

- 培养大鼠肝细胞的保护作用[J]. 浙江大学学报(医学版), 2007, 36(3):247-254.
- [13] 米宝丽, 李可强, 张振秋, 等. 炎立消制剂多指标成分的含量测定[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(3):504-507.
- [14] 刘志军, 戚进, 余伯阳, 等. 头花蓼化学成分及抗氧化活性研究[J]. 中药材, 2008, 31(7):995-998.
- [15] 王勤, 张永玲, 侯铁军, 等. 高效液相色谱法测定急支糖浆中原儿茶酸的含量[J]. 中国现代应用药学杂志, 2007, 24(5):406-408.

HPLC法同时测定滇产紫丹参中6种成分

朱艳琴¹, 殷勤红², 王文辉¹, 杨俊¹, 杨朝芬¹

(1. 昆明理工大学分析测试研究中心, 云南昆明650093; 2. 昆明积大制药有限公司, 云南昆明650106)

摘要:目的 采用HPLC同时测定滇产紫丹参中丹参素钠、原儿茶醛、咖啡酸、隐丹参酮、丹参酮I和丹参酮II_A。方法采用Hypersil ODS色谱柱(4.6 mm×250 mm 5 μm), 乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相, 梯度洗脱, 体积流量:1.0 mL/min; 检测波长:280 nm。结果 本方法各主要成分色谱峰之间有良好的分离度, 6个成分的浓度和各自峰面积之间有着良好的线性关系, 加样回收率的RSD均小于3.0%。结论 该方法简便、快速, 结果准确, 可用于紫丹参的质量控制。

关键词:紫丹参; HPLC; 丹参素钠; 原儿茶醛; 咖啡酸; 隐丹参酮; 丹参酮I; 丹参酮II_A

中图分类号:R284.1

文献标志码:A

文章编号:1001-1528(2011)04-0648-03

Determination of six components in *Salvia yunnanensis* Roots by HPLC

ZHU Yan-qin¹, YIN Qin-hong², WANG Wen-hui¹, YANG Jun¹, YANG Chao-fen¹

(1. Research Center for Analysis and Measurement, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650093, China; 2. Kunming Jida Pharmaceutical Co., Ltd, Kunming 650106, China)

ABSTRACT: **AIM** To develop an HPLC method for determining sodium danshensu, protocatechuicaldehyde, caffeic acid, cryptotanshinone, tanshinone I and tanshinone II_A simultaneously in *Salvia yunnanensis* Roots. **METHODS** The column was Hypersil ODS (4.6 mm×250 mm 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile (A) - water (containing 0.1% phosphoric acid) (B) in the gradient mode. The flow-rate was 1.0 mL/min. The detecting wave length was set at 280 nm. **RESULTS** The relationship between the concentration and the peak areas of the six compounds was all linear. The RSD of recovery were all less than 3.0%. **CONCLUSION** The method is simple, rapid and accurate and reproducible, and could be used for the quality control of *Salvia yunnanensis* C. H. Wright.

KEY WORDS: *Salvia yunnanensis* Roots; HPLC; sodium danshensu; protocatechuicaldehyde; caffeic acid; cryptotanshinone; tanshinone I; tanshinone II_A

紫丹参^[1]为唇形科植物云南鼠尾草 *Salvia yunnanensis* C. H. Wright 的干燥根, 该品是云南长期做丹参要用的品种之一, 因其根较《中华人民共和国药典》记载的唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 主要产销云南, 故又称为小紫丹参、小丹参、滇紫丹参和滇丹参。紫丹参主要分布于云南东部、中

部和西北部, 其药理活性与丹参类似, 具有较强的治疗心血管系统疾病的作用^[2-9]。紫丹参活性成分可以分为脂溶性的丹参酮类和水溶性的丹酚酸类, 丹参素钠、原儿茶醛、咖啡酸为水溶性丹酚酸类的主要成分, 隐丹参酮、丹参酮I和丹参酮II_A为脂溶性的丹参酮类的主要组成。相关文献已报道紫丹参和丹

