

UPLC法同时测定丹参中11种成分的含量^Δ

李耿^{1,2*}, 孟繁蕴², 杨洪军³, 方婧³, 付梅红^{3#} (1. 中日友好医院全国中西医结合心血管病中心, 北京 100029; 2. 北京师范大学资源学院资源生态与中药资源研究所, 北京 100875; 3. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100070)

中图分类号 R284.1; R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)19-1766-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.19.12

摘要 目的: 建立同时测定丹参中丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸B、丹酚酸A、二氢丹参酮、隐丹参酮、丹参酮I和丹参酮II_A 11种化学成分含量的方法。方法: 采用超高效液相色谱(UPLC)法。色谱柱为BEH C₁₈(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为0.5%甲酸溶液-乙腈(梯度洗脱), 流速为0.4 ml/min, 检测波长为265 nm和280 nm。结果: 该方法可在14 min内完成一次色谱分析, 11种成分色谱峰之间有良好的分离度, 各成分的质量浓度与各自峰面积积分值之间呈良好的线性关系, 精密性、重复性、稳定性及加样回收率试验的RSD<2.0%。结论: 该方法快捷、准确、重复性好, 能同时测定丹参药材与饮片中11种成分的含量, 可用于更全面地控制丹参的质量和丹参的相关研究。

关键词 丹参; 超高效液相色谱法; 多成分测定; 波长切换

Simultaneous Determination of 11 Components in *Salvia miltiorrhiza* by UPLC

LI Geng^{1,2}, MENG Fan-yun², YANG Hong-jun³, FANG Jing³, FU Mei-hong³ (1. National Integrated Chinese and Western Medicine Center for Cardiovascular Disease, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China; 2. Institute of Natural Medicine and TCM Resources, College of Resource Science & Technology, Beijing Normal University, Beijing 100875, China; 3. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of 11 compounds in *Salvia miltiorrhiza*, such as tanshinol, protocatechuic aldehyde, caffeic acid, rosmarini acid, lithospermic acid, salvianolic acid B, salvianolic acid A, tanshinone I, cryptotanshinone, dihydrotanshinone, tanshinone II_A. METHODS: UPLC method was adopted. The determination was performed on BEH C₁₈(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm) column with mobile phase consisted of 0.5% methanoic acid-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 0.4 ml/min. The detection wavelength was set at 265 nm and 280 nm. RESULTS: 11 components were separated clearly by this method within 14 min. A good linearity was obtained between the concentration and the peak areas of 11 compounds. RSDs of precision, reproducibility, stability and recovery tests were all less than 2.0%. CONCLUSIONS: The method is rapid, accurate and reproducible, and can be used for simultaneous determination of 11 compounds in *S. miltiorrhiza* and decoction pieces. It can be used for quality control and relative study of *S. miltiorrhiza*.

KEYWORDS *Salvia miltiorrhiza*; UPLC; Multi-component determination; Wavelengths switching

丹参为我国临床最常用的中药材之一, 为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎, 味苦, 性微寒, 归心、肝经, 为活血、养血、益气及治疗心血管疾病的传统中药; 具有扩张血管、降血脂、抗动脉粥样硬化、抑制血小板凝聚、保护心肌、抗菌消炎及抗肿瘤等作用^[1-2]。丹参的药效活性成分主要是水溶性的丹酚酸类和脂溶性的丹参酮类两大类化学成分^[2-3]。据文献报道, 丹参的含量测定多采用HPLC法, 指标成分多为丹参素、丹酚酸B、丹参酮II_A等中的几个, 往往仅控制水溶性或脂溶性一类成分, 未能全面控制水溶性和脂溶性成

分的含量, 且分析时间往往较长, 一次进样分析至少需要40 min^[4-9]。本研究采用超高效液相色谱(UPLC)技术, 建立了同时测定丹参中丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸B、丹酚酸A、二氢丹参酮、丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮II_A 11个主要活性成分的方法, 可在14 min内完成一次色谱分析。此方法快捷、准确, 重复性好, 可较全面地掌握丹参药材、饮片中11个化学成分的含量信息。

