

天冬饮片与标准汤剂的质量评价方法探索

靳如娜^{1,2}, 郝丽霞², 王涛¹, 吴红华^{1*}, 代云桃^{2*}, 石守刚³, 黄正军³

(1. 天津中医药大学 中医药研究院, 天津 300193; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;
3. 葵花药业集团(襄阳)隆中有限公司, 湖北 襄阳 441003)

[摘要] 目的:建立天冬饮片及其标准汤剂的质量评价方法。方法:制备10批天冬标准汤剂。采用高效液相色谱-蒸发光散射检测法(HPLC-ELSD),以乙腈-水为流动相梯度洗脱,建立天冬饮片、标准汤剂的指标成分含量测定方法以及天冬饮片的指纹图谱检测方法。采用UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS对指纹图谱中主要共有峰进行成分指认,以乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相,电喷雾离子源(ESI),正、负离子模式扫描,检测范围 m/z 100~1 400。结果:天冬饮片、标准汤剂中原薯蓣皂苷与原新薯蓣皂苷的总质量分数分别为0.41%~0.72%和0.33%~0.59%,这2个成分的转移率73.6%~98.3%。天冬标准汤剂的出膏率59.0%~73.0%,pH 4.9~5.6。天冬饮片的HPLC指纹图谱中呈现了10个共有峰,且均为皂苷类成分,包括原新薯蓣皂苷,原薯蓣皂苷,天冬皂苷甲及其同分异构体,甲基原薯蓣皂苷,asparagoside F,(25R)-26-O- β -D-葡萄糖吡喃糖基-呋甙-5,20-二烯-3 β ,26-二醇-3-O-[α -L-鼠李吡喃糖基(1 \rightarrow 2)]-[β -D-葡萄糖吡喃糖基(1 \rightarrow 4)- α -L-鼠李吡喃糖基(1 \rightarrow 4)]- β -D-葡萄糖吡喃糖基,26-O- β -D-葡萄糖吡喃糖基-呋甙-20(22)-烯-3 β ,26-二醇-3-O-[α -L-鼠李吡喃糖基(1 \rightarrow 2)]-[α -L-鼠李吡喃糖基(1 \rightarrow 4)]- β -D-葡萄糖吡喃糖基,伪原薯蓣皂苷,aspacochioside C。结论:建立了天冬饮片及其标准汤剂的质量评价方法,且建立的方法稳定可行,可为含天冬制剂的质量评价及控制提供参考。

[关键词] 天冬; 饮片; 标准汤剂; 原薯蓣皂苷; 原新薯蓣皂苷; 指纹图谱; 高效液相色谱-蒸发光散射检测法(HPLC-ELSD)

[中图分类号] R22;R28;R94;C37;O657 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2020)17-0111-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201064

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20200218.2322.005.html>

[网络出版日期] 2020-2-19 13:34

Analysis on Quality Evaluation Methods of Asparagi Radix Decoction Pieces and Its Standard Decoction

JIN Ru-na^{1,2}, HAO Li-xia², WANG Tao¹, WU Hong-hua^{1*}, DAI Yun-tao^{2*},
SHI Shou-gang³, HUANG Zheng-jun³

(1. Institute of Traditional Chinese Medicine (TCM), Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences,
Beijing 100700, China;

3. Sunflower Pharmaceutical Group (Xiangyang) Longzhong Co. Ltd., Xiangyang 441003, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the quality evaluation methods of Asparagi Radix decoction pieces and its standard decoction. **Method:** Ten batches of Asparagi Radix standard decoction were prepared. High performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection method (HPLC-ELSD) was established for the determination of protodioscin and protoneodioscin in Asparagi Radix decoction pieces and its

[收稿日期] 20200111(012)

[基金项目] 中国中医科学院中药研究所古代经典名方的开发研究项目(H2018026)

[第一作者] 靳如娜,在读硕士,从事中药质量分析研究,E-mail:jrn11330@163.com

[通信作者] *代云桃,博士,研究员,硕士生导师,从事中药药效物质基础和质量标准研究,E-mail:ytdai@icmm.ac.cn;

