

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00190

## HPLC 法同时测定中药丹参中水溶性和脂溶性成分的含量

娄子洋<sup>1</sup>, 张 海<sup>2</sup>, 李 翔<sup>3</sup>, 朱臻宇<sup>3</sup>, 赵 亮<sup>2</sup>, 张国庆<sup>2</sup>, 柴逸峰<sup>3\*</sup>

1. 第二军医大学药学院分析测试中心, 上海 200433
2. 第二军医大学东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438
3. 第二军医大学药学院药物分析学教研室, 上海, 200433

**[摘要]** **目的:** 建立同时测定丹参中 2 种水溶性成分和 2 种脂溶性成分的方法。**方法:** HPLC-DAD 法, 采用 Agilent Zorbax TC C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以甲醇:2% 醋酸为流动相进行梯度洗脱; 0~15 min, 30% B~40% B; 15~20 min, 40% B~60% B; 20~25 min, 60% B~90% B; 25~40 min, 90% B。检测波长为 281 nm, 柱温: 35℃。**结果:** 迷迭香酸、丹酚酸 B、隐丹参酮、丹参酮 II A 浓度分别在 3.76~120.20 μg·ml<sup>-1</sup> ( $r=0.9999$ )、34.20~1094.5 μg·ml<sup>-1</sup> ( $r=0.9999$ )、0.64~20.32 μg·ml<sup>-1</sup> ( $r=0.9999$ )、1.02~32.72 μg·ml<sup>-1</sup> ( $r=0.9996$ ) 范围内呈良好的线性关系。4 种成分精密度试验 RSD < 1%。48 h 内稳定性 RSD < 1%。加样回收率为 99.72%~100.63%。**结论:** 该含量测定方法简便, 分离效果好, 能同时测定丹参中迷迭香酸、丹酚酸 B、隐丹参酮及丹参酮 II A 四种有效成分的含量, 结果准确可靠。

**[关键词]** 丹参; 多成分含量测定; 迷迭香酸; 丹酚酸 B; 隐丹参酮; 丹参酮 II A; 高压液相色谱法

**[中图分类号]** R 931.5      **[文献标志码]** A      **[文章编号]** 0258-879X(2009)02-0190-04

### HPLC simultaneously determines multiple hydrophilic and lipophilic bioactive components in Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae

LOU Zi-yang<sup>1</sup>, ZHANG Hai<sup>2</sup>, LI Xiang<sup>3</sup>, ZHU Zhen-yu<sup>3</sup>, ZHAO Liang<sup>2</sup>, ZHANG Guo-qing<sup>2</sup>, CHAI Yi-feng<sup>3\*</sup>

1. Center of Drug Analysis and Testing, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438
3. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433

**[ABSTRACT]** **Objective:** To develop a new method for the simultaneous determination of two hydrophilic components and two lipophilic components of Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae. **Methods:** The HPLC-DAD method was employed using a column of Agilent Zorbax TC C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with a mobile phase of methanol-2% acetic acid. The gradient elution program was as follow: 0-15 min, 30% B-40% B; 15-20 min, 40% B-60% B; 20-25 min, 60% B-90% B; 25-40 min, 90% B. The detection wavelength was set at 281 nm and the temperature was 35℃. **Results:** The linearity was obtained over 3.76-120.20 μg·ml<sup>-1</sup> ( $r=0.9999$ ) for rosmarinic acid, 34.20-1094.5 μg·ml<sup>-1</sup> ( $r=0.9999$ ) for salviamolic acid B, 0.64-20.32 μg·ml<sup>-1</sup> ( $r=0.9999$ ) for clyptotanshinon, and 1.02-32.72 μg·ml<sup>-1</sup> ( $r=0.9996$ ) for tanshinone II A. The RSDs of precision and stability of the sample were both less than 1% in 48 hours. The average recovery was between 99.72%-100.63%. **Conclusion:** The present method is simple and has satisfactory efficacy; it can simultaneously determine multiple hydrophilic and lipophilic bioactive components in *Salvia miltiorrhiza* from different areas.

