后基本提取完全，所以，本文采用超声时间定为20 min。

3.4 检测波长的选择

在测定波长选择时，由于次野鸢尾黄素含量在本品中含量最低，所以在选择测定波长时尽可能优先考虑其测定时的最大吸收，因此选择265 nm作为检测波长。

参考文献

[1] 邱鹰昆. 射干的化学成分研究 [J]. 中国药学杂志, 2006, 41 (15): 1133-1135.

[2] 陈云珠. 射干药理作用的现代研究进展 [J]. 中国中医药现代化远程教育, 2006, 4 (10): 27-29.

[3] 李英娜, 张国刚, 毛德双, 等. 射干化学成分的研究 [J]. 中南药学, 2007, 5 (3): 222-224

[4] 林启寿. 中草药成分化学 [M]. 北京: 科学出版社, 1977: 284-285.

[5] 李英娜, 张国刚, 毛德双, 等. 射干总黄酮的提取工艺研究 [J]. 中南药学, 2007, 5 (6): 509-511.

[6] 中国药典2010版. 一部 [S]: 2010: 38-39.

[7] 万月生, 孙国祥, 邓湘昱. RP-HPLC测定射干抗病毒注射液中次野鸢尾黄素含量 [J]. 中南药学, 2004, 2 (3): 133-135.

[8] 杨明, 庞贺, 李国信, 等. HPLC法测定射干中射干苷的含量 [J]. 中医药学刊, 2008, 26 (4): 782-783.

[9] 王曙东. HPLC法测定川射干配方颗粒中射干苷的含量 [J]. 解放军药学学报, 2008, 24 (4): 367-368.

[10] 宋杨, 孙国祥. 反相高效液相色谱法测定射干抗病毒注射液中鸢尾苷的含量 [J]. 中南药学, 2008, 6 (5): 524-526.

[11] 陈银华, 孟军华, 侯俊杰, 等. 高效液相色谱法测定栽培射干中次野鸢尾黄素的含量 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18 (6): 1391-1392.

[12] 张华年, 宋新文, 陈渝军, 等. 肺炎喘嗽液质量控制方法的研究 [J]. 中国医院药学杂志, 1999, 19 (1): 13-15.

[13] 刘德茂, 林艳, 李振学. HPLC法测定射干利咽口服液中次野鸢尾黄素 [J]. 中草药, 2006, 37 (3): 382-383.

(收稿日期: 2010-04-12; 修回日期: 2010-05-10)

高效液相色谱法测定复方丹参喷雾剂中丹酚酸B和丹参酮ⅡA的含量

张永东[1], 钟颖[1], 谭鸿毅[2], 金承怀[2], 孟亚军[2], 阳国平[2*] (1. 湘西州人民医院, 湖南 吉首 41600; 2. 中南大学湘雅三医院, 长沙 410013)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法测定复方丹参喷雾剂中丹酚酸B和丹参酮ⅡA的含量。方法 采用高效液相色谱法测定, 测定丹酚酸B色谱柱为ultimate XB-C_{18}柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-乙腈-甲酸-水(29∶9∶1∶61), 流速为1 mL·min^{-1}, 检测波长为286 nm, 柱温为室温; 测定丹参酮ⅡA色谱柱为ultimate XB-C_{18}柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm, 流动相为甲醇-水 (76∶24), 流速为1 mL·min^{-1}, 检测波长264 nm, 柱温为室温。结果 丹酚酸B在7.2~460 μg·mL^{-1}与峰面积线性关系良好, r=0.999 9, 平均回收率为97.0%, RSD为6.0% (n=6); 丹参酮ⅡA在3.8~245 μg·mL^{-1}与峰面积线性关系良好, r=0.999 5, 平均回收率为97.3%, RSD为8.3% (n=6)。结论 该方法灵敏、准确、重复性好, 可作为评价复方丹参喷雾剂质量的方法。

关键词: 复方丹参喷雾剂; 丹酚酸B; 丹参酮ⅡA; 高效液相色谱

中图分类号: R927.2, R917 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981 (2010) 06-0434-04

Determination of salvianolic acid B and tanshinone ⅡA in Fufang Danshen Penwuji by HPLC

ZHANG Yong-dong[1], ZHONG Ying[1], TAN Hong-yi[1], JIN Cheng-huai[2], MENG Ya-jun[2], YANG Guo-ping[2*] (1. *People's Hospital of Xiangxi Autonomous Prefecture, Jishou Hunan* 416000; 2. *Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha* 410013)

Abstract: Objective To develop an HPLC method for the determination of salvianolic B and tanshinone ⅡA in Fufang

