

生化与药用试剂

多维度综合评价瞬时高温灭菌对丹参质量的影响

庄新慧^{1,2}, 焦连庆^{*1}, 于敏¹, 田齐聪², 张凤清^{*2}

(1. 吉林省中医药科学院, 吉林 长春 130012; 2. 长春工业大学 化学与生命科学学院, 吉林 长春 130012)

摘要:为考察瞬时高温灭菌对丹参质量的影响, 采用 HPLC 法测定 10 批灭菌前后丹参中 8 种化学成分含量, DPPH·法测定丹参灭菌前后抗氧化活性, MTT 法测定灭菌前后丹参大鼠肝星状细胞 (HSC-T6) 存活率。建立 HPLC 指纹图谱, 液质联用 (LC-MS) 法确定共有峰结构, 采用聚类分析和正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 预测不同丹参差异性质量标志物; 通过丹参与过量 DPPH 反应后的 HPLC 峰面积变化, 筛选丹参抗氧化成分; 采用偏最小二乘法回归 (PLS-DA) 分析法, 得出共有峰与 DPPH·抗氧化活性间的谱效关系, 结合单体化合物抗氧化活性大小, 最终确定丹参抗氧化活性质量标志物。灭菌前后 8 种化学成分含量、DPPH·清除率及细胞存活率经 *t* 检验均无显著性差异 ($P>0.05$); 灭菌前后指纹图谱相似度均大于 0.9, 同一批次样品灭菌前后聚为一类, 瞬时高温灭菌对丹参质量未产生影响; 紫草酸甲酯、丹酚酸 B、丹参酸甲酯、丹参酮 I、隐丹参酮、丹酚酸 F、丹参酮 II A、二氢丹参酮 I 可作为丹参质量差异标志物; 迷迭香酸、丹酚酸 B、紫草酸、丹酚酸 F 可作为抗氧化活性的质量标志物。

关键词: 丹参; 瞬时高温灭菌; DPPH·抗氧化活性; 质量标志物; 质量评价

中图分类号: R284 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-3283(2024)06-0009-08

DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0803

Multi-Dimensional Comprehensive Evaluation of the Impact of Instantaneous High-Temperature Sterilization on the Quality of *Salvia Miltiorrhiza* ZHUANG Xin-hui^{1,2}, JIAO Lian-qing^{*1}, YU Min¹, TIAN Qi-cong², ZHANG Feng-qing^{*2} (1. Jinlin Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130012, China; 2. School of Chemistry and Life Sciences, Changchun University of Technology, Changchun 130012, China)

Abstract: To investigate the impact of instantaneous high-temperature sterilization on the quality of *Salvia miltiorrhiza*, the content of eight chemical components in *Salvia miltiorrhiza* before and after sterilization was determined using HPLC, the antioxidant activity of *Salvia miltiorrhiza* before and after sterilization was measured using the DPPH· method, and the cell viability of rat hepatic stellate cells (HSC-T6) before and after sterilization was measured using the MTT method. Set up HPLC fingerprints, the shared peak structures were determined using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), differential quality markers for different batches of *Salvia miltiorrhiza* were obtained through cluster analysis and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). The antioxidant components of *Salvia miltiorrhiza* were screened by HPLC peak area changes after reaction with excess DPPH. Partial least square regression (PLS-DA) analysis method was used to obtain the spectral effect relationship between the common peak and DPPH· antioxidant activity, combined with the antioxidant activity of monomer compounds, and finally determine the antioxidant activity quality markers of *Salvia miltiorrhiza*. The contents of 8 chemical components, DPPH· clearance rate and cell survival rate were not significantly different by *t* test before and after sterilization ($P>0.05$). The similarity of fingerprints before and after sterilization was greater than 0.9, the same batch of samples clustered into one class before and after sterilization, instantaneous high temperature sterilization had no effect on the quality of *Salvia miltiorrhiza*. Methyl vioxalate, salvianolic acid B, methyl salvianolic acid, tanshinone I, cryptotanshinone, salvianolic acid F, tanshinone II A and dihydrotanshinone I could be used as markers of quality difference of salvianone. Rosmarinic acid, salvianolic acid B, purple oxalic acid, salvianolic acid F can be used as quality markers of antioxidant activity.

Key words: *Salvia miltiorrhiza*; instantaneous high-temperature sterilization; DPPH· antioxidant activity; quality markers; quality evaluation

收稿日期: 2023-12-13; 网络首发日期: 2024-04-16

基金项目: 吉林省发展和改革委员会项目 (2020C032-6)。

作者简介: 庄新慧 (1999-), 女, 江苏盐城人, 硕士生, 主要研究方向为天然药物化学及代谢研究。

通讯作者: 焦连庆, E-mail: jiaolq2017@163.com; 张凤清, E-mail: 1044424827@qq.com。

引用本文: 庄新慧, 焦连庆, 于敏, 等. 多维度综合评价瞬时高温灭菌对丹参质量的影响[J]. 化学试剂, 2024, 46(6): 9-16。

丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bge.) 为唇形科植物丹参的干燥根茎, 具有活血下瘀, 通经止痛, 清心除烦, 凉血消痛的功效^[1,2]。丹参中的有效成分主要为水溶性丹酚酸类和脂溶性丹参酮类, 水溶性成分以丹参素、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 等为主, 脂溶性主要以二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II A 等为主^[3]。丹参具有良好的抗氧化活性, 在治疗活性氧诱发的心脑血管疾病方面疗效显著, 其有效成分能够通过阻断自由基链反应和清除体内产生的自由基来减少对心脏的损害^[4]。

