

• 研究论文 •

丹参药材的综合质量评价研究

韦 辉^{1,2}, 刘素香², 刘 毅², 张铁军^{2*}, 陈常青^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院, 天津 300193

摘 要: **目的** 建立丹参药材 HPLC 方法同时用于指纹图谱和多指标测定。**方法** 采用 Diamonsil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 在 280 nm 波长下, 以乙腈-0.05%磷酸水溶液梯度洗脱, 测定了 19 批丹参药材的指纹图谱和丹参素、迷迭香酸、丹酚酸 B 及丹参酮 II_A 4 个指标成分, 对指纹图谱共有峰和相似度进行分析, 并进行聚类分析和主成分分析。**结果** 在选定的色谱条件下, 得到 19 批丹参药材的指纹图谱, 标定了 12 个共有峰, 并建立了丹参药材的指纹图谱共有模式, 相似度在 0.808~0.997。聚类分析结果将 19 批丹参药材分为两大类, 与主成分分析结果及药材测定结果相一致。**结论** 不同产地丹参药材色谱峰的数目差别不大, 但各指标成分量差别较大。该方法准确、可靠, 为有效地评价丹参药材的综合质量提供了参考依据。

关键词: 丹参; 高效液相色谱法; 指纹图谱

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2011)05-0343-05

Comprehensive quality evaluation of *Salvia miltiorrhizae radix et rhizoma*WEI Hui¹, LIU Su-xiang², LIU Yi², ZHANG Tie-jun², CHEN Chang-qing²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for *Salvia miltiorrhiza radix et rhizoma* fingerprint and simultaneous determination. **Methods** The HPLC method was used with Diamonsil-C₁₈ column (250 mm × 4.6mm, 5μm), under the wavelength of 280 nm, a mixed liquid of acetonitrile-0.05% H₃PO₄ as mobile phase in a gradient elution. The common HPLC fingerprint for 19 batches of *Salvia miltiorrhiza radix et rhizoma* was established, the contents of propanoid acid, rosmarinic acid, salvianolic acid B, and tanshinone II_A were determined, and the common peak and the similarity were analysed with parameter of fingerprint analyses. **Results** Under the selected spectrum condition, it acquired the fingerprint for 19 batches of *Salvia miltiorrhiza radix et rhizoma* and 12 common peaks. The 19 batches of samples were classified into two groups based on the results of hierarchical clustering analysis. It shows no difference with principle components analysis and the results of simultaneous determination. **Conclusion** The amounts of the peaks from different habitats were the same, but the contents of components showed significant difference in *Salvia miltiorrhiza radix et rhizoma* from different habitats. The method is accurate and reliable, and it could provide comprehensive reference for the quality evaluation of *Salvia miltiorrhiza radix et rhizoma*.

Key words: *Salvia miltiorrhiza radix et rhizoma*; HPLC; fingerprint

丹参为唇形科鼠尾草属多年生草本植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎^[1], 始载于《神农本草经》, 列为上品, 是我国常用传统中药, 具有祛瘀止痛、活血通经、清心除烦等功效。现代医学研究和临床实践还表明, 丹参有扩张冠状动脉、增加冠状动脉血流量、减慢心率、改善心肌缺氧之功

效, 常用于治疗冠心病、心绞痛、胸闷、心悸等症^[2]。丹参的化学成分分为脂溶性和水溶性两大类^[2], 水溶性成分主要为酚酸类物质, 丹参脂溶性成分主要为丹参酮类, 这些成分发挥不同的药理活性, 共同决定丹参药材的质量^[3-6]。本实验采用 HPLC 法, 测定 19 批不同产地丹参药材中丹参素、迷迭香酸、丹