作者简介: 张永东, 男, 主管药师, 主要从事医院药学工作, Tel: (0731) 8267244, E-mail: xiangxizyd@163.com * 通讯作者: 阳国平, 男, 副教授, 主要从事临床药理学和药物研发, E-mail: ygp9880@163.com, Tel: (0731) 88618339。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Danshen Penwuji and to control its quality. **Methods** The content of salvianolic B was analyzed with ultimate XB- C_{18} (250 mm× 4.6 mm, 5 μm) column. For sawiandic acid B the mobile phase consisted of methanol-acetonitrile-methanoic acid-water (29∶ 9∶ 1∶ 61) at 1.0 mL· min^{-1}. The detective wavelength was 286 nm. Tanshinone $ⅡA$ was analyzed with ultimate XB-C_{18} (250 mm× 4.6 mm, 5 μm) column. For tanshinone $ⅡA$ the mobile phase consisted of methanol-water (76∶ 24) at 1.0 mL· min^{-1}. The detective wavelength was 264 nm. **Results** The salvianolic acid B curve was linear at 7.2- 460 μg· L^{-1} (r= 0.9999). The average recovery was 97.0%, with the RSD 6.0% (n= 6). The tanshinone $ⅡA$ curve was linear at 3.8- 245 μg· L^{-1} (r= 0.9995). The average recovery was 97.3%, with the RSD 8.3% (n= 6). **Conclusion** The method is sensitive, accurate, reproducible and can be used for the quality control of Fufang Danshen Penwuji.

Key words: Fufang Danshen Penwuji; salvianolic acid B; tanshinone $ⅡA$; HPLC

复方丹参方是由丹参、三七、冰片 3 味药组成的治疗胸中憋闷、心绞痛的经典中药方剂，疗效肯定[1]。目前市场上供应的剂型主要为片剂、粉针剂、滴丸等，现代药理研究已证实丹参的水溶性丹酚酸类及脂溶性丹参酮类均是治疗冠心病、心绞痛的有效成分[2-7]。目前已上市的复方丹参制剂中要么只考虑到丹参脂溶性成分，要么只考虑水溶性成分，或者成分不富集。本实验研制了含有丹参脂溶性和水溶性两类有效成分的复方喷雾剂，并且这两类成分在制剂中的含量达到要求。

复方丹参喷雾剂的制备：丹参 1 kg、三七总皂苷 65 g、冰片 10 g，丹参经过超临界萃取后的醇提物与冰片混合，加入溶剂及相应辅料，得喷雾剂的脂溶性部分；另将丹参水提物和三七总皂苷混合后加入溶剂及辅料得喷雾剂的水溶性部分。将所制得的脂溶性部分和水溶性部分各 1 000 mL 分别灌装于自主设计的喷雾剂装置的独立两腔中，得复方丹参喷雾剂样品[8-12]。

为了有效地控制该药品的质量，笔者采用了 HPLC 法分别测定水溶性成分丹酚酸 B 和脂溶性成分丹参酮 $ⅡA$ 的含量，现报道如下。

1 仪器与试药

岛津 LC-20A 液相色谱仪（配备 CBM-20ALite 系统控制器，LC-20AT 输液泵，CTO-20A 柱温箱，SIL-20A 自动进样器，SPD-20A 检测器，LC solution 工作站，日本岛津）。

丹酚酸 B 对照品（上海诗丹德生物技术有限公司，批号：02/071218，纯度> 99%）；丹参酮 $ⅡA$ 对照品（供含量测定用，批号：110766-200518，中国药品生物制品检定所）；甲醇、乙腈（色谱纯，Tedia 公司）；其余试剂为分析纯；复方丹参喷雾剂（自制，规格：10 mL· 瓶$^{-1}$，批号：080311、080312、080313）。

2 丹酚酸 B 的含量测定

2.1 色谱条件[13-15]

色谱柱：ultimate XB-C_{18} 柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；流动相：甲醇-乙腈-甲酸-水（29∶ 9∶ 1∶ 61），流速为 1 mL· min^{-1}，柱温为室温，检测波长 286 nm；进样量 10 μL。

2.2 溶液制备

2.2.1 供试品溶液 精密吸取复方丹参喷雾剂溶液 1 mL 置于 25 mL 容量瓶中，用甲醇稀释并定容至刻度，摇匀，经 0.45 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液，即得供试品溶液。

2.2.2 阴性样品溶液 按处方比例、复方丹参喷雾剂制备工艺制备不含丹酚酸类成分的阴性样品；取阴性样品，按“2.2.1”项下方法操作，即得阴性样品溶液。

2.2.3 对照品溶液 精密称取丹酚酸 B 对照品 4.6 mg 置于 10 mL 容量瓶中，甲醇溶解并定容至刻度，配制成 460 μg· mL^{-1} 的对照品储备液。