丹参在采收、加工、储藏期间容易滋生细菌从而会影响其质量, 选择有效且对其质量没有影响的灭菌方法尤为重要。丹参药材灭菌方法的研究报道主要有流通蒸汽灭菌法^[5]、⁶⁰Co 辐照灭菌法^[6]、微波灭菌法^[7], 均仅以丹参酮 II A 含量作为评价指标, 不能全面反映对丹参整体质量的影响。流通蒸汽灭菌和 ⁶⁰Co 辐照灭菌前后, 丹参酮 II A 含量差异显著, 不适用于丹参灭菌; 瞬时高温灭菌 (High Temperature Short Time, HTST) 利用直接蒸汽或热交换器将食品、药品等在 150~180 °C 高温下持续灭菌几秒至十几秒使微生物失活, 灭菌时间极短, 效率高, 无环境污染, 自动化程度高。本课题组前期研究结果^[8,9]表明瞬时高温灭菌可在不影响苦丁茶冬青、甘草、大叶冬青等药材主要成分及抗氧化活性的前提下杀灭微生物, 表明了瞬时高温灭菌的有效性及其可行性。

本研究一方面通过对不同批次丹参中多种化合物含量进行化学计量分析, 明确影响丹参质量的重要标志物; 另一方面, 丹参提取液 DPPH· 抗氧化活性体现丹参全成分的抗氧化活性, HPLC 法分析丹参与过量 DPPH· 反应表征的是丹参中单体的抗氧化活性强弱及反应速率, 上述分析结果结合丹参 8 种单体化合物 DPPH· 抗氧化活性 IC₅₀ 值和不同批次丹参抗氧化活性与化学成分间的谱效关系, 确定丹参中抗氧化活性质量标志物, 探索丹参抗氧化活性物质基础。体外细胞毒性试验作为药物安全性评价的重要环节^[10], 用于初步评价瞬时高温灭菌过程中是否产生毒性物质从而对丹参药材的安全性造成影响。本研究建立了包括丹参多种化学成分含测、DPPH· 抗氧化活性测定、指纹图谱及谱效分析、微生物限度检查及体外细胞毒性等多个维度的质量评价体系, 全面评价瞬时高温灭菌对丹参质量及安全性的影响, 为瞬

时高温灭菌技术在丹参生产中的应用、质量控制及药效评价提供科学依据。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

WS-FMD15 型过热蒸汽瞬时灭菌系统 (长春钴智制药有限公司); BSA12S-CW 型电子天平 (德国赛多利斯科学仪器有限公司); LC-20A 型高效液相色谱仪、Waters SYNAPT G2 型超高效液相色谱-四极飞行时间质谱联用仪 (日本岛津公司); RT-6100 型酶标分析仪 (深圳雷杜生命科学有限公司); KQ-250E 型超声波清洗仪 (昆山市超声仪器有限公司); FD-1D-50 型冷冻干燥机 (北京博医康实验仪器有限公司)。

丹参购自山东药材市场, 经吉林省中医药科学院南敏伦研究员鉴定为唇形科植物丹参。对照品迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II A、丹参素 (纯度 >98%, 中国药品生物制品检定所); 乙腈 (色谱纯, 美国 TEDIA 公司); 甲酸 (色谱纯, 天津光复科技发展有限公司); DPPH· 试剂 (纯度 >98.5%, 上海麦克林生化科技有限公司); HSC-T6 大鼠肝星状细胞 (北京博沃尔斯生物科技公司); 优级胎牛血清、细胞培养级 PBS (1x)、DMEM/F12 培养基 (大连美伦生物公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 瞬时高温灭菌处理丹参样品

分别取 10 批丹参样品 500 g, 粉碎, 过三号筛 (50 目), 瞬时高温灭菌 170 °C 处理 10 s, 工艺参数来源于本课题组前期优化工作, 采用无菌均质袋分装, 即得。

1.2.2 微生物限度检查

按 2020 年版《中国药典》四部“非无菌产品微生物限度检查法 (通则 1105)”^[11], 分别检测霉菌和酵母菌总数、需氧菌总数及控制菌 (大肠埃希菌、沙门菌、耐胆盐革兰阴性菌)。

1.2.3 对照品溶液的制备

精密称取 8 种对照品, 加 75% 甲醇配制成每 1 mL 分别含有 3 mg 丹酚酸 B、1 mg 丹参素、1 mg 迷迭香酸、1 mg 紫草酸、1 mg 二氢丹参酮 I、1 mg 隐丹参酮、1 mg 丹参酮 I、0.5 mg 丹参酮 II A 的对照品溶液, 过微孔滤膜 (0.22 μm), 4 °C 冷藏保存, 即得。

1.2.4 供试品溶液的制备

精密称取灭菌前和灭菌后丹参样品粉末各 0.3 g,置 25 mL 棕色量瓶中,加 75% 甲醇溶液稀释至刻度,超声处理 30 min,静置,晾至室温,用 75% 甲醇补足减失重量,微孔滤膜过滤(0.22 μm),即得供试品溶液。

