

# 薄层色谱指纹图谱在丹参药材质量评价中的应用研究

蒋轶伦<sup>1</sup>, 李伟<sup>1</sup>, 庄峙厦<sup>1</sup>, 黎先春<sup>2</sup>, 王小如<sup>1,2\*</sup>

(1. 厦门大学化学化工学院化学系, 现代分析科学教育部重点实验室, 福建 厦门 361005;

2. 国家海洋局第一海洋研究所, 青岛现代分析技术及中药标准化重点实验室, 山东 青岛 266061)

**摘要:** 利用薄层色谱 (TLC) 技术对中药材丹参的有效成分进行了指纹图谱分析. 以不同等级的中江丹参和不同采收期的丹参、南丹参为分析对象, 采用适宜的水溶性及脂溶性成分提取方法和 TLC 分析条件, 可获得其相应的 TLC 图像及色谱图. 通过对不同丹参药材的色谱图像的分析, 结合化学计量学方法对其各主要指标成分的信息进行提取, 初步构建了丹参的 TLC 指纹图谱. 结果表明, 在 254 nm 波长下获取脂溶性和水溶性成分共 7 个共有指纹峰, 各峰相对比移值 ( $R_f$ ) 和峰面积的相对标准偏差分别小于 1.7% 和 4.0%. 通过对薄层色谱斑点的  $R_f$  值、斑点颜色和大小比较, 并进行主成分分析和聚类分析, 实现了对不同等级的丹参进行归属, 并确立了最佳采收期. 本实验建立的薄层色谱指纹图谱方法具有较高的稳定性、良好的精密度和重现性, 可用于丹参药材的质量评价和控制.

**关键词:** 丹参药材; TLC 指纹图谱; 图像分析; 化学计量学; 质量评价

**中图分类号:** O 658

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0438-0479(2005)06-0801-05

丹参系唇形科鼠尾草属植物丹参的干燥根及根茎. 丹参药材含有的有效成分类型包括脂溶性的二萜醌和水溶性的丹酚酸两大类, 其中脂溶性成分包括丹参酮 I、丹参酮 IIA、隐丹参酮等, 广泛应用于治疗化脓性感染及痤疮等; 水溶性成分包括丹酚酸 B、迷迭香酸、原儿茶醛、原儿茶酸、丹参素等, 主要用于治疗心血管疾病<sup>[1,2]</sup>. 因药典所载丹参野生资源渐少, 各地纷纷引种栽培. 为澄清混乱, 寻找优良品种, 进行开发利用, 需对丹参药材进行系统的品种鉴定和质量评价<sup>[3]</sup>. 指纹图谱是现阶段可以全面反映中药材内在质量的一个有效手段, 它突破传统的线性思维, 根据指纹图谱的模糊属性, 着眼于宏观规律性的特征分析<sup>[4]</sup>. 本文通过对不同等级及不同采收期中江丹参药材进行 TLC 指纹图谱研究, 为丹参药材的生产和质量控制提供科学可行的依据.

## 1 实验

收稿日期: 2005-05-23

基金项目: 科技部“九五”攻关计划中药现代化重中之重项目: 中药现代化生产中重金属测定的标准化及质量控制(99-929-02-13); 香港创新科技署与香港新世界生物科技有限公司联合资助项目

作者简介: 蒋轶伦(1981-), 女, 硕士研究生.

\* 通讯作者: mt2elp@fio.org.cn

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

### 1.1 仪器与试剂

瑞士卡玛薄层色谱自动点样仪; Reprostar 3 薄层色谱数码成像系统; winCATS 薄层色谱工作站; 双槽展开缸; 硅胶 GF254 预制板(德国 Merck).

甲醇、二氯甲烷、苯、醋酸乙酯、氯仿、甲酸均为分析纯, 水为双蒸水; 丹参酮 IIA 对照品、丹参酮 I 对照品、隐丹参酮对照品、丹参素钠对照品、原儿茶酸对照品、原儿茶醛对照品、咖啡酸对照品由中国生物制品检验所提供; 丹酚酸 B 对照品由中国药科大学周荣汉教授提供.

