

刘 臣. HPLC 法同时测定丹参药材中 6 种活性成分的含量[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(7): 312-314.

HPLC 法同时测定丹参药材中 6 种活性成分的含量

刘 臣

(苏州市职业大学, 江苏苏州 215104)

摘要: 本研究目的是建立同时测定丹参药材中 6 种活性成分丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 B、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II A 含量的高效液相色谱法。以不同产地的丹参药材为样本, 用 HPLC 法测定。色谱条件为: Shimpack C₁₈ 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 以 0.2% 甲酸的乙腈溶液-0.2% 甲酸的水溶液体系为流动相进行梯度洗脱; 紫外检测器, 检测波长为 280 nm; 流速为 1.0 mL/min; 进样量 10 μL; 柱温为 30 ℃。结果表明, 在优化条件下, 6 种成分的进样量范围分别为丹参素 0.15 ~ 1.16 μg、原儿茶醛 0.067 ~ 0.54 μg、丹酚酸 B: 0.34 ~ 2.76 μg、隐丹参酮 0.04 ~ 0.32 μg、丹参酮 I 0.009 ~ 0.074 μg、丹参酮 II A 0.010 ~ 0.082 μg, 该范围内进样量与色谱峰面积之间的线性关系良好 ($r^2 = 0.9994 \sim 0.9997$); 加标回收率在 98.90% ~ 99.41%; RSD 均小于 1%。该方法简便、快速、准确, 可用于野生丹参和栽培丹参中水溶性及脂溶性活性成分的质量控制。

关键词: HPLC; 丹参; 活性成分; 含量

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)07-0312-02

丹参为唇形科鼠尾草属植物 (*Salvia miltiorrhiza* Bge.), 丹参的干燥根部及根茎, 具有活血化瘀、凉血消肿、清心除烦的功效^[1]。临床上证实, 丹参具有扩张血管、降血脂、抗动脉硬化、抑制血小板凝聚、抗血栓形成、保护心肌、增加冠脉流量、抗菌消炎、抗肿瘤等作用^[2]。丹参的活性成分可分为脂溶性丹参酮类和水溶性丹酚酸类, 水溶性丹酚酸类的主要成分为丹酚酸 B、丹参素、原儿茶醛, 脂溶性的丹参酮类的主要成分为迷迭香酸、二氢丹参酮、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II A。现代药理学研究表明, 丹参中酚酸类和丹参酮类成分均具有显著的生物活性^[3-5], 因此可以通过测定这些化合物的含量来全面评价丹参的质量。《中华人民共和国药典》(2010 版) 中对丹参含量的控制方法, 只以丹酚酸 B 含量和丹参酮 II A 含量为两大类成分的代表物, 分别测定, 所采用的色谱系统及样品的前处理方法等各不相同, 操作繁琐, 不能全面反映药材中多个活性成分的含量以及成分间的相关性。本研究采用高效液相色谱 (HPLC) 法, 建立以同一色谱条件和样品前处理方法, 同时测定丹参中多个活性成分 (丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 B、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II A 等) 的分析方法, 操作简便易行, 并对 6 个不同产地丹参药材中活性成分进行了含量测定, 旨在全面控制丹参药材的质量。

1 材料

1.1 供试丹参

购自黑龙江省哈尔滨市中药材批发站。

1.2 仪器与试剂

仪器: P230 型高效液相色谱仪 (配有 P230⁺ 紫外检测器、P230/P230p 高压恒泵, EC2000 色谱工作站, 大连依利特

分析仪器有限公司产品); RUC-5200 型超声波清洗机 (上海睿祺公司产品)。

药品与试剂: 对照品丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸 B、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II A 均购自于中国药品生物制品检定所, 乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Shimpak C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: A 为 0.2% 甲酸的乙腈溶液, B 为 0.2% 甲酸的水溶液, 梯度洗脱, 洗脱程序见表 1, 流速 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 280 nm, 进样量 10 μL。

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	流动相 A 含量 (%)	流动相 B 含量 (%)
0	8	92
10	8	92
30	10	90
40	40	60
45	40	60

