

HPLC 法测定丹参中 丹参素、丹参酮 IIA、二氢丹参酮 I、隐丹参酮的含量

郑晓珂, 董三丽, 冯卫生
(河南中医学院, 河南 郑州 450008)

摘要: 目的: 建立丹参中水溶性成分和脂溶性成分同时定量的方法。方法: 高效液相色谱法, 采用 Shim-pack VP-ODS(150mm × 4.6mm) C₁₈ 色谱柱, 以甲醇-0.5% 冰醋酸溶液梯度洗脱, 检测波长为 281nm, 柱温为 35℃, 流速为 0.8ml/min。结果: 丹参素、丹参酮 IIA、二氢丹参酮 I、隐丹参酮回归方程的相关系数依次为 0.9997, 0.9997, 0.9999 和 0.9994, 四种成分精密度试验 RSD < 2%, 24h 内稳定性试验 RSD < 2%, 加样回收率试验 RSD < 5%。结论: 通过对河南卢氏县 14 种丹参样品的含量进行测定, 说明本方法切实可行、稳定可靠、且重现性好, 为丹参的质量评价提供了依据。

关键词: HPLC; 丹参; 丹参素; 丹参酮 IIA; 二氢丹参酮 I; 隐丹参酮

中图分类号: R284.1 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2003)06-0012-04

Determination of Danshensu Dhpl, Tanshinone IIA, Dihydrotanshinone I and Cryptotanshinone in *Salvia miltiorrhiza* Bge. by HPLC

ZHENG Xiao-ke, DONG San-li, FENG Wei-sheng

(Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

Abstract: Objective: To develop a new method for determination of the water-soluble components and lipophilic components in *Salvia miltiorrhiza* Bge. Method: A HPLC method was set up, using Shim-pack VP-ODS C₁₈ column (150mm × 4.6mm), methanol: 0.5% acetic acid as mobile phase in gradient elution, with detection at 281nm, temperature of column is 35℃, rate flow is 0.8ml/min. Result: The correlation coefficient of the calibration curve of Danshensu Dhpl, Tanshinone IIA, Dihydrotanshinone I and Cryptotanshinone were 0.9997, 0.9997, 0.9999 and 0.9994 respectively. The RSD of precision and stability of the sample was less than 2% in 24 hours. The RSD of the average recovery was less than 5%. Conclusion: The result of fourteen kinds of *Salvia miltiorrhiza* Bge. in Henan Lushi county indicates that this method is feasible, stable and offers a kind of method for quality evaluation of *Salvia miltiorrhiza* Bge.

Key words: HPLC; *Salvia miltiorrhiza* Bge; Danshensu Dhpl; Tanshinone IIA; Dihydrotanshinone I; Cryptotanshinone

丹参为唇形科鼠尾草属植物丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge.)的干燥根, 为临床常用中药, 具有活血祛瘀, 调经止痛, 清热安神等功效。丹参广泛分布于华北、华东、中南、西北以及西南地区, 气候、土壤、植被等因素对药材质量有较大的影响; 另一方面野生丹参逐渐减少, 栽培丹参逐年增长, 因此严格控制丹参的质量势在必行。有效成分的含量是药材质量评价的首要指标, 到目前为止, 丹参中脂溶性成分丹参酮类和水溶性成分丹参素及丹酚酸类的含量测定已有

较多的研究报道, 其方法有比色法, 薄层扫描法, 紫外分光光度法和高效液相色谱法^[1]等。但有关对丹参中水溶性成分和脂溶性成分进行同时定量的方法还未见报道。本文用 HPLC 法对河南卢氏县 14 种丹参样品中的水溶性成分丹参素和脂溶性成分丹参酮 IIA、二氢丹参酮 I、隐丹参酮进行了同时定量, 对其他中药材水溶性成分和脂溶性成分同时定量提供了一种参考方法。

1 实验条件

1.1 样品 河南省卢氏县不同地区栽培和野生丹参, 由河南中医学院中药鉴定教研室陈随清教授鉴定为丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根。