1.2.5 色谱条件

色谱柱:Agilent HC-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:0.1% 甲酸水溶液(A),乙腈(B),梯度洗脱;柱温 25 ℃,流速 1.0 mL/min,检测波长 280 nm,进样量 10 μL;洗脱程序:0~8 min, 10%~15% B;8~15 min, 15%~21% B;15~30 min, 21% B;30~40 min, 21%~30% B;40~50 min, 30%~60% B;50~65 min, 60%~75% B;65~70 min, 75%~95% B^[12]。

1.2.6 8 种化合物含量测定

按 1.2.5 条件进样测定,供试品溶液进样 10 μL,对照品溶液进样 5 μL,计算即得。

1.2.7 方法学考察

丹参中 8 种化合物的测定方法按照已发表的文献[12]测定,文献已进行方法学考察,建立的指纹图谱的测定方法也与文献方法相同。

1.2.8 质谱参数

电喷雾离子源(ESI);样品锥电压 35 V;喷雾电压正离子 3 000 V;负离子 2 400 V;源温 150 ℃;去溶剂气为氮气;温度 300 ℃;流速 300 L/h。

2 结果与讨论

2.1 灭菌前后丹参微生物限度检查

药典规定的非无菌药品微生物限度标准中,

需氧菌总数在 10⁵ CFU/g 以下,霉菌和酵母菌总数不超过 10² CFU/g,控制菌不得检出大肠埃希菌(1 g)、沙门菌(10 g)、耐胆盐革兰阴性菌(1 g)。灭菌前 10 批丹参需氧菌、霉菌和酵母菌均不可计,不符合药典规定的标准;瞬时高温灭菌后 10 批丹参样品各微生物总数见表 1,检查项目中细菌数、霉菌数、酵母菌数及控制菌检查结果均符合药典规定,结果表明瞬时高温灭菌能够有效降低丹参药材微生物限度水平,达到符合药典规定的灭菌效果。

表 1 微生物限度检查

Tab.1 Microbial limits checks (CFU/g)					
批次	需氧菌/ ×10 ³	大肠 埃希菌	耐胆盐革兰 阴性菌	沙门菌	霉菌和 酵母菌
1	4.0	—	<10	—	10
2	5.0	—	<10	—	20
3	2.0	—	<10	—	40
4	2.4	—	<10	—	10
5	3.6	—	<10	—	30
6	1.8	—	<10	—	50
7	4.1	—	<10	—	80
8	2.9	—	<10	—	38
9	2.6	—	<10	—	40
10	3.0	—	<10	—	60
未灭菌	不可计	—	<10	—	不可计

2.2 丹参 8 种化合物含量

瞬时高温灭菌后 10 批丹参中 8 种丹酚酸类和丹参酮类化合物含量及总含量结果见表 2, S1'~S10' 为丹参灭菌前 10 批样品, S1~S10 为丹参灭菌后 10 批样品。

表 2 灭菌前后丹参 8 种被测成分含量

Tab.2 Contents of 8 tested ingredients of <i>Salvia miltiorrhiza</i> before and after sterilization (%)									
样品	丹参素	迷迭香酸	紫草酸	丹酚酸 B	二氢丹参酮 I	隐丹参酮	丹参酮 I	丹参酮 II A	总含量
S1'	0.041	0.141	0.191	3.230	0.194	0.165	0.103	0.192	4.257
S1	0.039	0.136	0.188	3.102	0.205	0.186	0.239	0.204	4.299
S2'	0.040	0.141	0.192	3.262	0.130	0.119	0.147	0.128	4.159
S2	0.039	0.143	0.200	3.289	0.145	0.131	0.165	0.136	4.248
S3'	0.027	0.119	0.158	2.434	0.086	0.072	0.085	0.075	3.057
S3	0.028	0.126	0.167	2.659	0.082	0.066	0.084	0.070	3.282
S4'	0.033	0.106	0.137	2.159	0.067	0.058	0.073	0.059	2.693
S4	0.035	0.105	0.142	2.223	0.071	0.061	0.074	0.064	2.774
S5'	0.035	0.136	0.196	3.041	0.189	0.184	0.229	0.191	4.202
S5	0.036	0.134	0.200	3.017	0.208	0.199	0.260	0.212	4.265
S6'	0.032	0.135	0.199	3.063	0.142	0.130	0.162	0.143	4.006

续表

样品	丹参素	迷迭香酸	紫草酸	丹酚酸 B	二氢丹参酮 I	隐丹参酮	丹参酮 I	丹参酮 II A	总含量
S6	0.033	0.136	0.199	3.071	0.169	0.138	0.174	0.153	4.072
S7'	0.051	0.125	0.175	2.793	0.123	0.112	0.138	0.122	3.639
S7	0.025	0.127	0.178	2.831	0.126	0.110	0.137	0.119	3.652
S8'	0.019	0.120	0.163	2.583	0.083	0.074	0.088	0.078	3.207
S8	0.033	0.126	0.161	2.622	0.083	0.072	0.084	0.076	3.259
S9'	0.033	0.132	0.197	2.965	0.220	0.194	0.250	0.211	4.203
S9	0.035	0.137	0.120	3.076	0.220	0.189	0.241	0.210	4.229
S10'	0.040	0.114	0.161	2.433	0.111	0.103	0.122	0.108	3.191
S10	0.029	0.126	0.172	2.559	0.122	0.103	0.119	0.115	3.346

