

HPLC同时测定白花丹参中丹参酮II_A、 隐丹参酮、丹参酮I和二氢丹参酮I的含量

张琳琳¹, 王淳², 宋志前², 杜智勇², 宁张弛³, 董运茁², 刘振丽^{2*}

(1. 浙江中医药大学附属第一医院, 杭州 310003;

2. 中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700;

3. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的:建立同时测定白花丹参中丹参酮II_A、丹参酮I、隐丹参酮和二氢丹参酮I含量的方法。方法:从白花丹参产地山东采集了10个批次白花丹参,采用HPLC测定4种主要丹参酮成分丹参酮II_A、丹参酮I、隐丹参酮和二氢丹参酮I含量。色谱条件:Zorbax Extend-C₁₈色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.2%乙酸水(57:43),流速1.0 mL·min⁻¹,检测波长270 nm,柱温30 ℃。结果:丹参酮II_A、丹参酮I、隐丹参酮和二氢丹参酮I分别在0.138~2.76(*r*=0.999 9),0.024 8~0.496(*r*=0.999 9),0.096~1.92(*r*=0.999 9)和0.035~0.70 μg(*r*=0.999 9)线性关系良好。加样回收率分别为100.06%,99.60%,99.91%,100.06%。丹参酮II_A、丹参酮I、隐丹参酮和二氢丹参酮I含量范围分别是2.677~7.150,0.320~1.747,0.916~5.935,0.132~2.601 mg·g⁻¹。结论:该法简便、准确、分离度好,能同时测定白花丹参中4种有效成分的含量。

[关键词] 白花丹参; 高效液相色谱; 丹参酮II_A; 丹参酮I; 隐丹参酮; 二氢丹参酮I

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)06-0062-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015060062

Simultaneous Determination of Tanshinone II_A, Tanshinone I, Cryptotanshinone and Dihydro-tanshinone I in Salviae Albae Radix by HPLC ZHANG Lin-lin¹, WANG Chun¹, SONG Zhi-qian¹, DU Zhi-yong¹, NING Zhang-chi², DONG Yun-zhuo¹, LIU Zhen-li^{*} (1. First Affiliated Hospital Medical College, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China; 2. Institute of Basic Theory, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 3. School of Material Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the method for simultaneous determination of tanshinone II_A, tanshinone I, cryptotanshinone and dihydro-tanshinone I in Salviae Albae Radix by HPLC. **Method:** Each of ten batches of Salviae Albae Radix were collected from the same place-Shandong province. A simple and effective high-performance liquid chromatographic (HPLC) method has been developed for simultaneous quantification of four main diterpenes (tanshinone II_A, tanshinone I, cryptotanshinone, dihydro-tanshinone I) in Salviae Albae Radix. Chromatography was performed on a (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) particle size, extend-C₁₈ column. The mobile phase was a linear gradient prepared from 0.2% aqueous formic acid and acetonitrile (43:57) at a flow-rate of 1.0 mL·min⁻¹. Detection was accomplished at 270 nm and column temperature was set at 30 ℃. **Result:** The contents of tanshinone II_A, tanshinone I, cryptotanshinone, dihydro-tanshinone I in Salviae Albae Radix were between 2.677-7.150, 0.320-1.747, 0.916-5.935, 0.132-2.601 mg·g⁻¹, respectively. The average recovery was 100.06%, 99.60%, 99.91%, 100.06%, respectively. **Conclusion:** The developed method is simple, accurate and good separation, which is suitable for the quality control of tanshinone II_A, tanshinone I, cryptotanshinone and dihydro-tanshinone I in Salviae Albae Radix.

[Key words] Salviae Albae Radix; HPLC; identification; tanshinone II_A; tanshinone I; cryptotanshinone; dihydro-tanshinone I

[收稿日期] 20140227(013)

[第一作者] 张琳琳,在读硕士,从事中药质量分析研究,Tel:18810599940, E-mail:amazing1212@163.com

[通讯作者] *刘振丽,博士,研究员,博士生导师,从事中药药效物质基础和质量标准研究,Tel:010-64014411-2503, E-mail:zhenli_liu@sina.com

白花丹参为紫花丹参的白花变种^[1]。白花丹参除具有紫花丹参的作用和用途外,对治疗血栓闭塞性脉管炎具有独特疗效^[2]。目前白花丹参主要在山东省大量种植,白花丹参价格高于紫花丹参。白花丹参的主要成分为丹酚酸类和丹参酮类成分^[3-4]。有文献报道^[5]白花丹参中丹参酮 II_A 的含量显著高于紫花丹参。有关紫花丹参中丹参酮类成分含量研究较多^[6-7],但白花丹参中只有丹参酮 II_A 含量测定报道,未见其他 3 种丹参酮类含量测定报道。本文同时测定了从产地山东采集 10 个批次的白花丹参中活性成分丹参酮 II_A、隐丹参酮、丹参酮 I 及二氢丹参酮 I 含量,可用于白花丹参药材的质量评价。

