

# 高效液相色谱法测定白花丹参 3 种炮制品中 5 种酚酸类成分的含量

赵静<sup>1</sup>, 李玉琴<sup>2\*</sup>, 段瑞<sup>2</sup>, 吴娜娜<sup>2</sup>, 唐瑜菁<sup>2</sup>

(1. 山东省泰山疗养院, 山东 泰安 271000; 2. 泰山医学院, 山东 泰安 271016)

**[摘要]** 目的: 建立同时测定白花丹参生品、酒制品和炒炭 3 种炮制品中 5 种酚酸类成分丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、迷迭香酸和丹酚酸 B 含量的高效液相色谱法, 并探讨不同炮制方法对白花丹参中主要酚酸类成分的影响。方法: 大连依利特 C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 柱; 流动相甲醇-5% 冰醋酸, 梯度洗脱; 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 286 nm, 进样量 20 μL。结果: 丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、迷迭香酸和丹酚酸 B 的线性范围分别是 7.31 ~ 234 (R<sup>2</sup> = 0.999 5), 6.75 ~ 216 (R<sup>2</sup> = 0.999 9), 52.8 ~ 1.65 (R<sup>2</sup> = 0.999 0), 4.67 ~ 149.50 (R<sup>2</sup> = 0.999 8), 42.25 ~ 1 352 mg·L<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> = 0.999 9); 样品中 5 种酚酸类成分的平均加样回收率均 > 98%, RSD 均 < 1.6%。结论: 该方法简便快速, 重复性好, 灵敏度高, 可作为白花丹参类药材的酚酸类成分含量的定量方法。测定结果显示, 3 种炮制品种均不含原儿茶酸, 其余 4 种成分的含量均表现为生品 < 酒制品 < 炒炭。

**[关键词]** 高效液相色谱; 白花丹参生品; 酒制品; 炒炭; 酚酸类化合物

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0154-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013220154

## Simultaneous Determination the Five Phenolic Acids in the Three Processed Products of *Salvia miltiorrhiza* Bunge f. *alba* by HPLC

ZHAO Jing<sup>1</sup>, LI Yu-qin<sup>2\*</sup>, DUAN Rui<sup>2</sup>, WU Na-na<sup>2</sup>, TANG Yu-jing<sup>2</sup>

(1. Taishan Sanatorium of Shandong Province, Taian 271000, China;

2. Taishan Medical University, Taian 271016, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop a HPLC method for simultaneous determination of danshensu, protocatechuic acid, protocatechuic aldehyde, ferulic acid and salvianolic acid B in *Salvia miltiorrhiza* Bunge f. *alba*, the wine fried and the carbonizing, and explore the effects for their five phenolic acids with different processing methods *S. miltiorrhiza* Bunge f. *alba*. **Method:** The column was C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase was methanol and 5% acetic acid glacial with gradient elution and the flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, the detection wavelength was 286 nm. **Result:** The linearities were obtained over the range of 7.31-234 (R<sup>2</sup> = 0.999 5) for danshensu, 6.75-216 (R<sup>2</sup> = 0.999 9) for protocatechuic acid, 52.8-1.65 (R<sup>2</sup> = 0.999 0) for protocatechuic aldehyde, 4.67-149.50 (R<sup>2</sup> = 0.999 8) for rosmarinic acid, 42.25-1 352 mg·L<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> = 0.999 9) for salvianolic acid B, respectively. All of the average recoveries were > 98% with RSD < 1.6%. **Conclusion:** The validated method has the advantages of simplicity, precision and reliability, and could be used to simultaneous determination of the five phenolic acids in *S. miltiorrhiza* Bunge var *alba*. The results indicated that protocatechuic acid wasn't detected in the three processed products, and the rest four contents presented the fresh < the wine fried < the carbonizing, and provided the theory foundation for pharmacy and clinic.

**[收稿日期]** 20130619(014)

**[基金项目]** 山东省高等学校科技计划(J09LF30); 山东省科技攻关项目(2010GSF10282)

**[第一作者]** 赵静, 学士, 主管药师, 从事中药制剂分析工作, Tel: 0538-6232355, E-mail: zhaojingtl@163.com

**[通讯作者]** \* 李玉琴, 博士, 副教授, 从事药物分析研究工作, Tel: 0538-6229751, E-mail: liyuqin@tsmc.edu.cn

**[Key words]** HPLC; The fresh *S. miltiorrhiza* Bunge var. *alba*; the wine fried, the carbonizing; danshensu; protocatechuic acid; protocatechuic aldehyde; ferulic acid; and salvianolic acid B

