

白花丹参及其提取物中总丹酚酸含量测定方法研究

张琳琳, 宋志前, 王淳, 杜智勇, 董运茁, 刘振丽*
(中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:** 建立并测定白花丹参及其提取物中总丹酚酸的含量。**方法:** 采用亚硝酸钠-硝酸铝配位显色法, 以供试品溶液和对照品溶液紫外-可见吸收图谱一致性为依据, 比较丹酚酸 B、丹参素钠和原儿茶醛作对照品的合理性; 对亚硝酸钠-硝酸铝配位显色法中各显色剂加入量、加入显色剂后放置时间进行了考察, 进行方法学考察。**结果:** 丹酚酸 B 更适合作对照品, 最佳显色条件为: 精密加入 1% NaNO_2 2.5 mL, 暗处放置 10 min, 再精密加入 20% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 0.25 mL, 暗处放置 10 min, 再精密加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 4 mL, 暗处放置 15 min。丹酚酸 B 在 0.028 ~ 0.309 mg 线性关系良好 ($r = 0.9999$), 白花丹参和提取物的回收率分别为 96.29%, 99.53%。5 个批次白花丹参总丹酚酸的含量在 5.65% ~ 6.19%, 提取物中总丹酚酸的含量在 61.03% ~ 61.96%。**结论:** 建立了亚硝酸钠-硝酸铝配位显色法测定白花丹参及其提取物中总丹酚酸含量的方法。

[关键词] 白花丹参; 提取物; 总丹酚酸; 含量测定; 亚硝酸钠-硝酸铝配位显色法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)06-0086-05

[doi] 10.11653/syfy2014060086

Study on Method for Determining Content of Total Salvianolic Acids in the Root of *Salvia miltiorrhiza alba* and its Extration

ZHANG Lin-lin, SONG Zhi-qian, WANG Chun, DU Zhi-yong, DONG Yun-zhuo, LIU Zhen-li*
(The Institute of Basic Theory, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determining content of total salvianolic acids in the root of *Salvia miltiorrhiza alba* (Baihua Danshen) and its extraction. **Method:** Based on the consistency of the characteristic adsorption bands in the visible absorption spectrum between reference substance and sample solution of Baihua Danshen, salvianolic acid B, tanshion sodium and protocatechuic aldehyde were compared using NaNO_2 -

[收稿日期] 20130729(019)

[第一作者] 张琳琳, 在读硕士, 从事中药质量分析研究, Tel:010-64014411-2503, E-mail: amazing1212@163.com

[通讯作者] * 刘振丽, 博士, 研究员, 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

[4] 封亮, 贾晓斌, 李长春, 等. HPLC 同时测定六味地黄浓缩丸中 4 种主要成分的含量[J]. 中国药科大学学报, 2009, 40(1): 59.

[5] 孙国祥, 杨婷婷. 用高效液相色谱指纹图谱定量评价 4 种不同剂型六味地黄丸质量和工艺差异[J]. 中南药学, 2010, 8(2): 148.

[6] 贾晓斌, 封亮, 范晨怡, 等. 高效液相色谱法测定不同厂家六味地黄浓缩丸中的 5 种成分的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(22): 1964.

[7] 赵洪芝, 孟宪生, 叶挺祥, 等. 六味地黄丸的 HPLC 指纹图谱和模式识别研究[J]. 医学教育探索, 2010, 41(1): 48.

[8] 王喜军, 张宁, 孙晖. 六味地黄丸指纹图谱的研究

[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(10): 1004.

[9] Unger Klaus K, Skudas Romas, Schulte Michael M. Particle packed columns and monolithic columns in high-performance liquid chromatography-comparison and critical appraisal [J]. J Chromatography A, 2008, 1184(1/2): 393.

[10] Rong jie Fu, Yao Xiao. Analysis of Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) and compound danshen dropping pills using Poroshell 120 Superficially porous LC Columns [C]. 上海: 第五届上海国际分析化学研讨会论文摘要. 2010.