2.3 DPPH·抗氧化活性测定结果

2.3.1 丹参样品及 8 种化合物单体 DPPH·抗氧化活性测定

参照陈仁强等^[13]方法并加以改进,制成丹参药材质量浓度为 0.6、0.36、0.3、0.18 mg/mL 的 75% 甲醇溶液。在紫外波长 517 nm 下测定样品组溶液及样品对照组溶液、空白组溶液吸光度,每组样品设置 3 复孔,实验结果取平均值,样品对照组用样品溶剂替代 DPPH·溶液,空白组样品溶液用无水乙醇替代样品溶液,根据式(1)计算自由基清除率,结果见表 3。

$$\text{DPPH} \cdot \text{清除率}(\%) = [1 - (A_1 - A_0)/A_i] \times 100\% \quad (1)$$

式中, A_0 为样品对照溶液吸光度值; A_1 为样品溶液吸光度值; A_i 为空白溶液吸光度值。

表 3 灭菌前后 10 批丹参样品 DPPH·清除率

Tab.3 DPPH·clearance rate of 10 batches of *Salvia miltiorrhiza* samples before and after sterilization (%)

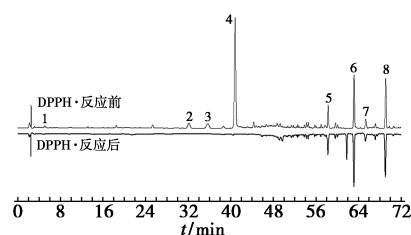
批号	灭菌前 $\bar{x} \pm S$	灭菌后 $\bar{x} \pm S$	批号	灭菌前 $\bar{x} \pm S$	灭菌后 $\bar{x} \pm S$
1	83.12±1.02	83.70±1.09	6	81.90±1.58	83.10±1.20
2	82.30±1.46	83.80±0.78	7	80.30±1.17	81.20±1.99
3	80.80±0.91	81.01±1.55	8	80.61±1.48	81.30±1.76
4	77.39±1.04	79.02±1.01	9	81.40±1.18	82.03±1.69
5	81.30±1.26	82.80±1.56	10	77.81±1.60	80.00±1.16

为了进一步验证丹参中影响 DPPH·抗氧化活性的化学成分,单独以丹参 8 种化合物单体进行抗氧化活性测定,将丹参素、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II A 8 种对照品分别用甲醇溶液稀释至 0.06、0.036、0.024、0.018 $\mu\text{g/mL}$,以样品浓度和自由基清除率进行线性回归得到方程,计算丹参素、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 的 DPPH·抗氧化活性 IC_{50} 值分别为 0.091、0.025、0.030、0.028 $\mu\text{mol/L}$,4 种水溶性丹参化合物抗氧化活性大小顺序为迷迭香酸>丹酚酸 B>紫草酸>丹参素,4 种

脂溶性丹参化合物二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II A 吸光度值大于 DPPH·对照组,无 DPPH·抗氧化活性。

2.3.2 HPLC 法筛选丹参 8 种化合物中 DPPH·抗氧化成分

取浓度为 12 mg/mL 丹参供试品溶液与 4 mg/mL DPPH 溶液反应 20 min,按 1.2.5 色谱条件注入高效液相色谱仪进行测定。丹参样品反应 20 min 前后 HPLC 图见图 1;根据峰面积变化计算反应率,结果见表 4。4 种水溶性成分丹参素、



1.丹参素;2.迷迭香酸;3.紫草酸;4.丹酚酸 B;
5.二氢丹参酮 I;6.隐丹参酮;7.丹参酮 I;8.丹参酮 II A

图 1 丹参样品反应 20 min 前后 HPLC 色谱图对比
Fig.1 Comparison of HPLC chromatograms before and after the reaction 20 min of *Salvia miltiorrhiza* samples

表 4 丹参样品反应前后峰面积变化及反应率

Tab.4 Changes in peak area and reaction rate of *Salvia miltiorrhiza* sample before and after reaction

化合物	反应前 峰面积	反应 20 min 后 峰面积	反应 65 min 后 峰面积	反应量	反应率/ %
丹参素	48 217	0	0	48 217	100
迷迭香酸	237 321	0	0	237 321	100
紫草酸	249 210	0	0	249 210	100
丹酚酸 B	2 998 364	0	0	2 998 364	100
二氢丹参酮 I	342 345	390 824	353 164	未反应	0
隐丹参酮、 丹参酮 I	1 019 508	1 020 772	1 020 880	未反应	0
丹参酮 II A	932 024	924 546	917 378	未反应	0

迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 反应率均为 100%, DPPH·抗氧化活性强;4 种脂溶性成分中二氢丹参酮 I 反应 20 min 后峰面积增加了 48479,最大吸收波长由反应前的 241、290 nm 变为 244、288 nm,可能有其他反应产物与二氢丹参酮 I 进行了叠加,隐丹参酮和丹参酮 I 色谱峰峰面积变化不明显,反应时间增加至 65 min 时,各峰面积变化不明显,不再继续发生反应,3 种化合物均无抗 DPPH·抗氧化活性;丹参酮 II A 反应后峰面积减少量少,抗氧化活性不显著,这与丹参 8 种化合物单体 DPPH·抗氧化活性结果相一致。

