

卢超,郭文柱,梁剑平. 丹参酮灌注液质量标准研究[J]. 江苏农业科学,2014,42(7):231-233.

丹参酮灌注液质量标准研究

卢超^{1,2}, 郭文柱¹, 梁剑平¹

(1. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所药物研究室, 甘肃兰州 730050; 2. 中国农业科学院研究生院, 北京 100081)

摘要:为了制定丹参酮灌注液质量标准,采用薄层色谱(TLC)法对制剂中的丹参酮进行定性鉴别;采用高效液相色谱(HPLC)法对制剂中的隐丹参酮、丹参酮ⅡA进行含量测定。结果表明:TLC定性鉴别专属性强,重现性好;隐丹参酮的线性范围为3.54~17.68 μg/mL,平均回收率为96.86%,RSD值为1.14%;丹参酮ⅡA的线性范围为9.18~45.92 μg/mL,平均回收率为98.16%,RSD值为0.89%。对丹参总酮的定性鉴别、隐丹参酮及丹参酮ⅡA的含量测定可应用于丹参酮灌注液的质量控制。

关键词:丹参酮灌注液;薄层鉴别;含量测定;质量标准

中图分类号: S853.76 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)07-0231-02

丹参酮灌注液是中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所运用环糊精包合技术制备的丹参酮新制剂,是一种运用药物新技术制备出的针对奶牛乳房炎的新型中兽药。环糊精分子包合进入的成分主要为丹参酮类化合物,其中以隐丹参酮和丹参酮ⅡA的临床治疗效果最为显著确切^[1],已经有人对其体外抑菌活性进行了研究。本试验为建立该制剂质量标准,采用薄层色谱法^[2]对制剂中主要丹参酮类化合物进行定性鉴别,用高效液相色谱法对隐丹参酮、丹参酮ⅡA进行含量测定,以期为制定制剂质量标准提供依据^[3]。

1 材料与方法

1.1 试验材料

丹参酮灌注液,中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所委托河北某公司生产(批号20130722、20130725、20130728);丹参酮提取物,由笔者所在实验室自行提取(丹参总酮含量41.7%、隐丹参酮含量3.16%、丹参酮ⅡA含量11.57%);隐丹参酮标准品(批号:110852-200806)、丹参酮ⅡA标准品(批号:110766-200619)购自中国药品生物制品检定所。

1.2 仪器与试剂

Waters2695 高效液相色谱仪;GOODLOOK-1000 型薄层色谱成像系统(上海科哲生化科技有限公司);循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);DHG-9070 型电热恒温鼓风干燥箱(上海鸿都电子科技有限公司);0.22 μm 微孔滤膜(天津津腾实验设备有限公司);硅胶G板(青岛海洋化工厂);乙酸乙酯、无水乙醇均为国产分析纯;石油醚(60~90℃)、甲醇、乙腈均为色谱纯。

1.3 丹参酮薄层鉴定

收稿日期:2013-10-07

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2006BAD04A05-05)。

作者简介:卢超(1989—),男,四川广元人,硕士,主要从事中兽药新制剂研究。E-mail: luc19898@126.com。

通信作者:梁剑平,男,甘肃兰州人,博士,博士生导师,主要从事天然药物化学研究。Tel: (0931) 2115286; E-mail: liangjianping100@sina.com。

取丹参酮灌注液40 mL,加无水乙醇40 mL,摇匀,静置12 h,乙酸乙酯反复萃取3次,收集乙酸乙酯层,减压浓缩,加入适量甲醇溶解,定容至10 mL,作为供试品溶液;另取丹参药材0.5 g,加甲醇20 mL,加热回流提取1 h,放冷过滤,滤液蒸干,残渣加热水洗至洗液无色,残渣加甲醇1 mL溶解,作为对照药材溶液;另取隐丹参酮对照品与丹参酮ⅡA对照品,加甲醇制成1 mg/mL的溶液,作为对照品溶液;按照薄层色谱法(中国药典2010附录ⅥB)试验,各吸取上述4种溶液5 μL,分别点于同一硅胶G薄层板上,以石油醚(60~90℃)-乙酸乙酯(5:1)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外灯下(253 nm)视检。供试品色谱、对照药材色谱、对照品色谱在相应的位置上显现相同颜色的斑点。

1.4 隐丹参酮及丹参酮ⅡA含量测定

1.4.1 色谱条件及系统适应性条件 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,以乙腈为流动相A,以0.026%磷酸溶液为流动相B,按表1的规定进行梯度洗脱。检测波长为270 nm,柱温为25℃,流速为1.2 mL/min。理论板数按隐丹参酮峰计算,应不低于20 000。

