

# 丹参四倍体优良品系有效成分的含量测定及药理学试验

朱丹妮, 高山林, 卞云云, 程心玫

(中国药科大学, 江苏 南京 210038)

**摘要:** 运用 HPLC 法测定丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 同源四倍体优良品系 61-2-22 及安徽、江苏和陕西产丹参不同部位、不同生长年限的有效成分(3 种丹参酮和 2 种水溶性酚酸)含量。丹参品系 61-2-22 的有效成分含量明显高于其他产地丹参的含量; 根中有效成分含量明显高于茎和叶的含量; 丹参酮和丹参素的含量呈明显相关。初步药理实验结果表明, 在相同剂量下, 优良品系 61-2-22 具有更好的药理活性。

**关键词:** 丹参; 同源四倍体; 丹参酮类; 丹参素; HPLC

**中图分类号:** S567.5<sup>+</sup>3; R284.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2001)02-0007-04

**Determination of effective constituents in autotetraploid elite line of *Salvia miltiorrhiza* Bunge and primary pharmacological experiments** ZHU Dan-ni, GAO Shan-lin, BIAN Yun-yun, CHENG Xin-min (China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2001, 10(2): 7-10

**Abstract:** Three kinds of tanshinone and two kinds of water-soluble phenolic-acid in different parts of plants and different growth years of autotetraploid elite line 61-2-22 and different localities of *Salvia miltiorrhiza* Bunge were determined by HPLC. The results indicated that the contents of effective constituents in the new autotetraploid of *Salvia miltiorrhiza* were significantly higher than that in other samples. The contents of effective constituents in roots were significantly higher than that in stems and leaves. The content of tanshinone was closely related to the content of danshensu in all tested materials. Primary pharmacological experiments indicated that the new autotetraploid line of *Salvia miltiorrhiza* showed more active pharmacological effects.

**Key words:** *Salvia miltiorrhiza* Bunge; autotetraploid; tanshinone; danshensu; HPLC

中药丹参为唇形科 (Labiatae) 植物丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 的根, 是我国传统大宗药材, 具有活血化瘀、凉血消肿、除烦清心等作用, 临床上治疗冠心病的主要药材。但是目前丹参药材品系混乱, 种质退化严重, 药材质量不稳定。作者应用植物组织培养技术对江苏产丹参进行了诱发多倍体技术的研究, 通过近十年的探索, 从诱导获得的多倍体株系中选育出优良品系 61-2-22, 同时自 1998 年起先后在安徽、江苏、陕西等省推广使用, 取得了良好的效果。

为了进一步观察丹参优良品系 61-2-22 有效成分的含量、分布部位和生长积累动态, 本文进行了丹参中脂溶性丹参酮类成分与水溶性酚酸类成分的测定和相关性分析, 将安徽、江苏、陕西地区产的地方品系与优良品系 61-2-22 进行对比, 采用 HPLC 法测定丹参酮类及酚酸类成分的含量, 进一步评价丹参

优良品系 61-2-22 的内在质量, 并进行了初步药理试验, 以验证有效成分和药理药效的对应关系。

## 1 实验部分

### 1.1 样品采集

丹参优良品系 61-2-22 采自中国药科大学药材实验地和江苏盱眙, 其他丹参样品分别采自安徽亳州、江苏盱眙和陕西商洛, 各样品均于 1999 年秋季采收, 采收后去除泥土, 干燥备用。

### 1.2 仪器与试剂

日本岛津 LC-10A 高效液相色谱仪, SPD-10A 紫

收稿日期: 2000-09-03

基金项目: 国家科技部“九五”国家级重点科技成果推广项目 (97100504A) 的一部分

作者简介: 朱丹妮 (1946-), 女, 江苏无锡人, 本科, 副教授, 长期从事药用植物成分分析和复方化学研究。

外检测器, C-R6A 色谱数据处理机, 上海产 CQ-250 型超声波清洗器。甲醇为色谱纯(江苏淮阴塑料制品厂精细化工研究所); 重蒸水自制; 其他试剂均为分析纯。