[责任编辑 顾雪竹]

Al (NO₃)₃ colorimetric method. The best color conditions, which regarded the dosage of color developing agent and placing time in the dark after adding color developing agent as observation factors, were optimized and its methodology was investigated. **Result:** Salvianolic acid B was selected as the reference substance. The optimized color condition was as follows: precisely add 2.5 mL 1% NaNO₂ and place in the dark for 10 min, then accurately add 20% Al (NO₃)₃ 0.25 mL and place in the dark for 10 min, and lastly, precisely add 1 mol·L⁻¹ NaOH 4 mL and place in the dark for 15 min. The linear range was 0.028-0.309 mg ($r=0.9999$) and the average recovery was 96.29% and 99.53% for Baihua Danshen and its extraction respectively. The content of total salvianolic acids in five batches of Baihua Danshen was ranged from 5.65% to 6.19% and in the extractions was ranged from 61.03% to 61.96%. **Conclusion:** The NaNO₂-Al (NO₃)₃ color imetric method for determining content of total salvianolic acids in Baihua Danshen and its extrationis established.

[Key words] *Salvia miltiorrhiza* Bge f. *alba* Radix et Rhizoma; extraction; total salvianolic acids; content; NaNO₂-Al (NO₃)₃ colorimetric method

白花丹参来源于唇形科植物白花丹参的干燥根和根茎,收载于《山东省中药材标准》^[1]。由于其药材性状与药典收载的紫花丹参非常相似,常被混淆应用。白花丹参对治疗血栓闭塞性脉管炎具有独特疗效^[3]。其野生品主要分布在山东章丘、莱芜等地的山区地带,目前在莱芜市苗山区有专门的种植基地^[2]。主要含有丹参酮类、丹酚酸类等成分^[4]。丹酚酸类具有抗血栓^[5]、扩张冠状动脉^[6]、保护心脏^[7]等作用。亚硝酸钠-硝酸铝配位显色法常用于紫花丹参中总丹酚酸含量测定^[8],文献报道所用的对照品有丹酚酸 B、丹参素钠和原儿茶醛 3 种^[8-10],显色反应所用显色剂的用量以及加入显色剂后的反应时间等都不太一致^[9,11-13]。本文对此进行了考察,从而建立了白花丹参及其提取物中总丹酚酸含量测定方法,以为其质量标准的制订提供科学依据。

1 材料

UV8453 型紫外-可见分光光度计(美国安捷伦公司),SARTARIUS BT25S 型电子分析天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司),CX-250 型超声波清洗器(北京医疗设备二厂)。

丹酚酸 B(批号 111562-200807),原儿茶醛(批号 813-9201),丹参素钠(批号 110855-200809)对照品均购自中国药品生物制品检定所,亚硝酸钠和氢氧化钠(北京化工厂,分析纯),硝酸铝(天津市光复精细化工研究所,分析纯)。白花丹参药材购于莱芜紫光生态园有限公司,经北京中医药大学刘春生教授鉴定为唇形科植物鼠尾草属植物白花丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge f. *alba* C. Y. Wu et H. W. Li 的干燥根和根茎,白花丹参提取物为白花丹参采用乙醇提取^[14],提取液适当浓缩后,经大孔树脂柱分离,接收 60% 乙醇洗脱液,减压回收溶剂,真空干

燥得到。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备 精密称取丹酚酸 B 对照品 10.05 mg,加水使溶解并定量转移至 25 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀,制成每 1 mL 含 0.402 mg 的对照品溶液。

2.2 供试品溶液制备

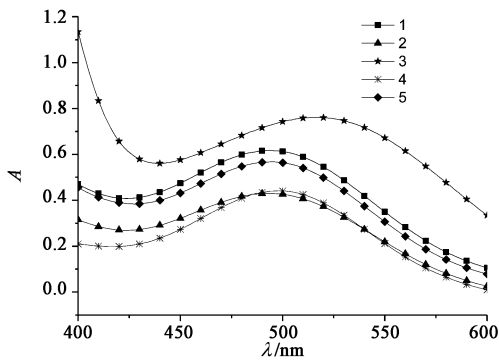
2.2.1 白花丹参供试品溶液 取白花丹参药材粉末(过四号筛)约 0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入水 25 mL,称定质量,水浴回流 30 min,放冷,再称定质量,用水补足减失的质量,摇匀,滤过,即得。

2.2.2 白花丹参提取物供试品溶液 取白花丹参提取物约 5 mg,同上白花丹参处理。

2.3 对照品选择及检测波长的确定 测定丹参中总丹酚酸含量常用的对照品有原儿茶醛^[8]、丹参素钠^[9]和丹酚酸 B^[10],对 3 种对照品显色后确定最佳对照品和检测波长。

