

· 方药研究 ·

“发汗”与非“发汗”丹参中 10 种活性成分含量测定及其质量的主成分分析

王 婷^{1,2,3}, 于 凡^{1,2,3}, 李国转^{1,2,3}, 邱 镇^{1,2,3}, 陈卫东^{1,2,3}, 彭代银^{1,2,3}, 俞年军^{1,2}, 王国凯^{1,2}

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 安徽道地中药材品质提升协同创新中心, 安徽 合肥 230012; 3. 安徽中医药大学药物代谢研究所, 安徽 合肥 230012)

[摘要]目的 考察“发汗”丹参与非“发汗”丹参中 10 种活性成分含量的差异,对“发汗”与非“发汗”两种加工方法进行综合评价。**方法** 将同一批次丹参鲜品随机分为两组,分别进行“发汗”与非“发汗”处理,对两组丹参中 10 种活性成分(丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸、异阿魏酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II A)进行含量测定并采用主成分分析法对两组丹参质量进行分析。**结果** “发汗”后丹参酚酸类成分和丹参酮 II A 含量上升,隐丹参酮和丹参酮 I 的含量略有下降;主成分分析结果表明,“发汗”处理后基于效应成分的综合评分更高。**结论** “发汗”丹参质量优于非“发汗”丹参。

[关键词]丹参;发汗;高效液相色谱法;含量比较;主成分分析

[中图分类号]R284.2 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2019.01.020

丹参又称赤参、红根、紫丹参,为唇形科植物丹参 *Salvia Miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎,具有活血祛瘀、通经止痛、清心除烦等功效^[1]。“发汗”是一种常见的中药材产地初加工技术,即将新鲜药材

堆积起来,把水分散发到药材表面^[2]。“发汗”不仅有利于药材的干燥,还可调节组织细胞中酶系统和微生物群落的活性^[3],对药材品质的形成有一定影响。丹参“发汗”后,药材条直,表面呈暗棕色,断面变紫^[4],被认为是质量上乘的表现。目前,四川中江一直沿用“发汗”的加工方法^[5-6],其他各产地常常忽略“发汗”环节,而市售丹参品质不一,与产地加工工艺密切相关^[7]。本研究使用高效液相色谱法(high-performance liquid chromatography, HPLC)测定“发汗”与非“发汗”两种加工方法对丹参中 10 种成分含量的影响,为丹参产地加工方法的选择提供依据。

基金项目:安徽道地中药材品质提升协同创新中心项目(皖教科[2013]2号);中医药行业科研专项安徽种植基地建设项目(201207002);安徽省重点研究与开发计划项目(1704a0802145)

作者简介:王婷(1995-),女,硕士研究生

通信作者:陈卫东(1965-),男,博士,教授, wuchen@ahtcm.edu.cn

pharmacokinetic parameters of gemcitabine in rats after the combined use of CKI and gemcitabine hydrochloride. **Methods** A total of 24 healthy male Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group and experimental group, and the experimental group was further divided into high-, middle-, and low-dose CKI groups. The rats in the experimental group were given different doses of CKI via the caudal vein for 10 consecutive days, and those in the control group were given an equal volume of normal saline via the caudal vein for 10 consecutive days. Gemcitabine was injected at 5 minutes after administration on the last day. Blood samples were collected from the fundus venous plexus at 13 time points to measure the concentration of gemcitabine by high-performance liquid chromatography. DAS 2.0 software was used to obtain the pharmacokinetic parameters of gemcitabine. **Results** The pharmacokinetic process of gemcitabine in each group was consistent with the two-compartment model. Compared with the control group, the high-dose CKI group had a significant increase in the area under the plasma concentration-time curve of gemcitabine ($P < 0.05$) and a significantly longer mean residence time of gemcitabine ($P < 0.05$). **Conclusion** Multiple-dose CKI has a great impact on the pharmacokinetics of gemcitabine in rats, and the combination of CKI and gemcitabine should be used based on patient conditions in clinical practice.

