

丹参煎煮化学成分溶出规律研究

李 耿¹, 于长安¹, 李振坤², 唐仕欢², 廖文强¹, 杨洪军^{2*}

(1. 中日友好医院 全国中西医结合心血管病中心, 北京 100029;

2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100070)

[摘要] 目的: 研究丹参煎煮过程中多种成分含量的变化规律。方法: 使用超高效液相色谱仪(UPLC), 采用析因试验设计, 考察了丹参饮片在不同加水倍数、煎煮时间、煎煮次数下的煎出液中丹酚酸 B、丹参素、原儿茶醛等多种成分的含量变化规律。结果: 随着煎煮时间的延长, 丹参中的主要水溶性有效成分丹酚酸 B 的含量会而逐步降低; 而同时, 丹参素和原儿茶醛的含量则持续增加。结论: 丹参酮类成分水煎煮很难溶出; 丹参中的丹参素和原儿茶醛主要是来源于丹参酚酸类成分在较高温度下的逐步降解; 测定或提取丹参中丹酚酸 B 等水溶性成分不宜采用长时间、高温煎煮的方式; 丹参临床应用时应注意避免久煎。

[关键词] 超高效液相色谱; 丹酚酸 B; 丹参素; 原儿茶醛; 丹参酮 IIA

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)08-0046-04

中药的疗效是由一系列化合物群(有效成分)的协调作用而体现的, 在药材、饮片质量稳定的前提下, 随着煎煮时间、溶剂用量、煎煮次数、药材粉碎粒度、煎煮溶剂极性、煎煮的温度和压力等因素变化, 煎煮溶出的活性成分的含量及比例相应发生变化, 从而影响临床用药效果。本研究采用析因试验设计, 对丹参进行了多因素、多水平的交叉试验, 较为全面的考察了其多种活性成分在煎煮过程中溶出和变化的规律, 为合理用药提供科学依据。本文主要探讨了煎煮时间、水用量、煎煮次数 3 个因素对丹参主要有效成分影响(其它因素的影响另文讨论)。

1 仪器和材料

1.1 仪器 美国 WATERS 超高效液相色谱(UPLC) ACCURACY 系统, 包括二元超高压溶剂系统、自动进样恒温样本管理器、二极管阵列检测器、Empower 2 色谱工作站。

1.2 试剂 甲醇(色谱纯, 美国 Fisher), 冰醋酸(分析纯, 北京化工厂); 煎煮用水: 蒸馏水; 色谱用水: 娃娃哈纯净水(市售瓶装)。

1.3 对照品 丹参素钠(批号 110855-200507)、丹酚酸 B(批号 111562-200504)、原儿茶醛(批号 110810-200506)、原儿茶酸(批号 110809-200503)、丹参酮 IIA(批号 110766-200417)、隐丹参酮(批号 852-9903) 对照品均购自中国药品生物制品检定所。

1.4 丹参饮片 购自北京同仁堂药店, 产地为山东。

2 方法与结果

2.1 试验设计

2.1.1 加水倍数 目前临床常规用药时, 一般每剂药的最终煎出液体积约为 360~400 mL(2 袋/剂, 约 180~200 mL/袋); 药典规定丹参用量为 9~15 g, 因此本研究设计重点考察加水倍数范围为 10~40 倍, 采用固定用水量(250 mL), 改变煎煮样品重量(6.25~25 g) 从而改变加水倍数的方式。

2.1.2 煎煮时间 试验分别考察了煎煮 15, 30, 45, 60, 90 min 的情况。

2.1.3 煎煮次数 考察丹参 2 次煎煮仍有成分溶出, 因此全部试验都进行了第 3 次的煎煮, 第 3 次煎煮液的主要指标成分丹酚酸 B 含量增加很少, 认为基本提取完全。

2.1.4 析因试验设计 析因试验设计又称为完全交叉分组试验设计, 是一种多因素、多水平单效应的交叉分组试验, 它可提供较多的信息, 缩小随机误差, 全面比较各因素水平间的效应。为全面考察煎

