

取物中未检测出水溶性成分丹参素、原儿茶醛, 两者存在于丹参的 SFE 残渣中, 结果见表 5。可见丹参 SFE 残渣中的丹参素、原儿茶醛较丹参药材中的浓度高, 其原因有待于进一步研究。

表 4  $L_9(3^4)$  正交试验结果Table 4 Results of  $L_9(3^4)$  orthogonal test

| 试验号        | A       | B       | C       | 丹参素/<br>( $g \cdot 100 g^{-1}$ ) | 原儿茶醛/<br>( $g \cdot 100 g^{-1}$ ) |
|------------|---------|---------|---------|----------------------------------|-----------------------------------|
| 1          | 1       | 1       | 1       | 0.460 9                          | 0.028 1                           |
| 2          | 1       | 2       | 2       | 0.559 7                          | 0.039 1                           |
| 3          | 1       | 3       | 3       | 0.496 2                          | 0.029 4                           |
| 4          | 2       | 1       | 2       | 0.596 5                          | 0.043 7                           |
| 5          | 2       | 2       | 3       | 0.671 0                          | 0.058 3                           |
| 6          | 2       | 3       | 1       | 0.514 5                          | 0.046 4                           |
| 7          | 3       | 1       | 3       | 0.877 1                          | 0.099 6                           |
| 8          | 3       | 2       | 1       | 0.686 1                          | 0.063 8                           |
| 9          | 3       | 3       | 2       | 0.841 4                          | 0.083 7                           |
| 丹参素 $K_1$  | 0.505 6 | 0.644 8 | 0.553 8 |                                  |                                   |
| $K_2$      | 0.594 0 | 0.638 9 | 0.665 9 |                                  |                                   |
| $K_3$      | 0.801 5 | 0.617 4 | 0.681 4 |                                  |                                   |
| R          | 0.295 9 | 0.027 4 | 0.127 6 |                                  |                                   |
| 原儿茶醛 $K_1$ | 0.032 2 | 0.057 1 | 0.046 0 |                                  |                                   |
| $K_2$      | 0.049 5 | 0.053 6 | 0.055 5 |                                  |                                   |
| $K_3$      | 0.082 3 | 0.053 2 | 0.062 4 |                                  |                                   |
| R          | 0.050 1 | 0.003 9 | 0.016 4 |                                  |                                   |

表 5 丹参的有效成分的测定 ( $n=3$ )Table 5 Effective components in *S. miltorrhiza* ( $n=3$ )

| 样 品          | 质量分数/%              |         |         |
|--------------|---------------------|---------|---------|
|              | 丹参酮 II <sub>A</sub> | 丹参素     | 原儿茶醛    |
| 丹参药材         | 0.298 4             | 0.560 0 | 0.072 8 |
| 丹参 SFE 提取物   | 0.235 0             | 未检出     | 未检出     |
| 丹参 SFE 残渣提取物 | 0.070 0             | 0.893 2 | 0.092 0 |

将丹参按上述试验条件进行超临界萃取, 将其 SFE 残渣再按上述试验条件进行水煎煮提取, 之后所得残渣于 50~60 °C 烘干, 称取烘干物适量, 照前述丹参酮 II<sub>A</sub>、丹参素、原儿茶醛的测定方法测定各有效成分的残留量, 结果 SFE 残渣水煎后残渣中残留各成分分别为丹参酮 II<sub>A</sub> 0.003 1%, 丹参素 2.907%, 原儿茶醛 7.936%。可见经上述提取工艺后, 丹参中大于 99% 的丹参酮 II<sub>A</sub>、大于 97% 的丹参素、92.064% 原儿茶醛已被提出。

#### 4 讨论

本试验提取丹参中有效成分的最佳工艺是: 首先, 利用 SFE 技术提取脂溶性成分如: 丹参酮 II<sub>A</sub> 等, 其提取条件是: 精密称取样品粉末(过 60 目筛) 300 g, 放入 SFE 萃取罐中, 用 35% 乙醇, 于 55 °C 温度、30 MPa 压力下萃取 2.5 h, 收集萃取液, 滤过, 浓缩, 浓缩后所得物再经真空干燥, 即得萃取物; 再利用传统的水煎法提取丹参 SFE 残渣中的水溶性成分如: 丹参素、原儿茶醛等, 其提取条件是: 以残渣 8 倍量的水煎煮 3 次, 每次 1.5 h。

丹参 SFE 残渣中的丹参素、原儿茶醛较丹参药材中的浓度高, 其原因有待于进一步研究。

#### References:

- [1] King JW. Fundamentals and applications of supercritical fluid extraction in chromatographic science [J]. *J Chromatogr Sci*, 1989, 27(7): 355.
- [2] Yuan HM, Dleak SV. Supercritical fluid and enhanced-flu-  
idity liquid extraction of phenolics from viver sediment [J]. *J Chromatogr*, 1997, 764: 265.

