

Simultaneous Determination of Four Fat-Soluble Components in *Salvia miltorrhiza* with Quantitative Analysis of Multi-Components by Single Marker

Ruomei Wang, Jiafan Cao, Dongming Chen, Caihong Liu*

College of Pharmaceutical, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Tai'an Shandong

Email: liuch7688@163.com

Received: Jul. 31st, 2020; accepted: Aug. 13th, 2020; published: Aug. 20th, 2020

Abstract

Four tanshinones in *Salvia miltorrhiza* were simultaneous determined by QAMS method. The relative analysis correction factors (RCF) of tanshinone II_A to dihydrotanshinone I, cryptotanshinone and tanshinone were calculated. The contents of four tanshinones were determined by both external standard method and QAMS method. The results showed there were no significant differences in the quantitative analysis results obtained by two methods. The QAMS method can be used to control the quality of *Salvia miltorrhiza*.

Keywords

Quantitative Analysis Multi-Components Single Marker (QAMS), *Salvia miltorrhiza*, Relative Analysis Correction Factors (RCF)

一测多评法测定丹参中4种脂溶性成分含量

王若梅, 曹家樊, 陈东明, 刘彩红*

山东第一医科大学(山东省医学科学院), 药学院, 山东 泰安

Email: liuch7688@163.com

收稿日期: 2020年7月31日; 录用日期: 2020年8月13日; 发布日期: 2020年8月20日

摘要

采用一测多评法同时测定丹参中4种丹参酮类成分的含量。通过建立丹参酮II_A与二氢丹参酮I、隐丹参酮、

*通讯作者。

丹参酮I的相对校正因子, 以外标法测定丹参酮II_A, 利用相对校正因子计算二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I的含量。结果显示建立的相对校正因子重现性良好, 采用校正因子计算的结果与外标法实测值一致, 该法可以用于丹参中多种成分的质量评价研究。

关键词

一测多评法丹参, 相对校正因子

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎, 是临床常用中药。丹参的有效成分主要包括两大类: 以丹参酮类为代表的脂溶性成分和以丹酚酸类为代表的水溶性成分[1] [2], 其中在丹参酮类化合物中, 丹参酮 I、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 II_A 的含量较高[3]。由于丹参药材受品种、产地、采收期等因素的影响[4] [5], 其所含主要成分相差较大, 因此应严格控制丹参药材的质量。

中药材成分复杂多样, 大多靠几种成分协同发挥药效, 单一成分含量难以全面反映中药质量, 因此, 多指标成分的含量测定成为中药质量评价的新模式。但同时测定药材中的几种成分又存在对照品难得的问题, 致使采用多指标成分评价中药质量的模式在实际应用中受到限制。“一测多评”方法的提出及应用[6] [7] [8], 在一定程度上有效解决了这一矛盾。“一测多评”即只测定一个成分(对照品供应充足、容易获者), 通过建立该成分与其他成分(对照品难以得到或难供应者)间的相对校正因子, 计算出其他成分的含量, 实现多成分的同步测定。本实验采用 HPLC 法, 以丹参酮 II_A 为内参物, 采用一测多评法同步测定了丹参中二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 的含量, 为丹参药材的质量评价提供了依据。

2. 实验材料与方法

2.1. 仪器和试剂

LC-10AT 高效液相色谱系统(日本岛津), EC2006 高效液相色谱系统(大连依利特); 色谱柱: Hypersil ODS2(4.6 × 250 mm, 5 μm), SinoChrom ODS-BP(4.6 × 200 mm, 5 μm), Wondasil C18(4.6 × 250 mm, 5 μm); KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

对照品二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A(上海晨易生物科技有限公司), 丹参药材购于泰安漱玉平民大药房, 甲醇为色谱纯, 水为蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。