分别精密吸取原儿茶醛(0.264 g·L⁻¹)、丹参素钠(0.134 g·L⁻¹)、丹酚酸 B 对照品溶液和两种供试品溶液适量,参考文献方法^[8],精密加入 1% NaNO₂ 2.5 mL,摇匀,暗处放置 5 min,再精密加入 20% Al(NO₃)₃ 0.25 mL,摇匀,暗处放置 5 min,再精密加入 1 mol·L⁻¹ NaOH 5 mL,用水溶液稀释至 10 mL,暗处放置 5 min,以显色剂为空白,照分光光度法(《中国药典》一部附录 VB),400~800 nm 扫描,结果见图 1。

图 1 显示,原儿茶醛、丹酚酸 B、丹参素钠对照品溶液最大吸收波长分别为 517,493,497 nm,两个供试品溶液的最大吸收波长为 493 nm,与丹酚酸 B 一致。因此,确定以丹酚酸 B 为对照品,测定波长



1. 白花丹参供试品; 2 提取物供试品;
3. 原儿茶醛; 4. 丹参素钠; 5. 丹酚酸 B

图 1 不同对照品及供试品

亚硝酸钠-硝酸铝配位显色可见吸收图谱

为 493 nm。

2.4 供试品溶液显色条件的考察 文献中采用亚硝酸钠-硝酸铝配位显色法,测定丹参中总丹酚酸含量,加入显色剂的量和反应时间各不相同^[9,11-13],因此,以白花丹参药材为对象,对显色条件进行了考察。

2.4.1 显色剂加入量的考察 采用 $L_9(3^4)$ 正交表,考察了 3 种显色剂 NaNO_2 , $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 和 NaOH 的加入量,每个因素 3 个水平。精密取白花丹参供试品溶液 0.4 mL,依因素水平表(表 1)加入不同体积的相应溶剂,按 2.3 项下依次放置时间,以显色剂为空白,在 493 nm 处测定吸光度,结果见表 2,3。

表 1 因素水平 mL

水平	1% NaNO_2	20% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$	1 mol·L ⁻¹ NaOH
	体积 A	体积 B	体积 C
1	1.5	0.05	2
2	2.5	0.15	3
3	3.5	0.25	4

结果表明,3 个因素加入量对总丹酚酸含量均无显著影响。影响因素大小是 $B > A > C$,综合考虑选择加入 1% NaNO_2 2.5 mL,20% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 0.25 mL,1 mol·L⁻¹ NaOH 4 mL。

2.4.2 显色剂反应时间的考察

2.4.2.1 NaNO_2 放置时间的考察 精密吸取供试品溶液 0.4 mL,分别加入 1% NaNO_2 2.5 mL,摇匀,依次暗处放置 0, 5, 10, 15 min,再加入 20% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 0.25 mL,其余同 2.3 处理。平行 2 份。吸收度平均值分别为 0.531, 0.551, 0.603, 0.592,因此加入 1% NaNO_2 后,暗处放置 10 min 即可。

2.4.2.2 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 放置时间的考察 精密吸取供

表 2 $L_9(3^4)$ 正交设计测定

No.	A	B	C	空白	总丹酚酸/%
1	1	1	1	1	5.68
2	1	2	2	2	5.41
3	1	3	3	3	6.07
4	2	1	2	3	5.83
5	2	2	3	1	5.79
6	2	3	1	2	6.14
7	3	1	3	2	5.66
8	3	2	1	3	5.70
9	3	3	2	1	5.78
K_1	17.16	17.17	17.52	17.26	
K_2	17.76	16.90	17.02	17.21	
K_3	17.14	17.99	17.52	17.60	
R	0.21	0.36	0.17	0.13	
K_1^2	294.41	2 794.80	306.95	297.56	
K_2^2	315.42	285.61	289.68	295.18	
K_3^2	293.78	323.64	306.95	309.76	

表 3 方差分析

因素	SS	f	均方	F	P
A	0.082 756	2	0.041 38	2.697	>0.1
B	0.214 822	2	0.107 41	7.000	>0.1
C	0.055 556	2	0.027 78	1.810	>0.1
D (误差)	0.030 689	2	0.015 34		

注: $F_{0.1}(2,2) = 9.0$ 。

试品溶液 0.4 mL,分别加入 1% NaNO_2 2.5 mL,摇匀,暗处放置 10 min,再加入 20% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 0.25 mL,摇匀,依次暗处放置 0,5,10,15 min,其余同 2.3 处理。平行 2 份。吸收度平均值分别为 0.529, 0.541, 0.605, 0.604,因此加入 20% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 后暗处放置 10 min 即可。

