

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

杨贵雅¹, 薛紫鲸¹, 张 丹¹, 郭 梅¹, 郑玉光¹, 郭 龙^{1,2*}

1. 河北中医学院药学院 河北省中药炮制技术创新中心, 河北 石家庄 050200

2. 河北中医学院 河北省心脑血管病中医药防治重点实验室, 河北 石家庄 050200

摘 要: **目的** 基于指纹图谱和多成分含量测定对丹参药材皮部和木部的化学成分进行分析与比较, 阐明丹参药材不同部位活性成分的分布规律。 **方法** 采用高效液相色谱法对不同批次的丹参皮部和木部样品进行分析, 分别建立丹参皮部和木部指纹图谱; 在此基础上, 对丹参皮部和木部样品中的丹参素、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 和丹参酮 II_A 8 个活性成分进行含量测定, 并结合聚类分析、主成分分析和正交偏最小二乘判别分析等化学计量学方法对丹参皮部和木部化学成分进行比较。 **结果** 建立了丹参药材皮部和木部化学指纹图谱, 共标定了 10 个共有峰; 含量测定和化学计量学分析结果表明, 丹参皮部和木部样品的化学成分存在差异, 其中丹酚酸类成分差异不大, 而丹参酮类成分差异较大, 丹参皮部样品中丹参酮类成分明显高于丹参木部样品。 **结论** 通过指纹图谱结合多成分含量测定方法, 明确了丹参药材不同部位活性成分的分布差异, 为丹参药材资源的开发和利用提供了科学依据。

关键词: 丹参; 皮部; 木部; 指纹图谱; 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

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)21-5328-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.21.028

Chemical comparison of *Salvia miltiorrhiza* phloem and xylem based on fingerprint analysis and quantitative analysis of multi-components

YANG Gui-ya¹, XUE Zi-jing¹, ZHANG Dan¹, GUO Mei¹, ZHENG Yu-guang¹, GUO Long^{1,2}

1. Traditional Chinese Medicine Processing Technology Innovation Center of Hebei Province, College of Pharmacy, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China

2. Hebei Key Laboratory of Chinese Medicine Research on Cardio-cerebrovascular Disease, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China

Abstract: Objective To comprehensively compare and evaluate the composition of *Salvia miltiorrhiza* phloem and xylem samples based on fingerprint analysis and quantitative analysis of multi-components. **Methods** In the present study, an accurate and reliable fingerprint approach was developed using high performance liquid chromatography for chemical comparison of phloem and xylem samples of *S. miltiorrhiza*. Furthermore, eight bioactive compounds including four salvianolic acids and four tanshinones in *S. miltiorrhiza* phloem and xylem samples were simultaneously quantified. Moreover, chemometrics methods were performed to compare and discriminate the phloem and xylem based on the quantitative data. **Results** The specific fingerprints of phloem and xylem of *S. miltiorrhiza* were obtained, and a total of 10 common peaks were marked. The quantitative and chemometrics analysis results indicated the content of chemical components in phloem and xylem samples of *S. miltiorrhiza* were notably different. Obviously, the content of tanshinones were notably different between phloem and xylem samples. The content of tanshinones were significant higher in phloem compared with xylem in *S. miltiorrhiza*. **Conclusion** The fingerprint analysis and quantitative analysis of multi-components could be a well-acceptable strategy for chemical comparison of *S. miltiorrhiza* phloem and xylem.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bge.; phloem; xylem; fingerprint; danshensu; rosmarinic acid; shikonic acid; dansolic acid B; dihydrotanshinone I; cryptotanshinone; tanshinone I; tanshinone II_A

收稿日期: 2019-04-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81803697); 河北省自然科学基金项目 (H2018423032); 河北省中医药管理局科研计划项目 (2018108); 孙宝惠全国名老中医专家传承工作室项目 (7002016008005); 河北省二期现代农业产业技术体系创新团队项目 (HBCT2018060205); 河北中医学院博士基金资助项目 (BSZ2017003); 第四次全国中药资源普查 (Z135080000022)

作者简介: 杨贵雅, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药效物质基础与质量控制。Tel: 17367713902 E-mail: 1589250378@qq.com

***通信作者** 郭 龙, 男, 博士, 讲师, 研究方向为中药药效物质基础与质量控制。Tel: 13932101062 E-mail: guo_long11@163.com

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎, 味苦, 微寒, 归心、肝经。丹参具有通经止痛、活血祛瘀、清心除烦、凉血消痈等功效, 常用于胸痹心痛、癥瘕积聚、热痹疼痛、心烦不眠、月经不调、痛经经闭、疮疡肿痛^[1]。临床中丹参及其复方制剂主要用于心血管疾病、脑血管疾病、高血脂和关节炎等疾病的治疗^[2-3]。丹参中的化学成分根据极性差异可以分为水溶性成分和脂溶性成分。水溶性成分主要为酚酸类化合物, 如丹参素、迷迭香酸、紫草酸和丹酚酸 B 等; 脂溶性成分主要为丹参酮类成分, 如丹参酮 II_A、丹参酮 I、隐丹参酮和二氢丹参酮 I 等^[4]。