收稿日期: 2011-07-01

基金项目: 河北省中小企业创新基金项目

*通讯作者 张铁军 Tel: (022)23006848 Email: tiejunzh2000@yahoo.com.cn

陈常青 Tel: (022)23006821 Email: chencq@tjipr.com

酚酸 B、丹参酮 II_A 4 个指标成分的量,同时采用指纹图谱对药材进行综合评价。

1 仪器与试剂

安捷伦液相色谱仪 1100 系列,包括 G1310A 四元液相梯度泵、G1313A 自动进样器、G1314A VWD 检测器、CO—201 柱温箱、安捷伦色谱工作站。AB204—N 电子天平 (Mettler Toledo), Autoscience As3120 超声仪, Seastae R501B 旋转蒸发仪。乙腈为色谱纯, 甲醇、乙醇、磷酸均为分析纯, 水为天慈纯净水; 丹参素、迷迭香酸、丹酚酸 B 对照品 (质量分数均为 98%, 天津一方科技有限公司)、丹参酮 II_A 对照品 (中国食品药品检定研究院)。

丹参药材于 2009—2010 年分别采(购)自河南、陕西、山东、四川、河北等地,见表 1。经天津药物研究院中药现代研究部张铁军研究员鉴定为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5

表 1 19 批丹参药材来源及产地

Table 1 Origin sources of 19 batches of *Salvia miltiorrhiza* radix et rhizoma

编号	批号	产地	编号	批号	产地
S1	1008180	山东	S11	20100716	山东
S2	1004183	河北	S12	100809	陕西商洛
S3	20100509	河北	S13	10040241	山东
S4	2009006	山东	S14	100906	山东
S5	20100429	四川	S15	2010052301	山东
S6	20100504	陕西商洛	S16	2010052302	山东
S7	201005170	不详	S17	2010052303	河北
S8	20100816	河南	S18	20100525	山东
S9	1008181	河北	S19	20100526	不详
S10	0809001	山东			

μm); 检测波长 280 nm; 柱温 30 ℃; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μL; 流动相乙腈 (A) -0.05% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱: 0~10 min, 10%~25% A; 10~20 min, 25%~30% A; 20~35 min, 30%~80% A; 35~65 min, 80%~100% A。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液制备 精密称取丹参素、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹参酮 II_A 对照品适量, 加甲醇使溶解, 分别制得各对照品储备液; 分别精密吸取各对照品储备液适量, 加甲醇稀释, 分别配制成含丹参素 18.56 μg/mL、迷迭香酸 22.04 μg/mL、丹酚酸 B 277.00 μg/mL、丹参酮 II_A 16.08 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液制备 取本品粉末约 0.2 g, 精密称定, 精密加入 70%乙醇 25 mL, 称定质量, 超声提取 45 min, 放冷, 补足质量, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

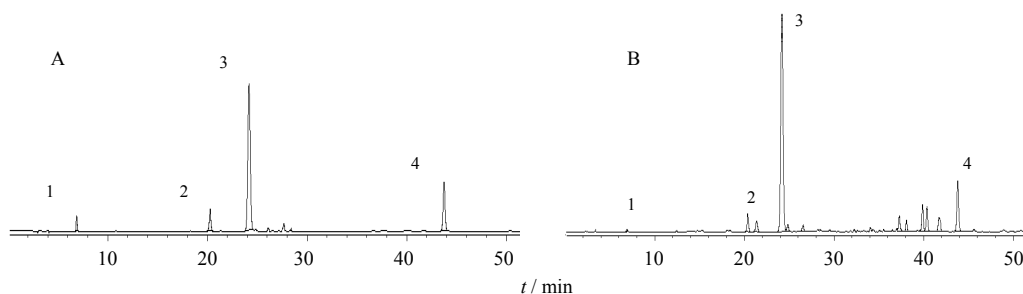
2.3 测定方法

精密量取供试品溶液 10 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 见图 1。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 取混合对照品溶液, 分别进样 1、2、5、10、20、30、40、50 μL, 在上述色谱条件下测定峰面积, 以进样量为横坐标, 以峰面积为纵坐标进行线性回归, 结果见表 2。

