

高效液相色谱-荧光检测法测定丹酚酸 B 的含量研究

王凤美¹, 李磊², 沈金灿¹, 王小如², 黎先春²

(1. 厦门大学化学化工学院化学系现代分析科学教育重点实验室, 福建 厦门 361005;

2. 国家海洋局第一海洋研究所, 山东 青岛 266061)

摘要:建立了丹酚酸 B 的高效液相色谱-荧光检测含量测定方法。色谱条件为: BACKMAN ODS 柱 (4.6mm i.d. × 250mm, 5 μ m), 以甲醇-0.5% 冰醋酸水溶液为流动相, 流速为 1.0mL/min; 荧光检测波长 λ_{EX} = 338nm, λ_{EM} = 443nm; 进样量 5 μ L。丹酚酸 B 进样量为 0.12~1.2 μ g 时, 其质量与峰面积呈良好的线性关系 ($r=0.9998$); 加样回收率为 98.6%~108%; 最低检测限为 0.013 μ g/mL。该法具有更高的灵敏度, 为丹酚酸 B 的药代动力学研究提供基础。

关键词: 高效液相色谱; 荧光检测法; 丹酚酸 B

中图分类号: R931 **文献标识码:** B

丹参为唇形科植物丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bge.) 干燥根及根茎, 俗名红根。现代医学研究表明: 丹参水溶性成分中丹酚酸类是治疗心血管病的主要有效部位^[1]。丹酚酸 B 在总酚酸类成分中含量最高, 且活性最强^[1]。药典委员会于 2002 年 3 月对 2000 版药典进行了修改和增补, 丹参片的质量鉴定增加了丹酚酸 B 的含量测定项目。丹酚酸 B 已成为丹参药材及制剂质量控制的一个重要指标。

高效液相色谱在药物分析中有着十分广泛的应用。在已报道的丹酚酸 B 高效液相色谱测定分析中, 广泛采用的检测方式是紫外检测^[2~4], 对于丹酚酸 B 的荧光检测未见有报道。由于丹酚酸 B 属于酚酸类结构, 具有 π 电子共轭体系^[5] (如图 1), 从而决定其具有较强的自然荧光特性。鉴于荧光检测有着较强的专一性和更高的灵敏度, 本文通过对丹酚酸 B 荧光特性的研究, 建立了高效液相色谱-荧光检测法用于丹酚酸 B 的含量测定。

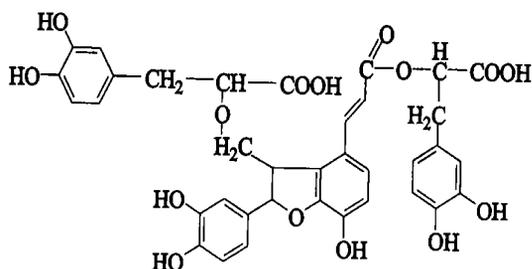


图 1 丹酚酸 B 的化学结构式

1 实验部分

1.1 仪器和试剂 仪器: Agilent 1100 高效液相色谱仪, 包括 G1311A 四元泵, G1313 自动进样器, G1321A 荧光检测器以及 1100 色谱工作站。AS5150A 超声波仪。

收稿日期: 2004-11-27

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (20235020)

作者简介: 王凤美 (1979-), 女, 山东济宁人, 硕士研究生, 主要从事中药有效成分的提取纯化及质量表征。

LXJ IIB 离心机。

试剂 甲醇、乙腈为色谱纯, 冰醋酸为分析纯, 水为超纯水; 丹酚酸 B 对照品由昆明同持医药研究有限公司提供 (含量 > 98%); 丹参药材由四川中江丹参基地提供; 复方丹参片和香丹注射液均为市售品。

1.2 色谱条件 色谱柱: BACKMAN ODS (4.6mm i.d. × 250mm, 5 μ m); 流动相 A: 0.5% 冰醋酸水溶液, 流动相 B: 甲醇; 梯度洗脱程序为: 0min: 30% B, 30min: 60% B; 流速: 1.0mL/min; 激发波长 λ_{EX} = 338nm, 发射波长 λ_{EM} = 443nm; 进样量: 5 μ L。