药用植物特别是双子叶植物在生长发育过程中, 因次生分生组织细胞分裂、分化出现形成层等次生构造, 次生代谢产物随着生长年限的不同在形成层内外(木质部和韧皮部)进行生物合成与富集, 从而导致皮部和木部的化学成分、生物活性等存在一定的差异性^[5-6]。但究竟有何差异性或相关性却鲜有量化评价方面的研究报道。针对于丹参药材, 研究主要集中于化学成分的分析 and 药理活性的研究, 未见有丹参皮部和木部化学成分对比研究的报道^[7-10]。

因此, 本研究采用高效液相色谱法对丹参皮部和木部化学成分进行全面分析, 分别建立丹参皮部和木部化学指纹图谱, 从整体上比较丹参药材木部和皮部化学成分差异。在此基础上, 建立丹参皮部和木部中丹参素、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 和丹参酮 II_A 8 种活性成分的含量测定方法, 对不同批次的丹参木部和皮部样品进行多成分含量测定, 分析不同活性成分在丹参皮部和木部药材中的分布差异。基于含量测定结果, 进一步结合化学计量学方法, 对丹参皮部和木部样品进行比较与区分, 并寻找二者之间的差异性成分。通过以上研究, 以期能够发现丹参药材不同部位活性成分的分布差异, 为更加全面地评价丹参药材质量提供方法, 为丹参药材资源的开发和利用提供数据参考。

1 材料

Shimadzu LC-2030 高效液相色谱仪, Agilent XDB C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), Mettler-Toledo XS205 DU 型电子分析天平, KS-5200B 超声波清洗仪 (昆山洁立美超声仪器有限公司)。

丹参素 (批号 MUST-17060910)、迷迭香酸 (批号 MUST-17040532)、紫草酸 (批号 MUST-17053003)、丹酚酸 B (批号 MUST-17040503)、二氢丹参酮 I (批号 MUST-17032705)、隐丹参酮 (批号 MUST-17030403)、丹参酮 I (批号 MUST-17030210) 和丹参酮 II_A (批号 MUST-17022502) 对照品购自成都曼思特生物科技有限公司, 经高效液相色谱归一化法测定, 质量分数均大于 98.0%。乙腈、甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

不同产地丹参药材购自河北安国药材市场, 来源见表 1, 经河北中医学院郑玉光教授鉴定为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎。药材标本保存于河北中医学院生药学教研室。

表 1 丹参药材皮部和木部样品信息

Table 1 Sources of *S. miltiorrhiza* phloem and xylem samples

样品编号	部位	产地	样品编号	部位	产地
P1	皮部	河北	M1	木部	河北
P2	皮部	河北	M2	木部	河北
P3	皮部	河南	M3	木部	河南
P4	皮部	河南	M4	木部	河南
P5	皮部	山西	M5	木部	山西
P6	皮部	山西	M6	木部	山西
P7	皮部	山东	M7	木部	山东
P8	皮部	山东	M8	木部	山东
P9	皮部	山东	M9	木部	山东
P10	皮部	山东	M10	木部	山东
P11	皮部	山东	M11	木部	山东
P12	皮部	山东	M12	木部	山东

2 方法与结果

2.1 样品处理

12 批丹参药材除去泥土及非药用部分后, 选择根条粗细一致的药材作为实验材料。将同批次丹参药材分为 2 部分, 一部分为形成层以外部分, 称为丹参药材皮部样品; 另一部分为形成层以内部分, 称为丹参药材木部样品。最终制备得到 12 批丹参药材皮部样品 (P1~P12) 和 12 批丹参药材木部样品 (M1~M12)。

2.2 色谱条件

色谱分离采用 Agilent XDB C₁₈ 色谱柱 (250

mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱, 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; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 °C; 检测波长 280 nm。

2.3 对照品溶液的制备

精密称取对照品丹参素、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 和丹参酮 II_A 适量置 10 mL 棕色量瓶中, 加 75%甲醇定容至刻度, 配制成含丹参素 0.156 mg/mL、迷迭香酸 0.356 mg/mL、紫草酸 0.342 mg/mL、丹酚酸 B 0.626 mg/mL、二氢丹参酮 I 0.122 mg/mL、隐丹参酮 0.148 mg/mL、丹参酮 I 0.110 mg/mL 和丹参酮 II_A 0.160 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备

精密称取丹参药材皮部和木部粉末(过 60 目筛) 0.15 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 75%甲醇 15 mL, 称定质量, 80 kHz 超声提取 30 min, 室温下冷却, 精密称定 75%甲醇补足减失质量, 13 000 r/min 离心 10 min 后, 取上清, 即得。

2.5 不同产地丹参药材皮部和木部指纹图谱研究

为了全面表征丹参药材皮部和木部化学成分, 对其二者之间化学成分进行比较, 为丹参药材质量评价及资源开发提供数据支撑, 本实验采用高效液相色谱法对不同产地丹参药材皮部和木部样品进行了分析, 分别建立了丹参药材皮部和木部化学指纹图谱。

