UFLC-UV 法同时测定黔产丹参中 4 个水溶性成分的含量*

王秋平[1]，郑 林[2]，陈思颖[2]，黄 勇[2]，兰燕宇[2]**
(1. 贵州省人民医院，贵州 贵阳 550002；2. 贵阳医学院 药学院，贵州 贵阳 550004)

[摘 要] **目的**：建立超快速液相色谱(UFLC)的方法同时测定丹参成分丹参素、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A。**方法**：采用 Diamonsil C_{18}色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm)，以乙腈 -0.05 %磷酸为流动相进行梯度洗脱，流速 1 mL/min，检测波长 220 nm，柱温 40 ℃，检测贵州 4 个不同产地的 8 批丹参成分丹参素、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A。**结果**：4 种被测成分的线性关系良好($r>0.999$)，精密度 RSD 0.49% ~1.67%，重复性 RSD 1.27% ~2.17%，稳定性 RSD 1.53% ~2.85%，平均加样回收率在 96.80% ~103.08%，RSD 1.88% ~2.79%($n=6$)，8 批黔产丹参药材中丹参素、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A 的平均含量分别为 2.061、3.559、44.223 及 1.426 mg/g。**结论**：UFLC 法用于检测丹参药材中丹参素、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A，具有简便、快速、准确的优点，能有效控制丹参药材的质量。

[关键词] 色谱法，液相；贵州；丹参；水溶性多酚
[中图分类号] R284.1；RZ273 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2014)04-0490-04

UFLC-UV Simultaneous Determination of Four Water-soluble Compounds in *Salvia miltiorrhiza* from Guizhou

WANG Qiuping[1], ZHENG Lin[2], CHEN Siying[2], HUANG Yong[2], LAN Yanyu[2]
(*1. People's Hospital of Guizhou Province, Guiyang 550002, Guizhou, China; 2. School of Pharmacy, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China*)

[**Abstract**] **Objective**: To establish a UFLC-UV method for determination of four water-soluble compounds in *Salvia miltiorrhiza* of Guizhou. **Methods**: Chromatogaphic analysis was performed on a Diamonsil C_{18} column (4.6 mm×250 mm,5 μm) with acetonitrile -0.05% phosphoric acid as mobile phase in gradient elution mode. The flow rate was 1 mL/min with the detection wavelength of 220 nm. The column temperature was set at 40 ℃. 8 samples of 4 different producing areas from Guizhou were analyzed. **Result**: All the four water-soluble compounds showed good linearity ($r>0.999$) in the range of tests concentrations. The RSD of the precision, reproducibility and stability tests were 0.49% ~1.67%, 1.27% ~2.17%, 1.53% ~2.85% respectively; the average recoveries of the method were in the range of 96.80% ~103.08%, RSD 1.88% ~2.79% ($n=6$). The average contents of four water-soluble compounds in *Salvia miltiorrhiza* of Guizhou were 2.061, 3.559, 44.223, 1.426 mg/g respectively. **Conclusions**: The method is simple, rapid and accurate, and can be applied for the quality control of *Salvia miltiorrhiza* from Guizhou.

[**Key words**] chromatography, liquid; Guizhou; *Salvia miltiorrhiza*; water-soluble compounds

*[基金项目]贵州省科技重大专项项目[黔科合重大专项字(2011)6019 号]；贵阳市科技计划项目[筑科合同(2011401)社 6 -2 号]；贵州省中药现代化科技产业研究开发专项[黔科合重 G 字(2013)4001]
**通信作者 E-mail：yanyu626@126.com
网络出版时间：2014 -08 -14 网络出版地址：http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20140814.2244.025.html

丹参为唇形科植物丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge.)的干燥根和根茎,具有活血祛瘀,通经止痛,清心除烦,凉血消痈等功效,主产于四川、安徽、江苏等省,河南、陕西、河北、山东、贵州、广西等亦有丹参分布和栽培[1-2]。据统计,2012 年贵州省丹参种植面积达 1.89 万亩,总产量达 1.15 万吨。丹参主要有脂溶性成分和水溶性成分,水溶性成分主要为丹参素、原儿茶醛、迷迭香酸、丹酚酸 B 等丹酚酸类化合物,是复方丹参片、丹参注射液、注射用丹参多酚酸盐的主要有效成分,具有抗血栓、抗氧化、改善血液循环、保护心肌、增加冠脉流量等药理作用[3-5]。《中国药典》(2010 年版)中对丹参含量的控制方法,只以丹酚酸 B 含量和丹参酮ⅡA 含量为指标,但这两种成分分别测定,操作繁琐,且不能全面反映药材中多个活性成分的含量[1]。因此,本研究采用超快速液相色谱(UFLC)法,建立能同时测定丹参素、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A 等 4 个丹参水溶性成分的方法,对 8 批贵州产丹参药材进行了含量测定,为贵州产丹参药材的质量评价和资源开发提供参考依据[6-8]。

