

加工炮制一体化与传统炮制川丹参饮片化学成分分析

罗明华^{1,2}, 洪燕¹, 顾冰³, 田徽¹, 雷利芬¹, 敬章书³

¹绵阳师范学院生命科学与技术学院, 四川 绵阳

²生态安全与保护四川省重点实验室, 四川 绵阳

³四川省天府神龙中药饮片有限公司, 四川 中江

Email: 969826049@qq.com

收稿日期: 2020年11月2日; 录用日期: 2020年11月13日; 发布日期: 2020年11月20日

摘要

为了提高川产丹参饮片质量, 本文分析比较了产地加工炮制一体化与传统川丹参饮片化学成分的含量。采用HPLC法测定两种方法炮制的丹参饮片中丹参酮类和丹酚酸类成分的含量。结果表明: 通过比较上述两类成分质量百分数的总和发现, 产地加工炮制一体化与传统方法饮片两类成分分别提高16.66%和15.24%。该方法简化了生产工艺流程, 值得推广。

关键词

丹参, 加工炮制一体化, HPLC, 丹参酮类, 丹酚酸类

Content Analysis on Chemical Composition between Integral Processing and Traditional Processing of *Salvia miltiorrhizae* Radix et Rhizoma in Sichuan

Minghua Luo^{1,2}, Yan Hong³, Bing Gu¹, Hui Tian¹, Lifan Lei¹, Zhangshu Jing³

¹College of Life Science and Technology, Mianyang Teacher's College, Mianyang Sichuan

²Ecological Security and Protection Key Laboratory of Sichuan Province, Mianyang Teacher's College, Mianyang Sichuan

³Sichuan Tianfushenglong Prepared Slices of Chinese Crude Drugs Co., Ltd., Zhongjiang Sichuan

Email: 969826049@qq.com

Received: Nov. 2nd, 2020; accepted: Nov. 13th, 2020; published: Nov. 20th, 2020

文章引用: 罗明华, 洪燕, 顾冰, 田徽, 雷利芬, 敬章书. 加工炮制一体化与传统炮制川丹参饮片化学成分分析[J]. 药物资讯, 2020, 9(6): 225-232. DOI: 10.12677/pi.2020.96033

Abstract

In order to improve the quality of *Salvia miltiorrhizae* Radix et Rhizoma (SMRR) in Sichuan, the chemical composition content of the integral processing and traditional processing of SMRR was determined. The content of tanshinones and salvianolic acids in the two methods of SMRR was determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Comparing the total of the mass fractions of the above two types of components, the content of SMRR slices increased by 16.66% and 15.24% respectively. The operation simplified the procedure and this method was worth popularizing.

Keywords

Salvia miltiorrhizae Radix et Rhizoma, Integral Processing, HPLC, Tanshinones, Salvianolic Acids

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 *Salvia miltiorrhizae* Radix et Rhizoma (SMRR) 味苦, 性微寒, 为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎[1], 川丹参是著名的川产道地药材之一。丹参中的化学成分主要有丹参酮类和丹参酚酸类成分[2]。现代药理研究表明, 丹参具有活血去瘀、通经止痛、具有抗炎、保肝[3] [4]、抗肿瘤[5] 等功效。目前, 川丹参饮片的加工炮制方法主要是冬季药农田间采挖, 除去泥沙, 阴干; 然后, 饮片生产厂家再按饮片生产要求, 洗净, 润透, 切片干燥。由于丹参从田间采收到制成饮片过程中, 先期去泥沙干燥后, 导致后期净制时需要时间长, 有效成分损失大, 质量不稳定。本实验测定了两种方法炮制的丹参饮片中丹参酮类和丹酚酸类共 7 种有效成分的含量, 并对其进行了比较分析, 为川丹参饮片生产工艺的改进提供依据。

2. 材料仪器和药品

2.1. 实验仪器

UltiMate3000 高效液相色谱仪, XS205 型万分之一的天平; METTLER TOLEDO 型十万分之一电子天平, 超声波提取器 KH-600DB; 粉碎设备 JD-07; DHG-9070A 型干燥箱; 沃特浦 WP-UPT-10 标准型超纯水机。