[收稿日期] 2008-11-18

[基金项目] 国家科技基础条件平台项目(2004DEA71170); 中日友好医院重点学科资助项目(ZDXK-LX01-01)

[通讯作者] * 杨洪军, Tel: (010) 84017384; E-mail: hongjun0420@vip.sina.com

煮过程中丹参各有效成分的含量变化规律, 本研究结合实际临床用药情况, 采用析因试验设计, 进行了 3 个主要影响因素、多水平的全部交叉试验。各因素和水平如表 1。

表 1 因素水平表

Table 1 Design of experiments

水平	因素		
	加水倍数 A(g)	煎煮时间 B(min)	煎煮次数 C
1	10(25.00)	15	1
2	15(16.67)	30	2
3	20(12.50)	45	3
4	25(10.00)	60	—
5	30(8.33)	90	—
6	40(6.25)	—	—

() 括号内表示实际称样量

2.2 试验方法 称取与上述各加水倍数相应重量的丹参饮片, 加水 250 mL, 按上述各因素不同水平分别回流提取, 提取液过滤冷却, 定容至 250 mL, 精密量取上述各次试验的提取液 1 mL, 用甲醇稀释定容至 10 mL, 用 0.2 μm 的滤膜过滤, 取续滤液进样 1 μL。

2.3 饮片中药典规定成分的含量测定 根据《中国药典》2005 版一部丹参项下^[1] 测定该批丹参饮片中丹酚酸 B 和丹参酮 II A 的含量, 结果二者含量分别为 8.231% 和 0.242%。

2.4 饮片中其它成分的含量测定

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm); 流动相: A 相为 1% 甲酸溶液, B 相为甲醇; 色谱梯度(以 B 相的比例表示)为: 0~ 2 min 8%, 2~ 7 min 33%, 7~ 9 min 100%; 流速: 0.4 mL·min⁻¹; 检测波长: 281 nm; 柱温: 40 °C; 样品管理器温度: 4 °C; 进样量: 1 μL, 各成分均完全分离(见图 1)。

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称取丹参素钠、原儿茶醛、原儿茶酸、丹酚酸 B、丹参酮 II A、隐丹参酮对照品用甲醇溶解并定容, 分别得到各自的对照品溶液(浓度分别为 5.06, 1.04, 0.06, 51.2, 4.10, 18.0 μg·mL⁻¹)。

2.4.3 供试品溶液的制备 取粉碎并过 3 号药典筛的丹参饮片粉约 2 g, 精密称定, 精密加入 95% 乙醇 100 mL 并称重, 超声提取 60 min(功率 300 W, 频率 25 kHz)后, 补足液体重, 过 0.2 μm 的滤膜, 取续

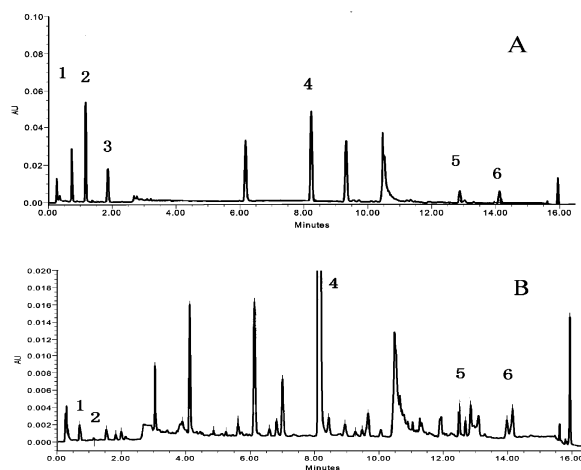


图 1 对照品(A)和样品(B)的色谱图

Fig. 1 UPLC Chromatograms of reference substances (A) and sample (B)

1. 丹参素钠(tanshinol); 2. 原儿茶醛(protocatechuic aldehyde);
3. 原儿茶酸(protocatechuic acid); 4. 丹酚酸 B (salvianolic acid B); 5. 隐丹参酮(Cryptotanshinone); 6. 丹参酮 II A (tanshinone II A)

