

全谱二维液相色谱检测丹参中的活性成分

LC-303

摘要： 本文利用岛津全谱二维液相色谱系统，建立了一针进样分析丹参中脂溶性和水溶性活性成分的液相色谱方法。相对于 2020 年版《中华人民共和国药典》需要分两个方法进行分析，本方法仅用 21 min，不仅可以实现丹参酮 II_A、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹酚酸 B 的同时分离，同时分离度良好，满足药典要求。方法学验证结果表明，四种成分在线性范围内相关性良好，线性相关系数均大于 0.999；连续 6 次重复进样分析中，四种成分的保留时间的 RSD 在 0.018%-0.085% 之间，峰面积的 RSD 在 0.10%-0.38% 之间，说明本方法稳定性良好。加标回收实验，四种成分的加标回收在 89.63%-118.15% 之间，RSD 在 0.31%-4.99% 之间。使用本方法检测某丹参样品含量，平行六次分析结果的 RSD 在 2.64%-4.31% 之间。通过本例，展示了全谱二维液相色谱在不同极性天然产物分析中的应用。

关键词： 全谱二维液相色谱系统 丹参 天然产物

丹参首载于《神农本草经》，是中国的传统中药，其有效成分主要包括两大类，分别是水溶性丹参酚酸类和脂溶性丹参酮类。①水溶性丹参酚酸类：丹参素、丹酚酸类化合物及迷迭香酸等成分。②脂溶性丹参酮类：主要包括丹参酮 I、异丹参酮 I、丹参酮 II、丹参酮 II_A、隐丹参酮及去氢丹参酮 II 等成分。2020 年版《中华人民共和国药典》规定了丹参中的主要脂溶性和水溶性活性成分含量测定的方法，采用高效液相色谱法，分两个方法进行分析。

岛津全谱二维液相色谱系统，可以实现一针进样

同时分析高、中、低极性物质，不仅可以将相同分离模式进行组合，还可以将不同分离模式如亲水作用色谱模式（HILIC）和反相液相色谱模式（C8 或者 C18）的组合，是非常有应用前景的分离分析技术。

本文通过优化中心切割条件及柱头聚焦条件，成功建立了丹参提取液中脂溶性活性成分和水溶性活性成分的一针进样分析方法。该方法不仅分离度满足药典要求，同时还有分析时间短、线性范围宽、定量准确度高的优点。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津全谱二维液相系统。具体配置为

输液泵：LC-40B XR, LC-40B X3

自动进样器：SIL-40C X3

系统控制器：SCL-40

检测器：SPD-M40

在线脱气机：DGU-20A5

柱温箱：CTO-40C

切换阀：FCV-36AH

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.97

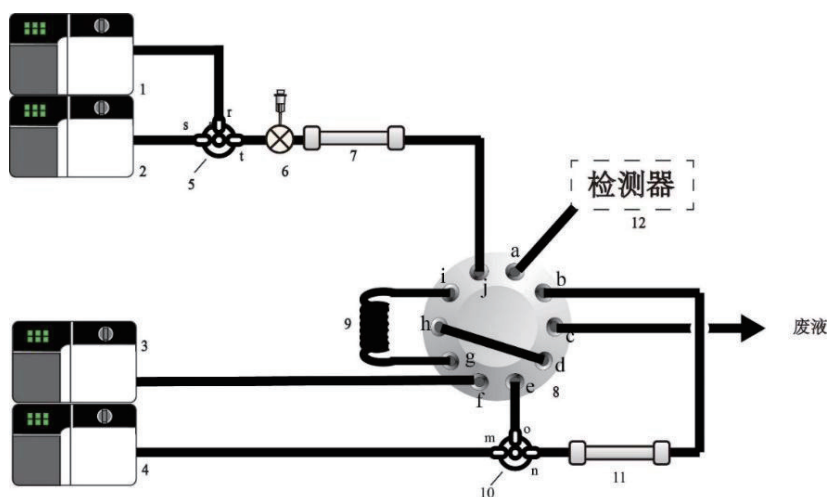


图 1 全谱二维液相系统示意图

(1: 一维液相输液泵 A; 2: 一维液相输液泵 B; 3: 二维液相输液泵 A; 4: 二维液相输液泵 B; 5: 三通混合器; 6: 自动进样器; 7: 色谱柱 1; 8: 高压十通阀; 9: 500 µL 样品环; 10: 三通混合器; 11: 色谱柱 2; 12: 检测器)

