

丹参及丹参茎叶水提物 UPLC 指纹图谱研究与丹酚酸类成分定量分析*

曾慧婷, 沙秀秀, 朱邵晴, 宿树兰**, 朱振华, 郭盛, 严辉, 钱大玮, 段金廛**

(南京中医药大学 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心 中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心
国家中医药管理局中药资源循环利用重点实验室, 南京 210023)

摘要 目的: 建立并比较丹参、丹参茎叶水提物 UPLC 特征指纹图谱, 同时分析评价 7 种丹酚酸类成分(丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 和丹酚酸 A), 以期为丹参资源的综合利用提供科学依据。方法: 采用 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm); 流动相为乙腈(A)–0.1% 甲酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~1 min, 5%A; 1~3 min, 5%A → 10%A; 3~7 min, 10%A → 15%A; 7~11 min, 15%A → 21%A; 11~15 min, 21%A → 33%A; 15~17 min, 33%A → 70%A; 17~18 min, 70%A → 80%A; 18~20 min, 80%A; 20~21 min, 80%A → 5%A), 流速 0.4 mL · min⁻¹; 检测波长为 280 nm。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”建立对照图谱和进行相似度评价, SPSS 19.0 进行主成分分析和聚类分析。结果: 丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 和丹酚酸 A 线性范围分别为 1.145~229、0.81~162、0.95~190、1.265~253、1.285~257、1.055~211 和 0.87~174 μg · mL⁻¹, R² 为 0.999 8 以上; 平均回收率在 97.3%~103.5% 之间, RSD 均小于 3% (n=6)。结论: 主成分分析将丹参、丹参茎叶各聚为一类, 聚类分析和相似度评价表明丹参及其茎叶水提物指纹图谱具有一定相似性, 相似度最高可达 0.981, 共有化学成分主要为丹酚酸类成分。定量分析表明不同批次丹参、丹参茎叶中丹酚酸类成分含量存在一定差异, 但丹酚酸类成分的种类组成相一致。
关键词: 丹参; 血参; 紫丹参; 红根; 丹参茎叶; 指纹图谱; 丹酚酸类成分; 丹参素; 原儿茶醛; 咖啡酸; 迷迭香酸; 紫草酸; 丹酚酸 B; 丹酚酸 A; 定量分析

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2017)04-0602-08
doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.04.07

UPLC fingerprint of water extracts of Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae and stems and leaves of *Salvia miltiorrhiza* and determination of salvianolic acids*

ZENG Hui-ting, SHA Xiu-xiu, ZHU Shao-qing, SU Shu-lan**, ZHU Zhen-hua, GUO Sheng, YAN Hui, QIAN Da-wei, DUAN Jin-ao**

(Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, and Key Laboratory of Chinese Medicinal Resources Recycling Utilization, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

Abstract Objective: To establish an ultra-high performance liquid chromatography method to compare the characteristic fingerprint of Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae and stems and leaves of *Salvia miltiorrhiza*.

* 江苏省“333 高层次人次培养工程”资助项目(No. BRA2015391); 江苏省高校中药学优势学科 II 期建设项目(yssk-2014); 江苏高校中药资源产业化过程协同创新中心建设专项(2013 年度)

** 通信作者 宿树兰 Tel: (025) 85811917; E-mail: sushulan1974@163.com
段金廛 Tel: (025) 85811291; E-mail: dja@njucm.edu.cn

第一作者 Tel: 15895975782; E-mail: zenght1991@163.com

And to determine the contents of seven kinds of salvianolic acids (danshensu, protocatechuic aldehyde, caffeic acid, rosmarinic acid, lithospermic acid, salvianolic acid B and salvianolic acid A). To provide scientific basis for the comprehensive utilization of *Salvia miltiorrhiza* resource. **Methods:** The separation was performed on an ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) column with gradient elution of acetonitrile (A) and 0.1% formic acid (B) (0–1 min, 5%A; 1–3 min; 5%A → 10%A; 3–7 min, 10%A → 15%A; 7–11 min, 15%A → 21%A; 11–15 min, 21%A → 33%A; 15–17 min, 33%A → 70%A; 17–18 min, 70%A → 80%A; 18–20 min, 80%A; 20–21 min, 80%A → 5%A). The flow rate was 0.4 mL · min⁻¹ and the UV detection were at 280 nm. Similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of TCM was used for establishing the reference fingerprint and similarity evaluation, and the principal component analysis (PCA) and clustering analysis was carried out by SPSS 19.0. **Results:** The calibration curves of danshensu, protocatechuic aldehyde, caffeic acid, rosmarinic acid, lithospermic acid, salvianolic acid B and salvianolic acid A were all in good linearity over the ranges of 1.145–229, 0.81–162, 0.95–190, 1.265–253, 1.285–257, 1.055–211 and 0.87–174 μg · mL⁻¹, respectively, with correlation coefficients R^2 over 0.999 8. The average recoveries ranged from 97. 3% to 103.5%, with RSD ($n=6$) < 3.0%. **Conclusion:** It showed that PCA clustered Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae and stems and leaves of *Salvia miltiorrhiza* for one class by themselves. Cluster analysis and similarity evaluation indicated that in some way, fingerprint of water extracts of Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae and stems and leaves of *Salvia miltiorrhiza* were similar, with maximum similarity up to 0.981. Salvianolic acids were identified to be the common components. Results of assay showed that salvianolic acids in different batches of Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae and *Salvia* stems and leaves varied a lot in contents but kept consistent in compositions.