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取适量对照品, 置 10 mL 量瓶中, 分别以甲醇为溶剂, 配制成单组分对照品溶液, 再配制成混合对照品溶液, 其中含丹参素 0.058 mg/mL、原儿茶醛 0.027 mg/mL、丹酚酸 B 0.138 mg/mL、隐丹参酮 0.016 mg/mL、丹参酮 I 0.0037 mg/mL、丹参酮 II A 0.0041 mg/mL。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取 0.5 g 丹参, 分别以 80 ℃ 热水、75% 甲醇、无水甲醇超声振荡提取 30 min, 每次用溶剂 30 mL, 残渣用少量甲醇洗涤, 与 3 次提取液合并, 定容至 100 mL 量瓶中, 备用。临进样前经 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

收稿日期: 2013-01-17

作者简介: 刘 臣 (1966—), 男, 黑龙江哈尔滨人, 高级工程师, 主要从事天然产物化学研究。Tel: (0512) 66507863; E-mail: liuchen008@163.com。

2.4 标准曲线的绘制

取上述混合对照品溶液分别进样 2.5、5.0、10.0、15.0、20.0 μL,按上述确定的色谱条件进样,记录峰面积与进样量,计算回归方程,结果见表 2。

表 2 丹参 6 种活性成分的回归方程、决定系数、线性范围

成分名称	回归方程	决定系数 (r^2)	线性范围 (μg)
丹参素	$y = 135.650x + 0.336$	0.999 7	0.15 ~ 1.16
原儿茶醛	$y = 83.911x - 4.793$	0.999 6	0.067 ~ 0.54
丹酚酸 B	$y = 330.520x + 1.102$	0.999 7	0.34 ~ 2.76
隐丹参酮	$y = 62.407x + 4.201$	0.999 5	0.04 ~ 0.32
丹参酮 I	$y = 11.130x + 0.452$	0.999 4	0.009 ~ 0.074
丹参酮 II A	$y = 11.224x + 0.344$	0.999 4	0.010 ~ 0.082

2.5 精密度试验

取上述丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 B、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II A 混合对照品溶液,连续进样 6 次,计算各成分峰面积的 RSD 值,结果表明所有成分峰面积的 RSD 值均小于 1.15%,说明仪器的精密度良好。

2.6 稳定性试验

取丹参供试品溶液,分别于 0、2、4、6、8 h 进样分析,结果各成分的峰面积 RSD 均小于 1%,表明供试品溶液在 8 h 内保持稳定。

2.7 重现性试验

取同一批丹参样品,称取 5 份,每份 0.5 g,按供试品溶液的制备方法处理,进行 HPLC 分析,结果表明 6 种所测成分的 RSD 均小于 2.0%。

2.8 回收率试验

精密称取已知含量的样品 18 份,每份各 0.25 g,分别加入一定量的 6 种对照品,测定含量,计算回收率,结果见表 3。

表 3 回收率试验结果

成分名称	供试品含量 (mg/mL)	对照品加入量 (mg/mL)	测定值 (mg/mL)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
丹参素	4.501 8	3.60	8.043 7	98.39	99.15	0.66
	4.491 0	4.50	8.969 6	99.52		
	4.478 4	5.40	9.852 9	99.53		
原儿茶醛	3.014 4	2.40	5.384 8	98.77	99.24	0.41
	3.010 8	3.00	5.995 9	99.50		
	3.025 2	3.60	6.605 3	99.45		
丹酚酸 B	11.013 2	8.80	19.856 8	100.50	99.39	0.99
	10.964 8	11.00	21.865 1	99.09		
	11.052 8	13.20	24.066 1	98.59		
隐丹参酮	2.250 9	1.80	4.028 4	98.75	98.99	0.23
	2.257 2	2.25	4.484 6	99.00		
	2.246 4	2.70	4.925 1	99.21		
丹参酮 I	0.548 5	0.44	0.983 4	98.85	98.90	0.40
	0.552 6	0.55	1.094 6	98.54		
	0.554 6	0.66	1.210 1	99.32		
丹参酮 II A	0.650 8	0.52	1.170 1	99.87	99.41	0.44
	0.649 0	0.65	1.294 9	99.38		
	0.651 3	0.78	1.423 4	98.99		

