



# 桃红四物汤醇提液的薄层分离与定性鉴别

宋天宝<sup>1,2</sup> 尤斯涵<sup>1</sup> 董明纲<sup>1</sup> 郭春燕<sup>1</sup>

1. 河北北方学院, 张家口, 075000, 中国

2. 天津中医药大学, 天津, 301617, 中国

**【摘要】** 目的: 桃红四物汤醇提液的薄层分离与定性鉴别。方法: 采用薄层色谱法, 选用硅胶 G 薄层板, 以正丁醇-冰乙酸-水(4:1.5:5, 上层)为展开剂, 置紫外灯(365 nm)下检视, 观察桃红四物汤醇提液中化学成分的展开情况, 再选用碘蒸气对各斑点进行显色, 并将薄层板置于薄层扫描仪进行扫描, 记录各斑点的吸收光谱图与比移值, 与对照品进行观察对比。结果: 桃红四物汤醇提液共分离得到 5 个斑点, 其中定性鉴别出 3 个斑点, 分别为来自红花的羟基红花黄色素 A、来自白芍的芍药苷、来自当归和川芎的阿魏酸; 其它 2 个斑点在组成桃红四物汤的六个单味药中均未检出。结论: 薄层色谱法能实现对桃红四物汤醇提液中化学成分的分, 可在此基础上进一步进行新成分的确定, 分离方法简单快速、稳定可行。

**【关键词】** 薄层色谱; 桃红四物汤; 分离; 鉴别

**【中图分类号】** R284.2

**【文献标识码】** A

**DOI:** 10.3969/j.issn.2095-1396.2021.05.004

## Thin-layer Separation and Qualitative Identification of the Alcohol Extract of Taohong Siwu Decoction

SONG Tian-bao<sup>1,2</sup>, YOU Si-han<sup>1</sup>, DONG Ming-gang<sup>1</sup>, GUO Chun-yan<sup>1</sup>

1 Hebei North University, Zhangjiakou, 075000, China

2 Tianjin University of Chinese Medicine, Tianjin, 301617, China

**【ABSTRACT】 Objective:** Thin layer separation and qualitative identification of alcohol extract of Taohong Siwu decoction. **Methods:** Thin layer chromatography (TLC) was used to observe the development of chemical components in the alcohol extract of Taohong Siwu decoction, and iodine vapor was used to perform color rendering on the spots, and the thin layer plate was placed in a thin-layer scanner for scanning. The absorption spectra and retardation factor (Rf) values of the spots were recorded and compared with the reference substances. The silica gel G thin laminate was used as the stationary phase, and n-butanol-acetic acid-water (4:1.5:5, upper layer) was used as the developing agent, and examined under UV lamp (365 nm). **Results:** A total of 5 spots were isolated from the alcohol extract of Taohong Siwu decoction, among which 3 spots were qualitatively identified as hydroxyl safflower yellow A (from Carthami Flos), paeoniflorin (from Paeoniae Radix Alba), and ferulic acid (from Angelicae Sinensis Radix and ChuanXiong Rhizoma). The other 2 spots were not detected in the six single drugs of Taohong Siwu decoction. **Conclusion:** TLC can be used to separate the chemical constituents from the alcohol extract

基金项目: 河北省中医药管理局科研计划项目 (No.2017102)

作者简介: 宋天宝, 天津中医药大学研究生在读; 研究方向: 中药资源; E-mail: 1842554018@qq.com

通讯作者: 郭春燕, 教授, 硕士生导师; 研究方向: 体内药物分析和靶向药物分析; E-mail: guochy0311@163.com

of Taohong Siwu decoction, and on this basis, new constituents can be further identified. The separation method is simple, rapid, stable, and feasible.