1.2 仪器与试剂 岛津 LC-10ATvp 型高效液相色谱

谱仪, SPD-10Avp 可见紫外检测器及 N-2000 双通道色谱工作站。对照品丹参素(Danshensu Dhpl)、二氢丹参酮 I (Dihydrotanshinone I)、隐丹参酮(Cryptotanshinone)、丹参酮 II A(Tanshinone IIA) 均购自中国药品生物制品检定所。甲醇为色谱纯,冰醋酸为分析纯,水为双蒸水。

2 色谱条件

色谱柱: Shim-pack VP-ODS(150mm × 4.6mm) 柱; 检测波长: 281nm; 柱温: 35 °C, 流速: 0.8ml/min。流动相: 甲醇-0.5% 冰醋酸梯度洗脱, 梯度程序见表 1。

表 1 流动相梯度程序

时间(min)	流动相 A(甲醇)	流动相 B(0.5% 冰醋酸溶液)
0.01	20%	80%
10	30%	70%
15	40%	60%
60	90%	10%
80	90%	10%
80.01	20%	80%

3 供试品溶液及对照品溶液的制备

供试品溶液的制备: 取过 40 目筛的丹参粉末 0.3g, 精密称定, 置 100ml 具塞锥形瓶中精密量取甲醇 50ml, 加入锥形瓶中, 振摇, 密塞, 称定重量, 加热回流 1h, 放冷, 加甲醇补足损失的重量, 摇匀, 0.45μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液。

对照品溶液的制备: 精密称取对照品丹参素、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 II A 适量, 分别制成浓度为 14.96μg/ml, 52μg/ml, 100μg/ml, 101μg/ml 的四种溶液, 作为对照品溶液。

按以上色谱条件得到对照品、丹参药材、空白对照的色谱图见图 1。

4 标准曲线

精密称取在 105 °C 干燥至恒重的丹参素、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 II A 0.25、0.52、1.00、1.01mg, 分别置于 50、25、50 和 25ml 容量瓶中, 用甲醇溶解至刻度, 摇匀。分别精密吸取 1, 2, 4, 8, 10μl 注入液相色谱仪中, 测定峰面积, 并以进样量为横坐标(X), 面积为纵坐标(Y), 计算回归方程; 丹参素为 $Y = 0.64869X + 3.39551 \times 10^5$ ($r = 0.9997$), 二氢丹参酮 I 为 $Y = -3.55301X + 4.78592 \times 10^6$ ($r = 0.9999$), 隐丹参酮为 $Y = -1.38788X + 2.71418 \times 10^6$ ($r = 0.9999$), 丹参酮 II A 为 $Y = 7.13682X + 2.13014 \times 10^6$ ($r = 0.9998$), 线性范围分别为: 0.005~0.005 × 10⁻³ mg, 0.0208~0.208 × 10⁻³ mg, 0.02~0.20 × 10⁻³ mg 和 0.0404~0.404 × 10⁻³ mg。

5 精密度试验

精密吸取样品 001 供试品溶液 20μl, 在确定的 HPLC 条件下, 重复进样 5 次, 结果丹参素、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 II A 峰面积积分值 RSD 分别为 1.53、1.85、1.72 和 1.26%。

6 稳定性试验

精密吸取样品 001 供试品溶液 20μl, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24h 进样 1 次, 结果丹参素、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 II A 峰面积积分值 RSD 分别为 1.39、1.67、1.58 和 1.28%。