2.3 系统适应性实验

分别精密吸取对照品储备液、阴性样品及供试品溶液各 10 μL，注入高效液相色谱仪测定，结果见图 1。理论塔板数按丹酚酸 B 计应≥3 000，分离度应> 1.5。阴性样品中杂质不干扰丹酚酸 B 的测定。

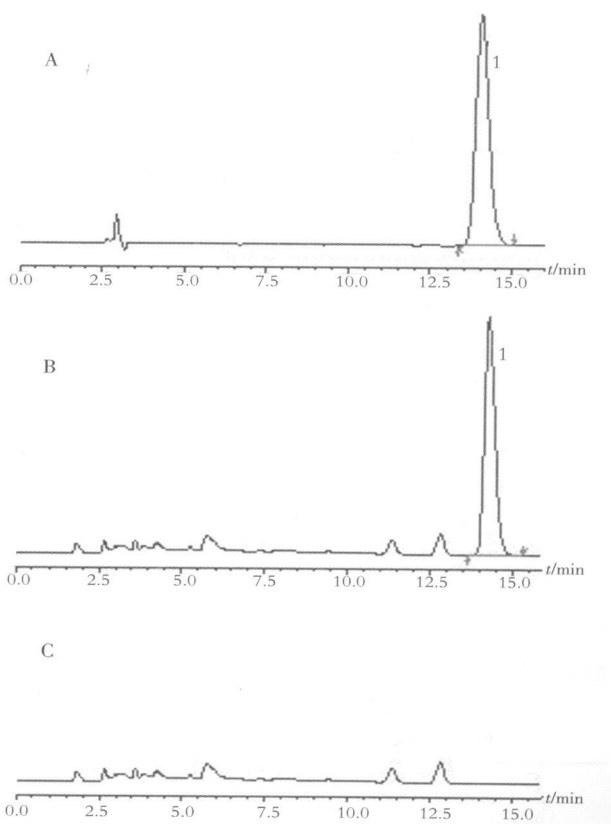

图 1 丹酚酸 B 的色谱图

Fig 1 HPLC of salvianolic acid B

A. 对照品（reference）；B. 供试品（sample）；C. 阴性样品（negative sample）；1. 丹酚酸 B（salvianolic acid B）

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.4 线性关系

将对照品储备液加流动相稀释成7.187 5、14.375、28.75、57.5、115、230、460 μg·mL^{-1}系列标准溶液，分别进样10 μL，记录峰面积，以峰面积与浓度进行线性回归，得标准曲线方程 $Y=5.828\times10^{3}X-1.747\times10^{3}$，$r=0.999\,9$。丹酚酸B在7.2~460 μg·mL^{-1}与峰面积具有良好线性关系。

2.5 精密度试验

取同一供试品溶液（批号：080311），连续进样5次，考察丹酚酸B峰面积的变化情况，计算得RSD为1.45%。结果表明，该方法精密度良好。

2.6 稳定性试验

将供试品溶液配制后放置0、4、8、12 h，分别进样10 μL，记录色谱图，考察供试品溶液放置后丹酚酸B峰面积的变化情况，计算得RSD为1.19%。结果表明，供试品溶液放置12 h稳定。

2.7 重复性试验

取同一批号样品（批号：080311）5份，按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定并计算，结果RSD分别为2.37%，本法重复性好。

2.8 回收试验

取已知浓度样品（批号：080311，2.202 mg·mL^{-1}）6份，每份0.1 mL，分别精密加入丹酚酸B对照品溶液0.5 mL，按“2.2.1”项下方法制备并进行量测定法，计算回收率。平均回收率为97.0%，RSD为6.0%，结果见表2。

表1 样品回收率（$n=6$）

Tab 1 Recovery of salvianolic acid B ($n=6$)

序号 (No.)	样品含量 (sample content) /mg	加入量 (added amount) /mg	测得量 (detected amount) /mg	回收率 (recovery) /%	RSD /%
1	0.220 2	0.230 0	0.429 3	90.9	
2	0.220 2	0.230 0	0.457 9	103.4	
3	0.220 2	0.230 0	0.461 3	104.8	
4	0.220 2	0.230 0	0.442 5	96.7	6.0
5	0.220 2	0.230 0	0.432 7	92.4	
6	0.220 2	0.230 0	0.435 4	93.6	