2.2. 药品与试剂

对照品二氢丹参酮 I、丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 IIA、丹参素钠、丹酚酸 B、丹酚酸 A 购于成都普思生物科技有限公司。批号分别是 PS010172、PS010103、PS010099、PS000274、PS000269、PS000278、PS011276。乙腈、磷酸和甲醇为色谱纯, 其余为分析纯。水为超纯水。

2.3. 丹参饮片的制备

丹参药材鲜品采自于四川川丹参道地产区, 为栽培第二年生植株, 由西南科技大学植物学教授马林

进行鉴定, 结果为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的根及根茎。试验材料按下述方法制备。

2.3.1. 加工炮制一体化丹参饮片

借鉴陆小华[6]的方法, 经过实验改进, 按下列步骤生产: 1) 丹参鲜品采收后, 分拣直径在 1 cm 以上和 0.5~1 cm 的根; 2) 抢水洗 3~5 分钟; 3) 取出在 30℃ 下鼓风干燥至含水量 35%~40%, 取出切成 3 mm 厚薄片; 4) 再在 30℃ 下鼓风干燥至含水量在 10% 以下。

2.3.2. 传统丹参饮片

按照 2015 版药典方法[1], 在实验中细化各操作步骤, 按下列程序进行: 1) 丹参鲜品采收后, 去泥沙, 阴干。2) 取丹参药材干品, 洗净, 码放成堆, 用纯净水喷淋 5 次, 时间间隔每次 2.5 h, 喷水量控制在药材质量的 1/5, 用湿润纱布覆盖, 让丹参原药材吸收水分至含水量 35% 左右, 浸润 10 h, 取出, 切成 3 mm 厚片, 50℃ 度热风干燥。

3. 方法与结果

3.1. 丹参酮类成分的含量测定

借鉴杨树生[7]的方法, 在试验中改进, 方法如下。

3.1.1. 色谱条件与系统适应性条件

色谱柱为 Welch C18 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇: 水(70:30); 等度洗脱; 流速 1.0 ml/min; 检测波长 270 nm; 柱温 25℃; 进样体积为 10 μL。

3.1.2. 溶液的制备

对照品溶液的制备: 精密称取, 丹参酮 IIA、丹参酮 I、隐丹参酮、二氢丹参酮 I 对照品各 10 mg, 用甲醇制成丹参酮 IIA、丹参酮 I、隐丹参酮、二氢丹参酮 I 分别为 0.1 mg/ml、0.08 mg/ml、0.1 mg/ml、0.1 mg/ml 的丹参酮类混合对照品溶液。供试品溶液的制备: 取丹参样品粉末约 0.3 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入 50 ml 甲醇, 密塞, 称定重量, 超声处理 45 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, 再用微孔滤膜(孔径 0.45 μm, 下同)滤过, 即得供试品溶液。

3.1.3. 样品测定

按 3.1.1 项下色谱条件, 精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μl, 注入液相色谱仪测定, 即得。

3.2. 丹酚酸类成分的含量测定

参考张友芹[8]的方法, 在试验中改进, 方法如下。

3.2.1. 色谱条件与系统适应性条件

色谱柱为 Welch C18 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇: 乙腈(10:1) (A), 1%甲酸(B); 梯度洗脱(0~5 min, 30%的流动相 B; 5~6 min, 30%~45%的流动相 B; 6~20 min, 45%的流动相 B; 20~22 min, 45%~30%的流动相 B; 22~25 min, 30%的流动相 B); 流速 1.0 ml/min; 检测波长 280 nm; 柱温 40℃; 进样体积为 10 μL。

3.2.2. 溶液的制备

对照品溶液的制备: 取丹酚酸 B、丹酚酸 A 和丹参素钠对照品, 精密称定 10 mg, 加甲醇 - 水(8:2) 混合溶液制成丹酚酸 A、丹酚酸 B、丹参素钠均为 0.1 mg/ml 的丹酚酸类混合对照品溶液, 即得。供试品溶液的制备: 取丹参样品粉末约 0.15 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入 50 ml 甲醇 - 水(8:2)

混合溶液，密塞，称定重量，超声处理 30 min，放冷，再称定重量，用甲醇 - 水(8:2)混合溶液补足减失的重量，摇匀，滤过，精密量取续滤液 5 ml，移至 10 ml 量瓶中，加甲醇 - 水(8:2)混合溶液稀释至刻度，摇匀，用微孔滤膜滤过，即得供试品溶液。