1 材料

1.1 仪器

超高效液相色谱(UPLC)Accuracy系统, 包括二元超高压溶剂系统、自动进样恒温样本管理器、二极管阵列检测器、Empower 3色谱工作站(美国Waters公司); NANO-pure Diamond Ro⁺纯水系统(美国Thermo Fisher Scientific公司);

Δ 基金项目: 国家重大新药创制专项(No.2011ZX09201-201-26)
* 主管药师, 博士。研究方向: 中药资源及质量。电话: 010-84205625。E-mail: 13810507641@163.com
通信作者: 研究员。研究方向: 中药化学成分。电话: 010-64062692。E-mail: fu00126@sina.com

CP225D型电子分析天平(德国 Sartorius 集团);KQ5200DE 型超声波仪(江苏昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

丹参素钠对照品(批号:110855-200507)、原儿茶醛对照品(批号:110810-200506)、丹酚酸B对照品(批号:111562-200504)、丹参酮Ⅱ_A对照品(批号:110766-200417)、隐丹参酮对照品(批号:852-9903)均购自中国食品药品检定研究院;迷迭香酸(批号:1189-060824)、咖啡酸(批号:1089-050103)、丹酚酸A(批号:1073-060113)、二氢丹参酮(批号:1065-090121)、丹参酮I(批号:1428-070321)均购自中药固体制剂制造技术国家工程中心(质量分数均>98%);紫草酸(批号:20216-201107)购自南昌贝塔生物科技有限公司,质量分数>98%;甲酸、甲醇均为分析纯,乙腈为色谱纯,水为超纯水。

1.3 药材与饮片

9批丹参药材样品由陕西步长制药有限公司提供(不同产地),另两批饮片分别来自北京同仁堂药店(批号:20120917)和北京卫仁饮片厂(批号:20130109)。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

取丹参药材或饮片,粉碎,过40目筛,精密称取粉末0.5g,置于150ml具塞锥形瓶中,精密加入75%甲醇溶液50ml,称定质量,超声处理30min(功率:280W;频率:40kHz),放置冷却至室温,用75%甲醇溶液补足减失的质量,摇匀,溶液过0.22μm微孔滤膜,续滤液作为供试品溶液。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取对照品丹参素钠1.44mg、原儿茶醛1.16mg、咖啡酸1.25mg、迷迭香酸1.30mg、紫草酸1.02mg、丹酚酸B6.63mg、丹酚酸A1.08mg、二氢丹参酮2.06mg、丹参酮I1.26mg、隐丹参酮1.74mg、丹参酮Ⅱ_A1.71mg,用甲醇溶解并定容至25ml,即得对照品溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱:Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈(2.1mm×50mm,1.7μm);流动相:0.5%甲酸溶液(A)-乙腈(B)系统,色谱洗脱梯度(以B相比比例表示):0~1min,4%;1~2.5min,4%~13%;2.5~7.5min,13%~22%;7.5~8.5min,22%~48%;8.5~12min,48%~60%;12~13min,60%~90%;13min~14min,90%;流速:0.4ml/min;检测波长:280nm和265nm;进样量:2μl;柱温:35℃;样品管理器温度:4℃。理论塔板数以丹酚酸B和丹参酮Ⅱ_A计,分别为19687和31045。色谱见图1。

2.4 线性关系考察

依次精密量取各对照品溶液0.25、0.50、1.00、2.00、5.00、8.00μl,分别进样,测定峰面积。分别以各色谱峰面积积分值(y)对质量(x)进行线性回归,结果见表1。

2.5 精密度试验

取对照品溶液适量,连续进样6次,测定各成分峰面积积分值,RSD分别为:丹参素钠0.63%、原儿茶醛0.25%、咖啡酸0.89%、迷迭香酸0.44%、紫草酸0.71%、丹酚酸B0.49%、丹酚