[Key words] Gemcitabine; Compound Kushen Injection; Multiple dose; Pharmacokinetic

1 仪器与材料

LC-16C 高效液相色谱仪、SPD 型紫外检测器：日本岛津公司；AB135-S 型十万分之一电子天平：德国 Mettler Toledo 公司；AS20500BDT 超声波清洗机：天津奥特赛恩斯仪器有限公司；HC-1000Y 多功能粉碎机：浙江省永康市诺邦富贸易有限公司；Milli-Q 超纯水系统：美国 Millipore 公司。

“发汗”丹参、非“发汗”丹参均为安徽中医药大学药物代谢动力学研究室自制；丹参素（批号 1108755-201210）、原儿茶酸（批号 110809-201205）、原儿茶醛（批号 110810-200506）、迷迭香酸（批号 111871-201404）、异阿魏酸（批号 111698-201103）、咖啡酸（批号 110885-200102）、丹酚酸 B（批号 11156-201111）、丹参酮 II A（批号 110766-200619）、隐丹参酮（批号 110852-200806）、丹参酮 I（批号 110867-200406）均购自中国食品药品检定研究院；甲醇、乙腈均为色谱纯；其余试剂为分析纯。

丹参（鲜品）样品是由安徽春之蔚农业科技有限公司规范化生产基地提供的 1 年生栽培丹参。原植物及药材经安徽中医药大学药系俞年军教授鉴定为鼠尾科丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bge.)。取同一批次鲜品丹参置于空旷场地摊开，使其自然失水（过程中避免积压，防止产热），去泥，去除芦头，选择粗细均匀的药材随机分为两组进行“发汗”与非“发汗”处理。参照 LIANG 等^[8]“发汗”制备方法：将新鲜的丹参根（约 250 kg）堆积 7 d 以使其根条内部水分外溢，丹参堆中预留疏松间隙用以通风，外周稍作覆盖，定时将覆盖物掀开，期间每隔 2 d 将丹参堆摊开晾一夜，重新堆积成堆，使丹参堆“发汗”均匀，当丹

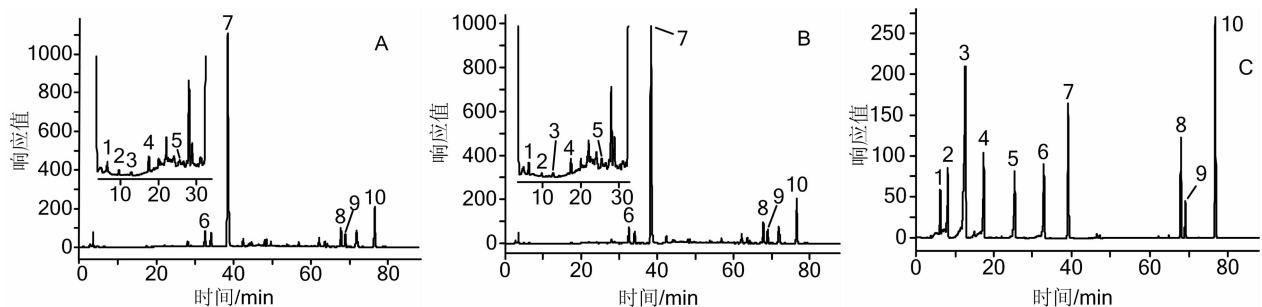
参根的内部断面变为紫红色时，摊开，置于洁净阴凉干燥通风处晾干。非“发汗”丹参通过常规处理方法进行，即将新鲜的丹参根（约 250 kg）置于背阴干燥洁净通风的地方阴干。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取适量的原儿茶酸、原儿茶醛、异阿魏酸、迷迭香酸、咖啡酸、丹参素、丹酚酸 B、丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 II A 对照品，加入甲醇配制成对照品储备液；精密吸取各成分储备液于同一容量瓶中，稀释定容，得到各成分质量浓度分别为 80、40、22、40、35、100、100、50、40、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.2 供试品溶液的制备 参照 2015 版《中华人民共和国药典》^[1]取干燥的“发汗”与非“发汗”丹参进行打粉，保存在密封袋中储存备用。精密称定“发汗”与非“发汗”丹参粉末各 1.0 g，放入具塞锥形瓶中，精密加入 90% 甲醇 25.0 mL，密塞，称质量，超声（功率 140 W，频率 42 kHz）40 min，称质量并用 90% 甲醇补足减失质量，收集上清液，再在锥形瓶中精密加入纯水 25.0 mL，超声 40 min，收集上清液，合并 2 次提取液，过滤，取续滤液即得供试品溶液。