2.2. 对照品溶液的制备

取二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 对照品适量, 精密称定, 分别置棕色量瓶中, 加甲醇溶解, 配制成对照品储备液: 二氢丹参酮 I 0.1 mg/ml, 隐丹参酮 0.5 mg/ml, 丹参酮 I 0.7 mg/ml, 丹参酮 II_A 0.5 mg/ml, 避光保存。分别精密吸取 1 ml 二氢丹参酮 I, 1 ml 隐丹参酮, 1 ml 丹参酮 I, 1 ml 丹参酮 II_A 对照品储备液同置于 10 ml 棕色量瓶中, 加甲醇溶解定容, 得混合对照品溶液, 低温避光保存, 备用。

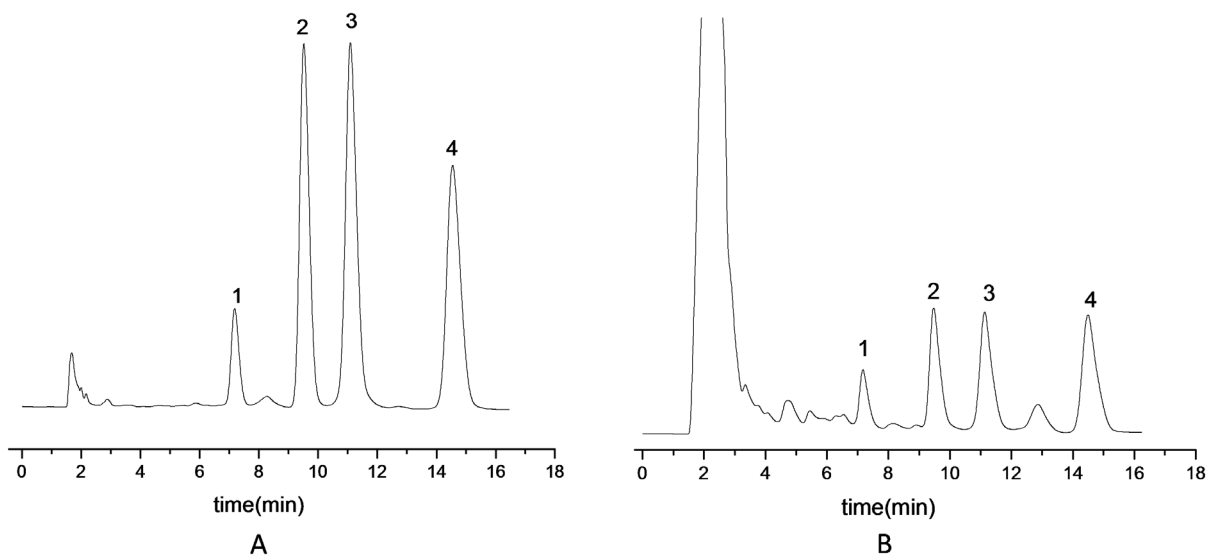
2.3. 供试品溶液的制备

取丹参粉末(过3号筛)约0.3 g, 精密加入甲醇50 ml, 密塞, 称定重量, 超声处理(功率140 W, 频率42 kHz) 30 min, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

3. 方法与结果

3.1. 色谱条件

Hypersil ODS2(4.6 × 250 mm, 5 μm)色谱柱; 甲醇-水(77:23)为流动相; 柱温30℃; 流速1.0 ml/min; 检测波长255 nm, 进样量20 μl。在上述色谱条件下, 各待测成分分离度良好, 对照品及样品 HPLC 图谱见图1。



1-二氢丹参酮 I; 2-隐丹参酮; 3-丹参酮 I; 4-丹参酮 II_A

Figure 1. HPLC chromatograms of *Salvia miltiorrhiza* standards and samples solutions

图 1. 丹参对照品(A)和丹参样品(B)的 HPLC 色谱图

3.2. 线性范围

精密吸取上述混合对照品溶液, 分别稀释 1、5、10、15、20、25 倍, 配制成系列浓度的混合对照品溶液, 分别进样, 按上述色谱条件测定, 记录峰面积, 以峰面积积分值对各对照品的浓度进行线性回归, 结果如表 1 所示, 各标准曲线在一定范围内线性良好。

