

HPLC法测定石见穿中丹酚酸B的含量[△]

高俊峰*, 丁玲, 张鹏, 刘建勋[#](中国中医科学院西苑医院实验研究中心, 北京 100091)

中图分类号 R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)07-0639-02
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.07.21

摘要 目的: 建立测定石见穿中丹酚酸B含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为 Thermo C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 甲酸水溶液(21:79, V/V), 流速为 1.0 ml/min, 检测波长为 286 nm, 柱温为 23 ℃。结果: 丹酚酸B的进样量在 0.153~3.060 μg 范围内与其峰面积积分值呈良好线性关系($r=0.9998$); 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD<1%; 平均加样回收率为 97.70%, RSD=0.56% ($n=6$)。结论: 该方法操作简便、准确可靠、重复性好, 可作为石见穿药材的质量控制方法。

关键词 石见穿; 丹酚酸B; 高效液相色谱法; 含量测定

Content Determination of Salvianolic Acid B in *Salvia chinensis* by HPLC

GAO Jun-feng, DING Ling, ZHANG Peng, LIU Jian-xun (Research Center of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of salvianolic acid B in *Salvia chinensis*. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Thermo C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% formic acid solution(21:79, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 286 nm, and the column temperature was 23 ℃. RESULTS: The linear range of salvianolic acid B were 0.153-3.060 μg($r=0.9998$) with an average recovery of 97.70% (RSD=0.56%, $n=6$); RSD of precision, stability and reproducibility tests were lower than 1%. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, reliable, repeatable and can be used for quality control of *S. chinensis*.

KEYWORDS *Salvia chinensis*; Salvianolic acid B; HPLC; Content determination

石见穿为唇形科植物华鼠尾草 *Salvia chinensis* Benth. 的干燥地上部分, 亦名紫参、小丹参、月下红、石大川、紫丹花、红根参、活血草等, 收载于 1977 年版《中国药典》中, 味苦、辛, 性平, 具有清热解毒、活血、利气、止痛的功效, 用于治疗腕肘胀痛、痈肿^[1]。迄今为止, 从石见穿中分离出的化学成分已达 30 多种, 主要包括萜类、酚酸类、甾醇类、多糖类等^[2-6]。目前, 对石见穿的研究主要集中在其化学成分和药理作用方面, 未见对其质量标准研究的文献报道。因此, 笔者采用高效液相色谱(HPLC)法对石见穿中丹酚酸B进行含量测定^[7-9], 以期建立石见穿药材的质量控制方法, 为石见穿质量标准的建立和新药研发提供依据。

1 材料

1.1 仪器

1100 型高效液相色谱(HPLC)仪、G1314A 型可变波长检测器(美国 Agilent 公司); KQ-300 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); AE 240 型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

1.2 试剂

丹酚酸B对照品(中国食品药品检定研究院, 批号:

111562-201111); 乙腈(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 水为纯化水, 其他试剂均为分析纯。

1.3 药材

石见穿药材购于河北神农(北京)药业有限公司(批号分别为 1206010、1109006、1201011、1201009, 对应产地分别为湖北、浙江、江苏、江苏), 经北京大学药学院张英涛副教授鉴定为唇形科鼠尾草属植物华鼠尾草 *S. chinensis* Benth. 的干燥地上部分, 标本保存于中国中医科学院西苑医院实验研究中心。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Thermo C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1% 甲酸水溶液(21:79, V/V); 流速: 1 ml/min; 检测波长: 286 nm; 柱温: 23 ℃; 进样量: 10 μl。在此色谱条件下, 丹酚酸B可与杂质峰达到基线分离, 分离度>1.5。色谱见图 1。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取丹酚酸B对照品 1.53 mg, 置 10 ml 量瓶中, 加 75% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得(每 1 ml 含丹酚酸B 0.153 mg)。

2.3 供试品溶液的制备

取石见穿药材粉末约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 75% 甲醇 50 ml, 称定质量, 加热回流提取 45 min, 放冷, 再称定质量, 用 75% 甲醇补足缺失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

△ 基金项目: 北京市科技专项(No.Z121107002412021)

* 硕士研究生。研究方向: 中药活性成分。电话: 010-62835640。

E-mail: gaojfl0@163.com

[#] 通信作者: 研究员, 博士研究生导师。研究方向: 心脑血管药理学。电话: 010-62835601。E-mail: liujx0324@sina.com

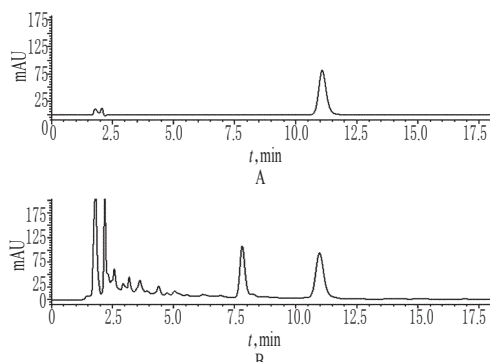


图1 高效液相色谱图

A.丹酚酸B对照品;B.供试品

Fig 1 HPLC chromatograms

A.salvianolic acid B control;B.test sample

2.4 线性关系考察

分别精密吸取上述丹酚酸B对照品溶液1、2、4、8、12、16、20 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以丹酚酸B的进样量($x, \mu\text{g}$)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $y=1\ 194.400\ 0x-0.915\ 8(r=0.999\ 8, n=7)$ 。结果表明,丹酚酸B进样量在0.153~3.060 μg范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.5 精密性试验

