

• 药材与资源 •

丹参脂溶性成分的地域分布特点分析

杨新杰, 万德光, 林贵兵, 张琦, 王金燕, 严铸云*

(成都中医药大学药学院 中药材标准化教育部重点实验室, 四川 成都 610075)

摘要:目的 分析全国不同产地丹参中脂溶性成分量的变化情况及其地域分布特点。方法 采用 HPLC 法测定不同产地丹参脂溶性成分的量, 运用 SAS 统计软件分析丹参脂溶性成分相关性及其地域分布特点。结果 回归分析表明, 丹参药材中丹参酮 II_A 量与二氢丹参酮 I 量呈负相关, 与其他两种呈正相关。聚类分析表明, 3 个野生药材与山东和河南大部分产地、四川中江集凤镇栽培药材脂溶性成分较高聚为一类。建议丹参药材中二氢丹参酮 I $\geq 0.02\%$, 丹参酮 I $\geq 0.03\%$, 隐丹参酮 $\geq 0.02\%$, 丹参酮 II_A $\geq 0.2\%$ 。结论 丹参的脂溶性成分呈现地域性差异, 传统道地产区的量较高。丹参药材中二氢丹参酮 I $\geq 0.045\%$, 丹参酮 I $\geq 0.12\%$, 隐丹参酮 $\geq 0.10\%$, 丹参酮 II_A $\geq 0.35\%$, 才能符合历史上药用的要求。

关键词: 丹参; 脂溶性成分; HPLC; 聚类分析

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)05-0809-04

Analysis on geographical distribution of liposoluble constituents in *Salvia miltiorrhiza*

YANG Xin jie, WAN De guang, LIN Gui bing, ZHANG Qi, WANG Jin yan, YAN Zhu yun

(Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicines of Ministry of Education, College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

Abstract: **Objective** To analyze the content change of liposoluble constituents and their geographical distribution in *Salvia miltiorrhiza* from different habitats around China. **Methods** Determining the content of liposoluble constituents in *S. miltiorrhiza* from different habitats by HPLC and using SAS to analyze correlation between liposoluble constituents in *S. miltiorrhiza* and their geographical distribution. **Results** Regression analysis showed that content of tanshinone II_A and dihydro-tanshinone I presented negative correlation and positive correlation with the other two. Cluster analysis showed that three wild medicinal herbs and the cultivated species in most habitats of Shandong and Henan Provinces and Zhongjiang in Sichuan Province are one kind. Their contents of liposoluble constituents are higher, suggesting that dihydro-tanshinone I should be $\geq 0.02\%$, tanshinone I $\geq 0.03\%$, cryptotanshinone $\geq 0.02\%$, and tanshinone II_A $\geq 0.02\%$. **Conclusion** There are differences in liposoluble constituents in *S. miltiorrhiza* between different habitats. The contents are especially higher in traditional and original location. Dihydro-tanshinone I should be $\geq 0.045\%$, tanshinone I $\geq 0.12\%$, cryptotanshinone $\geq 0.10\%$, and tanshinone II_A $\geq 0.35\%$, which is consistent with the historical medical requirements.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge; liposoluble constituents; HPLC; cluster analysis

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的干燥根及根茎, 具有祛瘀止痛、活血通经、清心除烦等功效^[1]。其活性成分包括脂溶性和水溶性两部分, 活性脂溶性成分主要是丹参酮类, 具有抗氧化和免疫调节作用, 也是治疗冠心病等心血管疾

病的主要有效成分^[2,3]。但丹参的产地较多, 在现有的报道^[4-11]中不同学者对各地丹参化学成分分析的结果和结论相去甚远。本实验采用平行采样和平行分析方法, 对四川、山东、河南、河北、陕西、山西、江苏等 7 省 28 个主产地的丹参药材, 进行了二

①收稿日期: 2009-07-27

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAI09B03-4)

作者简介: 杨新杰(1981—), 男, 汉族, 陕西蒲城人, 成都中医药大学在读博士, 主要从事中药品种、质量与资源开发研究。

Tel: 13541048702 E-mail: xxx211xxx@126.com

* 通讯作者 严铸云 Tel: 13981964354 E-mail: cdtcm yan@126.com

氢丹参酮 I (dihydro-tanshinone I)、丹参酮 I (tanshinone I)、隐丹参酮(cryptotanshinone)、丹参酮 II_A(tanshinone II_A) 4 种脂溶性成分的 HPLC 分析, 为广大药检、药材生产、加工、购销及使用人员提供参考。