收稿日期:2010-05-07

基金项目:昆明理工大学分析测试研究中心主任基金(2008-07)

作者简介:朱艳琴(1977-), 女, 工程师, 硕士, 从事天然产物分析。Tel:(0871)5119674, E-mail:zyq23788@sohu.com

参的某些成分的测定方法,但指标成分多为脂溶性的丹参酮类或水溶性的丹酚酸类^[10-13]。本试验采用梯度洗脱,同时测定紫丹参中3种脂溶性和3种水溶性的活性成分,以便更全面的控制其质量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪(DGU-20AS 在线脱气机,SPD-20A 紫外检测器,SIL-20AC 自动进样器,CTO-20AC 柱温箱,LC Solution 色谱工作站);SB3200 型超声波清洗器(上海必能信超声有限公司);BP211D 电子天平(德国 Sartorius 公司)。

1.2 试剂 丹参素钠(110855-200506)、原儿茶醛(110810-200205)、咖啡酸(110885-200102)、隐丹参酮(110852-200305)、丹参酮 I (110867-200406)和丹参酮 II_A (110766-200417)对照品购自中国药品生物制品检定所;乙腈为色谱纯;磷酸为分析纯;水为重蒸水。

1.3 药材 紫丹参药材于2008年10月采于云南省各地州,经云南大学中草药生物资源研究所云百

草实验室虞泓教授鉴定为唇形科植物云南鼠尾草 *Salvia yunnanensis* C. H. Wright。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Hypersil ODS 柱(4.6 mm × 250 mm 5 μm);流动相采用乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B) 梯度洗脱(0~5 min A:10%;5~10 min A:10%~12%;10~12 min A:12%~15%;12~20 min A:15%~40%;20~50 min A:40%~90%);体积流量为1.0 mL/min;检测波长为280 nm。

2.2 对照品溶液 分别精密称取丹参素钠、原儿茶醛、咖啡酸、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II_A 对照品适量,加甲醇制成浓度为14.7、0.294、1.66、7.95、64.20 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液 取本品,粉碎(过4号筛),精密称定2 g,置具塞锥形瓶中,精密加入70%乙醇溶液100 mL,称定质量,于100℃水浴上加热回流60 min,放冷,用70%乙醇溶液补足减失的质量,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即为供试品溶液。

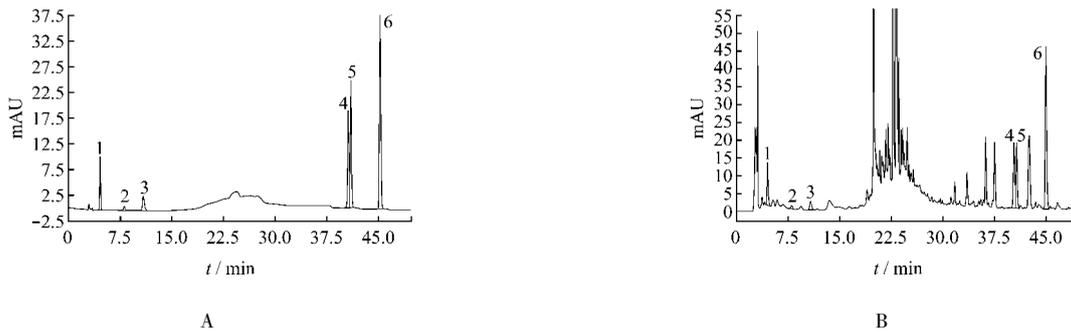


图1 对照品(A)和文山样品(B)的HPLC色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of reference(A) and sample in Wenshan(B)

1. 丹参素钠 2. 原儿茶醛 3. 咖啡酸 4. 隐丹参酮 5. 丹参酮 I 6. 丹参酮 II_A

1. sodium danshensu 2. protocatechuicaldehyde 3. caffeic acid 4. cryptotanshinone 5. tanshinone I 6. tanshinone II_A

