

波长切换 HPLC 法同时测定丹参中 5 种水溶性成分的含量^Δ

暴风伟*, 张振秋#, 刘玉强, 尤春雪, 梁朔, 杨超(辽宁中医药大学, 辽宁大连 116600)

中图分类号 R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)11-1002-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.11.15

摘要 目的: 建立同时测定丹参中 5 种水溶性成分(丹参素钠、原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B)含量的方法。方法: 采用波长切换高效液相色谱法。色谱柱为 Phenomil-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.5% 磷酸水(梯度洗脱), 流速为 1.0 ml/min, 检测波长为 280 nm(0~<50 min)、330 nm(50~<68 min)、286 nm(68~90 min), 柱温为 30 ℃。结果: 丹参素钠、原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 的进样量分别在 0.033 96~0.339 60、0.016 60~0.166 00、0.092 40~0.924 00、0.122 80~1.228 00、1.300 00~13.000 00 μg 范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系(r 分别为 0.999 1、0.999 4、0.999 9、0.999 7、0.999 5); 平均加样回收率分别为 98.2%、98.9%、99.5%、99.9%、99.8%, RSD 分别为 1.5%、2.0%、2.1%、2.7%、2.4% (n 均为 6)。结论: 本方法快速、准确、重复性好, 可用于丹参的质量控制。

关键词 高效液相色谱法; 波长切换; 丹参; 丹参素钠; 原儿茶醛; 迷迭香酸; 紫草酸; 丹酚酸 B; 含量测定

Simultaneous Determination of 5 Water-soluble Ingredients in *Salvia miltiorrhiza* by HPLC with Wavelength Switching System

BAO Feng-wei, ZHANG Zhen-qiu, LIU Yu-qiang, YOU Chun-xue, LIANG Shuo, YANG Chao(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Liaoning Dalian 116600, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for simultaneous determination of 5 kinds of water-soluble ingredients (sodium danshensu, protocatechuic aldehyde, rosmarinic acid, lithospermic acid and salvianolic acid B) in *Salvia miltiorrhiza*. METHODS: HPLC with wavelength switching system was used. The separation was performed on Phenomil-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.5% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. Detection wavelengths were set at 280 nm in 0-<50 min, 330 nm in 50-<68 min, 286 nm in 68-90 min. The column temperature was 30 ℃. RESULTS: Sodium danshensu, protocatechuic aldehyde, rosmarinic acid, lithospermic acid, salvianolic acid B had good linearity in the ranges of 0.033 96-0.339 60 μg ($r=0.999 1$), 0.016 60-0.166 00 μg ($r=0.999 4$), 0.092 40-0.924 00 μg ($r=0.999 9$), 0.122 80-1.228 00 μg ($r=0.999 7$), 1.300 00-13.000 00 μg ($r=0.999 5$), respectively. Average recoveries were 98.2%, 98.9%, 99.5%, 99.9% and 99.8%, and RSDs were 1.5%, 2.0%, 2.1%, 2.7% and 2.4% ($n=6$). CONCLUSION: The developed method is rapid, accurate and repeatability, which is suitable for the quality control of *S. miltiorrhiza*.

KEY WORDS HPLC; Wavelengths switching; *Salvia miltiorrhiza*; Sodium danshensu; Protocatechuic aldehyde; Rosmarinic acid; Lithospermic acid; Salvianolic acid B; Content determination

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎, 味苦, 性微寒, 归心、肝经, 具有活血祛瘀、通经止痛、凉血消痈等功效, 用于治疗胸痹心痛、腕腹胀痛、癥瘕积聚、热痹疼痛、心烦不眠、月经不调、痛经经闭、疮疡肿痛^[1]。传统医学认为, 丹参走血分, 通血脉, 功擅活血化瘀。《妇人明理论》记载: “一味丹参, 功同四物。”丹参的化学成分主要分为脂溶性和水溶性两大部分, 脂溶性成分主要有丹参酮 II_A、丹参酮 II_B、丹参酮 I、隐丹参酮 I 等; 水溶性成分主要有丹参素钠、原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、咖啡酸等。本试验采用波

长切换高效液相色谱(HPLC)法建立了同时测定丹参中丹参素钠、原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 5 种水溶性成分含量的方法, 该方法简便、快速、准确、重复性好, 可为更好地控制丹参质量提供依据。

1 材料

1.1 仪器

1100 HPLC 仪, 含四元梯度泵、在线脱气机、VWD 检测器(美国 Agilent 公司); AS3120A 超声提取器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司); 2140 电子分析天平[奥豪斯仪器(上海)有限公

^Δ 基金项目: 国家科技重大专项课题资助(No.2010ZX09401-304-5-6)