2.3 HPLC 测定条件 色谱分析条件：COSMIL C_{18} 柱（4.6 mm \times 250 mm, 5 μm ）；流动相：乙腈（A）-0.05% 磷酸（B）；梯度洗脱（0~7 min, 10% A；7~15 min, 10%~20% A；15~35 min, 20%~25% A；35~55 min, 25%~60% A；55~85 min, 60%~80% A；85~87 min, 80%~10% A）；流速：1.0 mL/min；检测波长 280 nm；柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ ；进样量为 20 μL 。色谱图见图 1。



注：1. 丹参素；2. 原儿茶酸；3. 原儿茶醛；4. 咖啡酸；5. 异阿魏酸；6. 迷迭香酸；7. 丹酚酸 B；8. 隐丹参酮；9. 丹参酮 I；10. 丹参酮 II A

图 1 “发汗”丹参(A)、非“发汗”丹参(B)以及混合对照品(C)的 HPLC 图

2.4 线性试验及方法学考察

2.4.1 单体类成分线性关系考察 按“2.1”项下操作方法，精密量取一定容积的 10 个化合物的混合对照品储备液，加甲醇配制成质量浓度分别为丹参素 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、原儿茶酸 1.28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、原儿茶醛 0.64

$\mu\text{g}/\text{mL}$ 、咖啡酸 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、异阿魏酸 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、迷迭香酸 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、丹酚酸 B 1 024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、隐丹参酮 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、丹参酮 I 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、丹参酮 II A 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合对照品溶液，用甲醇进行逐级稀释，得到一系列不同浓度的混合对照品溶液，按“2.3”项

下的色谱参数进样测定,记录各色谱峰峰面积。以进样质量浓度(x)为横坐标,以峰面积(y)为纵坐标,得到线性回归方程,见表1。

表1 回归方程及线性范围

化合物	回归方程	R	线性范围/ ($\mu\text{g/mL}$)
丹参素	$y=5\ 017.3x-4\ 615.5$	0.999 9	5~160
原儿茶酸	$y=9\ 982.2x-141.38$	0.999 8	0.04~1.28
原儿茶醛	$y=136\ 110x-1\ 789.9$	0.999 8	0.02~0.64
咖啡酸	$y=32\ 581x+101.19$	0.999 8	0.50~16
异阿魏酸	$y=49\ 979x-1\ 095.5$	0.999 8	0.50~16
迷迭香酸	$y=38\ 629x-99\ 514$	0.999 9	5~160
丹酚酸B	$y=33\ 943x+88\ 491$	0.999 6	32~1\ 024
隐丹参酮	$y=42\ 163x+32\ 068$	0.999 9	4~128
丹参酮I	$y=43\ 426x+3\ 923.5$	0.999 9	2~64
丹参酮II A	$y=77\ 843x+185\ 327$	0.999 8	4~128

2.4.2 精密密度试验 按“2.3”项下色谱条件,分别取20 μL 的对照品溶液,重复进样6次,记录色谱图,结果见表2,得到10种标准品峰面积的RSD \leq 2.74%,表明仪器精密密度良好。

2.4.3 重复性试验 在同一“发汗”样品粉末中取6份,每份精密称定1.0 g,按“2.2”项下制备供试品,平行进样,记录色谱图,并计算10种活性成分的质量分数,各成分质量分数的RSD \leq 2.94%,表明该方法重复性良好。见表2。

2.4.4 稳定性试验 取上述“发汗”丹参供试品溶液,分别在室温放置0、8、16、24、48 h时进样,记录色谱图,各成分峰面积的RSD \leq 2.42%,说明供试品溶液在48 h内稳定。见表2。

2.4.5 加样回收率试验 取已知含量的供试品溶液6份,分别加入已知浓度的标准对照品溶液200 μL ,制备供试液,按“2.3”项下色谱条件测定,得到各成分的平均回收率 \leq 107.40%,RSD \leq 2.77%,说明该方法回收率较好。见表2。

