

丹参标准提取物制备工艺与质量控制研究

朱志豪, 聂宇迪, 杨 澜, 申雯超, 刘斯琪, 靳明烜, 王如峰*

北京中医药大学生命科学院, 北京 102488

摘要: 目的 开发丹参 *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* 标准提取物的制备工艺, 并建立其质量控制方法。方法 采用层次分析法 (analytic hierarchy process, AHP) 结合 $L_9(3^4)$ 正交试验, 以总丹酚酸、总丹参酮、总多糖提取率和出膏率为参考指标, 开发丹参标准提取物的制备工艺; 利用 HPLC 法、紫外-可见分光光度法 (UV-Vis) 对 15 批丹参提取物进行定性和定量分析, 建立丹参标准提取物质量控制方法。结果 丹参标准提取物最佳制备工艺为丹参饮片加 10 倍量 80% 乙醇水回流提取 3 次, 每次 1 h, 药渣再加 9 倍量超纯水回流提取 3 次, 每次 1.5 h, 合并滤液, 冷冻干燥后即得。15 批丹参标准提取物 HPLC 指纹图谱中有 16 个共有峰, 对其中 12 个共有峰进行了指认, 相似度评价均大于 0.830; 其中丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、丹酚酸 E、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 A、丹酚酸 B 8 种成分的总质量分数为 2.87%~16.06%, 二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 4 种成分的总质量分数为 0.17%~1.09%, 总多糖质量分数为 2.04%~3.17%; 多糖相对分子质量分布明显分为高、中、低 3 个部分, 分别为 $3.94 \times 10^5 \sim 4.50 \times 10^5$ 、 $6.69 \times 10^3 \sim 2.00 \times 10^4$ 和 $1.20 \times 10^3 \sim 1.28 \times 10^3$ 。结论 开发的先乙醇提取再用水提取的制备工艺可有效提取丹参中的丹酚酸类、丹参酮类和多糖类成分; 建立的丹参标准提取物质量控制方法稳定、可靠, 可用于丹参提取物的质量控制。

关键词: 丹参; 标准提取物; 制备工艺; 质量控制; 丹酚酸类; 丹参酮类; 多糖类; 丹参素; 原儿茶醛; 咖啡酸; 丹酚酸 E; 迷迭香酸; 紫草酸; 丹酚酸 A; 丹酚酸 B; 二氢丹参酮 I; 隐丹参酮; 丹参酮 I; 丹参酮 II_A

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)10-3460-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.10.006

Preparation process and quality control of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* standard extract

ZHU Zhihao, NIE Yudi, YANG Lan, SHEN Wenchao, LIU Siqu, JIN Mingxuan, WANG Rufeng

School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective To develop a preparation process of standard extract from Danshen (*Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*, SMRR) (SMRR-SE) and establish its quality control method. **Methods** The extraction rates of total salvianolic acids, tanshinones and polysaccharides and extraction rate of solid substances were used as evaluation indicators, and the analytic hierarchy process (AHP) combined with $L_9(3^4)$ orthogonal experiment was used to develop the preparation process of SMRR-SE. Fifteen batches of SMRR extracts were analyzed qualitatively and quantitatively by HPLC and ultraviolet-visible spectrophotometry (UV-Vis) to establish the quality control method for SMRR-SE. **Results** The optimal preparation process of SMRR-SE was as follow: the SMRR decoction pieces were extracted with 10 volumes of 80% aqueous ethanol under reflux for 1 h for three times; then, the residue was further extracted with nine volumes of purified water for 1.5 h for three times. The combined filtrates were lyophilized to obtain the SMRR-SE. The HPLC fingerprints of fifteen batches of SMRR-SE were established with 16 common peaks including 12 identified ones, and the inter-batch similarities were all greater than 0.830. The content of eight compounds, including danshensu, protocatechuic aldehyde, caffeic acid, salvianolic acid E, rosmarinic acid, lithospermic acid, salvianolic acid A and salvianolic acid B ranged from 2.87% to 16.06%, that of four compounds, including dihydrotanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone I, and tanshinone II_A, ranged from 0.17% to 1.09%, and that of the total polysaccharides ranged from 2.04% to 3.17%. The molecular weight distribution of polysaccharides in most of SMRR-SE was clearly divided into high, medium and low parts, with distributions ranging from $3.94 \times 10^5 \sim 4.50 \times 10^5$,

收稿日期: 2025-01-22

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目 (2022YFC3501704)

作者简介: 朱志豪, 硕士研究生, 研究方向为中药化学成分与质量控制。E-mail: 14757966691@163.com

*通信作者: 王如峰, 教授, 博士生导师, 从事中药化学成分研究。E-mail: wrf@bucm.edu.cn

6.69×10^3 — 2.00×10^4 , and 1.20×10^3 — 1.28×10^3 , respectively. **Conclusion** The developed preparation process with successive extraction using aqueous ethanol and ultrapure water can efficiently extract salvianolic acids, tanshinones and polysaccharides from SMRR. The established quality control method for SMRR-SE is stable and reliable, which can be used for the quality control of SMRR extract.

Key words: *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*; standard extract; preparation process; quality control; salvianolic acids; tanshinones; polysaccharides; danshensu; protocatechuic aldehyde; caffeic acid; salvianolic acid E; rosmarinic acid; lithospermic acid; salvianolic acid A; salvianolic acid B; dihydrotanshinone I; cryptotanshinone; tanshinone I; tanshinone II_A

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎，始载于《神农本草经》，具有活血祛瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痈^[1]的功效。现代药理研究发现，丹参具有抗凝血^[2]、抗炎^[3]、抗氧化^[4]、抗纤维化^[5]、抗肿瘤^[6]、脏器保护^[7]等作用。其化学成分主要包括丹参酮类、丹酚酸类、多糖类、挥发油类等^[8]。目前，丹参的有效成分研究主要集中于丹酚酸类和丹参酮类成分，它们被认为是丹参的主要活性成分。然而，丹参多糖也具有抗炎^[9]、抗氧化^[10-11]、抗肿瘤^[12]、脏器保护^[13]等作用，并且与丹参的各种功效密切相关。例如，丹参多糖可以通过调节体内的抗氧化酶发挥抗氧化作用，从而减少血管内皮损伤^[14]。《中国药典》2020 年版收载的丹参片、复方丹参丸、复方丹参片等制剂中虽然只将丹酚酸类和丹参酮类成分作为指标成分，但其制备工艺中仍然兼顾到了多糖类成分的提取。因此，丹参的提取物，特别是标准提取物中应该包含多糖，并将其作为质量控制指标之一。

中药标准提取物是指采用现代科学技术，对传统中药材进行提取加工而得到的药效物质相对明确、质量标准严格的一种中药产品，可作为中药制剂的原料药^[15]。中药提取物在医药、保健品和美容领域有广泛的应用，例如由三七醇皂苷制得的三七通舒胶囊^[16]、银杏叶提取物制得的银杏叶丸^[17]、刺五加提取物制得的刺五加浸膏的临床应用^[18]，金银花提取物制得的相关产品在保健品领域的应用^[19]，以及薏苡仁提取物开发的系列防晒产品^[20]等。目前，中药标准提取物工艺研究较多，如水提法^[21]、乙醇回流提取法^[22-23]、超声提取法^[22]、水提醇沉法^[24]、水蒸气蒸馏法^[25]、大孔树脂柱纯化法^[22-23,26]等。当前，丹参提取物的研究和《中国药典》2020 年版收载的丹参提取物制备工艺主要包括水煎提取法^[27]、乙醇回流提取法^[1,28]、水提醇沉法^[1,29]、大孔树脂纯化法^[29]等。大部分制备方法将丹酚酸类和丹参酮类成分单独提取制备，步骤复杂、指标单一，而且没有考虑多糖的标准化制备和质量控制，无法全面传

递丹参的药效物质及功效。

本研究充分考虑丹参成分的全面性，通过比较水提取法和乙醇提取法对丹参中水溶性成分和脂溶性成分提取的影响，确定了包含丹酚酸类、丹参酮类、多糖类成分的最佳制备工艺，并在质量控制方法中，增加丹参多糖作为质量控制指标，综合控制标准提取物的质量，以期稳定标准提取物中药效成分的含量，有效利用丹参药材。

1 仪器与材料

1.1 仪器

LC-20AT 型、LC-10A 型高效液相色谱仪，日本岛津公司；UV-2100 型紫外-可见分光光度计，尤尼柯（上海）仪器有限公司；ME204/02 型万分之一级天平，美国泛华医药公司；SQP 型十万分之一级天平，赛多利斯科学仪器（北京）有限公司；KQ-500DE 型数控超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司；SCIENTZ-10N 型冷冻干燥机，宁波新芝生物科技股份有限公司；Milli-Q 超纯水机，美国默克密理博公司。