酸A0.31%、二氢丹参酮0.72%、丹参酮I0.81%、隐丹参酮0.97%、丹参酮Ⅱ_A0.37%,表明仪器精密度高。

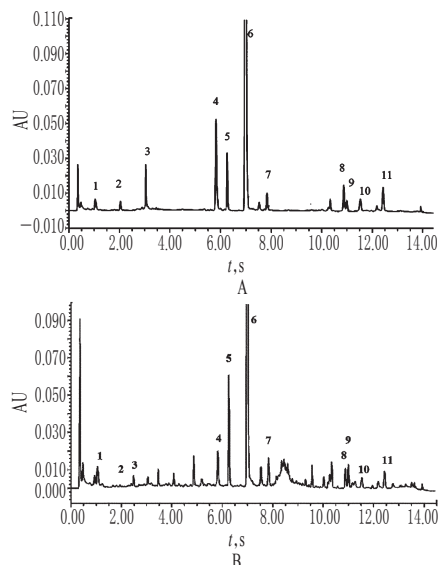


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.丹参样品;1.丹参素钠;2.原儿茶醛;3.咖啡酸;4.迷迭香酸;5.紫草酸;6.丹酚酸B;7.丹酚酸A;8.二氢丹参酮;9.丹参酮I;10.隐丹参酮;11.丹参酮Ⅱ_A。

Fig 1 UPLC chromatograms

A.mixed control;B.S. *miltiorrhiza* sample; 1.tanshinol; 2. protocatechuic aldehyde); 3.caffeic acid; 4.rosmarinci acid; 5.alkannic acid; 6. salvianolic acid B; 7.salvianolic acid A; 8.dihydrotanshinone; 9.tanshinone I; 10. cryptotanshinone; 11.tanshinone II_A。

表1 线性关系考察结果(n=6)

Tab 1 Linear relationship(n=6)

成分	线性范围,ng	回归方程	r
丹参素钠(Tanshinol)	14.40~460.80	y=624.28x-964.13	0.9999
原儿茶醛(Protocatechuic aldehyde)	11.60~371.20	y=321.87x-692.04	0.9998
咖啡酸(Caffeic acid)	12.50~400.00	y=1418x-4288.2	0.9997
迷迭香酸(Rosmarinci acid)	13.00~416.00	y=6995.4x-17012	0.9999
紫草酸(Lithospermic acid)	10.20~326.40	y=3013.9x-3399	0.9996
丹酚酸B(Salvianolic acid B)	66.30~2122.00	y=1205.7x-15550	0.9998
丹酚酸A(Salvianolic acid A)	10.80~345.60	y=4772.5x+4734.2	0.9999
二氢丹参酮(Dihydrotanshinone I)	20.60~659.20	y=791.32x+1011	0.9999
丹参酮I(Tanshinone I)	12.60~403.20	y=18118x+48409	0.9997
隐丹参酮(Cryptotanshinone)	17.40~556.80	y=6766.5x+7461.9	0.9999
丹参酮Ⅱ _A (Tanshinone II _A)	17.10~547.20	y=7617.5x+5798.4	0.9999

2.6 稳定性试验

取“2.1”项下供试品溶液适量,按上述色谱条件,于0、4、8、12、16、20、24h进样测定各成分峰面积积分值,其RSD分别为:丹参素0.98%、原儿茶醛0.65%、咖啡酸0.78%、迷迭香酸0.55%、紫草酸0.79%、丹酚酸B0.77%、丹酚酸A0.42%、二氢丹参酮0.82%、丹参酮I1.75%、隐丹参酮1.03%、丹参酮Ⅱ_A0.88%,表明供试品溶液在24h各成分稳定。