* 硕士研究生。研究方向: 药物分析。E-mail: weiwei115566@126.com

通信作者: 教授, 博士。研究方向: 药物分析。电话: 0411-87586058。E-mail: zhangzhenqiu@sina.com

本栏目协办

江阴天江药业有限公司

地址: 江苏省江阴市经济开发区秦望山路 8 号 电话: 400 066 9211
传真: 0510-86409611 网址: <http://www.tianjiang.com>

司]; AB135-S 十万分之一电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); U-3010 紫外-可见分光光度计(日本日立公司)。

1.2 试剂

丹参素钠(批号: 110855-200809, 纯度: 100.0%)、原儿茶醛(批号: 110810-200205, 纯度: 98.6%)、迷迭香酸(批号: 111871-201001, 纯度: 98.8%)、丹酚酸 B(批号: 111562-201009, 纯度: 96.0%) 对照品均购于中国食品药品检定研究院; 紫草酸对照品(四川省维克奇生物科技有限公司, 批号: 110326, 纯度: 98.8%); 乙腈、甲醇(色谱纯, 山东省禹王实业总公司化学试剂厂); 水为重蒸水, 磷酸为分析纯。

1.3 药材

10 批不同来源(分别来源于上海、浙江、吉林、河北、江苏、云南、北京、山东、辽宁、天津)的丹参饮片, 经辽宁中医药大学李峰教授鉴定均为真品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Phenomil-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.5% 磷酸水(B), 梯度洗脱(洗脱程序见表 1); 检测波长: 280 nm (0~<50 min, 丹参素钠、原儿茶醛), 330 nm (50~<68 min, 迷迭香酸), 286 nm (68~90 min, 紫草酸、丹酚酸 B); 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μl。理论板数按丹酚酸 B 峰计算应>100 000, 分离度>1.5。色谱见图 1。

表 1 HPLC 梯度洗脱程序

Tab 1 HPLC gradient elution procedure

时间, min	流动相 A, %	流动相 B, %
0	5	95
10	10	90
13	15	85
35	18	82
50	18	82
90	33	67

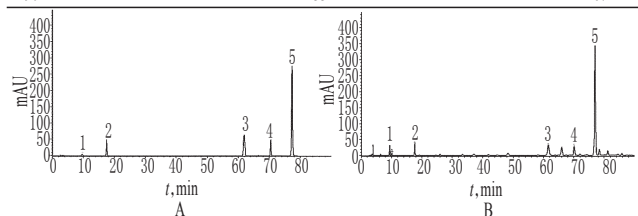


图 1 高效液相色谱图

A. 混合对照品; B. 供试品(上海); 1. 丹参素钠; 2. 原儿茶醛; 3. 迷迭香酸; 4. 紫草酸; 5. 丹酚酸 B

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixed control; B. test sample (Shanghai); 1. sodium danshensu; 2. protocatechuic aldehyde; 3. rosmarinic acid; 4. lithospermic acid; 5. salvianolic acid B

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 分别精密称取丹参素钠、原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 5 种对照品各适量, 加甲醇制成每 1 ml 含丹参素钠 0.566 mg、原儿茶醛 0.830 mg、迷迭香酸 0.525 mg、紫草酸 0.614 mg、丹酚酸 B 1.300 mg 的对照品贮备液, 备用。分别精密量取上述 5 种对照品贮备液各适量, 加甲醇制成每 1 ml 含丹参素钠 16.98 μg、原儿茶醛 8.30 μg、迷迭香酸 46.20 μg、紫草酸 61.40 μg、丹酚酸 B 650.00 μg 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取不同来源的丹参饮片各约 0.5 g, 精密称定, 分别加 20 倍量水回流提取 3 次, 每次 2 h, 合并滤液并浓

缩至 25 ml, 通过 10 g 的 AB-8 大孔吸附树脂柱, 用 3 倍柱体积水以每小时 6 倍柱体积的速率洗脱, 弃去水洗液, 用 2 倍柱体积 50% 乙醇以每小时 4 倍柱体积的速率洗脱, 收集洗脱液, 回收乙醇并浓缩至 25 ml, 以 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.3 线性关系考察

分别精密量取混合对照品溶液 2、4、8、12、16、20 μl, 注入 HPLC 仪, 按上述色谱条件测定, 记录峰面积。以进样量(x)为横坐标, 峰面积积分值(y)为纵坐标, 进行线性回归, 得回归方程, 详见表 2。

表 2 丹参中 5 种水溶性成分的回归方程、相关系数(r)和线性范围(n=6)

Tab 2 Regression equations, correlation coefficients and linear ranges of 5 water-soluble ingredients in *S. miltiorrhiza* (n=6)