表2 方法学考察结果($n=6$)

化合物	精密密度 RSD/%	稳定性 RSD/%	重复性 RSD/%	回收率/%	
				均数	RSD
丹参素	2.47	2.40	1.91	106.26	2.26
原儿茶酸	1.68	2.04	1.79	102.38	2.63
原儿茶醛	2.72	2.19	2.16	105.91	2.76
咖啡酸	2.31	1.41	2.36	100.14	2.77
异阿魏酸	1.94	2.42	2.12	101.87	1.28
迷迭香酸	2.73	2.17	0.92	103.74	2.52
丹酚酸B	1.05	2.29	1.13	102.74	2.76
隐丹参酮	2.48	2.35	2.94	104.38	2.63
丹参酮I	1.64	1.25	1.94	107.29	2.12
丹参酮II A	1.23	1.66	1.70	107.40	2.24

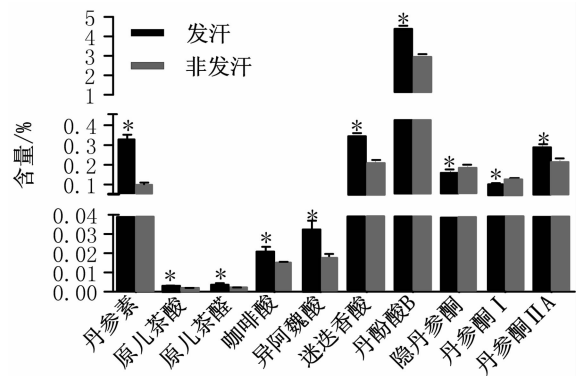
2.5 样品含量测定 从“发汗”与非“发汗”两组丹参样品中各组随机选取6批,按“2.2”项下方法制备

供试品溶液,按“2.3”项下色谱方法进行测定,记录各化合物峰面积,将所得峰面积代入回归方程中,计算“发汗”与非“发汗”丹参药材样品中10种成分含量,并采用两个独立样本 t 检验进行统计学分析,结果见表3,将得到的数据作图,得到的直观显示图见图2。

表3 “发汗”与非“发汗”丹参10种活性成分的质量分数($\bar{x}\pm s, n=6$)

活性成分	质量分数/%	
	“发汗”丹参	非“发汗”丹参
丹参素	0.323 0 \pm 0.025 0*	0.086 0 \pm 0.012 00
原儿茶酸	0.002 0 \pm 0.000 1*	0.001 0 \pm 0.000 30
原儿茶醛	0.001 8 \pm 0.000 3*	0.000 8 \pm 0.000 07
咖啡酸	0.020 0 \pm 0.003 0*	0.014 0 \pm 0.001 00
异阿魏酸	0.032 0 \pm 0.005 0*	0.016 0 \pm 0.003 00
迷迭香酸	0.333 0 \pm 0.037 0*	0.202 0 \pm 0.016 00
丹酚酸B	4.252 0 \pm 0.125 0*	2.850 0 \pm 0.103 00
隐丹参酮	0.158 0 \pm 0.009 0*	0.181 0 \pm 0.011 00
丹参酮I	0.093 0 \pm 0.005 0*	0.118 0 \pm 0.008 00
丹参酮II A	0.284 0 \pm 0.013 0*	0.212 0 \pm 0.011 00

注:与非“发汗”丹参比较,* $P<0.05$



注:与非“发汗”丹参比较,* $P<0.05$

图2 “发汗”丹参与“非发汗”丹参10种活性成分的质量分数($\bar{x}\pm s, n=6$)

2.6 主成分分析 为综合评价“发汗”与非“发汗”两种加工方法对丹参效应成分的影响,随机选取“发汗”与非“发汗”丹参各6批,以丹参中10种活性成分峰面积为分析指标,采用SPSS 23.0数据处理软件,对其进行主成分分析。结果显示,前两个主成分的特征值均大于1,而且前两个特征值之和占总特征值的90.618%,因此,提取前两个因子进行主成分分析,能够客观反映两种加工方法丹参的内在质量。见表4。

