

丹参中水溶性酚酸类成分的薄层扫描测定法

李 静* 何丽一 宋万志

(中国医学科学院药物研究所,北京 100050)

摘要 应用高效薄层扫描法对丹参根中的原儿茶醛、咖啡酸、迷迭香酸及其甲酯、丹酚酸 A、B 和 C 7 种有效成分进行了含量测定。选择了最佳提取分离方法,即生药用热水提取并酸化后用乙酸乙酯萃取,萃取液浓缩后进行薄层色谱分离。展开剂 A:氯仿-乙酸乙酯-苯-甲酸(2.4:2:1:0.6)分离原儿茶醛;展开剂 B:氯仿-乙酸乙酯-苯-甲酸-甲醇(1.5:2:1:1:0.1)分离其余 6 种成分。并用所建立的分析方法分析比较了 4 种丹参根中 7 种有效成分的含量。

关键词 丹参;酚酸类;高效薄层扫描法

丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge.)是重要传统中药之一,具有活血化瘀、通经止痛的功效。最近药理研究表明丹参中活血化瘀的有效成分在水溶性部位⁽¹⁾。从丹参中分离的丹酚酸 A、C、迷迭香酸等酚酸类化合物均有明显的抗血小板凝聚作用⁽²⁾,并有很强的抗脂质过氧化作用,且活性优于维生素 E⁽³⁾。

有关丹参水溶性成分的分析方法报道有比色法⁽⁴⁾、薄层色谱-光密度法⁽⁵⁾、纸色谱-光密度法⁽⁶⁾、荧光光谱法⁽⁷⁾、薄层扫描法^(8,9)和高效液相色谱法⁽¹⁰⁾。这些方法仅分析了原儿茶醛、原儿茶酸或丹参素中 1~3 个成分的含量。本实验分析的 7 个水溶性成分极性相差较大,而其中丹酚酸 A、C 和迷迭香酸三种成分的极性差别极小,Rf 值相近,不易分开。本文应用高效薄层扫描法首次分离测定了这些成分的含量,并用所建立的方法分析了 4 种丹参中 7 个成分的含量。此法分离效果好、省时、简便、易于操作,为分离分析丹参类生药中水溶性酚酸类成分提供了一个实用的方法,并为丹参的资源利用提供科学依据。

实 验 部 分

实验材料

参见表 1,原植物均经宋万志鉴定。

Tab 1 Contents of seven depsides in *Salvia miltiorrhiza* and other related plants

Sample	Habitat	Part	Content (%)							
			I	II	III	IV	V	VI	VII	Total
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Sichuan (Chengdu)	root	0.057	0.28	—	0.069	1.94	—	3.17	5.52
<i>S. gunnensis</i>	Yunnan (Lijiang)	root	0.088	0.57	0.068	—	2.40	—	2.46	5.58
<i>S. borelegana</i>	Jiangxi (Lianhua)	root	0.020	0.068	—	0.056	0.36	0.053	7.04	7.60
<i>S. sinica</i>	Anhui	root	0.046	0.37	—	—	1.41	—	6.00	7.83

I. Protocatechualdehyde; II. Caffeic acid; III. Methyl rosmarinate; IV. Salvianolic acid A; V. Rosmarinic acid; VI. Salvianolic acid C; VII. Salvianolic acid B.

本文于 1992 年 12 月 21 日收到。

· 中国医学科学院医药生物技术研究所

仪器、药品及试剂

薄层扫描仪 岛津 CS-930型双波长薄层扫描仪;岛津 DR-2数据处理机;高效硅胶 GF₂₅₄板 (10 cm×10 cm) 山东烟台化工研究所;微量定量毛细管 Drummond Sci Co. USA;标准品 7个标准品中的6个由作者从南丹参(*Salvia bowleyana* Dunn)中分离提纯,原儿茶醛 市售,化学纯,进一步结晶纯化。7个标准品:原儿茶醛(protocatechualdehyde, I)、咖啡酸(caffeic acid, II)、迷迭香酸甲酯(methyl rosmarinate, III)、丹酚酸 A (salvianolic acid A, IV)、迷迭香酸(rosmarinic acid, V)、丹酚酸 C (salvianolic acid C, VI)和丹酚酸 B (salvianolic acid B, VIII)经高效液相色谱检查均为单一纯品;试剂均为分析纯。

分离及检测条件的建立

薄层分离条件

将贮备液 A, B 各 2 μ l 点于薄层板上,分别用展开剂 A, B 展开。A. 氯仿—乙酸乙酯—苯—甲酸(2.4:2:1:0.6)分离原儿茶醛, Rf 值为 0.5; B. 氯仿—乙酸乙酯—苯—甲酸—甲醇(1.5:2:1:1:0.1)分离其余 6 种成分, Rf 值见表 2。

Tab 2 Rf values of six depsides in *Salvia bowleyana*

Depside	Rf	Depside	Rf
Caffeic acid	0.60	Rosmarinic acid	0.40
Methyl rosmarinate	0.56	Salvianolic acid C	0.35
Salvianolic acid A	0.45	Salvianolic acid B	0.15