## 西红花及注射用西红花苷的 HPLC 指纹图谱研究

郁 健<sup>1</sup>, 杜春波<sup>2</sup>, 周素娣<sup>3\*</sup>

(1. 中国药科大学 分析化学教研室, 江苏 南京 210038; 2. 中国药科大学制药有限公司, 江苏 南京 210009;  
3. 中国药科大学 中药分析教研室, 江苏 南京 210038)

西红花为鸢尾科番红花属植物番红花 *Crocus sativus* L. 的干燥柱头, 西红花苷(crocin)为西红花药材的提取物, 经过加工制成注射用西红花苷(冻干)制剂, 具有活血化瘀、散郁开结, 用于中风病血瘀证(脑脉痹塞), 临床上用于脑梗死, 或局限性脑梗死(包括脑血栓、脑栓塞、脑动脉痉挛等)。

西红花的主要成分为类胡萝卜素、苦味质和

挥发油<sup>[1]</sup>。类胡萝卜素为西红花苷元(西红花酸 crocetin)与多种糖组成各种糖苷, 西红花苷分为西红花苷-1、2、3、4。目前有文献<sup>[2,3]</sup>报道采用 HPLC 和 TLC 法对西红花苷-1、2 的测定。作为中药注射剂, SFDA 规定必须进行指纹图谱的研究, 以便控制中药注射剂的质量。本实验建立 HPLC 法, 对西红花药材、西红花提取物及注射用西红花苷制剂进行指纹图

\* 收稿日期: 2004-03-13

作者简介: 郁 健(1959—), 男, 工程师, 江苏启东人, 主要从事药物分析工作, 研究领域包括中西药质量分析、药物体内分析研究等。  
Tel: (025) 85322635 E-mail: yujian5959@163.com

谱的研究, 追溯他们之间的相关性, 确定其相应的技术参数, 为注射用西红花苷制剂一致性提供保证, 同时为西红花药材的鉴别和质量检验提供新手段。

## 1 仪器和药品

Agilent 1100 系列高效液相色谱仪, Chem station 系统, 配有自动脱气和恒温装置。

甲醇为色谱纯, 水为重蒸馏水, 磷酸二氢铵为分析纯。西红花苷-1 (cr-1)、西红花苷-2 (cr-2)、西红花苷-3 (cr-3) 和西红花苷-4 (cr-4) 对照品, 自制, 纯度大于 98%。西红花药材为浙江产优质药材, 由中国药科大学周锦祥教授鉴定; 西红花提取物由中国药科大学中药分析教研室提取, 西红花总苷含量以西红花苷-1 计大于 80%; 注射用西红花苷(冻干)由中国药科大学研制。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Shimadzu Shim-Pack VP-ODS (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 柱温: 40 °C; 流动相: 甲醇-0.01 mol/L 磷酸二氢铵溶液(用磷酸调节 pH 4) (30 : 70), 40 min 线性改变至 75 : 25, 并维持 20 min。体积流量: 1 mL/min; 检测波长: 440 nm。

### 2.2 供试液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备: 取 cr-1、cr-2、cr-3 和 cr-4 对照品适量, 分别用甲醇溶解, 用甲醇-水溶液 (50 : 50) 制成 15 μg/mL 的对照溶液和相应的混合液。

2.2.2 西红花药材供试溶液的制备: 称取西红花干燥、粉碎的细粉约 30 mg, 置索氏提取器中, 加甲醇 70 mL, 加热回流至提取液至无色, 放冷, 取出, 用甲醇洗涤提取器, 合并提取液和洗涤液, 浓缩, 置 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度。取 5 mL 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇-水溶液 (50 : 50) 至刻度, 作为供试品溶液。