Table 1. Standard curve of four kinds of active ingredient in *Salvia miltiorrhiza*

表 1. 丹参中 4 种有效成分的标准曲线

有效成分	标准曲线	线性范围(μg/ml)	r
二氢丹参酮 I	$Y = 88770X - 4002.5$	0.4~5	0.9990
隐丹参酮	$Y = 102919X - 105320$	2~25	0.9995
丹参酮 I	$Y = 72055X - 163957$	2.8~35	0.9997
丹参酮 II _A	$Y = 105538X - 86629$	2~25	0.9990

3.3. 精密度试验

精密吸取上述混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 计算得二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 I_A 峰面积的 RSD 分别为 1.9%、0.7%、1.3%、0.9%, 表明仪器精密度良好。

3.4. 稳定性试验

取同一供试品溶液, 室温避光放置, 分别于 0, 1, 2, 6, 10, 18, 24, 36 h 进样, 计算得二氢丹参酮、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 峰面积的 RSD 依次为 1.9%、1.1%、1.2%、1.3%, 表明供试品溶液在室温条件下避光放置 36 h 内稳定。

3.5. 重复性试验

称取同一批次丹参药材粉末约 0.3 g, 共 6 份, 按 1.3 项下操作, 制备 6 份供试品溶液, 分别进样测定, 按外标法计算, 得二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 的质量分数的 RSD 分别为 1.3%、1.5%、1.1%、1.6%, 表明方法重复性良好。

3.6. 回收率试验

取同一批已知含量的丹参药材粉末约 0.15 g, 9 份, 精密称定, 按各成分在药材中的含量不同分别精密加入高、中、低 3 个浓度水平的二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 对照品, 制备供试品溶液, 进样, 计算加样回收率, 二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 的加样回收率分别为 100.2%, 99.5%, 100.3%, 100.4%, RSD 值分别为 1.0%, 0.9%, 1.4%, 0.4%。

3.7. 校正因子的重现性考察

3.7.1. 不同仪器和色谱柱的影响

取 1.2 项下配制的系列浓度的混合对照品溶液, 分别进样。以丹参酮 II_A 为内标, 分别计算丹参酮 II_A 对二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 的相对校正因子, 相对校正因子的计算如下式所示[9]:

$$f_{s/x} = \frac{W_s \times A_x}{W_x \times A_s}$$

$f_{s/x}$ 为内标物丹参酮 II_A 与组分 χ 之间的相对校正因子, W_s 为内参物丹参酮 II_A 的质量(浓度), A_s 为内参物的峰面积, W 为组分 χ 的质量(浓度), A_x 为组分 χ 的峰面积。

分别考察了 EC2006, LC-10AT 2 种高效液相色谱系统和 Hypersil ODS2(4.6 × 250 mm, 5 μm), SinoChrom ODS-BP(4.6 × 200 mm, 5 μm), Wondasil C18(4.6 × 250mm, 5 μm)3 种色谱柱对各相对校正因子的影响, 结果表明, 不同仪器和不同色谱柱对各成分的相对校正因子无显著影响, 结果见表 2。

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

表 2. 不同仪器和不同色谱柱对相对校正因子的影响

不同仪器	不同色谱柱	相对校正因子		
		二氢丹参酮 I	隐丹参酮	丹参酮 I
EC2006	Hypersil ODS2	0.993	0.892	0.710
	SinoChrom ODS-BP	1.010	0.903	0.723
	Wondasil C18	0.990	0.890	0.692

Continued

LC-10AT	Hypersil ODS2	0.983	0.887	0.701
	SinoChrom ODS-BP	1.021	0.901	0.683
	Wondasil C18	1.014	0.902	0.716
平均值		1.002	0.896	0.704
RSD		1.5%	0.8%	2.1%