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：第一维：Shim pack GIST 100 mm×2.1 mm I.D., 2 µm (P/N: 227-30001-04, 岛津 (上海) 实验器材有限公司)

第二维：Shim-pack GIST-HP C18-AQ 100 mm×2.1 mm I.D., 3 µm (P/N: 227-30765-03 岛津 (上海) 实验器材有限公司)

流动相：第一维：A 相 -0.02% 磷酸水溶液； B 相 - 乙腈

第二维：A 相 - 0.1% 磷酸水溶液； B 相 - 乙腈

柱温：20°C

进样体积：4 µL

洗脱方式：梯度洗脱，时间程序见表 1- 表 3。

表 1 一维液相色谱梯度洗脱时间程序

时间 (min)	流速	泵 A 浓度	泵 B 浓度
0.00	0.4	45	55
3.00	0.4	45	55
10.00	0.4	10	90
10.10	0.4	45	55

表 2 二维液相色谱梯度洗脱时间程序

时间 (min)	流速	泵 A 浓度	泵 B 浓度
0.00	0.4	80	20
1.10	0.4	80	20
1.11	0.5	80	20
8.11	0.5	80	20
8.12	0.4	80	20
18.12	0.4	50	50
18.20	0.4	80	20

表 3 其他时间程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
1.1	柱温箱	Oven Valve 2	1
9.5	柱温箱	Oven Valve 2	0
21	控制器	Stop	

1.3 对照品溶液的配制

准确称取丹参酮 II_A、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹酚酸 B 对照品粉末，置于容量瓶中，加甲醇分别定容到 1 mg/mL、1 mg/mL、1 mg/mL 和 2 mg/mL，为储备溶液。取适量的储备溶液用甲醇稀释至指定浓度，上机分析。

1.4 供试品溶液制备

准确称取丹参样品粉末（过三号筛）约 0.15 g，置具塞锥形瓶中，精密加入 90% 甲醇 50 mL，密塞，称定重量，超声处理（功率 140 W，频率 42 kHz）30 分钟，放冷，再称定重量，用 90% 甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得

加标样品制备：准确称取丹参样品粉末（过三号筛）约 0.15 g，置具塞锥形瓶中，加入丹参酮 II_A、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹酚酸 B 对照品溶液适量，精密加入 90% 甲醇 50 mL，密塞，称定重量，超声处理（功率 140 W，频率 42 kHz）30 分钟，放冷，再称定重量，用 90% 甲醇补足重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

■ 结果与讨论

2.1 液相色谱方法参数优化

2.1.1 一维液相条件确认

本应用首先分别针对丹参酮类物质和丹酚酸 B 进行一维液相色谱条件优化和确认，主要优化色谱柱和梯度条件。丹参酮类物质液相色谱方法优化时，通过微调梯度条件，丹参酮 II_A、隐丹参酮、丹参酮 I 的分离度良好，如图 2 所示，相对保留时间见表 4，满足药典中相对保留时间规定值的 ±5% 范围内的要求。