2.4 线性关系考察 精密量取对照品溶液2、5、10、20、50 μL 分别进样,按照2.1项下的色谱条件测定。以对照品进样量(μg)为横坐标,色谱峰面积为纵坐标绘制标准曲线,求得丹参素钠、原儿茶醛、咖啡酸、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II_A 的回归方程分别为: $Y = 4.73 \times 10^5 X + 2.96 \times 10^2$ ($r = 0.9998$); $Y = 3.78 \times 10^6 X + 2.11 \times 10^2$ ($r = 0.9996$); $Y = 2.97 \times 10^6 X + 1.07 \times 10^3$ ($r = 0.9995$); $Y = 2.57 \times 10^6 X + 2.83 \times 10^4$ ($r = 0.9999$); $Y = 4.75 \times 10^5 X + 4.25 \times 10^3$ ($r = 0.9999$); $Y = 2.50 \times 10^6 X + 2.05 \times 10^3$ ($r = 0.9999$)。结果表明丹参素钠、原儿茶醛、咖啡酸、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II_A 分别为在 $2.94 \times 10^{-2} \sim 7.35 \times 10^{-1}$ μg、 $5.88 \times 10^{-4} \sim 1.47 \times 10^{-2}$

μg、 $3.32 \times 10^{-3} \sim 8.3 \times 10^{-2}$ μg、 $1.59 \times 10^{-2} \sim 3.98 \times 10^{-1}$ μg、 $1.28 \times 10^{-1} \sim 3.2$ μg、 $4.0 \times 10^{-2} \sim 1.0$ μg 范围内,线形关系良好。

2.5 精密度试验 分别吸取对照品溶液10 μL,连续进样5次,测定峰面积值,RSD 分别为:丹参素钠0.86%、原儿茶醛0.81%、咖啡酸0.73%、隐丹参酮0.58%、丹参酮 I 0.77%、丹参酮 II_A 0.57%。结果表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性实验 取供试品溶液,照上述色谱条件,分别于0、4、8、12 h 测定峰面积值,RSD 分别为:丹参素钠1.33%、原儿茶醛1.39%、咖啡酸0.47%、隐丹参酮0.32%、丹参酮 I 1.42%、丹参酮 II_A 1.06%。结果表明供试品溶液在12 h 内稳定。

2.7 重复性实验 取文山产紫丹参粉末按2.3项

下操作,平行制备5份样品,照上述色谱条件,分别测定6种成分,RSD分别为:丹参素钠1.22%、原儿茶醛1.45%、咖啡酸0.41%、隐丹参酮0.99%、丹参酮I 1.77%、丹参酮II_A 0.96%。

2.8 加样回收率实验 精密称取2.7项中已测含量的紫丹参样品6份,每份各1.0g,分别加入0.212 mg/mL丹参素钠、0.004 6 mg/mL原儿茶醛、0.012 6 mg/mL咖啡酸、0.088 mg/mL隐丹参酮、0.498 mg/mL丹参酮I和0.224 mg/mL丹参酮II_A的对照品溶液各5 mL,按2.3项下方法操作并进行表1

样品测定结果

Tab. 1

Determination results of samples

产地	丹参素钠/(mg/g)	原儿茶醛/(mg/g)	咖啡酸/(mg/g)	隐丹参酮/(mg/g)	丹参酮I/(mg/g)	丹参酮II _A /(mg/g)
视山	0.451	0.012	0.052	0.517	3.600	2.407
大理	0.363	0.031	0.160	0.247	1.447	2.381
瑞丽	0.787	0.018	0.124	0.278	1.167	1.934
红河	0.556	0.034	0.133	0.378	2.256	1.059
文山	0.978	0.021	0.063	0.425	2.525	1.130

3 讨论

3.1 参阅相关文献,丹参素钠、原儿茶醛、咖啡酸、隐丹参酮、丹参酮I和丹参酮II_A的最大吸收波长分别为280、280、323、273、244、270 nm,以上成分在280 nm波长处均有较强吸收,所以选择280 nm为检测波长。