2.9 样品测定

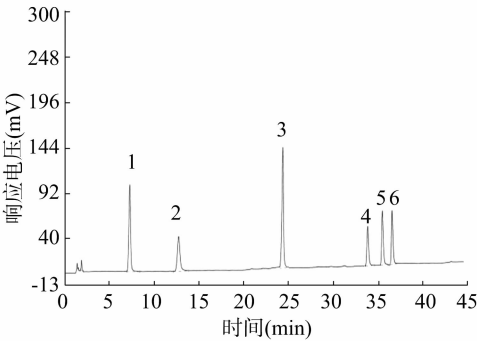
取不同产地的丹参药材,按供试品溶液的制备方法处理,进行 HPLC 分析,结果见表 4。

表 4 不同产地丹参药材 6 种活性成分含量 %

产地	丹参素	原儿茶醛	丹酚酸 B	隐丹参酮	丹参酮 I	丹参酮 II A
山东省临沂市	2.87	1.26	4.49	0.94	0.23	0.33
河北省安国市	1.82	1.09	5.57	0.81	0.43	0.35
河南省商丘市	0.96	0.58	4.99	0.98	0.27	0.48
江苏省盐城市	0.75	0.63	6.15	0.66	0.19	0.24
江苏省射阳县	0.72	0.86	3.19	0.71	0.31	0.42
陕西省洛南县	0.83	0.89	4.18	0.82	0.36	0.47

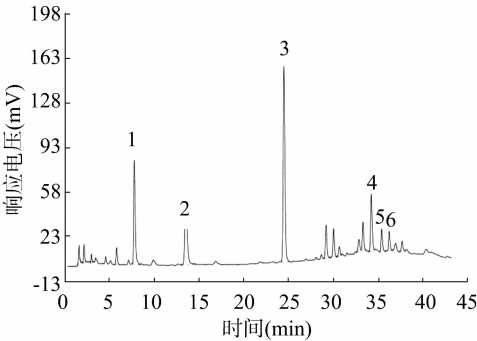
3 讨论

本试验采用 0.2% 甲酸乙腈溶液和 0.2% 甲酸水溶液溶剂系统作梯度洗脱,在该色谱条件下,丹参中 6 个活性成分均被完全分离(图 1、图 2)。本方法稳定,重现性好。



1—丹参素; 2—原儿茶醛; 3—丹酚酸B; 4—隐丹参酮; 5—丹参酮I; 6—丹参酮II A

图1 混合对照品HPLC图谱



1—丹参素; 2—原儿茶醛; 3—丹酚酸B; 4—隐丹参酮; 5—丹参酮I; 6—丹参酮II A

图2 丹参样品HPLC 图谱

在检测波长选择方面,丹参酚酸类成分的检测波长都在 280 nm 左右,而丹参酮类成分的检测波长都在 270 nm 左右,二者比较接近,影响不大,故选择 280 nm 作为检测波长。

在流动相系统选择方面,本研究选择了甲醇-醋酸-水、乙腈-磷酸-水、甲醇-甲酸-水、乙腈-甲酸-水系统分别以等度洗脱、梯度洗脱的方式进行色谱分离条件的选择,由于丹参中的酚酸类水溶性成分和丹参酮类脂溶性成分极性相差较大,筛选结果表明,以乙腈-甲酸-水系统进行梯度洗脱,6

薛春苗,王妙强,李 磊,等. 火焰原子吸收光谱法测定木防己中金属元素含量[J]. 江苏农业科学,2013,41(7):314-316.

火焰原子吸收光谱法测定木防己中金属元素含量

薛春苗,王妙强,李 磊,熊海涛,秦建萍,王文伟

(陕西理工学院化工学院,陕西汉中 723001)

摘要:选用 4 : 1 的 $\text{HNO}_3 - \text{HClO}_4$ 混酸作为消解体系来处理风湿类中药木防己,通过火焰原子吸收光谱法测定其中 K、Na、Ca、Fe、Zn、Cu、Sr、Mn 等 8 种金属元素的含量。结果表明:木防己中含有较高量的 K、Na、Ca、Fe、Zn 元素,回收率均在 95.50% ~ 102.8% 之间,且测定的相对标准偏差(RSD)均小于 2%,所得数据可为药材木防己的深入研究和开发提供新的科学依据。

