

# HPLC 测定山楂、丹参药对提取物中 6 个成分的含量

暴风伟, 刘玉强, 张振秋\*, 胡丽萍, 刘威  
(辽宁中医药大学, 辽宁 大连 116600)

**[摘要]** 目的: 建立高效液相色谱测定山楂、丹参药对提取物中原儿茶醛、金丝桃苷、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、槲皮素 6 个成分含量的方法。方法: 采用 Phenomexsil-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相乙腈-0.5% 磷酸水, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 300 nm, 柱温 30 °C。结果: 原儿茶醛、金丝桃苷、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、槲皮素 6 个成分的进样量分别在 0.021 58 ~ 0.107 9 μg ( $r = 0.999 4$ ), 0.102 6 ~ 0.513 0 μg ( $r = 0.999 2$ ), 0.157 5 ~ 0.787 5 μg ( $r = 0.999 0$ ), 0.245 6 ~ 1.228 μg ( $r = 0.999 1$ ), 2.600 ~ 13.00 μg ( $r = 0.999 0$ ), 0.085 1 ~ 0.425 6 μg ( $r = 0.999 1$ ) 与色谱峰面积呈良好的线性关系。原儿茶醛、金丝桃苷、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、槲皮素 6 个成分加样回收率 ( $n = 6$ ) 分别为 99.1%, 99.3%, 100.2%, 99.2%, 98.9%, 99.2%, RSD 均 < 3%。结论: 方法可为山楂、丹参药对提取物的质量控制提供参考。

**[关键词]** 高效液相色谱法; 山楂、丹参药对提取物; 含量测定

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0082-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013110082

## HPLC Determination of Six Ingredients in Hawthorn and *Salvia miltiorrhiza* Extracts

BAO Feng-wei, LIU Yu-qiang, ZHANG Zhen-qiu\*, HU Li-ping, LIU Wei  
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop an HPLC method for determination of six ingredients protocatechuic aldehyde, hyperoside, rosmarinic acid, lithospermic acid, salvianolic acid B, quercetin in hawthorn and *salvia miltiorrhiza* extracts. **Method:** The separation was performed on a Phenomexsil-C<sub>18</sub> ODS (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with the gradient elution of acetonitrile-water of 0.5% phosphoric acid at the flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. Detection wavelength was set at 300 nm. The column temperature was maintained at 30 °C. **Result:** Protocatechuic aldehyde, hyperoside, rosmarinic acid, lithospermic acid, salvianolic acid B, quercetin had good linearity in the ranges of 0.021 58-0.107 9 μg ( $r = 0.999 4$ ), 0.102 6-0.513 0 μg ( $r = 0.999 2$ ), 0.157 5-0.787 5 μg ( $r = 0.999 0$ ), 0.245 6-1.228 μg ( $r = 0.999 1$ ), 2.600-13.00 μg ( $r = 0.999 0$ ), 0.085 1-0.425 6 μg ( $r = 0.999 1$ ) respectively. The average recoveries ( $n = 6$ ) of protocatechuic aldehyde, hyperoside, rosmarinic acid, lithospermic acid, salvianolic acid B, quercetin were 99.1%, 99.3%, 100.2%, 99.2%, 98.9%, 99.2% respectively with RSDs of the recovery were less than 3%. **Conclusion:** The developed method is helpful to control the quality of hawthorn and *salvia miltiorrhiza* extracts.