【KEY WORDS】 thin layer chromatography; taohong siwu decoction; separation; identification

桃红四物汤亦称加味四物汤,由桃仁、红花、当归、生地、白芍和川芎六味药组成。来源于《医宗金鉴·妇科心法要诀》(卷四十四),为调经药方之一,功效为调经止痛、活血化瘀、养血补血<sup>[1-2]</sup>,主治血虚兼血瘀症,是药性比较平和安全有效的活血祛瘀名方<sup>[3]</sup>。现代研究表明,桃红四物汤具有扩张血管、抗炎、抗疲劳、抗休克、抗过敏、降脂、调节免疫功能、补充微量元素等作用。桃红四物汤中含有多种有机成分,如:芳香酸、生物碱、多糖、黄酮、挥发油、单萜类糖苷、芳香族甙等,还含有氨基酸、维生素等人类必需的营养成分,以及无机成分铁、锌、铜、钴等元素<sup>[4]</sup>。目前,中药成分分析和质量控制方法有高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)、色谱-质谱联用、薄层色谱法(thin layer chromatography, TLC)等。TLC与HPLC和色谱-质谱联用相比较,具有样品预处理简单,仪器设备成本、耗材成本低廉;操作简便、直观性强、适用性广<sup>[5-6]</sup>等特点。TLC可以几十个样品同时在一个薄层板上进行分离分析。通过紫外灯照射、显色、薄层扫描等方法鉴别含有特定官能团的物质<sup>[7]</sup>,与对照品结果比较,结合薄层扫描得到的光谱图和比移值,可以进行定性分析,在基层快检和中药分析中具有重要意义<sup>[8]</sup>。本研究采用薄层色谱法对桃红四物汤醇提液中的化学成分进行分离鉴别。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 药品

阿魏酸、羟基红花黄色素 A、芍药苷对照品,购自中检所,纯度 >98%。

#### 1.1.2 药材

桃仁,批号:20130321,河北;红花,批号:20140101,新疆;川芎,批号:20140401,四川;当归,批号:20130801,甘肃;生地,批号:20141203,山西;白芍,批号:20130401,安徽。

#### 1.1.3 试剂

试剂乙醇(分析纯)、甲醇(分析纯),均购自天津市北方化玻购销中心;试剂正丁醇(分析纯),购自天津市风船化学试剂有限公司;试剂冰乙酸(分析纯),购自天津市风船化学试剂科技有限公司。

#### 1.1.4 主要仪器设备

硅胶 G 薄层板,青岛海洋化工有限公司;薄层色

谱展开缸,上海信谊仪器厂有限公司;SB-800DT 超声波清洗器,浙江省宁波市新芝生物科技股份有限公司;K-H3000 型薄层扫描仪,上海科哲生化科技有限公司;ZF-6 型三用紫外线分析仪,上海嘉鹏科技有限公司;LC-4012 低速离心机,安徽中科中佳科学仪器有限公司;ME235P 电子分析天平,德国。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 溶液的制备

1.2.1.1 桃红四物汤醇提液及各单味药醇提液的制备参照国家中医药管理局会同国家药品监督管理局制定《古代经典名方目录(第一批)》目录中记载的桃红四物汤各单味药比例混合,以料液比 1:8 加入 50% 的乙醇超声提取 30 min,离心,取上清液。采用同法,制备各单味药。稀释定容至适当浓度,备用。

1.2.1.2 对照样品的制备 电子天平精密称取羟基红花黄色素 A 适量加 50% 的甲醇溶解成  $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、芍药苷适量加 50% 的甲醇溶解成  $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、阿魏酸适量加 50% 的甲醇溶解成  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,作为对照品备用。

#### 1.2.2 醇提液的薄层分离和鉴别

硅胶 G 薄层板(100 mm × 200 mm)上分别点样桃红四物汤提取液、各单味药的提取液和上述对照品溶液,以正丁醇-冰乙酸-水(4:1.5:5,上层)为展开剂,展开、取出、晾干,置于紫外灯(365 nm)下检视,并进行下一步操作。