成分	回归方程	r	线性范围, μg
丹参素钠	$y=10.53x+0.55$	0.999 1	0.033 96~0.339 60
原儿茶醛	$y=36.97x-9.30$	0.999 4	0.016 60~0.166 00
迷迭香酸	$y=129.90x-31.29$	0.999 9	0.092 40~0.924 00
紫草酸	$y=74.02x-15.26$	0.999 7	0.122 80~1.228 00
丹酚酸 B	$y=569.67x+88.38$	0.999 5	1.300 00~13.000 00

2.4 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液 10 μl, 在上述色谱条件下连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果, 丹参素钠、原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 的 RSD 分别为 0.8%、1.0%、0.9%、1.2%、0.6% (n 均为 6), 表明仪器精密度良好。

2.5 重复性试验

取同一批丹参饮片(上海)约 0.5 g, 共 6 份, 精密称定, 分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下进样测定, 记录峰面积, 计算样品含量。结果, 每 1 g 样品中平均含丹参素钠、原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 0.792 4、0.573 9、2.216 0、3.239 0、42.590 0 mg, RSD 分别为 2.2%、1.3%、1.2%、1.5%、1.0% (n 均为 6), 表明本方法重复性良好。

2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液(上海)适量, 室温下放置, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 在上述色谱条件下进样分析, 记录峰面积。结果, 丹参素钠、原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 的 RSD 分别为 1.8%、1.2%、1.7%、1.1%、1.2% (n 均为 6), 表明供试品溶液中上述 5 种水溶性成分在 24 h 内稳定性良好。

2.7 加样回收率试验

称取已知含量(丹参素钠、原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 分别为 0.792 4、0.573 9、2.216 0、3.239 0、42.590 0 mg/g)的丹参饮片(上海)6 份, 每份约 0.25 g, 精密称定。分别准确加入丹参素钠、原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 的对照品贮备液依次为 0.35、0.17、1.0、1.3、4.2 ml, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下进样测定, 计算加样回收率, 结果见表 3。

2.8 样品含量测定

取 10 批不同来源的丹参饮片各约 0.5 g, 精密称定, 分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下进样测定, 以外标法计算样品中丹参素钠、原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 5 种水溶性成分的含量, 结果见表 4。

3 讨论

3.1 供试品溶液的制备

表3 丹参中5种水溶性成分的加样回收率试验结果(n=6)

Tab 3 Results of recovery tests of 5 water-soluble ingredients in *S. miltiorrhiza* (n=6)

成分	称样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
丹参素钠	0.250 6	0.198 6	0.198 1	0.393 9	98.6	98.2	1.5
	0.253 3	0.200 7	0.198 1	0.392 7	96.9		
	0.251 4	0.199 2	0.198 1	0.396 3	99.5		
	0.251 8	0.199 5	0.198 1	0.392 0	97.2		
	0.253 4	0.200 8	0.198 1	0.399 5	100.3		
原儿茶醛	0.252 4	0.200 0	0.198 1	0.391 8	96.8	98.9	2
	0.250 6	0.143 8	0.141 1	0.286 9	101.4		
	0.253 3	0.145 4	0.141 1	0.284 9	98.9		
	0.251 4	0.144 3	0.141 1	0.281 3	97.1		
	0.251 8	0.144 5	0.141 1	0.284 9	99.5		
迷迭香酸	0.253 4	0.145 4	0.141 1	0.287 6	100.7	99.5	2.1
	0.252 4	0.144 9	0.141 1	0.280 7	96.3		
	0.250 6	0.555 3	0.525 0	1.080 0	99.9		
	0.253 3	0.561 3	0.525 0	1.090 0	100.7		
	0.251 4	0.557 1	0.525 0	1.095 0	102.5		
紫草酸	0.251 8	0.558 0	0.525 0	1.076 0	98.7	99.9	2.7
	0.253 4	0.561 5	0.525 0	1.067 0	96.3		
	0.252 4	0.559 3	0.525 0	1.079 0	99.0		
	0.250 6	0.812 0	0.798 2	1.625 0	101.9		
	0.253 3	0.820 0	0.798 2	1.588 0	96.2		
丹酚酸B	0.251 4	0.814 0	0.798 2	1.610 0	99.7	99.8	2.4
	0.251 8	0.816 0	0.798 2	1.644 0	103.8		
	0.253 4	0.821 0	0.798 2	1.607 0	98.5		
	0.252 4	0.818 0	0.798 2	1.610 0	99.3		
	0.250 6	10.670 0	5.460 0	16.290 0	102.9		
丹酚酸B	0.253 3	10.790 0	5.460 0	16.270 0	100.4	99.8	2.4
	0.251 4	10.710 0	5.460 0	15.990 0	96.8		
	0.251 8	10.720 0	5.460 0	16.150 0	99.4		
	0.253 4	10.790 0	5.460 0	16.120 0	97.6		
	0.252 4	10.750 0	5.460 0	16.310 0	101.8		

