

## 山东栽培丹参指纹图谱的研究

黄敏<sup>1</sup>, 丁晓彦<sup>2</sup>, 赵渤年<sup>2\*</sup>

(1. 山东中医药大学药学院; 2. 山东省中医药研究院, 山东 济南 250014)

**摘要:** 目的 建立山东栽培丹参高效液相指纹图谱。方法 采用高效液相色谱法进行梯度洗脱, 分别测定山东栽培丹参脂溶性成分和水溶性成分供试品溶液, 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统2004A版”软件计算处理测定图谱。结果 脂溶性成分选择8个共有峰, 水溶性成分选择10个共有峰为评价指标, 分别建立了丹参脂溶性成分和水溶性成分的HPLC指纹图谱, 其精密度、稳定性和重复性均良好。结论 该方法操作简单, 为栽培丹参药材质量评价提供了依据。

**关键词:** 栽培丹参; 脂溶性成分、水溶性成分; 指纹图谱; 高效液相色谱法

中图分类号: R282.7 文献标识码: A 文章编号: 1672-979X (2011) 11-0400-05

### Study on Fingerprint of Cultivated *Salvia Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* in Shandong

HUANG Min<sup>1</sup>, DING Xiao-yan<sup>2</sup>, ZHAO Bo-nian<sup>2</sup>

(1. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China; 2. Shandong Academy of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China)

**Abstract: Objective** To establish the HPLC fingerprint of cultivated *Salvia Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* in Shandong. **Methods** The liposoluble constituents and water-soluble constituents from cultivated *Salvia Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* in Shandong were determined by HPLC with gradient elution. The HPLC chromatogram was processed using the "similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of TCM" software (version 2004A).

**Results** Eight common peaks for liposoluble constituents and ten common peaks for water-soluble constituents were selected as the evaluation indexes, and the HPLC chromatograms for liposoluble and water-soluble constituents were established with good precision, stability and repeatability. **Conclusion** This method is simple and can provide the basis for quality evaluation of cultivated *Salvia Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* in Shandong.

**Key Words:** cultivated *Salvia Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*; liposoluble and water-soluble constituent; fingerprint; HPLC

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎, 是治疗心血管疾病的传统中药。目前丹参以栽培品入药为主, 且山东为丹参药材主产区, 产量居全国之首。

现行指标成分的质量评价方法难以全面反映药材质量, 因此一种更具综合性、完整性和模糊性的质量控制模式——中药色谱指纹图谱, 正逐步地受到重视和认可<sup>[1]</sup>。丹参有效成分为脂溶性、水溶性两部分, 前者主要为二萜类化合物, 后者为酚酸类化合物<sup>[2]</sup>。我们采用高效液相色谱法分别研究了山东不同地区丹参药材的脂溶性成分和水溶性成分指纹图谱, 以冀为丹参药材的质量评价提供实验依据。

### 1 材料

#### 1.1 仪器与试剂

Waters-600高效液相色谱仪、Waters-960二极管阵列检测器 (Waters公司); LC-350A超声波中药处理机 (济宁鲁超); 甲醇为色谱纯 (天津四友); 水为重蒸水; 其它试剂为分析纯。

#### 1.2 对照品与药材

丹参酮 II A 对照品 (批号 110766-200417)、隐丹参酮对照品 (批号 110852-200305); 丹酚酸 B 对照品 (批号 110855-200405)、丹参素钠 (批号 111562-200302)、咖啡酸对照品 (批号 110885-200102) 均由中国食品药品检定研究院提供; 收集了山东 10 个不

收稿日期: 2011-05-12

作者简介: 黄敏 (1987-), 女, 山东济南人, 硕士研究生, 研究方向为中药质量评价技术

\*通讯作者: 赵渤年, 男, 研究员, 硕士生导师 E-mail: bonianzh@163.com

同产地批次的丹参栽培药材（经山东中医药研究院林慧彬鉴定均为唇形科植物丹参*Salvia miltiorrhiza* Bge.的干燥根，并按中国药典2010年版一部“丹参”项下的标准检验，均为合格药材），粉碎过20目筛<sup>[3]</sup>，备用。