1 材料

1200 SL 系列高分离度快速液相色谱仪(包括 G1322A 脱气机, G1312B SL 型二元泵, G1367C SL 自动进样器, G1315CDAD SL 检测器, G1316B SL 恒温箱, HP 化学工作站, 美国安捷伦公司), CP 225D 型电子天平(德国赛多利斯公司)。

丹参酮 II_A、隐丹参酮、丹参酮 I 对照品(批号分别为 110766-200518, 110852-200806, 110867-200406, 购自中国食品药品检定研究院), 二氢丹参酮 I 对照品(上海田源生物技术公司, 纯度 > 98%, 批号 121220); 白花丹参样品采于山东省, 各样品在花期通过花的颜色确定, 然后在采收季节到产地采集, 见表 1。白花丹参为唇形科植物白花丹参 *Salvia miltiorrhiza alba* 的干燥根和根茎。乙腈色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

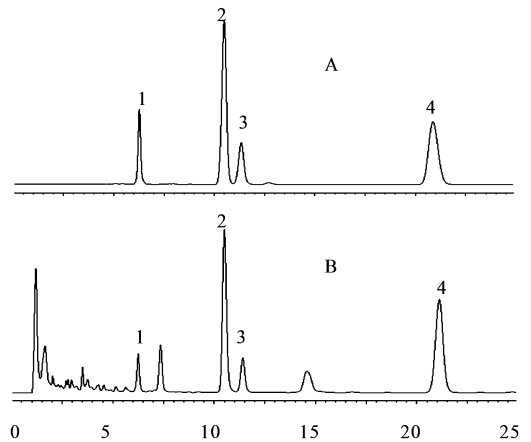
表 1 白花丹参样品采集信息

Table 1 Informa of *Salviae Albae Radix*

No.	采集地	采集时间
1	山东济南长青归德镇沙河辛村	2013-11-01
2	山东莱芜苗山镇三村	2013-11-03
3	山东莱芜苗山镇四村	2013-11-04
4	山东莱芜蔬菜基地	2013-11-01
5	山东泰山天然药物研究所	2013-11-03
6	山东泰安恒生科技公司	2013-11-05
7	山东济南长青马山镇大河东村	2013-11-01
8	山东莱芜紫光生态园	2013-11-02
9	山东泰安牡丹园	2013-11-05
10	山东医药技师学院药用植物园	2013-11-05

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Zorbax Extend-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.2% 乙酸(57:43), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 270 nm。在本色谱条件下, 白花丹参中的丹参酮 II_A、丹参酮 I、隐丹参酮和二氢丹参酮 I 的色谱峰与其他组分的色谱峰均得到较好的分离, 见图 1。



A. 对照品; B. 白花丹参样品; 1. 二氢丹参酮 I; 2. 隐丹参酮; 3. 丹参酮 I; 4. 丹参酮 II_A

图 1 白花丹参 HPLC 色谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of *Salviae Albae Radix*

2.2 混合对照溶液的制备 分别取丹参酮 II_A、丹参酮 I、隐丹参酮和二氢丹参酮 I 对照品适量, 精密称定, 分别加甲醇溶解并制成每 1 mL 含丹参酮 II_A 2.760 mg, 丹参酮 I 0.496 mg, 隐丹参酮 1.92 mg 和二氢丹参酮 I 0.700 mg 的溶液, 作为对照品贮备液。分别精密量取上述贮备液各 5 mL 置 50 mL 棕色量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得混合对照品溶液(丹参酮 II_A 0.276 g·L⁻¹, 丹参酮 I 0.0496 g·L⁻¹, 隐丹参酮 0.192 g·L⁻¹, 二氢丹参酮 I 0.07 g·L⁻¹)。

2.3 供试品溶液的制备 取各供试品粉末(过四号筛)约 0.5 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 精密加入甲醇-三氯甲烷(7:3)溶液 50 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定质量, 用所加溶液补足减少的质量, 摇匀, 滤过, 精密吸取续滤液 25 mL, 低温减压浓缩至干, 加入甲醇超声使溶解并定容于 10 mL 量瓶中, 摇匀, 用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过, 弃去初滤液, 取续滤液, 置棕色瓶内, 避光保存, 即得。

