

HPLC法测定丹参中弥罗松酚的含量及其影响因素研究^Δ

付英杰*, 时天, 王建安[#](济宁医学院药学院, 山东日照 276826)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)39-3690-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.39.15

摘要 目的:探讨影响丹参中弥罗松酚含量的因素。方法:采用高效液相色谱法分别考察不同产地、不同加工方法、不同采收季节、药用部位等因素对丹参中弥罗松酚含量的影响。色谱柱:Dikma Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(梯度洗脱);柱温:25 ℃;检测波长:280 nm。结果:弥罗松酚的质量浓度在0.125~0.625 μg/μl范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.9999$);平均加样回收率为100.68%,RSD为1.32%($n=9$)。不同产地的丹参中弥罗松酚的质量分数较为接近;干品中的弥罗松酚质量分数高于鲜品;弥罗松酚在根中的含量最多,其次为茎,而叶和花中的含量最低;采收季节对其含量的影响也较大;弥罗松酚在丹参根中含量最高的时间为3月,而在茎中含量最高的时间为6月。结论:在提取弥罗松酚时,应尽量在适宜的季节采摘根和茎,经晒干或烘干后提取利用。

关键词 丹参;弥罗松酚;高效液相色谱法;含量;影响因素

Content Determination of Ferruginol in *Salvia miltiorrhiza* by HPLC and Study on the Influential Factors

FU Ying-jie, SHI Tian, WANG Jian-an (Pharmacy College, Jining Medical University, Shandong Rizhao 276826, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the influential factors of content determination of ferruginol in *Salvia miltiorrhiza*. METHODS: HPLC method was adopted. The effects of different producing area, processing methods, harvest season and medicinal parts on the content of ferruginol in *S. miltiorrhiza* were investigated. The determination was performed on Dikma Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of methanol-water (gradient elution); the column temperature was 25 ℃ and the detection wavelength was set at 280 nm. RESULTS: The linear range of ferruginol were 0.125-0.625 μl ($r=0.9999$) with an average recovery of 100.68% (RSD=1.32%, $n=9$). The contents of ferruginol in *S. miltiorrhiza* from different producing areas were similar to each other; that of dried product was higher than that of fresh product; the content of ferruginol in the root of *S. miltiorrhiza* was the highest, followed by stem, leaves and flowers. The content of ferruginol was greatly influenced by harvest season: the content of ferruginol was the highest in the root of *S. miltiorrhiza* harvested in March, and that was the highest in the stem of *S. miltiorrhiza* harvested in June. CONCLUSIONS: For the extraction of ferruginol, the root and stem of *S. miltiorrhiza* should be harvested in suitable season, and dried in the sun or over the fire.

KEYWORDS *Salvia miltiorrhiza*; Ferruginol; HPLC; Content; Influential factors

弥罗松酚(Ferruginol)又称铁锈醇,分子式为C₂₀H₃₀O。目前,其提取、合成方法包括从松柏纲或唇形科的新鲜植株(如丹参)或粗提物中分馏提取^[1]、以脱氢松香胺为起始原料进行合成^[2]、采用细胞培养技术进行提取^[3-4]等。据报道,弥罗松酚具有抗氧化、抗菌、抗疟原虫^[5-6]、抗肿瘤^[7]、抗溃疡、保护心脏、保护乙醇所致的胃损伤^[8]等药理作用。但是,弥罗松酚目前仅在工业上作为增香剂使用,其药用价值还有待发掘。

目前,临床上治疗因乙醇所致的胃损伤患者多给予质子泵抑制药、组胺受体拮抗药、抗幽门螺旋杆菌药等,不良反应较大,患者顺应性差。Areche C等^[9]研究发现,弥罗松酚可通