白花丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge f. *alba*)为丹参的白花变型,作为山东特有的道地药材,主产于山东章丘、莱芜等丘陵地区<sup>[1]</sup>。近代医学临床证明,白花丹参在心脑血管疾病、癌症、抗衰老等方面具有很好的疗效。在治疗慢性肝炎、早期肝硬化等症,也有良好的效果<sup>[2-7]</sup>。

白花丹参有效成分通常被归为两大类:脂溶性成分(丹参酮类)和水溶性成分(酚酸类)<sup>[8-9]</sup>。白花丹参的水溶性酚酸类化合物是丹参的主要有效成分,具有增加血流量和扩张冠状动脉的作用,对心肌梗塞、心肌损害、心绞痛和冠心病具有一定疗效,因此丹参药材中丹酚酸含量的测定对药材质量评价具有一定意义<sup>[10]</sup>。

本文采用高效液相色谱法对白花丹参生品、酒制品、炭炒3种不同炮制品中丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、迷迭香酸和丹酚酸B含量进行测定、比较,并探讨不同炮制方法对白花丹参中水溶性成分的影响,为临床合理用药提供依据。

## 1 材料

**1.1 仪器** 岛津高效液相色谱仪(LC-10ATvpPlus),SPD-10A VP检测器;KQ600DB型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);电子分析天平(上海恒平科学设备有限公司)。

**1.2 试药** 丹参素(批号110855-200809)、原儿茶酸(批号110809-200503)和原儿茶醛(批号110810-200506)购于中国药品生物制品检定所,迷迭香酸(批号1231-050419)购自中国固体制剂制造技术国家工程研究中心,丹酚酸B(批号SAB-E060720)购自上海沪云医药开发有限公司;甲醇(天津市彪仕奇科技发展有限公司)为色谱纯,冰乙酸(天津市富宇精细化工有限公司)为分析纯,实验用水为纯化水;白花丹参采自泰山医学院药材种植基地,并经高红莉副教授鉴定。生品、酒制品和炒炭由泰山医学院药学教研室段瑞老师按《中国药典》一部(2010年版)规定的方法<sup>[11]</sup>炮制。

## 1.3 溶液配制

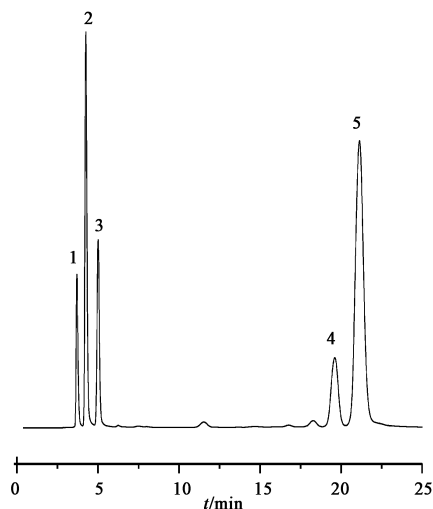
**1.3.1 标准溶液的配制** 分别精密称取丹参素11.7 mg、原儿茶酸10.3 mg、原儿茶醛16.2 mg、迷迭香酸14.95 mg,用纯化水分别配置成10 mL的储备液。在分别精密量取上述对照品储备液适量,置于10 mL量瓶中,再加入精密称定的丹酚酸B对照

品13.52 mg,用纯化水定容至10 mL,配制成混合对照品贮备液,其浓度分别为234,216,52.8,149.50,1352 mg·L<sup>-1</sup>,密闭置于4℃下避光保存。

**1.3.2 样品溶液的配制** 分别精密称取炮制品粉末2.0 g,加20 mL蒸馏水,60℃恒温振荡1 h后于100℃下煮沸约30 min。4000 r·min<sup>-1</sup>离心5 min,收集上清液。将药渣再加20 mL蒸馏水,煮沸约30 min,离心后取上清液,合并两次上清液,定容至50 mL。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** C-18色谱柱(大连依利特)(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相5%冰醋酸(A)-甲醇(B),进行梯度洗脱(0~6 min,30% B,6~10 min,30%~35% B,10~30 min,40% B,后运行10 min),流速为1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长286 nm,柱温为室温(约27℃),进样量为20 μL。此条件下,5种分析物的混合对照品色谱见图1。



1. 丹参素;2. 原儿茶酸;3. 原儿茶醛;4. 迷迭香酸;5. 丹酚酸 B

图1 对照品色谱

**2.2 线性关系考察** 分别精密量取丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、迷迭香酸和丹酚酸B对照品贮备液,用20%甲醇稀释相应的倍数,得到6个浓度梯度的标准混合溶液。在选定的测定条件下进样20 μL,重复测定3次,根据测得的峰面积平均值Y对应的质量浓度X进行线性回归,得到回归方程和相关系数,见表1。