丹参药材购自来源地四川中江药材公司(中江丹参由中国科学院昆明植物研究所李锡文教授鉴定为 *Salvia miltiorrhiza* Bge.). 不同商品等级中江丹参及不同采收期南丹参、丹参样品信息见表 1、2.

### 1.2 样品制备

随机取 10 株丹参根部药材洗净, 自然风干 10 d 后 60 °C 烘干, 粉碎过 60 目筛. 水溶性供试液: 取待测药材粉末 1.0 g, 2% 氨水超声提取 60 min, 提取液于沸水浴中加热 45 min(冰醋酸调 pH 至 3~4) 后过滤. 以乙酸乙酯萃取滤液, 萃取液用氮气挥干, 所得水溶性成分以 1.0 mL 甲醇溶解. 脂溶性供试液: 取待测药材粉末 0.5 g, 加甲醇/二氯甲烷(8/2, 体积比) 混合溶液 10 mL, 置具塞试管中超声提取 30 min 后过滤<sup>[5]</sup>. 对照品溶液: 取 2.0 mg 丹参酮 IIA、丹参酮 I、隐丹参酮、

表 1 不同商品等级丹参药材

Tab. 1 Danshen samples with 7 different commercial grades

样品号	特级品			一级品			二级品			三级品			四级品			五级品			六级品		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21

表 2 中江南丹参、丹参药材动态样品\*

Tab. 2 Danshen samples collected at different harvest times

样品号	南丹参							丹参												
	2	3	4	5	6	7	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
采收期	288	317	331	359	370	388	160	190	220	250	280	282	310	311	334	353	374	386		

\* 1号、8号及21号为混合标准物质(The sample number of mixed standard substances was 1, 8 and 21)

原儿茶醛、原儿茶酸、咖啡酸和 4.0 mg 丹酚酸 B 对照品, 分别加 1.0 mL 甲醇溶解; 取 1.0 mg 丹参素钠, 加 1.0 mL 25% 的甲酸甲醇溶解。

### 1.3 薄层色谱过程

固定相: 20 cm × 10 cm 硅胶 60GF<sub>254</sub> 高效薄层板 (Merck), 110 °C 活化 0.5 h, 干燥器中冷却至室温。水溶性展开剂: 氯仿/乙酸乙酯/苯/甲酸(12/10/5/3, 体积比); 脂溶性展开剂: 苯/乙酸乙酯(19/1, 体积比)<sup>[1]</sup>。点样: 供试品及混合对照品溶液各 2 μL, 底边距 10 mm。展开方式: 展开剂预平衡 30 min, 上行展开 8 ± 0.5 cm。检测: 置紫外光 254 nm 下检视, 在 254 nm 下获取色谱图像并同时生成色谱图和色谱数据。

### 1.4 薄层色谱识别

在水溶性供试品色谱中, 在与对照品相应的位置上, 显相同暗黄色斑点; 主斑点自下而上为丹参素、丹酚酸 B、原儿茶酸、原儿茶醛和咖啡酸; 在脂溶性供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同的暗红色斑点。主斑点自下而上为隐丹参酮, 丹参酮 I 和丹参酮 IIA。

## 2 结果和讨论

### 2.1 指纹图谱方法学考察

2.1.1 稳定性试验 取一样品的供试液, 分别在 0, 6, 12, 24 和 48 h 点样检测指纹图谱, 各主要色谱峰 R<sub>f</sub> 值的 RSD 低于 1.7%, 峰面积 RSD 低于 3.3%, 表明一样品在相同色谱条件下所测成分的 R<sub>f</sub> 值及色谱峰面积均取得良好的一致性。

2.1.2 精密度试验 取一样品的供试液, 同板连续点样 5 次, 检测指纹图谱, 各主要色谱峰 R<sub>f</sub> 值 RSD 低于 1.2%, 峰面积 RSD 低于 2.6%, 表明一样品在相同色谱条件下连续点样时, 各成分 R<sub>f</sub> 值及色谱峰面积