过刺激前列腺素E₂(PGE₂)的合成,加强胃壁的抗炎作用,维持谷胱甘肽(GSH)水平,增加胃内水分的分泌等途径保护胃损伤;并且,其口服急性毒性实验的半数致死量(LD₅₀)>3 g/kg,安全性高,且淡香味易被患者接受,故其很有可能成为新的治疗胃病的药物。为促进弥罗松酚的开发利用,本研究采用高效液相色谱(HPLC)法考察了不同产地、不同采收季节、不同加工方式及药用部位对唇形科中药丹参(*Salvia miltiorrhiza*)中弥罗松酚含量的影响。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AT型HPLC仪,包括SPD-M20A型二级阵列检测器和自动进样器(日本岛津公司);微量移液器(德国Eppendorf公司)。

1.2 药材

Δ 基金项目:济宁医学院青年科研基金项目(No.JYQ2011KM026)

* 讲师,博士。研究方向:中药新药与炮制原理。电话:0633-2983695。E-mail:pilipili@163.com

通信作者:副教授,硕士。研究方向:植物生理与生药学。E-mail:anansen@163.com

丹参饮片分别来自北京同仁堂日照药店(产地河南)、紫光药业日照连锁药店(产地安徽)、真诚大药房日照店(产地山东),以及济宁医学院日照校区试验田自种。

1.3 试剂

弥罗松酚对照品(云南西力生物技术有限公司,批号:bbp02888);三氯甲烷(上海安谱科学仪器有限公司,批号:131130,色谱纯;天津富宇精细化工有限公司,批号:120827,分析纯);甲醇(天津永大化学试剂有限公司,批号:130927,色谱纯)。

2 方法与结果

2.1 方法学考察

2.1.1 对照品贮备液的制备 精密称取弥罗松酚对照品5 mg,置5 ml量瓶中,加氯仿溶解并稀释至刻度,摇匀,密封冷藏保存,即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 分别精密称取丹参药材10.00 g,置索氏提取器中,以氯仿为提取溶剂,水浴加热并回流提取至药材浸液无颜色,回收溶剂,置10 ml量瓶中,加氯仿稀释至刻度,摇匀,密封冷藏保存,过0.45 μm微孔滤膜,即得。

2.1.3 色谱条件和系统适用性条件 色谱柱:Dikma Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:0~8 min,20%甲醇水溶液→纯甲醇,8~20 min:纯甲醇;柱温:25 ℃;检测波长:280 nm。理论板数按弥罗松酚计应不低于7 000;分离度=5.94。色谱见图1。

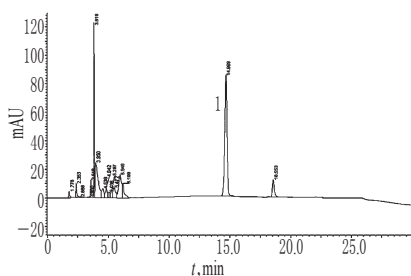


图1 高效液相色谱图

1. 弥罗松酚

Fig 1 HPLC chromatogram

1. ferruginol

2.1.4 线性关系考察 采用移液器分别吸取125、250、375、500、625 μl的对照品贮备液,置1 ml棕色量瓶中,加氯仿稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度分别为0.125、0.25、0.375、0.500、0.625 μg/μl的对照品溶液,密封冷藏,进样前过0.45 μm微孔滤膜,并快速转移至1.5 ml液相样品瓶中,按上述色谱条件进样20 μl测定,记录峰面积。以对照品溶液的质量浓度(x, μg/μl)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程: $y=7\ 184\ 474x-56\ 356$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明,对照品溶液的质量浓度在0.125~0.625 μg/μl范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.1.5 精密度试验 精密吸取质量浓度为0.25 μg/μl新配制的对照品溶液20 μl,连续进样5次,按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,RSD=1.25%($n=5$),表明仪器精密

度良好。

2.1.6 重复性试验 精密称取同一批样品(产自试验田)5.00、10.00、15.00 g,各3份,分别按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,RSD分别为1.82%、1.35%、1.66%(n 均为3),表明方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 取质量浓度为0.25 μg/μl新配制的供试品溶液适量,分别于0、0.5、1、1.5、2 h时按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,RSD=1.22%($n=5$),表明供试品溶液在2 h内稳定性良好。