**[Key words]** HPLC; Hawthorn and *miltiorrhiza* extracts; assay

山楂味酸、甘, 微温, 归脾、胃、肝经<sup>[1]</sup>。其中黄酮类成分具有抗心肌缺血损伤、心肌脂质过氧化、降

**[收稿日期]** 20120330(005)

**[基金项目]** 国家科技重大专项(2010ZX090401-304-5-6)

**[第一作者]** 暴风伟, 硕士研究生, 从事药物分析研究, Tel:0411-87586110, E-mail: weiwei115566@126.com

**[通讯作者]** \* 张振秋, 教授, 博士生导师, 从事中药质量标准研究, Tel:0411-87586058, E-mail: zhangzhenqiu@sina.com

压降血脂、增加冠脉流量等作用;丹参味苦,微寒。归心、肝经<sup>[1]</sup>。其水溶性成分具有保护心肌、扩张血管、活血祛瘀、痛经止痛、清心除烦、凉血消痈等作用。目前文献报道,山楂丹参同用具有明显的调节血脂和抗动脉粥样硬化作用<sup>[2-3]</sup>。文献对山楂或者丹参单位药材中各成分含量测定的报道较多<sup>[4-12]</sup>,但同时测定山楂、丹参药对提取物中各成分含量的方法尚未见报道。本文参照 2010 年版《中国药典》中规定的山楂与丹参最大用量,最后确定山楂和丹参药材按 4:5 比例混合,采用高效液相色谱法梯度洗脱同时测定山楂、丹参药对提取物中原儿茶醛、金丝桃苷、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、槲皮素 6 个成分含量,为山楂、丹参药对提取物的质量评价提供了可行的方法。

## 1 材料

**1.1 仪器** Agilent-1100 型高效液相色谱仪,配置四元梯度泵、在线脱气机、VWD 检测器;AS3120A 型超声提取器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司),2140 型电子分析天平(上海奥豪斯公司),METTLER AB135-S 型 1/10 万电子天平(瑞士),U-3010 型紫外-可见分光光度计(日立公司)。

**1.2 试药** 对照品原儿茶醛(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%);金丝桃苷(批号 111521-201004,纯度 93.9%)和槲皮素(批号 100081-200406,纯度 97.3%)均购于中国食品药品检定研究院;紫草酸(批号 110326,纯度 98.8%)购于四川省维克奇生物科技有限公司。丹参和山楂经辽宁中医药大学李峰教授鉴定均为正品药材。乙腈、甲醇为色谱纯(山东禹王化学试剂公司),水为重蒸馏水,磷酸为分析纯。

**1.3 提取物的制备** 取山楂药材,用 10 倍量 75% 乙醇回流提取 2 次,每次 1 h,滤过,合并滤液,并浓缩药液浓度至含生药  $1.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,通过 AB-8 型大孔吸附树脂柱,70% 乙醇洗脱,收集洗脱液,回收乙醇,浓缩,干燥,即得山楂提取物;取丹参药材,加水(12 倍,12 倍,10 倍)回流提取 3 次,每次 2 h,滤过,合并滤液,并浓缩药液浓度至含生药  $0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,通过 AB-8 型大孔吸附树脂柱,50% 的乙醇洗脱,收集洗脱液,回收乙醇,浓缩,干燥,即得丹参提取物;取山楂提取物和丹参提取物适量按生药 4:5 的比例混匀,即得山楂、丹参药对提取物。

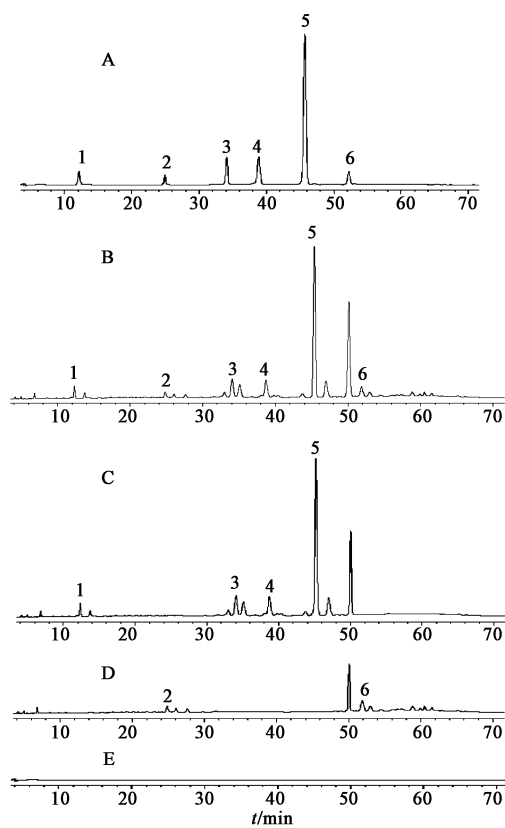
## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Phenomasil-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm ×