精密度良好。方法精密可靠。

2.1.3 重现性试验 取同一批丹参药材的样品 5 份, 按供试品溶液制备方法平行制备, 同一条件下检测指纹图谱, 各主要色谱峰 R<sub>f</sub> 值 RSD 低于 1.7%, 峰面积 RSD 低于 4%, 表明实验方法及仪器重现性均良好。

### 2.2 丹参 TLC 指纹图谱图像分析

2.2.1 中江丹参药材 TLC 指纹图谱等级间差异考察 对样品和对照品依次点样、饱和、展开, 在紫外光 254 nm 下获取 7 个等级、各 10 个批次的中江丹参药材色谱图像(图 1)。结果显示, 7 个等级、各 10 个批次的中江丹参药材脂溶性提取物色谱图像, 在与对照品丹参酮 IIA 和隐丹参酮色谱斑点相对应处, 不同等级样品间面积的大小和颜色的深浅均无明显差异, 表明就主要指标成分的含量和物质群指纹图像而言, 中江丹参脂溶性提取物的内在质量与药材的分级无明显的相

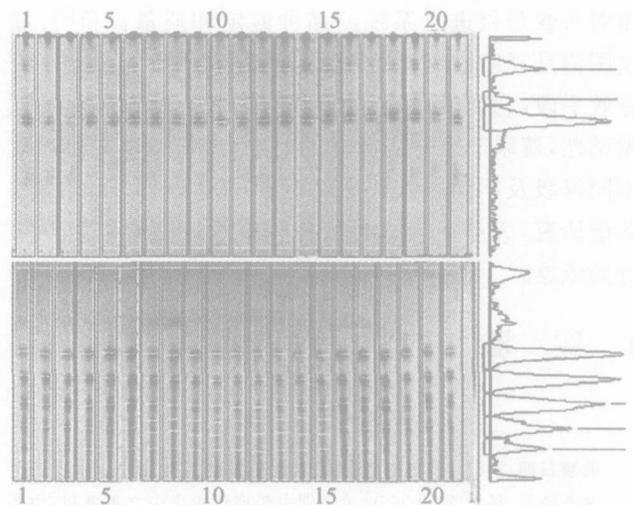


图 1 不同等级中江丹参药材脂提取物(上)及水提取物(下) HPTLC 图像(检测波长: 254 nm)

Fig. 1 HPTLC graph of lipid soluble (up) and water soluble (down) components of Danshen with commercial grade S to grade VI

关. 水溶性提取物色谱图像在与对照品原儿茶醛和丹酚酸 B 色谱斑点相对应处, 不同等级样品间面积的大小和颜色的深浅除了特级品与 I 级品比较相近外, I 级品、II 级品和 III 级品药材水溶性提取物的内在质量与药材的分级存在明显的正相关, 而 IV 级品、V 级品和 VI 级品药材则未表现出明显的相关性. 提示传统的依据丹参药材的色泽、粗细及均匀程度等外观性状进行分级的方法, 在一定程度上反映了水溶性提取物的内在质量.

2.2.2 中江丹参药材 TLC 指纹图像动态分布考察  
中药材一般都有固定的采收时间, 但对于采收时间跨度较大的中药材, 应考察不同采收时间的指纹图谱, 分析采收时间对指纹图谱, 乃至对生物活性的影响.

对样品和对照品依次点样、饱和、展开, 在紫外光 254 nm 下获取不同生长周期的中江南丹参(时间跨度为 100 d)、中江丹参(时间跨度为 226 d) 药材薄层色谱图像(图 2).

结果显示, 在紫外光 254nm 下进行检视, 脂溶性和水溶性提取物色谱图像与对照品隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 IIA、原儿茶醛和丹酚酸 B 色谱斑点相对应的样品色谱斑点处, 不同采收期的南丹参, 其斑点面积的大小和颜色的深浅无明显差异; 生长期在 160~ 386 d 内的丹参药材, 其隐丹参酮斑点面积的大小和颜色的深浅与采收期呈负相关; 生长期在 160~ 250 d 内的丹参药材, 其丹参酮 I、丹参酮 IIA、原儿茶醛和丹酚酸 B 斑点面积的大小和颜色的深浅与采收期呈正相关, 生长期在 250~ 386 d 内, 上述斑点面积的大小和颜色的深浅无明显差异.