**[KEY WORDS]** Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae; multicomponent assaying; rosmarinic acid; salviamolic acid B; clyptotanshinon; tanshinone II A; high pressure liquid chromatography

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(2): 190-193]

中药丹参 Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae 为唇形科植物丹参 *Salvia Miltiorrhiza 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。研究证实, 丹参主要含有脂溶性和水溶性

**[收稿日期]** 2008-09-06      **[接受日期]** 2008-11-19

**[基金项目]** 国家“十一五”科技支撑计划课题(2006BAI08B03-07). Supported by National Science and Technology Supporting Program of the Ministry of Science and Technology(2006BAI08B03-07).

**[作者简介]** 娄子洋, 博士, 副教授.

\* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-81870373, E-mail: yfchai@smmu.edu.cn

两类成分,不同的成分具有各自不同的药理活性。2005年版《中国药典》<sup>[1]</sup>中建立了分别测定丹参中水溶性成分丹酚酸 B 和脂溶性成分丹参酮 II A 的方法。但要全面地控制中药丹参的质量,仅测定其中的 2 个成分是远远不够的,而应该测定其中能代表丹参作用的有效成分群。目前,对丹参中化学成分进行测定的方法,文献中多有报道<sup>[2-9]</sup>。前人建立了同时测定丹酚酸 B、丹参素、原儿茶醛、丹参酮 II A、二氢丹参酮 I、隐丹参酮中部分成分的方法。丹参中所含的迷迭香酸具有抗氧化、抗炎、免疫调节、抗血栓、抗血小板聚集、抗菌、抗病毒、抗肿瘤等活性<sup>[10]</sup>,应作为控制丹参质量的一个重要指标。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 B、迷迭香酸、隐丹参酮及丹参酮 II A 含量的方法,该法简便、准确、重现性好,且具有足够的灵敏度,可为丹参药材的品质评价提供参考依据。

## 1 仪器和试剂

Agilent 1100LC 高效液相色谱仪;低压四元梯度泵;在线脱气机;自动进样器;柱温箱;ChemStation 色谱工作站。上海淀久 DJ-04 药材粉碎机;METTLER AE240 电子天平;BRANSON SB3200-T 型超声仪。迷迭香酸、丹酚酸 B、隐丹参酮及丹参酮 II A 对照品均为自制,经 HPLC 面积归一化法检查,纯度均高于 99.0%。丹参药材由上海华宇药业有限公司 Good Agricultural Practice (GAP) 试验基地提供,由第二军医大学药学院宓鹤鸣教授鉴定为丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根。

甲醇为色谱纯(购自 Fisher 公司),冰醋酸为分析纯(购自上海精细科技研究所),水为娃哈哈纯净水。

## 2 方法和结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Agilent Zorbax TC C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),柱号:880925-902;流动相:A 相为 2% 醋酸溶液,B 相为甲醇,梯度洗脱,洗脱程序如下:10~15 min,30% B~40% B; 15~20 min,40% B~60% B; 20~25 min,60% B~90% B;25~40 min,90% B;检测波长为:281 nm;流速:1.0 ml·min<sup>-1</sup>;进样量 20 μl。进样前以流动相梯度初始条件平衡 15 min。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取迷迭香酸、丹酚酸 B、隐丹参酮、丹参酮 II A 对照品各 30.05、273.63、5.08、8.18 mg 置 250 ml 棕色量瓶中,加 50% 甲醇溶解并定容,作为对照品溶液。

2.2.2 丹参药材样品溶液的制备 精密称取丹参药材粗粉 0.3 g(过 40 目筛,60℃ 干燥至恒定质量),置具塞锥形瓶中,加 50% 甲醇 50 ml,称质量,超声处理 30 min 后再用 50% 甲醇补质量,提取液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,弃去初滤液,取续滤液,即得丹参药材样品溶液,置于 4℃ 冰箱中保存。

### 2.3 方法学考察

2.3.1 系统适应性 在 2.1 项的色谱条件下,以对照品溶液和样品进样,根据色谱参数计算系统适应性。样品溶液的 HPLC 色谱图中迷迭香酸、丹酚酸 B、隐丹参酮和丹参酮 II A 的理论塔板数分别为 171 622、218 059、665 899 和 480 197;分离度分别为 2.459、2.818、4.346 和 3.432;拖尾因子分别为 1.107、1.113、1.127 和 1.013,均符合含量测定要求。对照品及样品的色谱图见图 1。