Keywords: Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae; Xueshen; Zidanshen; Honggen; stems and leaves of *Salvia miltiorrhiza*; fingerprint; salvianolic acids; danshensu; protocatechuic aldehyde; caffeic acid; rosmarinic acid; lithospermic acid; salvianolic acid B; salvianolic acid A; quantitative analysis

中药丹参为唇形科鼠尾草属植物丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bge.) 的干燥根及根茎, 又称为血参、紫丹参、红根等, 始载于《神农本草经》, 列为上品药材, 具有活血祛瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痈之功效, 临床用于治疗月经不调、经闭痛经、胸腹刺痛、热痹疼痛、疮疡肿痛、心烦不眠、肝脾肿大、心绞痛等症^[1]。随着社会需求量的增大, 在丹参药材采收加工过程中, 约占全株量 67% 的地上部分尚未被有效利用而丢弃, 造成资源浪费和环境污染^[2]。丹参叶早在清代《医方守约》中就有药用记载: 丹参叶捣烂, 合酒糟敷乳, 肿初起立消。现代国内外研究发现, 丹参茎叶具有与根和根茎相似的临床疗效及药理活性, 近年来研究报道丹参茎叶具有抗氧化、活血化瘀、抗病毒、抗肿瘤、抗动脉粥样硬化、改善糖尿病糖代谢等多种生物活性^[3-6], 同时也有丹参叶外用治疗扁平疣的报道^[7]。目前, 丹参茎叶已被收录于《陕西省中药材标准》。

丹参与丹参茎叶属丹参植物的不同部位, 迄今,

关于丹参及其制剂指纹图谱的研究较多^[8-9], 而尚未见丹参非药用部位茎叶指纹图谱的文献报道。近年来研究发现丹参茎叶富含酚酸类、黄酮类、三萜类、糖类等资源性化学成分^[10-13], 几乎不含丹参酮类脂溶性成分, 而水提物中主要为丹参酚酸类成分。本研究在建立丹参、丹参茎叶水提物 UPLC 指纹图谱方法的基础上, 分析了 13 批丹参和 13 批丹参茎叶水提物指纹图谱异同, 指认了丹参、丹参茎叶水提物中共有成分并对其进行定量分析, 为丹参、丹参茎叶质量控制及丹参茎叶新资源的开发利用提供科学依据和参考^[14]。

1 仪器与试剂

Waters 公司 ACQUITY UPLC 系统 (二元高压泵, 自动进样器, 柱温箱, 二极管阵列检测器); Waters 公司 SynaptTM Q-TOF 质谱仪 (Lock-spray 接口, 电喷雾离子源); Waters 公司 MassLynxTM 质谱工作站; Waters 公司 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm; 填料: 十八烷基硅烷键合硅胶); 天津市泰斯特仪器有限公司 FW80 高速万能粉碎机; 上海精宏

实验设备有限公司 DHG-9023A 型电热恒温鼓风干燥箱;塞多利斯公司 Sartorius BT125D 电子分析天平;南京易普易达科技发展有限公司 EPED 超纯水系统;Millipore 公司 Milli-Q 超纯水制备仪;昆山禾创超声仪器有限公司 KQ-250E 型超声波清洗器;上海安亭科学仪器厂 AnkeGL-16 GII 型离心机;巩义市予华仪器有限责任公司 HH-ZK4 水浴锅。

对照品原儿茶醛(批号 110810-201007)、咖啡酸(批号 110885-200102)、迷迭香酸(批号 111871-201203)均购自中国食品药品检定研究院;丹参素(批号 MUST-13030108)、紫草酸(批号 MUST-

15022407)、丹酚酸 B(批号 MUST-13030203)、丹酚酸 A(批号 MUST-13030701)均购自北京普天同创生物科技有限公司,纯度均大于 98%。甲醇为分析纯,乙腈及甲酸均为色谱纯,超纯水由 Milli-Q 纯水机制备。

26 批不同批次丹参及茎叶样品,其详细信息见表 1。经南京中医药大学段金廛教授鉴定丹参为唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎;丹参茎叶样品为 6~9 月期间植株生长旺盛时丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的地上茎叶。所得样品分别于热风烘干(50℃)条件下进行,干燥至恒定质量后粉碎成粗粉,常温密封干燥保存备用。

表 1 26 批不同产地丹参(G)和丹参茎叶(Y)