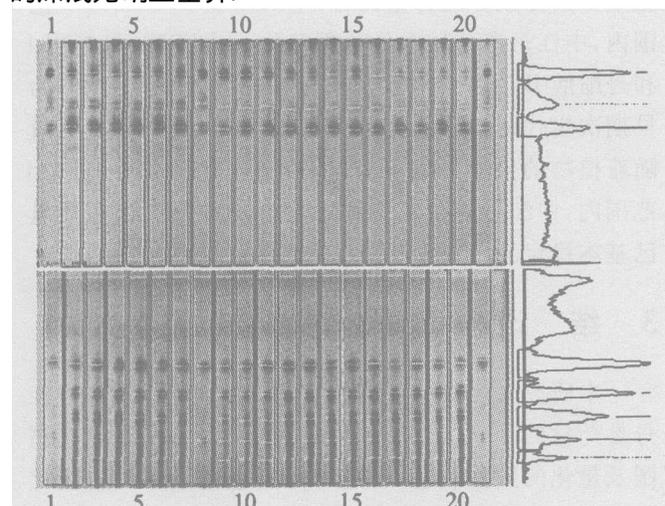


图 2 不同生长周期的中江南丹参、丹参药材脂提取物(上)及水提取物(下)HPTLC 图像(检测波长: 254 nm)

Fig. 2 HPTLC graph of lipid soluble (up) and water soluble (down) components of Danshen collected at different harvest times

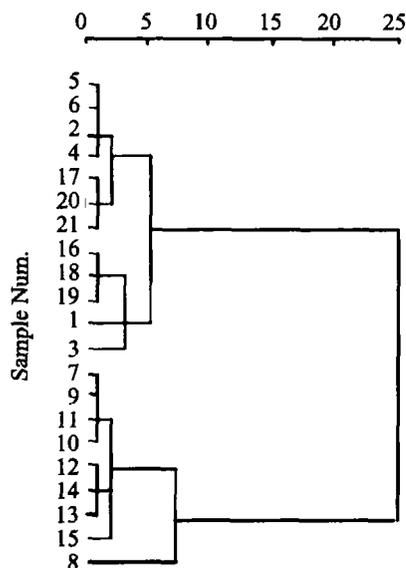


图 3 不同等级中江丹参药材水溶性成分指纹图谱聚类图

Fig. 3 Clustering plot of water soluble components in Danshen samples of commercial grade S to grade VI

### 2.3 丹参药材 TLC 指纹图谱计量学分析

2.3.1 不同等级中江丹参药材 TLC 指纹图谱聚类分析  
比较 7 个等级, 各 10 个批次中江丹参药材薄层色谱, 确定其水溶性成分的共有峰为 5 个( $R_f$  值在 0.2~0.7 之间). 按照  $R_f$  值由小到大的顺序对其进行编号. 取 2 号峰丹酚酸 B 作为参照物, 计算各峰的相对峰面积. 以共有峰的相对峰面积为指标, 对不同等级中江丹参药材水溶性成分进行聚类分析, 以 Pearson 相关系数为测度的聚类结果见图 3.

2.3.2 不同等级中江丹参药材 TLC 指纹图谱主成分分析  
对 7 个等级, 各 10 个批次中江丹参药材, 脂溶性、水溶性成分共选取 7 个共有峰, 以共有峰的相对峰面积为指标, 进行主成分分析, 结果见表 3、表 4. 主成

表 3 主成分分析相关矩阵的特征值

Tab. 3 Eigenvalues of the PCA correlation matrix

主成分	特征值	差异	百分比	累计贡献率
1	5.58344251	4.78302082	0.7976	0.7976
2	0.80042169	0.40006314	0.1143	0.9120
3	0.40035855	0.25918488	0.0572	0.9692
4	0.14117367	0.09421724	0.0202	0.9893
5	0.04695643	0.01942849	0.0067	0.9961
6	0.02752794	0.02740872	0.0039	1.0000
7	0.00011922		0.0000	1.0000