3.2.3. 样品测定

按 3.2.1 项下色谱条件，精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μ l，注入液相色谱仪测定，即得。

3.3. 方法学验证

3.3.1. 线性关系考察

丹参酮类成分的线性关系考察：精密吸取二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 IIA 混合对照品液，加甲醇分别配制二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 IIA 浓度为 1.0、5.0、10.0、15.0、20.0 μ g/ml，丹参酮 I 浓度为 0.8、4.0、8.0、12.0、16.0 μ g/ml 的混合标准品溶液，按 2.1 项下色谱条件，精密吸取不同浓度的混合标准品溶液各进样 10 μ l，测定峰面积，以峰面积值为纵坐标，含量为横坐标绘制标准曲线。丹酚酸类的线性关系考察：用甲醇 - 水(8:2)混合溶液分别配置丹酚酸 A、丹酚酸 B、丹参素钠均为 1.0、5.0、10.0、15.0、20.0 μ g/ml 的混合标准品溶液，按照 2.2 项下色谱条件精密吸取不同浓度的混合标准品溶液各进样 10 μ l，测定峰面积，以峰面积值为纵坐标，含量为横坐标绘制标准曲线。

得到的 7 种成分线性回归方程见表 1。

Table 1. Regression equation and linear range of components

表 1. 各成分的回归方程及线性范围

成分	回归方程	r	线性范围(μ g/ml)
二氢丹参酮 I	$y = 0.5777x + 0.0386$	0.9995	1.041~20.82
丹参酮 I	$y = 0.6631x + 0.038$	0.9996	0.8376~16.752
隐丹参酮	$y = 0.8037x + 0.0444$	0.9998	0.968~19.36
丹参酮 IIA	$y = 0.9427x - 0.2012$	0.9999	1.118~22.36
丹参素钠	$y = 0.096x + 0.0058$	0.9995	1.033~20.66
丹酚酸 B	$y = 0.1995x - 0.0197$	0.9999	1.068~21.36
丹酚酸 A	$y = 0.4968x - 0.0117$	0.9998	1.084~21.68

3.3.2. 精密度试验

丹参酮类成分的精密度试验：精密吸取丹参酮 IIA、丹参酮 I、隐丹参酮、二氢丹参酮 I 混合对照品溶液 10 μ l，按 3.1 项下含量测定方法，重复进样 6 次，计算 RSD；结果分别为 0.51%、0.69%、0.75%、0.62%。丹酚酸类成分的精密度试验：精密吸取丹酚酸 A、丹酚酸 B、丹参素钠混合对照品溶液 10 μ l，按 3.2 项下含量测定方法，重复进样 6 次，计算 RSD；结果分别是：0.71%、0.58%、0.81%。结果表明精密度试验符合要求。

3.3.3. 稳定性试验

丹参酮类成分稳定性试验：取同一供试品溶液，按 3.1 项下含量测定方法测定分别于 0 h、4 h、8 h、12 h、16 h、20 h、24 h 进样，测定含量，计算 RSD，验证 24 h 内供试品溶液中丹参酮 IIA、丹参酮 I、隐丹参酮、二氢丹参酮 I 的含量的稳定性，结果是 1.21%、2.05%、1.54%、1.32%。丹酚酸类的稳定性试验：取同一供试品溶液，按 3.3.3 项下含量测定方法测定分别于 0 h、4 h、8 h、12 h、16 h、20 h、24 h

进样,测定含量,计算 RSD,验证 24 h 内供试品溶液中丹酚酸 A、丹酚酸 B、丹参素的含量的稳定性,结果为 2.29%、1.69%、1.61%。

3.3.4. 重复性试验

丹参酮类成分的重复性试验:精密称取 6 份同一丹参样品粉末,按 3.1 项下方法制备 6 组供试品溶液,再按照按 3.1 项下含量测定方法测定,计算 RSD,结果是 1.86%、2.12%、1.76%、1.98%。丹酚酸类成分的重复性试验:精密称取 6 份同一丹参样品粉末,按 2.2 项下方法制备 6 组供试品溶液,再按照按 3.2 项下含量测定方法测定,计算 RSD,结果为 1.85%、1.56%、2.06%。