**2.3 检测限的测定** 将一定浓度的标准混合溶液逐级稀释,依次进样,计算当信噪比S/N=3时所对应的标准混合溶液的浓度以确定检测限,见表1。

表 1 分析物的回归方程、相关系数及检测限

分析物	回归方程	线性范围 C/mg·L <sup>-1</sup>	相关系数/R <sup>2</sup>	检测限 C/mg·L <sup>-1</sup>
丹参素	Y = 15 230X15 282	7.31 ~ 234	0.999 5	0.028
原儿茶酸	Y = 44 550X + 19 830	6.75 ~ 216	0.999 9	0.026
原儿茶醛	Y = 93 413X + 54845	52.8 ~ 1.65	0.999 0	0.006 3
迷迭香酸	Y = 37 141X22 448	4.67 ~ 149.5	0.999 8	0.018
丹酚酸 B	Y = 19 435X + 39 893	42.25 ~ 1 352	0.999 9	0.16

**2.4 精密度试验** 为了考察体系的精密度,取含丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、迷迭香酸和丹酚酸 B 分别为 58.5,54.0,13.2,37.375 和 338 mg·L<sup>-1</sup> 的混合标准,在上述条件下重复进样 5 次。结果丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、迷迭香酸和丹酚酸 B 用峰面积的 RSD 分别为 1.57%,1.61%,0.26%,0.65% 和 0.50%,显示 5 种分析物的精密度良好。

**2.5 加样回收率试验** 取已知含量的白花丹参样品,按高、中、低 3 个量准确加入标准品适量,按 1.3.2 的方法制备的供试品溶液,通过标准加入法测定方法的回收率。结果见表 2~4。

表 2 生品加样回收率试验 (n = 6)

分析物	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	平均回收率/%	回收率 RSD/%
丹参素	26.51	29.25	56.43	102.3	0.74
原儿茶醛	3.711	3.522	7.300	101.9	1.12
迷迭香酸	17.92	18.69	36.50	99.42	1.41
丹酚酸 B	302.2	302.8	609.3	102.1	1.53

表 3 酒制品加样回收率试验 (n = 6)

分析物	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	平均回收率/%	回收率 RSD/%
丹参素	42.10	39.08	81.53	100.9	1.83
原儿茶醛	5.464	6.651	12.15	101.3	1.18
迷迭香酸	17.28	18.69	35.77	98.93	1.36
丹酚酸 B	343.2	338.0	684.6	100.1	0.98

表 4 炭炒品加样回收率试验 (n = 6)

分析物	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	平均回收率/%	回收率 RSD/%
丹参素	84.31	87.17	172.4	101.1	0.69
原儿茶醛	3.485	4.262	7.815	101.6	0.61
迷迭香酸	11.32	12.69	23.83	98.62	1.37
丹酚酸 B	150.2	169.0	320.0	100.5	0.80

**2.6 样品测定结果** 将 2.3.2 制备的样品溶液,生品稀释 3 倍,酒制品稀释 3 倍,炒炭稀释 10 倍,在相同的测定条件下,测定白花丹参炮制品中丹参素,原儿茶酸,原儿茶醛,迷迭香酸,丹酚酸 B 5 种成分的含量,3 种样品的图谱见图 3。样品中各分析物的测定结果见表 5。

表 5 白花丹参样品中 4 种成分测定 (n = 3) %

样品	分析物	含量	RSD
生品	丹参素	0.55	1.30
	原儿茶醛	0.07	0.85
	迷迭香酸	0.36	1.49
	丹酚酸 B	6.02	1.59
酒制品	丹参素	0.85	0.70
	原儿茶醛	0.11	1.54
	迷迭香酸	0.34	1.25
炒炭品	丹参素	4.55	0.93
	原儿茶醛	0.18	1.51
	迷迭香酸	0.63	1.52
	丹酚酸 B	7.95	0.42

### 3 结论与讨论

本文建立的同时测定白花丹参中丹参素、原儿茶醛、迷迭香酸和丹酚酸 B 含量的高效液相色谱法,检测灵敏度高,方法简便、准确,可作为白花丹参类药材中水溶性成分含量的定量方法。测定结果显示,3 种炮制品中均未检测出原儿茶酸,其余 4 种成分的含量均表现为生品 < 酒制品 < 炒炭,为药物制剂和临床应用提供了理论依据。

本实验对测定丹参素,原儿茶酸,原儿茶醛,迷迭香酸和丹酚酸 B 的流动相梯度进行了筛选,当 6~10 min,流动相(B)甲醇改变至 40% 时,迷迭香酸和丹酚酸 B 不能分离,当 6~10 min,流动相(B)甲醇改变至 35% 时,迷迭香酸和丹酚酸能够实现基线分离,因此最后确定梯度为 0~6 min,30% B,6~10 min,B 线性改变至 35%,10~30 min,B 线性