表1 色谱条件

时间(min)	流动相A(%)	流动相B(%)
0~20	60~90	40~10
20~30	90	10

1.4.2 对照品溶液的制备 精确称取隐丹参酮4.42 mg,丹参酮ⅡA 11.48 mg,置于25 mL容量瓶中,用甲醇溶解定容,摇匀。隐丹参酮含量176.8 μg/mL,丹参酮ⅡA含量459.2 μg/mL。

1.4.3 供试品溶液的制备 取样品溶液10 mL,加入无水乙醇10 mL,振摇,静置12 h,乙酸乙酯反复萃取3次,收集乙酸乙酯层,减压浓缩蒸干,加入适量甲醇溶解并定容至20 mL容量瓶中,待测。

1.4.4 线性关系考察 用移液管分别精确吸取上述对照品贮备液1 mL,置于10 mL棕色容量瓶中,加无水甲醇稀释至刻度,摇匀,备用。用移液管分别精确吸取该浓度溶液0.4、0.8、1.2、1.6、2 mL于2 mL离心管中,加无水甲醇稀释至刻度;将丹参酮ⅡA配制成浓度分别为9.18、18.37、27.55、

36.74、45.92 μg/mL 的系列对照品溶液,将隐丹参酮配制成 3.54、7.07、10.61、14.14、17.68 μg/mL 的系列对照品溶液备用,以甲醇溶液作空白对照,在 270 nm 的检测波长处测定上述标准品,以峰面积对进样质量浓度进行回归分析。

1.4.5 加样回收率试验 取已知含量的 10 mL 样品溶液 6 份,分 2 组,每组 3 份,一组加入隐丹参酮标准品 100 μg、丹参酮ⅡA 标准品 200 μg,另一组加入隐丹参酮标准品 150 μg、丹参酮ⅡA 300 μg。按照供试品溶液制备方法制备样品,并按“1.4.1”的色谱条件测定峰面积并分别计算回收率及 RSD 值。

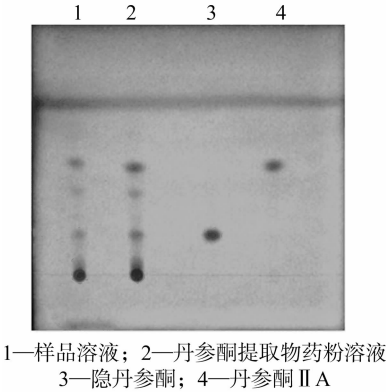
1.4.6 精密度试验 取浓度为 27.55 μg/mL 丹参酮ⅡA、10.61 μg/mL 隐丹参酮的对照品溶液,按照色谱条件连续测定 5 次,记录峰面积。取 20130512 批次样品 5 份,按照供试品溶液制备方法制备,并按上述色谱条件测定、记录峰面积,计算 RSD 值。

1.4.7 样品测定 取样品 3 批,各批次平行取样 3 份,按供试品处理方法处理,处理好的样品溶液按上述色谱条件进样、测定和记录峰面积。计算样品中的隐丹参酮、丹参酮ⅡA 含量。

2 结果与分析

2.1 丹参酮薄层色谱鉴定结果与分析

由图 1 可知,供试品色谱中,对照药材色谱、隐丹参酮及丹参酮ⅡA 的相应位置上有相同的颜色斑点,表明该方法具有专一性。



2.2 含量测定结果与分析

2.2.1 线性关系考察结果与分析 以丹参酮ⅡA 浓度 x 为横坐标,峰面积 y 为纵坐标,作标准曲线(图 2),得出回归方程为 $y = 94\,586x - 36\,618$ ($r = 0.999\,8$),结果表明丹参酮ⅡA 质量浓度在 9.18 ~ 45.92 μg/mL 范围内呈现良好的线性关系。以隐丹参酮浓度 x 为横坐标,峰面积 y 为纵坐标,作标准曲线(图 3),得出回归方程为 $y = 94\,776x + 32\,434$ ($r = 0.999\,8$),结果表明隐丹参酮质量浓度在 3.54 ~ 17.68 μg/mL 范围内呈现良好的线性关系。

2.2.2 加样回收率试验结果与分析 由表 2、表 3 可知,隐丹参酮的平均回收率为 96.86%,RSD 值为 1.14%;丹参酮ⅡA 的平均回收率为 98.17%,RSD 值为 0.89%。