#### 1.2.3 醇提液的薄层扫描和定性鉴别

在紫外灯(365 nm)下观察薄层板上的斑点,记录斑点位置。再将薄层板用碘蒸气显色,记录斑点位置,并对所有斑点进行薄层扫描,确定各个斑点的光谱特征和比移值。比较桃红四物汤醇提液、各单味药醇提液斑点和对照品的最大吸收波长、光谱特征和比移值,进行定性鉴别。

## 2 结果

### 2.1 桃红四物汤醇提液和各单味药薄层分离结果

桃红四物汤醇提液定性鉴别出 5 个成分,其最大吸收波长和比移值见表 1;依据吸收波长和比移值确定,有 3 个成分分别为羟基红花黄色素 A(来自红花)、芍药苷(来自白芍)、阿魏酸(来自当归和川芎)。另外,在桃红四物汤中有两个成分在组成桃红四物汤的各个单味药中均未检出。

表 1 桃红四物汤醇提液和各单味药薄层分离结果

| 成分     | 最大吸收波长 /nm | 比移值  | 备注  |
|--------|------------|------|---|
| THSW-1 | 351        | 0.34 | 吸收光谱图和比移值与 HH-1 完全相同。   |
| THSW-2 | 309        | 0.45 | 虽然 THSW-2 与 HH-2 的比移值相同,但是 THSW-2 在 309 nm 有最大吸收外,还存在末端吸收;HH-2 吸收光谱图中除了 311 nm 的最大吸收波长外,在 219 nm 有峰值吸收,所以认为 THSW-2 和 HH-2 不是同一成分。 |
| THSW-3 | 273        | 0.51 | 比移值与 CX-1 相同,但是吸收光谱图特征不同,因此,不是同一成分。   |
| THSW-4 | 234        | 0.77 | 吸收光谱图和比移值与 BS-2 完全相同。   |
| THSW-5 | 301        | 0.97 | 吸收光谱图和比移值与 DG-1 和 CX-2 完全相同。  |
| HH-1   | 351        | 0.34 | 吸收光谱图和比移值与 THSW-1 完全相同。   |
| HH-2   | 311        | 0.45 | 虽然 HH-2 与 THSW-2 的比移值相同,但是吸收光谱图特征不同,因此,不是同一成分。HH-2 除 311 nm 的最大吸收波长外,在 219 nm 有峰值吸收;而 THSW-2 在 309 nm 有最大吸收外,还存在末端吸收。             |
| CX-1   | 303        | 0.51 |   |
| CX-2   | 301        | 0.97 | 比移值和吸收光谱图同 THSW-5 和 DG-1。   |
| DG-1   | 301        | 0.97 | 比移值和吸收光谱图同 THSW-5 和 CX-2。   |
| BS-1   | 301        | 0.68 |   |
| BS-2   | 234        | 0.77 | 比移值和吸收光谱图同 THSW-4。  |
| BS-3   | 292        | 0.90 |   |

## 2.2 桃红四物汤已知化学成分对照品的薄层分析结果

### 2.2.1 羟基红花黄色素 A 扫描结果

羟基红花黄色素 A (hydroxysafflor yellow A, HSYA) 对照品的扫描结果如图 1-B, 有 2 个峰值吸收分别为 351 nm、425 nm, 1 个谷值吸收为 383 nm; THSW-1(图 1-A)、HH-1(图 1-C)与 HSYA(图 1-B)的

光谱特征完全一致,比移值均为 0.34,见表 2。

### 2.2.2 芍药苷扫描结果

芍药苷对照品的扫描结果,如图 2-B,有 3 个峰值吸收分别为 234 nm、293 nm、352 nm,2 个谷值吸收分别为 260 nm、325 nm;THSW-4(图 2-A)、BS-2(图 2-C)与 PF(图 2-B)的光谱特征完全一致,比移值均为 0.77,见表 2。