1.2 药材

16 批丹参饮片来自 10 个省份，其中山东 DS0~DS3（批号分别为 2022110801、2022110802、2023110301、2023110302）、河北 DS4（批号 2023110303）批次购自河北安国中药材专业市场，湖南 DS5（批号 2024041601）、陕西 DS6（批号 2024041602）、宁夏 DS7（批号 2024041603）、四川 DS8（批号 2024041604）批次购自四川成都荷花池中药材专业市场，安徽 DS9（批号 2024043001）、河南 DS10（批号 2024043002）、山西 DS11（批号 2024043003）、甘肃 DS12（批号 2024043004）批次购自安徽亳州中药材专业市场，山西 DS13（批号 2024050201）、河南 DS14（批号 2024050202）批次购自当地种植户，安徽 DS15（批号 2024050301）批次购自北京同仁堂，经北京中医药大学生命科学院王如峰教授鉴定为唇形科鼠尾草属植物丹参 *S. miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎。

1.3 对照品与试剂

对照品原儿茶醛(批号 J1025AS)购自美仑生物技术有限公司,质量分数>98.0%;对照品丹参素(批号 RFS-D03611812016)、紫草酸(批号 RFS-Z00802112006)、丹酚酸 A(批号 RFS-D01102201004)、丹酚酸 B(批号 RFS-D01202206028)、二氢丹参酮 I(批号 RFS-E00402208031)、隐丹参酮(批号 RFS-Y00211801022)、丹参酮 I(批号 RFS-D00601901003)、丹参酮 II_A(批号 DFS-D00802106015)均购自成都瑞芬思德丹生物科技有限公司,质量分数均>98.0%;对照品迷迭香酸(批号 111871-201505),质量分数>98.0%,购自中国食品药品检定研究院;对照品咖啡酸(批号 Y2508C46530)、丹酚酸 E(批号 O11GB163261)、葡萄糖(批号 N03IB230669)均购自上海源叶生物科技有限公司,质量分数均>98.0%;P5~P800 葡聚糖(批号 10202)购自 SHOWA DENKO 公司,质量分数均>97.0%。

色谱级甲醇(批号 F24O85202)和乙腈(批号 F24OB4202)购自赛默飞世尔科技中国有限公司;分析纯磷酸和苯酚购自上海麦克林生化科技股份有限公司;乙醇(质量分数>95%)购自梅河口市阜康酒精有限责任公司;分析纯三氯甲烷和硫酸购自北京市通广精细化工公司;分析纯正丁醇购自北京益利精细化学品有限公司;分析纯氢氧化钠购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;分析纯氯化钠购自天津市科密欧化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 UV-Vis 测定各组份含量方法的建立

2.1.1 供试品溶液的制备和检测

(1) 总丹酚酸测定:精密称取丹参提取物粉末 200.0 mg 于 150 mL 锥形瓶中,加 40 mL 80%甲醇水溶液,称定质量。80 °C 超声 30 min(功率 500 W、频率 40 kHz),放冷。复称后用 80%甲醇水溶液补足减失的质量,4 000 r/min 离心(离心半径 5 cm) 15 min,取 0.3 mL 上清液于 10 mL 棕色量瓶中,加入 5%亚硝酸钠溶液 0.5 mL,混匀,再加入 10%硝酸铝溶液 0.5 mL,混匀。反应 5 min,再用 1 mol/L 氢氧化钠溶液定容至刻度,摇匀后用 UV-2100 型紫外-可见分光光度计于 496 nm 波长处测定吸光度(*A*)值。

(2) 总丹参酮测定:精密称取丹参提取物粉末 500.0 mg 于 150 mL 锥形瓶中,加 40 mL 甲醇,称定质量。70 °C 超声(功率 500 W、频率 40 kHz) 30

min,放冷。复称后用甲醇补足减失的质量,4 000 r/min 离心(离心半径 5 cm) 15 min,取 0.2 mL 上清液于 10 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,混匀后用 UV-2100 型紫外-可见分光光度计于 268 nm 波长下测定 *A* 值。

(3) 总多糖测定:精密称取丹参提取物粉末 200.0 mg 于 150 mL 锥形瓶中,加 40 mL 超纯水。70 °C 超声 30 min(功率 500 W、频率 40 kHz),放冷。复称后用超纯水补足减失的质量,4 000 r/min 离心(离心半径 5 cm) 15 min,吸取 1 mL 上清液于 15 mL 离心管(Eppendorf tube, EP)中,加入 95%乙醇至溶液终体积分数为 70%。混匀后静置 12 h,4 000 r/min 离心(离心半径 11 cm) 10 min。沉淀用 1 mL 超纯水溶解,向溶液中加入 Sevage 试剂(三氯甲烷-正丁醇 4:1) 2 mL,混匀,4 000 r/min 离心(离心半径 11 cm) 10 min。吸取 0.4 mL 上清液,加超纯水补至 2 mL,混匀后加入 1 mL 5%苯酚溶液,混匀。快速加入 5 mL 硫酸,混匀后静置 5 min,沸水浴 15 min。冷却至室温,用 UV-2100 型紫外-可见分光光度计于 490 nm 处测定 *A* 值。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取对照品丹酚酸 B 3.12 mg、丹参酮 II_A 2.59 mg、葡萄糖 5.00 mg,分别用 80%甲醇水溶液、甲醇和超纯水配制成含丹酚酸 B 124.8 μg/mL、丹参酮 II_A 103.6 μg/mL 和葡萄糖 1 030.4 μg/mL 的单一对照品储备液。

2.1.3 线性关系考察 精密吸取各对照品储备液,配制成系列质量浓度梯度的对照品溶液,按照“2.1.1”项下方法进行检测。以对照品质量浓度为横坐标(*X*),以 *A* 值为纵坐标(*Y*),绘制标准曲线,进行线性回归,得回归方程分别为丹酚酸 B $Y=0.0337X+0.0095$, $R^2=0.9990$,线性范围 3.120~20.592 μg/mL;丹参酮 II_A $Y=0.0989X-0.0538$, $R^2=0.9997$,线性范围 2.072~10.360 μg/mL;葡萄糖 $Y=0.0142X+0.0029$, $R^2=0.9996$,线性范围 10.304~51.520 μg/mL。

2.1.4 精密度试验 取各对照品溶液,连续测定 6 次,测得总丹酚酸、总丹参酮、总多糖 *A* 值的 RSD 分别为 0.27%、0.17%、0.25%,结果表明该仪器精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 精密称取各丹参提取物粉末,按照“2.1.1”项下各自的方法制备供试品溶液,按照各自的方法每 20 分钟测定 1 次 *A* 值,持续 120 min,测得总丹酚酸、总丹参酮、总多糖 *A* 值的 RSD

分别为 1.81%、0.63%、0.88%，结果表明各供试品溶液在 120 min 内稳定性良好。

2.1.6 重复性试验 精密称取各丹参提取物各 6 份，按照“2.1.1”项下各自的方法制备供试品溶液并进行检测，测得总丹酚酸、总丹参酮、总多糖质量分数的 RSD 分别为 1.56%、1.84%、1.95%，结果表明该方法重复性良好。

2.1.7 加样回收率试验 精密称取已测知各指标成分含量的丹参提取物各 6 份，分别加入对应对照品储备液适量，按照“2.1.1”项下各自的方法制备供试品溶液并进行检测，计算各指标成分的加样回收率。结果显示，总丹酚酸的加样回收率为 100.42%，RSD 为 1.80%；总丹参酮的加样回收率为 100.46%，RSD 为 1.46%；总多糖的加样回收率为 97.55%，RSD 为 1.09%。

2.2 丹参提取物制备工艺考察

2.2.1 层次分析法(analytic hierarchy process, AHP) 确定指标成对比较优先判断矩阵及各指标权重系数 选择总丹酚酸、总丹参酮、总多糖提取率和出膏率为评价指标，根据各类成分在丹参中的药理作用，查阅相关文献，确定权重指标给予量化，各层次评分标准见表 1。

表 1 各层次评分标准

Table 1 Grading criteria for each level

对比打分	相对重要程度
1	同等重要
3	稍微重要
5	明显重要
7	强烈重要
9	绝对重要
2, 4, 6, 8	以上相邻标度重要性的中间值
倒数	若 i 与 j 的重要性之比为 a_{ij} ，则 j 与 i 的重要性之比为 $1/a_{ji}$