2.4 线性关系的考察 分别精密量取混合对照品溶液 0.5, 2, 4, 6, 8, 10 mL 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 得到系列对照品溶液。分别进样

10 μL , 记录峰面积 Y , 以峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标进行线性回归, 得回归方程为丹参酮 II_A $Y = 3\ 603.9X + 8.665$ ($r = 0.999\ 9$), 丹参酮 I $Y = 6\ 252.8X + 2.125$ ($r = 0.999\ 9$), 隐丹参酮 $Y = 3\ 780.3X - 0.757\ 2$ ($r = 0.999\ 9$), 二氢丹参酮 I $Y = 2\ 699X + 4.301$ ($r = 0.999\ 9$), 线性范围分别为 0.138 ~ 2.76, 0.024 8 ~ 0.496, 0.096 ~ 1.92, 0.035 ~ 0.70 μg 。

2.5 精密度试验 精密吸取 1 号样品制备的供试品溶液, 重复进样 6 次, 丹参酮 II_A, 丹参酮 I, 隐丹参酮和二氢丹参酮 I 峰面积积分值的 RSD 分别为 2.3%, 1.7%, 1.0%, 1.4%。表明仪器的精密度良好。

2.6 稳定性试验 精密吸取 1 号样品制备的供试

品溶液, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样, 丹参酮 II_A, 丹参酮 I、隐丹参酮和二氢丹参酮 I 峰面积积分值的 RSD 分别为 0.8%, 1.1%, 2.6%, 0.8%。表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取 1 号样品粉末(过四号筛)约 0.5 g, 6 份, 按供试品溶液制备方法处理, 进行含量测定。丹参酮 II_A, 丹参酮 I, 隐丹参酮和二氢丹参酮 I 含量的 RSD 分别为 1.6%, 1.9%, 0.8%, 1.9%。表明重复性良好。

2.8 加样回收率试验 取 1 号样品粉末(过四号筛)约 0.25 g, 精密称定, 分别精密加入 4 种对照品溶液适量, 按供试品溶液制备方法处理, 在上述色谱条件下进行测定, 计算回收率和 RSD。结果见表 2。

表 2 白花丹参中 4 种丹参酮加样回收率试验

Table 2 Recovery test of 4 tanshinones of *Salviae Albae Radix*

化合物	称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
丹参酮 II _A	0.246 6	0.695 2	0.704 0	1.415 2	102.27	100.06	2.0
	0.254 9	0.718 6	0.704 0	1.413 2	98.66		
	0.253 8	0.715 5	0.704 0	1.424 4	100.70		
	0.251 6	0.709 3	0.704 0	1.409 6	99.47		
	0.253 9	0.715 7	0.704 0	1.434 5	102.10		
	0.260 3	0.733 8	0.704 0	1.417 8	97.16		
丹参酮 I	0.246 6	0.090 3	0.092 4	0.186 4	104.00	99.60	2.9
	0.254 9	0.093 3	0.092 4	0.183 9	98.05		
	0.253 8	0.092 9	0.092 4	0.182 5	96.97		
	0.251 6	0.092 1	0.092 4	0.186 8	102.49		
	0.253 9	0.092 9	0.092 4	0.183 3	97.84		
	0.260 3	0.095 3	0.092 4	0.186 1	98.27		
隐丹参酮	0.246 6	0.362 5	0.372 0	0.725 8	97.66	99.91	2.7
	0.254 9	0.374 7	0.372 0	0.756 2	102.55		
	0.253 8	0.373 1	0.372 0	0.742 3	99.25		
	0.251 6	0.369 9	0.372 0	0.739 9	99.46		
	0.253 9	0.373 2	0.372 0	0.758 9	103.68		
	0.260 3	0.382 6	0.372 0	0.742 8	96.83		
二氢丹参酮 I	0.246 6	0.052 5	0.052 0	0.104 5	100.00	100.06	2.9
	0.254 9	0.054 3	0.052 0	0.107 4	102.12		
	0.253 8	0.054 1	0.052 0	0.104 9	97.69		
	0.251 6	0.053 6	0.052 0	0.103 9	96.73		
	0.253 9	0.054 1	0.052 0	0.105 7	99.23		
	0.260 3	0.055 4	0.052 0	0.109 8	104.62		