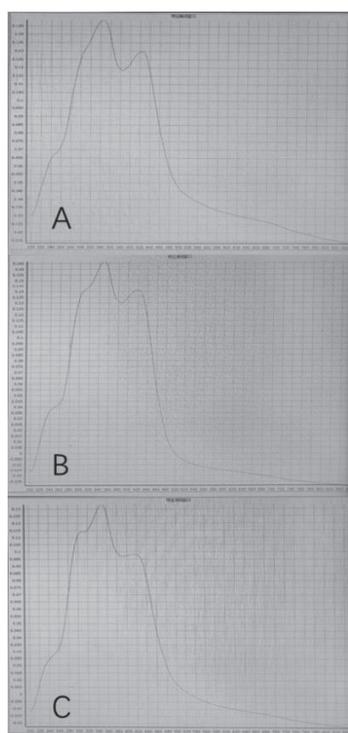


图 1 HSYA 薄层扫描结果  
A: THSW-1; B: HSYA; C: HH-1

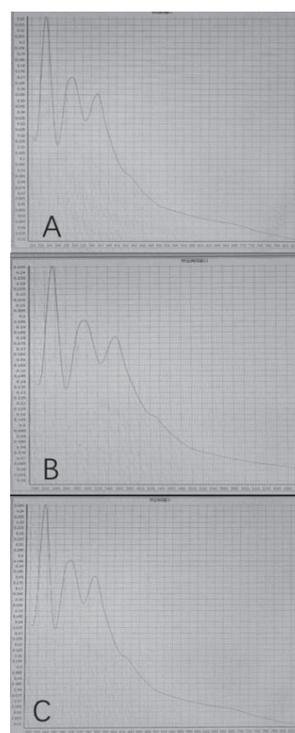


图 2 芍药苷 (PF) 薄层扫描结果  
A: THSW-4; B: PF; C: BS-2

表 2 桃红四物汤薄层分离斑点的定性鉴别

| 成分                      | 峰值吸收                | 谷值吸收               | 比移值  | 定性鉴别结果                                   |
|-------------------------|---------------------|--------------------|------|--|
| THSW-1、HH-1、<br>HSYA    | 均为 351 nm 和 425 nm  | 均为 383 nm          | 0.34 | 比移值相同,光谱图轮廓一致,初步断定 THSW-1 来自红花,成分为 HSYA  |
| THSW-4、BS-2、PF          | 均为 234、293 和 352 nm | 均为 260 nm 和 325 nm | 0.77 | 比移值相同,光谱图轮廓一致,初步断定 THSW-4 来自白芍,成分为 PF    |
| THSW-5、CX-1、<br>DG-1、FA | 均为 228 nm 和 301 nm  | 均为 251 nm          | 0.97 | 比移值相同,光谱图轮廓一致,初步断定 THSW-5 来自川芎和当归,成分为 FA |
| THSW-2                  | 309 nm              | 240 nm             | 0.45 | 其它药材均未检出                                 |
| THSW-3                  | 273 nm              | 243 nm             | 0.51 | 其它药材均未检出                                 |

### 2.2.3 阿魏酸扫描结果

阿魏酸对照品的薄层扫描结果见图 3-B,有 2 个峰值吸收分别为 228 nm、301 nm,1 个谷值吸收为 251 nm, THSW-5(图 3-A)、FA(图 3-B)、CX-1(图 3-C)和 DG-1(图 3-D)的光谱特征完全一致,比移值均为 0.97,见表 2。

### 2.3 薄层扫描结果分析

根据扫描结果,虽然桃红四物汤醇提液第二个斑点与红花醇提液第二个斑点的比移值相同为 0.45,但是吸收光谱特征不同(图 4),桃红四物汤有 1 个峰值吸收为 309 nm,1 个谷值吸收为 240 nm;红花有 2 个峰值吸收分别为 218 nm、311 nm,1 个谷值吸收为 238 nm,提示桃红四物汤醇提液第二个斑点可能为新产生的化学成分。

