

UPLC法测定丹参中 5种脂溶性成分的含量

武为宝, 唐军

(安徽省六安市药品检验所, 六安 237006)

摘要 目的: 建立同时测定丹参中二氢丹参酮I、降鼠尾草氧化物、隐丹参酮、丹参酮I、丹参酮II_A 5种脂溶性成分的超高效液相色谱 (UPLC) 分析方法。方法: 采用 Waters Acquity UPLC系统, Acquity UPLC BEH C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-水, 以流速为 0.5 mL·min⁻¹ 进行梯度洗脱; 柱温: 35℃; 样品经甲醇超声提取后, 用 UPLC-PDA 进行分析检测, 检测波长为 280 nm。结果: 二氢丹参酮I、降鼠尾草氧化物、隐丹参酮、丹参酮I、丹参酮II_A 5种被测成分在线性范围内均具有良好的线性关系 ($r \geq 0.9997$); 平均回收率在 98.5% ~ 103.1% 之间, RSD ≤ 4.2%。结论: UPLC 分离效果及重复性好, 且快速、简便, 可作为丹参的质量控制方法。

关键词: 超高效液相色谱; 丹参; 质量控制

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)05-0827-03

UPLC simultaneous determination of 5 lipophilic components in *Salvia miltiorrhiza* Bge

WU Wei-bao, TANG Jun

(Lian Institute for Drug Control, Lian 237006, China)

Abstract Objective To establish a ultra performance liquid chromatography (UPLC) method for simultaneous determination of 5 lipophilic components in *Salvia miltiorrhiza*. **Methods** The analyses were performed on a Waters Acquity UPLC system, equipped with a binary solvent manager, a sampler manager, a column compartment and a PDA detector, connected to Waters Empower 2 software. An Acquity UPLC BEH C₁₈ column (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) was used for all analyses. The investigated compounds were separated with gradient mobile phase consisting of water and acetonitrile. The temperature of sample manager was set at 35℃, and the injection volume was 2 μL. Peaks were detected at 280 nm. **Result** The investigated compounds including dihydrotanshinone I, przewalskian, cryptotanshinone, tanshinone I, tanshinone II_A had good linearity ($r \geq 0.9997$) over the tested ranges. The average recovery was 98.5% to 103.1% with RSD ≤ 4.2%. **Conclusion** The developed UPLC method is simple, sensitive and accurate with good repeatability, which is available for quality control of *Salvia miltiorrhiza*.

Key words ultra performance liquid chromatography (UPLC); *Salvia miltiorrhiza*; quality control

丹参是唇形科植物丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bge.) 的干燥根及根茎^[1], 是常用中药之一, 对心血管疾病具有明显的治疗作用^[2,3]。脂溶性成分是丹参的一类代表性成分, 具有多方面的药理作用, 可以抗血小板聚集, 抗血栓形成, 对心肌缺血和再灌注损伤等有保护作用^[4], 也是丹参质量控制的重要指标性成分。本文建立了丹参中 5 种脂溶性成分的超高效液相色谱 (UPLC) 分析方法, 旨在为丹参质量控制提供参考方法。

1 仪器与试剂

Waters Acquity UPLC 超高效液相色谱仪 (Waters, Milford, MA), 包括二元梯度泵、恒温自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器以及 Waters Empower 2 软件; BRANSON 8510E-DTH 超声仪 (美国 BRANSON 公司); 0.2 μm 滤膜 (Whatman, Maidstone, U.K.)。

对照品二氢丹参酮 I (dihydrotanshinone I) 购自 IL 公司, 丹参酮 I (tanshinone I)、隐丹参酮

(cryptotanshinone)和丹参酮Ⅱ_A (tanshinoneⅡ_A)购自中国药品生物制品检定所, 降鼠尾草氧化物 (przewalskin)由澳门大学中药医药研究院提供 (经 HPLC 分析纯度均在 98% 以上)。乙腈和甲醇购自德国 Merck 公司 (色谱纯), 水为 Milli-Q 水。丹参采自安徽六安, 经澳门大学李绍平博士鉴定为唇形科植物丹参 *Sabvia miltiorrhiza* Bge。

2 溶液制备

2.1 对照品混合储备液 分别精密称取对照品二氢丹参酮Ⅰ、降鼠尾草氧化物、隐丹参酮、丹参酮Ⅰ、丹参酮Ⅱ_A适量于 2 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 制成每 1 mL 含二氢丹参酮Ⅰ 6.88 μg 降鼠尾草氧化物 110.77 μg 隐丹参酮 97.69 μg 丹参酮Ⅰ 9.65 μg 丹参酮Ⅱ_A 36.92 μg 的混合溶液, 存放于 4℃ 冰箱供 UPLC 分析用。

2.2 供试品溶液 分别取丹参药材样品细粉 (过 60 目筛)约 0.5 g 精密称定, 置具塞试管中, 分别精确加入甲醇 25 mL, 称定重量, 超声提取 (100 W, 40 kHz) 45 min 称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 静置 10 min, 上清液过 0.2 μm 滤膜, 取续滤液, 即得供试品溶液, 存放于 4℃ 冰箱供 UPLC 分析用。