250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.5% 磷酸水(B),梯度洗脱(表 1),检测波长 300 nm,流速  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,柱温 30 °C,进样量 10 μL。在上述色谱条件下,对照品色谱峰的理论塔板数均 > 5 000,拖尾因子均在 0.95 ~ 1.05,分离度均 > 1.5。混合对照品溶液、供试品溶液、阴性液、空白溶剂色谱图见图 1。

表 1 山楂丹参提取物色谱梯度洗脱

t/min	乙腈/%	0.5% 磷酸水/%
0	10	90
15	20	80
40	25	75
50	30	70
70	45	55



1. 原儿茶醛;2. 金丝桃苷;3. 迷迭香酸;  
4. 紫草酸;5. 丹酚酸 B;6. 槲皮素

图 1 混合对照品溶液(A)、供试品溶液(B)、山楂阴性对照液(C)、丹参阴性对照液(D)、空白溶剂(E)色谱

## 2.2 溶液的制备

**2.2.1 混合对照品溶液的制备** 分别精密称取原儿茶醛、金丝桃苷、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、槲皮素对照品适量,加甲醇分别制成每 1 mL 含原儿茶醛 0.830 mg、金丝桃苷 0.513 0 mg、迷迭香酸

0.525 0 mg、紫草酸 0.614 0 mg、丹酚酸 B 1.300 mg、槲皮素 0.532 0 mg 的对照品储备液,备用。分别精密量取上述 6 个对照品储备液适量,加甲醇制成每 1 mL 含原儿茶醛 53.95  $\mu\text{g}$ 、金丝桃苷 25.65  $\mu\text{g}$ 、迷迭香酸 39.38  $\mu\text{g}$ 、紫草酸 61.40  $\mu\text{g}$ 、丹酚酸 B 650.0  $\mu\text{g}$ 、槲皮素 21.28  $\mu\text{g}$  的混合对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 取山楂、丹参药对提取物 0.15 g,精密称定,加 70% 甲醇 50 mL,称重,超声提取 30 min,放冷,用 70% 甲醇补足失重,摇匀,滤过,即得。

**2.2.3 阴性对照液的制备** 取山楂提取物 0.05 g (丹参提取物 1.0 g),精密称定,加 70% 甲醇 50 mL,称重,超声提取 30 min,放冷,用 70% 甲醇补足失重,摇匀,滤过,即得。

### 2.3 方法学考察

**2.3.1 线性关系的考察** 分别精密量取上述混合对照品溶液 4, 8, 12, 16, 20  $\mu\text{L}$  注入高效液相色谱仪,测定。以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程,结果见表 2。

表 2 6 个成分的标准曲线方程、相关系数和线性范围

化合物	标准曲线方程	R	线性范围/ $\mu\text{g}$
原儿茶醛	$Y = 17.57X + 7.61$	0.999 4	0.021 58 ~ 0.107 9
金丝桃苷	$Y = 16.59X + 34.75$	0.999 2	0.102 6 ~ 0.513 0
迷迭香酸	$Y = 90.38X - 179.69$	0.999 0	0.157 5 ~ 0.787 5
紫草酸	$Y = 91.81X - 140.14$	0.999 1	0.245 6 ~ 1.228
丹酚酸 B	$Y = 563.88X + 4.61$	0.999 0	2.600 ~ 13.00
槲皮素	$Y = 23.61X + 15.63$	0.999 1	0.085 1 ~ 0.425 6

**2.3.2 精密度试验** 取山楂、丹参药对提取物 0.15 g,精密称定。按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下连续进样 5 次,测得原儿茶醛、金丝桃苷、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、槲皮素峰面积的 RSD ( $n = 5$ ) 分别为 2.4% , 2.4% , 2.1% , 1.9% , 1.5% , 2.1% 。结果表明仪器精密度良好。