7 加样回收率试验

精密称取 001 丹参样品 300mg, 置具塞锥形瓶

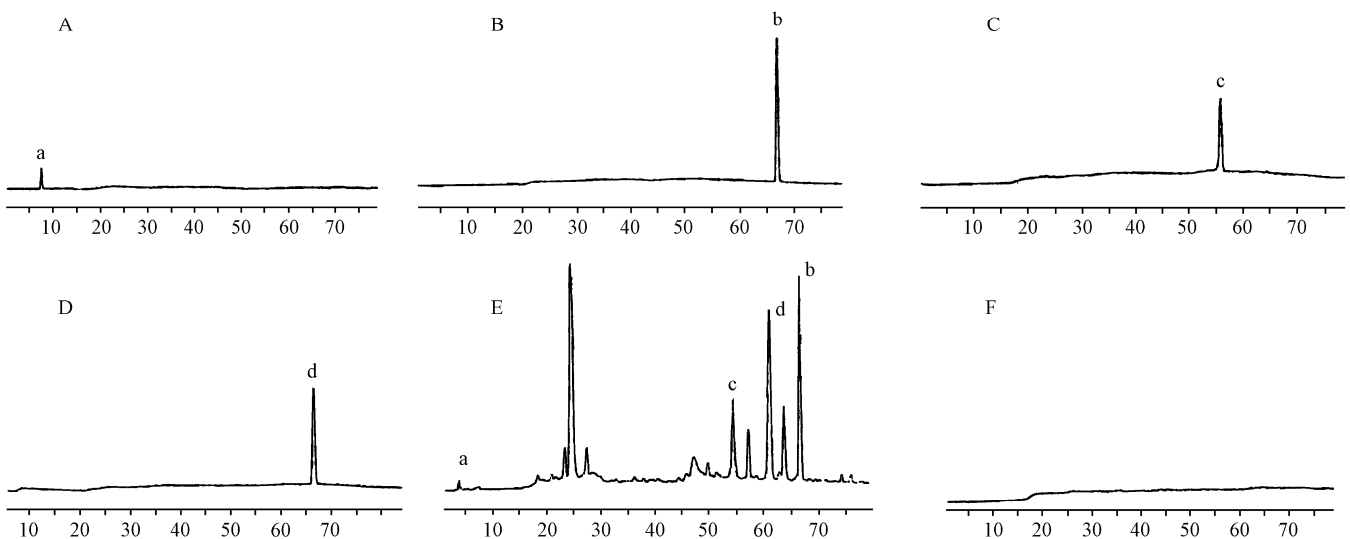


图 1 丹参高效液相色谱图

a. 丹参素; b. 丹参酮 II A; c. 二氢丹参酮 I; d. 隐丹参酮
A-D. 对照品; E. 丹参药材; F. 空白对照

中,按1:1的比例分别加入对照品丹参素、二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮IIA,精密加入甲醇50ml,按项3方法制备供试品溶液,测定并计算回收率。结果见表2。

8 含量测定

精密吸取上述各供试品溶液20μl,对照品溶液4μl,注入高效液相色谱仪中,按外标法计算百分含量。结果见表3。

表2 加样回收率试验测定结果

测定成分	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
丹参素	0.018	0.022	0.039	95.5		
	0.015	0.018	0.033	100.0		
	0.018	0.015	0.033	100.0	97.4	2.4
	0.018	0.024	0.041	95.8		
二氢丹参酮I	0.017	0.023	0.039	95.7		
	0.51	0.57	1.09	101.8		
	0.49	0.61	1.11	101.6		
	0.55	0.54	1.08	98.1	98.9	2.7
隐丹参酮	0.52	0.53	1.03	96.2		
	0.48	0.65	1.11	96.9		
	0.65	0.63	1.29	101.6		
	0.54	0.51	1.06	102.0		
丹参酮IIA	0.58	0.60	1.17	98.3	99.4	2.3
	0.54	0.55	1.08	98.2		
	0.59	0.61	1.18	96.7		
	0.96	1.05	2.02	101.0		
丹参酮IIA	0.98	1.20	2.15	97.5		
	1.02	1.18	2.23	102.5	99.1	2.5
	0.98	1.13	2.09	98.2		
	1.05	1.15	2.16	96.5		

9 讨论

9.1 流动相的选择 文献多用甲醇-水不同比例进行梯度洗脱^[2-6],结果表明,只有脂溶性丹参酮类成分能得到较好的分离,水溶性成分几乎不被分离。考虑到丹参中含有极性较强的酚酸类成分,分离效果不好,故向流动相中加入一定比例的冰醋酸,选用梯度洗脱,结果分离效果较好。

9.2 检测波长的选择 文献报道,丹参素的最大紫外吸收为281nm,丹参酮IIA为254nm,二氢丹参酮I和隐丹参酮在281nm附近有吸收。经试验证明,以281nm为检测波长,丹参素、二氢丹参酮I、隐丹

