

一测多评法测定丹参中4种丹参酮类成分

蓝天凤¹, 王晓², 王岱杰², 王亮³, 刘青³, 于宗渊^{3*}

1. 山东中医药大学, 山东 济南 250355

2. 山东省分析测试中心, 山东 济南 250014

3. 山东省中医药研究院, 山东 济南 250014

摘要: 目的 建立测定丹参中4种丹参酮类成分的一测多评法。方法 采用HPLC法, 以丹参酮II_A为对照品, 外标法测定其在丹参中的量, 同时测定丹参酮II_A与丹参酮I、隐丹参酮、二氢丹参酮的相对校正因子, 用获得的相对校正因子计算后3种成分的量, 实现一测多评; 用外标法测定丹参中丹参酮I、隐丹参酮和二氢丹参酮的量, 比较其与采用相对校正因子计算值之间的差异。结果 各相对校正因子重现性良好; 各成分采用相对校正因子计算的量值与外标法测定值之间无显著差异。结论 一测多评法在丹参中4种丹参酮类成分的测定中具有适用性和可行性。

关键词: 丹参; 丹参酮; 一测多评法; 相对校正因子; 外标法

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)12-2420-04

Determination of four tanshinones in *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* with quantitative analysis of multi-components by single-marker

LAN Tian-feng¹, WANG Xiao², WANG Dai-jie², WANG Liang³, LIU Qing³, YU Zong-yuan³

1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. Shandong Analysis and Test Center, Jinan 250014, China

3. Shandong Academy of Chinese Medicine, Jinan 250014, China

Key words: *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*; tanshinone; quantitative analysis of multi-components by single-marker; relative correction factor; external standard method

如何有效地评价中药质量是中药现代化研究面临的关键问题之一。中药成分复杂, 现行的用1~2种化学成分评价中药质量的模式, 无法表征中药化学成分的整体性和复杂性, 不能有效地评价中药的质量^[1]。因此, 应逐步建立采用多指标成分评价中药质量的新模式。但由于采用多指标成分评价中药质量需要有足够数量的化学对照品, 致使其在实际应用中受到限制。针对这一矛盾, 王智民等^[2]提出了中药质量评价“一测多评”的新思路, 即只采用1个对照品(供应充足、容易获得者), 来实现对多个成分(对照品不能充足供应者)的同步测定, 并已成功运用于人参、三七、关黄柏等药材中多种成

分的含量测定^[3-4]。

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎, 是临床常用大宗中药材之一。丹参药材因品种、产地、采收期等的不同, 致使其所含主要成分差异较大^[5-6], 因此应严格控制丹参药材的质量。目前已有以多个丹参酮类成分的同步测定来评价丹参质量的相关报道^[7], 但这种方法目前还难以推广应用, 主要是由于丹参中这类成分的对照品供应不足。笔者采用HPLC法, 建立了以丹参酮II_A为对照品, 同步测定丹参药材中丹参酮II_A、丹参酮I、隐丹参酮和二氢丹参酮4种成分的一测多评法。

收稿日期: 2012-02-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20872083); 中国中医科学院中药研究所科研基金资助项目(ZZ20090107); 山东省科技攻关项目(2009GG2001021-16)

作者简介: 蓝天凤, 女, 硕士, 主要从事中药质量控制与研究。Tel: 15362039607 E-mail: piao.xue0473@163.com

*通讯作者 于宗渊 Tel: (0531)82949805 13698627586 E-mail: yuzys@sohu.com

网络出版时间: 2012-11-27 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20121127.0949.004.html>

1 仪器与试药

Agilent 1200 系列高效液相色谱系统(A), Waters 600-996 高效液相色谱系统(W), 色谱柱 Shim-pack PREP-ODS (H) KIT C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm, S, 上海欧尼仪器科技有限公司), Welch Material C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm, W, 杭州汉泽仪器有限公司), Amethyst C₁₈-P (250 mm×4.6 mm, 5 μm, A, 广州市化玻贸易有限公司)。