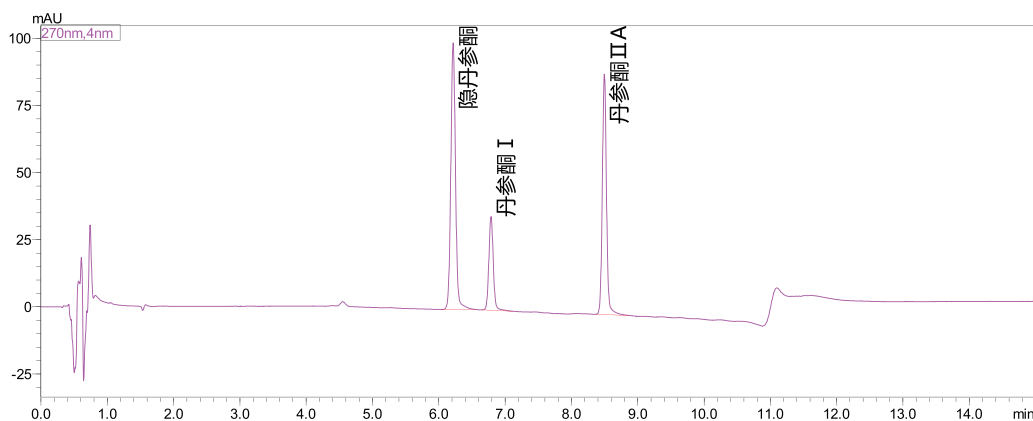

 图 2 丹参酮 II_A、隐丹参酮、丹参酮 I 一维液相色谱图（浓度 5.0 μg/mL）

表 4 丹参酮类化合物保留时间

#	待测成分	保留时间	相对保留时间	药典规定相对保留时间	药典规定参考范围
1	隐丹参酮	6.155	0.728	0.75	0.7125 - 0.7875
2	丹参酮 I	6.741	0.797	0.79	0.7505 - 0.8295
3	丹参酮 II _A	8.460	1.00	1.00	—

丹酚酸 B 液相色谱方法优化，主要对比了 1.9 μm 和 3.0 μm 的色谱柱，由于柱温较低，1.9 μm 的色谱柱虽然有更好的柱效，但是背压更高，因此选择 3.0 μm 的色谱柱用于丹酚酸 B 的分离。丹酚酸 B 的分离采用梯度洗脱，通过实验验证，丹酚酸 B 在色谱柱上保留较强，满足柱头聚焦的要求。

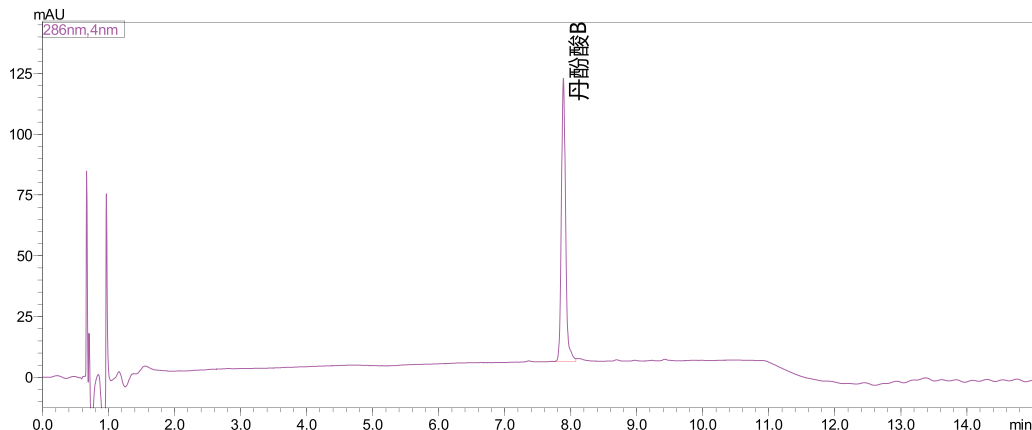


图 3 丹酚酸 B 液相色谱图（浓度 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）

2.1.2 二维柱头聚焦条件优化——聚焦体积

在全谱二维系统的分析过程中，丹酚酸 B 从第一维经定量环导入到第二维，并经历了较长时间的柱头稀释聚焦，因此有必要对柱头聚焦条件进行优化以达最佳的聚焦效果。聚焦体积定义为二维液相中利用有机相将目标物从定量环中携带出来的体积。以 10% 为稀释比例，当聚焦体积随聚焦时间延长而增加，考察峰面积随聚焦体积的变化规律，见图 4。由图可知，当聚焦体积 $\geq 800 \mu\text{L}$ 时，峰面积达到稳定。