由因子载荷矩阵可以看出,丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸B、丹参酮II A在第1个因子上载荷较大,是对第一主成分影响大的特征向量,原儿茶酸在第2个因子上载荷较大(见表5),说明第一主成分包含丹参质量效应成分的大部分信息。

表4 主成分的特征值及贡献率

成分	初始特征值			提取载荷平方和			旋转载荷平方和		
	总计	方差百分比	累积百分比	总计	方差百分比	累积百分比	总计	方差百分比	累积百分比
1	7.664	76.642	76.642	7.664	76.642	76.642	6.840	68.399	68.399
2	1.398	13.975	90.618	1.398	13.975	90.618	2.222	22.219	90.618

表5 旋转后的成分矩阵

指标	主成分	
	1	2
丹参素	0.964	0.246
原儿茶酸	0.243	0.820
原儿茶醛	0.952	0.208
咖啡酸	0.960	0.158
异阿魏酸	-0.035	-0.845
迷迭香酸	0.978	0.150
丹酚酸B	0.967	0.032
隐丹参酮	-0.721	-0.636
丹参酮I	-0.871	-0.409
丹参酮IIA	0.924	0.335

采用上述得到的两个主成分对丹参两种加工方法进行评价,以各主成分因子得分与方差贡献率乘积之和相加,得到丹参两种加工方法的各类成分的总因子得分值 $F^{[9]}$, $F=0.76642F_1+0.13975F_2$,得到6批“发汗”丹参的综合评分的平均值大于6批非“发汗”的综合评分平均值,可初步确定“发汗”丹参质量优于非“发汗”丹参。以12批丹参效应成分为峰面积进行主成分分析,可以很好地将“发汗”与非“发汗”丹参进行区分。见图3。

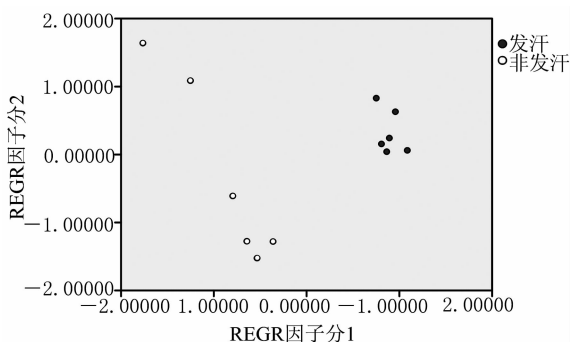


图3 “发汗”与非“发汗”丹参10种活性成分主成分分析图

3 讨论

本研究以HPLC同时测定了“发汗”与非“发汗”两种加工方法丹参药材中7种水溶性酚酸类成分和3种脂溶性酮类成分含量,而2015版《中华人民共和国药典》中采取了两种测定方法分别测定丹参酮类(隐丹参酮、丹参酮I、丹参酮IIA)和丹酚酸B成分的含量,相比较而言,本研究中的方法增加了对丹参素等有效成分的测定且能同时检测酮类和酚酸类成分,方法稳定,结果可靠,可用于后续相关研究中丹参多指标成分的测定。

丹参作为广泛应用的大宗药材,其质量直接影响着临床用药的有效性和安全性,丹参药材质量的优劣与产地加工工艺密切相关,含量测定结果表明,“发汗”与非“发汗”丹参差异较大。经“发汗”处理后,水溶性成分含量明显升高,研究^[3,10]表明,药材在“发汗”过程中自行产热,温度上升,为细胞中酶的活动创造有利条件,促进酚酸类成分的生成;本研究中隐丹参酮和丹参酮I含量略有下降,丹参酮IIA含量上升,与袁瑶等^[11]研究结果一致,可能是因为在相关活性酶如脱氢酶的作用下,颜色较浅的隐丹参酮等成分转化成颜色较深的丹参酮IIA^[4,12],此现象与“发汗”后药材断面颜色变深相一致。