关键词:木防己;消解体系;原子吸收光谱法;金属元素

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)07-0314-03

目前,金属元素在人体内的作用已经被越来越多的人所认识,因为它们对生命有着重要的意义,因而引起了医学界和营养学家的高度重视^[1]。人们已经注意到中草药的药性与其金属元素含量相关^[2],并且在对中草药治病机理的研究中发现,金属元素的协同作用同样是不容忽视的^[3]。木防己 [*Cocculus trilobus* (Thunb.) DC.] 是我国常用的中药,其适宜的生长温度为 15 ~ 25 °C,木防己耐旱喜阴,多生于山坡、低地、丘陵地及路旁,主要分布在河北、河南、陕西、山东、江苏、浙江、安徽、江西、湖北、四川、贵州、广东及福建等地。木防己的根含木防己碱(trilobine)、异木防己碱(isotrilobine, homotrilobine)、木兰花碱(mag-noflorine, 又名广玉兰碱)、木防己胺(trilobamine)、木防己宾碱(coclobine)、甲门尼萨任碱(meni-sarine)及去甲门尼萨任碱(normenisarine)等多种生物碱^[4],它们在中医上主要可用于行水利湿,消肿止痛^[5]。此

外,防己自古以来有汉防己和木防己之分,现代中医应用的经验是:汉防己偏于利湿走里,可利小便以消肿;木防己偏于祛风而走外,用于祛风湿以止痛^[6]。

在金属微量元素的测定方面,原子吸收光谱法用于元素分析已有几十年的历史,方法相对成熟,不但测定灵敏、准确^[7],而且选择性好、分析速度较快^[8]。然而采用这种方法测定金属元素含量时一般需要对样品进行消解预处理,而消解方式主要有湿法消解、干法消解及微波消解^[9]。湿法消解的实质是用强氧化性酸或强氧化剂的氧化作用来破坏有机试样^[10],使得测元素可以以溶液的形式存在^[11];干法消解是在高温下将样品进行灰化的试验方法,一般是先在电炉上加热样品使其充分碳化至无烟,再放入高温电阻炉中进行灰化 2 h;微波消解具有高效快速、试剂消耗量少、节约能源、降低分析人员的劳动强度等优点^[12]。对 3 种方法进行比较可以发现,微波消解法避免了其他方法的样品损失、易污染、耗时等缺点,但其成本较大,取样量较少;湿法消解和干法消解的操作简便且安全性较高,但干法消解样品的损失较大^[13]。

本研究采用湿法消解处理样品,用火焰原子吸收光谱法测定 3 个不同地域的木防己样品中金属元素的含量,以期为木防己中金属元素含量与木防己药用价值的研究提供一定的

进行全面的分析与控制。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:人民卫生出版社,2010:70-71.
- [2] 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):155-160.
- [3] 丰成相. 丹参的化学成分及药理作用概况[J]. 中国民族民间医药,2012,21(2):25-26.
- [4] 刘艾林,李络源,王一涛,等. 丹参药理学活性物质基础研究现状[J]. 中国药学杂志,2007,42(9):642-646.
- [5] 赵艳威,杨 宣,谢文利,等. 丹参素及原儿茶醛研究进展[J]. 武警医学院学报,2009,18(3):260-262.

收稿日期:2013-01-06

基金项目:陕西理工学院大学生创新实验基金(编号:UIRP12013);

陕西理工学院重点资助基金(编号:SLGKY10-05)。

作者简介:薛春苗(1991—),女,陕西宝鸡人,研究方向为应用化学。

通信作者:熊海涛,男,陕西洋县人,硕士,主要从事光谱分析工作。

E-mail:xiongtht@snut.edu.cn.

个成分间均得到良好的分离。

本研究方法是 2010 版《中华人民共和国药典》中丹参药材含量测定项下的一个改进,不但可以测定丹酚酸 B 和丹参酮 II A 含量,也可以同时测定丹参素、原儿茶醛、隐丹参酮、丹参酮 I 的含量。在样品的前处理上,优选超声振荡提取的方式,优于加热回流提取的方法,使得操作简便易行,提取率高。在提取溶剂的选择上,由于 6 种活性成分在水和甲醇中的溶解度相差悬殊,丹参素、原儿茶醛易溶于热水,丹酚酸 B 易溶于 75% 甲醇,丹参酮类易溶于 100% 甲醇,故选择了 80 °C 水、75% 甲醇、无水甲醇分别进行提取,以保证有效成分提取完全。通过对不同产地药材的测定结果发现,不同产地之间,其 6 个活性成分含量相差较大,而且多酚类化合物和丹参酮类化合物之间也无相关性,故在临床用药时,要对药材