表 4 主成分分析特征向量

Tab.4 The PRINCOMP procedure eigenvectors

峰号	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7
1	- 0.3557	0.3813	0.6330	0.2130	0.4237	0.2297	0.2222
2	0.3861	0.3656	0.0059	0.5650	- 0.5416	0.2327	0.2241
3	- 0.4146	- 0.1405	0.1111	- 0.2109	- 0.4651	- 0.3047	0.6649
4	0.3996	0.3292	0.0128	0.0505	0.3098	- 0.7711	0.1960
5	- 0.3618	0.1809	- 0.7524	0.2830	0.3117	0.0946	0.2896
6	0.3982	0.2439	- 0.1020	- 0.6337	0.1394	0.4274	0.4093
7	0.3210	- 0.7073	0.1005	0.3262	0.3130	0.1174	0.4101

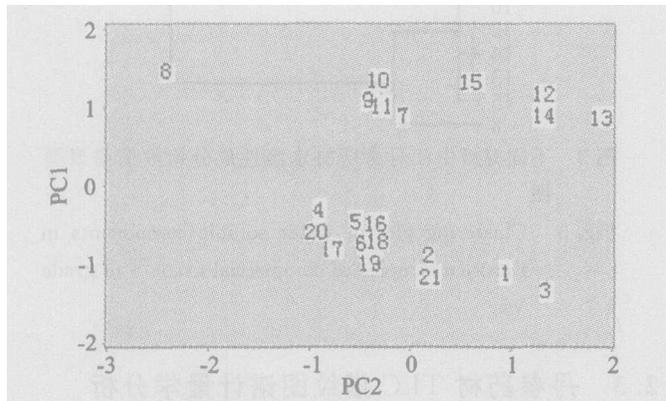


图 4 不同等级中江丹参药材 TLC 指纹图谱主成分分析线性投影图

Fig.4 PCA linear projective plot of both lipid and water soluble components in Danshen samples of commercial grade S to grade VI

分 1 和主成分 2 的累计贡献率为 0.912 0(即 91.2%), PC1(主成分 1) = - 0.355 7P1 + 0.386 1P2 - 0.414 6P3 + 0.399 6P4 - 0.361 8P5 + 0.398 2P6 + 0.321 0P7, 由此表达式可以看出, 各峰对主成分 1 贡献十分相近, 选取的 7 个共有峰具有指纹代表性. 以主成分 1 和主成分 2 做线性投影图(图 4). 由图可见, 如表 1 所示的不同等级 21 个丹参样品, 各等级内在此投影图上可较好的聚为一类.

由聚类及主成分分析的结果可知, 经 10 个批次样品的实验, 7 个等级各自基本可聚为一类, 说明各等级内(批次间)丹参药材主要指标成分含量分布情况是十分相似的, 此法可用于考察不同等级丹参的归属.

2.3.3 中江丹参药材动态分布 TLC 色谱数据显著性差异考察 采收期时间跨度为 100 d 的南丹参, 其脂提与水提主要指标成分峰面积经方差分析,  $P = 0.994$ , 表明 100 d 内 6 个采收时间点, 各主要指标成分含量无显著性差异( $P > 0.05$ ).

以积分峰面积为指标, 考察不同采收期丹参药材各主要成分含量与采收期关系(图 5), 从图中可以看

出, 其反映的趋势与图像考察是一致的.