2.4.2 精密度试验 取批号为 1008180 的药材粉末 0.2 g, 精密称定, 按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 精密吸取 10 μL, 连续进样 5 次, 考察色谱峰相对保留时间和相对峰面积的一致性, 以丹酚酸 B 为参照峰, 计算其中 12 个色谱峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.32%, 相对峰面积的 RSD 均小于 3.59%。同时测得丹参素、迷迭香酸、丹酚酸 B



1- 丹参素 2- 迷迭香酸 3- 丹酚酸 B 4- 丹参酮 II_A
1- propanoid acid 2- rosmarinic acid 3- salvianolic acid B 4- tanshinone II_A

图 1 混合对照品 (A) 和供试品 (B) 色谱图

Fig. 1 Chromatograms of mixed reference substance (A) and samples (B)

表2 各成分的回归方程
Table 2 Regression equations of components

化合物	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ μg
丹参素	$Y=443.3X+13.555$	0.998 5	0.037 12~0.556 80
迷迭香酸	$Y=1\ 216.4X+2.597$	0.999 5	0.022 04~1.102 00
丹酚酸 B	$Y=877.4X-27.671$	0.999 9	0.277 00~8.310 00
丹参酮 II _A	$Y=3\ 086.7X-23.312$	0.999 8	0.016 08~0.804 00

和丹参酮 II_A 峰面积的 RSD 分别为 0.48%、0.48%、0.07%和 0.58%。

2.4.3 重现性试验 取批号为 1008180 的药材粉末 5 份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,注入 HPLC 仪,考察色谱峰相对保留时间和相对峰面积的一致性,以丹酚酸 B 为参照峰,计算其中 12 个色谱峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.29%,相对峰面积的 RSD 均小于 2.28%。分别以外标法计算指标成分的量,计算得该批药材丹参素、迷迭香酸、丹酚酸 B 和丹参酮 II_A 的质量分数分别为 0.059%、0.27%、6.63%、0.26%,RSD 值分别为 0.81%、1.13%、0.87%、1.15%。

2.4.4 稳定性试验 取批号为 1008180 的药材粉末,按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,密闭放置于室温中,分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 进样分析,考察色谱峰相对保留时间和相对峰面积的一致性,以丹酚酸 B 为参照峰,计算其中 12 个色谱峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.38%,相对峰面积的 RSD 均小于 3.64%。丹参素、迷迭香酸、丹酚酸 B 和丹参酮 II_A 峰面积的 RSD 分别为 1.30%、0.71%、0.50%、0.53%,表明室温条件下供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.5 加样回收率试验 取批号为 1008180 的药材粉末 6 份,每份约 0.1 g,精密称定,分别加入混合对照品溶液适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,注入 HPLC 仪,计算回收率,结果丹参素、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹参酮 II_A 的平均回收率分别为 101.3%、102.4%、102.9%、97.9%,RSD 值分别为 1.72%、1.05%、1.67%、1.42%。

2.4.6 样品测定 取表 1 中所列的丹参药材 19 批,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,精密吸取 10 μL 进样,按上述色谱条件测定,以外标法计算,结果见表 3。

2.5 化学模式识别

2.5.1 聚类分析 以 19 批丹参药材为研究对象,进行指纹图谱研究,共获得 12 个共有峰。将各色谱峰

表3 不同产地丹参药材各指标成分的测定结果
Table 3 Determination of components in *Salvia miltiorrhiza* radix et rhizoma from different habitats