3.3.5. 加样回收率试验

丹参酮类成分的重复性试验:取已知 4 种丹参酮成分含量的丹参供试品溶液 6 份,分别精确加入与样品中的含量相等的丹参酮 IIA、丹参酮 I、隐丹参酮、二氢丹参酮 I 对照品溶液,按照 3.1 项下含量测定方法测定含量,得到丹参酮 IIA、丹参酮 I、隐丹参酮、二氢丹参酮 I 的加样回收率(RSD 值)分别为 99.85% (1.59%)、100.5% (1.68%)、101.2% (2.25%)、98.24% (1.82%)。丹酚酸类成分的加样回收率试验:取已知含量的丹参样品粉末 0.15 g (6 份),精密称定,分别精密加入样品含量的 100% 的丹酚酸 A、丹酚酸 B 和丹参素标准品,按 3.2 项下方法制备溶液和测定方法测定,计算回收率和 RSD,结果分别是 96.82% (1.23%)、101.2% (2.06%)、98.67% (2.43%)。两类成分的回收率数据均满足加样回收率要求(95%~105%),且 RSD 值均较低,表明加样回收率试验结果符合相关规定要求。

3.4. 含量测定

3.4.1. 色谱条件与系统适用性

本试验的色谱条件与系统适用性结果如图 1 和图 2。

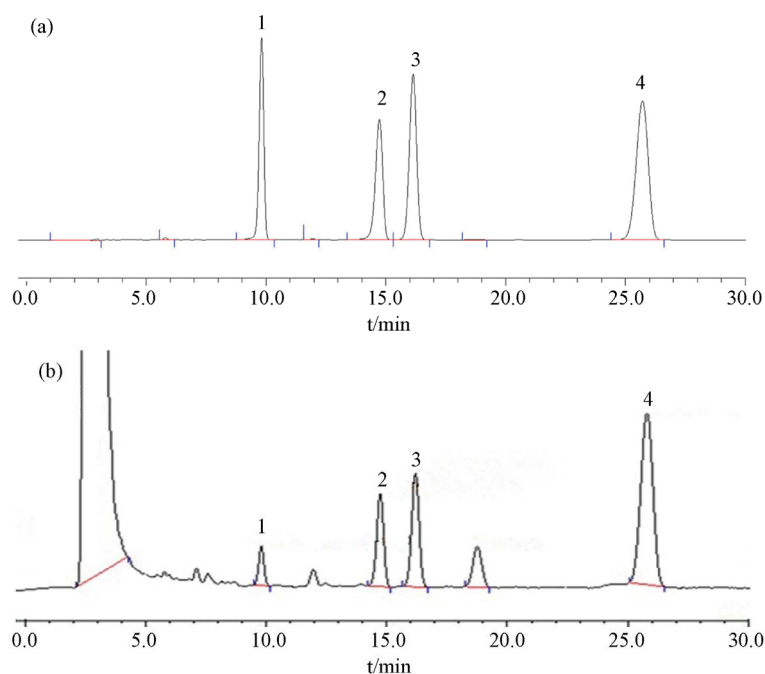


Figure 1. HPLC diagrams of tanshinones mixed reference substance (a) and tanshinone test substance (b). (1, dihydrotanshinone I; 2, tanshinone I; 3, cryptotanshinone; 4, tanshinone II A)

图 1. 丹参酮类成分的混合对照品(a)和丹参供试品(b)的 HPLC 图。(1, 二氢丹参酮 I; 2, 丹参酮 I; 3, 隐丹参酮; 4, 丹参酮 IIA)