对照品: 丹参酮 II A 购自中国药品生物制品检定所; 丹参酮 I、隐丹参酮由中国药科大学罗厚蔚教授提供; 丹参素(丹参酸 A) 购自上海医科大学药学院; 原儿茶醛由中国药科大学分析教研室胡育筑教授赠送。

### 1.3 高效液相色谱分离条件<sup>[1]</sup>

丹参酮分离条件:  $C_{18}$  5  $\mu\text{m}$  柱(5mm  $\times$  250mm); 流动相为  $V(\text{甲醇}):V(\text{水})=80:20$ ; 流速 1 mL/min; 检测波长 254 nm。

丹参素、原儿茶醛分离条件<sup>[2]</sup>: 色谱柱同上, 流动相为  $V(\text{甲醇}):V(\text{水}):V(\text{冰醋酸})=35:160:5$ ; 流速 0.8 mL/min; 检测波长 254 nm。

### 1.4 标准曲线绘制

1.4.1 3种丹参酮标准曲线 精密称取隐丹参酮 0.9 mg, 丹参酮 I 1.2 mg, 丹参酮 II A 0.9 mg, 用  $V(\text{二氯甲烷}):V(\text{甲醇})=8:2$  混合溶剂溶解定容至 1 mL, 作为对照品贮备液。取 3 种丹参酮对照品贮备液各 25  $\mu\text{L}$ , 定容至 1 mL, 配成浓度分别为隐丹参酮 22.5  $\mu\text{g/mL}$ , 丹参酮 I 30  $\mu\text{g/mL}$ , 丹参酮 II A 22.5  $\mu\text{g/mL}$  的对照品混合液; 用微量进样器精密吸取上述对照品溶液 2.5、5.0、7.5、10.0、12.5、15.0  $\mu\text{L}$ , 分别进样测定, 经回归处理得到 3 种对照品浓度和峰面积的回归方程:

$$\text{隐丹参酮 } Y = 1451.9351x + 169.9189 \\ r = 0.9996 (n = 5)$$

$$\text{丹参酮 I } Y = 2509.6270x - 38.2162 \\ r = 0.9999 (n = 5)$$

$$\text{丹参酮 II A } Y = 2388.0162x + 390.2703 \\ r = 0.9999 (n = 5)$$

1.4.2 丹参素和原儿茶醛标准曲线 称取丹参素、原儿茶醛适量, 用重蒸水配成丹参素 0.09 mg/mL、原儿茶醛 0.055 mg/mL 的混合对照品溶液, 分别吸取上述对照品混合溶液 2.5、5.0、7.5、10.0、12.5 和 15.0  $\mu\text{L}$ , 注入高效液相色谱仪测定, 以峰面积( $Y$ )为纵坐标, 对照品浓度( $x$ )为横坐标作图, 得标准曲线, 回归方程为:

$$\text{原儿茶醛 } Y = 91719.2727x - 2402.2 \\ r = 0.9995 (n = 5)$$

$$\text{丹参素 } Y = 13574.6667x - 875.4 \\ r = 0.9976 (n = 5)$$

隐丹参酮浓度在 0.056 ~ 0.330  $\mu\text{g}$ 、丹参酮 I 浓度在 0.075 ~ 0.450  $\mu\text{g}$ 、丹参酮 II A 浓度在 0.056 ~ 0.330  $\mu\text{g}$ 、丹参素浓度在 0.225 ~ 3.375  $\mu\text{g}$ 、原儿茶醛浓度在 0.1375 ~ 0.8250  $\mu\text{g}$  范围内与峰面积间呈良好线性关系。

### 1.5 样品含量测定

1.5.1 丹参酮含量测定 精密称取干燥至恒重的各丹参样品粗粉(50 目筛)50 ~ 60 mg, 加入  $V(\text{二氯甲烷}):V(\text{甲醇})=8:2$  混合溶液 10 mL, 暗处浸泡过夜, 次日超声提取 20 min, 然后离心 15 min (3000 r/min), 吸取上清液以丹参酮色谱分离条件作 HPLC 分析, 以外标二点法计算各丹参样品中 3 种丹参酮含量。