## 2 丹参药材脂溶性成分指纹图谱的建立

### 2.1 对照品溶液的制备

分别取丹参酮II A对照品和隐丹参酮对照品适量于棕色量瓶中，精密称定，加甲醇溶解并定容，均配成浓度为25 μg/mL的溶液。

### 2.2 供试品溶液的制备

精密称定丹参粉末0.4 g，加95%乙醇25 mL，加热回流1 h，放冷，滤过，用乙醇洗涤滤纸、滤器，与滤液合并，水浴挥干乙醇，残渣用热水洗至分液漏斗中，加等量乙醚提取4次，合并乙醚液，挥干乙醚，残渣用甲醇溶解并转移至10 mL棕色量瓶中，定容，摇匀，微孔滤膜（0.45 μm）滤过，作为供试品溶液。

### 2.3 色谱条件

色谱柱：kromasil C<sub>18</sub>（150 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：水（A）-甲醇（B），梯度洗脱。洗脱程序：B 60%~75%，0~50 min；75%：50~60 min；75%~60%：60~70 min。测定波长：280 nm。流速：1.0 mL/min。柱温：30℃。

### 2.4 参照峰的选择

分别将丹参酮II A对照品溶液、隐丹参酮对照品溶液各10 μL，注入高效液相色谱仪中，按照“2.3项下”色谱条件测定，确定以隐丹参酮为参照峰。

### 2.5 方法学考察

**2.5.1 精密度** 取供试品溶液，按照“2.3项”色谱条件连续测定5次，得共有峰的相对保留时间RSD为0.08%~1.59%，相对峰面积RSD为1.43%~2.46%。结果表明，仪器精密度良好。

**2.5.2 重现性** 取同一批样品粉末5份，按“2.2项”制备供试品溶液，注入高效液相色谱仪中，测定图谱。得共有峰的相对保留时间RSD为0.29%~2.07%，相对峰面积RSD为1.11%~2.98%。结果表明，该方法重现性良好。

**2.5.3 稳定性** 按“2.2项”制备供试品溶液，分别在0，3，6，12，24 h测定，得共有峰的相对保留时间RSD为0.10%~0.69%，共有峰的相对峰面积RSD为0.82%~2.08%。结果表明，供试品溶液在24 h内稳定性良好。

### 2.6 指纹图谱的建立

**2.6.1 共有峰的标定** 按“2.2项”方法，将10批丹参样品制成供试品溶液，比较10批供试品HPLC色谱图的检测结果，选定稳定性好、吸收强、特征明显的色谱峰为共有峰，共标定8个共有峰（占总峰面积90%以上），各共有峰的相对保留时间的RSD在0.44%~1.94%之间，见表1。

表1 栽培丹参样品共有峰的保留时间

共有峰号	S1 济南	S2 肥城	S3 莒县	S4 沂源	S5 泰安	S6 潍坊	S7 烟台	S8 蒙阴	S9 临朐	S10 枣庄	RSD/%
1	0.4522	0.4518	0.4522	0.4530	0.4506	0.4563	0.4634	0.4621	0.4639	0.4623	1.20
2	0.6771	0.6765	0.6833	0.6778	0.6777	0.6825	0.7056	0.7055	0.7043	0.7035	1.94
3	0.7868	0.7865	0.7906	0.7871	0.7863	0.7896	0.8038	0.7881	0.8042	0.8043	1.00
4	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.00
5	1.0766	1.0761	1.0807	1.0772	1.0800	1.0823	1.1169	1.1176	1.1129	1.1139	1.74
6	1.2243	1.2355	1.2305	1.2261	1.2263	1.2316	1.2444	1.2455	1.2414	1.2463	0.70
7	1.3526	1.3530	1.3578	1.3529	1.3555	1.3603	1.3151	1.3159	1.3171	1.3119	1.57
8	1.4355	1.4353	1.4442	1.4364	1.4404	1.4501	1.4302	1.4319	1.4301	1.4381	0.44

