

河南栾川地区“白化”丹参的 TLC 和 HPLC 图谱分析

赵瑞娜^{1,2}, 谢培山^{1,2}, 尹卫平¹, 卢平华², 颜玉贞², 王忠东^{1*}

(1. 河南科技大学化工与制药学院, 河南 洛阳 471003; 2. 珠海科曼中药研究有限公司, 广东 珠海 519085)

摘要:目的 借助丹参药材 TLC 和 HPLC 图谱的条件, 对河南栾川地区“白化”丹参(因生长环境影响而根部表皮及断面呈白色)与正常丹参的品质进行色谱图谱分析, 比较成分的异同。方法 TLC 色谱条件: GF₂₅₄ 预制薄层板, 水溶性部位与脂溶性部位分别展开、显色; HPLC 色谱条件: Zorbax SB C₁₈ 色谱柱, 水溶性部位与脂溶性部位分别进行梯度洗脱。结果 栾川地区“白化”丹参脂溶性有效成分明显偏低, 仅检出痕量的二萜醌类成分; 水溶性部分丹参酚酸类成分较高。结论 栾川地区丹参根的“白化”现象反映了生长环境可影响丹参二萜醌类成分的生物合成, 具体影响因素待进一步考察, 是值得丹参 GAP 管理注意的问题。

关键词: 丹参; “白化”丹参; 薄层色谱; 高效液相色谱

中图分类号: R 282. 710. 3

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)01-0119-04

Quality analysis of ‘whitish’ *Radix Salvia Miltiorrhiza* in Luanchuan Region of Henan Province by TLC and HPLC

ZHAO Rui-na¹, XIE Pei-shan^{1,2}, YIN Wei-ping¹, LU Ping-hua², YAN Yu-zhen², WANG Zhong-dong¹

(1. Chemical and Pharmaceutical College, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China;

2. Zhuhai Chromap Institute of Herbal Research, Zhuhai 519085, China)

Abstract: **Objective** To study the sample quality of ‘whitish’ *Radix Salvia Miltiorrhiza* (the root of a grown-environmental-influenced variant sample of *Salvia miltiorrhiza*, which cortex and transection is white) grown in Luanchuan Region of Henan Province and normal *Radix Salvia Miltiorrhiza* by the means of TLC and HPLC chromatographic fingerprints; hence to compare the difference of their constituents.

Methods TLC Chromatographic condition: Precoated silica gel F₂₅₄ plate; hydrophilic and lipophilic constituents were developed and derivatized with different solvent systems and visualization reagents, respectively. HPLC Chromatographic condition: Zorbax SB C₁₈ column; hydrophilic and lipophilic constituents were gradient eluted, respectively.

Results The ‘whitish’ *Radix Salvia Miltiorrhiza* contains lower content of lipophilic compounds, the main diterpene quinones was only trace amount, while the content of hydrophilic constituents was relatively higher. **Conclusion** The ‘whitish’ phenomenon suggests that the ‘micro’-environmental condition can probably influence negatively the bio-synthesis of diterpene-quinones. The factors of influence still need further study. Such phenomenon would be worth concerning seriously for GAP administration.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge; ‘whitish’ *Radix Salvia Miltiorrhiza*; TLC; HPLC

丹参始记载于《神农本草经》, 具有活血化瘀、清心除烦之功效^[1]。《中国药典》2005 版一部收载丹参为唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的干燥根及根茎。其主要有效成分为脂溶性的二萜醌类和水溶性的丹酚酸类成分^[2]。其中脂溶性部位具有抗菌、抗炎、治疗冠心病等疗效, 水溶性酚酸类成分具有改善微循环、抑制血小板、减少心肌损伤和抗氧化等作用, 丹参及其制品广泛地应用于临床。目前在四川和陕西均建有丹参药材的 GAP 种植基地。

2003 年笔者在河南栾川地区发现同一地区的不同生长地点丹参根有红(正常)、白(异常)之分, 而种质为同一来源, 植物鉴定均为丹参。所谓“白化”丹参很可能是因为局部生长微环境影响了丹参酮 II_A 等二萜醌类成分的生物合成途径, 根的皮部没有红色出现, 为便于与正常生长的丹参区分, 针对这种“白化”现象, 取名“白化”丹参。而在同地区的其他生长点没有“白化”现象。由于外观差异较大, 故多被弃置不用, 药农损失较大。为了分析两者内在成分的差异, 本研究采用了经优化的薄层色谱及液相色谱条

