

## 双波长 HPLC 同时测定丹参中隐丹参酮、 丹参酮 I 和丹参酮 II<sub>A</sub> 的含量

石岩<sup>1,2\*</sup>, 熊婧<sup>1</sup>, 胡晓茹<sup>1</sup>, 魏锋<sup>1</sup>, 马双成<sup>1</sup>, 林瑞超<sup>1,2</sup>

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 2. 沈阳药科大学 中药学院, 沈阳 110016)

**[摘要]** 目的: 建立双波长 HPLC 测定丹参中隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II<sub>A</sub> 的含量的方法。方法: 使用 Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇-水为流动相梯度洗脱, 流速 1 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 245 nm (丹参酮 I) 和 269 nm (隐丹参酮和丹参酮 II<sub>A</sub>)。结果: 隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II<sub>A</sub> 分别在各自进样量范围内与峰面积的线性关系良好, 相关系数均在 0.9997 以上, 各成分平均回收率均在 98.0% ~ 100.1% (n = 6), 各成分回收率 RSD 均不过 3.0%。结论: 该方法快速、准确、简便, 可作为丹参中主要菲醌类成分的质控与评价方法。

**[关键词]** 高效液相色谱; 双波长检测; 隐丹参酮; 丹参酮 I; 丹参酮 II<sub>A</sub>; 含量测定

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2013) 22-0158-03

**[doi]** 10.11653/syfyj2013220158

## Simultaneous Determination of Cryptotanshinone, Tanshinone I and Tanshinone II<sub>A</sub> in *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* by Dual-wavelength HPLC

SHI Yan<sup>1,2\*</sup>, XIONG Jing<sup>1</sup>, HU Xiao-ru<sup>1</sup>, WEI Feng<sup>1</sup>, MA Shuang-cheng<sup>1</sup>, LIN Rui-chao<sup>1,2</sup>

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China; 2. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method for simultaneous determination of cryptotanshinone, tanshinone I and tanshinone II<sub>A</sub> in *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* by dual-wavelength HPLC. **Method:** The Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with a mobile phase of methanol-water at 1 mL·min<sup>-1</sup>, and the detection wave-lengths were set at 245 nm (tanshinone I) and 269 nm (cryptotanshinone and tanshinone II<sub>A</sub>). **Result:** All calibration curves showed good linear regression in test concentration ranges ( $r > 0.9997$ ), and the overall average recoveries were in the range of 98.0% -100.1% (n = 6) with RSD no more than 3.0%. **Conclusion:** The results indicated that this dual-wavelength HPLC method is rapid, accuracy, and simple, which is suitable for the quality control of the main phenanthraquinone in *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*.

**[Key words]** HPLC; dual-wavelength; cryptotanshinone; tanshinone I; tanshinone II<sub>A</sub>; determination

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎<sup>[1]</sup>, 首载于《神农本草经》, 具有活血祛瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痈等功效, 常用

来治疗心血管等疾病<sup>[2]</sup>。丹参中主要有效成分为水溶性的酚酸类成分和脂溶性的菲醌类成分<sup>[3]</sup>, 菲醌类成分具有较强的抗氧化、抗菌消炎、心血管药理作用、抗肿瘤作用<sup>[4-5]</sup>。目前关于丹参菲醌类成分的 HPLC 测定的文献报道较多<sup>[6-8]</sup>, 但是这些文献所用液相洗脱系统往往加入甲酸或磷酸等酸性物质, 测定时间也较长, 本文参考以上文献, 使用简单的液相洗脱系统, 在 30 min 内完成了多种成分的测定,

**[收稿日期]** 20130529 (004)

**[通讯作者]** \* 石岩, 博士, 副研究员, 从事中药及保健食品质量控制与评价研究, E-mail: san0373@163.com

并且针对所测成分丹参酮 I、隐丹参酮和丹参酮 II<sub>A</sub> 的紫外吸收的不同分别选用 245,269 nm 两个通道进行检测。

## 1 材料

**1.1 仪器** Waters 2695 型液相色谱仪(美国 Waters 公司),Waters 2489 紫外检测器(美国 Waters 公司),METTLER AE240 型电子天平(瑞士 METTLER 公司),KQ-300DA 型超声清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。

**1.2 试药** 隐丹参酮对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110852-200305)、丹参酮 I(中国食品药品检定研究院,批号 0867-200205)和丹参酮 II<sub>A</sub>(中国食品药品检定研究院,批号 110766-200518);甲醇为色谱纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