确定各指标的优先顺序为总丹酚酸提取率 = 总丹参酮提取率 > 总多糖提取率 > 出膏率。构建各指标成对比较的优先判断矩阵，赋予各项指标间的相对评分，指标成对比较的优先矩阵见表 2。按照公式 $a_{ij}' = a_{ij} / \sum_{k=1}^n a_{kj}$ 将矩阵每一列进行归一化处理，再按照公式 $w_i = \sum_{j=1}^n a_{ij}' / n$ 计算各指标归一化权重系数 (w)，得总丹参酮、总丹酚酸、总多糖提取率和出膏率的权重系数分别为 0.388 9、0.388 9、0.153 5、0.068 7。按照公式 $\lambda_{\max} = \sum_{i=1}^m (\sum_{j=1}^m a_{ij} w_j / w_i) / m$ 和 $CI = (\lambda_{\max} - m) / (m - 1)$ 计算一致性检验因子 (consistency

表 2 指标成对比较的判断优先矩阵

Table 2 Priority matrix for comparison on index pairs

权重指标	总丹酚酸	总丹参酮	总多糖	出膏率
总丹酚酸	1	1	3	5
总丹参酮	1	1	3	5
总多糖	1/3	1/3	1	3
出膏率	1/5	1/5	1/3	1

index, CI)，得 $CI = 0.014 6$ 。查表可得平均随机一致性指标 (randomization index, RI)，按照公式 $CR = CI / RI$ 计算一致性比例因子 (consistency ratio, CR)，得 $CR = 0.016 4 < 0.1$ ，表明此 4 项指标优先比较矩阵满足一致性要求，计算的权重系数合理有效。

2.2.2 评价指标综合评分的计算 根据“2.2.1”项中得到的各指标权重系数，计算综合评分值 = 总丹酚酸提取率/丹酚酸提取率最大值 $\times 0.388 9 \times 100 +$ 总丹参酮提取率/丹参酮提取率最大值 $\times 0.388 9 \times 100 +$ 总多糖提取率/多糖提取率最大值 $\times 0.153 5 \times 100 +$ 出膏率/出膏率最大值 $\times 0.068 7 \times 100$ 。通过比较评分值的大小，综合考察不同浓度的乙醇对总丹参酮、总丹酚酸、总多糖和干膏的提取情况，选取最佳的提取溶剂。

2.2.3 提取溶剂考察 称取 DS0 丹参饮片 20 g，分别加入 10 倍量超纯水及 20%、40%、50%、60%、80%、95% 乙醇水溶液回流提取 3 次，每次 1.0 h。每种溶剂重复提取 3 次，滤过，合并滤液。将提取液减压浓缩，冷冻干燥，称取干燥后的提取物质量，按照“2.1.1”项下方法测定总丹参酮、总丹酚酸、总多糖提取率和出膏率，计算综合评分值。根据各溶剂提取结果，并对先醇提后水提的提取方式进行考察：称取 DS0 丹参饮片 20 g，加入 10 倍量 60% 或 80% 乙醇水回流提取 3 次，每次 1.0 h，醇提后饮片再加入 10 倍量超纯水回流提取 3 次，每次 1.0 h，滤过，合并滤液后浓缩干燥，测定各指标数据，计算综合评分值，结果见表 3，结果表明丹参饮片先用 80% 乙醇水溶液提取，药渣再用超纯水提取的效果最好。

2.2.4 乙醇提取工艺正交试验 在确定提取溶剂的基础上，以提取时间 (A)、提取次数 (B)、溶剂用量 (C) 为考察因素，参考已有的文献报道^[30-31]选择合适的水平。称取 DS0 丹参饮片 9 份，每份 20 g，按照 $L_9(3^4)$ 正交试验表设计的方法加入相应倍量 80% 乙醇水进行回流提取，滤过，滤液经浓缩后冷冻干燥。正交试验设计与结果见表 4、5，方差分析

表 3 不同溶剂提取各组分结果 ($n=3$)
Table 3 Extraction results of components with different solvents ($n=3$)

类别	出膏率/ %	质量分数/%			综合 评分
		总丹酚酸	总丹参酮	总多糖	
超纯水	56.70	4.38	0.89	2.03	80.20
20%乙醇	56.32	4.55	1.03	1.47	82.49
40%乙醇	56.28	4.66	1.18	1.36	87.06
50%乙醇	51.92	4.46	1.20	1.38	85.61
60%乙醇	53.80	4.41	1.27	1.20	86.41
80%乙醇	42.40	3.15	1.24	1.03	72.92
95%乙醇	9.43	0.52	0.59	0.21	23.71
60%乙醇+水	62.05	4.57	1.31	2.53	97.65
80%乙醇+水	61.70	4.76	1.32	2.58	99.96

表 4 乙醇提取 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平、试验设计及 AHP 分析结果

Table 4 $L_9(3^4)$ orthogonal test design and AHP results of ethanol extraction process

试验号	A/h	B/次	C/倍	D(空白)	出膏率/%	总丹酚酸/%	总丹参酮/%	总多糖/%	综合评分
1	1.0 (1)	1 (1)	6 (1)	(1)	21.30	1.49	0.79	0.49	54.74
2	1.0 (1)	2 (2)	8 (2)	(2)	38.85	2.55	1.07	0.91	85.87
3	1.0 (1)	3 (3)	10 (3)	(3)	43.80	3.22	1.20	0.92	99.01
4	1.5 (2)	1 (1)	8 (2)	(3)	24.85	1.83	0.84	0.51	61.23
5	1.5 (2)	2 (2)	10 (3)	(1)	43.05	2.85	1.14	0.85	91.28
6	1.5 (2)	3 (3)	6 (1)	(2)	41.90	3.18	1.12	0.86	94.70
7	2.0 (3)	1 (1)	10 (3)	(2)	29.35	2.01	0.91	0.59	67.56
8	2.0 (3)	2 (2)	6 (1)	(3)	36.90	2.79	1.01	0.74	83.95
9	2.0 (3)	3 (3)	8 (2)	(1)	46.15	3.26	1.19	0.93	99.61

表 5 乙醇提取 $L_9(3^4)$ 正交试验直观分析

Table 5 Intuitive analysis of $L_9(3^4)$ orthogonal test of ethanol extraction process

水平	A/h	B/次	C/倍	D(空白)
K_1	239.63	183.53	233.40	245.64
K_2	247.21	261.10	246.71	248.13
K_3	251.12	293.33	257.86	244.19
R	3.83	36.60	8.15	1.31

表 6 乙醇提取 $L_9(3^4)$ 正交试验方差分析结果

Table 6 Variance analysis of $L_9(3^4)$ orthogonal test of ethanol extraction process

误差来源	离差平方和	自由度	F 值	P 值	显著性
A	22.767	2	8.612	0.104	无
B	2 123.363	2	803.159	0.001	$P<0.01$
C	99.968	2	37.813	0.026	$P<0.05$
D(空白)	2.644	2			

入相应倍量的超纯水进行回流提取,滤过,滤液经浓缩后冷冻干燥。水提取 AHP 综合分析结果见表

结果见表 6。结果表明, $A_3>A_2>A_1$, $B_3>B_2>B_1$, $C_3>C_2>C_1$, 因素 B 和因素 C 为显著性因素, 它们的极差和 F 值都比因素 A 要高, 说明它们对醇提工艺的影响较大。A 为不显著性因素, 对工艺的影响较小, 结合工业生产成本, 故考虑缩短提取时间。综上所述, 确定醇提最佳提取工艺为 $A_1B_3C_3$, 即加 10 倍量 80%乙醇水回流提取 3 次, 每次 1 h。

2.2.5 水提取工艺正交试验 以提取时间(A)、提取次数(B)、溶剂用量(C)为考察因素, 参考已有的文献报道^[32-33]选择合适的水平。称取 DS0 丹参饮片 9 份, 每份 20 g, 用上述 80%乙醇水溶液最佳提取工艺提取丹参饮片后, 滤过, 弃去滤液。取醇提后丹参饮片按 $L_9(3^4)$ 正交试验表设计的方法, 加

7~9, 水提取丹参多糖正交试验结果见表 7~9。

水提取 AHP 综合分析结果显示无显著性影响因素。水提取总多糖结果表明, $A_3>A_2>A_1$, $B_3>B_2>B_1$, $C_3>C_2>C_1$, 因素 A 和因素 B 为显著性因素, 它们的极差和 F 值都比因素 C 要高, 说明它们对水提工艺的影响较大。提取时间对多糖类成分有显著影响, 但对 3 类总成分的综合影响较小, 综合考虑总多糖提取率和实际生产成本, 选择 $A_2(1.5\text{ h})$ 作为提取时间。C 为不显著性因素, 对工艺的影响较小, 因此可以考虑减少溶剂用量。综上所述, 确定水提最佳工艺为 $A_2B_3C_1$, 即加 9 倍量超纯水提取 3 次, 每次 1.5 h。