主成分分析是将多个具有一定相关性的变量通过变换以选出互相无关联的几个综合变量的一种方法^[13],便于直观观测各变量间的关系。主成分分析结果表明,丹参“发汗”样品综合评分更高,综合质量更好,且“发汗”丹参与非“发汗”丹参能很好地区分。今后应进一步规范丹参的产地加工方法,以保证临床疗效。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:77.
- [2] 陈茹,陈成,杨兴鑫,等. 中药“发汗”炮制法的现代研究进展[J]. 中草药,2018,49(2):489-493.
- [3] 段金殿,宿树兰,严辉,等. 药材初加工“发汗”过程及其酶促反应与化学转化机制探讨[J]. 中草药,2013,44(10):1219-1225.
- [4] 刘红亮,晏仁义,邵爱娟,等. 中药材“发汗”对药材质量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(24):349-352.
- [5] 王晓宇,李青苗,吴萍,等. 不同加工方法对川产道地药材中江丹参药效成分的影响[J]. 中药材,2017,40(4):831-833.
- [6] 赵志刚,邵舒蕊,侯俊玲,等. 不同产地加工方法对山东丹参药材质量的影响[J]. 中国中药杂志,2014,39(8):1396-1400.
- [7] 王立萍. 流通领域市售丹参质量考察与评价[D]. 济南:山东中医药大学,2009:3-5.
- [8] LIANG W, CHEN W, WU L, et al. Quality evaluation and chemical markers screening of *Salvia miltiorrhiza* Bge. (Danshen) based on HPLC fingerprints and HPLC-MSⁿ coupled with chemometrics[J]. Molecules, 2017,22(3):478.

- [9] 刘培,陈京,周冰,等.不同干燥加工方法及其条件对杭白芷中香豆素及挥发油类化学成分的影响[J].中国中药杂志,2014,39(14):2653-2659.
- [10] 周铜水.丹参的主要活性成分丹酚酸 B 是采后干燥胁迫诱导的产物[J].中国现代中药,2013,15(3):211-218.
- [11] 袁瑶,季龙宝.传统发汗法对丹参中丹参酮 II A 的影响

[J].基层中药杂志,2002,16(3):29.

- [12] 沈雁,王立娜,张春枝,等.丹参酮转化酶的制备及其在丹参酮转化中的应用[J].大连轻工业学院学报,2007,26(1):21-23.
- [13] 杜焰,冯怡,徐德生,等.基于主成分分析的中药粉体流动性表征研究[J].中成药,2012,34(7):1258-1263.

(收稿日期:2018-08-21;编辑:张倩)

Content Determination of Ten Active Components in *Salvia miltiorrhiza* With or Without Sweating Treatment and Quality Evaluation Based on a Principal Component Analysis

WANG Ting^{1,2,3}, YU Fan^{1,2,3}, LI Guo-zhuan^{1,2,3}, QIU Zhen^{1,2,3}, CHEN Wei-dong^{1,2,3}, PENG Dai-yin^{1,2,3}, YU Nian-jun^{1,2}, WANG Guo-kai^{1,2}

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China; 2. Synergetic Innovation Center of Anhui Authentic Chinese Medicine Quality Improvement, Anhui Hefei 230012, China; 3. Institute of Drug Metabolism, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the differences in the content of 10 active components between *Salvia miltiorrhiza* with or without sweating treatment, and to perform a comprehensive evaluation of sweating and non-sweating processing methods. **Methods** The same batch of fresh products of *Salvia miltiorrhiza* were randomly divided into two groups and were given sweating and non-sweating treatment, respectively. The content of 10 active components (danshensu, protocatechuic acid, protocatechuic aldehyde, caffeic acid, isoferulic acid, rosmarinic acid, salvianolic acid B, cryptotanshinone, tanshinone I, and tanshinone II A) was determined, and a principal component analysis was performed for quality evaluation. **Results** Compared with the non-sweating group, the sweating group had increases in the content of salvianolic acid and tanshinone II A and slight reductions in the content of cryptotanshinone and tanshinone I. The principal component analysis showed that there was an increase in comprehensive score based on active component after sweating treatment. **Conclusion** *Salvia miltiorrhiza* with sweating treatment has better quality than that without sweating treatment.

[Key words] *Salvia miltiorrhiza*; Sweating; High-performance liquid chromatography; Content comparison; Principal component analysis