2.9 样品含量测定

取3批样品各适量，按“2.2.1”项下方法制备，按“2.1”项下方法测定，按外标法以峰面积计算供试品中丹酚酸B的含量，结果见表3。

表2 样品中丹酚酸B的含量（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Content of salvianolic acid B ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

批号 (batch)	含量 (content) /mg·mL^{-1}	RSD /%
080311	2.16±0.08	2.0
080312	2.17±0.11	2.7
080313	2.13±0.16	4.1

3 丹参酮ⅡA的含量测定[16]

3.1 方法

丹参脂溶性成分丹参酮ⅡA的测定方法较成熟，本文参考李迎春的文献[16]测定：色谱柱ultimate XB-C_{18}柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：甲醇-水（76∶24），流速：1 mL·min^{-1}，柱温：室温，检测波长264 nm，丹参酮ⅡA的保留时间为30 min，其他成分无干扰。标准曲线：$Y=3.010\times10^{4}X-2.165\,8\times10^{4}$，$r=0.999\,5$，线性范围3.8~245 μg·mL^{-1}。

3.2 回收试验

取已知浓度样品（批号：080311，0.250 mg·mL^{-1}）6份，每份0.5 mL，分别精密加入丹参酮ⅡA对照品溶液（0.245 mg·mL^{-1}）0.5 mL，按“2.2.1”项下方法制备并按含量测定法进行测定，计算回收率。平均回收率为97.3%，RSD为8.3%，结果见表4。

表3 丹参酮ⅡA回收试验结果（$n=6$）

Tab 3 Recovery of tanshinone ⅡA ($n=6$)

序号 (No.)	样品含量 (sample content) /mg	加入量 (added amount) /mg	测得量 (detected amount) /mg	回收率 (recovery) /%	RSD /%
1	0.125 0	0.122 5	0.236 5	91.0	
2	0.125 0	0.122 5	0.236 7	91.2	
3	0.125 0	0.122 5	0.258 3	108.8	
4	0.125 0	0.122 5	0.235 6	88.0	8.3
5	0.125 0	0.122 5	0.243 6	96.8	
6	0.125 0	0.122 5	0.254 2	105.5	

3.3 样品含量测定

取3批样品各适量，依法测定，按外标法以峰面积计算供试品中丹参酮ⅡA的含量，结果见表5。

表4 样品中丹参酮ⅡA的含量（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 4 Content of tanshinone ⅡA ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

批号 (batch)	含量 (content) /mg·mL^{-1}	RSD /%
080311	0.247±0.006	2.3
080312	0.242±0.009	3.7
080313	0.245±0.007	3.1

4 讨论

4.1 指标成分的选择

丹酚酸B、丹参素、原儿茶醛为丹参水溶性成分的代表，且与功效直接相关，中国药典2005版采用了RP-HPLC法测定了丹参素的含量；而丹酚酸B在本品以及原药材中含量最高，经现代药理学证明它在治疗心血管系统疾病方面疗效显著，应该对其进行含量测定。本试验建立了复方丹参喷雾剂中水溶性有效成分丹酚酸B含量方法及参考文献中脂溶性有效成分丹参酮ⅡA的含量测定方法，建立的方法简单、快速，为丹参类制剂质量。

4.2 流动相的选择

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

本试验测定丹酚酸 B 时曾选择了几种不同的流动相系统：甲醇-水-醋酸、乙腈-水醋酸等，只有以甲醇-乙腈-甲酸-水（29∶9∶1∶61）分离效果最好，丹酚酸 B 峰与其他杂质峰达到基线分离。

4.3 柱温的选择

本研究中曾考察过 25、30、40 ℃等不同柱温对测定丹酚酸 B 结果的影响。结果表明，各色谱峰在不同温度时几乎无变化，故柱温选择室温。

参考文献

[1] 中国药典 2005 年版. 一部 [S]. 2005: 527-528.

[2] Adam Matkowski, Sylwia Zielinska. Activity of extracts from leaves and roots of Salvia miltiorrhiza Bunge, S. przewalskii Maxim, and S. verticillata L [J]. Bioresource Technology, 2008, 99 (16): 7892-7896.

[3] 吕炳强，范英昌，孙莲胜. 丹酚酸 B、丹参酮 $\mathrm{II_A}$ 对动脉粥样硬化家兔血清一氧化氮及甘油三酯的影响 [J]. 天津中医学院学报，2006, 25 (1): 32-34.

[4] 郭利平，张萌，杜嵘，等. 丹酚酸 B/丹参酮 $\mathrm{II_A}$ 不同配比对缺氧损伤 CMEC 影响 [J]. 中国中医基础医学杂志，2004, 10 (4): 35-38.