1 材料

1.1 样品: 2007 年 11 月在丹参各主产区采集栽培或野生丹参的根(产地情况见样品测定项)。采用平行采样, 每份样品为 20~ 25 点采集, 样品采集后快速运回实验室, 经常规加工处理。样品经成都中医药大学严铸云教授鉴定为丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的根。

1.2 仪器: Varian Prostar 系列高效液相色谱仪: 包括 Prostar 210 泵、Prostar 325 二极管阵列检测器和 Prostar 色谱工作站(美国 Varian 公司); 电子天平 (Made by Sartorius BP121S); BRANSON SB-2200 型超声仪。

1.3 药品与试剂: 丹参酮 II_A (批号 110766-200417)、隐丹参酮(批号 08529902)购自中国药品生物制品检定所; 丹参酮 I (批号 071106)、二氢丹参酮 I (批号 080319) 购自上海融禾医药科技有限公司。甲醇(色谱纯, Fisher Scientific), 甲醇(分析纯, 批号 20071205, 成都市联合化工试剂研究所), 水为去离子重蒸水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 WelchromTM C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm, 美国 Welch 公司)。流动相: A 相为甲醇, B 相为水, 梯度洗脱 A: 0~ 25 min 67%~ 67%, 25~ 45 min 67%~ 90%; B: 0~ 25 min 33%~ 33%, 25~ 45 min 33%~ 10%。体积流量: 1.0 mL/min; 进样量: 20 μL; 柱温: 室温; 检测波长: 270 nm。色谱图见图 1。

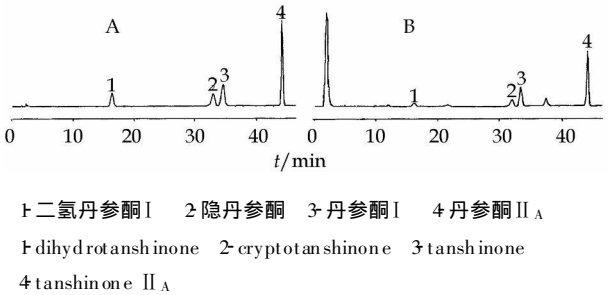


图 1 混合对照品(A)和样品(B)HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC Chromatograms of mixed reference substance (A) and sample (B)

2.2 对照品溶液的制备: 分别精密称取对照品置棕色量瓶中, 以甲醇为溶剂, 配制成单组分对照品溶

液, 再配制混合对照品溶液, 其中含二氢丹参酮 I 43.50 μg/mL、隐丹参酮 50.00 μg/mL、丹参酮 I 120.00 μg/mL、丹参酮 II_A 114.00 μg/mL。

2.3 样品溶液的制备: 取丹参药材粉末(过 3 号筛) 0.2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 10 mL, 密塞, 称定质量, 过夜, 超声提取 45 min, 冷却后再称定质量, 加甲醇补足减失质量, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 备用。

2.4 标准曲线的绘制: 取上述混合对照品溶液 1、2.5、5、10、15、20 μL, 按确定色谱条件进样, 测定峰面积, 进行线性回归。结果见表 1。

表 1 4 种脂溶性成分线性关系

Table 1 Linearing of four liposoluble constituents			
化合物	方程式	r	线性范围/μg
二氢丹参酮 I	$y = 3 \times 10^7 x + 155\,996$	0.999 8	0.044~ 0.87
隐丹参酮	$y = 1 \times 10^8 x - 451\,774$	0.999 7	0.05~ 1.00
丹参酮 I	$y = 3 \times 10^7 x + 4 \times 10^6$	0.999 7	0.12~ 2.40
丹参酮 II _A	$y = 7 \times 10^7 x - 7 \times 10^6$	0.999 6	0.114~ 2.28

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验: 取 2.2 项下混合对照品溶液连续进样 5 次, 所测二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II_A 4 个组分的峰面积的 RSD 分别为 1.40%、0.97%、1.13%、1.27%。

2.5.2 重现性试验: 取同一丹参药材, 精密称取 5 份, 按 2.3 项下制备方法处理, 进样分析, 测得样品中二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II_A 质量分数的 RSD 分别为 1.56%、0.92%、1.82%、1.43%。