1.5.2 丹参素、原儿茶醛含量测定 精密称取上述干燥至恒重的丹参样品 0.5 g, 用 1% 盐酸 30 mL 浸泡 1 h, 回流提取 1 h, 过滤, 定容至 50 mL, 用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 吸取滤液用丹参素、原儿茶醛色谱分离条件进行 HPLC 分析, 以外标二点法计算各样品的丹参素及原儿茶醛含量。

### 1.6 药理试验

试验动物购自中国药科大学动物饲养室。采用微循环显微镜和冷光源观测小鼠耳廓微循环情况。丹参生药水煎剂浓度为 0.2 g/mL。取体重 18 ~ 22 g 小鼠 70 只, 随机分为 7 组, 每组 10 只。腹腔注射 1.5 g/kg 20% 乌拉坦麻醉, 耳廓去毛并涂上少许液体石蜡, 平展于载玻片上, 将盖玻片盖在耳廓上, 并置于显微镜载物台上。调节冷光源, 在透射光下, 选择视野清晰部位, 测量给药前微静脉(V), 微动脉(A)直径及同标尺相交毛细血管数(N), 同时描记出所观察部位和血管形态, 以便再次观察。随后分别灌胃 61-2-22 四倍体丹参和二倍体丹参生药各 4、8 和 12 g/kg(每 10 g 小鼠体重各 0.2、0.4 和 0.6 mL), 对照组灌胃自来水每 10 g 小鼠体重 0.4 mL。观测给药后 1 h 小鼠同一部位耳廓微循环的上述指标在给药前后的差值, 并与对照比较。

## 2 结果与讨论

### 2.1 12 个丹参样品中丹参酮类和酚酸类含量

对不同来源、不同品系和不同部位的 12 个丹参

样品进行丹参酮类和酚酸类含量的 HPLC 测定。结果见表 1。

2.1.1 不同产地丹参药材中丹参酮含量 按中国药典规定<sup>[3]</sup>:丹参药材的质量以丹参酮 II A 为衡量指标,其含量不应低于 0.2%,从本实验测定结果看,目前生产上的丹参药材大多达不到药典规定的质量指标要求,其原因之一是目前生产中使用的丹参药材品系长期没有进行品系选育,普遍存在退化混杂现象,致使丹参药材的产量和质量均大幅度下降。作者进行了丹参的组织培养多倍体育种研究,

育成丹参优良品系 61-2-22。在产量提高的同时,药材质量也明显提高,和目前的丹参药材相比,优良品系丹参药材的丹参酮 II A 的含量为 0.358 10%,安徽亳州产丹参为 0.204 60%,而江苏江宁产丹参和陕西产野生丹参分别仅为 0.182 70%和 0.131 40%(表 1)。陕西商洛的栽培丹参和江苏江宁永耀产的丹参中丹参酮 II A 的含量就更低。而丹参优良品系 61-2-22 中丹参酮 II A 的含量比丹参酮含量最高的安徽产丹参提高了 75%以上,达到和超过了中国药典对丹参药材的质量要求指标。

表 1 不同丹参样品中丹参酮类及酚酸类的含量

Table 1 The contents of cryptotanshinone, tanshinone I, tanshinone II A, protocatechuic aldehyde and danshensu in samples of *Salvia miltiorrhiza*