1　材料与方法

1.1　材料

超快速液相色谱系统(UFLC,岛津,包括二元梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、Lcsolution 工作站);AE2401 /10 万电子天平(梅特勒 - 托利多仪器上海有限公司),超纯水机(四川沃特尔科技发展有限公司)。乙腈(德国 MERCK 公司)为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。丹参素钠(批号 110 855 200 508)对照品购于中国药品生物制品检定所,迷迭香酸(批号 MUST-10 120 901)、丹酚酸 B(批号 MUST-11 031 401)、丹酚酸 A(批号 MUST-10 012 901)对照品购于北京恒元启天化工技术研究院,8 批丹参药材来源于贵州贵阳、安顺、黔南州和黔东南州等地,并经贵阳医学院药学院龙庆德副教授鉴定为唇形科植物丹参的干燥根和根茎。

1.2　方法

1.2.1　色谱条件　Diamonsil C_{18} 色谱柱(4.6 mm ×250 mm,5 μm);流动相乙腈(A) - 0.05% 磷酸(B),流速 1 mL/min,梯度洗脱,0 ~ 7 min,A 2% ~ 4%;7 ~ 12 min,A 4% ~ 18%;12 ~ 15 min,A 18% ~ 20%;15 ~ 22 min,A 20% ~ 23%;22 ~ 32 min,A 23% ~ 32%;32 ~ 42 min,A 32% ~ 35%;42 ~ 50 min,A 35% ~ 90%。柱温 40 ℃,进样量 10 μL。用二极管阵列检测器分别对丹参素、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A 进行全波长扫描,其最大吸收波长分别为 220、220、221 及 221 nm,因此选择 220 nm 作为检测波长。

1.2.2　供试品溶液的制备　取丹参药材粉末(过 40 目筛)0.5 g,加入水 25 mL,经比较加热回流提取 1 h、2 h、3 h 样品,回流提取 2 h 后各成分含量趋于稳定,放冷再称定重量,用水补足减失的重量,摇匀,上清液用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液。

1.2.3　对照品溶液的制备　取丹参素钠、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A 适量,分别置于 4 个 10 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度分别为 1.090、1.606、3.654 及 1.186 g/L 的对照品储备液。

1.2.4　方法学考察　分别对丹参药材含量测定方法的专属性、线性关系、精密度、重复性、中间精密度、稳定性及回收率试验进行考察,以验证分析方法的可靠性。

1.2.5　样品测定　取收集的 8 批贵州不同产地的丹参药材,按"1.2.2"项下方法操作,进样测定,用外标法计算样品中 4 个水溶性成分的含量。

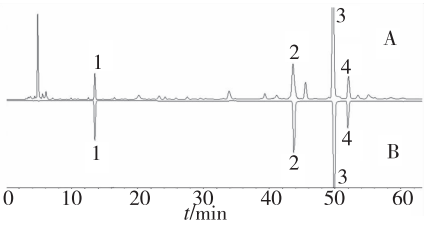
2　结果

2.1　专属性

分别吸取 4 种对照品混合溶液和供试品溶液 10 μL,在上述色谱条件下测定,4 种被测成分分离良好,在供试品溶液色谱中与其他物质色谱峰分离度均大于 1.5,见图 1。供试品中被测定化合物色谱图与对照品色谱图比较,供试品中被测定的 4 个化合物的保留时间分别与对照品的保留时间一致,紫外光谱图与各自对照品的紫外光谱图一致,说明该方法具有良好的专属性。

2.2　线性关系

分别精密量取上述 4 种对照品储备液 2、1、3.5 及 0.5 mL 置同一个 10 mL 容量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀后得混合对照品中间液;精密量取混合对照品中间液 0.125、0.25、0.5、1、2 及 4 mL 分别置于 4 个 5 mL 容量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀后按拟定的色谱条件注入 UFLC 测定,以峰面积对进样质量进行线性回归,得各被测成分的回归方程、相关系数及线性范围,见表 1。