2.2.6 工艺验证 称取丹参饮片 20 g, 以优化后的工艺进行提取, 合并滤液, 60 °C 减压浓缩至一定体积, 转移至冻干机中冷冻干燥后即得, 重复提取 3 次。测得 3 批提取物的出膏率和各组分提取率 RSD 值均小于 2%, 表明该丹参标准提取物制备工艺稳定, 结果如表 10 所示。

表 7 水提取 L₉(3⁴)正交试验因素水平、试验设计及 AHP 分析结果

Table 7 Orthogonal test design and AHP analysis results of water extraction process

试验号	A/h	B/次	C/倍	D (空白)	出膏率/%	总丹酚酸/%	总丹参酮/%	总多糖/%	综合评分
1	1.0 (1)	1 (1)	9 (1)	(1)	11.35	1.12	0.13	0.44	73.34
2	1.0 (1)	2 (2)	12 (2)	(2)	15.05	1.28	0.11	1.00	77.66
3	1.0 (1)	3 (3)	15 (3)	(3)	18.20	1.54	0.13	1.28	93.40
4	1.5 (2)	1 (1)	12 (2)	(3)	12.05	1.10	0.10	0.67	64.95
5	1.5 (2)	2 (2)	15 (3)	(1)	17.60	1.52	0.13	1.18	91.34
6	1.5 (2)	3 (3)	9 (1)	(2)	17.65	1.38	0.13	1.36	91.51
7	2.0 (3)	1 (1)	15 (3)	(2)	14.00	1.23	0.12	0.78	77.98
8	2.0 (3)	2 (2)	9 (1)	(3)	17.05	1.38	0.13	1.23	90.45
9	2.0 (3)	3 (3)	12 (2)	(1)	18.65	1.68	0.13	1.43	98.06

表 8 水提取 L₉(3⁴)正交试验直观分析

Table 8 Intuitive analysis of L₉(3⁴) orthogonal test of water extraction process

水平	综合评分				总多糖			
	A/h	B/次	C/倍	D (空白)	A/h	B/次	C/倍	D (空白)
K ₁	244.402	216.270	255.303	262.748	2.717	1.890	3.026	3.052
K ₂	247.802	259.443	240.668	247.145	3.209	3.414	3.104	3.135
K ₃	266.485	282.976	262.718	248.796	3.451	4.072	3.247	3.189
R	7.361	22.235	7.350	5.201	0.245	0.727	0.074	0.046

表 9 水提取 L₉(3⁴)正交试验方差分析结果

Table 9 Variance analysis of L₉(3⁴) orthogonal test of water extraction process

误差来源	自由度	综合评分				总多糖			
		离差平方和	F 值	P 值	显著性	离差平方和	F 值	P 值	显著性
A	2	94.256	1.924	0.342	无	0.093	29.542	0.033	P<0.05
B	2	763.056	15.579	0.060	无	0.835	264.228	0.004	P<0.01
C	2	83.930	1.714	0.369	无	0.008	2.655	0.274	无
D (空白)	2	48.981				0.003			

表 10 工艺验证结果

Table 10 Results of preparation process validation

序号	出膏率/%	总丹酚酸/%	总丹参酮/%	总多糖/%
1	61.16	4.58	1.32	1.51
2	61.49	4.75	1.35	1.52
3	60.17	4.69	1.31	1.47
均值	60.94	4.67	1.33	1.50
RSD/%	1.13	1.89	1.70	1.75

2.3 丹参提取物制备

分别称取 15 批丹参饮片 (DS1~DS15) 各 20 g, 按上述优化工艺进行提取, 合并滤液, 60 ℃减压浓缩, 冷冻干燥后即得。

2.4 丹参提取物 HPLC 指纹图谱建立

2.4.1 对照品溶液制备 精密称取各对照品适量, 加 80%甲醇水超声溶解, 即得对照品储备液。

2.4.2 供试品溶液制备 精密称取各丹参提取物

粉末 200.0 mg, 置于锥形瓶中, 加 80%甲醇水溶液 50 mL, 称定质量。超声 (功率 500 W、频率 40 kHz) 30 min, 冷却至室温, 称定质量。用 80%甲醇水溶液补足减失的质量, 摇匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 续滤液作为丹参供试品溶液。

2.4.3 色谱条件 色谱柱为 Agela C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.05%磷酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱: 0~10 min, 8%~20%乙腈; 10~15 min, 20%~25%乙腈; 15~20 min, 25%乙腈; 20~27 min, 25%~28%乙腈; 27~30 min, 28%~30%乙腈; 30~35 min, 30%乙腈; 35~43 min, 30%~35%乙腈; 43~47 min, 35%~55%乙腈; 47~57 min, 55%~65%乙腈; 57~67 min, 65%~70%乙腈; 67~77 min, 70%~100%乙腈; 77~80 min, 100%乙腈; 80~95 min, 100%~8%乙腈; 95~100 min, 8%乙腈; 体积流量 1 mL/min; 进样量 10 μL; 柱温 25 ℃;

检测波长 279 nm。

2.4.4 精密度试验 取同一批丹参提取物 (DS1) 供试品溶液, 连续进样 6 次, 计算共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积, 各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 小于 3%。结果表明该仪器精密度良好。

2.4.5 稳定性试验 取同一批丹参提取物 (DS1) 供试品溶液, 分别在制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样测定, 测定 HPLC 指纹图谱, 各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 小于 3%。结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.6 重复性试验 取同一批丹参提取物 (DS1) 样品 6 份, 按“2.4.2”项下方法制备成供试品溶液后进样分析, 各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 小于 3%。结果表明该方法重复性良好。

2.4.7 指纹图谱建立 将 15 批 (DS1~DS15) 丹参

提取物按照“2.4.2”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.4.3”项下色谱条件进行 HPLC 分析, 记录色谱数据。在“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012.130723 版)”中导入这 15 批丹参供试品的指纹图谱数据, 设置参照图谱 (S14)。采用中位数法, 时间窗宽度为 0.1 min, 多点校正后, 将谱峰自动匹配, 生成叠加图谱, 如图 1 所示。特征图谱结果共得到 16 个共有峰, 通过对照品指认了其中 12 个共有峰, 如图 2 所示。指纹图谱各共有峰相似性数据结果显示, 除 S1 外, 其他 14 批提取物相似度均在 0.990 以上, 相似度结果见表 11。其中 16 号共有峰峰形较好, 选择作为参照峰 (S), 计算得到 15 批丹参样品指纹图谱共有峰相对保留时间的 RSD 值均小于 0.1%, 但相对峰面积的 RSD 值较大, 说明不同产地的丹参药材的主要成分含量存在一定差异, 故可用对照指纹图谱对丹参提取物进行质量控制。

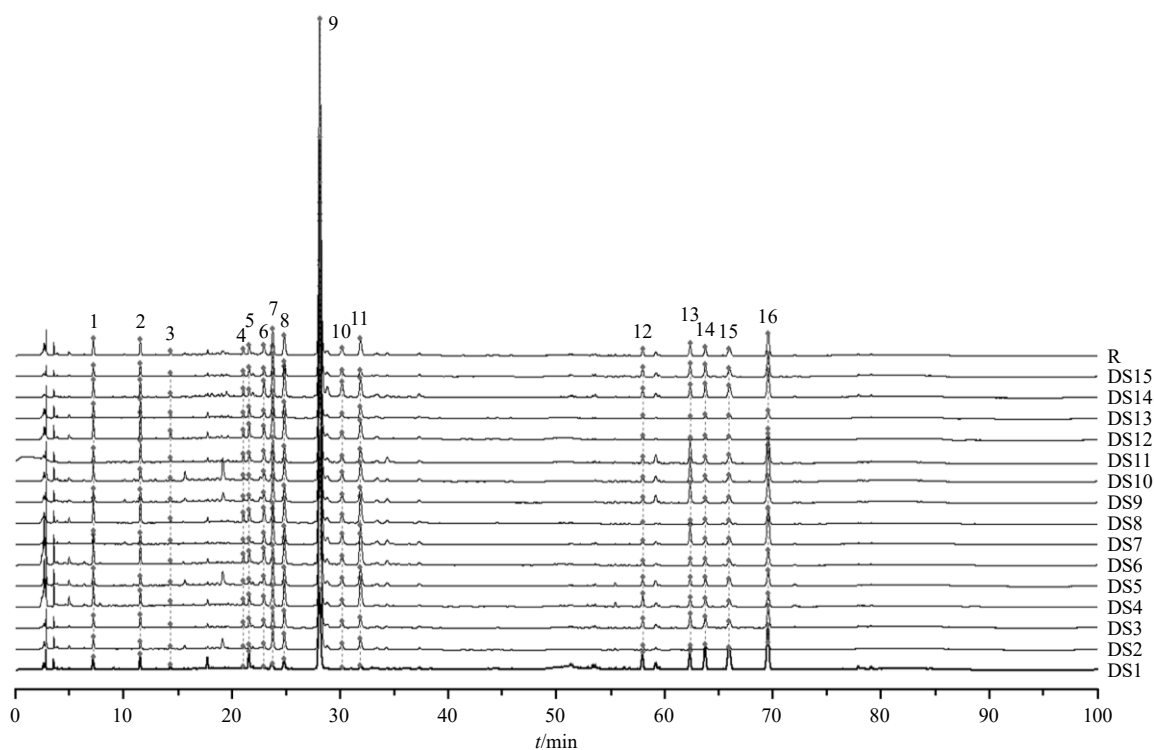


图 1 丹参提取物指纹图谱及其对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 Fingerprints of SMRR extracts and its reference fingerprint (R)