2.4 MTT 法测定灭菌前后丹参样品 HSC-T6 细胞存活率

2.4.1 样品溶液制备

精密称量 1 g 丹参样品,加入 20 倍量水溶液超声提取 30 min,过滤,取上清液,冷冻干燥,加水配制成浓度依次为 2 000、1 000、500、250、125 μg/mL 的供试品溶液。

2.4.2 细胞存活率测定

取处于对数生长期的 HSC-T6 细胞悬液,植入 96 孔板中,37 ℃ 培养箱中通入 5% CO₂ 培养 24 h 至细胞贴壁。分别吸取 100 μL 供试品溶液加入细胞中作为给药组,对照组每孔加入 100 μL 新鲜培养液,每组受试物设 6 复孔。采用 MTT 法^[14]在波长 450 nm 下测定待测物吸光度 OD 值,实验重复 3 次,按下列公式计算细胞存活率 RGR。

$$RGR(\%) = [(\text{给药组平均 OD 值}) / (\text{对照组平均 OD 值})] \times 100\%$$

(2)

灭菌前后不同浓度丹参样品溶液作用于 HSC-T6 细胞 24、48、72 h 后,细胞存活率随着药物剂量的降低而呈现增高的趋势,灭菌前后细胞存活率均大于 50%,灭菌前后的丹参样品溶液均无 HSC-T6 细胞毒性,结果见表 5。灭菌前后 24、48、72 h 内相同给药浓度下细胞存活率经 *t* 检验,均无显著性差异 (*P*>0.05)。

表 5 灭菌前后不同给药浓度下 HSC-T6 细胞存活率

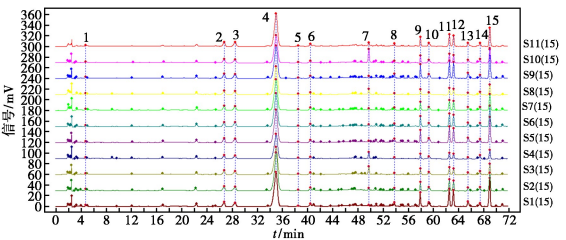
Tab.5 Survival rate of HSC-T6 cells at different concentrations before and after sterilization							
给药浓度/(μg·mL ⁻¹)	灭菌前/后	24 h($\bar{x}\pm S$)/%	<i>P</i>	48 h($\bar{x}\pm S$)/%	<i>P</i>	72 h($\bar{x}\pm S$)/%	<i>P</i>
2 000	灭菌前	74.3±3.3	0.958	60.6±2.8	0.300	58.6±0.8	0.063
	灭菌后	73.3±3.4		59.1±1.8		58.0±2.4	
1 000	灭菌前	81.5±2.7	0.861	82.7±6.1	0.529	75.9±1.1	0.187
	灭菌后	82.8±2.9		83.6±4.5		76.8±3.6	
500	灭菌前	87.9±2.3	0.972	85.6±1.7	0.636	87.1±2.1	0.403
	灭菌后	89.6±2.2		86.4±1.4		86.4±3.4	
250	灭菌前	92.1±2.2	0.787	91.4±1.1	0.447	91.5±1.7	0.833
	灭菌后	91.2±1.9		92.1±0.8		92.4±1.6	
125	灭菌前	98.0±1.5	0.807	96.4±0.6	0.164	96.2±1.5	0.781
	灭菌后	98.2±1.8		96.9±1.6		96.0±1.7	

2.5 指纹图谱分析

最佳灭菌工艺处理前后的 10 批丹参供试品溶液,按 1.2.5 方法测定,数据分别导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”,以灭菌前 10 批丹参样品生成对照指纹图谱作为参照图谱,生成叠加 HPLC 指纹图谱对照指纹图谱。选取 15 个峰作为共有峰,其中 8 个共有峰与丹参 8 种对照品图谱保留时间和最大紫外吸收波长相一致,见图 2。灭菌前后 10 批图谱与灭菌前对照图谱的相似度均大于 0.9,丹参质量稳定。

2.6 丹参 15 个共有峰成分鉴别及结构确认

分别采用正离子和负离子模式,丹参样品和丹参 8 种对照品采用 1.2.5 条件进样分析。采用 LC-MS 法确认丹参样品中 15 个共有峰所对应的



1.丹参素;2.迷迭香酸;3.紫草酸;4.丹酚酸 B;5.丹酚酸 E;
6.紫草酸甲酯;7.丹参酸甲酯;8.丹酚酸 F;9.二氢丹参酮 I ;
10.1,2-去氢隐丹参酮;11.隐丹参酮;12.丹参酮 I ;
13.1,2-二氢丹参酮;14.去氢丹参新酮;15.丹参酮 II A;
S1~S10:灭菌后图谱;S11:灭菌前对照图谱

图 2 灭菌前后丹参指纹谱图
Fig.2 Fingerprint of *Salvia miltiorrhiza* before and after sterilization