**2.6.2 相似度分析** 将10批丹参样品的指纹图谱测定结果导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统，设置样品S1的图谱为参照谱，多点校正后，自动匹配，生成对照图谱（见图1），计算相似度，结果见表2。

### 2.7 聚类分析

应用SPSS11.0软件中的系统聚类法，分别分析10批栽培丹参样品HPLC指纹图谱各共有峰的相对峰面积，结果表明：各样品分为2类，样品S7、S9、S5的

表2 栽培丹参样品脂溶性成分分析相似度结果

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照 指纹图谱
S1	1.000	0.903	0.996	0.971	0.963	0.978	0.665	0.659	0.653	0.667	0.898
S2	0.903	1.000	0.898	0.803	0.810	0.801	0.289	0.292	0.283	0.294	0.626
S3	0.996	0.898	1.000	0.978	0.960	0.979	0.668	0.670	0.643	0.659	0.897
S4	0.971	0.803	0.978	1.000	0.937	0.985	0.765	0.791	0.728	0.762	0.945
S5	0.963	0.810	0.960	0.937	1.000	0.977	0.769	0.720	0.770	0.740	0.932
S6	0.978	0.801	0.979	0.985	0.977	1.000	0.795	0.785	0.779	0.788	0.964
S7	0.665	0.289	0.668	0.765	0.769	0.795	1.000	0.962	0.983	0.975	0.921
S8	0.659	0.292	0.670	0.791	0.720	0.785	0.962	1.000	0.927	0.936	0.903
S9	0.653	0.283	0.643	0.728	0.770	0.779	0.983	0.927	1.000	0.971	0.905
S10	0.667	0.294	0.659	0.762	0.740	0.788	0.975	0.936	0.971	1.000	0.918
对照 指纹图谱	0.898	0.626	0.897	0.945	0.932	0.964	0.921	0.903	0.905	0.918	1.000

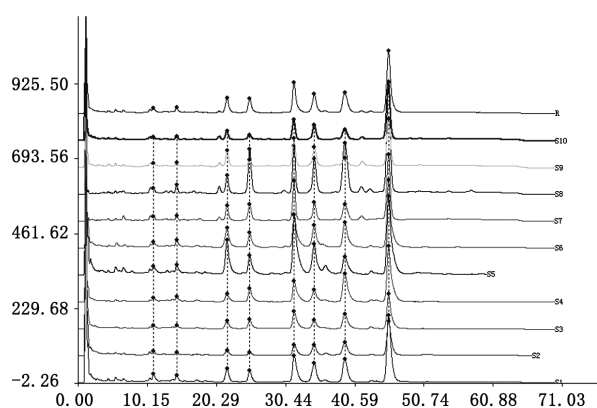


图1 栽培丹参样品脂溶性成分分析相似度结果

丹参聚为一类，来源于S1、S2、S3、S4、S6、S8、S10的丹参聚为一类。分析结果，S5、S7、S9号样品的1、3、6、8（丹参酮IIA）号共有峰的相对峰面积值偏低，归为一类。

### 3 丹参药材水溶性成分指纹图谱的建立

#### 3.1 对照品溶液的制备

取丹酚酸B对照品适量，用75%甲醇溶解，定容，摇匀，配成浓度为0.20 mg/mL对照品溶液；取咖啡酸对照品、丹参素钠对照品适量，加蒸馏水溶解，定容，摇匀，配成浓度0.50 mg/mL的对照品溶液。

#### 3.2 供试品溶液的制备

精密称定丹参样品0.5 g，加蒸馏水30 mL，称量，用电热套加热回流30 min，放凉后补足损失重量，摇匀，滤过，取续滤液15 mL，浓缩，转移至5 mL容量瓶中，定容，微孔滤膜（0.45 μm）滤过，作为供试品溶液。