参酮、丹参酮IIA均可被检出,且分离较好。

表3 河南卢氏县不同野生或栽培丹参中4种成分的含量测定结果(%)

编号	产地	丹参素	二氢丹参酮I	隐丹参酮	丹参酮IIA
001	管道口镇岭南村南组(栽培)	0.006	0.16	0.25	0.33
002	管道口镇大岭村南西组(栽培)	0.004	0.04	0.09	0.13
003	官坡丹参2号(栽培)	0.001	0.04	0.10	0.21
004	范李埵子沟(野生)	0.003	0.18	0.28	0.35
005	管道口镇南赵家山(栽培)	0.003	0.19	0.27	0.32
006	官坡丹参3号(栽培)	0.002	0.05	0.13	0.20
007	么口相么口镇3组(野生)	0.003	0.15	0.26	0.24
008	磨沟口(栽培)	0.005	0.09	0.16	0.17
009	城邓乡当家二组(栽培)	0.001	0.18	0.30	0.36
010	徐家湾(栽培)	0.003	0.08	0.12	0.12
011	范李埵子沟(栽培)	0.007	0.14	0.08	0.22
012	官坡丈坎(栽培)	0.007	0.16	0.08	0.07
013	管道口镇大岭村后村组(栽培)	0.003	0.12	0.17	0.24
014	管坡丹参1号(栽培)	0.001	0.10	0.17	0.26

9.3 样品前处理方法的选择 文献报道^[7],丹参素采用50%乙醇提取效果最佳,丹参酮IIA等脂溶性成分用甲醇回流提取效果最佳。我们比较了50%乙醇、95%乙醇、50%甲醇、100%甲醇回流提取,结果表明100%甲醇回流提取丹参素的含量同50%乙醇提取丹参素的含量无显著差异。还以100%甲醇为提取溶剂,比较了超声提取30min,回流提取1h,索氏提取1h,结果回流提取和索氏提取无显著差异,但都较超声提取率高,故选用回流提取法。

9.4 含量测定结果讨论 本文所得四种成分含量较文献报道^[8]偏低且并不符合野生品种比栽培品种含量高理论,是由于本文所用丹参生长时间较短且生长年限不一和受其他因素的影响,导致丹参中各成分的含量和文献报道有所出入。尽管如此,把含量测定结果和文献比较,河南卢氏县丹参中各成分的含量仍较高,说明河南卢氏县是丹参的道地产区具有一定的科学性。

9.5 方法可行性讨论 通过对大量不同丹参样品的含量测定和精密度、稳定性和回收率试验以及标准曲线建立试验结果,表明该方法对丹参中水溶性成分和脂溶性成分进行同时定量是可行的,对其他中药材水溶性成分和脂溶性成分同时定量提供了一种参考方法。

参考文献:

- [1] 黎莲娘. 丹参的化学. 中草药现代研究与应用[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1996. 481-491.
- [2] 谭生建, 王文明, 胡文祥, 等. 高效液相色谱法测定通脉冲剂中丹参酮 II A 的含量[J]. 中国中药杂志 1999, 24(9): 543-546.
- [3] 林佳, 徐丽珍, 李琰, 等. 不同产地丹参中丹参酮 II A 的含量比较[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(2): 153-154.
- [4] 袁俊贤, 朱立中. 丹参片中丹参素和原儿茶醛的高效液相测定法[J]. 中成药, 1996, 18(1): 15-17.
- [5] 李正国, 赵淑杰, 王宝琴, 等. HPLC 测定丹红注射液中丹参素的含量[J]. 中药新药与临床药理, 1999, 10(2): 110-111.
- [6] 张友芹. 高效液相色谱法测定丹参药材中丹参素的含量[J]. 中医药学报, 2000, 28(3): 68.
- [7] 刘重芳, 张钰泉, 戴居云, 等. 丹参不同提取工艺比较[J]. 中成药, 1999, 29(8): 385-388.
- [8] 郭宝林, 冯毓秀, 赵杨景. 丹参种植资源研究进展[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(7): 492-495.