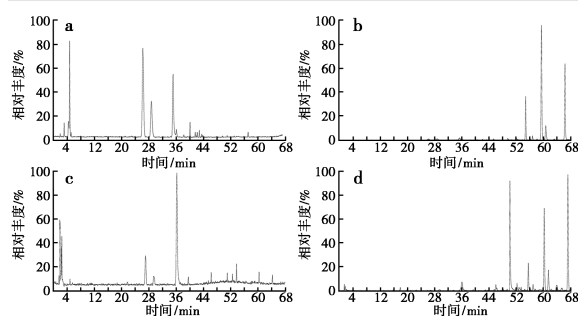
化学结构,根据丹参化学成分裂解的离子信息以及加和行为等规律推断其化学成分结构并与 8 种对照品碎片离子信息进行比对,最终在负离子模式下确认 1~8 号共有峰为水溶性丹酚酸类化合物,正离子模式确认 9~15 号共有峰为丹参酮类化合物^[15-17],结果见表 6。质谱离子流图见图 3。

表 6 丹参 15 个共有峰质谱分析

Tab.6 Spectrometry analysis of 15 common peaks of

Salvia miltiorrhiza

峰号	化合物	保留时间/min	分子式	相对分子质量	MS(<i>m/z</i>)
1	丹参素	4.84	C ₉ H ₁₀ O ₅	198.2	197.0[M-H] ⁻
2	迷迭香酸	27.09	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	360.3	359.1[M-H] ⁻
3	紫草酸	29.48	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₂	538.5	537.0[M-H] ⁻
4	丹酚酸 B	36.32	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	718.6	717.1[M-H] ⁻
5	丹酚酸 E	39.70	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	718.6	717.1[M-H] ⁻
6	紫草酸甲酯	46.44	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₂	552.5	551.0[M-H] ⁻
7	丹参酸甲酯	51.19	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	338.4	337.1[M-H] ⁻
8	丹酚酸 F	53.90	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314.3	313.0[M-H] ⁺
9	二氢丹参酮 I	56.08	C ₁₈ H ₁₄ O ₃	278.3	279.0[M+H] ⁻
10	1,2-去氢隐丹参酮	58.10	C ₁₉ H ₁₈ O ₃	294.3	295.1[M+H] ⁺
11	隐丹参酮	60.74	C ₁₉ H ₂₀ O ₃	296.4	297.1[M+H] ⁻
12	丹参酮 I	61.97	C ₁₈ H ₁₂ O ₃	276.3	277.0[M+H] ⁺
13	1,2-二氢丹参酮	64.51	C ₁₈ H ₁₄ O ₃	278.3	279.0[M+H] ⁺
14	去氢丹参新酮	66.05	C ₁₉ H ₂₀ O ₂	280.4	281.0[M-H] ⁻
15	丹参酮 II A	67.75	C ₁₉ H ₁₈ O ₃	294.3	295.1[M+H] ⁺



a. 丹参对照品负离子流图; b. 丹参对照品正离子流图;

c. 丹参样品负离子流图; d. 丹参样品正离子流图

图 3 质谱离子流图

Fig.3 Ion flow diagram of mass spectrum

2.7 统计与分析

2.7.1 *t* 检验分析

灭菌前后 10 批丹参中 8 种化合物含量、总含量及 DPPH·清除率分别经 *t* 检验分析,均无显著性差异($P>0.05$),结果见表 7。

表 7 *t* 检验分析表

Tab.7 Analysis table of *t* test

样本	处理方式	($\bar{x}\pm S$)/%	<i>P</i>
丹参素	灭菌前	0.351±0.008	0.181
	灭菌后	0.332±0.004	
迷迭香酸	灭菌前	0.126±0.011	0.374
	灭菌后	0.129±0.010	
紫草酸	灭菌前	0.176±0.212	0.709
	灭菌后	0.172±0.265	
丹酚酸 B	灭菌前	2.796±0.377	0.522
	灭菌后	2.844±0.324	
二氢丹参酮 I	灭菌前	0.134±0.517	0.694
	灭菌后	0.143±0.556	
隐丹参酮	灭菌前	0.121±0.474	0.648
	灭菌后	0.126±0.522	
丹参酮 I	灭菌前	0.139±0.060	0.441
	灭菌后	0.157±0.070	
丹参酮 II A	灭菌前	0.130±0.053	0.746
	灭菌后	0.135±0.057	
总含量	灭菌前	3.661±0.580	0.816
	灭菌后	3.742±0.551	
DPPH·清除率	灭菌前	80.69±1.833	0.922
	灭菌后	81.79±1.583	

2.7.2 聚类分析

将灭菌前后 10 批丹参 15 种化合物色谱峰面积数据采用 SPSS 软件标准化处理后,导入 OriginPro 2022 软件,以平均值为连接, Euclidean 距离为测度进行系统聚类分析,生成聚类分析热图,结果见图 4。10 个不同批次丹参样品根据不同成分的差异性分为 3 类,第 1、5、9 批丹参样本聚为一类,第 2、7、6 批丹参样本聚为一类,第 3、4、8、10 批丹参样本聚为一类,同一批次样品灭菌前后依然聚为一类,表明瞬时高温灭菌后丹参药材质量稳定。