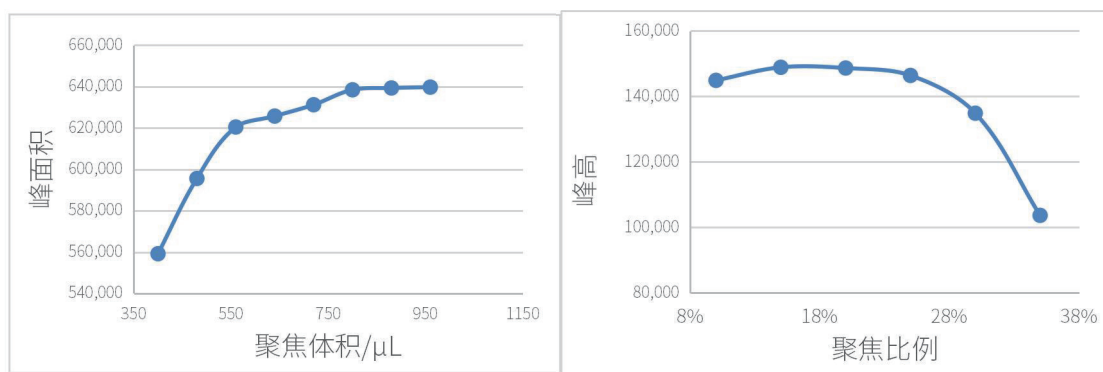


图 4 丹酚酸 B 峰面积与聚焦体积的变化趋势、峰高与聚焦比例的变化趋势

2.1.3 二维柱头聚焦条件优化——聚焦比例

聚焦比例对二维色谱分析的聚焦时间和分离结果都有很大影响，因此，聚焦比例也是二维聚焦条件的核心参数。以 800 μL 为聚焦体积，在不同稀释比例条件下，考察丹酚酸 B 的峰宽、峰高等基本参数，结果见图 4。由图可知，随着聚焦比例增加，丹酚酸 B 的峰宽显著变宽，峰面积也随之减小，说明聚焦比例过大时丹酚酸 B 在色谱柱上有一定程度的洗脱，而导致聚焦效果变差。聚焦比例较小，虽然聚焦效果良好，但是会大幅延长聚焦时间，不同聚焦比例下对应的聚焦时间见表 5。因第一维色谱分离中丹参酮 II_A 的保留时间为 8.460 min，聚焦时间大于 10 min 时则会增加全谱二维液相系统的分析时间，因此 20% 和 25% 的聚焦比例均比较理想。

表 5 不同聚焦比例下聚焦时间变化

聚焦比例	10%	15%	20%	25%
聚焦时间	20 min	13.3 min	10 min	8 min

聚焦比例同时也是二维液相色谱梯度分析的起点，因此聚焦比例直接影响二维液相色谱梯度变化，进而影响分离效果。通过对比丹酚酸 B（峰 2）对照品溶液中主峰和附近杂质峰（峰 1 和峰 3）的分离度，见图 6 聚焦比例为 20% 条件下，丹酚酸 B 和杂质峰的分离度稍好，考虑实际样品更为复杂，需要更好的分离效果，因此确定聚焦比例为 20%。

表 6 丹酚酸 B 和杂质峰的分离度

峰号	20% 聚焦比例	25% 聚焦比例
1	--	--
2	3.523	3.121
3	5.791	5.511

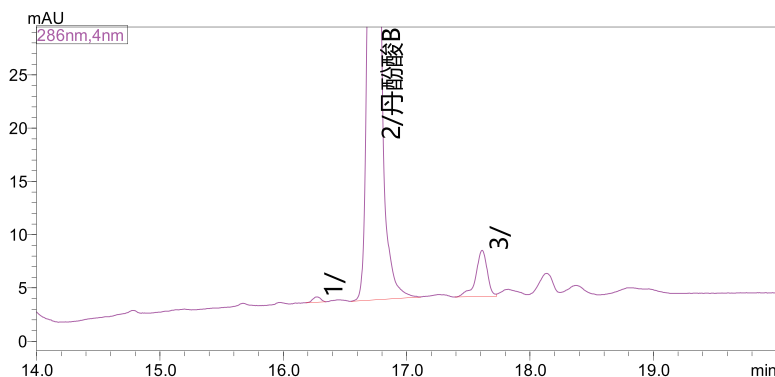


图 5 20% 聚焦比例聚焦比例的色谱图

2.1.4 二维柱头聚焦条件优化——聚焦流速

聚焦流速直接决定了柱头聚焦的时间，提升流速可以直接缩短聚焦时间，甚至提前开始梯度分析，可以大幅缩短整个的分析时间，但是提升流速也直接带来了背压升高，因此本文仅考察 0.4 mL/min, 0.5 mL/min 和 0.6 mL/min 的聚焦流速。实验数据显示，三种聚焦流速对分离效果没有显著影响，选择 0.5 mL/min 流速为最终聚焦流速。