* 收稿日期: 2005-04-23

件,对上述“白化”丹参及正常丹参的成分进行综合分析。

1 高效薄层色谱试验

1.1 仪器与试剂:瑞士 CAMAG 全自动点样仪 ATS4;薄层色谱成像系统 ReproStar 3;薄层扫描仪 TLC Scanner3;薄层色谱工作站:winCATs1.3.5,双槽展开缸。甲醇、醋酸乙酯、无水乙醇、氯仿、甲酸等均为分析纯。

丹参药材共 37 批,收集自四川、广东、湖南及河南等省,“白化”丹参 1 批,产自河南栾川,均由河南科技大学化工与制药学院王忠东教授提供并鉴定。

1.2 方法与结果

1.2.1 供试品溶液的制备:脂溶性部位:取丹参药材粉末(过 2 号筛)约 1 g,加 50 mL 醋酸乙酯,置水浴加热回流 2 次,每次 30 min,滤过,合并滤液,蒸干,残渣加无水乙醇溶解,制成 1 mL 溶液,即得。

水溶性部位:取脂溶性部位项下挥干醋酸乙酯后的药渣,加水 50 mL,煎煮 30 min,放冷,用棉花滤过,滤液移至分液漏斗中,用 10% HCl 调 pH 值至 2 左右,用水饱和的醋酸乙酯萃取 2 次,每次 30 mL,合并萃取液,蒸干,残渣加甲醇溶解,制成 2 mL 溶液,即得。

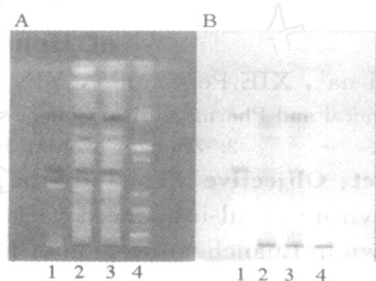
1.2.2 对照品溶液的制备:脂溶性部位:精密称取丹参酮 II_A、隐丹参酮和二氢丹参酮对照品适量,分别加无水乙醇制成含 1 mg/mL 的溶液,即得。水溶性部位:精密称取丹参素和丹酚酸 B 对照品适量,分别加甲醇制成 1.0 mg/mL 的溶液,即得。

1.2.3 高效薄层色谱条件:点样:照《中国药典》2005 版一部附录 VIB 薄层色谱法进行。脂溶性部位:吸取上述样品和对照品溶液各 5 μ L,分别点于同一硅胶 GF₂₅₄ 预制薄层板 (Sigma, 批号 10B204667) 上。水溶性部位:吸取上述样品和对照品溶液各 2 μ L,分别点于同一硅胶 GF₂₅₄ 高效薄层板 (Merck, 批号 OB257276) 上。点样后将薄层板置于五氧化二磷真空干燥器内干燥过夜,备用。展开剂:脂溶性成分用正己烷-醋酸乙酯-甲酸 (30:10:0.5) 展开,展距 10 cm;水溶性成分用氯仿-醋酸乙酯-甲酸 (5:4:2) 展开,展距 8 cm。薄层板从干燥器中拿出后立即展开。温度 23 $^{\circ}$ C,湿度 53% (环境湿度)。

1.2.4 显色及观察:脂溶性部位:喷以 10% 硫酸乙醇溶液,于 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰为止,置

紫外光 (366 nm) 灯和日光下检视。水溶性部位:先在紫外光 (366 nm) 灯下观察荧光色谱,再喷以 5% 香草醛浓硫酸溶液,于 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰为止,置于日光下检视。

1.2.5 结果:在脂溶性部位的色谱(图 1)中,四川中江和河南伊川的丹参药材在与对照品相应位置,显相同的斑点,属正常现象。而“白化”丹参药材在与对照品相应的位置未检出斑点;显示未检出二氢丹参酮、隐丹参酮、丹参酮 II_A 等主要的二萜醌类成分;在水溶性供试品色谱(图 2)中,正常丹参与“白化”丹参药材在与对照品相应位置,均显相同颜色的荧光斑点和可见光斑点,在同样取样量的推荐下,色谱的各主要斑点如丹参酚酸 B、丹参素均较正常丹参明显。