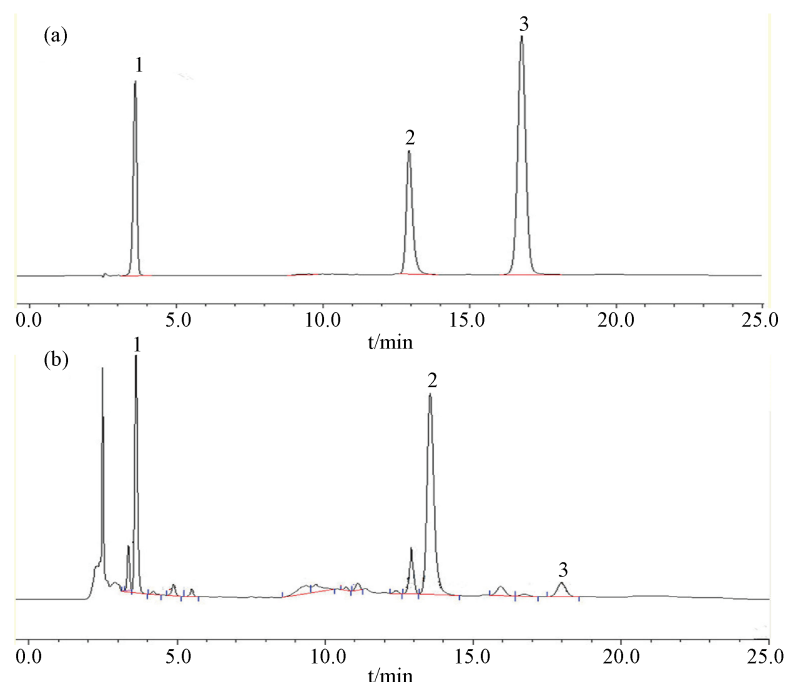


Figure 2. HPLC diagrams of salvianolic acids mixed reference substance (a) and salvianolic acids test substance (b). (1, danshensu; 2, salvianolic acid B; 3, salvianolic acid A)

图 2. 丹酚酸类的混合对照品(a)和丹参供试品(b)的 HPLC 图。(1, 丹参素; 2, 丹酚酸 B; 3, 丹酚酸 A)

由图 1 和图 2 可以看出，丹参酮类和丹酚酸类的混合对照品和供试品图中。的各峰都被分离开来，分离度高，且峰形良好，表明两种色谱条件的系统适用性良好。

3.4.2. 含量测定

将两种方法制成的丹参饮片制备溶液，按本试验的测定方法测定 7 种丹参酮类和丹酚酸类成分的含量。结果见表 2。

Table 2. Compositions content of two types of processing methods of SMRR in Sichuan (n = 6)

表 2. 两种方法炮制的川丹参饮片化学成分测定结果(n = 6)

样 品	质量分数(%)		
	传统丹参	加工炮制一体化丹参	
丹参酮类	丹参酮 IIA	0.214 ± 0.013	0.253 ± 0.003
	丹参酮 I	0.041 ± 0.002	0.051 ± 0.001
	隐丹参酮	0.042 ± 0.003	0.043 ± 0.004
	二氢丹参酮 I	0.045 ± 0.005	0.052 ± 0.006
	总和	0.342	0.399
丹酚酸类	丹酚酸 B	3.582 ± 0.042	4.125 ± 0.023
	丹酚酸 A	0.016 ± 0.006	0.022 ± 0.004
	丹参素	0.011 ± 0.003	0.012 ± 0.001
	总和	3.609	4.159

从表 2 中的试验结果可知,两种方法炮制的丹参饮片相比,工炮制一体化丹参饮片的丹参酮 IIA、丹参酮 I、隐丹参酮、二氢丹参酮 I 的含量分别高出 18.22%、24.39%、2.38%和 15.55%,丹参酮类成分含量的总和高出 16.66%;丹酚酸 A、丹酚酸 B 和丹参素的含量分别高出 15.16%、37.50%、9.09%,丹酚酸类成分含量的总和高出 15.24%;表明加工炮制一体化法炮制的丹参饮片质量较好。

4. 讨论

在预试验时,对混合对照品溶液中丹参酮类和丹酚酸类的分离、检测进行了流动相的考察,结果表明,丹参酮类用流动相为甲醇:水(70:30);等度洗脱,分离得到的色谱峰多,可获得良好的分离效果;丹酚酸类成分用流动相为甲醇:乙腈(10:1)(A),1%甲酸(B);梯度洗脱(0~5 min,30%的流动相 B;5~6 min,30%~45%的流动相 B;6~20 min,45%的流动相 B;20~22 min,45%~30%的流动相 B;22~25 min,30%的流动相 B),效果好。