2.2 色谱图

通过优化上述条件，确认最终液相色谱方法，21 min 完成丹参中高级性活性成分和中低极性活性成分的同时分析。

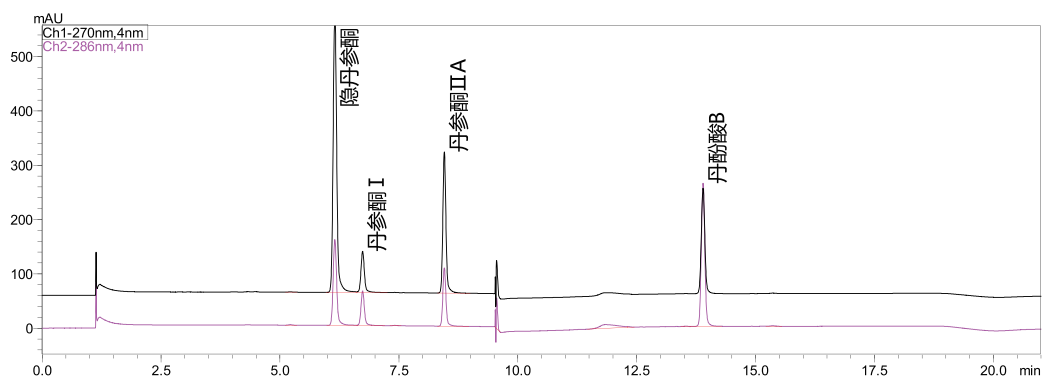


图6 丹参活性成分对照品的色谱图
(丹参酮II_A、隐丹参酮、丹参酮I，检测波长 270 nm，浓度为 20 μg/mL；丹酚酸 B，检测波长 286 nm，浓度为 100 μg/mL)

2.3 提取条件优化

由于丹参中活性成分的极性跨度较大，必须针对不同极性的成分优化提取条件，才能保证目标成分能够有效提取，保证定量结果的准确性。本文对比了 100% 甲醇、90% 甲醇水溶液和 80% 甲醇水溶液的提取结果，通过对比四种目标物的峰面积，选取提取效果最好的提取溶液，如图 7 所示，四种目标成分在 90% 甲醇水溶液中均有良好的提取效率。

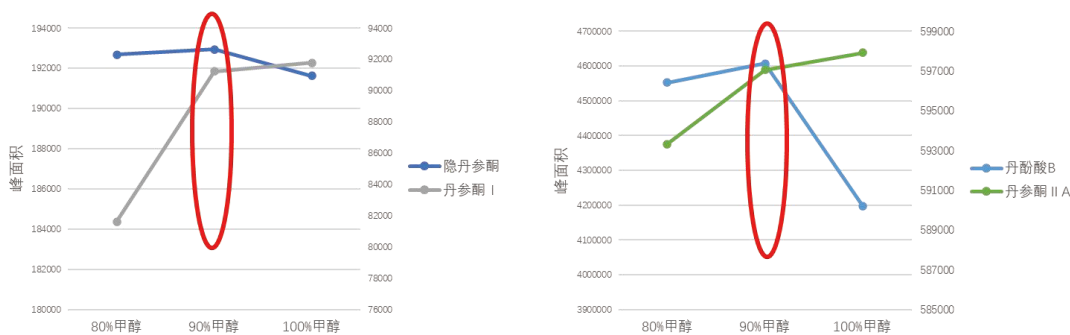


图7 丹参活性成分在不同提取溶液中的峰面积

2.4 方法学验证

2.4.1 重复性

按照 1.3 和 1.4 所述准备对照品溶液和供试品溶液，其中对照品溶液中丹参酮II_A、隐丹参酮、丹参酮I 的浓度为 20 μg/mL，丹酚酸 B 的浓度为 100 μg/mL。两份溶液均连续进样 6 次，计算四种成分保留时间和峰面积的重复性，并统计相对标准偏差 (RSD%)。结果表明，四种成分的保留时间的 RSD 在 0.018%-0.085% 之间，峰面积的 RSD 在 0.10%-0.38% 之间，说明本方法稳定性良好。

表 7 对照品溶液和供试品溶液的重复性 (n=6)

#	成分	对照品溶液		供试品溶液	
		保留时间	峰面积	保留时间	峰面积
1	隐丹参酮	0.085	0.27	0.052	0.38
2	丹参酮 I	0.068	0.31	0.045	0.36
3	丹参酮 II _A	0.042	0.28	0.032	0.10
4	丹酚酸 B	0.018	0.17	0.022	0.53