2.5.3 稳定性试验: 取同一供试品溶液在 0、2、4、8、12、24 h 进样, 测得样品中二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II_A 的 RSD 分别为 1.84%、1.54%、1.43%、1.88%, 表明供试品在 24 h 内稳定。

2.5.4 加样回收率试验: 精密称取已测定的丹参样品适量共 9 份, 3 份为一组, 分别加入 3 种不同浓度(样品量的 80%、100%、120%) 的混合对照品溶液, 按 2.3 项制备方法处理, 进样后计算回收率。二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II_A 的平均回收率分别为 99.59%、100.98%、100.87%、97.95%; RSD 分别为 1.89%、1.55%、2.58%、1.94%。

2.6 样品测定: 取不同产地丹参药材, 按 2.3 供试品制备方法处理, 进样 20 μL 分析, 结果见表 2。

2.7 脂溶性成分的相关性分析: 采用 SAS 统计软件对 4 种丹参脂溶性成分进行回归分析, 分别得到 4 种脂溶性成分之间的回归模型, 其预测值为: 丹参

表 2 样品测定结果($n=4$)
Table 2 Determination of samples ($n=4$)

序号	产 地	二氢丹参酮 I / %	RSD / %	隐丹参酮 / %	RSD / %	丹参酮 I / %	RSD / %	丹参酮 II _A / %	RSD / %
1	安徽亳州十八里镇(栽培)	0.012	1.45	0.034	2.23	0.033	2.80	0.186	0.42
2	安徽亳州五马镇(栽培)	0.025	1.80	0.035	0.52	0.073	0.71	0.229	0.52
3	山东平邑流峪镇(栽培)	0.052	2.60	0.126	0.97	0.124	0.49	0.362	0.80
4	山东沂南砭埠乡(栽培)	0.044	2.33	0.081	1.66	0.151	0.61	0.418	0.91
5	山东日照三庄镇(栽培)	0.067	1.02	0.160	2.08	0.171	1.22	0.433	0.73
6	山东日照三庄镇(野生)	0.111	0.62	0.194	0.83	0.206	0.79	0.514	0.27
7	山东临朐吕厘镇(栽培)	0.076	2.88	0.104	1.36	0.200	0.42	0.374	0.65
8	山东莱芜苗山镇(栽培)	0.053	2.06	0.154	0.90	0.190	1.57	0.528	0.48
9	河南邓州十林镇(栽培)	0.045	1.99	0.071	0.81	0.059	2.32	0.205	0.97
10	河南栾川合峪镇(野生)	0.079	1.94	0.114	0.70	0.218	0.68	0.549	0.86
11	河南栾川合峪镇(栽培)	0.041	1.98	0.084	0.88	0.097	1.49	0.261	0.88
12	河南方城拐河镇(栽培)	0.114	1.33	0.159	1.43	0.217	1.33	0.442	1.71
13	河南卢氏朱阳关镇(野生)	0.152	2.32	0.184	0.54	0.289	1.18	0.486	0.41
14	河南灵宝阳平镇(栽培)	0.048	2.41	0.050	1.50	0.107	2.53	0.259	0.64
15	河南民权程庄镇(栽培)	0.013	1.96	0.016	0.83	0.028	1.56	0.226	0.34
16	四川中江古店乡(栽培)	—	—	0.038	0.66	0.069	1.05	0.199	0.68
17	四川中江集凤乡(栽培)	0.055	2.78	0.234	0.19	0.147	0.72	0.440	0.93
18	四川中江石泉乡(栽培)	0.018	2.48	0.056	1.31	0.023	1.81	0.208	0.92
19	四川中江石堰乡(栽培)	—	—	0.031	1.89	0.017	1.45	0.197	0.36
20	河北安国明官店乡(栽培)	0.028	2.49	0.037	2.02	0.083	2.02	0.208	0.34
21	河北行唐安香乡(栽培)	0.074	2.16	0.080	1.96	0.046	2.38	0.212	0.73
22	山西芮城东垆乡(栽培)	0.058	2.03	0.083	0.86	0.039	2.90	0.200	0.86
23	山西曲沃北董乡(栽培)	0.024	2.42	0.041	1.34	0.097	1.07	0.215	1.35
24	山西襄汾汾城镇(栽培)	0.014	2.48	0.020	1.71	0.009	2.07	0.215	0.87
25	陕西商洛元明村(栽培)	0.027	1.34	0.057	1.71	0.071	1.73	0.199	0.84
26	陕西蓝田玉山镇(栽培)	0.091	1.23	0.118	1.96	0.170	0.48	0.355	0.50
27	江苏射阳洋马镇(栽培)	—	—	0.007	0.52	0.008	2.57	0.183	0.57
28	江苏赣榆门河镇(栽培)	0.057	2.12	0.087	1.59	0.090	1.18	0.216	0.94
$\bar{x} \pm s$		0.055 1 ± 0.035		0.087 7 ± 0.059 67		0.108 3 ± 0.076 2		0.304 2 ± 0.102 4	