Tab. 1 26 batches of samples from different habitats

样品号 (sample No.)	产地/品种 (origin/variety)	收集时间 (collection time)	样品号 (sample No.)	产地/品种 (origin/variety)	采收时间 (harvest time)
G1	山西药材(Shanxi, crude drugs)	2014-11	Y1	山西稷田(Jitian, Shanxi)	2015-07
G2	陕西药材(Shaanxi, crude drugs)	2014-10	Y2	山西绛县(Jiangxian, Shanxi)	2015-09
G3	安徽饮片(Anhui, decoction pieces)	2015-01	Y3	山西绛县(Jiangxian, Shanxi)	2015-07
G4	河南饮片(Henan, decoction pieces)	2015-01	Y4	陕西商洛(Shangluo, Shaanxi)	2015-07
G5	江苏药材(Jiangsu, crude drugs)	2014-06	Y5	河南桐柏(Tongbo, Henan)	2015-07
G6	江苏药材(Jiangsu, crude drugs)	2016-08	Y6	河南洛阳(Luoyang, Henan)	2015-07
G7	河北饮片(Hebei, decoction pieces)	2014-06	Y7	江苏南京(Nanjing, Jiangsu)	2015-06
G8	山东饮片(Shandong, decoction pieces)	2015-07	Y8	江苏南京(Nanjing, Jiangsu)	2016-08
G9	山东药材(Shandong, crude drugs)	2014-11	Y9	山东济南华丹一号(Jinan, Shandong, Huadan No.1)	2015-07
G10	山东饮片(Shandong, decoction pieces)	2014-12	Y10	山东济南华丹一号(变型)(Jinan, Shandong, Huadan No. 1, variant)	2015-07
G11	山东饮片(Shandong, decoction pieces)	2015-01	Y11	山东济南(Jinan, Shandong)	2015-07
G12	山东饮片(Shandong, decoction pieces)	2014-12	Y12	山东济南(Jinan, Shandong)	2015-07
G13	山东饮片(Shandong, decoction pieces)	2015-07	Y13	山东济南(Jinan, Shandong)	2015-08

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm); 柱温: 35℃; 流动相: 乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~1 min, 5%A; 1~3 min, 5%A → 10%A; 3~7 min, 10%A → 15%A; 7~11 min, 15%A → 21%A; 11~15 min, 21%A → 33%A; 15~17 min, 33%A → 70%A; 17~18 min, 70%A → 80%A; 18~20 min, 80%A; 20~21 min, 80%A → 5%A); 流速: 0.4 mL · min⁻¹; 检测波长为 280 nm; 进样量: 2 μL。

2.2 对照品溶液制备

分别精密称取丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸B、丹酚酸A的对照品适

量,用甲醇配成质量浓度分别为0.229、0.162、0.190、0.253、0.190、0.257、0.174 mg · mL⁻¹的混合溶液,即得。

2.3 供试品溶液制备

取样品粉末(过40目筛)1g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入超纯水50mL,静置过夜,热回流1h后补足减失的量,13000 r · min⁻¹离心10min。取上清液适量,0.45 μm的微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取Y1号样品,按照“2.3”项下方法制备供试品溶液,连续进样6次,记录色谱图;以丹酚酸B峰为参照峰,计算各共有峰的相对保留

时间和相对峰面积,其 RSD 均小于 3.0%,表明仪器精密度良好,符合特征图谱要求。

2.4.2 重复性试验 取 Y1 号样品 6 份,分别按照“2.3”项下方法制备供试品溶液,进样测定;以丹酚酸 B 峰为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,其 RSD 均小于 3.0%,表明方法重复性良好,符合特征图谱要求。

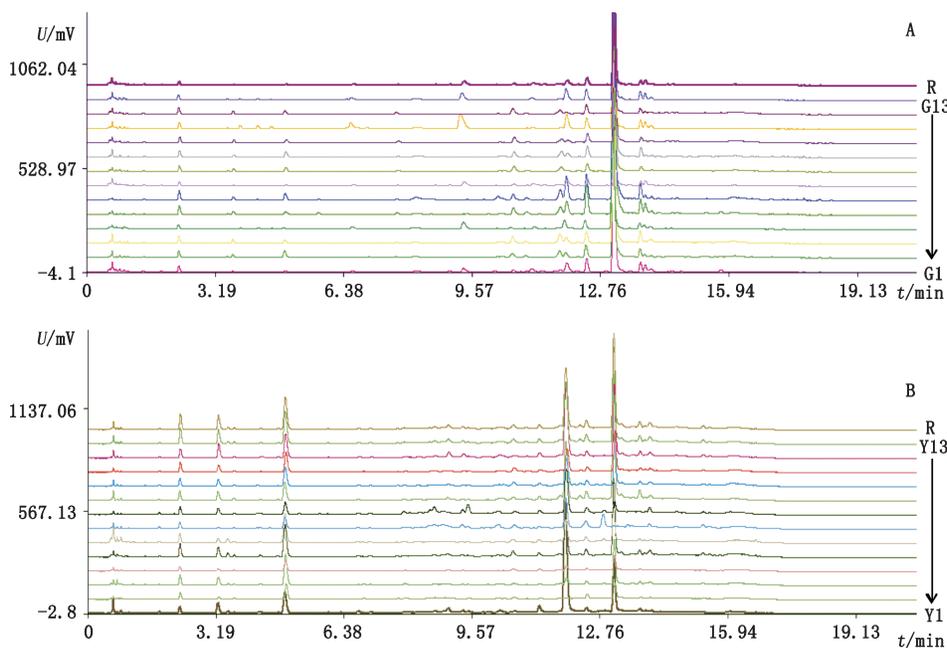
2.4.3 稳定性试验 取 Y1 号样品,按照“2.3”项下方法制备供试品溶液,分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样,记录色谱图;以丹酚酸 B 峰为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,其 RSD 均小于 3.0%,结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5 指纹图谱建立及相似度分析