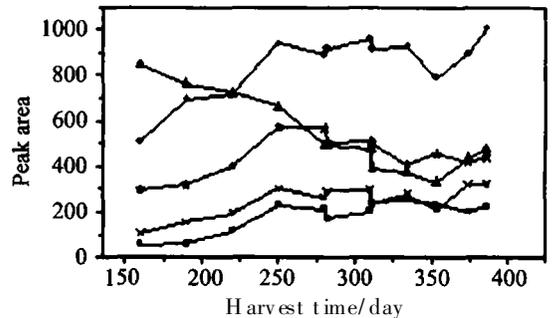


图 5 不同采收期中江丹参药材主成分 TLC 动态分布  
▲: 隐丹参酮, ●: 丹参酮 IIA, ★: 原儿茶醛, ×: 丹参酮 I, ■: 丹酚酸 B

Fig.5 The growth dynamic trends of Danshen collected at different harvest times

上述结果表明, 生长期在 288~ 388 d 范围内, 南丹参脂溶性和水溶性提取物的内在质量已基本稳定; 就主要指标成分的含量而言, 生长期在 160~ 250 d 范围内, 中江丹参药材中丹参酮 IIA、原儿茶醛、丹参酮 I 和丹酚酸 B 的含量与采收期呈正相关, 隐丹参酮作为早期次生代谢物和后期次生代谢物的前体<sup>[6]</sup>, 其含量随着植物的生长而呈下降趋势; 生长期在 250~ 386 d 范围内, 中江丹参脂溶性和水溶性提取物的内在质量已基本稳定.

### 3 结 论

本研究采用薄层色谱方法, 同时、快速地获取中江丹参药材的 TLC 图像, 并生成基于光密度的薄层色谱图及量化的数据信息, 通过对薄层色谱图像的直观比较, 结合指纹图谱技术及化学计量学, 对不同等级和不同采收期的丹参药材进行了质量评价. 通过稳定性、精密性及重现性考察, 显示本方法适用于丹参药材质量的评价.

## 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2000. 57- 58.
- [2] 杨保津. 丹参的活性成分[J]. 中成药研究, 1986, 3: 36- 37.
- [3] 徐国均, 徐珞珊, 主编. 常用中药材品种整理和质量研究(第一册) [M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1994. 140- 168.
- [4] 曹进, 饶毅, 沈群. 中药指纹图谱及其建立原则[J]. 中药新药与临床药理, 2001, 12(3): 200- 203.
- [5] 胡建林, 张荣平, 李惠兰. 3种滇产鼠尾草属植物丹参酮IIA的薄层扫描定量[J]. 中成药, 2000, 22(10): 723- 724.
- [6] 徐任生. 丹参生物学及其应用[M]. 北京: 科学出版社, 1990. 7- 9.

## Quality Assessment of Radix Salvia Miltiorrhiza (Danshen) by TLC Fingerprinting Technique

JIANG Yi-lun<sup>1</sup>, LI Wei<sup>1</sup>, ZHUANG Zhixia<sup>1</sup>, Frank S. C. Lee<sup>2</sup>, WANG Xiaoru<sup>1,2\*</sup>

(1. Department of Chemistry, College of Chemistry  
and Chemical Engineering, The Key Laboratory of Analytical Sciences of the MOE,  
Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Qingdao Key Lab of Analytical Technology Development  
and Standardization of Chinese Medicines, First Institute Oceanography of SOA, Qingdao 266061, China)

**Abstract:** The purpose of this study is to develop and apply the thin layer chromatography (TLC) technique to the fingerprinting studies of Danshen (Radix Salvia Miltiorrhiza) drugs. A range of Danshen samples with different commercial grades or harvested after different growing time was analyzed for quality assessment and regulatory purposes. And the compositional variations of these authentic Danshen drugs were investigated using an analytical protocol involving water or organic solvent extractions, followed by TLC assay of the extracts, and subsequent TLC fingerprinting analysis by image comparison combined with chemometrics methods. The analytical performances of the method were evaluated by examining the stability, precision and reproducibility, respectively. Excellent results were observed and the RSDs of relative  $R_f$  values and peak areas were respectively less than 1.7% and 4.0%. The analysis results obtained suggested that a total of seven common peaks were identified in the TLC chromatograms under the 254 nm detection wavelength. Based on the comparison of the  $R_f$  values of the common peaks, the depth and size of the TLC spots and in combination with cluster analysis and principal component analysis (PCA), the attribute of quality grading and optimal harvest time of the Danshen material were identified. Thus, the developed TLC chromatographic fingerprinting method is considered as an useful and effective tool for the quality control of the Danshen drug material.

**Key words:** Radix Salvia Miltiorrhiza; TLC fingerprinting; image analysis; chemometrics; quality assessment