[5] 张萌，张伯礼，高秀梅，等. 丹酚酸 B/丹参酮 $\mathrm{II_A}$ 不同配比对肿瘤坏死因子-α 损伤大鼠心肌细胞的影响 [J]. 中国药理学通报，2003, 9 (19): 992-994.

[6] 江莉华，徐天生，陈兴兴，等. 高效液相色谱测定丹参中丹酚酸 B 含量的方法研究 [J]. 时珍国医国药，2007, 18 (6): 1395-1396.

[7] 张伯礼，高秀梅，商洪才，等. 复方丹参方的药效物质及作用机理研究 [J]. 世界科学技术中医药现代化，2003, 5 (5): 14-17.

[8] 张辉等，药物新制剂手册 [M]. 郑州：河南科学技术出版社，2001: 326.

[9] 金勇群，潘金火. 中药喷雾剂的研究概况 [J]. 时珍国医国药，2005, 16 (7): 655-656.

[10] 崔福德. 药剂学 [M]. 北京：人民卫生出版社，2003.

[11] 刘延泽. 植物组织破碎提取法及闪式提取器的创制与实践 [J]. 中国天然药物，2007, 5 (6): 401-407.

[12] 黄祖发，袁洪，阳国平. 可同时实现多腔喷雾的喷雾装置 [P]. 中国专利：ZL200520050990. 6, 2005-6-2.

[13] 李向军，刘敏彦，赵兴茹，等. 丹参水溶性成分提取工艺研究 [J]. 中国中医药信息杂志，2005, 12 (12): 49-50.

[14] 张军，王凤云，詹丽玲，等. 丹参药材提取液中丹酚酸 B 稳定性影响因素的考察 [J]. 中国中药杂志，2005, 30 (10): 789-790.

[15] 李晓红，冯玛莉，刘霞，等. 高效液相色谱法测定丹芪养血颗粒中丹酚酸 B 的含量 [J]. 中南药学，2008, 6 (5): 557-559.

[16] 李迎春，曾健青，刘莉玫，等. 丹参中 3 种丹参酮的超临界二氧化碳萃取及液相色谱分析 [J]. 色谱，2002, 20 (1): 40-42.

（收稿日期：2010-01-28；修回日期：2010-04-28）

雷帕霉素对 TGF-β1 诱导的 Treg 细胞的体外影响

刘华[1]，何敏[1]，刘建胜[2]，卢思广[2]（1. 徐州医学院，江苏 徐州 221002；2. 徐州医学院附属连云港医院儿科，江苏 连云港 222002）

摘要：目的 体外观察雷帕霉素（Rapa）对转化生长因子-β1（TGF-β1）诱导的 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞（iTreg）扩增的有效性及其相关性。方法 以抗原提呈细胞（APC）、植物血凝素（PHA，10 μg·L^{-1}）、TGF-β1（7.5 ng·L^{-1}）联合刺激诱导 $CD4^+CD25^-$ T 细胞转化为 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞，培养第 5 日添加不同浓度 Rapa 刺激培养 3 d 作为实验组，设阴性对照组（不加 Rapa）和空白对照组（RPMI 1640 培养基），FCM 检测各组中 $CD4^+CD25^+$ T 细胞比例变化情况；MTT 法测定各组诱导细胞的抑制功能。结果 ①阴性对照组 $CD4^+CD25^+$ T 细胞比例较空白对照组增高（$P<0.01$），而实验组 $CD4^+CD25^+$ T 细胞比例显著升高，Rapa（100 ng·mL^{-1}）增殖效应显著（$P<0.01$），$CD4^+CD25^+$ T 细胞增殖比例达到 42.6%；②实验组 iTreg 细胞能够明显抑制同型 $CD4^+CD25^-$ T 细胞的增殖（$P<0.01$）且不同浓度 Rapa 之间存在差异，100 ng·mL^{-1} Rapa 抑制效应最明显（$P<0.01$）。结论 在体外条件下，Rapa 可以促进 TGF-β1 诱导分化的 Treg 细胞增殖，且具有免疫抑制功能，这为体外回输 Treg 细胞治疗疾病开辟了新途径。

关键词：雷帕霉素；转化生长因子-β1；$CD4^+CD25^-$ 调节性 T 细胞

中图分类号：R966 文献标识码：A 文章编号：1672-2981（2010）06-0437-05

作者简介：刘华，女，在读硕士研究生，从事调节性 T 细胞体外扩增的研究，Tel: 15150946195，E-mail: liuhua90024@sohu.com

* 通讯作者：卢思广，男，教授，硕士生导师，主要从事儿科肾脏病的研究，Tel: 18961325050，E-mail: lsghospital@yahoo.com.cn

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net