**2.3.3 重复性试验** 取山楂、丹参药对提取物 0.15 g 共 5 份,精密称定。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,测得原儿茶醛、金丝桃苷、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、槲皮素平均含量 ( $n = 5$ ) 分别为 1.890, 8.77, 12.65, 19.22, 270.2, 7.325  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ; RSD 分别为 2.2% , 1.3% , 0.8% , 1.8% , 0.6% , 2.1% 。

**2.3.4 稳定性试验** 取同一供试品溶液,在室温下放置,分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 在上述色谱条件下进样分析,测定峰面积。原儿茶醛、金丝桃苷、迷迭香

酸、紫草酸、丹酚酸 B、槲皮素峰面积的 RSD ( $n = 6$ ) 分别为 2.5% , 2.6% , 1.0% , 2.5% , 0.8% , 2.4% 。结果表明,供试品溶液中上述 6 个成分在 24 h 内稳定性良好。

**2.3.5 加样回收率试验** 称取已知含量(原儿茶醛、金丝桃苷、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、槲皮素的含量分别为 1.890, 8.77, 12.65, 19.22, 270.2, 7.325  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 的山楂、丹参药对提取物 0.07 g 6 份,精密称定,分别准确加入原儿茶醛、金丝桃苷、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、槲皮素对照品 0.132 8, 0.616 5, 0.893, 1.351, 9.75, 0.532 0 mg, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下进行测定,计算回收率,结果见表 3。

表 3 山楂、丹参药对提取物中 6 个成分加样回收率

成分	取样量 /g	样品中量/mg	加入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
原儿茶醛	0.072	0.137	0.133	0.268	98.6	99.1	1.5
	0.072	0.137	0.133	0.269	99.2		
	0.072	0.137	0.133	0.272	101.5		
	0.072	0.136	0.133	0.265	97.4		
	0.073	0.137	0.133	0.268	98.0		
	0.072	0.136	0.133	0.269	99.8		
金丝桃苷	0.072	0.634	0.617	1.261	101.7	99.3	2.7
	0.072	0.635	0.617	1.236	97.5		
	0.072	0.634	0.617	1.272	103.4		
	0.072	0.631	0.617	1.226	96.5		
	0.073	0.638	0.617	1.246	98.7		
	0.072	0.632	0.617	1.236	97.9		
迷迭香酸	0.072	0.914	0.893	1.801	99.3	100.2	1.2
	0.072	0.915	0.893	1.819	101.2		
	0.072	0.915	0.893	1.806	99.8		
	0.072	0.910	0.893	1.807	100.4		
	0.073	0.919	0.893	1.827	101.7		
	0.072	0.912	0.893	1.792	98.6		
紫草酸	0.072	1.389	1.351	2.706	97.5	99.2	1.4
	0.072	1.391	1.351	2.736	99.6		
	0.072	1.390	1.351	2.721	98.5		
	0.072	1.382	1.351	2.752	101.4		
	0.073	1.397	1.351	2.745	99.8		
	0.072	1.386	1.351	2.715	98.4		
丹酚酸 B	0.072	19.53	9.75	29.53	102.6	98.9	2.8
	0.072	19.55	9.75	29.07	97.6		

续表 3

成分	取样量 /g	样品 中量 /mg	加入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
	0.072	19.54	9.75	28.89	95.9		
	0.072	19.43	9.75	29.12	99.4		
	0.073	19.64	9.75	29.55	101.6		
	0.072	19.48	9.75	28.89	96.5		
槲皮素	0.072	0.530	0.532	1.057	99.2	99.2	1.7
	0.072	0.530	0.532	1.051	99.8		
	0.072	0.530	0.532	1.043	96.5		
	0.072	0.527	0.532	1.055	99.3		
	0.073	0.532	0.532	1.074	101.8		
	0.072	0.528	0.532	1.053	98.7		