2.4.2 校准曲线

按 1.4 所述方法配制系列对照品混合标准溶液, 以各对照品的色谱峰峰面积 (y) 对进样质量浓度 (x, $\mu\text{g}/\text{mL}$) 进行回归计算, 4 种对照品的线性关系, 线性回归方程及相关系数 (r) 如表 8 所示, 4 种对照品在线性范围内线性相关性良好, 相关系数 r 均在 0.999 以上。

表 8 四种对照品的校准曲线及线性范围

#	成分	线性范围 $\mu\text{g}/\text{mL}$	校准曲线	相关系数	准确度 %
1	隐丹参酮	0.1-50.0	$Y = (73888.5)X + (-1200.88)$	0.9999	98.2-106.3
2	丹参酮 I	0.1-20.0	$Y = (29648.1)X + (-1131.19)$	0.9992	94.2-115.5
3	丹参酮 II _A	0.1-50.0	$Y = (63635.2)X + (-548.227)$	0.9999	99.2-103.2
4	丹酚酸 B	1.0-500.0	$Y = (12622.2)X + (333.099)$	0.9999	98.2-108.8

2.4.3 实际样品含量检测

按照上述方法, 对丹参样品进行检测, 平行 6 次实验, 所得溶液上机分析, 结果如图 8 和表 9 所示。结果显示, 4 种成分的含量在 0.43 mg/g - 57.06 mg/g 之间, RSD 在 2.64%-4.31% 之间。

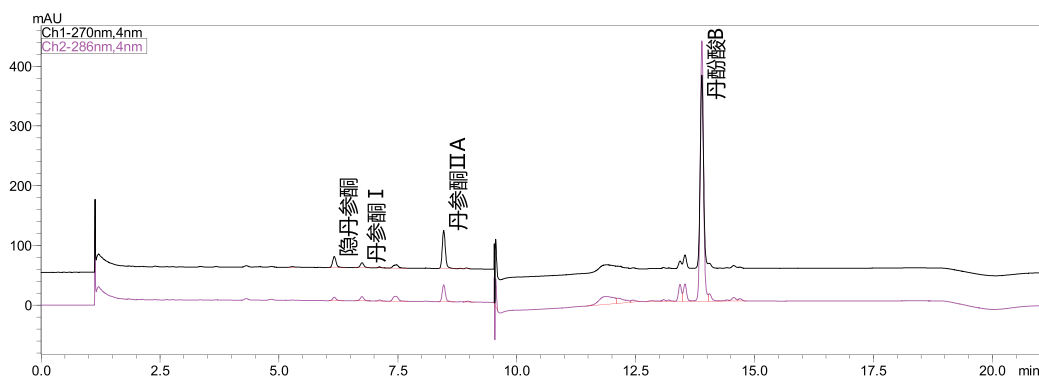


图 8 丹参样品色谱图
(丹参酮 II_A、隐丹参酮、丹参酮 I, 检测波长 270 nm; 丹酚酸 B, 检测波长 286 nm)

表 9 丹参样品检测结果 (n=6)

#	成分	含量 (mg/g)	RSD(%)
1	隐丹参酮	0.43	4.21
2	丹参酮 I	0.50	3.68
3	丹参酮 II _A	1.53	3.79
4	丹酚酸 B	57.06	2.64

2.4.4 加标回收

向 2.4.3 中已测得含量的丹参样品中按照低、中、高三浓度水平分别加入适量的对照品溶液，按照 1.4 方法制备加标样品，每个浓度水平平行 3 次实验，所得溶液上机分析，并计算回收率。实验结果显示 4 种成分的加标回收在 89.94%-117.40% 之间，RSD 在 0.31%-4.99% 之间。

表 10 丹参中 4 种成分的加标回收率 (n=3)

#	成分	样品含量 mg/g	加标浓度 1			加标浓度 2			加标浓度 3		
			加标量 mg/g	回收率 %	RSD %	加标量 mg/g	回收率 %	RSD %	加标量 mg/g	回收率 %	RSD %
1	隐丹参酮	0.43	0.33	97.30	0.42	0.67	97.20	0.64	1.00	98.92	0.31
2	丹参酮 I	0.50	0.33	114.00	3.24	0.67	117.40	3.95	1.67	101.02	4.99
3	丹参酮 II _A	1.53	0.83	100.32	0.49	1.67	102.28	0.91	3.33	89.94	0.57
4	丹酚酸 B	57.06	11.67	108.80	3.08	16.67	116.43	4.00	33.33	98.87	4.39