#### 3.3 色谱条件

色谱柱：kromasil C<sub>18</sub>（150 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：0.1%冰醋酸水溶液（A）-0.1%冰醋酸甲醇

溶液（B），梯度洗脱。洗脱程序：B 10%~50%，0~50 min；50%~80%，50~60 min；100%~10%，61~66 min；10%，66~70 min。波长：280 nm。流速：1.0 mL/min。柱温：25℃。

#### 3.4 参照峰的选择

按“3.3”项”色谱条件，分别将丹酚酸B、丹参素钠、咖啡酸对照品溶液10 μL注入高效液相色谱仪中，测定图谱。确定咖啡酸为参照峰。

#### 3.5 方法学考察

**3.5.1 精密度** 按“3.2项”制备供试品溶液，注入高效液相色谱仪中，连续测定5次，得共有峰的相对保留时间RSD为0.34%~2.95%，相对峰面积RSD%均小于3.0%。表明仪器精密度良好。

**3.5.2 重现性** 取同一批丹参样品粉末5份，按“3.2项”制备供试品溶液，注入高效液相色谱仪中，测定图谱。得共有峰的相对保留时间RSD为0.26%~2.91%，相对峰面积RSD小于3.0%。表明该方法重现性良好。

**3.5.3 稳定性** 按“3.2项”制备供试品溶液，分别在0，3，6，12，24 h测定，得共有峰的相对保留时间RSD为0.10%~0.82%，相对峰面积RSD为0.50%~1.34%。结果表明，供试品溶液在24 h内稳定性良好。

#### 3.6 指纹图谱的建立

**3.6.1 指纹图谱共有峰的标定** 按“3.2项”方法，将10批丹参样品制成供试品溶液，通过比较10批供试品HPLC色谱图的检测结果，选定稳定性好，吸收强，特征明显的色谱峰为共有峰，共标定10个共有峰（占总峰面积90%以上），各共有峰相对保留时间的RSD在0.25%~1.76%之间，见表3。

表3 栽培丹参样品水溶性成分分析共有峰的相对保留时间

共有峰号	S1 济南	S2 肥城	S3 莒县	S4 沂源	S5 泰安	S6 潍坊	S7 烟台	S8 蒙阴	S9 临朐	S10 枣庄	RSD/%
1	0.3190	0.3366	0.3275	0.3195	0.3300	0.3284	0.3229	0.3250	0.3230	0.3332	1.76
2	0.5884	0.5954	0.5918	0.5913	0.5923	0.5919	0.5916	0.5926	0.5910	0.5959	0.36
3	1	1	1	1	1	1	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.00
4	1.5917	1.5831	1.5877	1.5812	1.5889	1.5856	1.5823	1.5778	1.5876	1.5818	0.27
5	1.6442	1.6352	1.6403	1.6327	1.6397	1.6382	1.6352	1.6316	1.6404	1.6327	0.25
6	1.7055	1.6968	1.7005	1.6912	1.7008	1.6984	1.6935	1.6901	1.7012	1.6936	0.29
7	1.7588	1.7462	1.7524	1.7378	1.7497	1.7521	1.7454	1.7437	1.7523	1.7419	0.35
8	1.8373	1.8259	1.8319	1.8182	1.8302	1.8294	1.8258	1.8238	1.8332	1.8226	0.31
9	1.9114	1.8968	1.9043	1.8842	1.9003	1.9082	1.8967	1.8984	1.9106	1.8983	0.43
10	2.1505	2.1354	2.1439	2.1237	2.1409	2.1420	2.1389	2.1337	2.1493	2.1388	0.36

3.6.2 相似度分析 将10批丹参样品的指纹图谱测定结果导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统, 设置样品S1图谱为参照谱, 多点校正后, 自动匹配, 生成对照图谱(见图2), 计算相似度。结果见表4。