2.2.3 精密度试验结果与分析 精密度试验中的 RSD 值为 0.75%,表明该方法精密度良好;重复性试验结果表明,丹参

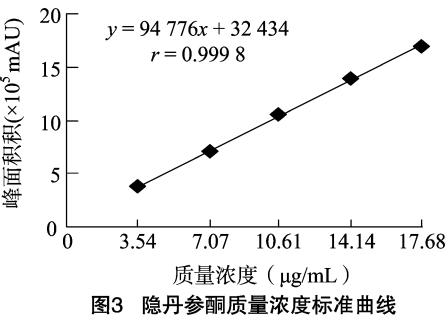
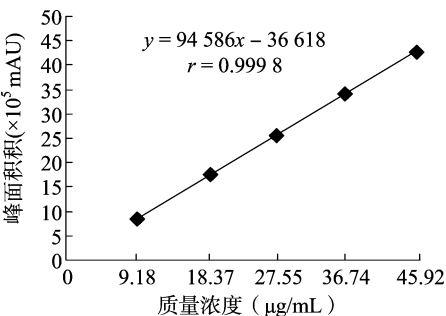


表 2 隐丹参酮回收率试验结果

隐丹参酮含量 (μg/mL)	添加量 (μg/mL)	测得值 (μg/mL)	回收率 (%)	RSD (%)
12.51	10	21.94	97.47	1.14
12.51	10	21.88	97.20	
12.51	10	21.56	95.78	
12.51	15	27.07	98.25	
12.51	15	26.73	97.16	
12.51	15	26.22	95.31	

表 3 丹参酮ⅡA 回收率试验结果

丹参酮ⅡA 含量 (μg/mL)	添加量 (μg/mL)	测得值 (μg/mL)	回收率 (%)	RSD (%)
36.71	20	55.08	97.12	0.89
36.71	20	55.43	97.74	
36.71	20	56.22	99.13	
36.71	30	66.14	99.14	
36.71	30	65.67	98.44	
36.71	30	64.99	97.42	

酮ⅡA 平均含量为 36.25 μg/mL,RSD 值为 0.88%,隐丹参酮平均含量为 14.86 μg/mL,RSD 值为 0.92%,表明样品中隐丹参酮、丹参酮ⅡA 含量测定的稳定性良好。

2.2.4 样品含量测定结果 经上述方法测定,批号 20130505 样品中隐丹参酮、丹参酮ⅡA 含量分别为 0.291、0.271 mg/mL;批号 20139512 样品中隐丹参酮、丹参酮ⅡA 含量分别为 0.276、0.265 mg/mL;批号 20130519 样品中隐丹参酮、丹参酮ⅡA 含量分别为 0.302、0.283 mg/mL。

3 结论与讨论

丹参酮是从植物丹参中提取出的一类脂溶性化合物^[4],

魏广莲,徐钢春,顾若波,等. 饲料中高不饱和脂肪酸对刀鲚幼鱼不同组织中 *FAD* 基因表达的影响[J]. 江苏农业科学,2014,42(7):233-236.

饲料中高不饱和脂肪酸对刀鲚幼鱼不同组织中 *FAD* 基因表达的影响

魏广莲¹, 徐钢春², 顾若波^{1,2}, 杜富宽², 徐 跑^{1,2}

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心/农业部淡水渔业和种质资源利用学科群重点实验室, 江苏无锡 214081)

摘要:选用初始体质量为(2.78 ± 0.09) g 的刀鲚幼鱼作为研究对象,随机分为 2 组(每组 3 个重复,每个重复 500 尾),分别投喂不添加鱼油(对照组)和添加 4.76% 精制鱼油(HUFA 组)的 2 种配合饲料,饲养 60 d 后采样。通过荧光定量 PCR 检测 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶基因在刀鲚幼鱼脑、肝脏、肌肉等不同组织中的表达量。结果显示:饲料中脂肪含量可以上调 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶基因在组织中的表达。HUFA 组刀鲚幼鱼 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶基因在肝脏、心脏中的表达量极显著高于对照组($P < 0.01$),在鳃中的表达量显著高于对照组($P < 0.05$)。