2.5.1 精密度试验 取丹参药材皮部样品, 按照“2.4”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进样分析, 连续进样 6 次, 记录色谱图, 以丹酚酸 B 色谱峰为参照, 计算指纹图谱中 10 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 考察所建立指纹图谱方法的精密度。结果表明各共有峰相对保留时间的 RSD 分别为 0.07%、0.15%、0.05%、0.11%、0.13%、0.23%、0.17%、0.08%、0.15%、0.20%; 各共有峰相对峰面积的 RSD 分别为 0.45%、0.64%、0.50%、0.57%、0.15%、0.92%、1.07%、0.55%、0.43%、0.48%, 提示方法精密度良好。

2.5.2 稳定性试验 取丹参药材皮部样品供试品溶液, 分别放置 0、2、4、8、12、24 h 后按“2.2”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图。以丹酚酸 B

色谱峰为参照峰, 计算指纹图谱中 10 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积。各共有峰相对保留时间的 RSD 分别为 0.14%、0.23%、0.31%、0.17%、0.41%、0.48%、0.19%、0.12%、0.27%、0.19%; 各共有峰相对峰面积的 RSD 分别为 1.20%、1.79%、1.95%、1.87%、1.91%、2.75%、2.12%、2.35%、1.67%、2.23%。

2.5.3 重复性试验 取丹参药材皮部样品粉末, 精密称取 0.15 g, 平行 6 份, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 进样分析, 记录色谱图, 以丹酚酸 B 色谱峰为参照峰, 计算指纹图谱中 10 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果各共有峰的相对保留时间的 RSD 分别为 0.10%、0.15%、0.22%、0.08%、0.07%、0.18%、0.28%、0.23%、0.25%、0.12%; 各共有峰的相对峰面积的 RSD 分别为 1.82%、0.87%、1.68%、0.44%、1.49%、2.21%、2.93%、3.02%、1.24%、2.67%。

2.5.4 丹参药材皮部和木部指纹图谱建立 将 12 批丹参药材皮部样品和 12 批丹参药材木部样品, 共 24 批样品, 按“2.4”项供试品溶液的制备方法制备, 进行色谱分析, 将所得丹参皮部和木部样品的色谱数据分别导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)”, 以 P1 和 M1 样品色谱图作为参照图谱, 采用中位数法, 时间窗设为 0.2 min, 经多点校正后, 进行色谱峰的匹配, 分别生成丹参药材皮部和木部对照指纹图谱。以保留时间为 29.91 min 的 4 号峰作为参照峰, 最终确定了 10 个共有峰。通过对照品比对, 共指认出其中 8 个峰, 分别为丹参素(1 号峰)、迷迭香酸(2 号峰)、紫草酸(3 号峰)、丹酚酸 B(4 号峰)、二氢丹参酮 I(6 号峰)、隐丹参酮(8 号峰)、丹参酮 I(9 号峰)和丹参酮 II_A(10 号峰)。12 批丹参药材皮部和木部样品色谱图见图 1。丹参药材皮部和木部对照指纹图谱见图 2。

分别将 12 批不同产地丹参药材皮部样品色谱图和 12 批丹参药材木部样品色谱图与对照指纹图谱进行相似度评价。与丹参药材皮部对照指纹图谱相比, 各批次丹参药材皮部样品色谱图相似度均在 0.90 之上; 与丹参药材木部对照指纹图谱相比, 各批次丹参药材木部样品色谱图相似度均在 0.93 之上。由相似度评价结果可知, 所建立的丹参药材皮部和木部化学指纹图谱相似度良好, 可用于丹参皮部和木部样品的质量评价。

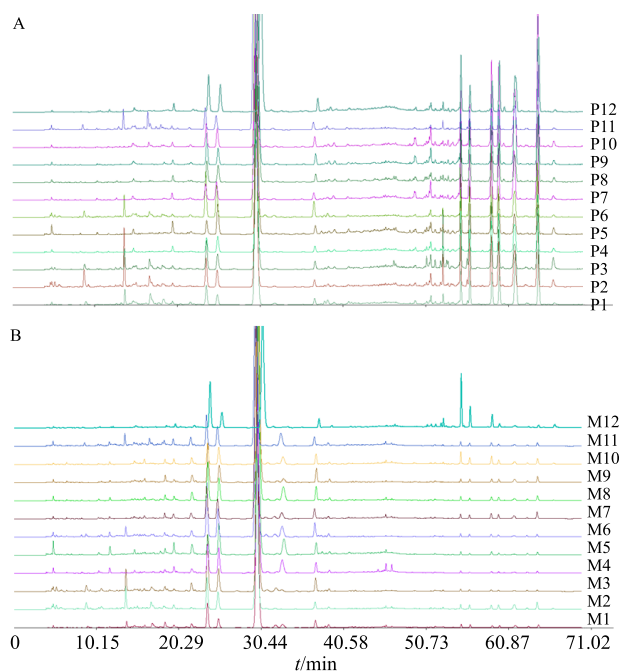


图 1 12 批丹参皮部样品 (A) 和 12 批丹参木部样品 (B) 指纹图谱

Fig. 1 Fingerprints of phloem samples (A) and xylem samples (B) of 12 batches of *S. miltiorrhiza*