检测条件

仪器参数: $\lambda_s = 300$ nm, $\lambda_R = 240$ nm, 反射法线性扫描, 狭缝 0.4 mm×6 mm, SX=3, 扫描速度和纸速均为 20 mm/min。用上述条件扫描得到标准品及样品的扫描图(图 1)。

稳定性试验

贮备液配制

贮备液 A 精密称取原儿茶醛标准品 0.2362 mg, 置 2 ml 量瓶中, 甲醇定容。

贮备液 B 精密称取标准品咖啡酸 1.150 mg、迷迭香酸及甲酯分别为 3.020 mg 和 1.290 mg, 丹酚酸 A, B, C 分别为 1.296 mg, 1.840 mg 和 1.408 mg, 同置 2 ml 量瓶中, 甲醇定容, 稀释 1 倍。

取贮备液 A 和 B 分别点在不同的薄层板上, 展开后放置 20, 40, 60, 90, 120, 150 min 测定, 结果表明各组分在 60~150 min 内峰面积值稳定, RSD 0.49~2.94%。故薄层板展开后需放置 1 h, 待展开剂中的酸挥尽后再扫描测定, 否则结果不稳。

精密度试验

为了考察方法的精密度, 将贮备液 A, B 分别点在不同薄层板上, 每种贮备液各点 5 次, 展开后测定各斑点的峰面积值, 7 种组分的 RSD 为 1.06~3.65%。

标准曲线的绘制

精密吸取贮备液 A 0.5, 2.3, 4.5 μ l, 贮备液 B 0.5, 2.4, 5.6 μ l, 分别点在不同薄层板上, 每个量重复点样两次, 展开后测定各斑点峰面积值, 以点样量(μ g)对峰面积($A \times 10^3$)作图, 得到 7 条直线, 其线性范围见表 3。

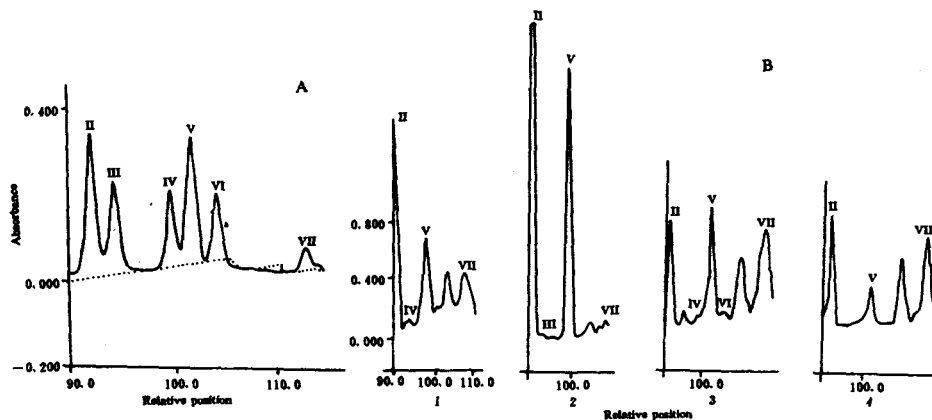


Fig 1 Scanning chromatograms of standards (A) and samples (B). 1. *Salvia miltiorrhiza* (Sichuan); 2. *S. gunnanensis* (Yunnan); 3. *S. bowleyana* (Jiangxi); 4. *S. sinica* (Anhui). I~VII of Tab 1.

Tab 3 Data of standard calibration curves

Depside	Regression equation	Correlation coefficient	Linear range (ug)
	$Y=a+bx$ (Y, spot area; X ug)		
Protocatechualdehyde	$Y=16.5 \times 10 - 9.46 \times 10 X$	0.9989	0.3627~3.6265
Caffeic acid	$Y=-7.52 \times 10 + 8.32 \times 10 X$	0.9890	0.1138~1.7250
Methyl rosmarinat	$Y=-5.82 \times 10 + 5.19 \times 10 X$	0.9887	0.1613~1.9350
Salvianolic acid A	$Y=-1.64 \times 10 + 4.38 \times 10 X$	0.9796	0.1620~1.9350
Rosmarinic acid	$Y=-9.75 \times 10 + 3.03 \times 10 X$	0.9817	0.3175~4.5300
Salvianolic acid C	$Y=-8.89 \times 10 + 4.22 \times 10 X$	0.9800	0.1760~2.1120
Salvianolic acid B	$Y=-11.57 \times 10 + 3.26 \times 10 X$	0.9778	0.2300~2.7600

提取条件

精密称取丹参样品(40目)4份各0.5 g,分别用酸性丙酮、酸性甲醇、酸水(以上溶液均 pH 2)及水冷浸过夜后直火煮沸1 h,前3种提取液不需再酸化,第4种需酸化,酸化后提取液分别用乙酸乙酯萃取(10 ml×3),合并萃取液,浓缩后定量移置2 ml 量瓶中,甲醇定容,供点样。展开后测定,结果以水提取率最高。丹酚酸 B 虽以酸性甲醇提取率最高,但在此斑点处同时出现另外斑点,而用水作溶剂时无其它斑点干扰丹酚酸 B。故选择水为最佳提取溶剂。