表4 栽培丹参样品水溶性成分分析相似度结果

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照 指纹图谱
S1	1.000	0.997	0.996	0.994	0.992	0.990	0.993	0.994	0.992	0.988	0.997
S2	0.997	1.000	0.995	0.992	0.990	0.988	0.996	0.993	0.990	0.986	0.997
S3	0.996	0.995	1.000	0.998	0.997	0.991	0.995	0.995	0.994	0.990	0.999
S4	0.994	0.992	0.998	1.000	0.998	0.991	0.992	0.993	0.993	0.990	0.998
S5	0.992	0.990	0.997	0.998	1.000	0.991	0.990	0.992	0.991	0.990	0.996
S6	0.990	0.988	0.991	0.991	0.991	1.000	0.988	0.990	0.990	0.986	0.991
S7	0.993	0.996	0.995	0.992	0.990	0.988	1.000	0.997	0.995	0.989	0.996
S8	0.994	0.993	0.995	0.993	0.992	0.990	0.997	1.000	0.996	0.991	0.996
S9	0.992	0.990	0.994	0.993	0.991	0.990	0.995	0.996	1.000	0.996	0.995
S10	0.988	0.986	0.990	0.990	0.990	0.986	0.989	0.991	0.996	1.000	0.991
对照 指纹图谱	0.997	0.997	0.999	0.998	0.996	0.991	0.996	0.996	0.995	0.991	1.000

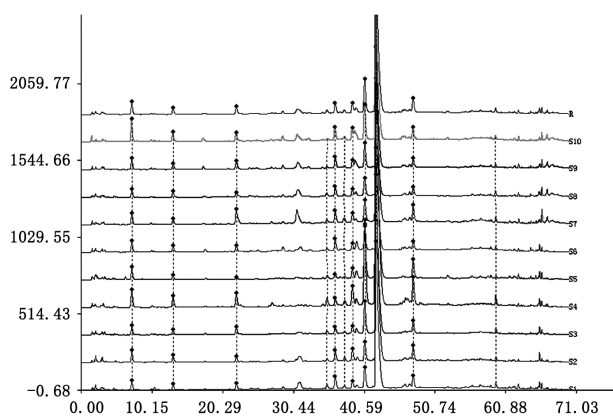


图2 栽培丹参样品水溶性成分分析相似度结果

3.6.3 聚类分析 应用SPSS11.0软件中系统聚类法, 分别分析10批栽培丹参样品HPLC指纹图谱各共有峰的相对峰面积。分析结果, 丹参水溶性成分各样品分为3类。由于S5号样品内参照峰含量偏低, 导致共有峰相对峰面积值整体偏低, 故单独为一类; S7号样品

内参照峰含量偏高, 导致共有峰相对峰面积值整体偏低, 故单独为一类; 其余样品聚为一类。

## 4 讨论

### 4.1 提取方法的选择

脂溶性成分分析中, 分别选择不同提取溶媒(乙酸乙酯、乙醇、甲醇)、提取时间(0.5, 1, 1.5 h)、提取方法(回流、超声), 最终确定以乙醇为溶媒, 回流提取0.5 h的方法。水溶性成分分析中, 分别选择脱脂不脱脂、提取时间等, 最终选择直接用水回流提取30 min的方法。

### 4.2 色谱条件的选择

脂溶性成分分析中, 分别考察流动相的组成(甲醇-水、乙腈-水)、流动相配比、检测波长(250~340 nm)等, 结果以甲醇-水为流动相, 280 nm, 流速1.0 mL/min、柱温30 °C分离最佳, 故以此为色谱条件测定。水溶性成分分析中, 分别考察流动相

## 山东鬼针草属植物挥发油GC-MS分析

李洪芹, 刘红燕, 蒋海强, 彭慧敏, 马昌豪, 彭艳丽\*

(山东中医药大学 济南 250355)