1. 丹参素钠;2. 迷迭香酸;3. 丹酚酸 B;4. 丹酚酸 A

图 1 丹参提取液(A)和 4 种混合对照品(B)UFLC-UV

Fig. 1 UFLC-UV of *Salvia miltiorrhiza* extracts and 4 kinds of controls

表 1 4 个被测成分的线性关系

Tab. 1 Linear relationship of the 4 measured compounds

对照品	回归方程	r	线性范围(mg/L)
丹参素钠	$y=5.32\times10^{6}x-8.22\times10^{2}$	0.999 9	5.45 ~ 174.40
迷迭香酸	$y=1.05\times10^{7}x+4.40\times10^{3}$	0.999 8	4.02 ~ 128.45
丹酚酸 *B*	$y=5.83\times10^{6}x-1.95\times10^{4}$	0.999 9	31.97 ~ 1023.12
丹酚酸 *A*	$y=8.45\times10^{6}x-2.84\times10^{3}$	0.999 8	14.83 ~ 474.40

2.3 精密度试验

取同一供试品溶液,按供试品溶液制备方法制备供试品溶液,分别进样测定 6 次,4 个被测定成分峰面积平均值的RSD分别为0.49%、0.65%、1.58%及1.67%,表明仪器的精密度良好。

2.4 重复性试验

取同一批号样品 6 份,按供试品溶液制备方法制备供试品溶液并进行测定,4 个被测定成分质量浓度的 RSD 值分别为 1.29%、1.27%、1.36%及 2.17%。

2.5 中间精密度试验

以不同时间,不同实验人员取与重复性试验同一批号的供试品 6 份,对其进行测定,将测定结果与重复性结果进行比较,精密度良好,RSD 值分别为 0.89%、1.05%、1.67%及 2.03%。

2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液,分别于 0、2、4、6 及 12 h 进样测定,4 个被测定成分峰面积平均值的 RSD 分别为 2.45%、2.85%、2.37%及 1.53%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.7 回收率试验

同一批号丹参药材,称取 6 份,每份 0.25 g,分别置于圆底烧瓶中,加入混合对照品溶液 25 mL,其中混合对照品中各对照品浓度分别为:丹参素 0.018 09 g/L、迷迭香酸 0.028 48 g/L、丹酚酸 B 0.486 1 g/L 及丹酚酸 A 0.014 69 g/L。按供试品溶液制备方法制备,并按拟定的色谱条件进行测定,计算回收率及 RSD,结果见表 2。

表 2 4 个被测成分加样回收率($n=6$)

Tab. 2 The recoveries of the 4 measured compounds

化合物	样品中量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD (%)
丹参素钠	0.432 6	0.452 3	0.900 7	103.493 3		
	0.436 0	0.452 3	0.884 8	99.226 2		
	0.430 5	0.452 3	0.89 2	102.034 0		
	0.445 2	0.452 3	0.912 5	103.316 4	103.08	2.79
	0.432 8	0.452 3	0.921 5	108.047 8		
	0.433 8	0.452 3	0.896 7	102.343 6		
迷迭香酸	0.721 0	0.712 0	1.436 6	100.505 6		
	0.726 7	0.712 0	1.427 0	98.356 7		
	0.717 6	0.712 0	1.390 5	94.508 4		
	0.741 9	0.712 0	1.433 9	97.191 0	98.46	2.47
	0.721 3	0.712 0	1.442 5	101.292 1		
	0.723 0	0.712 0	1.427 4	98.932 6		
丹酚酸 B	11.755 0	12.152 5	23.310 9	95.090 7		
	11.848 4	12.152 5	23.992 1	99.927 6		
	11.698 9	12.152 5	23.259 2	95.126 9		
	12.096 0	12.152 5	23.564 7	94.373 2	96.80	2.66
	11.759 6	12.152 5	23.439 6	96.111 9		
	11.787 7	12.152 5	23.961 8	100.177 7		
丹酚酸 A	0.385 6	0.367 3	0.743 2	97.355 7		
	0.388 7	0.367 3	0.749 2	98.147 6		
	0.383 8	0.367 3	0.755 0	101.063 3	98.49	1.88
	0.396 8	0.367 3	0.754 6	97.420 4		
	0.385 8	0.367 3	0.740 2	96.494 9		
	0.386 7	0.367 3	0.755 7	100.472 1		