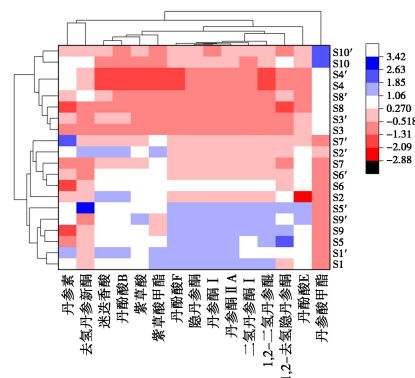


图 4 聚类分析热图

Fig.4 Heat map of cluster analysis

2.7.3 OPLS-DA 分析

为了进一步判别区分 10 个不同批次丹参的差异化标志物,采用 OPLS-DA 法化学计量学中经典的模式识别方法,通过寻找解释变量的线性子空间,使高度多维数据的自变量 X 与相应的因变量 Y 之间的协方差最大化,完成新的子空间基于减少的因素实现 Y 变量的预测^[18]。将灭菌前后 10 批丹参数据导入 SIMCA 软件,进行 OPLS-DA 分析,散点得分图和变量重要性投影 (VIP) 值见图 5、6,在得分散点图上呈现出明显的 3 组分类,与聚类分析结果一致。 $VIP > 1$ 的成分贡献率大,可以作为区分不同批次丹参的指标性成分,紫草酸甲酯>丹酚酸 B>丹参酸甲酯>丹参酮 I>隐丹参酮>丹酚酸 F>丹参酮 II A>二氢丹参酮 I。

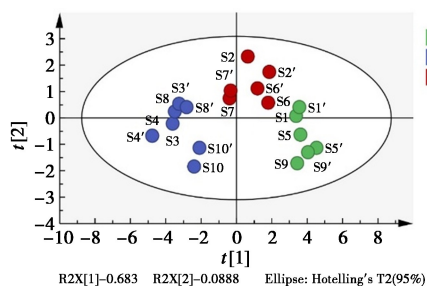


图 5 PLS-DA 得分图

Fig.5 PLS-DA Score chart

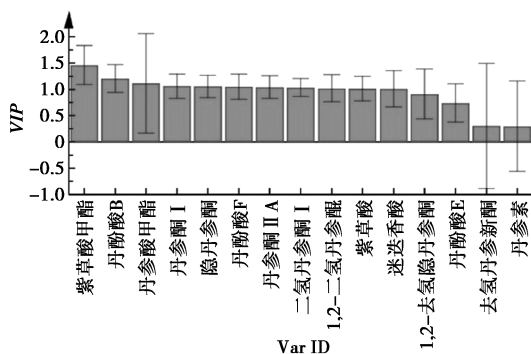


图 6 OPLS-DA 分析不同成分 VIP 值

Fig.6 OPLS-DA analyzed VIP values of different components

2.7.4 谱效关系分析

以 10 批指纹图谱中 15 个共有峰的峰面积为自变量 X , 与其对应的 DPPH·清除率为因变量 Y , 导入 SIMCA-P 14.1 软件中,作偏最小二乘回归分析 (PLS-DA), 计算标准化回归系数和变量重要性投影 VIP 值^[19]。当回归系数为正值时自变量和因变量呈正相关, 回归系数为负值时呈负相关, 丹参素、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 E、紫草酸甲酯、丹参酸甲酯、丹酚酸 F、去氢丹参新酮

与丹参抗氧化活性呈正相关, 如图 7 所示, 说明丹参中上述成分含量增加时, 丹参抗氧化活性增强。VIP 值由大到小的顺序为迷迭香酸>丹酚酸 B>紫草酸>丹酚酸 F>紫草酸甲酯>丹参酸甲酯>丹酚酸 E>丹参素>去氢丹参新酮, 其中迷迭香酸、丹酚酸 B、紫草酸、丹酚酸 F 这 4 种成分 $VIP > 1$, 见图 8, 与抗氧化活性呈强正相关。PLS-DA 预测得到的 15 种化学成分抗氧化活性大小与 2.3.1 中丹参 8 种化合物单体 DPPH·抗氧化活性规律基本一致, 丹参中迷迭香酸、丹酚酸 B、紫草酸、丹酚酸 F 可作为衡量丹参 DPPH·抗氧化活性质量标志物。Saw 等^[20]和赵雪魏等^[21]用 NMR 分析几种含邻二酚羟基的儿茶素单体与 DPPH·反应后的瞬间产物, 检测到产生邻苯醌结构, 这表明儿茶素抗氧化机理是由于 B 环邻二酚羟基被氧化形成邻苯醌结构, 而丹参水溶性成分分子中均含有 1~4 对邻二酚羟基结构, 这是它们 DPPH·抗氧化活性强的结构基础; 丹参中脂溶性成分 DPPH·抗氧化活性不显著, 与其结构中邻苯醌不能被氧化供氢产生自由基有关。

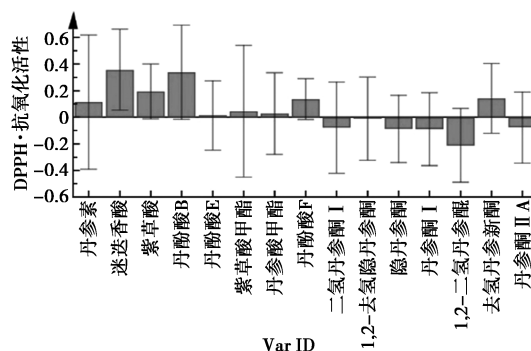


图 7 丹参 15 个共有峰偏最小二乘回归系数

Fig.7 15 peak-partial least squares regression coefficients of *Salvia miltiorrhiza*