2.5.1 丹参 UPLC 指纹图谱共有模式的建立 取不同批次(G1~G13)的丹参粉末,精密称定,分别按供试品溶液制备及检测方法进行检测,记录 21 min 的 UPLC 图,以 CDF 格式导入《中药色谱指纹图谱相似

度评价系统》(国家药典委员会 2004A 版),G9 号样品的图谱为参照谱,设定时间窗宽度为 0.1,采用中位数法自动匹配生成丹参指纹图谱共有模式(即对照图谱),丹参叠加图谱及对照图谱见图 1-A。将该对照图谱的相似度值定为 1,计算 G1~G13 号样品特征图谱的相似度分别为 0.996、0.998、0.998、0.995、0.995、0.995、0.992、0.984、0.999、0.964、0.985、0.977、0.994。13 批丹参指纹图谱与对照图谱相似度均大于 0.964,表明相似度良好。

2.5.2 丹参茎叶 UPLC 指纹图谱共有模式的建立 同“2.5.1”项下方法,以 Y9 号样品图谱为参照谱建立丹参茎叶特征指纹图谱及对照图谱,如图 1-B,计算 Y1~Y13 号样品图谱与对照图谱相似度分别为 0.843、0.805、0.909、0.852、0.976、0.916、0.746、0.803、0.917、0.976、0.979、0.961、0.971,其中 Y7、Y8 样品产地为江苏南京,相对其他批次样品,相似度较低。



A. 丹参 (Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae) B. 丹参茎叶 (Salvia stems and leaves) R. 对照 (reference fingerprint)

图 1 丹参、丹参茎叶水提取物 UPLC 指纹图谱及对照图谱

Fig. 1 UPLC fingerprints of water extracts of Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae, stems and leaves of Salvia miltiorrhiza, and the reference fingerprint

2.5.3 丹参、丹参茎叶指纹图谱比较 将所得 26 批样品(13 批丹参和 13 批丹参茎叶)UPLC 指纹图谱依次导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版》软件进行数据分析处理,以 G9 号样品图谱为参照谱,计算 13 批丹参和 13 批丹参茎叶图谱相似度,结果

见表 2,除 Y7、Y8 号样品图谱外,丹参和丹参茎叶水提取物指纹图谱相似度为 0.543~0.981。在 2~15 min 内,丹参茎叶特有峰数量多于丹参,说明丹参茎叶水提取物中化学成分相对丹参水提取物组成种类较为多样化,是丹参茎叶指纹图谱与丹参指纹图谱的差异所在。

表 2 丹参、丹参茎叶水提物 UPLC 特征图谱相似度分析结果

Tab. 2 Similarity of 26 batches of samples

样品号 (sample No.)	相似度 (similarity)	样品号 (sample No.)	相似度 (similarity)
G1	0.971	Y1	0.543
G2	0.979	Y2	0.773
G3	0.973	Y3	0.822
G4	0.972	Y4	0.782
G5	0.977	Y5	0.854
G6	0.981	Y6	0.778
G7	0.975	Y7	0.351
G8	0.971	Y8	0.423
G9	0.976	Y9	0.943
G10	0.961	Y10	0.822
G11	0.961	Y11	0.830
G12	0.977	Y12	0.742
G13	0.968	Y13	0.868

2.5.4 共有指纹峰的标定 将丹参和丹参茎叶水提物指纹图谱峰锁定在 2~15 min 共有指纹区进行统计,经与对照品比对和 UPLC/Q-TOF-MS 鉴定^[15],确定了其中 7 个共有峰,分别为丹参素(1 号峰)、原儿茶醛(2 号峰)、咖啡酸(3 号峰)、迷迭香酸(4 号峰)、紫草酸(5 号峰)、丹酚酸 B(6 号峰)和丹酚酸 A(7 号峰),见图 2。

2.6 定量分析方法与结果

2.6.1 系统适应性试验 按“2.1”项下色谱条件进行检测,7 种丹酚酸类成分(丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 和丹酚酸 A)分离度均大于 1.5,