滤液进样。

2.4.4 线性关系考察 依次精密量取各对照品溶液 0.20, 0.50, 1.00, 2.00, 5.00, 10.00 μL, 分别进样, 测定峰面积。分别以色谱峰面积积分值(Y)对其浓度(X)进行对照品标准曲线的回归方程见表 2。

表 2 对照品标准曲线回归方程

Table 2 Linear relationship for peak area-concentration of six components

对照品	方程	R ²	线性范围(μg·mL ⁻¹)
丹参素钠	$Y = 6.91 \times 10^5 X - 1.01 \times 10^3$	0.999 9	1.120~ 50.60
原儿茶醛	$Y = 5.18 \times 10^5 X - 2.75 \times 10^3$	0.999 8	0.208~ 10.40
原儿茶酸	$Y = 3.22 \times 10^5 X - 9.97 \times 10^2$	0.999 7	0.120~ 6.000
丹酚酸 B	$Y = 6.72 \times 10^5 X - 2.97 \times 10^3$	0.999 9	10.24~ 512.0
丹参酮 II A	$Y = 8.12 \times 10^5 X - 7.65 \times 10^3$	0.999 7	0.820~ 41.00
隐丹参酮	$Y = 9.33 \times 10^5 X - 2.55 \times 10^4$	0.999 7	0.360~ 18.00

2.4.5 方法学考察 精密度试验: 取供试品溶液连续进样 6 次, 每次 1 μL, 测定各成分峰面积积分值, RSD 分别为: 丹参素钠 0.68%、原儿茶醛 0.35%, 结果表明仪器精密度良好; 稳定性试验: 取同上供试品溶液(保存于 4 °C 冰箱内), 分别在 1, 2, 4, 6, 8 d 测定各成分峰面积积分值, 测得各成分的 RSD 分别为: 丹参素钠 0.98%、原儿茶醛 1.05%, 结果表明, 供试品溶液在 4 °C 避光条件下 8 d 内稳定; 重复性试验: 取同一批样品, 平行取样 5 份, 制备供试品溶液, 测定计算各成分的含量, 其 RSD 分别为: 丹参素钠 0.53%、原儿茶醛 0.45%, 结果表明重复性良好; 回

收率试验: 同时在另 3 份样品中加入适量的丹参素钠、原儿茶醛、原儿茶酸对照品, 同样操作; 精密吸取丹参素、原儿茶醛、原儿茶酸标准品储备液 1 mL 0.5 mL 0.5 mL, 分别加至 10 g 丹参粉末中, 混匀, 水浴蒸干, 精称此粉末同前测定 3 次, 结果如表 3。

表 3 回收率试验结果

Table 3 Result of recovery (n=3)

成分	原样品含量 (μg)	加入量 (μg)	测得量 (μg)	回收率 (%)	\bar{x} (%)	RSD (%)
丹参素	5 200	5 060	5 004	98.89	99.43	0.56
	5 200	5 060	5 030	99.41		
	5 200	5 060	5 060	100.0		
原儿茶醛	40.00	52.00	51.7	99.42	99.22	0.78
	40.00	52.00	51.15	98.37		
	40.00	52.00	51.94	99.88		
原儿茶酸	—	30.00	30.05	100.2	99.82	0.33
	—	30.00	29.94	99.80		
	—	30.00	29.85	99.50		

测得该批丹参饮片中丹参素、原儿茶醛含量仅分别为 0.026% 和 0.002%, 远远低于其在提取液中的含量; 原儿茶酸未检出(饮片含量 < 0.000 6%)。

参考《中国药典》2005 版一部丹参项下测定丹参中丹参酮 II_A 的方法, 同时测定隐丹参酮, 1 倍对照品加入样测得回收率为 99.5%, RSD 为 0.98%; 取供试品溶液连续进样 6 次, 每次 1 μL, 测定峰面积积分值, 隐丹参酮的 RSD 为 0.58%, 结果表明仪器精密度良好; 取同上供试品溶液(保存于 4 °C 冰箱内), 按上述色谱条件, 分别在 1, 2, 4, 6, 8 d 测定峰面积积分值, 测得隐丹参酮的 RSD 为 0.98%, 结果表明, 供试品溶液在 4 °C 避光条件下 8 d 内稳定; 取同一批样品, 平行取样 5 份, 制备供试品溶液, 测定计算隐丹参酮的含量, RSD 为 0.53%, 表明方法的重复性较好。测得该批饮片中隐丹参酮含量为 0.056%。