编号 No	样品 Samples	产地 Locality	生长年限 Years of growth (a)	部位 Part of plant	隐丹参酮 Cryptotanshin- one (%)	丹参酮 I Tanshinone I (%)	丹参酮 II A Tanshinone II A (%)	原儿茶醛 Protocatechuic aldehyde (%)	丹参素 Danshensu (%)
1	61-2-22	江苏省盱眙 Xuyi, Jiangsu	1	根 root	0.212 80	0.098 82	0.358 10	0.112 30	0.591 60
2	61-2-22	江苏省盱眙 Xuyi, Jiangsu	1	茎 stem	0.143 60	0.006 71	0.034 81	0.046 49	0.171 20
3	61-2-22	江苏省盱眙 Xuyi, Jiangsu	1	叶 leaf	0.012 70	0.004 27	0.022 10	0.041 75	0.166 60
4	61-2-22	本校试验地 Experiment plot	0.5	根 root	0.036 10	0.043 57	0.227 90	0.074 07	0.443 60
5	61-2-22	本校试验地 Experiment plot	0.5	茎 stem	0.003 21	0.004 56	0.004 32	0.019 33	0.078 96
6	安徽丹参	安徽省亳州 Bozhou, Anhui	2	根 root	0.099 67	0.063 78	0.204 60	0.051 51	0.465 10
7	安徽丹参	本校试验地 Experiment plot	0.5	根 root	0.019 63	0.058 11	0.163 30	0.111 20	0.386 10
8	安徽丹参	本校试验地 Experiment plot	0.5	茎 stem	0.001 84	0.002 48	0.002 99	0.023 56	0.160 50
9	野生丹参	陕西省商洛 Shangluo, Shaanxi	2	根 root	0.036 52	0.025 24	0.131 40	0.048 66	0.343 60
10	陕西丹参	陕西省商洛 Shangluo, Shaanxi	1	根 root	0.009 28	0.027 10	0.053 86	0.074 07	0.443 60
11	江苏丹参	江苏省江宁 Jiangning, Jiangsu	1	根 root	0.090 00	0.047 93	0.182 70	0.041 22	0.318 80
12	江苏丹参	江苏省江宁 Jiangning, Jiangsu	1	根 root	0.028 36	0.014 06	0.073 83	0.038 93	0.240 70

2.1.2 丹参酮和丹参素含量的相互关系 根据目前丹参药理研究结果,丹参药材中除了丹参酮是有效成分外,丹参素等水溶性酚酸也是重要的有效成分,尤其对心血管系统有药理活性。因此本研究在测定丹参酮类含量的同时,也进行了丹参素和原儿茶醛含量的测定。结果表明,在所测定的 12 个供试样品中,凡是丹参酮含量高的样品,丹参素含量也较高(表 1),为此进行了 12 个样品的丹参酮 II A 和丹参素含量的相关性分析,相关系数为 75%,相关性较高,由此可见中国药典以丹参酮 II A 的含量作为丹参药材的质量指标是可行的。

2.1.3 丹参不同部位丹参酮和丹参素含量 丹参优良品系 61-2-22 根中丹参酮和丹参素的含量明显高于茎和叶。根中丹参酮 II A 含量(0.358 10%)是茎(0.034 81%)和叶(0.022 10%)的 10.3 倍和 16.2 倍。根中丹参素含量(0.591 60%)是茎(0.171 20%)

和叶(0.166 60%)的 3.46 倍和 3.55 倍。这一趋势在半年生的试管苗丹参中也明显地反映出来。这一结果同时也说明:丹参的药用部位传统上主要采用根是有科学依据的。

2.1.4 不同生长年限丹参药材中丹参酮和丹参素含量 表 1 结果还表明,一年生丹参药材丹参酮和丹参素含量明显高于半年生试管苗,以优良品系 61-2-22 丹参为例,一年生药材根中丹参酮 II A 含量(0.358 10%)是半年生根(0.227 90%)的 1.57 倍;一年生药材根中丹参素含量(0.591 60%)是半年生根(0.443 60%)的 1.33 倍,说明丹参药材的适宜采收期以一年以上为好,也说明了丹参酮和丹参素是后期积累的次生代谢产物。