2.7 重复性试验

取丹参样品适量,平行取样6份,制备供试品溶液,测定计算各成分的含量,其RSD分别为:丹参素0.43%、原儿茶醛0.55%、咖啡酸0.62%、迷迭香酸0.77%、紫草酸0.99%、丹酚酸B0.19%、丹酚酸A0.35%、二氢丹参酮0.77%、丹参酮I

1.25%、隐丹参酮0.95%、丹参酮Ⅱ_A0.76%，表明重复性良好。

2.8 加样回收率试验

精密称定已测知质量浓度的丹参样品6份，每份0.25 g，加入各对照品溶液适量，按“2.1”项下方法制备供试品溶液（丹酚酸B的回收率试验，按1/10的量同比例操作，即称取5份丹参样品，每份0.025 g，再加入丹酚酸B对照溶液，加入溶剂5 ml，同法提取制备），取2 μl续滤液注入液相色谱仪，测定，计算各成分回收率。结果，丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸B、丹酚酸A、二氢丹参酮、丹参酮Ⅰ、隐丹参酮、

丹参酮Ⅱ_A的回收率分别为98.29%、100.84%、99.66%、99.05%、98.53%、97.70%、99.07%、97.93%、97.75%、97.95%、101.07%，各成分的RSD分别为1.03%、1.48%、1.03%、1.29%、1.35%、1.42%、0.98%、1.05%、1.61%、1.89%、1.24%。

2.9 样品含量测定

取各丹参样品，按“2.1”项下制备供试品溶液，进样1 μl，记录峰面积，代入回归方程，计算各样品中各成分的含量平均值，结果见表2。

3 讨论

表2 样品含量测定结果(mg/g, n=3)

Tab 2 Results of content determination of samples(mg/g, n=3)

序号	产地	来源	含量,mg/g										
			丹参素钠	原儿茶醛	咖啡酸	迷迭香酸	紫草酸	丹酚酸B	丹酚酸A	二氢丹参酮	丹参酮Ⅰ	隐丹参酮	丹参酮Ⅱ _A
1	安徽太和县	步长集团	10.138 1	0.236 5	0.099 6	2.497 2	3.326 8	49.897 7	7.868 0	0.179 8	0.178 5	0.193 5	0.308 6
2	四川中江县	步长集团	2.537 6	0.010 4	0.079 4	1.703 2	5.217 5	67.541 1	0.990 4	0.217 7	0.165 2	0.505 5	0.797 8
3	河北承德市	步长集团	4.203 3	0.019 8	0.098 9	0.909 9	5.626 4	38.704 9	1.025 5	0.546 3	0.184 3	0.588 7	0.437 3
4	山东沂水县	步长集团	0.960 3	0.006 5	0.050 0	2.756 8	1.886 9	99.721 5	0.665 1	0.772 9	0.474 6	1.211 4	1.691 8
5	安徽亳州市	步长集团	3.444 6	0.017 2	0.085 7	1.011 8	5.244 4	48.869 8	0.838 5	0.453 0	0.347 8	0.643 7	0.792 1
6	河北灵寿县	步长集团	3.439 7	0.014 2	0.096 1	1.043 0	5.808 3	46.325 2	0.884 1	0.246 0	0.239 1	0.301 8	0.491 1
7	山东莒县	步长集团	2.144 0	0.012 0	0.064 6	1.528 7	3.712 0	48.633 4	0.592 7	0.403 1	0.270 1	0.457 7	0.454 5
8	山东平邑县	步长集团	2.988 4	0.015 9	0.066 4	2.238 0	4.833 1	63.270 8	0.810 1	0.374 7	0.274 5	0.418 8	0.495 1
9	山东临朐县	步长集团	2.010 9	0.009 1	0.078 6	2.372 4	4.867 8	104.549 5	1.478 4	1.440 2	0.864 4	3.733 5	2.725 2
10	山东	北京同仁堂药店	1.019 8	0.013 2	0.043 7	2.531 6	3.514 5	56.123 7	1.161 5	1.227 5	0.648 7	1.487 8	1.872 8
11	不详	中日友好医院药房	1.838 9	0.020 7	0.053 8	2.575 6	3.074 1	75.922 9	0.638 3	0.261 0	0.258 4	0.260 0	0.638 6