根据扫描结果,虽然桃红四物汤醇提液第三个斑点与川芎醇提液第一个斑点的比移值相同为 0.51,但

是吸收光谱特征不同(图 5),桃红四物汤有 1 个峰值吸收为 273 nm,1 个谷值吸收为 243 nm;川芎有 3 个峰值吸收分别为 227 nm、303 nm、439 nm,2 个谷值吸收分别为 260 nm、395 nm,且在紫外灯(365 nm)照射下斑点颜色也不相同,在其它单味药中均未检出,提示桃红四物汤醇提液第三个斑点可能为新产生的化学成分。

### 3 讨论

本研究中桃红四物汤提取液的溶剂采用 50% 的乙醇,提取获得的化学成分为极性较大成分。薄层色谱展开针对极性较大组分的常用展开剂有:正丁醇-冰乙醇-水(4:1:5,上层)、乙酸乙酯-正丁醇-水(4:5:1)、三氯甲烷-甲醇-水(65:35:10,下层)、三氯甲烷-甲醇(8:1)<sup>[9]</sup>。本研究根据实际情况,在预实验中选择毒

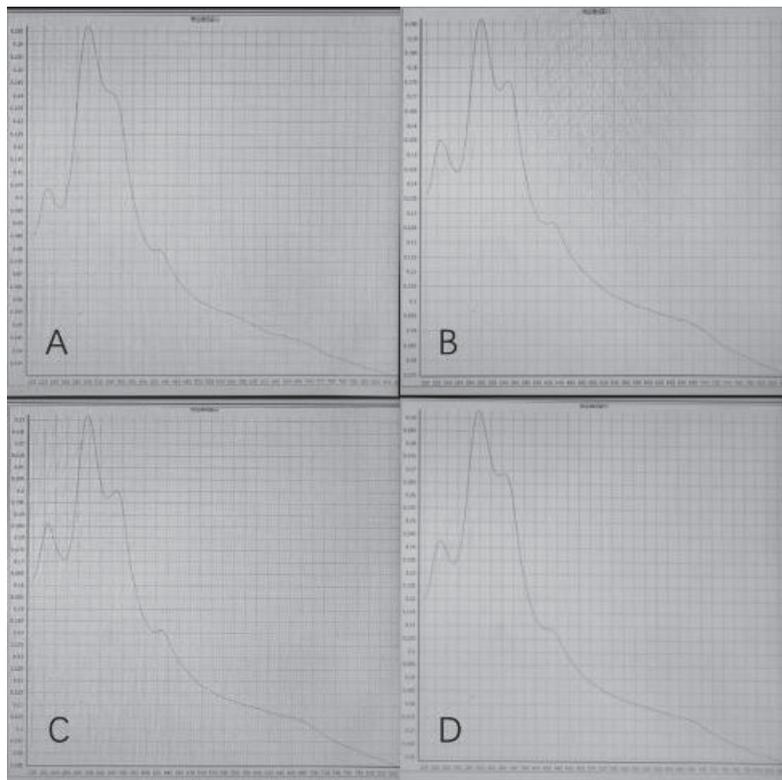


图 3 FA 薄层扫描结果(A: THSW-5; B: FA; C: CX-1; D: DG-1)

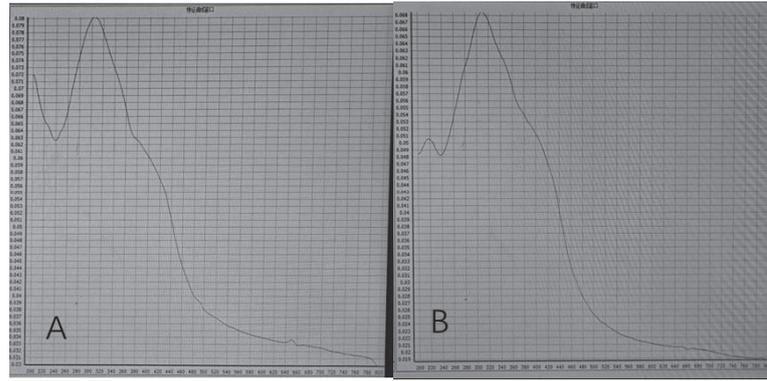


图 4 THSW 和 HH 的薄层扫描 (A:THSW;B:HH)

