

HPLC 同时检测丹参提取物中 5 种水溶性和脂溶性成分含量

张英丰¹, 朱黎霞², 梁东辉^{2*}

(1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 南方医科大学, 广州 510515)

[摘要] 目的: 建立丹参提取物中丹酚酸 A、丹酚酸 B、紫草酸、丹参素及丹参酮 II_A 反相 HPLC 同步测定新方法。方法: 选用 Kromasil 100-5 C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-水 (含 0.1% 甲酸) 为流动相梯度洗脱, 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 285 nm。结果: 丹酚酸 A、丹酚酸 B、紫草酸、丹参素及丹参酮 II_A 分别在进样量范围内与峰面积线性关系良好, $r > 0.999 5$, 仪器精密度和稳定性 RSD 均 < 2%, 成分的回收率在 97% ~ 103% ($n = 3$)。测定了其 5 批丹参提取物含量。结论: 该方法快速、准确、重复性好, 可同时定量丹参的 5 种水溶性及脂溶性成分。

[关键词] 高效液相色谱法; 丹酚酸 A; 丹酚酸 B; 丹参素; 紫草酸; 丹参酮 II_A; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)11-0076-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20120327.2700.022 **[网络出版时间]** 2012-03-27 17:07

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120327.1707.022.html>

Simultaneous Content Determination of Salvianolic acid A, Salvianolic acid B, Tanshinol, Lithospermum Acid, Tanshinone II_A in Crude Extract of *Salvia miltiorrhiza* Radix et Rhizoma by HPLC

ZHANG Ying-feng¹, ZHU Li-xia², LIANG Dong-hui^{2*}

(1. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Southern Medicine University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a new RP-HPLC method for simultaneous determination of salvianolic acid A, salvianolic acid B, tanshinol, lithospermum acid, tanshinone II_A in crude extract of Radix Salvin Miltiorrhiza. **Method:** Analysis was carried out on a Kromasil 100-5 C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with acetonitrile-pure water (added 0.1% formic acid) as mobile phases in gradient elution. The flow rate was 1 mL·min⁻¹, and the UV detector was monitored at 285 nm. **Result:** All calibration curve showed good linear regression in test ranges ($r > 0.999 5$); and the overall recoveries were in the range of 97% -103% ($n = 3$) with RSD less than 3%. The overall RSD of precision test were less than 3%. **Conclusion:** The method is rapid, accurate, credible and repeatable, and can provide bases for the material basis and compatibility for Radix Salvin Miltiorrhiza.

[Key words] HPLC-UV; salvianolic acid A; salvianolic acid B; tanshinol; lithospermum acid; tanshinone II_A; content determination

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia mihiorrhiza* Bge.

的干燥根及根茎, 具有祛瘀止痛、活血通经、清心除烦之功效。大量研究证实, 丹参主要含有脂溶性和水溶性两类成分, 不同的成分具有各自不同的药理活性, 对其水溶性成分研究成为近年来的研究热点。由于丹参成分众多、物质基础相对清晰, 但要全面地控制中药丹参的质量, 仅仅监测常规的丹酚酸 B 和丹参酮 II_A 是远远不够的, 而应该测定其中能代表

[收稿日期] 20111107(008)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072935)

[第一作者] 张英丰, 副教授, 从事生物药剂学与药物动力学研究, E-mail: zyfeng-2006@163.com

[通讯作者] * 梁东辉, 教授, 主任医师, 从事心脑血管疾病的临床及科研, E-mail: dhleng2005@21.cn.com

丹参作用的有效成分群。对于含有水溶性和脂溶性成分的丹参,迫切需要建立一种快速、简便、同时测定其中多种成分的方法。本实验采用梯度洗脱法,建立了同时测定丹参中极性差异较大的丹酚酸 A、丹酚酸 B、丹参素、紫草酸及丹参酮 II_A 含量的方法,可为丹参药材及提取物的品质评价提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器 DIONEX SummitP680 型液相色谱仪(包括 Summit P680A 四元泵,ASI-100 自动进样器,Chromleon 色谱工作站),AUW120D 型 1/10 万分析天平(日本岛津公司),KQ-500 型超声清洗仪(功率 500 W,频率 40 kHz,昆山市超声仪器有限公司),XW-80A 型微型涡旋混合仪(上海市沪西分析仪器厂有限公司),旋转蒸发器(上海亚荣仪器公司)。