—表示未检出

— represents not be detected

酮 II_A = 0.132 80 + 1.367 96 × 丹参酮 I + 0.843 14 × 隐丹参酮 - 1.028 35 × 二氢丹参酮 I ; 丹参酮 I = - 0.050 43 - 0.156 57 × 隐丹参酮 + 0.416 28 × 丹参酮 II_A + 0.930 46 × 二氢丹参酮 I ; 二氢丹参酮 I = 0.021 20 + 0.464 42 × 丹参酮 I + 0.287 99 × 隐丹参酮 - 0.156 19 × 丹参酮 II_A ; 隐丹参酮 = - 0.034 68 - 0.214 05 × 丹参酮 I + 0.350 75 × 丹参酮 II_A + 0.788 78 × 二氢丹参酮 I 。

上式表明, 药材中丹参酮 II_A 量与二氢丹参酮 I 量呈负相关, 丹参酮 I 量与隐丹参酮呈负相关。说明所测的 4 种脂溶性成分在植物体内存在明显底物和产物的转化关系。

2.8 脂溶性成分与地理相关性: 聚类分析是一种常见的数据分析和探索方法, 用其可以判断样品或者变量间的亲疏远近。因此, 本实验按产地进行了丹参脂溶性成分的聚类分析, 具体分析方式如下: 用 SAS 统计软件中的 Hierarchical Cluster Analysis 对上述 28 个产地的丹参以 4 个脂溶性成分量之和

及丹参酮 II_A 的量作为变量进行聚类分析, 所用聚类方法为 Average linkage, 结果见图 2。

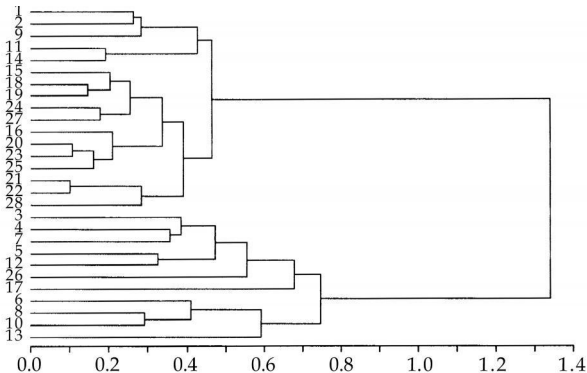


图 2 不同产地丹参脂溶性成分的聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis of liposoluble constituents in *S. miltiorrhiza* from different habitats

由图 2 可见, 根据脂溶性成分的量, 可把样品分为 2 组, 第 1 组包括 1、2、9、11、14、15、18、19、24、27、16、20、23、25、21、22、28, 4 个脂溶性成分质量分数之和为 0.198% ~ 0.483%, 丹参酮 II_A 质量分数

为 0.183% ~ 0.226%; 主要包括河北、陕西、山西、江苏、四川、河南。第 2 组包括 3、4、5、6、7、8、10、12、13、26、17, 4 个脂溶性成分质量分数之和为 0.664% ~ 1.111%, 丹参酮 II_A 质量分数为 0.355% ~ 0.549%; 主要包括山东和河南大部分产地、四川中江集凤镇栽培药材和 3 个野生药材, 这与山东、河南、四川中江被认为其道地产区一致, 但山东、河南和四川中江的质量也存在差别。可见丹参酮 II_A 质量分数与丹参中脂溶性成分量之和成正比, 所得结论与文献报道^[4]一致。