丹参酮 II_A、丹参酮 I、隐丹参酮、二氢丹参酮对照品均为自制(经 ESI-MS、NMR 进行结构鉴定), 经 HPLC 面积归一化法测定, 质量分数均大于 98%。乙腈为色谱纯(山东禹王实业有限公司), 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

10 批丹参样品分别购自济南市中鲁医院、中山大药房、一笑堂大药房、泉城大药房、金日大药房、泽生大药房、鲁医南苑大药房、漱玉平民大药房、齐鲁大药房和神农本草大药房, 经山东省中医药研究院于宗渊研究员鉴定, 均为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Shim-pack PREP-ODS (H) KIT C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.2%乙

酸(55:45), 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 ℃, 检测波长 270 nm。在该色谱条件下, 各待测成分分离度良好。色谱图见图 1。

2.2 混合对照品溶液的制备

分别取丹参酮 II_A、丹参酮 I、隐丹参酮、二氢丹参酮对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解, 配制成含丹参酮 II_A 30 μg/mL、丹参酮 I 40 μg/mL、隐丹参酮 30 μg/mL、二氢丹参酮 5 μg/mL 的混合对照品溶液, 置棕色瓶内, 避光保存。

2.3 供试品溶液的制备

取丹参药材粉末(过 60 目筛)约 0.3 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称定质量, 加热回流 1 h, 放冷, 再称定, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过, 弃去初滤液, 取续滤液, 置棕色瓶内, 避光保存。

2.4 线性关系考察

取混合对照品溶液, 分别稀释 1、4、8、12、16、20 倍, 配制成系列质量浓度的混合对照品溶液, 分别进样 10 μL, 以峰面积积分值对各对照品的进样量进行线性回归, 结果见表 1。表明各对照品的进样量与峰面积积分值均呈良好线性关系。

2.5 精密度试验

取购于中山大药房的丹参制备的供试品溶液,

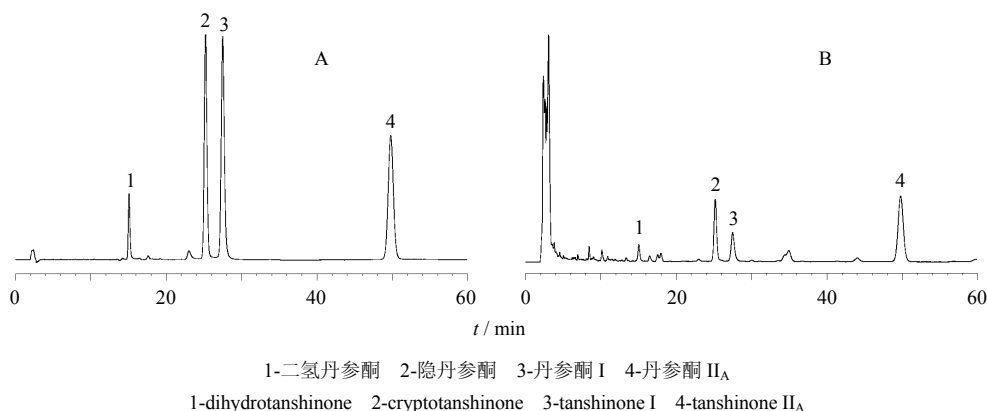


图 1 混合对照品 (A) 和丹参样品 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* sample (B)

表 1 线性关系考察结果

Table 1 Results of linear relationship

成 分	回归方程	<i>r</i>	线性范围 / ng
丹参酮 II _A	$Y = 1\,457.2 X + 2.568\,7$	0.999 5	15~300
丹参酮 I	$Y = 1\,348.1 X + 3.616\,4$	0.999 7	20~400
隐丹参酮	$Y = 1\,575.1 X - 9.666\,5$	0.999 0	15~300
二氢丹参酮	$Y = 254.63 X + 0.752\,8$	0.999 2	2.5~50