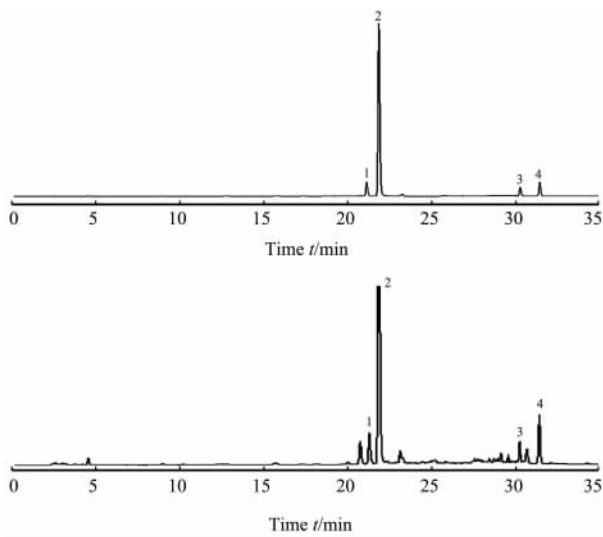


图 1 对照品(A)和样品(B)溶液的 HPLC/DAD 色谱图

Fig 1 HPLC/DAD chromatograms of standards and sample solutions

1: Rosmarinic acid; 2: Salviamolic acid B; 3: Clyptotanshinon; 4: Tanshinone II A

2.3.2 线性关系 精密吸取对照品混合溶液逐级用 50% 甲醇减半稀释,得 6 个浓度梯度的对照品混合溶液(迷迭香酸依次为:3.76,7.51,15.03,30.05,60.1,120.2 μg·ml<sup>-1</sup>,丹酚酸 B 依次为:34.2,68.41,136.81,273.63,547.25,1 094.5 μg·ml<sup>-1</sup>,隐丹参酮依次为:0.64,1.27,2.54,5.08,10.16,20.32 μg·ml<sup>-1</sup>,丹参酮 II A 依次为:1.02,2.05,

4.09, 8.18, 16.36, 32.72  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )。照 2.1 项下色谱条件进样测定,以对照品溶液的浓度为横坐标(X),以峰面积值为纵坐标(Y)绘制标准曲线,计算回归方程迷迭香酸在 3.760~120.20  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  的浓度范围内,回归方程  $Y = 11.279X - 0.2366$ ,  $r = 0.9999$ ; 丹酚酸 B 在 34.20~1094.5  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  的浓度范围内,回归方程  $Y = 263.87X + 53.8$ ,  $r = 0.9999$ ; 隐丹参酮在 0.6400~20.32  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  的浓度范围内,回归方程  $Y = 4.439X - 0.6865$ ,  $r = 0.9999$ ; 丹参酮 II A 在 1.020~32.72  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  的浓度范围内,回归方程  $Y = 6.9122X + 6.6224$ ,  $r = 0.9996$ 。

2.3.3 精密度 在 2.1 项色谱条件下,分别以对照品溶液连续进样 5 次,计算其峰面积的相对标准偏差(RSD),结果迷迭香酸、丹酚酸 B、隐丹参酮、丹参酮 II A 峰面积积分值 RSD 分别为 0.15%、0.22%、0.62%、0.50%,符合含量测定要求。

2.3.4 稳定性 精密称取批号 G2004031502 的丹参药材粉末 0.3 g,照 2.2.5 项下的方法制备样品溶液。分别在 0、3、6、12、18、24、36、48 h 测定 4 种有效成分的峰面积,计算其 RSD,结果迷迭香酸、丹酚酸 B、隐丹参酮、丹参酮 II A 峰面积积分值 RSD 分别为 0.08%、0.07%、0.12%、0.22%,符合含量测定要求。