1.2 试药 丹酚酸 A 对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号 201102),丹酚酸 B 对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号 201102),丹参酮 II_A 对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110766-200417),丹参素对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110855-200809),紫草酸对照品(上海融禾医药科技有限公司,批号 110125);丹参药材由广州致信药业提供,提取物由药剂教研室提取经减压干燥所得黑褐色块状物;乙腈(霍尼韦尔公司,批号 10071743,色谱纯),水(纯化水),其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil 100-5 C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱;流动相 A 为含 0.1% 甲酸的水, B 为乙腈,梯度洗脱。(0 ~ 8 min) 91% A, (8 ~ 15 min) 91% ~ 32% A, (15 ~ 25 min) 32% A, (25 ~ 30 min) 32% ~ 9% A, (30 ~ 50 min) 9% A, (50 ~ 60 min) 9% ~ 91% A;检测波长 285 nm,流速 1 mL · min⁻¹,柱温室温;丹参素保留时间(*t_R*)为 7.0 min,紫草酸保留时间为 19.0 min,丹酚酸 B 保留时间为 20.8 min,丹酚酸 A 保留时间为 22.2 min,丹参酮 II_A 保留时间为 37.5 min。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取置五氧化二磷干燥器中干燥至恒重的各对照品适量于 5 mL 棕色量瓶,甲醇定容,得到贮备液备用。各取储备液适量于 25 mL 量瓶,甲醇定容得到的混标溶液中,丹参素钠为 9.625 mg · L⁻¹,丹酚酸 B 967.5 mg · L⁻¹,丹酚酸 A 13.75 mg · L⁻¹,紫草酸 143.75 mg · L⁻¹,丹参酮 II_A 103.1 mg · L⁻¹,冷藏、避光备用。

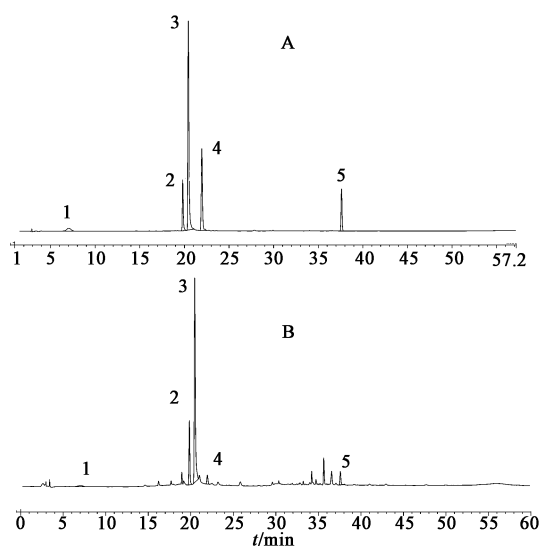
2.3 供试品溶液的制备 精密取丹参提取物 0.2 g,用少许甲醇研磨并超声 10 min 使其完全溶解后,完全转移至 5 mL 量瓶内,甲醇定容后, -20 °C 冷冻 20 min,12 000 r · min⁻¹ 高速离心以除去微量不溶物,上清液过 0.22 μm 微孔滤膜后进样。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密吸取混标溶液分别进样 0.5, 1, 2, 5, 7.5, 10, 15, 20 μL, 以色谱峰面积 (*Y*) 对进样量 (*X*) 进行线性回归,绘制标准曲线。结果表明在进样量范围内线性关系良好。

丹参素回归方程为 $Y = 7.745 2X + 0.015 8$ ($R^2 = 0.999 1$),线性范围 0.004 8 ~ 0.192 5 μg;紫草酸回归方程为 $Y = 18.729X - 0.082$ ($R^2 = 0.999 7$),线性范围 0.072 ~ 2.875 μg;丹酚酸 B 回归方程为 $Y = 13.664X + 1.518$ ($R^2 = 0.999 8$),线性范围 0.484 ~ 19.35 μg;丹酚酸 A 回归方程为 $Y = 38.998X + 0.0968 8$ ($R^2 = 0.999 7$),线性范围 0.006 8 ~ 0.275 μg;丹参酮 II_A 回归方程为 $Y = 11.220X + 0.227 8$ ($R^2 = 0.999 9$),线性范围 0.050 1 ~ 2.062 μg。

2.4.2 系统适用性试验 在上述色谱条件下分别进样混标及供试品液,混标及供试品溶液色谱图见图 1,各成分分离度及峰型符合含量测定要求。



1. 丹参素; 2. 紫草酸; 3. 丹酚酸 B; 4. 丹酚酸 A; 5. 丹参酮 II_A

图 1 丹参混标(A),丹参样品(B)液相色谱

2.4.3 精密度考察 精密吸取同一对照品溶液,在上述色谱条件下一日内连续进样 5 次,记录峰面积;同一对照品溶液,在上述色谱条件下每天进样 1 次,连续进样 5 d,进样 10 μL,分别计算峰面积 RSD。结果表明丹参素、紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A、丹参酮 II_A 的日内峰面积 RSD 分别为 0.57%, 0.24%,