依法测定, 连续进样 6 次, 每次 10 μL, 计算得丹参酮 II_A、丹参酮 I、隐丹参酮、二氢丹参酮峰面积的 RSD 依次为 0.31%、0.43%、0.68%、0.38%。

2.6 稳定性试验

取购于中山大药房的丹参制备的供试品溶液, 分别于室温避光放置 0、4、8、12、16、20、24 h 进样, 计算得丹参酮 II_A、丹参酮 I、隐丹参酮、二

氢丹参酮峰面积的 RSD 依次为 0.40%、0.30%、1.1%、1.4%，表明供试品溶液于室温避光放置 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验

取购于中山大药房的丹参药材粉末（过 60 目筛）6 份，每份约 0.3 g，精密称定，制备供试品溶液，依法测定，外标法计算得丹参酮 II_A、丹参酮 I、隐丹参酮、二氢丹参酮质量分数的 RSD 依次为 1.3%、1.2%、1.6%、1.1%。

2.8 加样回收率试验

取购于中山大药房的丹参药材粉末 6 份，每份约 0.15 g，精密称定，按各成分在药材中的质量分数不同分别加入适量的对照品，制备供试品溶液，依法测定，分别计算各对照品的回收率。结果丹参酮 II_A、丹参酮 I、隐丹参酮、二氢丹参酮的平均回收率依次为 99.5%、96.8%、98.7%、99.6%，RSD 依次为 1.6%、1.3%、0.90%、1.2%。

2.9 不同仪器和色谱柱对相对校正因子的影响

取“2.4”项下配制的系列质量浓度的混合对照品溶液，各进样 10 μL，以丹参酮 II_A 为内标，分别计算丹参酮 II_A 对丹参酮 I、隐丹参酮和二氢丹参酮的相对校正因子^[2]，取均值。

分别考察了 W、A 2 种高效液相色谱系统和 S、W、A 3 种色谱柱对各相对校正因子的影响，结果表明，不同仪器和色谱柱对各成分的相对校正因子无显著影响，结果见表 2。

2.10 色谱峰定位参数考察

为了在仅采用丹参酮 II_A 为对照品时，能够确认丹参酮 I、隐丹参酮和二氢丹参酮色谱峰的位置，从而通过获得的相对校正因子同时计算 3 种成分

量，达到一测多评的目的，考察了采用不同仪器和色谱柱时丹参酮 I、隐丹参酮和二氢丹参酮色谱峰与丹参酮 II_A 色谱峰间的保留时间差和相对保留时间 2 个参数。结果见表 3、4。表明其他待测成分与丹参酮 II_A 保留时间差的 RSD 在 1.7%~2.0%，相对保留时间的 RSD 在 0.61%~1.7%，可见，与丹参酮 II_A 色谱峰间的保留时间差和相对保留时间均可作为其他 3 个待测成分色谱峰的定位参数，相对保留时间较保留时间差的变异更小。

表 3 保留时间差考察结果

Table 3 Investigation on retention time difference			
色谱系统	丹参酮 II _A 对其他成分的保留时间差 / min		
	丹参酮 I	隐丹参酮	二氢丹参酮
W-S	23.07	24.76	35.39
W-W	22.69	23.96	34.43
W-A	22.99	24.88	35.53
A-S	22.26	24.53	34.65
A-W	21.94	23.86	33.96
A-A	22.24	24.47	34.94
平均值	22.54	24.49	34.82
RSD	2.0%	1.8%	1.7%

表 4 相对保留时间考察结果

Table 4 Investigation on relative retention time			
色谱系统	丹参酮 II _A 对其他成分的相对保留时间		
	丹参酮 I	隐丹参酮	二氢丹参酮
W-S	0.547	0.514	0.305
W-W	0.549	0.524	0.314
W-A	0.549	0.512	0.303
A-S	0.552	0.506	0.303
A-W	0.555	0.504	0.311
A-A	0.555	0.516	0.301
平均值	0.551	0.513	0.306
RSD	0.61%	1.4%	1.7%