2.4.2.3 NaOH 放置时间的考察 精密吸取供试品溶液 0.4 mL,分别加入 1% NaNO_2 2.5 mL,摇匀,暗处放置 10 min,再加入 20% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 0.25 mL,摇匀,暗处放置 10 min,再加入 1 mol·L⁻¹ NaOH 4 mL,稀释至 10 mL,再依次暗处放置 0,5,10,15,20 min,其余同 2.3 处理。吸收度平均值分别为 0.528,0.552,0.573,0.595,0.592,因此加入 1 mol·L⁻¹ NaOH 暗处放置 15 min 后显色即可。

2.5 供试品溶液显色条件 精密吸取供试品溶液 0.4 mL,精密加入 1% NaNO_2 2.5 mL,摇匀,暗处放置 10 min,再精密加入 20% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 0.25 mL,摇

匀,暗处放置10 min,再精密加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 4 mL,稀释至 10 mL,暗处放置 15 min,以显色剂为空白,在493 nm处测定吸光度。

2.6 方法学考察

2.6.1 线性关系考察 精密吸取丹酚酸 B 对照品溶液 ($0.402 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.07, 0.21, 0.35, 0.49, 0.63, 0.77 mL, 分别置试管中,按 2.5 项下操作,以吸收度为纵坐标,丹酚酸 B 取样量 (mg) 为横坐标,绘制标准曲线。回归方程 $Y = 3.144 \ 9X - 0.000 \ 8$ ($r = 0.999 \ 9$),说明总丹酚酸在 0.028 ~ 0.309 mg 线性关系良好。

2.6.2 精密度试验 分别取序号为 1 的白花丹参、序号为 7 的白花丹参提取物制备的供试品溶液,按 2.5 项下操作,重复测定 6 次,白花丹参和提取物 RSD 分别为 0.21%, 1.11%, 符合要求。

2.6.3 重复性考察 分别取序号为 1 的白花丹参粉末约(过四号筛)0.2 g,序号为 7 的白花丹参提取物粉末约 5 mg,精密称定,共 6 份,按 2.2 项和 2.5 项下操作,白花丹参和提取物 6 次测定结果的 RSD 分别为 2.79%, 2.17%, 说明该方法的重复性较好。

2.6.4 稳定性试验 分别取序号为 1 的白花丹参、序号为 7 的白花丹参提取物制备供试品溶液,按 2.5 项下操作,于显色后 0, 1, 2, 3, 4, 5 h 后测定其吸光度,白花丹参和提取物 RSD 分别为 0.87%, 1.23%, 表明显色后 5 h 内稳定。

2.6.5 加样回收率试验 采用加样回收法。取已知含量的 1 号白花丹参供试品粉末(过四号筛)约 0.1 g,精密称定,共 6 份,精密加入丹酚酸 B 对照品溶液(浓度为 $6.082 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 1 mL,再精密加入水 24 mL,按 2.2 项和 2.5 项下操作,在 493 nm 处测定吸光度。同时,精密吸取对照品溶液适量,按 2.5 项下操作,在 493 nm 处测定吸光度。

取已知含量的 7 号白花丹参提取物粉末约 2.5 mg,精密称定,共 6 份,精密加入丹酚酸 B 对照品溶液(浓度为 $1.51 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 1 mL,再精密加入水 24 mL,按 2.2 项和 2.5 项下操作,在 493 nm 处测定吸光度。

同时,精密吸取对照品溶液适量,按 2.5 项下操作,在 493 nm 处测定吸光度。计算回收率。结果见表 4。

表 4 总丹酚酸回收率试验

	No.	取样量/mg	供试品中量/mg	添加量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
白花丹参	1	98.97	6.017 4	6.082 0	11.863 9	96.13	96.29	1.06
	2	93.29	5.672 0	6.082 0	11.563 8	96.87		
	3	92.17	5.603 9	6.082 0	11.563 8	97.99		
	4	90.95	5.529 8	6.082 0	11.363 7	95.92		
	5	89.06	5.414 8	6.082 0	11.243 7	95.84		
	6	88.24	5.365 0	6.082 0	11.143 7	95.01		
提取物	1	2.48	1.514	1.51	3.023	99.93	99.53	1.99
	2	2.33	1.423	1.51	2.909	98.41		
	3	2.69	1.643	1.51	3.187	102.25		
	4	2.37	1.447	1.51	2.975	101.19		
	5	2.66	1.624	1.51	3.112	98.54		
	6	2.83	1.728	1.51	3.190	96.82		