*吴红华,博士,副研究员,从事中药药效成分分离及质量控制研究,E-mail:wuhonghua2003@163.com

standard decoction, and the fingerprint detection of Asparagi Radix decoction pieces with acetonitrile-water as mobile phase for gradient elution. UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS was used to identify ten main common peaks in the fingerprint with acetonitrile-0.1% formic acid solution as mobile phase for gradient elution, electrospray ionization (ESI) and positive and negative ion mode scanning were employed, the detection range was m/z 100-1 400. **Result:** The total content of protodioscin and protoneodioscin in Asparagi Radix decoction pieces was 0.41%-0.72%, and their total content in Asparagi Radix standard decoction was 0.33%-0.59%, the transfer rate of these two components was 73.6%-98.3%. The dry extract yield of the standard decoction was 59.0%-73.0%, and its pH was 4.9-5.6. There were 10 common peaks in the fingerprint, and all of them were saponins, including protoneodioscin, protodioscin, aspachioside A and its isomer, methyl protodioscin, asparagoside F, (25*R*)-26-*O*- β -*D*-glucopyranosyl-furostan-5, 20-diene-3 β , 26-diol-3-*O*-[α -*L*-rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 2)]-[β -*D*-glucopyranosyl (1 \rightarrow 4)]- α -*L*-rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 4)]- β -*D*-glucopyranoside, 26-*O*- β -*D*-glucopyranosyl-furostan-20 (22)-ene-3 β , 26-diol-3-*O*-[α -*L*-rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 2)]-[α -*L*-rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 4)]- β -*D*-glucopyranoside, pseudodiosgenin, aspachioside C. **Conclusion:** In this paper, the quality evaluation methods of Asparagi Radix decoction pieces and its standard decoction are established, and these methods are stable and feasible, which can provide reference for the quality control of pharmaceutical preparations containing Asparagi Radix.

[Key words] Asparagi Radix; decoction pieces; standard decoction; protodioscin; protoneodioscin; fingerprint; high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection method (HPLC-ELSD)

天冬具有养阴润燥、清肺生津的功效,常用于治疗肺燥干咳、顿咳痰黏、内热消渴、热病津伤、肠燥便秘等^[1]。天冬分布十分广泛,今用天冬主产于贵州、四川、广西等省区,其中以贵州产量最大、质量亦佳,现代多将本品的道地产区确定为贵州^[2,4]。天冬中主要含有多糖、皂苷和氨基酸类等化学成分^[5],皂苷主要为甾体皂苷,其苷元包括薯蓣皂苷元、雅姆皂苷元及菝葜皂苷元等。现代药理研究表明,天冬皂苷为主要药用成分,具有改善脑血流和降低脑血管阻力、抗肿瘤、抗衰老、抗氧化、抗炎、调节免疫、改善受损肾脏、抗病毒等活性^[6]。

天冬是本课题组承担的经典名方的君药,但2015年版《中国药典》仅规定了天冬药材和饮片中浸出物、水分、总灰分、二氧化硫残留量等项,无含量测定和指纹图谱项,因此需要对其标准进行完善。目前已有对天冬药材中多糖、总皂苷及氨基酸成分含量测定的研究报道^[7-9],对天冬中单指标成分含量的研究也有一些,例如,王树春等^[10]建立了HPLC-ELSD测定天冬皂苷甲含量的方法;徐从立等^[11]用HPLC-ELSD测定了天冬总呋甾皂苷中AR-1[(25*S*)-26-*O*- β -*D*-葡萄糖吡喃糖基-5 β -呋甾-20(22)-烯-3 β ,26-二醇-3-*O*- α -*L*-鼠李吡喃糖基(1 \rightarrow 4)- β -*D*-葡萄糖吡喃糖基]的含量;王贝等^[12]采用超高效液相色谱-电雾式检测器(UHPLC-CAD)建立了天冬中