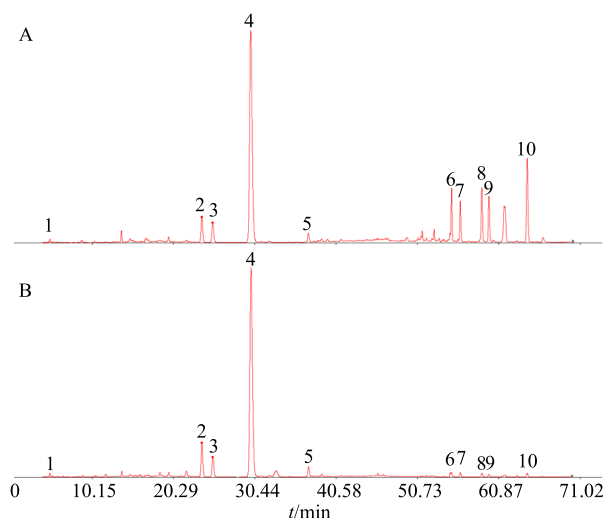


图 2 丹参皮部 (A) 和丹参木部 (B) 对照指纹图谱

Fig. 2 Reference fingerprints of phloem samples (A) and xylem samples (B) of *S. miltiorrhiza*

2.6 不同产地丹参药材皮部和木部多成分含量测定

采用 HPLC 法建立了丹参皮部和木部化学指纹图谱, 确定了 10 个共有峰并指出其中 8 个共有峰。比较丹参药材皮部和木部样品指纹图谱可知, 二者指纹图谱共有峰相同, 说明丹参皮部和木部所含化学成分种类相似; 但是, 丹参皮部和木部样品

各共有峰的高度上有明显差异, 提示丹参皮部和木部样品之间各化学成分的含量有差异。为了明确丹参药材皮部和木部化学成分含量差异, 采用高效液相色谱法, 对不同产地丹参药材皮部和木部样品中 8 个共有成分, 包括 4 个丹酚酸类成分 (丹参素、迷迭香酸、紫草酸和丹酚酸 B) 和 4 个丹参酮类成分 (二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II_A) 进行含量测定。

2.6.1 线性关系、定量限和检测限 将丹参混合对照品溶液用 75% 甲醇稀释成一系列的梯度浓度溶液后, 按“2.2”项色谱条件进样分析, 以待测化合物峰面积对浓度进行线性回归, 得到各成分标准曲线。另以适宜浓度的对照品溶液逐级稀释后进样分析, 分别测定各待测成分信噪比 (S/N 为 10 和 3 时的浓度计为定量限和检测限)。实验结果见表 2, 结果表明在定量范围内各待测化合物的线性良好 ($r^2 > 0.9995$)。

2.6.2 精密度试验 取丹参皮部样品, 按“2.4”项下方法制备样品, 在 1 d 内连续进样 6 针, 记录各待测成分的峰面积和保留时间, 计算 RSD 考察日内精密度。结果显示丹参素、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 和丹参酮 II_A 峰面积的 RSD 分别为 1.16%、1.52%、2.35%、1.61%、1.45%、1.23%、0.86%、1.14%; 保留时间的 RSD 分别为 0.07%、0.15%、0.05%、0.11%、0.23%、0.08%、0.15%、0.20%。由精密度考察结果可知, 仪器精密度良好。

2.6.3 稳定性试验 取丹参药材皮部样品供试品溶液, 分别于供试品溶液制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样分析, 记录各待测成分的峰面积和保留时间, 并计算 RSD 值。结果显示丹参素、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 和丹参酮 II_A 峰面积的 RSD 分别为 1.10%、1.22%、1.41%、0.39%、2.06%、1.80%、0.63%、1.15%; 保留时间的 RSD 分别为 0.14%、0.23%、0.31%、0.17%、0.48%、0.12%、0.27%、0.19%。以上结果表明, 各待测成分在 24 h 内稳定性较好。

2.6.4 重复性试验 精密称取丹参皮部样品粉末 6 份, 每份 0.15 g, 按“2.4”项下方法平行制备供试品溶液。用外标法计算各成分的含量, 记录各化合物的保留时间, 并计算测定结果的 RSD。丹参素、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、二氢丹参酮 I、隐

表 2 8 个成分的保留时间、回归方程、相关系数、线性范围、检测限和定量限

Table 2 Calibration curves, retention time, correlation coefficients, linear ranges, limit of detection and quantitation of eight constituents