2.8 样品测定结果

丹参药材中 4 个水溶性成分含量差异较大,其中丹酚酸 B 的含量最高,在测定的 8 批贵州产药材中丹酚酸 B 的含量均远高于 2010 年版中国药典所规定的含量限度(≥3.0%),见表 3。

表 3　贵州产丹参药材中 4 个被测成分的测定结果(n=2)

Tab. 3　Test results of the 4 measured compounds in *Salvia miltiorrhiza* produced in Guizhou

批号	产地	丹参药材成分(mg/g)			
		丹参素	迷迭香酸	丹酚酸 B	丹酚酸 A
1	贵阳(花溪)	1.730	2.818	47.432	1.552
2	贵阳(花溪)	1.568	2.493	57.011	0.977
3	安顺(西秀)	2.138	4.067	37.667	1.422
4	安顺(西秀)	2.372	4.888	44.859	1.584
5	黔南州(都匀)	1.783	5.760	36.506	1.205
6	黔南州(都匀)	1.724	3.650	38.996	1.190
7	黔东南州(台江)	3.310	2.945	42.384	2.051
8	黔东南州(台江)	2.050	2.250	41.927	1.428
	平均值(mg/g)	2.061	3.559	44.223	1.426

3　讨论

中药化学成分的多样性与复杂性是发挥其疗效的物质基础,也是质量评价的难点与重点。传统的以单一成分作为指标进行质量控制手段越来越不能适应目前中药质量控制的要求。UFLC 作为高效液相色谱分析方法的一种突破,为中药多成分复杂体系的分析提供了一种新的强有力工具。近年来随着丹参研究的深入,发现丹参中的除了以丹参酮ⅡA 为代表的脂溶性成分外,其所含的水溶性酚酸类成分也是丹参中不可忽视的活性成分[9]。本文采用 UFLC-UV 法同时测定了丹参中丹参素、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A 的含量,为更客观地评价丹参的质量提供了实验依据。

丹参是贵州制药企业生产的参芎葡萄糖注射液、丹参川芎嗪注射液等名优中药大品种的主要原料,制剂制备工艺中均采用水煮工艺提取丹参。本研究采用丹参药材中 4 个主要的水溶性成分作为检测指标,在测定的 8 批贵州产药材中丹酚酸 B 的含量最高,并高于 2010 年版中国药典所规定的含量限度(≥3.0%),表明贵州产丹参药材质量较优,为贵州制药企业在本省内采购丹参药材提供了一定指导。

试验中对甲醇 - 水、乙腈 - 水、乙腈 - 0.05% 磷酸、乙腈 - 0.5% 乙酸等不同配比流动相系统进行考察,结果表明,以乙腈 - 0.05% 磷酸为流动相梯度洗脱分离效果较好。在丹参提取方法的选择上,对丹参药材超声提取、索式提取、回流提取及提取时间进行了比较研究,发现采用回流提取 2 h 作为丹参药材提取方法,操作简便、快速,结果可靠,可用于丹参药材的质量控制。

4　参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:化学工业出版社, 2010:70 - 71.

[2] 王晨,李佳,张永清. 丹参种质资源与优良品种选育研究进展[J]. 中国现代中药, 2012 (4):37 - 41.

[3] 曹金仪. 丹参的化学成分及临床用途[J]. 中国医药指南, 2012 (29):53 - 55.

[4] 王炜辰,吴学辉,郑芳. 丹参药理学研究进展[J]. 海峡药学, 2013 (10):24 - 25.

[5] 王兴东. 丹参在心脑血管病中的临床应用及其药理作用[J]. 中国医学创新, 2013 (16):116 - 118.

[6] 王鹏娇,舒阳,张敏,等. 高效液相色谱法测定杀菌止痒洗剂的稳定性[J]. 贵阳医学院学报, 2013 (5):485 - 488.

[7] 吴运莉,舒阳,孟小夏,等. HPLC 法测定香青百草油中丁香酚的含量[J]. 贵阳医学院学报, 2011 (5):488 - 490.

[8] 王爱民,鄢艳,谭安菊,等. 四季草颗粒质量标准提升研究[J]. 贵阳医学院学报, 2011 (5):455 - 459.

[9] 马丙祥,董宠凯. 丹参的药理作用研究新进展[J]. 中国药房, 2014 (7):663 - 665.

(2014-05-08 收稿,2014-06-25 修回)

中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 赵　毅