3 色谱条件

色谱柱: Acquity UPLC BEH C₁₈ column (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: 乙腈 (A) - 水 (B), 经 0.2 μm 滤膜过滤并超声脱气, 梯度洗脱 (0 ~ 0.5 min, 95% → 90% B; 0.5 ~ 6.0 min, 90% → 77% B; 6.0 ~ 7.8 min, 77% → 70% B; 7.8 ~ 9.0 min, 70% → 58% B; 9.0 ~ 11.5 min, 58% → 55% B; 11.5 ~ 14.5 min, 55% → 44% B; 14.5 ~ 17.5 min, 44% → 15% B); 流速: 0.5 mL · min⁻¹; 检测波长: 280 nm; 柱温: 35℃。在该色谱条件下, 各成分得到良好的分离, 见图 1。

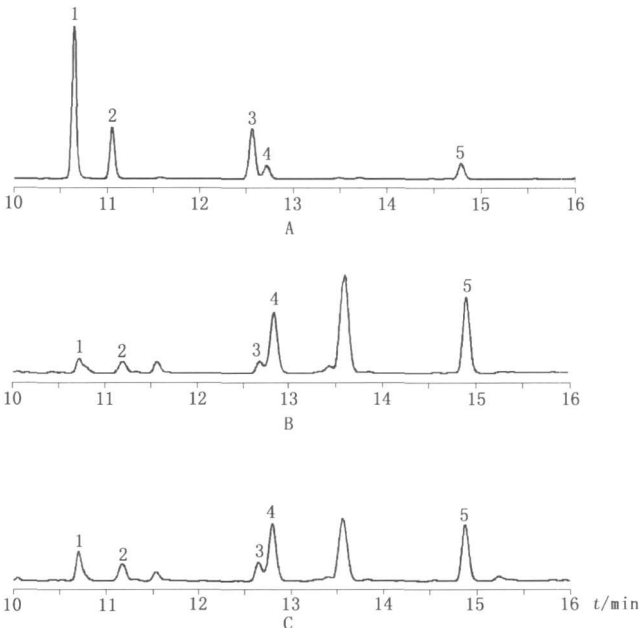


图 1 对照品 (A)、丹参根 (B)、丹参根茎 (C) 的 UPLC 图
Fig 1 UPLC chromatograms of mixed reference standards (A), roots (B) and radix (C) of *S. miltiorrhiza*

1. 二氢丹参酮Ⅰ (dihydrotanshinone) 2 降鼠尾草氧化物 (przewalskin) 3 隐丹参酮 (cryptotanshinone) 4 丹参酮Ⅰ (tanshinone) 5. 丹参酮Ⅱ_A (tanshinoneⅡ_A)

4 方法学考察

4.1 线性关系、检测限 (LOD) 及定量限 (LOQ)

精密吸取按“2.1”项下方法制成的二氢丹参酮Ⅰ、降鼠尾草氧化物、隐丹参酮、丹参酮Ⅰ、丹参酮Ⅱ_A 5 个成分的对照品混合储备液, 用倍比稀释的方法以甲醇制成 5 个浓度点的系列对照品混合溶液, 在上述色谱条件下, 分别进样 2 μL, 每个浓度进 3 针, 测量峰面积值。以对照品峰面积平均值 Y 与对照品浓度 X (μg · mL⁻¹) 进行线性回归, 结果见表 1。将混合对照品溶液用甲醇不断进行稀释后作 UPLC 分析, 得到 5 个成分的 LOD 值 (S/N = 3) 和 LOQ 值 (S/N = 10), 结果见表 1。

表 1 5 个成分的线性回归方程及 LOD、LOQ 测定结果

Tab 1 The linear regression equation, LOD and LOQ data for 5 compounds

化合物 (components)	回归方程 (regression equation)	线性范围 (linear range) / μg · mL ⁻¹	r	LOD / μg · mL ⁻¹	LOQ / μg · mL ⁻¹
二氢丹参酮Ⅰ (dihydrotanshinone)	Y = 6.781 × 10 ³ X - 461.4	0.22 ~ 6.88	0.9999	0.05	0.18
降鼠尾草氧化物 (przewalskin)	Y = 1.914 × 10 ³ X + 1.353 × 10 ³	0.43 ~ 110.77	0.9998	0.04	0.07
隐丹参酮 (cryptotanshinone)	Y = 6.585 × 10 ³ X + 1.728 × 10 ³	0.38 ~ 97.69	0.9999	0.03	0.09
丹参酮Ⅰ (tanshinone)	Y = 2.051 × 10 ⁴ X + 624.8	0.15 ~ 9.65	0.9998	0.01	0.06
丹参酮Ⅱ _A (tanshinoneⅡ _A)	Y = 7.385 × 10 ³ X - 1.191 × 10 ³	0.15 ~ 36.92	0.9997	0.01	0.04