2.5 与常规液相方法对比

根据《中药材高效液相色谱检定》中收录的丹参品种色谱图显示，按照药典标准方法，脂溶性成分需要 40 min 完成分析，而水溶性成分需要 50 min 完成分析，合计需要 90 min 的分析时间。利用全谱二维液相建立的一针分析方法，仅需 21 min 即可完成 4 种成分的同时分析，效率提升了 4.5 倍，同时分离度满足药典要求。

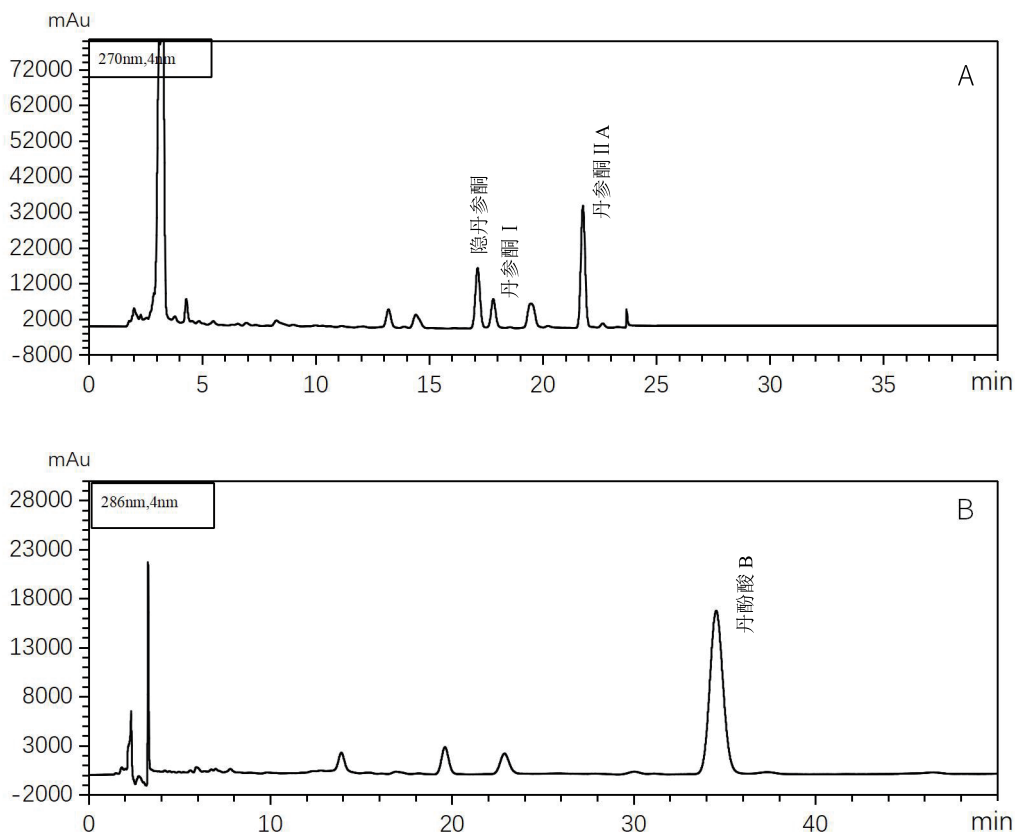


图 10 药典中丹参品种的高效液相色谱图

(A: 丹参酮 II_A、隐丹参酮、丹参酮 I, 检测波长 270 nm; B: 丹酚酸 B, 检测波长 286 nm)

■ 结论

本文利用岛津全谱二维液相系统，建立了一针进样分析丹参样品中脂溶性和水溶性活性成分的液相色谱方法。本方法仅用 21 min，不仅可以实现丹参酮 II_A、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹酚酸 B 的同时分离，同时分离度良好，满足药典要求。方法学实验中，4 种成分的线性相关性、重复性和加标回收均良好，同时还用该方法计算了丹参样品中 4 种成分的含量。本方法具有分析时间短、线性范围宽、定量准确度高的优点，可用于丹参中含量测定，供相关人员参考。通过本例，展示了全谱二维液相色谱在不同极性天然产物分析中的应用。

岛津应用云