2.2.3 西红花提取物供试品溶液的制备: 取西红花提取物约 20 mg, 置 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀。取 5 mL 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇-水溶液 (50 : 50) 稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.4 注射用西红花苷供试品溶液的制备: 取注射用西红花苷内容物适量 (约含西红花提取物 20 mg), 置 25 mL 量瓶中, 用甲醇-水溶液 (50 : 50) 溶解并稀释至刻度, 摇匀。取 5 mL 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇-水溶液 (50 : 50) 稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 测定: 分别取上述各供试液 20 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图。cr-1、cr-2、cr-3 和 cr-4 对照品的保留时间分别为 18.3、21.6、31.1、25.6 min, 色谱图见图 1。典型的西红花药材、西红花提取物和注

射用西红花苷的 HPLC 图谱见图 2。

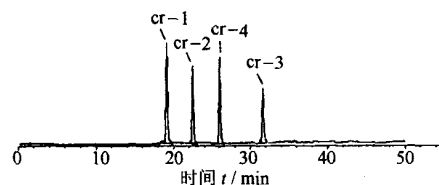


图 1 对照品混合液的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatogram of reference substance mixture

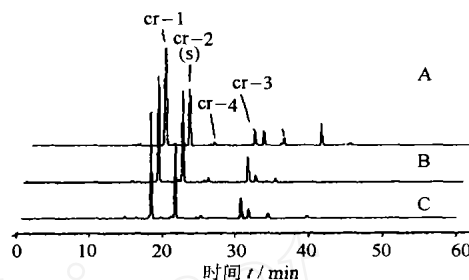


图 2 西红花药材(A)、提取物(B)和注射用西红花苷(C)的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC chromatogram of *C. sativus* (A), *C. sativus* extract (B), and crocin for injection (C)

### 2.4 方法学考察

2.4.1 精密度和稳定性试验: 取同一批号的提取物约 20 mg, 按上述西红花提取物供试品溶液的制备和测定操作, 连续进样 5 次, 并在 1、5、8、12 h 测定, 按国家药品监督管理局颁布的《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》有关规定, 以西红花苷-2 峰为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间和面积比, 相对保留时间的 RSD 均小于 0.5%, 单峰面积大于 5% 总峰面积的色谱峰的面积比 RSD 均小于 1%。精密度试验结果符合测定要求, 测定溶液在 12 h 内稳定。

2.4.2 重现性试验: 取同一批号的提取物 5 份, 按上述西红花提取物供试溶液的制备和测定操作, 按上述有关规定, 计算各共有峰相对保留时间和面积比。相对保留时间的 RSD 均小于 0.5%, 单峰面积大于 5% 总峰面积的色谱峰的面积比 RSD 均小于 1%。

2.5 指纹图谱及技术参数: 比较获得的 HPLC 图, 西红花药材、西红花提取物和注射用西红花苷供试品溶液指纹图谱中明显的共有峰有 7 个峰, 其中 cr-1、cr-2、cr-3 和 cr-4 的峰都可标定。指纹图谱中将 cr-2 为参照峰, 计算其余共有峰的相对保留时间和面积比。西红花药材、西红花提取物和注射用西红花苷供试品溶液指纹图谱共有峰的技术参数见表 1。

表 1 西红花药材、西红花提取物和注射用西红花苷的指纹图谱参数 (n= 10)

Table 1 Chromatographic fingerprint data of *C. sativus*, *C. sativus* extract, and crocin for injection (n= 10)

| 名称          | 峰号          | 相对保留时间<br>/min | RSD<br>/% | 峰面积比  | RSD<br>/% |
|-------------|-------------|----------------|-----------|-------|-----------|
| 西红花<br>药材   | 1 (cr-1)    | 0.846          | 0.36      | 1.953 | 5.93      |
|             | 2 (cr-2, S) | 1              |           | 1     |           |
|             | 3 (cr-4)    | 1.160          | 0.17      | 0.049 | 16.55     |
|             | 4 (cr-3)    | 1.411          | 0.29      | 0.274 | 13.87     |
|             | 5           | 1.468          | 0.32      | 0.292 | 16.69     |
|             | 6           | 1.595          | 0.41      | 0.155 | 12.11     |
|             | 7           | 1.825          | 0.43      | 0.578 | 35.96     |
| 西红花<br>提取物  | 1 (cr-1)    | 0.846          | 0.13      | 1.308 | 9.94      |
|             | 2 (cr-2, S) | 1              |           | 1     |           |
|             | 3 (cr-4)    | 1.161          | 0.11      | 0.049 | 3.98      |
|             | 4 (cr-3)    | 1.418          | 0.21      | 0.314 | 5.98      |
|             | 5           | 1.466          | 0.22      | 0.099 | 25.67     |
|             | 6           | 1.591          | 0.21      | 0.069 | 9.55      |
|             | 7           | 1.834          | 0.26      | 0.020 | 56.81     |
| 注射用<br>西红花苷 | 1 (cr-1)    | 0.849          | 0.23      | 1.465 | 10.02     |
|             | 2 (cr-2, S) | 1              |           | 1     |           |
|             | 3 (cr-4)    | 1.159          | 0.11      | 0.052 | 3.36      |
|             | 4 (cr-3)    | 1.405          | 0.16      | 0.252 | 29.01     |
|             | 5           | 1.462          | 0.14      | 0.067 | 43.88     |
|             | 6           | 1.587          | 0.13      | 0.029 | 47.21     |
|             | 7           | 1.816          | 0.12      | 0.033 | 44.72     |