2.1.8 加样回收率试验 分别精密称取同一批样品(产自试验田)各8.00、10.00、12.00 g,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,代入回归方程,得弥罗松酚的质量浓度分别为0.29、0.37、0.44 μg/μl。精密吸取上述3个质量浓度的供试品溶液各500 μl,置1 ml棕色量瓶中,分别加入质量浓度为0.250、0.375、0.500 μg/μl的对照品溶液500 μl,按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=3$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=3$)

取样量, μl	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	回收率, %	\bar{x} , %	RSD, %
500	145.00	125.00	273.50	102.80		
500	145.00	187.50	333.14	100.34		
500	145.00	250.00	398.77	101.51		
500	185.00	125.00	309.31	99.45	100.68	1.32
500	185.00	187.50	372.51	100.01		
500	185.00	250.00	440.69	102.28		
500	220.00	125.00	346.46	101.17		
500	220.00	187.50	406.88	99.67		
500	220.00	250.00	467.32	98.93		

2.2 弥罗松酚含量影响因素考察

2.2.1 产地 取4批样品(产地为山东、河南、安徽,以及试验田)各适量,晒干,分别按“2.1.2”项下方法平行制备3份供试品溶液,按上述色谱条件进样10 μl,记录峰面积,计算样品含量。结果,山东、河南、安徽和试验田产的丹参中弥罗松酚的含量分别为(365±12)、(357±53)、(343±7)、(365±11) μg/g,表明各地所产丹参中弥罗松酚的质量分数差异较小。

2.2.2 药用部位 采集试验田栽培丹参的根、茎、叶、花的鲜品(采集时间为5月)及相应的60 ℃烘干品,分别按“2.1.2”项下方法平行制备3份供试品溶液,按上述色谱条件进样10 μl,记录峰面积,计算样品含量,结果见表2。

表2 丹参不同药用部位弥罗松酚的含量测定结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Content determination of ferruginol in different medicinal parts of *S. miltiorrhiza* ($\bar{x} \pm s$)

样品	含量, μg/g	样品	含量, μg/g
烘干茎	258±25	烘干花	34±3
烘干根	268±6	鲜茎	81±2
晒干茎	343±16	鲜根	101±9
晒干根	366±11	鲜叶	58±9
烘干叶	47±16	鲜花	27±2

由表2可知,烘干品中弥罗松酚的含量普遍高于鲜品,且以根中最多,其次为茎(与根相近),而叶、花中弥罗松酚的含

表3 不同采收季节对丹参根、茎中弥罗松酚含量的影响
($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Effects of harvest season on the content of ferruginol in root and stem of *S. miltiorrhiza* ($\bar{x} \pm s$)

采收月份	根, $\mu\text{g/g}$	茎, $\mu\text{g/g}$
1月	232±10	159±8
2月	271±5	139±7
3月	321±2	121±4
4月	294±6	179±8
5月	268±6	258±25
6月	241±2	298±11
7月	141±12	200±10
8月	119±9	173±10
9月	159±6	187±3
10月	235±17	207±4
11月	303±14	269±6
12月	274±8	217±12

量很低;另比较了烘干品与晒干品的样品含量,发现晒干品中弥罗松酚的含量高于烘干品。

2.2.3 采收季节 每隔一月采集试验田产丹参的根与茎,经60℃烘干后,按“2.1.2”项下方法平行制备3份供试品溶液,按上述色谱条件分别进样10 μl ,记录峰面积,计算样品含量结果见表3。

由表3可见,弥罗松酚在丹参根中含量最高的时间为3月,其次为11月,夏季不宜采收;而在茎中含量最高的时间为6月,其次为11月,初夏及初冬时节采收较为适宜。

3 讨论

本试验对多种可能影响丹参中弥罗松酚含量的影响因素进行了分析。结果表明,产地对其含量影响较小;加工方法对含量的影响较大,样品含量由大到小依次为晒干品、烘干品、鲜品;植物器官的含量也有所不同,样品含量由大到小依次为根、茎、叶、花,其中叶和花含量很低,对于弥罗松酚的开发价值较小;采收季节对含量也有一定的影响:在根中,3月和11月弥罗松酚的含量最高;而在茎中,6月和11月的含量最高。