2.9 样品含量测定 对各批样品按照 2.3 项下方法制备, 进样测定, 计算含量, 结果见表 3。

3 讨论

3.1 供试品溶液制备 考察了提取溶剂甲醇^[8],

表 3 白花丹参中丹参酮成分含量

Table 3 Content of four tanshinones in *Salviae Albae Radix*

No.	二氢丹参酮 I	隐丹参酮	丹参酮 I	丹参酮 II _A	总和
1	0.213	1.470	0.366	2.819	4.868
2	0.170	1.596	0.320	3.088	5.174
3	0.718	3.337	0.607	4.117	8.779
4	2.601	5.935	1.026	7.150	16.712
5	0.836	4.825	0.597	4.196	10.454
6	1.457	4.301	1.747	6.910	14.415
7	0.505	2.605	0.411	3.949	7.470
8	0.132	0.916	0.454	2.677	4.179
9	0.436	5.526	0.613	3.800	10.375
10	0.566	2.506	0.457	2.958	6.487

甲醇-三氯甲烷(7:3)^[6]、甲醇-二氯甲烷(8:2)^[9],结果显示以甲醇-三氯甲烷(7:3)作为提取溶剂效果最佳。比较了超声和回流提取方式对 4 种丹参酮类成分提取效率的影响,结果显示无显著性差异,超声提取更方便。对提取溶剂量(25,50,100 mL)和提取时间(15,30,45 min)进行了考察,确定加入甲醇-三氯甲烷(7:3)溶液 50 mL,超声提取 30 min 最佳。

3.2 检测波长的选择 取丹参酮 II_A,丹参酮 I,隐丹参酮,二氢丹参酮 I 的混合对照品在 200 ~ 400 nm 扫描,隐丹参酮和丹参酮 II_A 紫外吸收相似,在 270 nm 附近有最大吸收,二氢丹参酮 I 最大吸收波长在 240 nm,丹参酮 I 最大吸收波长在 245 nm 处,4 种成分在 270 nm 处均有较强吸收,灵敏度高,重复性好,因此选择 270 nm 作为检测波长。

3.3 含量分析 10 个批次白花丹参中丹参酮 II_A,丹参酮 I,隐丹参酮、二氢丹参酮 I 含量范围分别是 2.677 ~ 7.150, 0.320 ~ 1.747, 0.916 ~ 5.935, 0.132 ~ 2.601 mg·g⁻¹,各批次含量差异最大的成分是二氢丹参酮 I,相差约 20 倍。4 种成分含量比较,10 个样品中有 8 个以丹参酮 II_A 含量最高,其次为隐丹参酮,二氢丹参酮 I 和丹参酮 I 相差不大。所有样品中,丹参酮 II_A 含量高的样品,其他 3 个成分含量也比较高。山东莱芜蔬菜基地的白花丹参二氢丹参酮 I、隐丹参酮和丹参酮 II_A 含量均高于其他批次。文献报道^[5,10-11]了 5 批白花丹参中丹参酮

II_A 的含量范围在 1.80 ~ 7.26 mg·g⁻¹,与本文结果大体一致。

本文对采集的白花丹参中 4 中主要丹参酮类成分含量进行了测定,为其质量标准的制定提供了依据。

[参考文献]

[1] 山东省药品监督管理局. 山东中药材标准[S]. 济南:山东友谊出版社,2002:66-68.

[2] 李允尧,赵华英,陈沪宁,等. 山东省白花丹参的植物资源[J]. 中药材,2000,23(2):69-70.

[3] 王鹏. 白花丹参化学成分及其保护血管内皮细胞的研究[D]. 济南:山东中医药大学,2011.

[4] Li Y G, Song L, Liu M, et al. Advancement in analysis of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* (Danshen) [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(11):1941-1953.

[5] 董蕊. 白花丹参中丹参酮成分的提取分离和含量测定[D]. 长春:吉林农业大学,2004.

[6] Liu A H, Lin Y H, Yang M, et al. High-performance liquid chromatographic determination of tanshinones in the roots of *Salvia miltiorrhiza* and related traditional chinese medicinal preparations [J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2006, 9(1):1-9.

[7] Yang Q, Zhang X L, Li X Y, et al. Coupling continuous ultrasound-assisted extraction with ultrasonic probe, solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography for the determination of sodium Danshensu and four tanshinones in *Salvia miltiorrhiza bunge* [J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 589(2):231-238.

[8] Hou J J, Wu W Y, Da J, et al. Ruggedness and robustness of conversion factors in method of simultaneous determination of multi-components with single reference standard [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(33):5618-5627.

[9] Hu P, Luo G A, Zhao Z, et al. Quality Assessment of *Radix Salviae Miltiorrhizae* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2005, 53(5):481-486.

[10] 冉蓉,周凤琴,王婷,等. 山东产丹参的丹参酮 II_A 含量比较[J]. 中药材,2008,31(3):331-333.

[11] 李长峰. 丹参与白花丹参的比较研究[D]. 济南:山东中医药大学,2008.

[责任编辑 顾雪竹]