2.3.5 重复性 精密称取批号为 G2004031502 丹参药材粉末 5 份各约 0.3 g,按照 2.2.2 项方法制备

样品溶液,测定 4 种有效成分的含量,计算其 RSD,结果迷迭香酸、丹酚酸 B、隐丹参酮、丹参酮 II A 四种成分含量测定结果的重复性,其 RSD 分别为 0.21%、0.50%、0.16%、0.54%,符合含量测定要求。

2.3.6 最低检测限 将迷迭香酸、丹酚酸 B、隐丹参酮和丹参酮 II A 对照品溶液分别稀释进样,以信噪比为 3:1 确定最低检测限分别为 0.0375、0.0342、0.0630、0.0102  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ,符合含量测定要求。

2.3.7 回收率 精密称取迷迭香酸、丹酚酸 B、隐丹参酮和丹参酮 II A 含量分别为 0.3055%、2.0862%、0.0818%和 0.1169%的丹参药材粉末(批号 G2004031502),各约 0.3 g,分别精密加入 0.96  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  迷迭香酸对照品溶液、6.32  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  丹酚酸 B 对照品溶液、0.24  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  的隐丹参酮对照品溶液、0.35  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  的丹参酮 II A 对照品溶液各 1.0 ml,分别按 2.2.2 项方法制备样品溶液,测定 4 种有效成分的含量,结果其平均加样回收率为 100.07%、99.72%、100.63%、99.84%;其 RSD 分别为 0.53%、0.34%、1.13%、1.05%,符合含量测定要求。

2.4 样品测定 精密称取 6 个不同产地的丹参药材粉末各 0.3 g,分别按 2.2.2 项方法制备样品溶液并测定,结果见表 1。

表 1 不同产地的丹参药材中四种成分的含量结果

Tab 1 Contents of four components in Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae from different production areas

( $n=3, \bar{x} \pm s, \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )

| Batch       | Habit           | Rosmarinic acid | Salviamic acid B | Clyptotanshinon | Tanshinone II A |
|-------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|
| T2004020501 | Ganyu Jiangsu   | 1.62±0.01       | 11.29±0.05       | 0.69±0.02       | 1.49±0.01       |
| T2004030801 | Linqu Shandong  | 3.07±0.01       | 20.73±0.43       | 1.38±0.01       | 1.74±0.03       |
| T2004022401 | Pingyi Shandong | 4.38±0.04       | 22.51±0.64       | 1.85±0.05       | 2.50±0.01       |
| G2003080101 | Dongtai Jiangsu | 1.16±0.04       | 8.76±0.01        | 0.09±0.00       | 0.24±0.02       |
| G2003050601 | Luoning Henan   | 1.01±0.01       | 3.81±0.00        | 0.07±0.00       | 0.18±0.01       |
| G2004031502 | Buning Jiangsu  | 3.05±0.02       | 20.86±0.28       | 0.81±0.01       | 1.16±0.00       |

### 3 讨论

3.1 样品溶液的制备 在对丹参药材样品溶液的制备中,有文献<sup>[5]</sup>报道采用 50%乙醇回流提取效果最好,本实验对比了不同提取方法(超声、回流)、不同提取溶剂(100%甲醇、50%甲醇、50%乙醇)对丹参药材的提取效果,结果采用超声与回流的效果相差不大,采用 50%甲醇超声与采用 50%乙醇回流效果相当,但较采用 100%甲醇超声的提取效果要好

得多,综合经济实用、快捷简便等各个方面,故确定最终的提取条件采用 50%甲醇 50 ml,超声处理 30 min。这样既可以把其中有效成分尽可能多的提取出来,又可节约时间,方便操作。

3.2 流动相的选择 文献多用甲醇与水、乙腈与水不同比例进行梯度洗脱,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醋酸;

水溶性成分中,由于迷迭香酸与丹酚酸 B 的极性极其接近,而隐丹参酮和丹参酮 II A 属脂溶性成分,所以无法采用等度洗脱的方法同时对 4 个成分进行分离。经实验考察,采用 2% 的醋酸溶液和甲醇溶液为流动相进行梯度洗脱,4 个成分均能够实现良好分离。