0.42%, 1.22%, 0.20%; 日间峰面积 RSD 分别为 1.17%, 1.25%, 1.68%, 1.09%, 0.87%, 表明仪器精密度良好。

2.4.4 重复性考察 取同一批药材制备的提取物, 按照 2.3 项平行制备 6 份供试品液, 在上述色谱条件下分析测定, 分别计算紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A、丹参酮 II_A、丹参素含量。由于在所用条件下, 丹参素峰面积较小, 难以准确积分, 故只对其余 4 个成分进行定量, 紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A、丹参酮 II_A 含量 RSD 分别为 1.14%, 1.56%, 1.37%, 0.96%, 表明本法重复性良好。

2.4.5 稳定性考察 取同一供试品溶液, 分别于 0, 1, 2, 4, 8, 12 h 在上述条件下进样测定 4 种成分的峰面积, 紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A、丹参酮 II_A 峰面积 RSD 分别为 1.08%, 1.36%, 0.91%, 0.55%, 结果表明样品在 12 h 稳定。

2.4.6 回收率考察 采用加样回收率方法。取已知含量的提取物, 精密称定 9 份, 平均分成 3 份, 分别加入低、中、高 3 个浓度的混合对照品溶液, 相当于含量的 80%, 100%, 120%, 按 2.3 项制备, 在上述色谱条件下测定, 各成分回收率在 97% ~ 103%, RSD < 3%。结果见表 1。

表 1 丹参提取物中 4 种成分加样回收率试验 (n = 3)

成分	样品中量 /mg·g ⁻¹	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 %	RSD /%
紫草酸	0.844	0.682	1.524	99.71	100.08	0.33
	0.844	0.852	1.699	100.35		
	0.844	1.022	1.868	100.19		
丹酚酸 B	5.062	4.046	9.100	99.80	99.96	0.14
	5.062	5.058	10.122	100.04		
	5.062	6.069	11.134	100.05		
丹酚酸 A	0.077	0.064	0.140	98.44	98.29	0.75
	0.077	0.080	0.155	97.50		
	0.077	0.096	0.172	98.96		
丹参酮 II _A	0.280	0.230	0.508	99.13	99.77	0.96
	0.280	0.288	0.566	99.31		
	0.280	0.346	0.629	100.87		

2.5 样品测定 按 2.3 项方法制备供试品 5 批, 在上述色谱条件下测定, 记录色谱峰面积, 按照外标法计算各成分的含量, 结果见表 2。

3 讨论

3.1 结果 本实验采用反相高效液相法建立了丹参提取物的活性成分丹酚酸 A、丹酚酸 B、丹参素、

表 2 丹参提取物中 4 种成分测定结果 mg·g⁻¹

批号	紫草酸	丹酚酸 B	丹酚酸 A	丹参酮 II _A
20110601	4.070	23.344	0.371	1.337
20110602	4.194	23.700	0.414	1.412
20110603	4.444	27.245	0.422	1.311
20110604	4.656	26.222	0.389	1.514
20110605	4.135	25.188	0.372	1.356

紫草酸及丹参酮 II_A 含量同步测定的新方法, 该方法简便、准确度高、重复性好, 可用于丹参物质基础研究, 亦可为含有丹参相关制剂的含量测定做参考。

3.2 波长的选择 对于多成分的紫外同步测定, 波长选择是关键。经过紫外扫描, 丹参酮 II_A、丹参素、丹酚酸 B 最大吸收波长分别为 270, 281, 286 nm, 紫草酸、丹酚酸 A 也与之较为接近, 在 254 ~ 300 nm 均有较大吸收, 故以 285 nm 为检测波长。

3.3 流动相的选择 试过甲醇-水、乙腈-水、甲醇-乙腈-水等不同流动相系统, 发现乙腈-水流动相系统可较好满足实验需求, 考虑到丹参中含有极性较强的酚酸类成分, 分离效果不好, 故向水相中加入 0.1% 的甲酸以改善峰型及分离度。由于水溶性和极性成分溶解性差异较大, 等度洗脱无法洗脱, 故尝试了不同梯度洗脱程序, 可获得较好峰形、分离度及较适当的保留时间, 最终确定上述流动相梯度洗脱程序, 5 个成分得到较好分离, 分离度均符合要求。实验中发现, 丹参酮 II_A 的保留时间与有机相的比例密切相关, 如乙腈比例低于 55% 或甲醇比例低于 65% 则长时间洗脱也不出峰, 必须增大有机相比例方可。