3 结果

本研究拟测定各试验条件下丹参水提取液中丹参素、原儿茶醛、原儿茶酸、丹酚酸 B、丹参酮 II_A、隐丹参酮 6 种成分的含量, 但在所有试验的水提取液中, 原儿茶酸均未测到; 丹参酮 II_A 和隐丹参酮的含量都很少(最多的试验分别为 0.005 4% 和 0.001 1%), 均不足该批药材中该成分含量的 2%, 故本研究最终重点考察丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 B 3 种成分的含量; 在各试验提取液中丹酚酸 B 的含

量都非常高, 基本在 4.0% ~ 8.5% 范围内, 而且其峰面积占总积分峰面积比例也高达 60% 以上, 远高于所有其它成分的含量。

由图 2 可知, 丹酚酸 B 在回流提取 30 min 左右提取率达到峰值, 之后提取率一直降低; 而丹参素和原儿茶醛在提取 15~ 90 min 范围, 随着时间增加, 提取量持续增加。

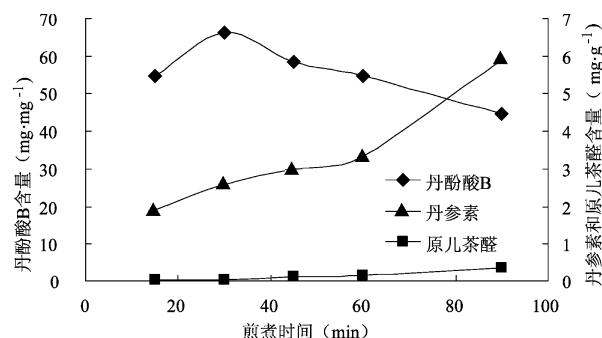


图 2 丹参提取液中各主要水溶性成分含量的随煎煮时间变化(加水 10 倍, 煎煮 1 次)

Fig. 2 Major water-solubility constituent contents of salvia miltiorrhiza extract with decocting time (10 times water, the 1st decocting)

第 1 次提取液中丹酚酸 B 的含量就占总含量 50 ~ 95% 左右(根据溶剂倍数和煎煮时间有所不同); 第 2 次提取液中丹酚酸 B 仍有 10~ 20%, 第 3 次提取液中丹酚酸 B 含量很少(一般都小于 5%)。加水量在 15 倍以上(约相当于处方量 24 g 以下), 加水倍数增加, 提取率变化不大; 15 倍以下时, 提取率明显下降。

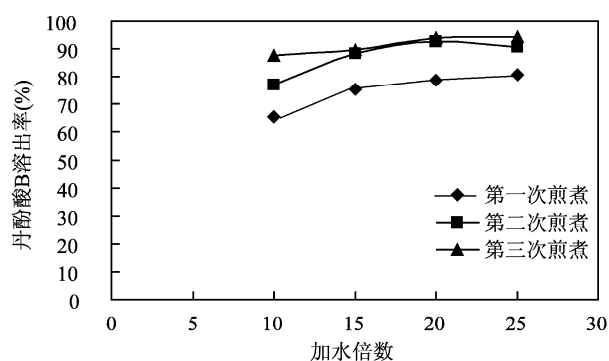


图 3 丹酚酸 B 提取率的变化(煎煮 30 min)

Fig. 3 Extraction rate of salvianolic acid B (decocting 30 min)

4 讨论

本研究所有试验的提取液中丹参酮 II_A 和隐丹参酮含量都非常少, 说明仅用水煮, 很难使脂溶性成分有效溶出; 近年的研究表明, 丹参酮 II_A 具有一定的细胞毒性, 可使细胞壁剥离^[2], 并对人 CYP450 1A2 活性有强的抑制作用, 影响药物在体内的代谢^[3]; 且