3.3 检测波长的选择 经紫外检测,迷迭香酸的的最大紫外吸收为 280~360 nm,丹酚酸 B 的最大吸收波长为 230 nm 和 285 nm,丹参酮 II A 的最大吸收在 250~280 nm,隐丹参酮在 281 nm 附近有吸收。经实验证明,以 281 nm 为检测波长,迷迭香酸、丹酚酸 B、隐丹参酮、丹参酮 II A 均可被检出。

本实验成功采用梯度洗脱的方法同时测定丹参中迷迭香酸、丹酚酸、隐丹参酮、丹参酮 II A 4 个成分的含量,样品分析时间小于 35 min,所测定丹参药材中 4 个成分的含量数据与文献<sup>[7-9]</sup>报道基本一致,因产地差异其含量表现出一些差异。这可为丹参药材的化学评价提供方法和依据,为药典含量测定方法的修订提供根据。

## [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 52.
- [2] 游勇基, 陈铭辉. 高效液相色谱法测定丹参中丹酚酸 B 等 3 种有效成分[J]. 中国药学杂志, 2003, 38: 950-952.
- [3] 郑晓珂, 董三丽, 冯卫生. HPLC 法测定丹参中丹参素、丹参酮 II A、二氢丹参酮 I、隐丹参酮的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9: 12-15.
- [4] 刘重芳, 张钰泉, 戴居云, 陶建生, 朱 艳. 丹参不同提取工艺比较[J]. 中成药, 1999, 29: 385-388.
- [5] 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丹参素、原儿茶醛和丹酚酸 B 的含量[J]. 药物分析杂志, 2003, 23: 475-476.
- [6] Hu P, Luo G A, Zhao Z, Jiang Z H. Quality assessment of *Radix Salviae Miltiorrhizae* [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2005, 53: 481-486.
- [7] Shi Z, He J, Yao T, Chang W, Zhao M. Simultaneous determination of cryptotanshinone, tanshinone I and tanshinone II A in traditional Chinese medicinal preparations containing *Radix salvia miltiorrhiza* by HPLC[J]. J Pharm Biomed Anal, 2005, 37: 481-486.
- [8] Ma L, Zhang X, Guo H, Gan Y. Determination of four water-soluble compounds in *Salvia miltiorrhiza* Bunge by high-performance liquid chromatography with a coulometric electrode array system[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2006, 833: 260-263.
- [9] Hu P, Luo G A, Zhao Z, Jiang Z H. Quantitative determination of four diterpenoids in *Radix Salviae Miltiorrhizae* using LC-MS-MS[J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2005, 53: 705-709.
- [10] 郭道森, 杜桂彩, 李 丽, 李荣贵. 迷迭香酸对几种植物病原真菌的抗菌活性[J]. 微生物学通报, 2004, 31: 71-76.

[本文编辑] 尹 茶

## · 书 讯 ·

### 《细支气管肺泡细胞癌》已出版

本书由李强、韩一平著, 第二军医大学出版社出版, ISBN 978-7-81060-868-8, 16 开, 定价 138.00 元。

本书是国内第一部关于“细支气管肺泡癌(BAC)”的专业性论著, 分上、下两篇, 系统地阐述了细支气管肺泡癌的流行病学、生物学特性以及 BAC 发生、发展的分子遗传学机制、病理组织学特征及其影像学改变和临床表现之间的关系; 同时对疾病的诊断、鉴别诊断和治疗现状, 尤其是对当前 BAC 的治疗热点——生物靶向治疗和外科手术术式的改进作了详细的描述, 反映了目前 BAC 基础和临床研究的新动态和新进展。

本书的一个亮点是每一位参与编写的作者均从各自的临床实践经验出发, 以病例为基础, 采用图文并茂的形式, 力求深入浅出地将 BAC 的病理、影像及临床特征和表现规律呈现给读者。

本书内容翔实, 科学性、实用性强, 适用于内科医师、分科的呼吸科医师、肿瘤科医师以及医学院校研究生、博士生, 并对放射科医师、胸外科医师均有重要的临床指导意义。

本书由第二军医大学出版社发行科发行, 全国各大书店均有销售。

通讯地址: 上海市翔殷路 800 号, 邮编: 200433

邮购电话: 021-65344595, 65493093

<http://www.smmup.com>