丹参多成分同步检测成为近年来研究热点。如罗世英等^[1]同步测定了丹参药材中丹参素、原儿茶醛和丹酚酸 B 含量, 侯媛媛等^[2]同步测定丹参药材及其制剂中丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 A、丹酚酸 B 4 种酚酸类成分含量, 张慧娴等^[3]同时测定丹参中迷迭香酸、丹酚酸 B、隐丹参酮、丹参酮、丹酚酸 A 5 种有效成分的含量, 王莉等^[4]同步测定了丹参素、原儿茶醛、原儿茶酸、香草酸、咖啡酸、阿魏酸、迷迭香酸、紫草酸和丹酚酸 B 9 种有效成分的含量。

丹酚酸 A 作为丹参里的微量成分在提取物里含量比较高, 自其 1984 年被发现以来对其研究日益增加, 多进行单个成分或数个酚酸类成分的同步检测^[5], 尚未看到丹酚酸 A 和脂溶性成分同步检测的报道, 故本文所建立的方法具有一定参考价值。

RP-HPLC 同时测定茅莓中齐墩果酸和熊果酸

邹盛勤*, 黄浩

(宜春学院化学与生物工程学院, 江西省天然药物活性成分研究重点实验室, 江西 宜春 336000)

[摘要] 目的: 建立茅莓中齐墩果酸和熊果酸的反相高效液相色谱分析方法。方法: Kromasil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-1.0% 磷酸溶液 (90:10), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 210 nm, 柱温 30 °C。结果: 齐墩果酸、熊果酸分别在 0.136 8 ~ 1.368 0, 0.212 8 ~ 2.218 0 μg 线性关系良好, 平均回收率 (n=6) 分别为 97.5% (RSD 1.6%) 和 96.9% (RSD 1.4%)。结论: 方法准确, 操作简便, 数据可靠, 可用于茅莓中齐墩果酸和熊果酸的含量测定。

[关键词] 茅莓; 齐墩果酸; 熊果酸; 反相高效液相色谱法; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)11-0079-03

[DOI] CNKI:11-3495/R.20120327.2700.021 **[网络出版时间]** 2012-03-27 17:07

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120327.1707.021.html>

Simultaneous Determination of Oleanolic Acid and Ursolic Acid in *Rubus parvifolius* by RP-HPLC

ZOU Sheng-qin*, HUANG Hao

(College of Chemistry and Bioengineering of Yichun University, Key Laboratory of Jiangxi Province
for Research on Active Ingredients in Natural Medicines, Yichun 336000, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a RP-HPLC method for simultaneous determination of oleanolic acid and ursolic acid in *Rubus parvifolius*. **Method:** The separation was achieved on a Kromasil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) at 30 °C using methanol-phosphoric acid solution (90:10) as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, 210 nm as the detection wavelength. **Result:** The linear ranges of oleanolic acid and ursolic acid were from 0.136 8 to 1.368 0 μg and 0.212 8 to 2.218 0 μg, respectively. The average recoveries (n=6) for oleanolic acid and ursolic acid were 97.5% (RSD 1.6%), 96.9% (RSD 1.4%), respectively. **Conclusion:**

[收稿日期] 20110731(011)

[基金项目] 国家高技术研究发展计划项目(2002AA2Z3217)

[第一作者] 邹盛勤, 硕士, 教授, 从事天然产物活性成分提取与分析研究, Tel: 13507058127, E-mail: zsqyxy@sohu.com

[参考文献]

- [1] 王莉, 赵明波, 何文顺, 等. HRPLC-UV 法同时测定丹参中酚酸类成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(19):2481.
- [2] 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.
- [3] 罗世英, 钟志国, 林坚涛, 等. HPLC 同时测定丹参水溶性 3 组分的含量[J]. 中国药学杂志, 2009, 43

(19):1504.

- [4] 侯媛媛, 黄晓婧, 晁若冰. HPLC 同时测定丹参及其制剂中 4 种酚酸类成分的含量[J]. 中国药学杂志, 2009, 43(19):1108.
- [5] 张正付, 陈鸿珊, 李卓荣. HPLC 法同时测定滇丹参和丹参中 5 个活性酚酸的含量(英文)[J]. 中国药学杂志, 2010(19):271.

[责任编辑 蔡仲德]