1.3 对照品溶液与待测液的制备 精密称取丹酚酸 B 标准品 2mg, 加水溶解定容至 10mL 棕色容量瓶中, 作为对照品储备液。

丹参药材 精密称取丹参粉末 (过 60 目筛) 约 0.1g, 置于 100mL 烧杯中, 加水 20mL 超声处理 20min。离心后取上清液过 0.45 μ m 微孔滤膜, 作为待测液。

复方丹参片 取 10 片药片, 除去糖衣, 研细, 过 60 目筛, 按照与丹参药材同样的方法处理。

香丹注射液 直接精密量取一定体积注射液, 过 0.45 μ m 微孔滤膜后稀释 10 倍, 进样测定。

2 结果与讨论

2.1 方法选择 **波长选择** 最佳激发波长和发射波长通过扫描荧光激发光谱和发射光谱进行确定。丹酚酸 B 标准溶液进样, 以较短波长 λ_{EM} = 260nm 作为激发波长, 进行丹酚酸 B 荧光发射光谱扫描, 选择最佳发射波长 λ_{EM} = 443nm, 然后固定发射波长 λ_{EM} = 443nm, 扫描激发光谱, 选择最佳激发波长 λ_{EX} = 338nm。

流动相选择 由于许多荧光体的荧光光谱受溶剂环境的影响, 特别是荧光物质为弱酸或弱碱时, 溶液的 pH 值改变将对荧光强度产生很大的影响^[6]。本实验考察了不同 pH 值条件下丹酚酸 B 的荧光响应强度 (结果见图 2)。结果表明随着酸度的增加, 丹酚酸 B 的荧光信号增强, 当 pH 值接近 3 时, 趋于平稳。由于所用 C₁₈ 色谱柱承受的 pH 范围为 2~8, 本实验采用 0.5% 冰醋酸水溶

液(pH 约为 3)作为水相,同时也改善了丹酚酸 B 的拖尾现象。实验还考察了有机相分别为甲醇和乙腈时丹酚酸 B 的荧光强度,结果在甲醇介质中的荧光强度较高,实验选择甲醇作为有机相。

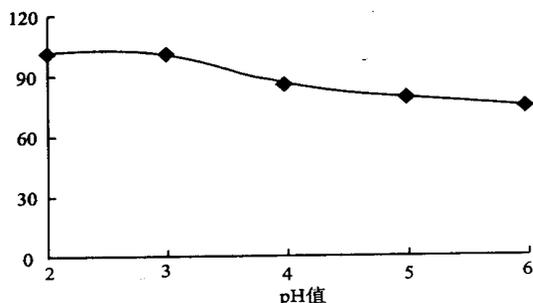


图 2 不同 pH 值条件下丹酚酸 B 的荧光响应强度

2.2 方法评价 线性关系与仪器精密度 精密量取丹酚酸 B 对照品储备液适量,加水稀释为 5 个不同浓度的标准溶液,进样 5 μ L。以峰面积为纵坐标,进样量(μ g)为横坐标,得丹酚酸 B 的线性回归方程: $Y = 1311.1X - 11.848$, ($r = 0.9998$);丹酚酸 B 在 0.12~ 1.2 μ g 范围内线性关系良好。浓度为 2.4mg/mL 的丹酚酸 B 标准溶液,重复进样 5 次,其峰面积的 RSD 为 1.60%。

加样回收实验 精密称取已知含量的丹参药材及复方丹参片粉末,分别加入一定量的丹酚酸 B 标准品,按样品处理方法制备,进样测定;直接量取适量香丹注射液,加一定量丹酚酸 B 对照品储备液,混合制样方法同前,进样测定。测得回收率见表 1。

表 1 丹酚酸 B 回收率实验结果($n = 6$)

| 样品 | 回收率(%) | RSD(%) |
|-------|--------|--------|
| 丹参药材 | 98.6 | 2.32 |
| 香丹注射液 | 99.6 | 3.32 |
| 复方丹参片 | 108 | 1.92 |