进一步考察了不同提取方法(冷浸、热提及超声波提取),其中热提效率最高,结果见表4。

Tab 4 Comparison of extraction methods

Method	Spot area			
	Protocatechualdehyde	Caffeic acid	Rosmarinic acid	Salvianolic acid B
Maceration 21 h	—	187.51	122.10	2661.18
Hot extraction 1 h	591.70	1106.17	652.99	1266.19
Supersonic extraction 0.5 h	—	953.13	256.95	2526.75
Supersonic extraction 1 h	—	901.93	190.51	1772.65

并比较了不同时间的热提效率,发现原儿茶醛2 h 提取最完全,其余6种成分均以0.5 h 提取率最高,可能后6种成分随受热时间的延长,因缩合、分解等原因受到破坏。故原儿茶醛和其余6种成分需分别提取分离测定。结果见表5。

Tab 5 Comparison of extraction time

Time (min)	Spot area			
	Protocatechualdehyde	Caffeic acid	Rosmarinic acid	Salvianolic acid B
15	190.61	2160.08	490.59	7140.44
30	320.60	2630.68	810.81	8090.56
60	980.39	2520.11	579.05	6970.24
90	160.83	2010.10	650.99	7460.78
120	2520.94	2220.25	640.48	3130.29
150	1420.97	2410.36	490.45	580.89

样品测定方法

精密称取样品(40目)0.5 g,加水30 ml,浸泡过夜后热提0.5 h(测原儿茶醛时热提2 h),静置过滤,滤液用10% HCl 酸化至 pH 2,酸化液用乙酸乙酯萃取(10 ml×3),合并萃取液,浓缩后定量转移到2 ml 量瓶中,甲醇定容供点样,测定。

回收率实验

精密称取等量的同一样品(40目)4份,其中两份中分别加入一定量的贮备液 A 和 B,另两份为对照,按测定方法操作,用外标两点法计算,结果见表6。

Tab 6 Results of recovery

Depside	Added	Measured	Recovery	Depside	Added	Measured	Recovery
	(μg)	(μg)	(%)		(μg)	(μg)	(%)
Protocatechualdehyde	196.4	201.0	102.4	Rosmarinic acid	390.0	391.2	100.3
Caffeic acid	143.8	144.5	100.5	Salvianolic acid C	176.0	170.7	97.0
Methyl rosmarinate	161.3	152.0	94.3	Salvianolic acid B	230.0	221.1	96.1
Salvianolic acid A	648.0	658.4	101.6				

用上述方法分析了4种丹参生药,结果见表1。

讨 论

由于本实验分析的成分较多,HPTLC 的分离又受温度、湿度等多种因素的影响,有时两相邻组分分离不好,只需稍加改变展开剂的配比,即能得到好的分离效果。

参 考 文 献

- 1 上海第九制药厂. 冠心病新药——丹参及复方丹参注射液的研究. 医药工业. 1973;1:14.
- 2 李承珠,等. 丹参抗凝作用的实验. 中西医结合杂志. 1983;3:297.
- 3 黄治森,张均田. 丹参中三种水溶性成分的体外抗氧化作用. 药学报. 1992;27:96.

- 4 李瑞玲,等. 丹参及其注射剂中水溶性总酚的测定. 药物分析杂志 1983;3:163.
- 5 杨树德、周同惠. 原儿茶醛分析方法的研究. 药理学报 1981;16:530.
- 6 倪坤仪、倪青云. 纸层析定量分析丹参注射剂中原儿茶醛的含量. 药检工作通讯 1979;9:115.
- 7 秦芝玲,等. 丹参水溶性成分——丹参素的荧光光谱法测定. 药物分析杂志 1984;5:278.
- 8 倪坤仪,等. 薄层扫描法测定丹参注射剂中水溶性成分. 南京药学院学报 1986;17:265.
- 9 简洋辉,等. 中药丹参类的质量研究. 中国药科大学学报 1989;20:5.
- 10 温天明,等. 丹参注射剂质量标准的研究. 中成药研究 1984;6:11.

SEPARATION AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF SEVEN AQUEOUS DEPSIDES IN *SALVIA MILTIORRHIZA* BY HPTLC SCANNING

J Li, LY He and WZ Song

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050)

ABSTRACT A new analytical method for the separation and determination of seven aqueous depsides in *salvia miltiorrhiza* by HPTLC has been developed. The seven depsides are protocatechualdehyde, caffeic acid, methyl rosmarinate, rosmarinic acid, salvianolic acid A, B and C. Using chloroform—ethyl acetate—benzene—formic acid(2.4:2:1:0.6) as developing solvent A, protocatechualdehyde was separated; using chloroform—ethyl acetate—benzene—formic acid—methanol (1.5:2:1:1:0.1) as developing solvent B, the other six constituents were well separated. The aqueous depsides were detected at the wave lengths of $\lambda_S = 300$ nm and $\lambda_R = 240$. This method is simple, rapid, sensitive and accurate. The contents of seven depsides in several *Salvia* species were determined.

Key words *Salvia miltiorrhiza* Bge.; Depsides; HPTLC