甾体皂苷25-*epi*-officialisnin II的含量测定方法。上述对天冬中单指标成分的含量研究所用对照品均为实验室自制,市面上没有供应,且大多以天冬饮片的80%丙酮提取物或50%乙醇提取物作为测定对象,尚无以天冬汤剂为检测对象的研究报道。本研究建立了天冬饮片及其标准汤剂中原新薯蓣皂苷和原薯蓣皂苷的含量测定方法,并建立了天冬饮片的指纹图谱检测方法,为天冬及其制剂的质量评价提供了有效的检测方法。所选指标成分稳定、市场有对照品供应、在天冬中含量较高,且已有文献表明原薯蓣皂苷具有抗癌、保护神经、改善糖尿病肾病等活性^[13-15],说明原薯蓣皂苷与原新薯蓣皂苷可作为天冬饮片及其标准汤剂质量控制的质量标志物。

1 材料

1200型高效液相色谱仪[美国安捷伦公司,配有Alltech 2000型蒸发光散射检测器(ELSD)], UltiMate 3000型超高效液相色谱仪(美国戴安公司), LTQ-Orbitrap XL型高分辨质谱仪[美国Thermo Scientific公司,配备电喷雾离子源(ESI)和Xcalibur 2.1工作站], ME204/02型1/10万电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司], HC-3018型高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司)。原薯蓣皂苷(中国食品药品检定研究院,批号

111937-201201, 纯度 94.9%), 伪原薯蓣皂苷(成都克洛玛生物科技有限公司, 批号 CHB180408, 纯度≥98%); 天冬饮片共 10 批, 样品信息见表 1, 购于贵州、四川等地, 包括了天冬的主产区和道地产区, 经中国中医科学院中药研究所代云桃研究员鉴定为百合科植物天冬 *Asparagus cochinchinensis* 的干燥块根; 水为纯净水, 乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

表 1 天冬饮片的样品信息

Table 1 Sample information of 10 batches of *Asparagi Radix* decoction pieces

编号	产地	批号	生产厂家
TD01	贵州贵阳	180911	襄阳华福药业有限公司
TD02	四川万源	20190701	四川新荷花中药饮片股份有限公司
TD03	四川万源	20190702	四川新荷花中药饮片股份有限公司
TD04	四川万源	20190703	四川新荷花中药饮片股份有限公司
TD05	四川万源	20190704	四川新荷花中药饮片股份有限公司
TD06	四川万源	20190705	四川新荷花中药饮片股份有限公司
TD07	贵州遵义	18081301	盛实百草药业有限公司
TD08	贵州遵义	19030301	盛实百草药业有限公司
TD09	贵州遵义	19030401	盛实百草药业有限公司
TD10	贵州	801000431	北京同仁堂(亳州)饮片有限责任公司

2 方法与结果

2.1 天冬标准汤剂的制备 取天冬饮片 100 g, 加 7 倍量水浸泡 30 min, 回流提取 30 min, 趁热 2 层纱布过滤; 药渣再加 6 倍量水, 回流提取 20 min, 趁热用 2 层纱布过滤; 合并 2 次滤液, 水浴浓缩至体积 500 mL, 得天冬标准汤剂^[16]。

2.2 指标成分含量的 HPLC 测定

2.2.1 供试品溶液的制备 精密量取天冬标准汤剂 300 μL , 置于 1.5 mL 离心管中, 精密加入 30% 乙腈水溶液 700 μL , 13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min (离心半径 5 cm), 取上清液, 得天冬标准汤剂供试品溶液。取天冬饮片粉末(过 4 号筛)约 1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入水 10 mL, 加热回流 30 min, 离心 10 min (8 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 离心半径 10 cm, 下同), 取上清液转移至 25 mL 量瓶中, 药渣再加水 10 mL, 加热回流 30 min, 离心 10 min, 合并上清液, 加水定容至刻度, 得天冬饮片供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液的制备 取原薯蓣皂苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含有原薯蓣皂苷和原新薯蓣皂苷总量 1.1 mg 的对照品溶液。