传统中医药丹参往往入汤药应用,本研究证实,汤剂中丹参酮类成分极难溶出,因此认为丹参中的脂溶性丹参酮类成分与丹参传统的中医药疗效关联性不大,药典中丹参药材的丹参酮 II_A 含量规格需在进一步的质量评价、药理学和毒理学研究基础上重新修订。

丹参酚酸类是丹参水煎液中的主要化学成分,且丹参酚酸类成分是目前已知抗氧化作用最强的天然化合物之一,具有强大的清除自由基和抗氧化的活性,文献说明其主要有较强的扩张冠脉血管、降血脂、降血液黏度、抗血小板凝集、防止动脉粥样硬化等方面作用^[4~5],基本代表了中医传统丹参的常用功效;其中丹酚酸 B 含量远远高于其它成分,可以作为主要指标性成分;但另一方面,丹参酚酸类成分的化学结构组成相似,均为若干各丹参素与咖啡酸单元组合而来,相关研究也均证实,丹酚酸 A、丹酚酸 B 等均有相似的活性^[4~5],仅仅以丹酚酸 B 的含量评价相关药物质量,也会造成评价结果不够客观、合理,认为采用结合丹酚酸 B 的含量和丹参总酚酸含量(或总抗氧化活性)来控制丹参药材、饮片及以丹参水溶性成分入药的中成药质量较为合理;测定丹参酚酸类成分的含量或提取此类成分时,应尽量避免采用用长时间、高温煎煮的方式。

本研究结果表明,丹参药材中的丹参素和原儿茶醛含量本身非常少,而随着煎煮时间延长,丹酚酸 B 含量不断减少,同时丹参素和原儿茶醛含量持续增加;再结合其化学结构特点^[6],丹酚酸 A、B 等结构中都含有若干丹参素单元,因此,认为丹参中的丹参素和原儿茶醛很可能主要是来源于丹参酚酸类成分在较高温度下的逐步降解。这也解释了为什么一些文献^[7~8]报道测定丹参中丹参素和原儿茶醛的含量时,回收率试验结果大多不甚理想,所测得的含量值

经常相差数十倍,其实主要是由于采用了不同的煎煮提取方法,一般来说,煎煮时间越长所测得丹参素和原儿茶醛的含量值越高。

丹参酚酸 B 随着煎煮时间延长而不断降解,因此临床丹参入药时不宜久煎(煎煮时间应控制在 30 min 左右);每剂最多煎煮两次即可;加水量 15 倍以下时,提取率明显下降,说明丹酚酸 B 在水中溶解度不是很大,临床应用时处方量过大(24 g 以上)或煎煮时加水过少,有可能导致有效成分溶出不完全。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部,北京:化学工业出版社,2005:52-53.
- [2] TAKAHASHI K, OUYANG X, UESHIMA E, et al. Abstracts of Papers, The 122nd Annual Meeting of Pharmaceutical Society of Japan [C]. Osaka: Medical and pharmaceutical Society for WA-KAN-YAKU, 2003, 20 (supply): 192-196.
- [3] UENG Y F, KUO Y H, PENG H C, et al. Diterpene quinone tanshinone II A selectively inhibits mouse and human cytochrome p450 1A2 [J]. Xenobiotica, 2003, 33 (6): 603-613.
- [4] 杜冠华,张均田. 丹参现代研究概况与进展[J]. 医药导报, 2004, 23(6): 355-360.
- [5] 杜冠华,张均田. 丹参水溶性有效成分-丹酚酸研究进展[J]. 基础医学与临床, 2000, 20(5): 394-398.
- [6] 徐德然,王康才,王峥涛,等. 丹参中丹参素、原儿茶醛来源的初步研究[J]. 中国天然药物, 2005, 3(3): 148-150.
- [7] 郑晓珂,董三丽,冯卫生. HPLC 法测定丹参中参素、丹参酮 II_A、二氢丹参酮、隐丹参酮的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(6): 12-15.
- [8] 黄敬群,田嘉玲,朱伟. 高效液相色谱法测定不同煎煮条件下丹参和冠心 II 号中丹参素、原儿茶醛的含量[J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(12): 44-45.