编号	丹参素/%	迷迭香酸/%	丹酚酸 B/%	丹参酮 II _A /%
S1	0.06	0.27	6.63	0.26
S2	0.09	0.24	5.51	0.03
S3	0.03	0.27	5.62	0.07
S4	0.06	0.15	3.83	0.36
S5	0.21	0.22	5.05	0.20
S6	0.12	0.95	9.24	0.09
S7	0.03	0.20	6.97	0.30
S8	0.04	0.40	8.71	0.22
S9	0.06	0.32	4.65	0.04
S10	0.06	0.21	4.38	0.24
S11	0.05	0.24	5.51	0.27
S12	0.10	0.60	6.97	0.08
S13	0.04	0.24	3.81	0.11
S14	0.06	0.20	5.11	0.29
S15	0.06	0.26	5.61	0.07
S16	0.07	0.22	7.23	0.07
S17	0.06	0.15	6.05	0.07
S18	0.05	0.14	4.71	0.21
S19	0.03	0.11	3.39	0.04

面积占总色谱峰的峰面积量化,得到 19×12 阶原始数据矩阵,运用 SPSS 软件进行聚类分析^[7]。结果见图 2。聚类分析将 19 批样品分为两大类,样品号为 1、4、5、7、10、11、14 共 7 批为第 I 类,其余 12 批为第 II 类。

2.5.2 主成分分析 19 批样本的色谱数据,各色谱峰占总峰面积量化作为数据的信息,一个样本的数据为一个数据向量生成样本数据,19 个样本数据组成样本指纹信息数据矩阵^[7-8]。对数据矩阵进行主成分分析 (PCA) 后,各特征值贡献图见图 3。

从主成分分析的贡献率来看,主成分 1 的贡献率最大为 55.51%,主成分 2 的贡献率次之为 20.75%,主成分 3 的贡献率次之为 16.38%,其他的贡献率较小。从累积贡献率来看,取前 3 个特征值时,累积贡献率为 92.64%,故取前 3 个为主成分。由表 4 可

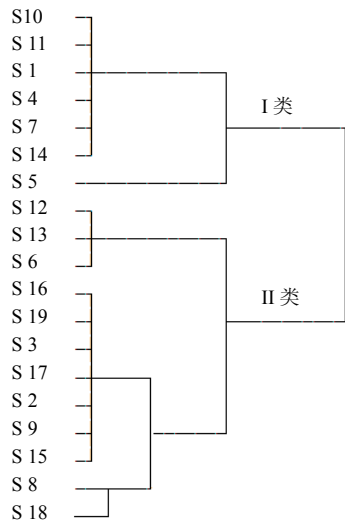


图 2 丹参样品聚类分析

Fig. 2 Hierarchical clustering analysis figure of samples

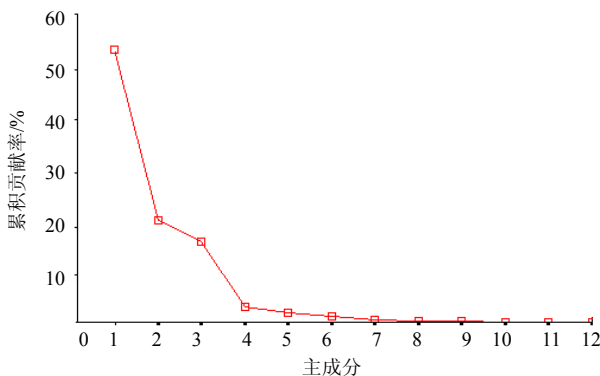


图 3 主成分分析碎石图

Fig. 3 Scree plot of principal component analysis

以看出, 7、8、9、10、11、12 号色谱峰(均为脂溶性成分), 在主成分 1 中有明显的正相负荷, 表明它们增加, 第 1 主成分增大; 2 号色谱峰迷迭香酸, 4 号色谱峰丹酚酸 B 在主成分 1 中有明显的逆负荷, 表明它增加, 第 1 主成分减少; 其他对第 1 主成分影响相对较小。2、3、5 号色谱峰在主成分 2 中有明显的正相负荷, 表明它们增加, 第 2 主成分增大, 其他对第 2 主成分影响相对较小。1、3、6 号色谱峰在主成分 3 中有明显的正相负荷, 表明它们增加, 第 3 主成分增大, 其他对第 3 主成分影响相对较小。