关键词:刀鲚;脂质代谢;精制鱼油; $\Delta 6$ -脂肪酸去饱和酶;基因表达;调控机制

中图分类号: S917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)07-0233-04

人工饲料中的脂肪含量关系到鱼类的营养成分、抗病力、繁殖性能以及肌肉品质。所以,鱼类饲料中脂肪源、脂肪添加量,特别是高不饱和脂肪酸(highly unsaturated fatty acids, HUFA)添加量成为人们关注的焦点。HUFA 在调控鱼类能量代谢、维持细胞膜结构等方面起重要作用^[1-2]。鱼类特别是海水鱼类的生长发育需要足量的 HUFA,所以,鱼类苗种培育中常使用强化 HUFA 的生物饵料,或者添加含有 HUFA 的人工饲料进行鱼苗培育^[3]。鱼油富含不饱和脂肪酸,特别是多

不饱和脂肪酸(EPA、DHA),所以,常被作为鱼类饲料优质的脂肪源^[4]。鱼类自身也能合成 HUFA,其合成能力主要受体内脂肪酸去饱和酶(fatty acid desaturase, FAD)、延长酶(fatty acid elongase, FAE)的限制^[5-6]。 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶($\Delta 6$ fatty acid desaturase, FADS6)可催化不饱和脂肪酸特定位置上的单键形成双键,在 HUFA 合成过程中起关键限速酶的作用。研究发现,淡水鱼体内 FAD 表达量升高,会使 HUFA 合成活性提高^[7]。鱼类的 *FAD* 基因结构功能高度保守且活性位点相同,但是合成 HUFA 能力差异很大。如军曹鱼(*Rachycentron canadum*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)等能利用亚油酸或亚麻酸等通过去饱和及延长碳链作用合成 HUFA,大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)、斑马鱼(*Danio rerio*)合成 HUFA 的能力较弱,需要外源补充^[8]。鱼类 HUFA 合成途径存在复杂的进化过程。刀鲚(*Coilia nasus*)隶属鲱形目鲱科鲱属,是长江及浅海水域重要的洄游性经济鱼类^[9]。刀鲚以肌肉肥美著称,营养价值极高。本研究以刀鲚幼鱼为研究对象,通过投喂添加精制鱼油的饲料,分析 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶在不同组

收稿日期:2013-10-23

资助项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费院级专项资金(编号:2013A0903);国家科技支撑计划(编号:2012BAD26B05);国家公益性行业(农业)科研专项(编号:201203065);江苏省水产三新工程重大专项(编号:DZ2012-1)。

作者简介:魏广莲(1987—),女,安徽淮南人,硕士,主要从事水产遗传育种和养殖技术研究。E-mail:593501773@qq.com。

通信作者:徐 跑,研究员,主要从事水产养殖技术研究。E-mail:xup@ffrc.cn。

由于此类化合物水溶性差,已有多种关于提高丹参酮水溶性并进行制剂改造的研究报道,石远等制备了注射用丹参酮 II A 包合物,该制剂通过包合技术制备出丹参酮水溶性注射液,以提高药物吸收及生物利用度^[5]。目前,研究团队已完成该制剂的制备工作,将对其进行质量控制研究。目前,很多中药新剂型及中药复方制剂都面临着成分复杂、分析难度大、标准品不足的问题。由于丹参酮类化合物标准品只有丹参酮 II A 及隐丹参酮,本试验也只能对这 2 种成分进行定性鉴别及定量分析,这 2 种化合物均为治疗奶牛乳房炎的有效成分。本研究运用薄层色谱法定性鉴别注射液中主要丹参酮类化合物,结果表明供试品与对照品在相同位置出现斑点,表明方法具有专一性。采用高效液相色谱法测定丹参酮 II A、隐丹参酮的含量,具有回收率高、分离度好、精密度高、重现性好和阴性无干扰的特点。因此对丹参酮类化合物的定性鉴别及对丹

参酮 II A、隐丹参酮 2 种化合物进行含量测定,能达到控制丹参酮注射液质量的目的,可为其质量标准的制定提供依据。

参考文献:

- [1] 强 喆,李晓明,梁剑平. 丹参酮包合物体外抑菌活性研究[J]. 西北农业学报,2013,22(5):196-203.
- [2] 中国药典委员会. 中华人民共和国药典 2010 版[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010.
- [3] 王胜义,齐志明,刘治岐,等. 黄白口服液的质量控制研究[J]. 中国畜牧兽医,2011(12):226-231.
- [4] 陈向荣,陆京伯,石汉平. 丹参的药理作用研究新进展[J]. 中国医院药学杂志,2001,21(1):44-45.
- [5] 石 远,石 惠,姜同英,等. 注射用丹参酮 II A 包合物的制备及性质考察[J]. 沈阳药科大学学报,2008(10):765-771.