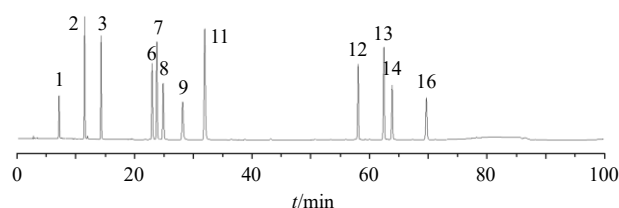
2.5 丹酚酸和丹参酮类成分含量测定

2.5.1 对照品溶液的制备 精密称取丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、丹酚酸 E、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 和丹酚酸 A 对照品, 用 80% 色谱甲醇配制成质量浓度均为 1.000 mg/mL 的对照品储备液。精密称取二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II_A 对照品, 用色谱甲醇分别配制成质量浓度分别为

0.200、1.000、0.125、1.000 mg/mL 的对照品储备液。

2.5.2 供试品溶液的制备

(1) 丹酚酸类成分测定: 取各批次提取物粉末 200.0 mg, 精密称定, 置锥形瓶中, 精密加入 80% 甲醇水溶液 50 mL, 密封, 称定质量。超声 (功率 500 W、频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量。用 80% 甲醇水溶液补足减失的质量, 摇匀, 滤过。



1-丹参素; 2-原儿茶醛; 3-咖啡酸; 6-丹酚酸 E; 7-迷迭香酸; 8-紫草酸; 9-丹酚酸 B; 11-丹酚酸 A; 12-二氢丹参酮 I; 13-隐丹参酮; 14-丹参酮 I; 16-丹参酮 II_A; 图 3、4 同。

1-danshensu; 2-protocatechuic aldehyde; 3-caffeic acid; 6-salvianolic acid E; 7-rosmarinic acid; 8-lithospermic acid; 9-salvianolic acid B; 11-salvianolic acid A; 12-dihydrotanshinone I; 13-cryptotanshinone; 14-tanshinone I; 16-tanshinone II_A; same as figures 3, 4.

图 2 混合对照品 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of mixed reference substances

表 11 15 批丹参提取物 HPLC 指纹图谱相似度评价

Table 11 Similarity assessment of HPLC fingerprint profiles of 15 batches of SMRR extracts

批号	相似度															
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	对照
S1	1.000	0.834	0.880	0.870	0.856	0.851	0.862	0.849	0.875	0.877	0.897	0.831	0.846	0.856	0.884	0.872
S2	0.834	1.000	0.996	0.984	0.999	0.985	0.996	0.995	0.994	0.994	0.987	0.995	0.996	0.998	0.995	0.996
S3	0.880	0.996	1.000	0.988	0.998	0.986	0.998	0.994	0.999	0.999	0.997	0.991	0.995	0.998	1.000	0.999
S4	0.870	0.984	0.988	1.000	0.990	0.998	0.981	0.994	0.989	0.988	0.987	0.989	0.990	0.987	0.985	0.992
S5	0.856	0.999	0.998	0.990	1.000	0.991	0.997	0.997	0.997	0.997	0.993	0.995	0.997	0.999	0.997	0.999
S6	0.851	0.985	0.986	0.998	0.991	1.000	0.982	0.997	0.988	0.987	0.984	0.989	0.990	0.987	0.983	0.991
S7	0.862	0.996	0.998	0.981	0.997	0.982	1.000	0.992	0.998	0.998	0.995	0.990	0.993	0.998	0.998	0.998
S8	0.849	0.995	0.994	0.994	0.997	0.997	0.992	1.000	0.994	0.994	0.990	0.995	0.997	0.995	0.992	0.997
S9	0.875	0.994	0.999	0.989	0.997	0.988	0.998	0.994	1.000	1.000	0.998	0.991	0.994	0.997	0.998	0.999
S10	0.877	0.994	0.999	0.988	0.997	0.987	0.998	0.994	1.000	1.000	0.998	0.990	0.993	0.997	0.998	0.999
S11	0.897	0.987	0.997	0.987	0.993	0.984	0.995	0.990	0.998	0.998	1.000	0.985	0.990	0.993	0.997	0.997
S12	0.831	0.995	0.991	0.989	0.995	0.989	0.990	0.995	0.991	0.990	0.985	1.000	0.999	0.995	0.990	0.994
S13	0.846	0.996	0.995	0.990	0.997	0.990	0.993	0.997	0.994	0.993	0.990	0.999	1.000	0.997	0.994	0.997
S14	0.856	0.998	0.998	0.987	0.999	0.987	0.998	0.995	0.997	0.997	0.993	0.995	0.997	1.000	0.998	0.999
S15	0.884	0.995	1.000	0.985	0.997	0.983	0.998	0.992	0.998	0.998	0.997	0.990	0.994	0.998	1.000	0.998
对照	0.872	0.996	0.999	0.992	0.999	0.991	0.998	0.997	0.999	0.999	0.997	0.994	0.997	0.999	0.998	1.000

23.0%乙腈; 35.00~46.00 min, 23.0%~25.0%乙腈; 46.00~50.00 min, 25.0%~30.0%乙腈; 50.00~50.01 min, 30.0%~5.0%乙腈; 50.01~53.00 min, 5.0%乙腈; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 °C; 检测波长 279 nm; 进样量 10 μL; 色谱图见图 3。

(2) 丹参酮类成分测定: 色谱柱为 Agela C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.02%磷酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱: 0~8.0 min, 63%乙腈; 8.0~22.0 min, 63%~88%乙腈; 22.0~22.5 min, 88%~63%乙腈; 22.5~25.0 min, 63%乙腈; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 20 °C; 检测波长 270 nm; 进样量 10

μL; 色谱图见图 4。

取续滤液, 用于测定丹酚酸类成分。
(2) 丹参酮类成分测定: 取各批次提取物粉末 500.0 mg, 精密称定, 置锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 密封, 称定质量。超声 (功率 500 W、频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量。用甲醇补足减失的质量, 摇匀。滤过, 取续滤液, 用于测定丹参酮类成分。

2.5.3 色谱条件

(1) 丹酚酸类成分测定: 色谱柱为 Agela C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.05%磷酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱: 0~5.00 min, 5.0%~10.0%乙腈; 5.00~15.00 min, 10.0%~22.5%乙腈; 15.00~25.00 min, 22.5%乙腈; 25.00~35.00 min, 22.5%~

2.5.4 线性关系考察 精密吸取各对照品储备液适量, 经倍半稀释后配制成系列质量浓度的对照品溶液, 按照“2.5.3”项下方法测定峰面积, 以对照品溶液的质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得回归方程分别为丹参素 $Y=6\,073.8X+10\,367.0$, $R^2=0.999\,9$, 线性范围 8.0~128.0 μg/mL; 原儿茶醛 $Y=49\,626.0X-803.25$, $R^2=0.999\,7$, 线性范围 0.625~10.0 μg/mL; 咖啡酸 $Y=27\,899.0X-136.67$, $R^2=0.999\,7$, 线性范围 0.312 5~5.0 μg/mL; 丹酚酸 E $Y=9\,922.5$

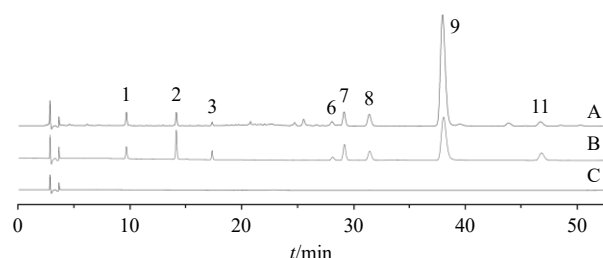


图 3 丹参样品溶液 (A)、8 个丹酚酸对照品溶液 (B) 和空白溶剂 (C) 的 HPLC 图

Fig. 3 HPLC of SMRR sample solution (A), eight salvanolic acid references solution (B) and blank solvent (C)