A-显色后紫外光 (366 nm) 色谱 B-显色后可见光色谱 1-对照品从下至上,二氢丹参酮、隐丹参酮、丹参酮 II_A 2-24# 四川中江产丹参 3-23# 河南伊川产丹参 4-“白化”丹参

A-fluorescent (366 nm) chromatogram after visualization B-visible chromatogram after visualization 1-control from below to above, dyhydrotanshinone, cryptotanshinone, tanshinone II_A 2-24# *Radix Salvia Miltiorrhiza* grown in Zhongjiang Region of Sichuan Province 3-23# *Radix Salvia Miltiorrhiza* grown in Yichuan Region of Henan Province 4-“whitish” *Radix Salvia Miltiorrhiza*

图 1 脂溶性成分的薄层色谱图

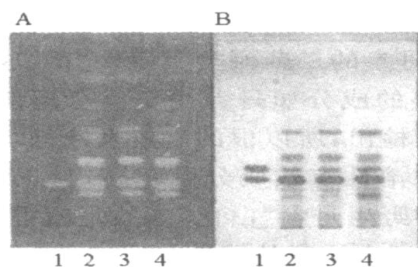
Fig 1 TLC Chromatogram of lipophilic constituents

2 高效液相色谱指纹图谱试验

2.1 仪器与试剂:Agilent1100 高效液相色谱仪,在线脱气机,四元泵,自动进样器,柱温箱,DAD 检测器,HP1100 色谱工作站。醋酸乙酯、磷酸等均为分析纯,甲醇、乙腈为色谱纯,水为重蒸馏水。对照样品同 TLC 试验项下。

2.2 方法与结果

2.2.1 供试品溶液的制备:取丹参药材粉末(过 2 号筛)约 0.5 g,按 1.2.1 项下供试品溶液制备方法,同法脂溶性部位制成 5 mL 溶液,水溶性部位制成 10 mL 溶液,过 0.45 μ m 的微孔滤膜,取续滤液,即得。



A-显色后紫外光 (366 nm) 色谱 B-显色后可见光色谱 1-对照品(从下至上, 丹参酚酸B、丹参素) 2-24# 四川中江产丹参 3-23# 河南伊川产丹参 4-“白化”丹参

A-fluorescent (366 nm) chromatogram before visualization B-visible chromatogram after visualization 1-control from below to above, salvianolic acid B, danshensu 2-24# *Radix Salvia Miltiorrhiza* grown in Zhongjiang Region of Sichuan Province 3-23# *Radix Salvia Miltiorrhiza* grown in Yichuan Region of Henan Province 4-“whitish” *Radix Salvia Miltiorrhiza*

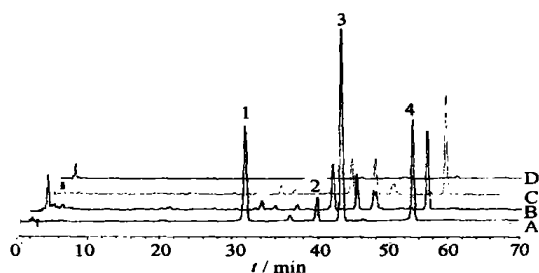
图 2 水溶性成分的薄层色谱图

Fig 2 TLC Chromatogram of hydrophilic constituents

2.2.2 对照品溶液的制备: 取二氢丹参酮、丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 II_A、丹酚酸 B、丹参素和原儿茶醛对照品适量, 加甲醇制成含 0.1 mg/mL 的溶液, 即得。

2.2.3 色谱条件: ZORBAX SB C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱。脂溶性部分: 流动相为 A (甲醇)- B (水), 0 min: 55% A; 55 min: 80% A。体积流量 0.9 mL/min, 柱温 30℃, 检测波长 270 nm, 进样量 20 μL; 记录时间为 70 min。水溶性成分: 流动相为 A (乙腈)- B (甲醇)- C (0.2% 磷酸), 0 min: 8% A、92% C; 25 min: 43% B、57% C; 45 min: 43% B、57% C; 60 min: 65% B、35% C。体积流量 0.8 mL/min, 柱温 35℃, 检测波长 280 nm, 进样量 10 μL, 记录时间为 65 min。