3 讨论

3.1 文献报道^[12] 丹参酮 II_A 等脂溶性成分用甲醇回流提取效果最佳。比较了 50% 甲醇、75% 甲醇、100% 甲醇回流提取, 结果表明 100% 甲醇回流提取较好。还以 100% 甲醇为提取溶剂, 比较了过夜超声提取 45 min, 回流提取 1 h, 索氏提取 5 h, 结果表明超声提取、回流提取和索氏提取无显著差异, 由于丹参酮 II_A 对热的不稳定性^[13], 为了尽量避免加热回流导致的成分破坏, 故选用超声提取法。

3.2 四川、河南、河北、山西、陕西、山东等地的家种及野生丹参脂溶性成分测定结果, 表明不同产地的丹参药材的脂溶性成分量存在差异, 山东各个产地的药材比较接近, 比其他省区的药材量要高; 而且同一产地所产丹参药材、野生丹参药材中所测得成分量比家种的要高。4 种成分中丹参酮 I 在各样品中量差异较大, 最大可达 30 倍。根据本次测定全国各产地样品结果, 建议二氢丹参酮 I $\geq 0.02\%$, 丹参酮 I $\geq 0.03\%$, 隐丹参酮 $\geq 0.02\%$, 丹参酮 II_A $\geq 0.2\%$; 依据道地产区推断古代优质丹参的质量: 二氢丹参酮 I $\geq 0.045\%$, 丹参酮 I $\geq 0.12\%$, 隐丹参酮 $\geq 0.10\%$, 丹参酮 II_A $\geq 0.35\%$ 。

3.3 采用 SAS 统计软件统计分析, 可知药材中丹参酮 II_A 量与二氢丹参酮 I 量呈负相关, 与隐丹参酮、丹参酮 I 量呈正相关。聚类分析结果表明 3 个野生药材与山东和河南大部分产地、四川中江集凤

镇栽培药材聚为一类, 与历史上出现以河南、山东、四川为道地产区相吻合, 这些产地的脂溶性成分较高。不同产地的丹参药材质量存在明显差别, 故在临床用药时从药材的来源进行控制。

3.4 本研究中采用平行采样和平行分析方法, 有效降低了采样误差和测试分析误差, 保证了数据的质量, 有关研究将后续报道。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005
- [2] 肖培根. 新编中药志[M]. 北京: 化学出版社, 2002
- [3] 陈 磊, 陆 茵, 郑仕中. 丹参药理活性成分的整合效应[J]. 中草药, 2009, 40(3): 476-479
- [4] 张月江, 赵淑明, 冯艳荣, 等. 四种不同产地丹参的质量考察[J]. 时珍国医国药, 2003, 14(1): 18
- [5] 唐晓清, 王康才, 陈 暄, 等. 丹参不同栽培类型的生物量与水溶性、脂溶性成分积累的相关性研究[J]. 中草药, 2006, 37(5): 753-758
- [6] 曹春泉, 孙隆儒, 王小宁. 白花丹参的化学成分研究(II)[J]. 中草药, 2009, 40(2): 173-175
- [7] 陈 幸, 黎万寿, 夏文娟, 等. 四川中江丹参与其他产地丹参化学成分的比较研究[J]. 中国中药杂志, 1997, 22(9): 522
- [8] 赵磊磊, 谢 凯, 朱盛山, 等. 不同产地丹参的 HPLC 和 TLC 图谱分析[J]. 中药材, 2007, 30(6): 646-648
- [9] 金樟照, 祝 明, 张文婷, 等. 不同产地丹参水溶性成分和脂溶性成分指纹图谱测定及相关性研究[J]. 中草药, 2004, 35(10): 1174-1177
- [10] 刘海清, 吕 东, 陈岳蓉, 等. 全国中药材市场商品丹参中 4 种脂溶性成分的 HPLC 测定[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(2): 229-301
- [11] 郑晓珂, 董三丽, 冯卫生, 等. HPLC 法测定丹参中丹参素、丹参酮 II_A、二氢丹参酮 I、隐丹参酮的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(6): 12-15
- [12] 刘重芳, 张钰泉, 戴居云, 等. 丹参不同提取工艺比较[J]. 中成药, 1999, 29(8): 385-388
- [13] 杜志谦, 冯 坤, 刘月桂, 等. 丹参中丹参酮 II_A 受热降低的规律研究[J]. 中草药, 2002, 33(10): 892-893