3.7.2. 待测组分色谱峰的定位

为了在仅采用 1 个对照品时, 能够确认其它 3 个成分色谱峰的位置, 分别采用丹参酮 I、隐丹参酮、二氢丹参酮 I 与丹参酮 II_A 色谱峰间的保留时间差和相对保留时间 2 个参数作为色谱峰定性依据, 并考察了这 2 个参数在不同仪器和不同色谱柱上的重现性, 见表 3。结果表明, 丹参酮 II_A 与其他 3 个待测成分相对保留值波动较小, 保留时间差波动较大, 因此选用相对保留值作为其他 3 个待测成分色谱峰的定位参数。

Table 3. Different instruments and columns of the target composition relative retention value

表 3. 不同仪器和不同色谱柱下目标成分的相对保留值

不同仪器	不同色谱柱	相对保留值		
		二氢丹参酮 I	隐丹参酮	丹参酮 I
EC2006	Hypersil ODS2	0.501	0.647	0.758
	SinoChrom ODS-BP	0.486	0.652	0.765
	Wondasil C18	0.479	0.659	0.781
LC-10AT	Hypersil ODS2	0.494	0.655	0.763
	SinoChrom ODS-BP	0.503	0.662	0.772
	Wondasil C18	0.489	0.645	0.769
平均值		0.492	0.653	0.768
RSD		1.9%	1.0%	1.0%

3.8. 样品测定

取丹参药材, 按照 1.3 项下要求制备供试品溶液, 进样测定, 分别采用外标法和一测多评法(丹参酮 II_A 的含量测定采用外标法计算, 其他三种成分根据校正因子计算公式计算)计算丹参药材中二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II_A 的含量。结果见表 4, 表明两种方法所得结果一致。

Table 4. Results of sample determination

表 4. 样品测定结果

方法	质量分数(%)			
	二氢丹参酮 I	隐丹参酮	丹参酮 I	丹参酮 II _A
外标法	0.014	0.0024	0.064	0.101
一测多评法	0.012	0.0025	0.062	0.100

4. 结论

本实验采用 HPLC 法, 以丹参酮 II_A 为内标物, 建立其与二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 的相对校正因子, 用外标法测定药材中丹参酮 II_A 的量, 根据相对校正因子计算二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 的量, 实现了一测多评。同时将外标法测定所得 4 个成分的量与一测多评法所得结果进行比较, 二者无显著性差异。一测多评法可用于丹参药材多指标成分含量测定。

基金项目

山东省大学生创新创业训练计划(S201910439044), 泰安市科学技术引导计划(2019ZC245)。

参考文献

- [1] 戴新新, 宿树兰, 郭盛, 等. 丹参酮类成分的生物活性与应用开发研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(7): 1442-1448.
- [2] 刘慧颖, 姜长涛, 冯娟, 等. 丹参酮类化合物研究进展[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(12): 1643-1647.
- [3] Su, C.Y., Qian, L.M., Khalid, R., *et al.* (2015) Salvia Miltiorrhiza: Traditional Medical Uses, Chemistry, and Pharmacology. *Chinese Journal of Natural Medicines*, **13**, 163-182.
- [4] 曾慧婷, 沙秀秀, 宿树兰, 等. 不同产地丹参茎叶 UPLC 指纹图谱与化学模式识别研究[J]. 中草药, 2017, 48(4): 767-772.
- [5] 宋嫵, 赵志刚, 郜舒蕊. 不同产地栽培与野生丹参药材品质评价[J]. 中成药, 2014, 36(5): 1026-1029.
- [6] 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.
- [7] 胡瑞雪, 梁元昊, 徐文丽, 刘玉峰. 一测多评法在中药中的应用及研究进展[J]. 药物分析杂志, 2019(11): 1968-1979.
- [8] 姜志远, 刘世萍, 马妍妍, 等. 一测多评法同时测定银杏叶片中 4 种内酯类成分的含量[J]. 中国药学杂志, 2018, 53(22): 1952-1955.
- [9] 王玲娜, 刘红燕, 张金, 等. “一测多评法”与外标法测定金银花中 8 种活性成分含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(20): 57-61.