2.2.4 结果: 在脂溶性成分的色谱图中(图 3), 四川中江和河南伊川的丹参药材在与对照品相应的保留时间上出现相同的色谱峰, 属正常现象; 而“白化”丹参药材在与对照品相应的位置仅检出痕量的色谱峰。在水溶性供试品的色谱图中(图 4), 在与对照品相应的保留时间上出现相同的色谱峰, 保留时间及紫外吸收光谱均与对照品一致。且“白化”丹参供试品色谱与丹参药材供试品色谱有极高的相似性, 说明水溶性部分中酚酸类成分与正常丹参基本一致, 没有异常现象, 同样取样量的条件下, 与测试的正常丹参比较, 丹参酚酸 B 量略高。对丹参酚酸 B 进行的测定结果显示, 37 批丹参药材中丹参酚酸 B 的量为 (4.84 ± 1.83)%, 1 批“白化”丹参药材的测定结果为 5.32%。



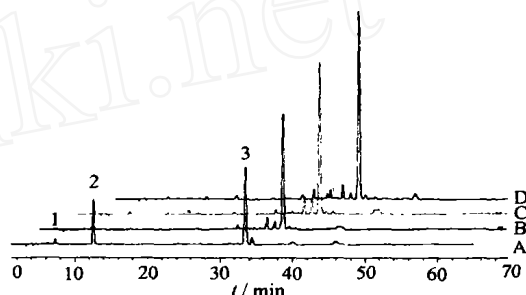
1-二氢丹参酮 2-丹参酮 I 3-隐丹参酮 4-丹参酮 II_A
A-对照品 B-24# 四川中江产丹参 C-23# 河南伊川产丹参 D-“白化”丹参

1-dihydrotanshinone 2-tanshinone I 3-cryptotanshinone 4-tanshinone II_A

A-reference substance B-24# *Radix Salvia Miltiorrhiza* grown in Zhongjiang Region of Sichuan Province C-23# *Radix Salvia Miltiorrhiza* grown in Yichuan Region of Henan Province D-“whitish” *Radix Salvia Miltiorrhiza*

图 3 脂溶性成分的 HPLC 色谱图

Fig 3 HPLC Chromatogram of lipophilic constituents



1-丹参素 2-原儿茶醛 3-丹参酚酸 B
A-对照品 B-24# 四川中江产丹参 C-23# 河南伊川产丹参 D-“白化”丹参

1-danshensu 2-protocatechualdehyde 3-salvianolic acid B
A-reference substance B-24# *Radix Salvia Miltiorrhiza* grown in Zhongjiang Region of Sichuan Province C-23# *Radix Salvia Miltiorrhiza* grown in Yichuan Region of Henan Province D-“whitish” *Radix Salvia Miltiorrhiza*

图 4 水溶性成分的 HPLC 色谱图

Fig 4 HPLC Chromatogram of hydrophilic constituents

3 讨论

3.1 提取方法的考察: 丹参的两类主要有效成分的极性相差很大, 因此为了全面反映丹参药材的质量信息, 设计了两步提取法。根据文献报道^[3,4]和试验比较, 最后采用醋酸乙酯提取二萜醌类成分, 药渣用水提取酚酸类成分。液相色谱试验表明“白化”丹参仅含有痕量的丹参酮类脂溶性成分。

3.2 展开剂及显色剂的选择: 丹参药材中的主要有效成分为脂溶性的二萜醌类和水溶性丹酚酸类成分。薄层鉴别及薄层扫描定量分析有很多报道^[3,4], 通过不同展开系统的筛选和比较, 确定丹参酮类采用正己烷系统, 酚酸类采用氯仿-甲酸展开系统。通过不同显色剂的比较, 确定脂溶性部位采用 10% 硫

酸乙醇溶液,水溶性部位采用 5% 香草醛浓硫酸溶液作为显色剂。水溶性部位的薄层与液相色谱图谱相比,前者在特征表达和直观辨认等方面更具优势。

3.3 高效液相色谱条件的选择:据文献报道^[5~7]和通过色谱条件的优化,最后确定了本实验的流动相条件,即甲醇-水和乙腈-甲醇-0.2% 磷酸梯度洗脱。通过对 6 个品牌色谱柱的比较,最后选用了 Zorbax SB C₁₈ 色谱柱,其分离效果相对较好。