### 3 讨论

西红花苷在甲醇中具有良好的溶解度,因此,西红花药材的提取溶剂和方法按照《中华人民共和国药典》2000 年版一部西红花鉴别项下 TLC 法进行,使用甲醇为提取溶剂,西红花提取物和注射用西红花苷的溶剂采用甲醇或甲醇-水溶液,并用甲醇-水 (50 : 50) 溶液稀释,以提高被测组份的溶解度和分离效率。

在 HPLC 方法建立过程中,采用甲醇-水 (50 : 50) 流动相体系进行试验,尽管 cr-1 峰和 cr-2 峰以适当的时间出峰,但造成其他成分保留时间相对较长,引起保留时间相对较长,峰扩展和保留时间偏差大。而采用具有一定 pH 值流动相并进行线性梯度分离的试验,各特征指纹峰保留时间适当、紧凑和稳定,精密度和重现性符合中药指纹图谱研究的要求。同时通过梯度过程中甲醇的比例达到 100% 观察,40 min 后无明显的色谱峰出现。

分别以甲醇-水 (50 : 50) 和甲醇-0.01 mol/L 磷酸二氢铵溶液 (用磷酸调节 pH 4) 不同比例 (甲醇起始比例 25%~45%, 终止比例 75%) 线性梯度为流动相,以提取物为供试品溶液进行试验,结果表明,采用梯度洗脱,保留时间适中,其中甲醇-0.01 mol/L 磷酸二氢铵溶液 (用磷酸调节 pH 4) (30 : 70), 40 min 线性改变至 75 : 25 的流动相为佳。在不同比例甲醇的流动相的试验中,以西红花苷-2 峰为参照峰,单峰面积大于 5% 总峰面积的色谱峰的面积比 RSD 均小于 2%,说明本系统的良好适用性。

西红花苷各对照品、西红花药材、西红花提取物的甲醇溶液的紫外-可见光谱最大吸收约在 443 nm 和 582 nm,而甲醇-水溶液的最大吸收约在 440 nm,图谱形态相似,考虑测定对象具有相同的西红花苷元,并且西红花提取物和制剂中的主要成分为西红花苷,因此本实验的检测波长为 440 nm。

为保证指纹图谱特征指纹峰相关参数的准确性,实验条件应该保持条件的一致性,本实验中采用了柱温控制和在线脱气系统。同时,色谱柱在测定前应该得到充分的平衡。

从指纹图谱看,西红花药材、西红花提取物和注射用西红花苷 3 者之间具有很好的相关性和追溯性,他们的最大特征峰为 cr-1、cr-2 和 cr-3,药材中 3 者平均占有总峰面积的 70%,药材中共有峰面积和占总峰面积的 90% 以上。西红花提取物和注射用西红花苷中 cr-1 峰、cr-2 峰和 cr-3 峰,3 者平均约占有总峰面积的 85%,西红花提取物和注射用西红花苷共有峰面积和占总峰面积的 95% 以上。这与提取物的提取和精制过程相符合。

### References

- [1] Xiao P G. *Newly compiled Record of Chinese Materia Medica* (新编中药志) [M]. Vol 2. Beijing: Chemical Industry Press, 2002.
- [2] Pfander H, Rychener M. Separation of crocetin glycosyl esters by high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr*, 1982, 234: 443-447.
- [3] Jin R L, Qiao Z P, Zhou S D, et al. Quality analysis of *Crocus sativus* [J]. *J Nanjing Coll Pharm* (南京药学院学报), 1986, 17(4): 247-251.

欢 迎 投 稿      欢 迎 订 阅