2.6.6 含量测定 按上述方法测定样品,结果见表 5。

表 5 白花丹参药材及提取物中总丹酚酸的含量 %

No.	药材含量	RSD	提取物含量	RSD
1	6.08	2.79	61.06	0.49
2	5.90	1.59	61.03	1.28
3	5.65	1.62	61.96	0.74
4	6.19	2.17	-	-
5	5.94	2.54	-	-

3 讨论

总酚酸类成分的测定方法主要有铁氰化钾显色法^[15]和亚硝酸钠-硝酸铝配位显色法^[16]。三氯化铁-铁氰化钾显色法测定总丹酚酸含量时干扰因素较多,方法专属性差^[9]。亚硝酸钠-硝酸铝配位显色法稳定,可操作性强,结果准确,因此选择此方法。

通过对测定丹参中总酚酸含量常用的 3 种对照品原儿茶醛、丹酚酸 B 和丹参素钠显色后可见吸收图谱的对比,确定以丹酚酸 B 为对照品,测定波长

493 nm。3种对照品中,原儿茶醛与供试品最大吸收波长相差最大,如果以原儿茶醛为对照品,会造成测定的供试品中总酚酸含量与实际含量有一定差异,影响结果准确性。丹酚酸B为白花丹参中的主要酚酸类成分,以其为对照品,可以较准确计算总酚酸含量,但其缺点为价格较高。

对供试品溶液制备方法进行了考察^[12,17]。经比较,水提取总丹酚酸含量显著高于酸水提取;回流和超声提取对比显示,回流提取显著高于超声提取;对提取溶剂量(10,25,50 mL)和提取时间(30,60,90 min)进行了考察,确定加入水25 mL,回流提取30 min。

[参考文献]

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

[2] 王峰祥,闫永亮,毛淑敏,等. 白花丹参野生资源濒危保护和开发利用研究[J]. 中国现代中药,2009,11(8):17.

[3] 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.

[4] 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.

[5] Fan H Y, Fu F H, Yang M Y, et al. Antiplatelet and antithrombotic activities of salvianolic acid A [J]. Thromb Res, 2010,126(1):17.

[6] Lam F F, Yeung J H, Kwan Y W, et al. Salvianolic acid B, an aqueous component of danshen (*Salvia miltiorrhiza*), relaxes rat coronary artery by inhibition of calcium channels [J]. Eur J Pharmacol, 2006, 553 (1/

3):240.

[7] Zhou R, He L F, Li Y J, et al. Cardioprotective effect of water and ethanol extract of *Salvia miltiorrhizainan* experimental model of myocardial infarction [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 139(2):440.

[8] 暴风伟,刘玉强,胡丽萍,等. HPLC 波长切换法同时测定丹参酚酸提取物中5种成分[J]. 中国成药, 2012,34(12):2368.

[9] 陈焕娜,刘洋,赵晓霞,等. 分光光度法测定丹参总酚含量方法的研究[J]. 亚太传统医药,2010,6(8):19.

[10] 卢君蓉,傅超美,刘芳,等. 星点设计-效应面法优选丹参中丹参总酚酸的提取工艺[J]. 中成药,2012,34(7):1373.

[11] 叶勇. 比色法与高效液相色谱法对丹参酚酸含量测定比较研究[J]. 浙江中医药大学报,2006,30(4):350.

[12] 王文祥,周巧霞,蒋木岗,等. 比色法测定丹参及提取物水溶性总酚的改进[J]. 中草药,2001,32(8):711.

[13] 史国玉,刘艳辉,郭庆梅,等. 丹参叶中水溶性成分提取工艺研究[J]. 山东中医杂志,2012,31(2):132.

[14] 董美虹,王锦玉,全燕,等. 白花丹参提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(13):18.

[15] 李朝霞,李云谷. 大孔吸附树脂纯化丹参总酚酸的工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(3):30.

[16] 黄喜如,曹冬,樊淑彦,等. NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 显色测定丹参及其制剂中水溶性酚酸总量[J]. 化学试剂, 2005,27(12):745.

[17] 石勇强,王玉. 丹参酒制方法与其水溶性有效成分含量的关系[J]. 黑龙江医药,2010,23(5):706.

[责任编辑 顾雪竹]

欢迎投稿

欢迎订阅