3.1 色谱条件的选择

对乙腈、甲醇与不同体积浓度甲酸、醋酸、磷酸溶液的不同配比流动相系统进行考察的结果表明，以乙腈-0.5%甲酸溶液系统为流动相，对丹参各成分的分离效果较好，其色谱峰与相应对照品的色谱峰保留时间及紫外光谱一致；选择检测波长时，采用二极管阵列检测器，分别对各指标成分的对照品溶液在200~400 nm进行了全波长扫描，结果显示酚酸类成分的最大吸收波长大多在280 nm处，丹参酮类成分的最大吸收波长多在265 nm附近，同一波长下测定，误差较大。因此，最终选择在280 nm和265 nm两个波长处分别检测丹参酚酸类和丹参酮类成分，各成分响应信号较稳定，且干扰较小。

3.2 供试品提取条件的考察

以丹酚酸B及丹参酮Ⅱ_A含量为指标，进行提取溶剂和提取方式、提取时间的考察。甲醇、乙醇、乙酸乙酯等提取溶剂的比较结果显示，甲醇提取效率较高；60%、70%、75%、80%、90%、100%甲醇为提取溶剂的比较结果显示，75%的甲醇对丹参中的水溶性成分和脂溶性成分均能有效提取；加热回流、浸渍、超声等提取方式的比较结果显示，超声不仅提取效率较高，而且成分破坏较少；超声提取15、30、45、60 min的比较结果显示，对于过40目筛的丹参粉末，超声提取30 min已能提取完全各类成分，过长提取时间易导致丹酚酸B等成分被破坏；50、75、100、150倍溶剂体积的比较结果显示，在体积100倍的75%甲醇超声提取30 min条件下，两类成分均可完全提取。

本实验结果表明，不同产地、批次的丹参药材饮片中，同一指标成分含量差异显著，提示厂家在使用丹参药材、饮片为原材料时应注意控制其来源，方可保证最终产品的质量与疗效的均一、可靠。本研究采用UPLC双波长法，在14 min内即

可完成一次进样色谱分离，可对丹参中的11个指标性成分同时进行准确定量，可用于控制其质量，加强对丹参药材、中间体、成药质量的整体把握。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：一部[S]. 2010年版. 北京：中国医药科技出版社，2010：70.
- [2] 杜冠华，张均田. 丹参现代研究概况与进展[J]. 医药导报，2004，23(6)：355.
- [3] 赵娜，郭治昕，赵雪，等. 丹参的化学成分与药理作用[J]. 国外医药：植物药分册，2007，22(4)：155.
- [4] 李耿，辛文峰，杜金行，等. UPLC法同时测定丹参注射剂中6个成分的含量[J]. 药物分析杂志，2008，28(12)：2 021.
- [5] 暴凤伟，张振秋，刘玉强，等. 波长切换HPLC法同时测定丹参中5种水溶性成分的含量[J]. 中国药房，2013，24(11)：1 002.
- [6] 张文生，李德坤，叶正良. 反相高效液相色谱法测定丹参提取物中的丹参素，原儿茶醛和丹酚酸B的含量[J]. 药物分析杂志，2003，23(6)：475.
- [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] 游勇基，程广强，陈铭辉. 丹参注射剂中丹参素、原儿茶醛、原儿茶醛和丹酚酸B的同时测定[J]. 药物分析杂志，2004，24(1)：46.
- [9] 杨伟，李永吉. RP-HPLC测定丹参中4种水溶性成分的含量[J]. 中国中药杂志，2006，31(23)：2008.

(收稿日期：2013-11-25 修回日期：2014-04-14)