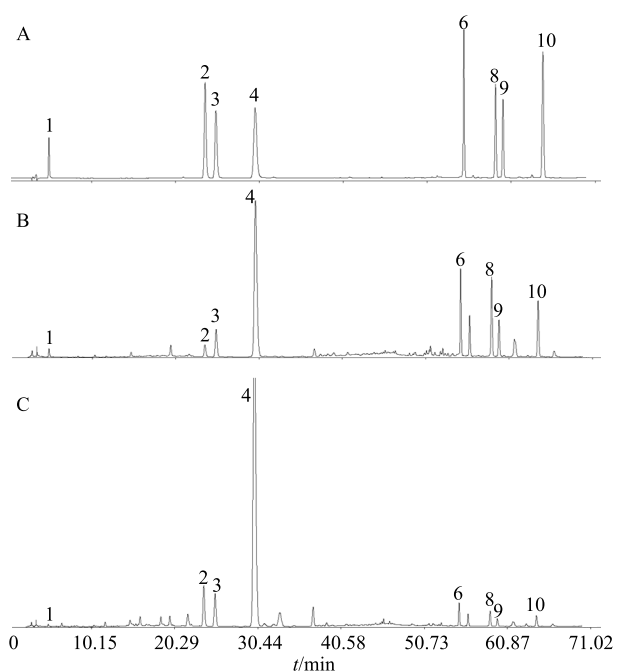
峰号	成分	保留时间/min	回归方程	r^2	线性范围/(mg·L ⁻¹)	检测限/(mg·L ⁻¹)	定量限/(mg·L ⁻¹)
1	丹参素	4.89	$Y=7\,268.2X+4\,497.5$	0.999 9	0.15~156	0.05	0.15
2	迷迭香酸	23.85	$Y=15\,125X+20\,776$	0.999 9	0.35~356	0.07	0.35
3	紫草酸	25.16	$Y=12\,790X+11\,787$	0.999 9	0.30~342	0.08	0.30
4	丹酚酸 B	29.91	$Y=10\,738X+3\,264.1$	0.999 9	0.60~626	0.10	0.60
6	二氢丹参酮 I	55.14	$Y=37\,167X+24\,954$	0.999 6	0.06~122	0.02	0.06
8	隐丹参酮	58.97	$Y=23\,566X+20\,239$	0.999 5	0.07~148	0.03	0.07
9	丹参酮 I	59.87	$Y=29\,202X+5\,581.8$	0.999 7	0.05~110	0.02	0.05
10	丹参酮 II _A	64.70	$Y=34\,872X+34\,108$	0.999 5	0.08~160	0.03	0.08

丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II_A 质量分数的 RSD 分别为 2.12%、2.54%、2.26%、2.71%、1.77%、2.41%、1.71%、1.43%；保留时间的 RSD 分别为 0.10%、0.15%、0.22%、0.08%、0.18%、0.23%、0.25%、0.12%。结果表明所建立方法重复性良好。

2.6.5 加样回收率试验 精密称定已测定的丹参药材皮部样品粉末 0.075 g，平行 6 份，分别加入 8 个待测化合物对照品适量，按“2.4”项下方法制备样品溶液，进样分析，记录各化合物的峰面积，计算各成分的质量分数。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 的平均加样回收率分别为 101.91%、101.64%、98.54%、102.86%、101.15%、102.60%、101.75%、99.69%，RSD 分别为 1.29%、1.64%、1.48%、0.81%、1.42%、1.03%、1.76%、1.47%。

2.6.6 丹参药材皮部和木部多成分含量测定 按照“2.1”项下方法制备 12 批丹参药材皮部样品和 12 批丹参药材木部样品溶液，按“2.4”项下制备供试品溶液，进行色谱分析，应用所建立多成分含量测定方法测定不同产地丹参药材皮部和木部中丹参素、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 和丹参酮 II_A 的含量。丹参药材皮部样品、丹参药材木部样品和混合对照品色谱图见图 3，12 批丹参药材皮部样品和 12 批丹参药材木部样品含量测定结果见表 3。

由含量测定结果可知，丹参药材皮部和木部样品中，丹酚酸类成分的含量均明显高于丹参酮类成分的含量。所测定的 4 个丹酚酸类成分中，丹酚酸 B 的含量最高，其中丹参药材皮部样品中的质量分数为 20.81~56.31 mg/g，木部样品中质量分数为 19.86~50.98 mg/g。丹参药材皮部样品和木部样品之



1-丹参素 2-迷迭香酸 3-紫草酸 4-丹酚酸 B 6-二氢丹参酮 I
8-隐丹参酮 9-丹参酮 I 10-丹参酮 II_A
1-danshensu 2-rosmarinic acid 3-shikonic acid 4-dansolic acid B
6-dihydrotanshinone I 8-cryptotanshinone 9-tanshinone I 10-tanshinone II_A

图 3 混合对照品 (A)、丹参皮部样品 (B) 和丹参木部样品 (C) 色谱图

Fig. 3 Chromatograms of mixed reference solution (A) and phloem sample (B) and xylem sample (C) of *S. miltiorrhiza*

间丹酚酸类成分的含量差异不大，丹参皮部样品中总酚酸的质量分数为 24.01~62.19 mg/g，木部样品中总酚酸质量分数为 24.91~57.69 mg/g。相比于酚酸类成分，丹参酮类成分在丹参皮部和木部样品之间差异较大，皮部样品中总丹参酮的质量分数为 3.57~11.77 mg/g，木部样品中总丹参酮质量分数为 0~1.53 mg/g。