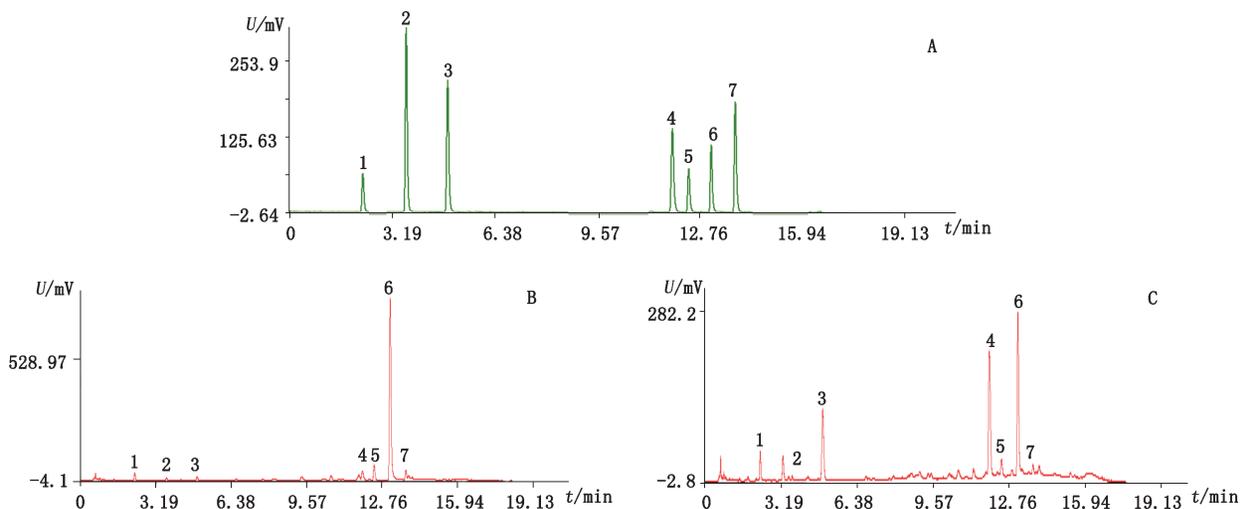
理论塔板数以丹酚酸 B 计大于 5 000,对照品溶液色谱图及丹参、丹参茎叶水提物指纹图谱对照谱见图 2。

2.6.2 线性关系 取“2.2”项下对照品溶液依次稀释到不同质量浓度,分别进样 2 μL,测定峰面积,以对照品进样浓度(μg·mL⁻¹)为横坐标 X,峰面积为纵坐标 Y 绘制标准曲线,得 7 个丹酚酸类成分的回归方程及线性范围,见表 3。

2.6.3 精密度的试验 取 Y1 号样品的供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积,得丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 和丹酚酸 A 峰面积的 RSD 分别为 2.0%、2.1%、1.9%、1.1%、2.9%、1.2%、2.4%,表明仪器精密度的良好。

2.6.4 重复性的试验 取 Y1 号样品 6 份,按照“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定各共有峰峰面积,丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 和丹酚酸 A 平均含量分别为 2.979、0.068、3.102、33.707、1.482、17.692、0.433 mg·g⁻¹,RSD 分别为 2.9%、2.7%、1.7%、1.2%、2.8%、2.3%、1.9%,表明该方法重复性良好。

2.6.5 稳定性的试验 取 Y1 号样品的供试品溶液,分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定峰面积,丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 和丹酚酸 A 峰面积的 RSD 分别为 1.9%、2.1%、2.9%、1.1%、2.2%、2.8%、1.9%,表明供试品溶液稳定性良好。



1. 丹参素(danshensu) 2. 原儿茶醛(protocatechuic aldehyde) 3. 咖啡酸(caffeic acid) 4. 迷迭香酸(rosmarinic acid) 5. 紫草酸(lithospermic acid) 6. 丹酚酸 B(salvianolic acid B) 7. 丹酚酸 A(salvianolic acid A)

图 2 对照品色谱图(A)及丹参(B)、丹参茎叶(C)指纹图谱对照谱

Fig. 2 UPLC chromatograms of the reference solution(A) and the reference fingerprints of Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae(B) and stems and leaves of saliva miltiorrhiza(C)

表 3 7 个丹酚酸类成分的回归方程、相关系数和线性范围

Tab. 3 The regression equations, coefficient correlations and linear ranges of 7 phenolic acids

成分 (component)	回归方程 (regression equation)	R^2	线性范围 (linear range)/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
丹参素 (danshensu)	$Y=2\ 115.4X-868.17$	0.999 8	1.145~229
原儿茶醛 (protocatechuic aldehyde)	$Y=14\ 129X+379.77$	1.000 0	0.81~162
咖啡酸 (caffeic acid)	$Y=9\ 660.1X-7\ 373$	1.000 0	0.95~190
迷迭香酸 (rosmarinic acid)	$Y=5\ 210.8X+1\ 380.9$	1.000 0	1.265~253
紫草酸 (lithospermic acid)	$Y=3\ 085.2X-450.18$	1.000 0	1.285~257
丹酚酸 B (salvinolic acid B)	$Y=3\ 360.7X+5\ 402.1$	1.000 0	1.055~211
丹酚酸 A (Salvinolic acid A)	$Y=8\ 561.9X-1\ 029.4$	1.000 0	0.87~174

2.6.6 回收率试验 精密称定已知含量的 Y1 号样品粉末 0.5 g, 6 份, 分别精密加入丹参素对照品溶液 ($2.963\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 0.5 mL、原儿茶醛对照品溶液 ($0.3\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 0.1 mL、咖啡酸对照品溶液 ($1.565\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 1 mL、迷迭香酸对照品溶液 ($2.73\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 5 mL、紫草酸对照品溶液 ($1.402\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 0.5 mL、丹酚酸 B 对照品溶液 ($1.5\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 5 mL 和丹酚酸 A 对照品溶液 ($0.278\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 0.5 mL, 按照“2.3”项下方法制备供试溶液, 在“2.1”项色谱条件下进行测定, 计算丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 和丹酚酸 A 的平均回收率分别为 102.2%、100.4%、99.1%、100.2%、101.5%、97.3%、103.5%, RSD 分别为 2.2%、2.9%、1.6%、3.0%、2.8%、1.9% 和 2.3%。表明该方法回收率良好。