**摘要:** 目的 分析比较鬼针草属五种植物的挥发油成分。方法 采用水蒸气蒸馏法提取鬼针草属植物的挥发油, 用气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术分析山东鬼针草属的5种植物挥发油成分, 并用色谱峰面积归一化法确定挥发油成分的百分含量。结果 金盏银盘、婆婆针、狼把草、小花鬼针草、鬼针草(商品药材)的挥发油含量分别为0.160%, 0.083%, 0.023%, 0.090%, 0.093%。确认的化合物数目分别为20, 45, 10, 61, 9, 占挥发油总量的比例分别是100%, 93.11%, 100%, 89.37%, 99.59%。结论 5个种的挥发油成分及含量差异较大。

**关键词:** 鬼针草属; 挥发油; 气-质联用

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-979X(2011)11-0404-04

### GC-MS Analysis for Essential Oils from *Bidens* L. Species in Shandong Province

LI Hong-qin, LIU Hong-yan, JIANG Hai-qiang, PENG Hui-min, MA Chang-hao, PENG Yan-li

(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

**Abstract: Objective** To analyze the constituents of volatile oils from five *Bidens* L. species in Shandong province.

**Methods** The essential oils were extracted from five *Bidens* L. species by steam distillation and the chemical compositions were further identified by GC-MS. The relative contents of essential oils were determined by area normalization method. **Results** The contents of volatile oils were 0.160%, 0.083%, 0.023%, 0.090%, 0.093%, respectively, for *Bidens biternata* (Lour.) Merr.et Sherff, *Bidens pilosa* Linn., *Bidens tripartite* (Lour.) Merr.et Sherff, *Bidens parviflora* Willd., *Bidens bipinnata* L.(commercial medicinal materials). Accordingly, the numbers of determined volatile compounds were 20, 45, 10, 61, 9, respectively, responsible for 100%, 93.11%, 100%, 89.37% and 99.59% of the total amount of volatile oils from different *Bidens* L. species. **Conclusion** There are significant differences in the constituents and contents of volatile oils from five *Bidens* L. species.

**Key Words:** *Bidens* L.; volatile oil; GC-MS

收稿日期: 2011-05-03

作者简介: 李洪芹(1987-), 女, 山东临沂人, 硕士研究生, 研究方向为生药、中药质量控制和品质评价。

\*通讯作者: 彭艳丽(1956-), 女, 教授, 研究方向为生药、中药质量控制与品质评价, E-mail: pyl567@163.com

配比、检测波长(250~370 nm)、流速、柱温等条件, 结果以甲醇-水为流动相, 280 nm, 流速1.0 mL/min, 柱温25℃为条件, 分离最佳, 故以此为色谱条件测定。

#### 4.3 参照峰的选择

脂溶性成分分析中, 分别测定丹参酮II A对照品溶液、隐丹参酮对照品溶液。结果隐丹参酮出峰时间适中且分离良好, 因此选择隐丹参酮的峰作为参照峰。在水溶性成分分析中, 分别测定丹酚酸B、丹参素钠、咖啡酸对照品溶液。结果咖啡酸出峰时间适中且分离良好, 因此选择咖啡酸的峰作为参照峰。

指纹图谱测定结果及各样品与对照图谱相似度计算结果表明, 山东栽培丹参显示了较好的质量均一

性。但通过聚类分析可见, 在某些化学成分的含量和比例方面呈现了一定的聚类趋势, 可能与药材的种质资源、栽培技术、地域环境等有关, 需要进一步通过综合考察探讨其原因, 为药材规范化种植提供科学依据。

#### 参考文献

- [1] 洪筱坤, 王智华. 中药数字化色谱指纹谱[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003: 2-3.
- [2] 王宇红, 张水寒, 杨永华, 等. 丹参超微饮片脂溶性有效部位的HPLC指纹图谱研究[J]. 中成药, 2007(7): 945-948.
- [3] 国家药典委员会. 中国药典[S]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 70-71.