2.6 丹参药材指纹图谱的建立

2.6.1 19 批丹参药材按照上述建立的色谱条件获得指纹图谱。综合所得结果, 选择其中丹酚酸 B 和丹参酮 II_A 均合格的 S1、S4、S5、S7、S8、S10、S11、S14 共 8 批药材建立指纹图谱。指纹图谱分析

表 4 因子负荷矩阵表
Table 4 Component matrix

成分	1	2	3
1	-0.269	0.038	0.940
2	-0.542	0.672	-0.320
3	-0.282	0.754	0.577
4	-0.891	-0.401	-0.134
5	-0.150	0.910	0.030
6	0.433	-0.331	0.763
7	0.862	0.434	-0.070
8	0.939	0.209	-0.106
9	0.948	0.264	-0.098
10	0.982	-0.002	-0.049
11	0.912	-0.243	-0.027
12	0.943	-0.093	0.128

软件采用国家药典委员会编的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”, 参数设置: (1) 参照图谱采用批号 1008180 样品作为相似度计算时校正的参照图谱, 对照图谱生成方法为平均数; (2) 时间窗宽度 0.10; (3) 校正方式为多点校正。校正色谱峰的确定: 本品色谱图中主要色谱峰在 0~60 min 内基本分布均匀, 为保证不同批次指纹图谱匹配时校正准确性, 选择了 12 个点进行校正 Mark 峰。(4) 指纹图谱的生成: 8 批丹参药材色谱图生成指纹图谱和对照指纹图谱见图 4, 相似度采用 Excel 2002 软件的数据处理功能, 用夹角余弦法计算^[9-10], 第 4 峰(丹酚酸 B) 的权重系数设为 0.2, 结果可见, 编号为 S1、S4、S5、S7、S8、S10、S11、S14 的样品相似度分别为 0.994、0.994、0.955、0.994、0.944、0.991、0.997、0.994, 相似度均在 0.9 以上, 符合有关规定。

2.6.2 其余 11 批不合格药材指纹图谱与生成的对照指纹图谱比较, 采用 Excel 2002 软件的数据处理功能, 用夹角余弦法计算相似度, 第 4 峰(丹酚酸 B) 的权重系数设为 0.2, 结果可见, 编号为 S2、S3、S6、S9、S12、S13、S15、S16、S17、S18、S19 的样品相似度分别为 0.808、0.881、0.849、0.858、0.858、0.874、0.858、0.894、0.908、0.885、0.838。

3 讨论

样品提取方法的选择 分别对提取溶剂、提取方式、提取时间进行考察, 实验结果表明, 70%乙醇超声提取 45 min, 提取已完全, 色谱峰较多, 色谱行为较好。

检测波长的选择 根据丹参中各化学成分的性

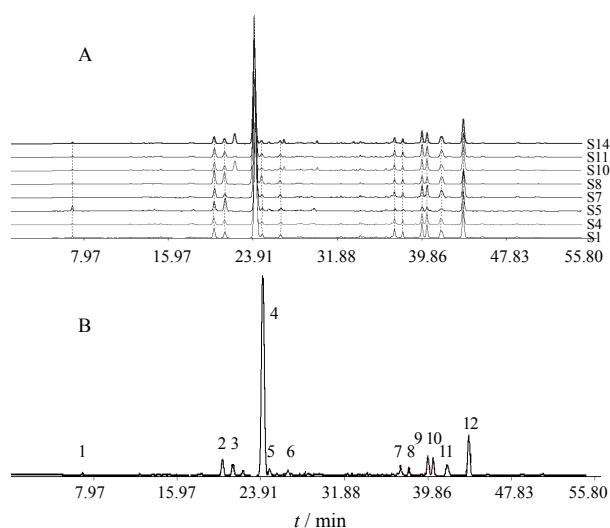


图4 8批丹参药材的色谱图(A)和对照指纹图谱(B)