表 3 丹参皮部和木部样品中 8 个成分含量测定结果 ($n = 3$)Table 3 Content of eight constituents in *S. miltiorrhiza* phloem and xylem samples ($n = 3$)

样品编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)							
	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
P1	0.32	1.61	1.08	52.39	0.72	1.27	1.19	2.09
P2	0.58	2.43	1.84	44.32	1.24	1.89	1.49	2.36
P3	0.28	2.44	1.77	40.73	1.97	2.47	1.37	1.65
P4	0.24	1.22	1.74	20.81	0.97	1.16	1.24	1.66
P5	0.94	1.18	3.43	34.63	2.08	3.39	1.42	1.85
P6	0.38	3.75	3.46	54.60	0.53	0.85	1.00	1.57
P7	0.20	1.32	1.92	28.59	1.10	2.87	2.10	3.38
P8	0.26	1.77	1.90	32.36	2.01	3.79	1.33	2.05
P9	0.22	2.63	1.81	56.31	0.89	2.46	1.93	4.29
P10	0.20	1.98	2.02	38.07	1.20	3.28	2.71	4.59
P11	0.38	1.78	1.50	52.50	0.37	0.77	0.70	1.73
P12	0.19	3.11	3.02	32.73	1.08	1.12	1.66	2.16
M1	0.18	1.76	0.85	37.56	未检出	未检出	未检出	未检出
M2	0.49	2.28	1.65	28.72	0.07	0.11	0.11	0.16
M3	0.35	4.17	2.19	50.98	未检出	未检出	未检出	未检出
M4	0.33	2.10	2.38	28.37	未检出	未检出	未检出	未检出
M5	1.08	1.42	3.04	39.84	未检出	0.09	0.05	未检出
M6	0.37	3.99	2.65	40.00	未检出	0.07	0.05	未检出
M7	0.16	2.41	1.86	33.27	0.07	0.14	0.10	0.15
M8	0.30	2.76	2.20	43.79	未检出	0.10	0.08	0.10
M9	0.19	2.86	1.63	50.09	未检出	0.09	0.08	0.13
M10	0.11	1.55	1.63	27.92	0.18	0.22	0.10	0.12
M11	0.41	2.22	1.81	39.04	未检出	0.09	未检出	未检出
M12	0.10	3.42	1.53	19.86	0.91	0.43	0.12	0.06

2.7 丹参药材皮部和木部化学成分比较

为了进一步分析比较丹参药材皮部和木部化学成分差异,采用聚类分析、主成分分析和正交偏最小二乘判别分析等化学计量学方法,以所测定的 8 种化学成分的含量作为变量,对 12 批丹参药材皮部样品和 12 批丹参药材木部样品进行分析和比较。

2.7.1 聚类分析 聚类分析是一种常见的无监督的化学计量学方法,可将具有相似特点的样品归为一类,可用于药材的区分与鉴别^[11-12]。以测定的 4 个丹酚酸类成分和 4 个丹参酮类成分的含量为变量,使用 SPSS 18.0 软件,对不同批次的丹参药材皮部和木部样品进行聚类分析。由聚类分析结果(图 4)可知,24 批样品可明显地分为 2 大类,一类为丹参药材皮部样品(I),另一类为丹参药材木部样品(II)。

2.7.2 主成分分析 主成分分析是一种重要的化学计量学方法,主成分分析在不丢失太多信息的基础上,将原始众多相关性的指标重新组合成新的相

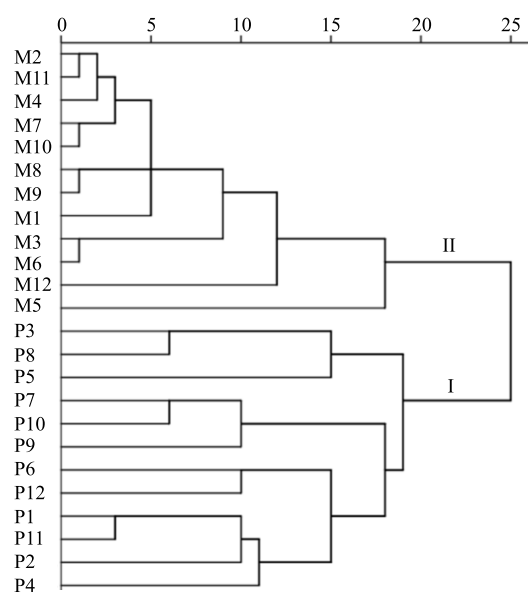


图 4 丹参皮部和木部样品聚类分析结果

Fig. 4 Hierarchical cluster analysis of *S. miltiorrhiza* phloem and xylem samples