## 2.2 丹参多倍体优良品系和原二倍体丹参品系的药理活性

为了进一步验证丹参多倍体优良品系 61-2-22



的药理活性。进行了丹参多倍体优良品系和原二倍体丹参品系的药理活性对比试验。

给药后 1 h 分别测得两丹参品系对小鼠耳廓微循环的影响,从表 2 可见两丹参品系高剂量组均可增大小鼠耳廓微动脉、微静脉口径,与对照组相比有极显著差异(P < 0.01),两丹参品系的高剂量组间比较无显著性差异(P > 0.05)。但四倍体丹参的中剂量组也可使微血管口径增大,与对照组相比有显著差异(P < 0.01),而二倍体丹参的中剂量组与对照相比对微血管口径无明显影响(P > 0.05)。

表 2 四倍体丹参和原二倍体丹参对小鼠耳廓微血管口径的影响(X ± S, n = 10)  
Table 2 The effects of autotetraploid and diploid of *Salvia miltiorrhiza* on diameter of micro-blood vessel in auricle of mouse (X ± SD, n = 10)

组别 Groups	剂量 Dose (mL/10g)	微血管口径(μm) Diameter of micro-blood vessel	
		动脉 Artery	静脉 Vein
水(Control)	0.4	-0.39 ± 0.48	-0.37 ± 0.61
四倍体 61-2-22 Autotetraploid	0.2	0.09 ± 0.64	0.19 ± 0.83
	0.4	1.07 ± 0.57***	1.02 ± 0.87***
	0.6	0.76 ± 0.77***	0.72 ± 0.63***
二倍体 Diploid	0.2	-0.05 ± 1.54	-0.04 ± 1.49
	0.4	0.02 ± 0.72	-0.13 ± 0.65
	0.6	0.87 ± 0.76***	0.66 ± 0.92***

\*\*\* P < 0.01 (与对照相比 comparing with control)

两丹参品系对小鼠耳廓毛细血管开放量影响见表 3,两丹参品系 3 个剂量组均可使耳廓毛细血管开放量增加,与对照组比较有显著性差异。

以上的初步药理实验结果表明四倍体丹参 61-2-22 比二倍体丹参(普通栽培丹参)有较强的改善微循环及增加微血管口径的作用;而对毛细血管开放数的影响两者无明显差异。

综合本研究结果,丹参四倍体优良品系 61-2-22

无论在丹参酮含量或是丹参素含量均明显高于地方丹参品系。进一步探讨丹参有效成分与药效的关系的初步结果表明:在相同剂量下,丹参四倍体优良品系的药理活性优于丹参地方品系,说明丹参中有效成分的含量与药效作用存在着平行关系,因此以丹参酮和丹参素含量作为衡量丹参药材的质量和药效是合理的。

表 3 四倍体丹参和原二倍体丹参对小鼠耳廓毛细血管开放量的影响(X ± S, n = 10)  
Table 3 The effect of autotetraploid and diploid of *Salvia miltiorrhiza* on enlarging diameter of capillary vessel in auricle of mouse (X ± S, n = 10)

组别 Groups	剂量 Dose (mL/10g)	毛细血管开放量(μm) Enlarging diameter of capillary vessel
水(Control)	0.4	-0.10 ± 0.88
四倍体 61-2-22 Autotetraploid	0.2	2.00 ± 1.33***
	0.4	3.00 ± 1.05***
	0.6	3.80 ± 1.48***
二倍体 Diploid	0.2	3.00 ± 1.94***
	0.4	2.60 ± 1.63***
	0.6	4.30 ± 1.49***

\*\*\* P < 0.01 (与对照相比 comparing with control)

参考文献:

- [1] 朱丹妮,高山林,蔡朝辉,等. 丹参多倍体株系中三种丹参酮含量的比较[J]. 药物生物技术,1996,3(1):22.
- [2] 倪坤仪,张国清. 反相高效液相色谱测定丹参注射剂三种有效成分[J]. 药学报,1988;23(4):293.
- [3] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典一九九五年版(一部)[M]. 广州:广东科技出版社,1995. 62.
- [4] 徐叔云,卞如谦,陈修,等. 药理学试验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1994. 1.
- [5] 黄泰康. 常用中药成分与药理手册[M]. 北京:人民卫生出版社,1994. 4.

(责任编辑:惠红)