2.6.7 样品测定 精密称取 13 批丹参和 13 批丹参茎叶粉末, 分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项下色谱条件下测定, 根据回归方程计算各化合物含量, 结果见表 4。

2.7 主成分分析和聚类分析

2.7.1 主成分分析 为了更加合理地评价丹参、丹参茎叶水提取物特征指纹图谱异同, 以丹参、丹参茎叶指纹图谱中标定的共有化学成分含量为变量, 导入 SPSS 19.0 数据统计软件进行主成分分析, 分别提取出所对应特征值大于 1 的 2 个主成分 PC1 和 PC2, 其累计贡献率可达到 80.694%, 包含了大部分信息: 第 1 主成分特征值为 3.799, 方差贡献率为 54.276%; 第 2 主成分特征值为 1.849, 方差贡献率为 26.418%。分别以第 1、2 主成分建立坐标系, 进行投影, 得到 26 批样品的 PCA 得分图, 见图 3。在 13 批丹参中, G1、G2、G5、G6 和 G9 号样品为丹参药材, G3、G4、G7、G8、G10~G13 号样品为丹参饮片, 通过丹参、丹参茎

叶 PCA 图可知, G1、G2 和 G9 号丹参药材样品与丹参饮片样品聚为一类, 而产地为江苏的丹参药材样品 G5 和 G6 单独聚为一类。总体上主成分 1 将丹参和丹参茎叶分别聚为两类, 符合丹参和丹参茎叶具有各自特征图谱的特点。

2.7.2 聚类分析 分别以丹参、丹参茎叶指纹图谱中标定的共有化学成分含量为变量, 采用 SPSS 19.0 数据统计软件, 采用欧氏距离进行聚类分析, 结果见图 4。以所测 26 批样品 (丹参 13 批, 丹参茎叶 13 批) 指纹图谱中标定的共有化学成分含量为变量, 运用 SPSS 19.0 数据统计软件进行系统聚类分析, 采用组间连接法, 利用欧氏距离 (Euclidean distance) 作为样品的测度, 聚类分析结果见图 4。根据丹参、丹参茎叶水提取物 UPLC 特征指纹图谱聚类分析结果可知, 26 批丹参样品分为两类, G1~G6、G9、G11 和 G13 聚为一类, G7、G8、G10、G12 和 Y1~Y13 聚为一类, 说明 13 批丹参与 13 批丹参茎叶水提取物指纹图谱在一定程度上具有相似性, 这一结果与相似度分析结果相一致。

3 讨论

3.1 丹参、丹参茎叶水提取物指纹图谱相似度评价

本文通过比较丹参与丹参茎叶水提取物的指纹图谱相似性, 主成分分析法进一步根据专属性及存在的差异而有效地区分这两者, 相似度分析与聚类分析结果表明丹参和丹参茎叶水提取物在一定程度上存在相似性, 相似度最高可达 0.981。在 13 批丹参水提取物指纹图谱中, 除产地为江苏的 G5、G6 号丹参药材样品外, 丹参药材和丹参饮片样品指纹图谱并无统计学差异。在 13 批丹参茎叶水提取物指纹图谱中, 产地为江苏南京的 Y7、Y8 号丹参茎叶样品相对其他批次相似度低, 观察其图谱可知, 在 5、7 号峰后各多出 1 个峰, 且各共有峰峰面积均较低, 其中代表性成分丹酚