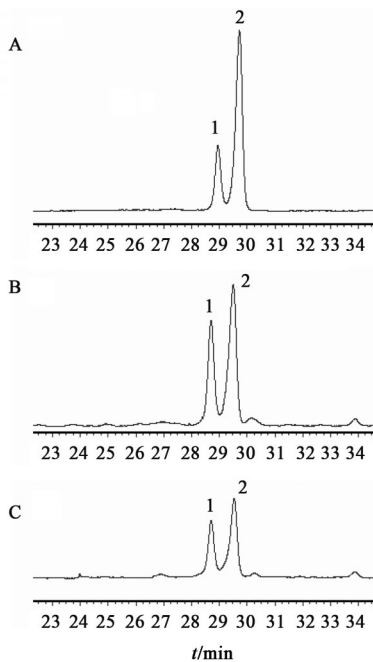
2.2.3 色谱条件 采用 Waters XSelect[®] HSS T3 色

谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 流动相水(A)-乙腈(B)梯度洗脱 (0~20 min, 24%B; 20~25 min, 24%~27%B; 25~33 min, 27%~28%B; 33~36 min, 28%~90%B; 36~41 min, 90%~24%B), 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 流速 0.8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 利用 ELSD 检测, 漂移管温度 104 $^{\circ}\text{C}$, 载气流速 2.8 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 进样量 10 μL 。理论板数按原薯蓣皂苷计算为 70 988。

2.2.4 方法学考察 取 2.2.2 项下对照品溶液适量, 加甲醇稀释成质量浓度分别为 0.055, 0.11, 0.22, 0.44, 0.55, 0.88 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列对照品溶液, 按 2.2.3 项下条件测定, 以峰面积的自然对数 ($\ln Y$) 为纵坐标, 质量浓度的自然对数 ($\ln X$) 为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程 $\ln Y = 1.879 1 \ln X + 9.141 8$ ($r = 0.999 2$), 线性范围 0.055~0.88 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

取 TD03 号天冬饮片与 TD05 号天冬标准汤剂的供试品溶液适量, 按 2.2.3 项下色谱条件连续进样 6 次, 结果天冬饮片、标准汤剂中原薯蓣皂苷与原新薯蓣皂苷峰面积之和的 RSD 依次为 3.4%, 2.0%。取 TD03 号天冬饮片与 TD05 号天冬标准汤剂的供试品溶液适量, 分别于制备后 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 按 2.2.3 项下色谱条件测定, 记录峰面积, 结果天冬饮片、标准汤剂中原薯蓣皂苷与原新薯蓣皂苷峰面积之和的 RSD 依次为 2.5%, 2.4%, 说明上述供试品溶液在 24 h 内均较为稳定。取 TD03 号天冬饮片与 TD05 号天冬标准汤剂适量, 按 2.2.1 项下方法分别平行制备 6 份供试品溶液, 按 2.2.3 项下色谱条件测定, 结果天冬饮片、标准汤剂中原薯蓣皂苷与原新薯蓣皂苷质量分数之和分别为 0.53%, 0.48%, RSD 依次为 2.0% 和 1.4%, 说明该方法重复性良好。取已知指标成分含量的 TD03 号天冬饮片与 TD05 号天冬标准汤剂样品, 按 1:1 比例添加对照品, 按 2.2.1 项下方法分别平行制备 6 份供试品溶液, 按 2.2.3 项下色谱条件测定, 计算加样回收率。结果天冬饮片中原薯蓣皂苷+原新薯蓣皂苷的平均加样回收率 94.37%, RSD 2.5%; 天冬标准汤剂中原薯蓣皂苷+原新薯蓣皂苷的平均加样回收率 96.35%, RSD 2.3%, 说明该方法准确可靠。