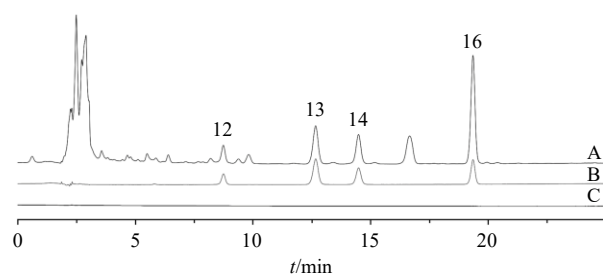


图 4 丹参样品溶液 (A)、4 个丹参酮对照品溶液 (B) 和空白溶剂 (C) 的 HPLC 图

Fig. 4 HPLC of SMRR sample solution (A), four tanshinone references solution (B) and blank solvent (C)

$X+8\ 908.3$, $R^2=0.999\ 9$, 线性范围 $5.0\sim 80.0\ \mu\text{g/mL}$; 迷迭香酸 $Y=16\ 894.0X-1\ 087.9$, $R^2=0.999\ 9$, 线性范围 $1.0\sim 64.0\ \mu\text{g/mL}$; 紫草酸 $Y=12\ 607.0X-2\ 230.0$, $R^2=1.000\ 0$, 线性范围 $4.0\sim 64.0\ \mu\text{g/mL}$; 丹酚酸 B $Y=9\ 176.4X+91\ 602.0$, $R^2=0.999\ 0$, 线性范围 $75.0\sim 1\ 200.0\ \mu\text{g/mL}$; 丹酚酸 A $Y=24\ 890.0X-2\ 978.2$, $R^2=0.999\ 9$, 线性范围 $0.625\sim 40.0\ \mu\text{g/mL}$; 二氢丹参酮 I $Y=28\ 551.0X-3\ 757.5$, $R^2=0.999\ 9$, 线性范围 $1.0\sim 16.0\ \mu\text{g/mL}$; 隐丹参酮 $Y=44\ 418.0X-1\ 907.4$, $R^2=1.000\ 0$, 线性范围 $1.0\sim 32.0\ \mu\text{g/mL}$; 丹参酮 I $Y=27\ 472.0X-3\ 159.8$, $R^2=1.000\ 0$, 线性范围 $2.0\sim 32.0\ \mu\text{g/mL}$; 丹参酮 II_A $Y=35\ 349.0X-19\ 746.0$, $R^2=0.999\ 7$, 线性范围 $4.0\sim 64.0\ \mu\text{g/mL}$ 。

2.5.5 精密度试验 取各对照品储备液适量, 配制混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 计算丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、丹酚酸 E、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 峰面积的 RSD 分别为 1.02%、1.22%、1.14%、1.29%、1.27%、0.86%、1.50%、0.90%、0.71%、0.63%、0.65%、0.60%, 结果表明该仪器精密度良好。

2.5.6 稳定性试验 分别制备供试品溶液, 于 0、2、4、8、12 和 24 h 测定峰面积, 计算丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、丹酚酸 E、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 峰面积的 RSD 分别为 1.80%、1.66%、1.82%、1.22%、1.90%、1.74%、2.84%、1.16%、1.84%、1.87%、1.78%、1.95%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5.7 重复性试验 取同批丹参提取物粉末 6 份, 按照“2.5.2”项下方法分别制备供试品溶液后进样测定, 计算丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、丹酚酸 E、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 质量分数的 RSD 分别为 1.36%、1.49%、1.43%、1.45%、1.85%、1.89%、1.97%、1.83%、1.08%、0.89%、1.23%、0.76%, 表明方法重复性良好。

2.5.8 加样回收率试验 精密吸取已测知成分含量的各供试品溶液, 分别加入各对照品储备液适量, 按照“2.5.3”项下方法进样测定, 计算丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、丹酚酸 E、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 的平均加样回收率分别为 98.17%、101.82%、99.42%、100.61%、99.07%、98.68%、99.17%、101.49%、102.43%、99.30%、101.26%、97.87%, RSD 分别为 1.85%、1.46%、1.90%、1.80%、2.00%、1.85%、2.82%、1.50%、0.36%、0.91%、1.16%、1.24%。

2.5.9 含量测定 按照“2.5.2”项下方法制备 15 批丹参提取物的供试品溶液, 按照“2.5.3”项下色谱条件进样测定, 计算各批次丹参提取物中丹酚酸类和丹参酮类成分的含量, 结果见表 12、13。根据含量测定结果可知, 8 种丹酚酸类成分总质量分数在 2.87%~16.06%, 均值为 9.52%, 4 种丹参酮类成分的总质量分数在 0.17%~1.09%, 均值为 0.56%。

2.6 多糖含量测定

取已制备的 15 批丹参提取物, 按照“2.1.1”项下方法测定总多糖含量, 结果见表 14。根据定量测定结果可知, 总多糖质量分数在 2.04%~3.17%, 均值为 2.62%。

2.7 多糖相对分子质量测定

2.7.1 对照品溶液的制备 精密称取各对照品 (P5~P800 葡聚糖) 5.00 mg, 溶解于 1 mL 流动相溶液中, 配制成 5.00 mg/mL 对照品溶液。

表 12 15 批丹参提取物中丹酚酸类成分含量 (n = 3)
Table 12 Contents of salvianolic acid compounds in 15 batches of SMRR extracts (n = 3)

编号	产地	质量分数/%								8 种成分总含量
		丹参素	原儿茶醛	咖啡酸	丹酚酸 E	迷迭香酸	紫草酸	丹酚酸 B	丹酚酸 A	
DS1	山东	0.30	0.05	0.02	0.00	0.05	0.19	2.21	0.04	2.87
DS2	山东	0.34	0.03	0.02	0.13	0.30	0.38	8.20	0.15	9.54
DS3	山东	0.35	0.05	0.02	0.16	0.28	0.40	7.43	0.14	8.83
DS4	河北	0.67	0.06	0.03	0.20	0.28	0.54	5.67	0.39	7.82
DS5	湖南	0.42	0.04	0.02	0.20	0.31	0.38	7.82	0.22	9.41
DS6	陕西	0.84	0.08	0.02	0.37	0.25	0.56	6.95	0.50	9.56
DS7	宁夏	0.32	0.04	0.02	0.23	0.43	0.36	10.54	0.12	12.05
DS8	四川	0.55	0.07	0.02	0.27	0.22	0.44	6.52	0.28	8.38
DS9	安徽	0.41	0.05	0.02	0.22	0.36	0.39	8.34	0.20	9.99
DS10	河南	0.48	0.05	0.02	0.23	0.34	0.45	9.20	0.22	10.99
DS11	山西	0.46	0.09	0.03	0.28	0.37	0.40	8.15	0.19	9.96
DS12	甘肃	0.61	0.09	0.05	0.26	0.63	0.55	8.27	0.23	10.69
DS13	山西	0.46	0.07	0.03	0.18	0.40	0.41	6.30	0.17	8.02
DS14	河南	0.49	0.06	0.02	0.38	0.67	0.65	13.55	0.24	16.06
DS15	安徽	0.31	0.05	0.02	0.19	0.31	0.34	7.32	0.08	8.62
均值		0.47	0.06	0.02	0.22	0.35	0.43	7.76	0.21	9.52

表 13 15 批丹参提取物中丹参酮类成分含量 (n = 3)
Table 13 Contents of tanshinone compounds in 15 batches of SMRR extracts (n = 3)

编号	产地	质量分数/%					编号	产地	质量分数/%				
		二氢丹参酮 I	隐丹参酮	丹参酮 I	丹参酮 II _A	4 种成分总含量			二氢丹参酮 I	隐丹参酮	丹参酮 I	丹参酮 II _A	4 种成分总含量
DS1	山东	0.13	0.19	0.23	0.54	1.09	DS9	安徽	0.05	0.24	0.04	0.39	0.72
DS2	山东	0.04	0.05	0.04	0.11	0.24	DS10	河南	0.03	0.24	0.05	0.47	0.80
DS3	山东	0.07	0.16	0.12	0.31	0.67	DS11	山西	0.06	0.28	0.06	0.49	0.89
DS4	河北	0.12	0.12	0.10	0.21	0.54	DS12	甘肃	0.03	0.02	0.04	0.08	0.17
DS5	湖南	0.07	0.10	0.08	0.22	0.47	DS13	山西	0.02	0.03	0.05	0.12	0.23
DS6	陕西	0.03	0.06	0.05	0.17	0.31	DS14	河南	0.06	0.12	0.12	0.32	0.62
DS7	宁夏	0.03	0.19	0.05	0.43	0.70	DS15	安徽	0.07	0.15	0.12	0.32	0.67
DS8	四川	0.01	0.04	0.03	0.17	0.25	均值		0.05	0.13	0.08	0.29	0.56