Fig. 4 HPLC chromatogram (A) and compared fingerprints (B) of eight batches of *Salvia miltiorrhiza radix et rhizoma*

质,同时分别在230、270、280、286 nm下检测,结果在280 nm下各峰分离良好,特征峰明显且峰型较好,并能较好反映体系组成的全貌,因此选定280 nm为指纹图谱测定波长。

主成分分析表明,19批样品分为两类,与聚类分析结果一致。结合其产地及质量分数进行分析,第I类的7批药材中,除一批产地自四川外,其余6批产地均为山东,丹参酮II_A质量分数均合格,从图谱峰面积来看,6、8、9、11号(丹参酮II_A)均为丹参酮类成分相对总峰面积值比其他批药材大;第II类的药材分别来自陕西、河北、河南、山东,迷迭香酸、丹酚酸B质量分数稍高,丹参酮II_A质量分数不合格,水溶性成分相对总峰面积及比值较大。由此得出,利用SPSS软件进行聚类分析的结果与药材的自身质量是一致的。

进行相似度计算时,采用了Excel 2002软件的数据处理功能,由于考虑到丹酚酸B峰面积高,对相似度结果贡献大,药效成分的变化无法得到很好体现,因此将丹酚酸B峰的权重系数设为0.2,8批合格药材相似度均为0.9以上,11批不合格药材与对照图谱比较,相似度在0.9以下,说明本实验建立的方法对评价丹参药材质量优劣有一定意义。本研究建立的方法同时适用于两个研究方向,建立的丹参药材指纹图谱,包含水溶性成分和脂溶性成分,方法操作简单,重现性良好,给评价丹参药材质量的优劣提供了参考,可作为丹参质量控制和应用的依据。

参考文献

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2010.
- [2] 徐丽君,黄光英. 丹参的化学成分及其药理作用研究概述[J]. 中西医结合研究, 2009, 1(1): 45-47.
- [3] 潘雪梅,韦辉,刘毅,等. 不同产地丹参药材质量研究[J]. 中草药, 2011, 42(9): 1833-1836.
- [4] 赵广荣,田莉莉,王长松. 丹参素的抗癌活性研究[J]. 药物评价研究, 2010, 33(3): 180-182.
- [5] Tian Y P, Wang Q, Yang W, et al. Determination of shionone in rat plasma by HPLC and its pharmacokinetic study[J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(2):132-135.
- [6] 刘德茂,史德胜. 双丹口服液丹酚酸B和丹参素的稳定性研究[J]. 现代药物与临床, 2009, 24(2): 102-104.
- [7] 黎阳,刘素香,张铁军,等. 枳实的高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中草药, 2009, 40(9): 1469-1474.
- [8] 黎阳,刘素香,张铁军,等. 麻仁软胶囊指纹图谱研究[J]. 中草药, 2011, 42(6): 1097-1100.
- [9] 苗爱东,孙殿甲. Excel 2002在中药指纹图谱相似度计算中的应用[J]. 药学进展, 2003, 27(1): 52.
- [10] 罗国安,梁琼麟,王义明. 中药指纹图谱-质量评价、质量控制与新药研发[M]. 北京:化学工业出版社, 2009.

中草药杂志社4种期刊为允许刊载处方药广告的医药专业媒体

据国家药品监督管理局、国家工商行政管理局和国家新闻出版总署发布的通知,中草药杂志社编辑出版的《中草药》、Chinese Herbal Medicines (CHM)、《现代药物与临床》、《药物评价研究》4本期刊作为第一批医药专业媒体,允许发布“粉针剂、大输液类和已经正式发文明确必须凭医生处方才能销售、购买和使用的品种以及抗生素类的处方药”广告。

电话: (022)27474913 23006821 传真: 23006821 联系人: 陈常青

网址: www.中草药杂志社.中国; www.tiprpress.com E-mail: zcy@tiprpress.com