表4 丹参中5种水溶性成分的含量测定结果(mg/g, n=3)

Tab 4 Results of content determination of 5 water-soluble ingredients in *S. miltiorrhiza* (mg/g, n=3)

编号	来源	收集时间	丹参素钠	原儿茶醛	迷迭香酸	紫草酸	丹酚酸B
1	上海	2011-08	0.792 4	0.573 9	2.216	3.239	42.59
2	浙江	2011-08	0.731 2	0.514 1	3.479	3.439	39.03
3	吉林	2011-08	0.365 6	0.305 7	6.339	2.359	25.48
4	河北	2011-08	0.381 0	0.433 4	2.184	2.776	33.23
5	江苏	2011-08	0.493 4	0.597 2	5.710	1.942	24.02
6	云南	2011-08	0.631 9	0.542 8	2.980	4.047	54.66
7	北京	2011-08	0.263 2	0.608 3	2.601	3.477	54.78
8	山东	2011-08	0.317 1	0.409 9	2.457	3.619	53.95
9	辽宁	2011-08	0.370 2	0.321 1	1.613	2.362	35.39
10	天津	2011-10	0.907 0	0.288 3	0.958	1.775	22.44

本试验以丹参中5种水溶性成分的含量为评价指标,采用加权系数综合评分的方法进行数据分析。在提取方法上比较了索氏提取、回流提取、超声提取3种方法,结果发现回流提取法提取效率最高,故采用回流提取法。同时采用L₉(3⁴)正交试验法,选择溶剂剂量、提取时间、提取次数3个因素,进行三水平考察,正交结果发现以20倍量水回流提取3次,每次2h的提取效率最高。在此基础上,采用AB-8大孔吸附树脂富集纯

化丹参提取液,结果发现经AB-8大孔吸附树脂富集纯化后的丹参中5种水溶性成分的综合评分较高,故最终确定最佳提取工艺为20倍量水回流提取3次,每次2h,以AB-8大孔吸附树脂富集纯化。

3.2 检测波长的选择

丹参水溶性成分的HPLC测定法已有报道^[2-4],丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸B的检测波长均在281 nm附近。为了保证丹参中5种水溶性成分在检测波长处有最大吸收,本试验将丹参素钠、原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸B 5种对照品溶液在200~400 nm范围内进行全波长扫描,测定各成分的最大吸收波长。最终采用HPLC波长切法^[5-6]测定丹参中5种水溶性成分的含量(5种成分的最大吸收波长分别为丹参素钠:280 nm,原儿茶醛:280 nm,迷迭香酸:330 nm,紫草酸:286 nm,丹酚酸B:286 nm),达到了检测灵敏度高、干扰小的目的。

3.3 测定结果分析

本试验对10批不同来源丹参中5种水溶性成分进行了含量测定。结果表明,不同来源丹参中5种水溶性成分的含量之间存在一定的差异,每1 g样品中含丹参素钠0.263 2~0.907 0 mg、原儿茶醛0.288 3~0.608 3 mg、迷迭香酸0.958~6.339 mg、紫草酸1.775~4.047 mg、丹酚酸B 22.44~54.78 mg。采用加权系数综合评分法进行分析,结果表明来自于云南的丹参质量最佳。2010年版《中国药典》规定丹参中丹酚酸B的质量分数不得少于3.0%,结合本试验结果可知,除来自于吉林、江苏、天津的样品外,其余7个来源的丹参均符合《中国药典》要求。

本试验以波长切换HPLC法同时测定丹参中5种水溶性成分的含量,丰富了2010年版《中国药典》仅测定丹参中丹酚酸B含量的质量控制方法,可为全面评价丹参的质量提供依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 70.
- [2] 张文生, 李德坤, 叶正良. 反相高效液相色谱法测定丹参提取物中的丹参素、原儿茶醛和丹酚酸B的含量[J]. 药物分析杂志, 2003, 23(6): 475.
- [3] 孙棣, 刘文英, 梁彩. HPLC法同时测定丹参片中4种有效成分的含量[J]. 中国药科大学学报, 2007, 38(1): 51.
- [4] 尉萍萍, 赵焱. HPLC测定丹参提取物中丹酚酸A含量[J]. 中国现代应用药学, 2008, 25(3): 241.
- [5] 李可强, 王坤, 张振秋. HPLC切换波长法同时测定冬凌草片中迷迭香酸和冬凌草甲素含量[J]. 中成药, 2008, 30(4): 526.
- [6] 周萃, 杨燕云, 张振秋, 等. 波长切换HPLC法同时测定甘草及其炮制品中7个物质的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(11): 2 067.

(收稿日期:2012-04-05 修回日期:2012-05-08)