**2.4 样品含量测定** 取 3 批山楂、丹参药对提取物 0.15 g 各 3 份,精密称定。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,并以外标法计算样品中原儿茶醛、金丝桃苷、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、槲皮素等 6 个成分的含量,结果见表 4。

表 4 山楂、丹参药对提取物中  
6 个成分的含量测定  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

成分	原儿 茶醛	金丝 桃苷	迷迭 香酸	紫草酸	丹酚酸 B	槲皮素
1	1.868	8.85	12.60	19.57	269.0	7.252
2	1.884	8.68	12.73	19.51	268.7	7.246
3	1.905	8.89	12.69	19.20	271.1	7.232
平均值	1.886	8.81	12.67	19.43	269.6	7.243
RSD/%	1.0	1.3	0.5	1.0	1.5	0.1

### 3 讨论

在提取方式的选择上,考察超声提取法和回流提取法,结果回流提取与超声提取结果差别不大,但超声提取法简单方便,故采用超声提取法;在提取溶剂的选择上,比较了甲醇、乙醇、水,结果用乙醇、水提取时,HPLC 色谱峰峰形不好,有干扰,甲醇提取效果最好;在此基础上考察了甲醇浓度的影响,结果 70% 甲醇提取效果最好。

参照相关文献[13-15],考察了乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸水溶液、乙腈-0.5% 磷酸水溶液、甲醇-水溶液 4 个流动相系统。结果表明:采用乙腈-0.1% 磷酸水溶液、乙腈-0.5% 磷酸水溶液系统为流动相所得到的色谱图基线平稳,6 个成分的分

离效果好。而使用乙腈-0.1% 磷酸水溶液与乙腈-0.5% 磷酸水溶液比较,乙腈-0.5% 磷酸水溶液分析效果比较好。故选用乙腈-0.5% 磷酸水溶液为流动相系统。

### [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,2010:29, 70.
- [2] 谢梅林. 丹参、山楂及其有效成分抗动脉粥样硬化实验研究进展[J]. 中国中西医结合, 1997, 17(12):756.
- [3] 王伟,杨滨,王岚,等. 丹参山楂药对对大鼠动脉粥样硬化的影响[J]. 中国中药杂志,2011,36(6):784.
- [4] 韦英杰,李萍,李松林. 高效液相二级管阵列检测法同时测定复方丹参制剂中 7 个成分的含量[J]. 分析化学,2006,34(12):1702.
- [5] 李倩,刘伟,罗祖良,等. 一测多评法测定丹参中丹参酮 II<sub>A</sub>、隐丹参酮、丹参酮 I、二氢丹参酮 I 的含量[J]. 中国中药杂志,2012,37(6):824.
- [6] 罗森,袁崇均,王笛,等. 丹参标准提取物质量标准研究[J]. 四川中医,2010,28(1):43.
- [7] 潘英妮,袁丹,付文卫,等. HPLC 法测定丹参类注射液中 4 种水溶性成分含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2004, 21(3):196.
- [8] 王伟,李焱,谢晓梅,等. 高效液相色谱法同时测定丹参中 4 种酚酸类成分的含量[J]. 安徽医药,2010, 14(11):1276.
- [9] 张雪,褚文静,刘伟娜,等. 高效液相色谱二极管阵列检测法同时测定丹参滴注液中 4 种水溶性成分的含量[J]. 分析化学学报,2010, 26(1):109.
- [10] 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.
- [11] 肖飞,李卫民,李其凤. 益心舒胶囊质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011, 22(17):105.
- [12] 魏冬青,陈绍民,苗建武,等. 丹参总酚酸大孔树脂纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012, 18(3):42.
- [13] 尉萍萍,赵粼. 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.
- [14] 张慧娟,杜守颖,陆洋,等. HPLC 同时测定丹参水溶性及脂溶性 5 种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2010, 16(15):34.
- [15] 王福成,豆文太,朱文学. HPLC 测定山楂中牡荆苷、牡荆苷-2-O-鼠李糖苷、金丝桃苷、芦丁的含量[J]. 中成药,2002,24(2):122.

[责任编辑 顾雪竹]