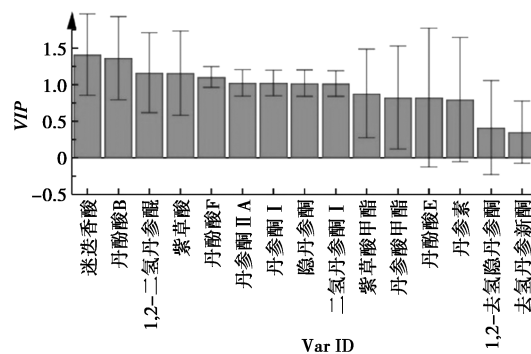


图 8 丹参 15 个共有峰变量重要性 (VIP) 值

Fig.8 Variable importance (VIP) values of 15 common peak of *Salvia miltiorrhiza*

3 结论

瞬时高温灭菌前后丹参微生物限度检查、8 种化合物含量、DPPH· 抗氧化活性检测、丹参指纹图谱相似度分析和 HSC-T6 细胞存活率分析结果显示瞬时高温灭菌对丹参质量及安全性无影响。紫草酸甲酯、丹酚酸 B、丹参酸甲酯、丹参酮 I、隐丹参酮、丹酚酸 F、丹参酮 II A、二氢丹参酮 I 为丹参质量差异标志物;迷迭香酸、丹酚酸 B、紫草酸、丹酚酸 F 为抗氧化活性的质量标志物。本研究为瞬时高温灭菌技术在丹参生产中的应用、质量控制及抗氧化活性物质基础的确定提供科学依据。

参考文献:

- [1] 单晓晓,洪帮振,刘洁,等.丹参化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及质量标志物的预测分析[J].中国中药杂志,2021,46(21):5 496-5 511.
- [2] 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.
- [3] 万新焕,王瑜亮,周长征,等.丹参化学成分及其药理作用研究进展[J].中草药,2020,51(3):788-798.
- [4] 贾巧,陈华,赵荣华,等.基于抗氧化活性的丹参药品质量评价研究[J].中成药,2015,37(3):667-670.
- [5] 张春梅,王振彬.HPLC 测定不同灭菌方法后丹参药材中丹参酮 II A 的含量变化[J].河北中医药学报,2005,(2):33-34.
- [6] 华方波,赵焕君,白俊楠,等.辐照灭菌对丹参中丹参酮 II A 含量的影响[J].辽宁中医药大学学报,2013,15(6):55-56.
- [7] 武娜,张利红,万露,等.丹参微波灭菌工艺优化及评价[J].解放军药学报,2015,31(4):288-290.
- [8] 张婷,焦连庆,刘融融,等.基于多指标分析优化苦丁茶冬青瞬时高温灭菌工艺[J].食品工业科技,2023,44(8):205-211.
- [9] 栾依琳,焦连庆,权兴周,等.瞬时高温灭菌对甘草药材质量的影响[J/OL].吉林农业大学学报,2023,doi:10.13327/j.jjlau.2023.20029.
- [10] 陈子涵,杨建波,陈智伟,等.何首乌醇提物及单体体外肝细胞毒性研究[J].中国药物警戒,2022,19(7):728-732.
- [11] 中华人民共和国药典委员会.中华人民共和国药典(四部)[M].北京:中国医药科技出版社,2020.
- [12] 杨贵雅,薛紫鲸,张丹,等.基于指纹图谱和多成分含量测定的丹参药材皮部和木部化学成分比较研究[J].中草药,2019,50(21):5 328-5 335.
- [13] 陈仁强,刘楨,胡慧玲,等.紫花地丁总香豆素提取工艺优化及其抗氧化和抗肿瘤活性考察[J].中国药房,2022,33(20):2 471-2 476.
- [14] 赵灿,李志,马晓东.新型唑啉酮类衍生物的设计、合成与体外抗肿瘤活性评价[J].化学试剂,2023,45(12):112-117.
- [15] 董昕,徐立,姜子洋.丹参药材中水溶性及脂溶性成分的电喷雾离子阱质谱研究[J].中国药理学杂志,2010,45(14):1 048-1 054.
- [16] 陈琴华,熊琳.电喷雾离子阱质谱检测隐丹参酮的正离子裂解途径[J].现代中药研究与实践,2016,30(1):9-12.
- [17] 赵国欣,刘萌,李领川,等.超高效液相色谱-质谱联用同时测定丹参中 7 种成分含量[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(1):60-63.
- [18] 王巧,于永杰,付海燕,等.基于多指标含量测定结合化学计量学的不同产地丹参品质差异分析[J].分析测试学报,2023,42(4):389-401.
- [19] 彭丽颖,梁悦,施君君,等.丹参 HPLC 指纹图谱及总抗氧化活性谱效关系研究[J].中药药理与临床,2022,38(3):110-115.
- [20] SAW Y, SAKATA K. NMR analytical approach to clarify the antioxidative molecular mechanism of catechins using 1, 1-diphenyl-1, 2-piroylhydrazyl [J]. Agric. Food Chem., 1998, 46(1):111-114.
- [21] 赵雪巍,刘培玉,刘丹,等.黄酮类化合物的构效关系研究进展[J].中草药,2015,46(21):3 264-3 271.