精密吸取对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定5次,记录峰面积。结果显示, $RSD=0.67\% (n=5)$,表明仪器精密性良好。

2.6 重复性试验

精密称取同一批(批号:1201009)石见穿药材粉末适量,共6份,分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,石见穿药材中丹酚酸B的平均含量为4.91 mg/g, $RSD=0.18\% (n=6)$,表明本方法重复性良好。

2.7 稳定性试验

取同一批(批号:1201011)石见穿药材粉末制备的供试品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件分别于0、1、3、5、8、12、24 h进样测定,记录峰面积。结果显示, $RSD=0.64\% (n=7)$,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.8 加样回收率试验

精密称取已知含量的同一批石见穿药材(批号:1201009,含丹酚酸含量:4.85 mg/g)粉末6份,每份约0.2 g,分别精密加入丹酚酸B 75%甲醇溶液(每1 ml B 0.493 mg)2.0 ml,再分别精密加入75%甲醇8.0 ml,摇匀,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=6$)

序号	称样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	$\bar{x},\%$	RSD,%
1	0.200 4	0.972 0	0.986 0	1.933 0	97.46		
2	0.201 1	0.975 0	0.986 0	1.948 0	98.68		
3	0.200 3	0.972 0	0.986 0	1.935 0	97.67	97.70	0.56
4	0.199 6	0.968 0	0.986 0	1.925 0	97.06		
5	0.200 5	0.973 0	0.986 0	1.938 0	97.87		
6	0.199 5	0.968 0	0.986 0	1.929 0	97.46		

2.9 样品含量测定

精密称取不同产地的石见穿药材粉末各1.0 g,分别按

“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,每个样品重复测定3次,以平均值按标准曲线计算各样品中丹酚酸B的含量,结果见表2。

表2 不同产地石见穿中丹酚酸B含量测定结果(mg/g, $n=3$)

Tab 2 Contents of salvianolic acid B in *S. chinensis* from different habitats(mg/g, $n=3$)

编号	产地	批号	丹酚酸B含量
1	湖北	1206010	6.07
2	浙江	1109006	6.03
3	江苏	1201011	5.01

3 讨论

3.1 关于提取方法

本试验比较了不同提取溶剂(甲醇、75%甲醇、水)、不同提取方法(超声提取、加热回流提取、冷浸)和不同加热回流提取时间(45、60、90 min)对丹酚酸B提取效果的影响,最终确定丹酚酸B的提取方法为:以75%甲醇加热回流提取45 min。

3.2 关于流动相

本试验对流动相的系统组成进行了比较研究,分别比较了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液等系统,根据分离情况,最终选择乙腈-0.1%甲酸水溶液(21:79, V/V)为流动相。

3.3 小结

本试验对不同产地石见穿药材中丹酚酸B的含量进行了测定,结果显示,产自湖北(批号:1206010)的石见穿药材中丹酚酸B的含量较高。

由于石见穿易混药品为石打穿,在很多地方这两种植物相互混用,同名异物、同物异名现象比较严重;同时,目前对石见穿中的化学成分研究较少,其有效成分不明确,所以除1977年版《中国药典》收载外,未见其他版药典收载该植物。本试验首次采用HPLC法测定了石见穿中丹酚酸B的含量,方法操作简便、准确可靠、重复性好,可作为石见穿药材的质量控制方法。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].1977年版.北京:人民卫生出版社,1977:138.
- [2] 康琛,李曼玲,王谦,等.石见穿化学成分的提取分离及定量分析[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(7):1.
- [3] Wang YL, Song DD, Li ZL, et al. Triterpenoids isolated from the aerial parts of *Salvia chinensis*[J]. *Phytochem Let*, 2009, 2(2):81.
- [4] 刘环香,苏汉文,向梅先.石见穿药材醋酸乙酯部位化学成分的研究[J].中国医院药学杂志,2010,30(19):1 657.
- [5] 王业玲,李占林,刘涛,等.石见穿化学成分的分离与鉴定[J].沈阳药科大学学报,2009,26(2):110.
- [6] 刘翠平,王雪松,方积年.石见穿两个酸性多糖的化学研究[J].中草药,2004,35(1):8.
- [7] 李雪靖,王宪英,杨颖.RP-HPLC法测定骨痹宁胶囊中丹酚酸B的含量[J].中国药房,2012, 23(19):1 791.
- [8] 夏明.RP-HPLC法测定丹七片中丹酚酸B的含量[J].中华中医药杂志,2010,25(11):1 880.
- [9] 李翔,刘饭阳,马建丽. HPLC测定丹膝颗粒中丹酚酸B的含量[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(22):135.

(收稿日期:2013-03-09 修回日期:2013-05-24)