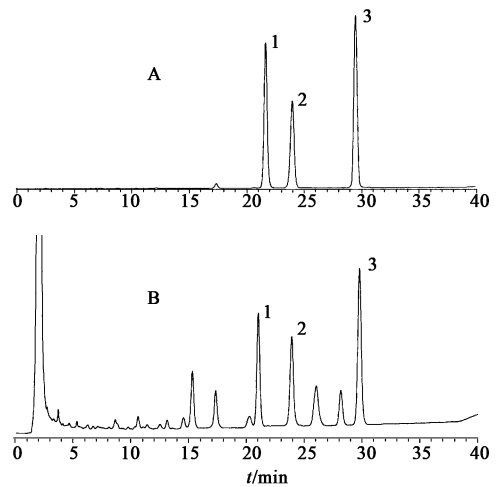
**2.1 色谱条件** Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相 A 为水,B 为甲醇,梯度洗脱(0~35 min,30%~17% A),流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,柱温为室温,检测波长 245 nm(丹参酮 I)和 269 nm(隐丹参酮和丹参酮 II<sub>A</sub>)。

**2.2 对照品混标溶液的制备** 分别精密称取隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II<sub>A</sub> 对照品适量于 10 mL 棕色量瓶中,甲醇定容至刻度,即得各对照品储备液。分别取各对照品储备液适量于同一个棕色量瓶中,甲醇定容至刻度,即得对照品混标溶液,该混标溶液含隐丹参酮 29.40 mg·L,丹参酮 I 12.56 mg·L,丹参酮 II<sub>A</sub> 33.72 mg·L。

**2.3 供试品溶液的制备** 取丹参粉末(过三号筛)约 0.3 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,称定质量,超声(功率 250 W,频率 25 kHz)提取 30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

### 2.4 方法学考察

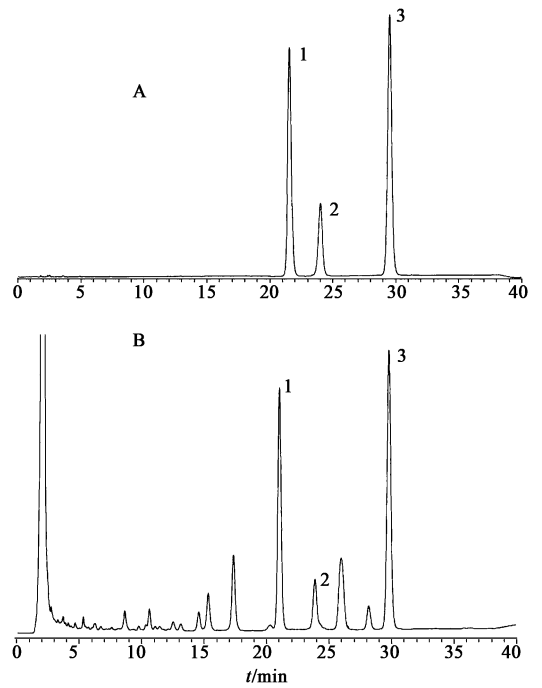
**2.4.1 线性关系考察** 分别精密吸取混标溶液 1,2,4,6,8,10 mL 置于 6 个 10 mL 棕色量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,即得各系列浓度的混标溶液。分别精密吸取各系列浓度的混标溶液 5 μL,注入液相色谱仪,测定,以各对照品进样量(μg)为 X 轴,以峰面积积分值为 Y 轴,进行线性回归,各对照品回归方程和线性范围分别为  $Y_{\text{隐丹参酮}} = 7\ 318\ 346X + 5\ 638$  ( $r = 0.999\ 8$ ),线性范围 0.014 7~0.147 μg; $Y_{\text{丹参酮 I}} = 9\ 814\ 536X - 61\ 358$  ( $r = 0.999\ 7$ ),线性范围 0.006 28~0.062 8 μg; $Y_{\text{丹参酮 II}_A} = 9\ 341\ 951X - 85\ 328$  ( $r = 0.999\ 8$ ),线性范围 0.016 86~



1. 隐丹参酮;2. 丹参酮 I;3. 丹参酮 II<sub>A</sub>;

A. 混合对照品;B. 丹参供试品

图 1 245 nm 检测丹参 HPLC 色谱



1. 隐丹参酮;2. 丹参酮 I;3. 丹参酮 II<sub>A</sub>;

A. 混合对照品;B. 丹参供试品

图 2 269nm 检测丹参 HPLC 色谱

0.168 6 μg。

**2.4.2 精密度考察** 精密吸取同一份供试品溶液 5 μL,连续进样 5 次,隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II<sub>A</sub> 的峰面积积分值 RSD 分别为 1.6%,1.1%,0.9% ( $n = 5$ ),表明精密度良好。

**2.4.3 重复性考察** 取同一批丹参供试品药材粉末,按照 2.3 项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按上述色谱条件分析测定,分别测定并计算隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II<sub>A</sub> 的含量,各份供试品溶液的隐

丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II<sub>A</sub> 的测定结果 RSD 分别为 2.1% ,1.9% ,2.2% (n=6),表明重复性良好。

**2.4.4 稳定性考察** 取同一份供试品溶液,分别于 0,2,4,8,12 h 进样测定,隐丹参酮、丹参酮和丹参酮 II<sub>A</sub> 的峰面积 RSD 分别为 1.20% ,1.37% ,0.91% ,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

**2.4.5 回收率考察** 取已知含量的供试品粉末 6 份,每份各约 0.15 g,精密称定,分别置具塞锥形瓶中,分别精密加入 2.2 项下制备的对照品混标溶液 10 mL,按照 2.3 项下方法平行制备,测得隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II<sub>A</sub> 平均回收率见表 1,表明该方法加样回收试验结果良好。

表 1 丹参中 3 种成分加样回收率试验

成分	供试品 含有量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
隐丹参酮	0.286 3	0.294 0	0.582 3	100.7	100.1	3.0
	0.287 1		0.574 5	97.8		
	0.287 5		0.591 4	103.4		
	0.285 4		0.571 2	97.2		
	0.283 7		0.589 6	104.1		
	0.288 2		0.575 5	97.7		
丹参酮 I	0.105 5	0.125 6	0.228 7	98.1	98.5	2.6
	0.105 8		0.225 9	95.6		
	0.105 9		0.230 2	99.0		
	0.105 1		0.231 2	100.4		
	0.104 5		0.233 0	102.3		
	0.106 2		0.226 6	95.9		
丹参酮 II <sub>A</sub>	0.331 5	0.337 2	0.663 1	98.3	98.4	1.4
	0.332 4		0.659 4	97.0		
	0.332 9		0.668 2	99.4		
	0.330 4		0.669 3	100.5		
	0.328 5		0.655 3	96.9		
	0.333 7		0.665 2	98.3		

**2.5 样品测定** 按照上述供试品溶液制备方法 & 色谱条件测定收集到的 3 批丹参药材供试品,结果见表 2。

表 2 3 批丹参供试品测定 %

No.	隐丹参酮	丹参酮 I	丹参酮 II <sub>A</sub>
1	0.19	0.07	0.22
2	0.21	0.12	0.26
3	0.22	0.09	0.30

### 3 讨论

**3.1 波长通道的选择** 在确定 HPLC 色谱条件时,通过对对照品单标溶液的紫外扫描发现,丹参酮 I、隐丹参酮和丹参酮 II<sub>A</sub> 的紫外最大吸收分别约为 245,263,269 nm。由于供试品丹参酮 I 含量相对较低,若统一选用 263 nm 或 269 nm 检测,该成分峰面积较小,测定误差较大,所以分别选择 245,269 nm 作为检测波长。

**3.2 液相洗脱系统的选择** 本研究使用甲醇-水洗脱系统即可使供试品中的丹参酮 I、隐丹参酮和丹参酮 II<sub>A</sub> 分离良好,该洗脱系统经济、简单且易操作,适合分离丹参中丹参酮 I、隐丹参酮和丹参酮 II<sub>A</sub> 等菲醌类成分,但该洗脱系统对丹参中的酚酸类成分分离效果较差。

**3.3 提取方法的选择** 分别考察了加热回流提取法和超声提取法,结果显示两种提取方法提取效率相当,考虑操作简便选择超声提取法;分别考察了 15,30,45 min 3 个超声提取时间,结果超声提取 30 min 时待测成分的提取量已达最大值,所以确定超声 30 min 作为提取方法。

### [参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:70.

[2] 肖禾,宋民宪,赖娟. 国家药品标准中丹参的质量控制情况[J]. 中国药事,2006,20(1):57

[3] 肖培根. 新编中药志. 第 1 卷[M]. 北京:化学工业出版社,2001:213.

[4] 梁勇,羊裔明,袁淑兰. 丹参酮药理作用及临床应用研究进展[J]. 中草药,2000,31(4):304.

[5] 陈坚,林庚金. 丹参酮抗肿瘤的研究进展[J]. 复旦学报:医学版,2003,30(6):626.

[6] 赵鸣舒,赵希贤. 双波长高效液相色谱法测定丹参中多种成分的含量[J]. 中国药事,2010,24(8):804.

[7] 魏惠珍,王跃生,吴有根,等. HPLC 同时测定冠心病丹参胶囊中丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 B 和丹参酮 II<sub>A</sub> 的含量[J]. 中成药,2009,31(1):64.

[8] 周国军,李焱,秦民坚,等. 高效液相色谱法快速测定丹参中 5 种活性成分的含量[J]. 药物分析杂志,2012,32(8):1357.

[责任编辑 顾雪竹]