2.7.2 供试品溶液的制备 精密称取丹参提取物粉末 450.0 mg 于 150 mL 锥形瓶中, 加 30 mL 超纯水。70 ℃超声 30 min, 放冷, 复称并补足减失的质量。将溶液以 4 000 r/min 离心(离心半径 5 cm) 15 min, 取上清液加入 95%乙醇至溶液终体积分数为 70%。混匀后静置 12 h, 4 000 r/min 离心(离心半径 11 cm) 15 min。沉淀用 3 mL 超纯水溶解, 在溶液中加入 Seavage 试剂(三氯甲烷-正丁醇 4 : 1) 6 mL, 混匀。以 4 000 r/min 离心(离心半径 11 cm) 15 min, 上清液浓缩后即得丹参粗多糖。精密称取粗多糖 5.00 mg, 溶解于 1 mL 流动相溶液中, 配制 5 mg/mL 溶液。超声 10 min 后(功率 500 W、频

率 40 kHz), 以 12 000 r/min 离心(离心半径 5 cm) 10 min。吸取上清液, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得供试品溶液。

2.7.3 色谱条件 色谱柱为 BRT105-103-101 串联凝胶柱(8 mm×300 mm); 流动相为 0.5 mol/L 氯化钠溶液, 体积流量为 0.7 mL/min; 柱温为 40 ℃; 进样量为 100 μL; 检测器为示差检测器 RID-20A, 色谱图见图 5。

2.7.4 线性关系考察 吸取各对照品储备液, 按照“2.7.3”项下色谱方法进行分析, 以保留时间(*t_R*)为横坐标(*X*), lg*M_w*(*M_w*为重均相对分子质量)为纵坐标(*Y*), 绘制标准曲线, 进行线性回归, 所得

表 14 15 批丹参提取物中总多糖含量和丹参提取物中多糖相对分子质量测定结果 (n = 3)
Table 14 Contents of total polysaccharides and molecular weights of polysaccharides in 15 batches of SMRR extracts (n = 3)

编号	产地	总多糖/ %	SMP1			SMP2			SMP3		
			t _R /min	M _w	峰面积占比/%	t _R /min	M _w	峰面积占比/%	t _R /min	M _w	峰面积占比/%
DS1	山东	3.17	—	—	—	42.172	15 259	73.58	51.327	1 271	26.42
DS2	山东	2.60	29.718	448 588	5.75	42.762	13 001	71.01	51.485	1 218	23.24
DS3	山东	2.56	29.885	428 705	5.79	44.490	8 133	73.12	51.357	1 261	21.09
DS4	河北	2.27	30.052	409 703	4.07	42.662	13 358	71.87	51.538	1 200	24.05
DS5	湖南	2.34	29.783	440 742	4.50	41.167	20 045	71.09	51.350	1 263	24.41
DS6	陕西	2.19	29.960	420 065	3.83	43.217	11 490	62.82	51.367	1 257	33.35
DS7	宁夏	2.92	29.708	449 808	8.01	43.393	10 954	73.88	51.333	1 269	18.11
DS8	四川	2.04	29.958	420 293	5.80	44.292	8 582	61.69	51.508	1 210	32.52
DS9	安徽	2.34	30.058	409 036	5.74	43.453	10 777	68.32	51.377	1 254	25.94
DS10	河南	2.22	29.855	432 211	4.75	43.358	11 058	62.88	51.390	1 249	32.37
DS11	山西	2.78	30.073	407 374	5.15	45.207	6 694	77.71	51.517	1 207	17.14
DS12	甘肃	3.11	30.100	404 399	4.58	44.663	7 759	75.68	51.390	1 249	19.74
DS13	山西	2.94	30.193	394 317	4.55	44.953	7 172	74.45	51.480	1 219	21.01
DS14	河南	2.88	29.960	420 065	7.14	44.447	8 228	71.86	51.297	1 281	21.00
DS15	安徽	2.87	29.755	444 105	6.11	44.330	8 494	72.04	51.490	1 216	21.85
均值		2.62			5.41			70.80			24.15

lgM_w-t_R 标准曲线的回归方程为 Y=9.155 6-0.117 9 X, R²=0.994 7。

2.7.5 相对分子质量测定 按“2.7.2”项下方法制备 15 批丹参提取物的供试品溶液,按照“2.7.3”项下色谱条件进样测定,计算相对分子质量大小,结果见表 14。由测定结果可知,DS2~DS15 批丹参标准提取物中多糖相对分子质量分布明显分为高、中、低 3 部分,而 DS1 只含中、低 2 部分,它们的相对分子质量分布范围分别在 3.94×10⁵~4.50×10⁵、6.69×10³~2.00×10⁴和 1.20×10³~1.28×10³,且中等相对分子质量部分的多糖占比最大,在总多糖中占比为 61.69%~77.71%,均值为 70.80%。

3 讨论

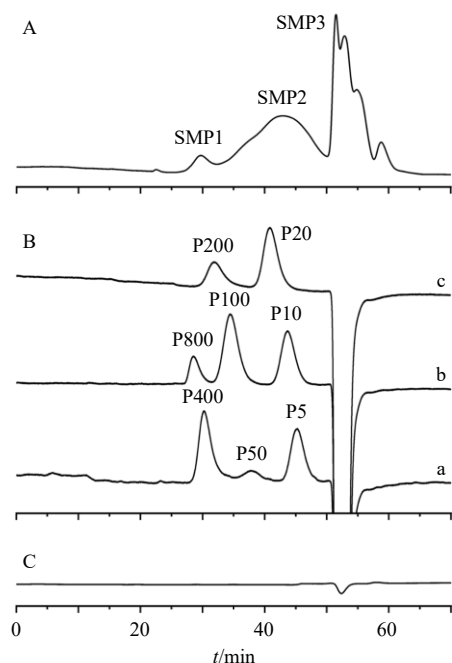
丹参对心血管疾病、癌症、抗炎等有较好的治疗效果。随着老龄人口的增多,丹参的需求量越来越多,因此,丹参提取物的作用也越来越重要^[8]。丹参中的丹参酮类成分为脂溶性强的萜类化合物,高浓度的乙醇提取效果较好;而丹酚酸类和多糖类成分水溶性强,极性大的溶剂更有利于这 2 类成分的提取。

提取溶剂考察结果显示,40%乙醇水提出的丹酚酸类成分最多,但丹参酮类和多糖类成分相对较少;60%乙醇水最有利于丹参酮类成分的提取,但对多糖类成分的提取效果较差;超纯水则较难以提

取脂溶性强的丹参酮类成分。由于这 3 类成分极性的差异,采用先醇提后水提的提取方式更有利于全面获取丹参中的各类成分。相较于单一溶剂提取并增加提取次数的提取方式,先醇提后水提能够更好地提取这 3 类成分,且以水代替乙醇可以节约生产成本。这种提取方式也在部分配方颗粒的制备过程中得到应用,如丹参片^[1]、复方丹参丸^[1]、前列爽颗粒^[34]、刺五加分散片^[35]等。

在实际生产中,不论是中药提取物还是配方颗粒皆需要兼顾成分全面性和质量稳定性,本研究确定的提取方式符合上述要求,适合用来制备丹参标准提取物。本实验采用 AHP 法对各类成分进行赋权分析,主观与客观相结合,既考虑到各项指标在总评分中的重要程度,也考虑到各项原始数据之间的相互联系及影响;既满足了本实验的需求,也保证了实验的科学性与合理性^[36]。因此,本研究最后确定的最佳制备工艺为丹参饮片加 10 倍量 80%乙醇水回流提取 3 次,每次 1 h;药渣再加 9 倍量超纯水回流提取 3 次,每次 1.5 h;合并滤液,滤液于 60℃减压浓缩至一定体积后转移至冷冻干燥机,冻干后即得。

HPLC 指纹图谱广泛应用于中药质量评价,它从中药的整体性出发,相对全面地反映中药的整体质量,能有效鉴别样品的真伪^[37]。本研究采用 HPLC



SMP1-高相对分子质量多糖; SMP2-中相对分子质量多糖; SMP3-低相对分子质量多糖; P5~P800 代表 M_w 分别为 7 380、10 510、21 950、44 520、109 900、217 800、410 200、755 900 的葡聚糖。SMP1-high molecular weight polysaccharide; SMP2-medium molecular weight polysaccharide; SMP3-low molecular weight polysaccharide; P5 to P800 are glucans with M_w 7 380, 10 510, 21 950, 44 520, 109 900, 217 800, 410 200, 755 900, respectively.