4.2 精密度 取“4.1”项下各对照品线性范围中间浓度点的对照品混合溶液, 进样 2 μL, 连续进样 6 次; 或每天进样 2 次, 连续 3 d 分别记录各峰面

积, 计算各峰 RSD。结果: 5 种成分的日内和日间变异分别不大于 3.2% 和 4.2%, 表明精密度良好。

4.3 重复性 取丹参根样品 0.4 g、0.5 g、0.6 g 各

3份,按照“2.2”项下方法制备低、中、高3个浓度的供试品溶液,各进样2 μL ,按上述色谱条件分析。样品中二氢丹参酮I、降鼠尾草氧化物、隐丹参酮、丹参酮I、丹参酮II_A低浓度的RSD值分别为0.63%, 2.7%, 2.3%, 1.3%, 2.2%;中浓度的RSD值分别1.2%, 0.34%, 2.1%, 2.1%, 1.7%;高浓度的RSD值分别0.32%, 1.5%, 0.77%, 2.7%, 3.0%。结果表明方法具有良好的重复性。

4.4 加样回收率 精密称取已测知含量的丹参根样品0.25 g共9份,分别加入一定量(高、中、低3个浓度)的5个化合物的对照品,按照“2.2”项下方法制备供试溶液,进样2 μL ,按上述色谱条件测定,分别计算回收率。其平均回收率及RSD值见表2。

表2 5个化合物的加样回收率结果($n=3$)

Tab 2 The recovery of 5 investigated compounds

化合物 (components)	原始量 (original) / μg	加入量 (spiked) / μg	回收率 (recovery) %	RSD %
二氢丹参酮I (dihydroshanshionol)	35.5	545.5	100.0	3.1
	35.5	656.5	100.0	1.4
	35.5	753.5	100.1	1.7
降鼠尾草氧化物 (peroxyshanshionol)	168.4	554.6	98.5	4.2
	168.4	694.6	98.7	1.5
	168.4	833.7	103.1	2.5
隐丹参酮 (cryptoshanshionone)	95.9	114.1	99.6	1.4
	95.9	163.1	99.8	1.1
	95.9	184.1	100.0	0.72
丹参酮I (shanshionol)	19.8	180.2	100.2	1.7
	19.8	271.2	100.0	1.8
	19.8	306.2	100.1	3.1
丹参酮II _A (shanshionol II _A)	216.1	183.9	99.9	0.39
	216.1	264.9	99.8	1.2
	216.1	303.9	99.9	0.54

4.5 稳定性 取“4.1”项下对照品混合溶液,于0, 1, 2, 5, 10, 20 h分别进样2 μL ,按上述色谱条件分析,二氢丹参酮I、降鼠尾草氧化物、隐丹参酮、丹参酮I、丹参酮II_A峰面积的RSD值分别为4.2%,

2.7%, 4.7%, 3.1%, 3.0%。结果表明,对照品混合溶液中5个化合物在20 h内稳定。

5 样品测定

按“2.2”项下方法制备供试品溶液,各进样2 μL ,按本文所述的色谱条件对丹参药材样品根及根茎的二氢丹参酮I、降鼠尾草氧化物、隐丹参酮、丹参酮I、丹参酮II_A进行含量测定,结果:根及根茎中二氢丹参酮、降鼠尾草氧化物、隐丹参酮、丹参酮I、丹参酮II_A的含量分别依次是0.273, 0.675, 0.177, 0.328, 1.138 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 和0.514, 1.257, 0.328, 0.336, 0.937 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

6 讨论

6.1 本文建立了UPLC同时测定丹参中5种脂溶性成分的方法,与HPLC^[5]比较,分析时间短,分离效率高,重复性好,准确简便。

6.2 丹参中所含成分主要为水溶性及脂溶性两类,其中脂溶性成分主要是丹参酮类化合物,具有抑菌、抑制血小板聚集、改善冠状动脉供血等药理作用。从测定结果可以看出,安徽丹参的根及根茎中同时含有测定的5种成分,且含量相近。

参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2005. Vol I (一部): 52
- 2 CHENG TQ. Cardiovascular effects of Danshen. *Int J Cardiol* 2007; 121(1): 9
- 3 LIU Ai-lin(刘艾林), LIM ing-yuan(李铭源), WANG Yi-tao(王一涛), et al. Research progress on active principles from *Salvia miltiorrhiza* (丹参药理学活性物质基础研究现状). *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2007; 42(9): 641
- 4 DENG Cui-e(邓翠娥). Pharmacological effects and progress of clinical application(丹参的药理作用与临床研究进展). *Lishichen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2003; 14(12): 776
- 5 CHEN Lei(陈蕾), ZHU Ji-hong(朱霁虹). Determination of four fat soluble ingredients in *Radix Salviae miltiorrhiza* (丹参中四种脂溶性成分的含量测定). *Chin Pharm Aff* (中国药事), 2004; 18(12): 947

(本文于2008年8月27日收到)