表 4 26 批样品中 7 个酚酸类成分的含量

Tab. 4 Content of 7 phenolic acids in 26 batches of samples

样品 (sample)	样品号 (sample No.)	含量 (content) / (mg · g ⁻¹)							总酚酸 (total phenolic acid)
		丹参素 (danshensu)	原儿茶醛 (protocatechuic aldehyde)	咖啡酸 (caffeic acid)	迷迭香酸 (rosmarinic acid)	紫草酸 (lithospermic acid)	丹酚酸 B (salvinolic acid B)	丹酚酸 A (Salvianolic acid A)	
丹参 (Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae)	G1	2.277	0.035	0.154	2.347	4.321	64.240	0.931	74.305
	G2	2.325	0.180	0.845	0.880	4.470	53.541	0.873	63.113
	G3	2.581	0.221	0.416	0.980	4.081	70.910	1.282	80.472
	G4	1.734	0.000	0.093	1.710	2.953	49.002	0.488	55.980
	G5	3.579	0.197	0.425	2.740	10.575	88.876	1.456	107.849
	G6	3.772	0.210	0.837	5.191	8.898	97.040	1.649	117.597
	G7	1.577	0.034	0.138	1.180	2.756	32.591	0.458	38.734
	G8	2.111	0.197	0.495	1.050	2.644	27.467	0.484	34.447
	G9	2.464	0.162	0.708	0.591	3.663	57.255	1.013	65.856
	G10	2.306	0.174	0.424	0.334	3.015	27.720	0.465	34.438
	G11	2.319	0.178	0.000	3.395	3.838	69.485	0.869	80.085
	G12	2.525	0.190	0.462	0.334	3.209	28.387	0.474	35.581
	G13	1.897	0.055	0.057	2.638	3.627	65.763	0.888	74.925
丹参茎叶 (stems and leaves of <i>salvia miltiorrhiza</i>)	Y1	2.963	0.060	3.130	27.316	1.402	15.000	0.278	50.149
	Y2	2.623	0.084	1.982	0.197	1.608	5.572	0.077	12.142
	Y3	3.835	0.055	4.184	1.672	1.199	14.029	0.244	25.217
	Y4	1.607	0.053	1.283	1.165	0.641	5.106	0.083	9.939
	Y5	5.679	0.107	4.724	10.244	2.108	26.967	0.505	50.335
	Y6	3.258	0.067	3.927	4.832	1.485	11.955	0.184	25.707
	Y7	2.722	0.052	1.612	8.103	2.837	0.107	0.386	15.819
	Y8	3.125	0.078	1.891	11.974	1.918	3.626	0.254	22.865
	Y9	3.491	0.112	2.358	12.886	2.318	39.970	0.841	61.976
	Y10	3.764	0.081	2.869	11.410	2.036	22.943	0.463	43.567
	Y11	4.012	0.071	3.245	5.498	1.585	14.573	0.261	29.244
	Y12	3.796	0.092	3.823	19.853	1.753	25.560	0.481	55.359
	Y13	5.735	0.073	4.768	14.148	2.265	29.855	0.579	57.424

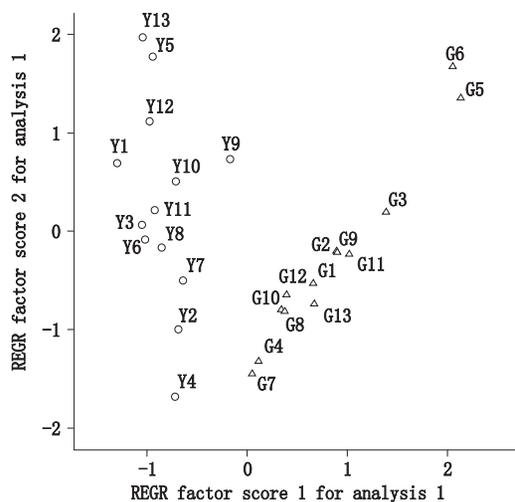


图 3 丹参、丹参茎叶 PCA 图

Fig. 3 PCA diagram of 26 batches of samples

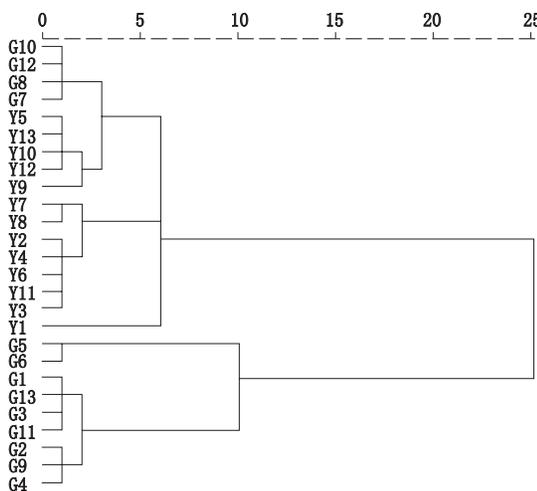


图 4 丹参、丹参茎叶聚类树状图

Fig. 4 Dendrogram of 26 batches of samples

酸 B 峰面积小,可能为引起差异的主要原因。此外,丹参茎叶水提物中含有种类更为丰富的化学成分,其资源价值值得进一步深入挖掘。

3.2 定量分析

本研究在同一色谱条件下,建立并比较了丹参、丹参茎叶水提物 UPLC 特征指纹图谱,同时确定了两者共有化学成分,分别为丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 和丹酚酸 A,定性分析结果进一步证实了丹参与丹参茎叶水提物在化学成分种类上的相似性。同时,通过分析并比较丹参和丹参茎叶(各 13 批)中 7 种丹酚酸及总酚酸含量,得出不同产地、不同批次的丹参及丹参茎叶中丹酚酸总量差异均较大,可能由于地域环境、水土气候等因素的影响,结合相似度分析、主成分分析和聚类分析,可为丹参及丹参茎叶质量评价和合理应用提供参考依据。由定量分析结果可知,总体上丹参茎叶中酚酸类成分种类组成与丹参相一致,但在含量上存在一定差异。丹参素、咖啡酸及迷迭香酸在丹参茎叶中含量高于丹参,而丹酚酸 B 和紫草酸在丹参中含量较高。因此,丹参茎叶可作为获得丹酚酸类成分的新资源进行开发利用,为丹参茎叶的资源化利用提供了支撑,同时为提高丹参资源的利用效率以及促进丹参资源产业链的延伸提供了科学依据和借鉴。