图 5 丹参样品溶液 (A)、8 个葡聚糖对照品溶液 (B) 和空白溶剂 (C) 的 HPLC 图

Fig. 5 HPLC of SMRR sample solution (A), eight glucan references solution (B) and blank solvent (C)

技术建立丹参提取物的指纹图谱, 得到 16 个共有峰, 并对其中 12 个峰进行了指认。DS1 相似度评价大于 0.830, DS2~DS15 相似度评价均大于 0.990, 推测丹参样品 DS1 相似度评价较低是由于其生长环境不同所导致的。

本研究中建立了 HPLC 测定丹酚酸类和丹参酮类成分含量的方法, 除了对《中国药典》2020 年版中丹参药材规定的丹酚酸 B、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II_A 的含量进行测定外, 同时还测定了丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、丹酚酸 E、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 A 和二氢丹参酮 I 的含量。测定的丹酚酸类和丹参酮类成分更加全面, 方法学结果显示该方法准确、可靠, 因此, 该方法可用于丹参提取物的质量控制。

多糖类成分没有共轭体系, HPLC 联用紫外检测器无法检测丹参中的多糖类成分, 故采用苯酚-硫酸法来测定总多糖类成分的含量^[38]。根据各批丹参

提取物含量测定结果, 以含量均值的 80% 设立标准, 则 8 种丹酚酸类成分的总质量分数应不少于 7.62%, 4 种丹参酮类成分的总质量分数应不少于 0.45%, 总多糖质量分数应不少于 2.10%。提取物中多糖相对分子质量需至少包含中、低 2 部分, 即相对分子质量分布范围分别为 $6.69 \times 10^3 \sim 2.00 \times 10^4$ 和 $1.20 \times 10^3 \sim 1.28 \times 10^3$, 且以前者为主。以均值的 80% 设立标准, 则该部分的占比应不少于 56.64%。综上所述, 本研究建立的各项质量控制方法准确可靠, 可为丹参标准提取物的质量控制提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 79-1305.
- [2] 周巧, 张智慧, 张学兰, 等. 基于谱效相关法探究酒炙丹参增强抗凝血活性的物质基础 [J]. 中成药, 2021, 43(4): 954-958.
- [3] 郭爽, 侯冉冉, 李秋, 等. 丹参地上部分丹酚酸 A 的抗炎活性及对 p38MAPK 通路的影响 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2020(8): 119-123.
- [4] 李红莲, 周桔, 林华, 等. 丹酚酸 B 通过抗炎、抗氧化和促进自噬减轻慢性肾小球肾炎的肾功能损伤 [J]. 中药药理与临床, 2019, 35(5): 34-38.
- [5] Yan N, Xiao C Q, Wang X G, *et al*. Tanshinone II_A from *Salvia miltiorrhiza* exerts anti-fibrotic effects on cardiac fibroblasts and rat heart tissues by suppressing the levels of pro-fibrotic factors: The key role of miR-618 [J]. *J Food Biochem*, 2022, 46(2): e14078.
- [6] 温文浩, 侯雪楠, 崔赛男, 等. 丹参酮 II_A 通过自噬诱导肺癌 A549 细胞周期阻滞的作用研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(5): 539-545.
- [7] 彭渊, 马园园, 黄恺, 等. 丹参抑制 NLRP3 炎症小体减轻胆汁淤积性肝损伤 [J]. 上海中医药大学学报, 2019, 33(1): 66-70.
- [8] 冯科冉, 李伟霞, 王晓艳, 等. 丹参化学成分、药理作用及其质量标志物 (Q-Marker) 的预测分析 [J]. 中草药, 2022, 53(2): 609-618.
- [9] 靳国忠, 张迪, 刘维, 等. 基于 TLR4 信号通路探讨丹参多糖缓解 LPS 诱导小鼠乳腺炎症的作用机制 [J]. 河北农业大学学报, 2022, 45(6): 109-114.
- [10] 靳国忠, 窦萌萌, 张迪, 等. 丹参多糖缓解小鼠乳腺炎症和过氧化反应的作用与机制 [J]. 中国兽医学报, 2022, 42(5): 1023-1029.
- [11] Peng L, Ru M, Liang Z S. Variation of photosynthesis, secondary metabolites and antioxidant activities in third generation of spaceflight-induced *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Chin Herb Med*, 2022, 14(4): 592-601.

- [12] 郭志青, 支学军, 王布, 等. 丹参多糖经 MAPK/ERK 信号轴抑制对肺癌细胞 A549 增殖、迁移和凋亡的影响 [J]. 中国药业, 2024, 33(1): 40-44.
- [13] 李巍, 陈贵才, 胡伟莲, 等. 丹参多糖低分子量组分抗小鼠肝肾损伤及其免疫保护作用机制的研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2023, 45(6): 635-642.
- [14] Jing Y S, Hu J Y, Su Z T, *et al.* Structural characterisation and antioxidant activities *in vitro* and *in vivo* of a novel polysaccharide from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Nat Prod Res*, 2023, 37(6): 1006-1011.
- [15] 孙成静. 丹参茎叶酚酸和黄酮有效部位研究及其改善微循环障碍作用 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2020.
- [16] 曹利利, 樊光辉. 三七三醇皂苷的临床应用研究 [J]. 湖北中医杂志, 2016, 38(10): 69-72.
- [17] Sun M Y, Chai L L, Lu F, *et al.* Efficacy and safety of *Ginkgo biloba* pills for coronary heart disease with impaired glucose regulation: Study protocol for a series of N-of-1 randomized, double-blind, placebo-controlled trials [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 7571629.
- [18] 关璐. 刺五加流浸膏治疗失眠症临床观察 [J]. 中医药临床杂志, 2017, 29(8): 1329-1331.
- [19] 宁德山, 赵宏伟, 王磊, 等. 金银花提取物在保健食品中的应用 [J]. 食品界, 2024, (1): 62-64.
- [20] 于玲. 薏苡仁提取物在化妆品中的应用及功效 [J]. 福建轻纺, 2021(10): 26-28.
- [21] 杨海明, 李秀敏, 孙宏冉, 等. 山苦荬标准提取物的制备与质量控制方法 [J]. 安徽农业科学, 2016, 44(21): 104-106.
- [22] 邓力. 南、北五味子及其标准提取物的质量控制研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2017.
- [23] 黄莎. 四倍体苦荞麦种子黄酮类物质标准提取物的制备和抗氧化功能研究 [D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2017.
- [24] 文喜艳, 王兰霞, 邵晶, 等. Box-Behnken 响应面法优化黄芪多糖标准提取物醇沉工艺研究 [J]. 中兽医医药杂志, 2017, 36(6): 8-13.
- [25] 朱林. 川芎挥发油标准提取物的研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2014.
- [26] 陈志鸿. 川黄柏、关黄柏及其标准提取物的质量控制研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2020.
- [27] 李磊, 戴金凤, 黎先春, 等. 丹参水溶性标准提取物生物活性研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2004, 18(S1): 95-97.
- [28] 罗森, 袁崇均, 王箭, 等. 丹参标准提取物质量标准研究 [J]. 四川中医, 2010, 28(1): 43-45.
- [29] 王莉. 丹参、人参标准提取物复方配伍在大鼠体内的药动学研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2010.
- [30] 闪媛媛, 王玉, 徐浪, 等. 多指标优选丹参提取工艺研究 [J]. 农产品加工, 2022, (3): 31-34.
- [31] 朱丽媛, 彭朝蕊, 周木艳, 等. 紫丹参水溶性及脂溶性成分提取工艺优化 [J]. 云南化工, 2021, 48(12): 26-29.
- [32] 赵卫星. 正交超声法提取丹参多糖工艺研究 [J]. 广东化工, 2014, 41(23): 36-38.
- [33] 高笛, 罗成, 周凯, 等. 响应面法优化白及多糖提取工艺 [J]. 海峡药学, 2024, 36(1): 30-35.
- [34] 赵婷婷. 前列爽颗粒的制备工艺及质量标准研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2020.
- [35] 赵敏. 刺五加分散片的研制 [D]. 长春: 吉林大学, 2015.
- [36] 吴振起, 高畅, 杨璐, 等. 基于层次分析法结合 Box-Behnken 设计-响应面法优选养阴清肺汤加味提取工艺 [J]. 中草药, 2019, 50(12): 2862-2867.
- [37] 易静, 刘德慧, 杨蓉, 等. 基于 HPLC 指纹图谱和多成分含量测定的苏合香丸质量评价研究 [J]. 药物分析杂志, 2024, 44(9): 1551-1559.
- [38] 王非凡, 马云凤, 景永帅. 丹参多糖的提取工艺、结构分析及质量控制研究进展 [J]. 神经药理学报, 2020, 10(5): 18-23.

[责任编辑 郑礼胜]