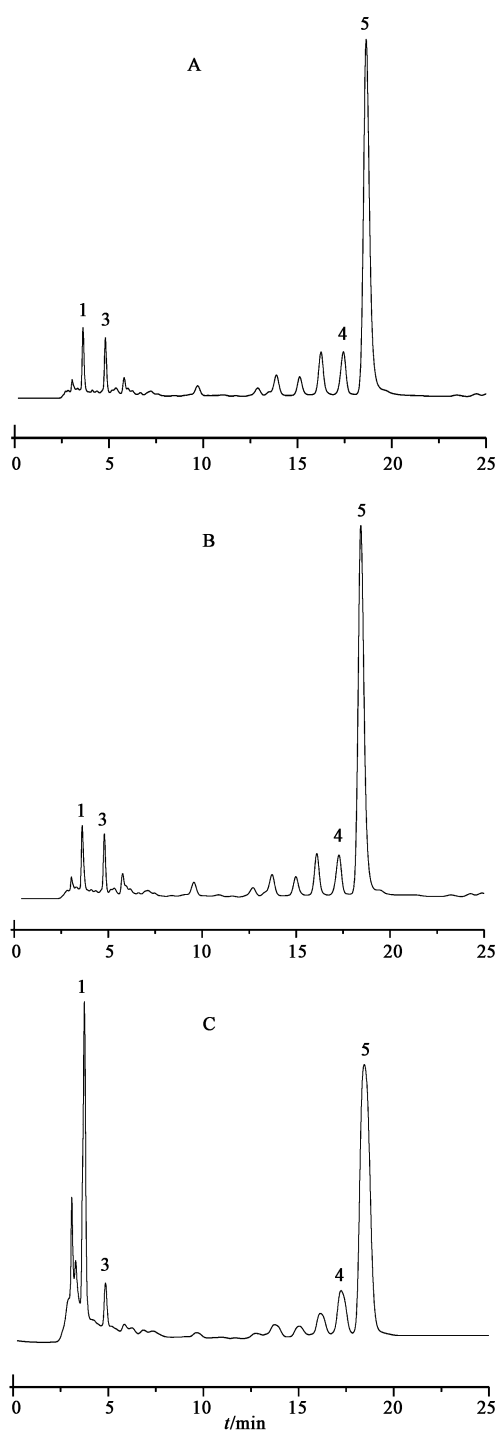
改变为40%。

据文献报道,丹参素和原儿茶醛的最大吸收波长为281 nm,原儿茶酸的最大吸收波长为260 nm,迷迭香酸的最大吸收波长为330 nm,丹酚酸B的最大吸收波长为286 nm。因此,5种化合物的吸收光谱和最大吸收波长存在明显差异,5种化合物在286 nm处信号强,且基线稳定,因此采用286 nm为检测波长。

### [参考文献]

- [1] 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,2009,29(1):46.
- [2] 史国玉,周凤琴,郭庆海. 丹参与白花丹参叶化学成分与药理临床研究进展[J]. 时珍国医国药,2011,22(2):465.
- [3] 李伟,王德忠,朱京涛,等. 白花丹参对清醒自发性高血压大鼠血压及血压波动性的影响[J]. 中国老年学杂志,2010,30(1):200.
- [4] 张秋玲,孙远东,王海英,等. 白花丹参对大鼠脑缺血再灌注致线粒体损伤及细胞凋亡的影响[J]. 中国病理生理杂志,2010,26(4):725.
- [5] 于长凯,张晓燕,高允生. 白花丹参上调 Bcl-2 抑制内皮细胞凋亡[J]. 第二军医大学学报,2010,31(11):1211.
- [6] 于长凯,张晓燕,高允生. 白花丹参对过氧化氢致人脐静脉血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. 中国药物警戒,2010,7(4):199.
- [7] 焦鹏,常起,王欣农,等. 白花丹参叶制剂对乳腺癌 BCap-37 细胞株增殖抑制的体外研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(2):350.
- [8] 王福刚,高允生,齐永秀,等. 白花丹参药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中成药,2010,32(9):1464.
- [9] 邵明辉,张永清,李长峰. 丹参与白花丹参有效成分含量的比较研究[J]. 齐鲁药事,2009,28(1):24.
- [10] 赵启韬,王鹏,杨红,等. 白花丹参水溶性部位抑制脂多糖诱导的血管内皮细胞凋亡[J]. 中国药理与临床,2010,26(6):56.
- [11] 中国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010;附录20.

[责任编辑 顾雪竹]



1. 丹参素;3. 原儿茶醛;4. 迷迭香酸;5. 丹酚酸 B  
A. 白花丹参生品;B. 白花丹参酒制品;C. 白花丹参炒碳品

图3 白花丹参样品色谱