表 2 不同仪器和色谱柱对相对校正因子的影响

Table 2 Effects of different instruments and columns on relative correction factor

色谱系统	丹参酮 II _A 对其他成分的相对校正因子		
	丹参酮 I	隐丹参酮	二氢丹参酮
W-S	0.733	0.827	0.636
W-W	0.754	0.823	0.613
W-A	0.753	0.820	0.633
A-S	0.747	0.825	0.634
A-W	0.750	0.834	0.634
A-A	0.752	0.821	0.638
平均值	0.748	0.825	0.631
RSD	1.0%	0.63%	1.4%

2.11 样品测定

取 10 批丹参药材制备供试品溶液，进样测定，分别采用一测多评法和外标法计算丹参药材中丹参酮 II_A、丹参酮 I、隐丹参酮和二氢丹参酮的量，结果见表 5。表明两种方法所得结果无显著差异。

3 讨论

本实验采用 HPLC 外标法测定了丹参药材中的丹参酮 II_A，同时测定并计算了丹参酮 II_A 与丹参酮 I、隐丹参酮、二氢丹参酮的相对校正因子，用相对

表5 样品测定结果
Table 5 Results of sample determination

样品来源	丹参酮 II _A / (mg·g ⁻¹)	丹参酮 I / (mg·g ⁻¹)		隐丹参酮 / (mg·g ⁻¹)		二氢丹参酮 / (mg·g ⁻¹)	
	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法	外标法
中鲁医院	1.690	0.751	0.750	0.590	0.592	0.219	0.220
中山大药房	3.100	1.640	1.650	1.080	1.120	0.297	0.299
一笑堂大药房	2.710	1.380	1.390	0.680	0.677	0.218	0.219
泉城大药房	1.910	0.889	0.891	0.631	0.630	0.308	0.310
金日大药房	1.840	0.976	0.980	0.679	0.675	0.274	0.276
泽生大药房	3.830	2.050	2.070	1.590	1.520	0.360	0.362
鲁医南苑大药房	1.570	0.781	0.781	0.508	0.515	0.233	0.234
漱玉平民大药房	1.640	0.656	0.654	0.417	0.431	0.173	0.173
齐鲁大药房	3.260	2.040	2.050	1.290	1.240	0.346	0.348
神农本草大药房	1.690	0.573	0.570	0.580	0.578	0.153	0.153

校正因子计算得到了丹参酮 I、隐丹参酮、二氢丹参酮的量,实现了一测多评。同时,采用外标法测定了丹参药材中的丹参酮 I、隐丹参酮和二氢丹参酮的量,比较了其采用相对校正因子计算值之间的差异。结果表明各成分采用相对校正因子计算的质量分数与外标法测定值之间无显著差异。一测多评法的适用性和可行性在丹参药材 4 种丹参酮类成分的定量测定中得到了验证。

参考文献

- [1] 何惠芳,赵庆国,郑 绯. 中药质量控制因素分析 [J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2009, 12(5): 805-807.
- [2] 王智民,高慧敏,付雪涛,等. “一测多评”法中药质量评价模式方法学研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23): 1925-1928.
- [3] 朱晶晶,王智民,匡艳辉,等. 一测多评法同步测定人参和三七药材中多种人参皂苷的含量 [J]. 药学学报, 2008, 43(12): 1211-1216.
- [4] 尹 萌,孟月兰,闻珺毓. 关黄柏中生物碱类成分的“一测多评” [J]. 中草药, 2011, 42(6): 1093-1096.
- [5] 夏广萍,潘 勤,程英莹,等. 中江产丹参药材的指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2004, 35(9): 1009-1011.
- [6] 韦 辉,刘素香,刘 毅,等. 丹参药材的综合质量评价研究 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(5): 343-347.
- [7] 王立萍,周凤琴,郭庆梅,等. 山东丹参脂溶性组分 HPLC 指纹图谱及有效成分含量测定 [J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(1): 133-135.