笔者在试验中发现,丹参的茎中弥罗松酚质量分数较高,而目前在种植时,茎常作为无用部位直接被去除掉。此外,目

前生产企业生产的丹参制剂多采用水提法提取其中的水溶性成分,如丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸^[9],而弥罗松酚中仅有一个酚羟基,脂溶性较大,因此可考虑从水提后的药渣中进行弥罗松酚的提取,以增加丹参的药用价值。

参考文献

- [1] Inoue N. Purification of ferruginol[P]. Japan: JP05294878 A, 1993-11-09.
- [2] González MA, Pérez-Guaita D. Short syntheses of (+)-ferruginol from (+)-dehydroabietylamine[J]. *Tetrahedron*, 2012, 68(47): 9 612.
- [3] Nakanishi T, Miyasaka H, Nasu M, et al. Production of cryptotanshinone and ferruginol in cultured cells of *Salvia miltiorrhiza*[J]. *Phytochemistry*, 1983, 22(3): 721.
- [4] Miyasaka H, Nasu M, Yamamoto T, et al. Production of ferruginol by cell suspension cultures of *Salvia miltiorrhiza*[J]. *Phytochemistry*, 1985, 24(9): 1 931.
- [5] Bispo de JM, Zambuzzi WF, Ruela de Sousa RR, et al. Ferruginol suppresses survival signaling pathways in androgen-independent human prostate cancer cells[J]. *Biochimie*, 2008, 90(6): 843.
- [6] Flores C, Alarcón J, Becerra J, et al. Bark of *Prumnopitys andina* (Podocarpaceae) and *Austrocedrus chilensis* (Cupressaceae)[J]. *Bol Soc Chil Quím*, 2001, 46(1): 61.
- [7] Son KH, Oh HM, Choi SK, et al. Anti-tumor abietane diterpenes from the cones of *Sequoia sempervirens*[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005, 15(8): 2 019.
- [8] Areche C, Theoduloz C, Yáñez T, et al. Gastroprotective activity of ferruginol in mice and rats: effects on gastric secretion, endogenous prostaglandins and non-protein sulfhydryls[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2008, 60(2): 245.
- [9] 李耿, 史载祥, 杨洪军, 等. 丹参类注射剂中主要成分含量的比较分析[J]. *中国药房*, 2009, 20(3): 207.

(收稿日期:2014-06-06 修回日期:2014-08-31)

2014年全国寄生虫病防治技术竞赛在济南举办

本刊讯 为进一步提高我国各级寄生虫病防治机构专业技术人员的能力,推动寄生虫病防治工作有序开展,2014年9月18-19日,国家卫生计生委疾控局和中国疾控中心在山东省济南市联合举办了全国寄生虫病防治技术竞赛。来自全国31个省、自治区、直辖市的124名选手参加了本次竞赛。

竞赛分为理论知识考核和检测技能操作考核两部分,主要考核常见和重点寄生虫病的诊断方法、防治措施、常规检测技术和标本片制作、染色、镜检鉴别等技术。江苏省代表队获得团体一等奖,安徽省代表队刘志宏获得个人综合考核一等

奖。竞赛共决出个人奖36名,团体奖10名,优秀组织奖5名,团体鼓励奖2名。

本次竞赛是继2011年以来,连续第4次成功举办的全国性寄生虫病防治技能竞赛活动。与往届相比,此次竞赛的参赛选手理论知识和镜检技能成绩均有所提高,各地区之间的差距逐步缩小:东部地区稳步增长,中西部地区大幅提升,尤其是西藏、贵州、云南、广西等省(区)荣获多项集体和个人奖项。通过竞赛活动,加强了各级疾控机构的人才和技术储备,增强了疾控队伍的防治能力和凝聚力。