参考文献

- [1] SU CY, QIAN LM, KHALID R, *et al.* *Salvia miltiorrhiza*: Traditional medical uses, chemistry, and pharmacology [J]. *Chin J Nat Med*, 2015, 13(3): 163
- [2] 段金廛. 中药资源化学—理论基础与资源循环利用[M]. 北京: 科学出版社, 2015
DUAN JA. Resources Chemistry of Chinese Medicinal Materials: Theoretical Basis and Resource Recycling Utilization [M]. Beijing: Science Press, 2015
- [3] ZHANG Y, LI X, WANG ZZ. Antioxidant activities of leaf extract of *Salvia miltiorrhiza* Bunge and related phenolic constituents [J]. *Food Chem Toxic*, 2010, 48(10): 2656
- [4] 李大伟, 蔡洪信, 张玲, 等. 白花丹参叶水提物对糖尿病大鼠糖化血红蛋白的影响 [J]. *中成药*, 2008, 30(5): 764
LI DW, CAI HX, ZHANG L, *et al.* Effect of aqueous extract of *Salvia miltiorrhiza* leaves on glycosylated hemoglobin in diabetic rats [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2008, 30(5): 764
- [5] ZHANG Q, CHANG Z, YANG J, *et al.* Antiatherogenic property of triterpenoids-enriched extract from the aerial parts of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Phytother Res*, 2008, 22(8): 1040
- [6] LENG J, CHEN MH, ZHOU ZH, *et al.* Triterpenoids-enriched extract from the aerial parts of *Salvia miltiorrhiza* regulates macrophage polarization and ameliorates insulin resistance in high-fat fed mice [J]. *Phytother Res*, 2017, 31(1): 100
- [7] 钟晓凤. 丹参和白花丹参叶的化学成分药理研究及临床应用 [J]. *中医临床研究*, 2014(3): 135
ZHONG XF. Pharmacological study on chemical composition and clinical application of *Salvia miltiorrhiza* and *Salvia miltiorrhiza* Bge. f. *alba* leaf [J]. *Clin J Chin Med*, 2014, 6(3): 135
- [8] 陈瑞雪, 焦玉娇, 朱彦, 等. 基于 UPLC-DAD/ESI-Q-TOF MS 技术的丹红注射液指纹图谱的构建 [J]. *药物分析杂志*, 2016, 36(3): 457
CHEN RX, JIAO YJ, ZHU Y, *et al.* Establishment of chromatographic fingerprint of Danhong injection by UPLC-DAD/ESI-Q-TOF MS [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2016, 36(3): 457
- [9] ZHANG DL, DUAN XJ, DENG SH, *et al.* Fingerprint analysis, multi-component quantitation, and antioxidant activity for the quality evaluation of *Salvia miltiorrhiza* var. *alba* by high-performance liquid chromatography and chemometrics [J]. *J Sep Sci*, 2015, 38(19): 3337
- [10] 史国玉, 郭庆梅, 周凤琴. 丹参叶的化学成分研究 [J]. *山西大学学报*, 2015, 38(4): 692
SHI GY, GUO QM, ZHOU FQ. Study on chemical constituents of leaves of *Salvia miltiorrhiza* Bge. [J]. *J Shanxi Univ*, 2015, 38(4): 692
- [11] 沙秀秀, 宿树兰, 沈飞, 等. 不同生长期丹参茎叶及花序中丹酚酸类化学成分分布与积累动态分析评价 [J]. *中草药*, 2015, 46(22): 3414
SHA XX, SU SL, SHEN F, *et al.* Distribution of salvianolic acids in aerial parts of *Salvia miltiorrhiza* during different growing periods and accumulation dynamic analysis [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2015, 46(22): 3414
- [12] 郑云枫, 葛婷, 夏彦铭, 等. 生长期丹参不同部位中水苏糖含量的动态变化 [J]. *南京中医药大学学报*, 2014, 30(6): 573
ZHENG YF, GE T, XIA YM, *et al.* Study on dynamic change of stachyose of *Salvia miltiorrhiza* at different parts in growing period [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med*, 2014, 30(6): 573
- [13] 蒋海强, 于鹏飞, 刘玉红. 野生丹参地上部分化学成分提取分离与鉴定 [J]. *山东中医药大学学报*, 2013, 37(2): 166
JIANG HQ, YU PF, LIU YH. Isolation and identification of chemical constituents from the aerial part of wild *Salvia miltiorrhiza* [J]. *J Shandong Univ Tradit Chin Med*, 2013, 37(2): 166
- [14] 沙秀秀, 戴新新, 宿树兰, 等. 丹参茎叶药材的质量标准研究 [J]. *药物分析杂志*, 2016, 36(6): 1106
SHA XX, DAI XX, SU SL, *et al.* Quality standard for stems and leaves of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2016, 36(6): 1106
- [15] 赵洪芝, 王静, 姜民, 等. 丹参总酚酸提取物 UPLC 指纹图谱及成分定性研究 [J]. *药物分析杂志*, 2012, 32(4): 620
ZHAO HZ, WANG J, JIANG M, *et al.* UPLC fingerprint and qualitative analysis study on *Salvia* total phenolic acids [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2012, 32(4): 620

(本文于 2016 年 7 月 3 日收到)