互无关的综合指标(主成分)来代替原始指标充分反映原始数据的信息。该方法被广泛用于中药材比较与区分中^[13-14]。因此,在聚类分析的基础上,进一步采用主成分分析对丹参药材皮部和木部样品进行分析。由主成分分析结果可知,前 2 个主成分的累积贡献率为 82.4%,说明所建立的模型的区分度较好,前 2 个主成分已基本能反映出样品的主要特征。以前 2 个主成分建立坐标系,得到 12 批丹参皮部样品和 12 批丹参木部样品的主成分分析得分图(图 5)。由主成分分析得分图可知,丹参皮部和木部样品明显分布于 2 个区域,可以被分为 2 类。综合聚类分析和主成分分析结果,提示丹参药材皮部和木部在化学成分的含量上存在明显的差异。

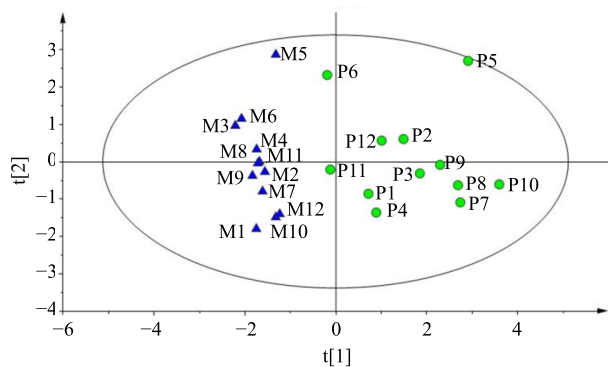


图 5 丹参皮部和木部主成分分析得分图

Fig. 5 Principal component analysis scores plots of *S. miltiorrhiza* phloem and xylem samples

2.7.3 正交偏最小二乘判别分析 正交偏最小二乘判别分析利用正交信号矫正过滤原理从正交预测变量中收集出对预测有用的变量,可以很好地区分组间差异并寻找差异性化合物^[15]。为了进一步比较丹参药材皮部与木部样品化学成分,并寻找二者之间的差异化合物,在进行了无监督的聚类分析和主成分分析之后,进一步采用有监督正交偏最小二乘判别分析的对丹参皮部和木部样品进行分析。在建立的正交偏最小二乘判别分析模型中,累计解释能力参数 R^2_X 和 R^2_Y 分别为 0.621 和 0.842,预测能力参数 Q^2 为 0.759,提示所建立的模型稳定性及预测能力均较好。由正交偏最小二乘判别分析得分图可知(图 6),12 批丹参皮部样品和 12 批丹参木部样品可以很好地被分为 2 类,表明二者化学成分之间存在明显差异。进一步对 2 组数据的差异性进行整体分析,得到变量权重重要性排序(VIP)预测值,根据模型中各化学成分的 VIP 值来筛选差异

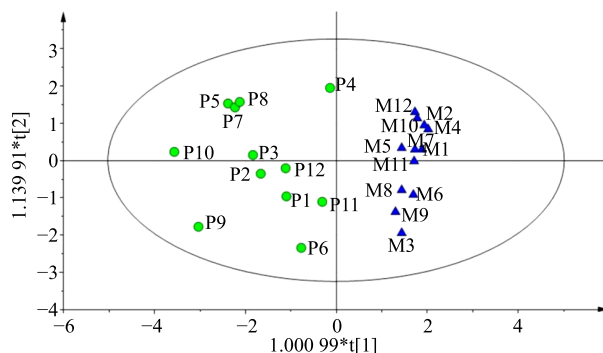


图 6 丹参皮部和木部正交偏最小二乘判别分析得分图

Fig. 6 Orthogonal partial least squares discriminant analysis scores plots of *S. miltiorrhiza* phloem and xylem samples

性化合物,在 0.95 的置信区间内,选取 $VIP > 1.0$ 的化合物作为差异性化合物。丹参酮 I、丹参酮 II_A、隐丹参酮和二氢丹参酮 I 的 VIP 值分别为 1.48、1.42、1.33 和 1.29,均大于 1。因此,由正交偏最小二乘判别分析结果可知,4 个丹参酮类成分(丹参酮 I、丹参酮 II_A、隐丹参酮和二氢丹参酮 I)为丹参药材皮部和木部的差异性化合物,可以作为二者区分和鉴别的指标性成分。

3 讨论

实验中为了优化最优的丹参药材皮部和木部样品提取条件,分别考察了不同提取溶剂(25%、50%、75%、100%甲醇)、不同提取时间(15、30、45、60 min)和提取物料比(1:50、1:100、1:150、1:200)对提取效率的影响。结果表明在 75% 甲醇作为提取溶剂,物料比 1:100,提取时间 30 min 的条件下,丹参皮部和木部样品中化学成分提取效率最高,因此选用该条件作为实验中的样品提取条件。

实验中采用二极管阵列检测器对丹参皮部样品进行全波长扫描,比较了不同波长下(254、280、320 nm)色谱图的峰数目与分离度。结果表明,在 280 nm 波长下样品中的峰数目较多且分离度良好,各成分均有较好的紫外吸收且基线平稳,因此将 280 nm 作为丹参皮部和木部指纹图谱及含量测定的检测波长。