3.2 实验中参考中国药典2010版一部中丹参的流动相,选择乙腈-水为溶剂系统;考虑到各峰的峰形需在水相中加入一定量的磷酸,可使各峰得到较好分离且峰形尖锐,因此选用乙腈和0.1%磷酸的梯度洗脱。

3.3 样品处理过程中,曾比较了以50%乙醇、70%乙醇、95%乙醇为溶剂,超声波和水浴回流处理,处理时间分别为30、60、90 min,结果表明以70%乙醇为溶剂,水浴回流处理样品60 min,6种成分提取较完全,且操作方法简便,步骤少。

3.4 本研究对不同滇产紫丹参药材进行定量测定,结果表明供试品中这6种成分的质量分数存在较大差别。HPLC测定紫丹参中丹参素钠、原儿茶醛、咖啡酸、隐丹参酮、丹参酮I和丹参酮II_A,操作简便,测定结果准确,重复性好,可有效地控制紫丹参的质量。

参考文献:

[1] 中国科学院昆明植物研究所. 云南植物志第一卷[M]. 北京: 科学出版社, 1977: 656-689.

测定,计算得出丹参素钠、原儿茶醛、咖啡酸、隐丹参酮、丹参酮I和丹参酮II_A的平均回收率分别为99.4%、98.4%、99.1%、98.6%、99.7%、100.4%;RSD分别为1.9%、2.5%、0.9%、2.7%、2.0%、1.1%。结果表明该测定方法测定结果较准确。

2.9 样品测定 按2.3项下方法将5份滇产紫丹参药材制成供试品溶液,按上述色谱条件注入液相色谱仪,测定峰面积值,用外标法计算样品的质量分数,结果见表1。

[2] 罗庆祯,李建美. 滇丹参对冠心病的防治作用[J]. 临床误诊误治, 2007, 20(5): 23-24.

[3] 刘晓丹,刘文达,刘培庆,等. 丹参酮II_A对白血病K562细胞的体外诱导凋亡作用研究[J]. 中草药, 2010, 41(10): 1663-1666.

[4] 周静,谭宇蕙,李杰芬,等. 丹参酮II_A对大鼠肝癌细胞CBRH7919的抑制及凋亡诱导作用[J]. 中药材, 2010, 33(6): 961-963.

[5] 张小方,云鹰. 丹参注射液对抗Thy-1系膜增生性肾炎模型大鼠TNF-α、IV-C水平的影响[J]. 中成药, 2009, 31(10): 1512-1514.

[6] 何治,潘志红,鲁文红,等. 丹参酮II_A对血管性痴呆大鼠的神经保护作用机制[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(14): 1883-1886.

[7] 徐克雷. 丹参酮II_A注射液对冠心病患者甲状腺激素水平的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(14): 1239-1240.

[8] 丘晋洪. 丹参治疗重症急性胰腺炎的疗效探讨[J]. 中国现代药物应用, 2010, 4(20): 2-3.

[9] 吴迎波,孙海军,严敏,等. 丹参注射液对同种异体肌腱移植后粘连防治的实验研究[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(18): 3456-3459.

[10] 严玉平,同利琪,郭聪,等. 复方丹参片指纹图谱及含量测定研究[J]. 中成药, 2009, 31(8): 1149-1151.

[11] 黄超,陈科力. 滇丹参及丹参中脂溶性成分含量的对比研究[J]. 中药材, 2007, 30(9): 1088-1091.

[12] 张庆萍,陈贵生. 高效液相色谱法测定滇丹参中原儿茶醛和丹参素的含量[J]. 湖北中医学院学报, 2007, 9(2): 43.

[13] 唐旭利,刘静,李国强,等. 丹参药材水溶性成分HPLC化学指纹图谱研究[J]. 中成药, 2008, 30(3): 313-317.