丹参加工炮制过程中,去泥沙等杂质是重要的环节。《中国药典》2015 版规定:药材采收要去泥沙、干燥,丹参饮片炮制时,要除去杂质,洗净、润透、切片、干燥[1]。在实际生产中,有两种选择:一是采收时,趁鲜品水洗去泥沙等杂质,然后干燥,之后炮制时,再洗净,干燥,这个过程进行了两次水洗,两次干燥,在此过程中不可避免会造成有效成分损失和变化;二是选择采收时,边干燥,边搓揉,除去泥沙,这样药材中含泥沙杂质多,粘在丹参药材表面,在炮制时,洗净环节用时间长,有效成分损失大。

梁君、李帅锋、罗明华等[9][10][11]研究半夏、何首乌和川白芍饮片炮制加工时,缩短水洗时间,显著提高了其饮片有效成分的含量,本试验中趁鲜品,进行抢水洗,已得到类似结果。

丹参炮制过程中,干燥温度的选择是关键的因素之一,高温干燥导致有效成分变化[12]和损失,喻芳君等[13][14][15]研究得出:鲜丹参 50℃~70℃烘干可使丹参酮类成分损失 14.9%~23.9%,丹酚酸 B 损失 18.7%~32.9%,本试验在前期研究中进行条件筛选时,已得出了相似的结论,因而在干燥时采取低温(30℃烘干)鼓风干燥。

本试验结果表明,与传统丹参饮片相比,产地加工炮制一体化丹参饮片 7 种成分含量的总和高,饮片质量较好,说明此工艺技术可以减少有效化学成分损失,提高饮片质量。本研究结果为川丹参饮片炮制的一体化生产模式的建立提供了科学依据,为进一步推广应用提供参考。

基金项目

德阳市开放式校市合作技术研发项目(编号:2018CKJ025);绵阳师范学院科研项目(编号:07134213)。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(第一部)(2015 版)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 76-77.
- [2] 胡佩芳, 雷玉丹, 谢金凤, 等. 丹参的化学成分及药理作用研究进展[J]. 临床医学进展, 2019, 9(2): 127-132.
- [3] 袁媛, 吴芹, 石金山, 等. 丹参及其主要成分保肝作用的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(4): 588-593.
- [4] 廖雨微. 丹参中主要成分及其作用的文献研究[J]. 医药卫生(文摘版), 2017(8): 153-154.
- [5] 廖雪怡. 关于丹参与其主要成分抗肿瘤作用的分析[J]. 中医临床研究, 2015(11): 24, 26.
- [6] 陆小华. 不同炮制方法对丹参药材中丹酚酸 B 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2): 103-105.
- [7] 杨树声, 宋平顺, 赵建邦, 等. 高效液相色谱法测定丹参类药材中四种脂溶性成分含量[J]. 兰州大学学报, 2010, 36(3): 26-28.
- [8] 张友芹. HPLC 法测定丹参药材中丹参素的含量[J]. 中医药学报, 2000(3): 68.
- [9] 梁君, 刘小鸣, 张振凌, 等. 姜半夏产地加工炮制一体化方法及工艺研究[J]. 中草药, 2015, 46(9): 1302-1306.
- [10] 李帅锋, 丁安伟, 张丽, 等. 何首乌产地加工与饮片炮制一体化工艺研究[J]. 中草药, 2016, 47(17): 3003-3008.

- [11] 罗明华, 顾冰, 蒙华, 等. 产地加工炮制一体化与传统川白芍饮片化学成分含量比较[J]. 药物资讯, 2019, 8(3): 154-160.
- [12] 周涛, 罗春梅, 黄志芳, 等. 丹参干燥前后游离型和结合型酚酸的比较研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(5): 1090-1096.
- [13] 喻芳君, 钱浩, 马志国. 鲜丹参的干燥工艺研究[J]. 海峡药学, 2016, 28(11): 38-41.
- [14] 侯晓杰, 李玮, 张建锋, 等. 加工方法对丹参中隐丹参酮及丹参酮 IIA 的影响[J]. 贵州农业科学, 2014(9): 190-192.
- [15] 裘汉幸, 蒋永海. 不同干燥法丹参药材中丹参酮II A 含量的比较[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(6): 580.