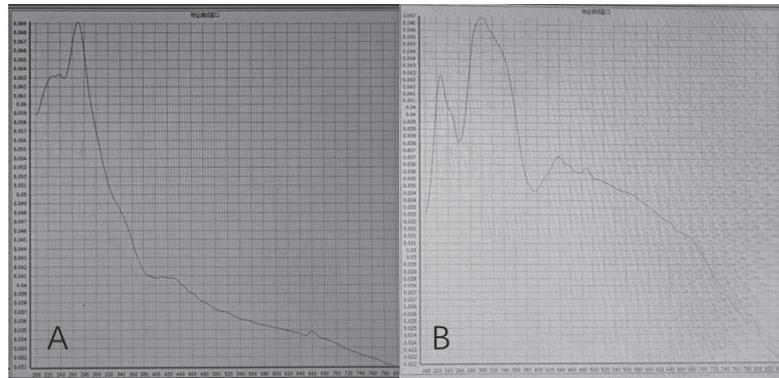


图 5 THSW 和 CX 的薄层扫描 (A:THSW;B:CX)

性较小和实验室较常用正丁醇-冰乙酸-水(4:1:5,上层)作为展开剂进行实验,但分离效果和比移值均不太理想。后调整展开剂中正丁醇-冰乙酸-水的比例,调整为正丁醇-冰乙酸-水(4:1.5:5,上层),展开结果效果较好。除去 THSW-5 成分外,其它成分比移值在 0.2~0.8 之间。

薄层色谱方法用于定性鉴别的特点:如果紫外光谱图轮廓一致并且比移值相同,可以初步断定为同一物质。如果紫外光谱图轮廓存在明显差异,可以断定肯定不是同一物质。本研究采用薄层色谱方法快速分离和初步鉴定了桃红四物汤中的几个化学成分。也肯定了合煎之后产生了新的物质,这是首次发现。实验结果验证了中医理论中的复方提取物合煎和单煎化学成分存在差异,也验证了合煎之后有新物质的产生。

尽管薄层色谱分离方法简单快速。但无法推断所产生的新的化学成分的结构。今后需采用制备薄层色谱后,结合紫外、红外、质谱和核磁进行进一步的结构鉴定。

### 参考文献

[1] 成颜芬,江华娟,王琳,等. 经典名方桃红四物汤化学指纹

图谱及 9 种成分含量测定研究[J]. 中草药,2020,51(3):653-661.

[2] 刘立,段金廛,宿树兰,等. 用于妇科血瘀证痛经的四物汤类方—桃红四物汤的研究进展[J]. 中国中药杂志,2015,40(5):814-821.

[3] 聂欣,成颜芬,王琳,等. 桃红四物汤化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(4):226-234.

[4] 李双双,郭春燕. 桃红四物汤化学成分及药理作用研究进展[J]. 神经药理学报,2016,6(4):42-49.

[5] Aleksandra Maria Juszczak, Marijana Zovko-Končić, Michal Tomczyk. Recent trends in the application of chromatographic techniques in the analysis of luteolin and its derivatives [J]. Biomolecules, 2019, 9(11):731.

[6] 李强,杜思邈,张忠亮,等. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望[J]. 中草药,2013,44(22):3095-3104.

[7] 高浩祥,梁恒宇,曾维才,等. 植物多酚常见的定性定量分析方法[J]. 包装工程,2021,42(07):1-11.

[8] 冯雅斌,杜靛,温静. 薄层色谱法在药物分析中的应用及研究进展[J]. 疾病监测与控制,2011,5(01):60-63.

[9] 曾镇广. 薄层色谱中展开剂的选择[J]. 新课程学习:学术教育,2010,(07):140.