方法重现性与检出限 取同一批丹参药材,按待测液制备方法平行制备 6 份,进样测定,其 RSD 为 2.1%。本方法对丹酚酸 B 的最低检测限为 0.013 μ g/mL (以信噪比为 3 计)。

样品测定 本实验采用高效液相色谱-荧光检测法对丹参药材、复方丹参片及香丹注射液中丹酚酸 B 进行了含量测定(结果见表 2)。结果表明,本实验方法不仅适用于丹参药材的分析,同样也适用于丹参制剂的分析。该法操作简便,结果准确,重现性良好,灵敏度较高,为丹酚酸 B 的药代动力学、药理学的研究提供一种高灵敏度的检测手段。

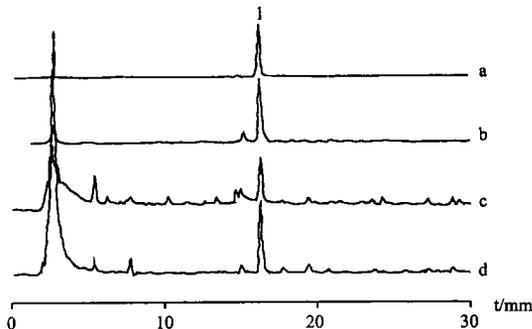


图 3 几种样品的色谱分离图

表 2 实际样品中丹酚酸 B 含量($\bar{X} \pm s, n = 6$)

| 样品 | 丹酚酸 B |
|-------|------------------------|
| 丹参药材 | 5.22 \pm 0.11(%) |
| 香丹注射液 | 1.12 \pm 0.02(mg/mL) |
| 复方丹参片 | 3.19 \pm 0.08(%) |

致谢:本研究得到青岛市现代分析技术及中药标准化重点实验室经费资助,特此感谢!

参考文献:

- [1] 杜冠华,张均田.丹参水溶性有效成分-丹酚酸研究进展[J].基础医学与临床,2000,2(5):394
- [2] 张启伟,张颖,李计萍,等.高效液相色谱法测定丹参中丹酚酸 B[J].中国中药杂志,2001,26(12):848
- [3] 顾洪安,余琛,王圣立,等.HPLC 法测定丹参中丹酚酸 B 的含量[J].药学服务与研究,2002,2(增刊):302
- [4] 程显隆,王峰,冯玉飞,等.丹参中丹酚酸 B 的高效液相色谱法含量测定[J].药物分析杂志,2003,23(2):149
- [5] LI Huar bin, LAI Jia ping, JIANG Yue, CHEN Feng [J]. Journal of Chromatography A, 943(2002): 235
- [6] 陈国珍.荧光分析法[M].第 2 版.北京:科学出版社,1990.83

Determination of Salvianolic acid B by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection

WANG Feng mei¹, LI Lei², SHEN Jir can¹, WANG Xiaor ru², LI Xiar chun²

(1. The Key Laboratory of Science of Ministry of Education of China, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China;

2. First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao 266061, Shandong, China)

Abstract: A new method for the determination of Salvianolic acid B by high performance liquid chromatography with fluorescence detection has been established. The column used was BACKMAN C₁₈ (4.6mm i. d. \times 250mm, 5 μ m); The mobile phase was methanol- 0.5% acetic acid solution with gradient condition at a flow rate of 1.0mL/min; The fluorescence detector was operated at $\lambda_{EX} = 338\text{nm}$ and $\lambda_{EM} = 443\text{nm}$ with the injection volume of 5 μ L. The result proved that Salvianolic acid B has a good linearity in the range of 0.12 μ g to 1.2 μ g with the correlation coefficient of 0.9998; The recoveries were 98.6% ~ 108%; The limit of detection is 0.013 μ g/mL. This method has a higher sensitivity and can be used in the study of pharmonic metabolize.

Key words: high performance liquid chromatography; fluorescence detection; salvianolic acid B