3.4 “白化”丹参成因考察:通过河南栾川“白化”丹参与产自河南伊川、四川中江的丹参产地的土壤样本分析,生长“白化”丹参的地段的土壤中 Mg、Zn 元素量较高(“白化”丹参 Mg 5.2%,伊川 Mg 2.7%,四川中江 Mg 3.4%;“白化”丹参 Zn 0.02%,其他两种不含有 Zn 元素),土壤的 pH 值也较高(“白化”7.01,伊川 6.70,四川中江 6.45),这是否是丹参“白化”的直接因素,待进一步证实。丹参的“白化”说明在特殊生长环境下具有邻醌结构的丹参酮类成分的醌式很可能发生变化,或者不能形成邻醌,因而不显红色,文献报道,邻醌结构是丹参酮类成分的活性中心^[8],由此推断丹参“白化”后对功效肯定有直接影响。

3.5 “白化”丹参成分分析: TLC 图谱试验结果表明,“白化”丹参的二萜醌类脂溶性有效成分量很低,以致于主要的成分如丹参酮 II_A、隐丹参酮、二氢丹参酮等均难以检出,所以根的表皮及断面均不见红色。而酚酸类水溶性有效成分量较高,与正常丹参样品无异。这种野生丹参“白化”现象是值得野生变栽培的 GAP 管理中注意的问题。

References:

- [1] Xiao P G. *Modern Chinese Materia Medica* (新编中药志) [M]. Vol 1. Beijing: Chemical Industry Press, 2002.
- [2] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.
- [3] Li W. Extraction and expression of fingerprint characteristics for Danshen by the plate chromatography [J]. *World Sci Technol—Modern Tradit Chin Med Mater Med*, 2003, 5(1): 58-61.
- [4] Li J. Separation and quantitative determination of seven aqueous depsides in *Salvia miltiorrhiza* by HPLC scanning [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1993, 28(7): 543-547.
- [5] Liu Y. Studies on the HPLC fingerprint of Danshen crude drugs [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2002, 33(2): 127-130.
- [6] Zeng L J. Study on the chromatography fingerprint of compound Danshen Tablet for its quality assessment [J]. *Acad J Guangdong Coll Pharm* (广东药学院学报), 2002, 18(3): 182-184.
- [7] Li L. Development of HPLC fingerprint bar code technique for authentication and quality assessment of *Radix Salvia miltiorrhiza* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(7): 649-653.
- [8] Sun C J. The synthesis of the compounds of tanshinone [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1985, 20(1): 39-43.

丹参脂溶性成分的 ESI-MS 行为及其特征图谱研究

韩凤梅, 张 玲, 陈怀侠, 陈 勇*

(湖北大学 中药生物技术省级重点实验室, 湖北 武汉 430062)

摘 要: 目的 研究脂溶性丹参酮类成分的 ESI-MS 规律, 建立丹参药材脂溶性丹参酮类成分提取物 ESI-MS 特征图谱。方法 应用电喷雾离子阱质谱 (ESI-MS) 技术研究丹参酮类成分的 ESI-MS 规律; 用 95% 乙醇超声提取丹参药材中丹参酮类物质, 在正离子方式检测模式下, 直接进样应用一级全扫描质谱建立其特征 ESI-MS 图谱。结果 丹参酮类物质在 ESI-MS 一级正离子全扫描时, 易捕获一个质子形成分子离子, 且都易形成二聚体加合 Na⁺ 离子峰; 分子离子在二级质谱中易发生脱水、脱羰基和 A 环开环裂解。丹参药材中丹参酮类物质的 ESI-MS 图谱重现性与特征性较好, 易于解析。结论 丹参脂溶性成分 ESI-MS 图可用于丹参药材及复方丹参中丹参酮类成分的快速鉴别。

关键词: 丹参药材; 脂溶性成分; 电喷雾-质谱; 指纹图谱

中图分类号: R 286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)01-0122-04

ESI-MS Performance and fingerprint of lipophilic constituents from *Radix Salviae Miltiorrhiza*

HAN Fengmei, ZHANG Ling, CHEN Huai-xia, CHEN Yong

(Hubei Province Key Laboratory of Biotechnology of Traditional Chinese Medicine,

Hubei University, Wuhan 430062, China)

* 收稿日期: 2005-02-10

基金项目: 科技部“十五”攻关项目 (2001BA701A 01); 湖北省青年杰出人才科学基金项目 (2002AC004)

* 通讯作者 陈 勇 Tel/Fax: (027) 88663590 E-mail: cy101610@npc.gov.cn