本研究采用高效液相色谱法分析了 12 批丹参药材皮部样品和 12 批丹参药材木部样品,分别建立了丹参皮部和木部化学指纹图谱,结果表明丹参皮部和木部样品相似度评价结果均大于 0.90,所建立的丹参药材皮部和木部指纹图谱方法可用于丹

参药材皮部和木部化学成分的比较和质量评价。丹参皮部和木部指纹图谱共有峰一致,表明二者所含化学成分类型基本一致,但皮部和木部样品中共有峰峰面积相差较大,表明二者在一些成分的含量上存在较大差异。

在指纹图谱分析的基础上,进一步建立了丹参药材皮部和木部中 8 个指标性成分的含量测定方法,应用所建立的含量测定方法对 12 批丹参皮部和 12 批丹参木部样品进行了多指标含量测定。含量测定结果表明,丹酚酸类成分在皮部和木部分布较为均匀,含量差异不大;而丹参酮类成分,丹参皮部和木部的含量差异明显,皮部明显高于木部,提示丹参酮类成分主要分布在丹参药材的皮部中。为了进一步明确丹参皮部和木部化学成分差异,寻找差异化合物,采用聚类分析、主成分分析和正交偏最小二乘判别分析等化学计量学方法,对丹参皮部和木部样品进行了分析。结果表明,基于 8 种化学成分的含量测定结果,可以较好地 将丹参皮部和木部样品区分开来,4 个丹参酮类成分(二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II_A)为二者之间的差异性化合物,可以作为区分丹参皮部和木部的指标性成分。

本研究为了比较丹参药材不同部位(皮部和木部)化学成分差异,发现不同活性成分的分布规律,采用高效液相色谱法对丹参药材皮部和木部样品化学成分进行了全面分析与比较。首先,建立了丹参药材皮部和木部化学指纹图谱,通过对比指纹图谱发现,丹参皮部和木部样品所含化学成分类型相同,但量上存在明显差异。进一步,针对丹参皮部和木部样品中的丹酚酸类(丹参素、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B)和丹参酮类(二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A)成分进行了含量测定,并结合化学计量学方法对皮部和木部样品进行了分析与比较。结果表明,丹酚酸类成分在皮部和木部分布差异不明显,而丹参酮类成分在二者分布差异较明显,主要分布于丹参药材皮部中。通过以上研究,发现了丹参皮部和木部化学成分的差异,明确了丹参药材不同部位活性成分的分布规律,为

丹参药材资源的开发和利用提供了数据支撑。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] Cheng T O. Danshen: A popular Chinese cardiac herbal drug [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 47(7): 1498-1506.
- [3] Wang B Q. *Salvia miltiorrhiza*: Chemical and pharmacological review of a medicinal plant [J]. *J Med Plant Res*, 2010, 4(25): 2813-2820.
- [4] Su C Y, Qian L M, Khalid R, et al. *Salvia miltiorrhiza*: Traditional medical uses, chemistry, and pharmacology [J]. *Chin J Nat Med*, 2015, 13(3): 163-182.
- [5] 鄢 丹, 韩玉梅, 骆骄阳, 等. 板蓝根木皮比与药效及化学成分的相关性分析 [J]. *中药材*, 2011, 34(1): 43-46.
- [6] 宋 嫵, 赵志刚, 郜舒蕊. 不同产地栽培与野生丹参药材品质评价 [J]. *中成药*, 2014, 36(5): 1026-1029.
- [7] 赵志刚, 郜舒蕊, 侯俊玲, 等. 不同产地加工方法对山东丹参药材质量的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(8): 1396-1400.
- [8] 曾慧婷, 沙秀秀, 宿树兰, 等. 不同产地丹参茎叶 UPLC 指纹图谱与化学模式识别研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(4): 767-772.
- [9] 王小平, 白吉庆, 寇文龙, 等. 不同加工与贮藏方法对商洛产丹参药材品质的影响 [J]. *中草药*, 2013, 44(11): 1407-1411.
- [10] 庞汉青, 唐于平, 史旭芹, 等. 基于主成分分析和多指标综合指数法丹参不同有效部位的活血化瘀作用比较 [J]. *中草药*, 2016, 47(18): 3239-3247.
- [11] 付小梅, 孙 菡, 刘 婧, 等. 基于聚类分析和主成分分析的栀子指纹图谱研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(19): 4653-4661.
- [12] 苏静华, 张 超, 孙 磊, 等. 指纹图谱结合化学计量学用于香橼品种鉴别的可行性分析 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(12): 2318-2324.
- [13] 郭 龙, 焦 倩, 张 丹, 等. 基于指纹图谱和多组分含量测定的艾叶药材质量控制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(5): 977-984.
- [14] 吕 杨, 刘妍如, 唐志书, 等. 不同成熟度南五味子化学模式识别研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(9): 2147-2152.
- [15] 康 建, 周 霖, 孙 志, 等. 基于 UPLC 指纹图谱结合化学模式识别的冠心丹参胶囊质量控制研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(17): 4051-4057.