2.2.5 样品检测 分别精密吸取 10 批天冬饮片和天冬标准汤剂的供试品溶液 10 μL , 按 2.2.3 项下色谱条件测定, 记录色谱图, 见图 1 和表 2。结果显示在 10 批天冬饮片中, 两者质量分数之和处于 0.41%~0.72%; 在 10 批天冬标准汤剂中, 按照药材投料量计算, 二者总质量分数处于 0.33%~0.59%。



A. 对照品; B. 饮片; C. 标准汤剂; 1. 原新薯蓣皂苷; 2. 原薯蓣皂苷
图1 天冬饮片与天冬标准汤剂的HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of *Asparagi Radix* decoction pieces and its standard decoction

表2 天冬标准汤剂关键质量属性的特征参数

Table 2 Characteristic parameters of key quality properties of *Asparagi Radix* standard decoction

编号	pH	出膏率/%	原薯蓣皂苷与原新薯蓣皂苷总量/%		
			天冬饮片	天冬标准汤剂	转移率
TD01	5.1	59.2	0.69	0.52	75.4
TD02	5.1	66.9	0.47	0.43	91.5
TD03	5.6	67.5	0.54	0.45	83.3
TD04	5.4	67.4	0.52	0.40	76.9
TD05	5.2	67.7	0.50	0.49	98.0
TD06	5.2	69.5	0.49	0.42	85.7
TD07	5.0	73.0	0.60	0.59	98.3
TD08	5.1	66.0	0.54	0.47	87.0
TD09	5.5	70.0	0.72	0.53	73.6
TD10	4.9	59.0	0.41	0.33	80.5

2.3 天冬标准汤剂指标参数的测定

2.3.1 出膏率 分别取TD01~10号天冬标准汤剂各50 mL,置已干燥至恒重的蒸发皿中,在90℃烘箱中干燥至恒重,计算出膏率,见表2。结果10批天冬标准汤剂的出膏率处于59.0%~73.0%,平均值66.6%,不同批次样品的出膏率均位于均值的±20%范围内。

2.3.2 转移率 分析各批次天冬饮片与标准汤剂中原薯蓣皂苷与原新薯蓣皂苷的含量,按公式转移

率= $W/M \times 100\%$ 计算转移率,式中 W 表示天冬标准汤剂中指标成分的质量, M 表示饮片中指标成分的质量,见表2。结果转移率(以原薯蓣皂苷与原新薯蓣皂苷总量计)73.6%~98.3%,平均值85.0%,不同批次样品中指标成分的转移率均位于均值的±20%范围内。

2.3.3 pH测定 采用pH计测得各批天冬标准汤剂的pH 5.2±0.2,说明不同批次标准汤剂之间pH差异不大。

2.4 天冬饮片的指纹图谱分析

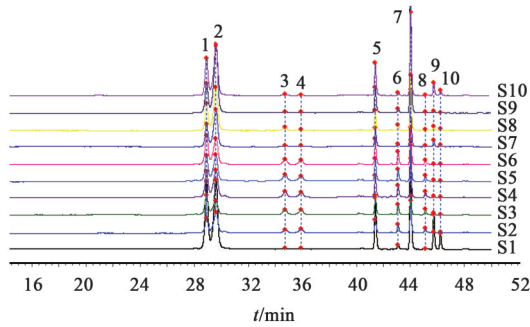
2.4.1 供试品溶液的制备 称取天冬饮片粉末(过4号筛)约1.0 g,精密称定,置50 mL离心管中,加65%甲醇10 mL,超声处理40 min,离心5 min,取上清液,转移至10 mL量瓶中,加65%甲醇定容至刻度^[17],即得。

2.4.2 色谱条件 Waters XSelect® HSS T3 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~15 min, 24%A; 15~20 min, 24%~27%A; 20~30 min, 27%~28%A; 30~35 min, 28%~32%A; 35~50 min, 32%~42%A; 50~55 min, 42%~90%A; 55~60 min, 90%~24%A),流速0.8 mL·min⁻¹,柱温30℃;采用ELSD检测,漂移管温度104℃,载气流速2.4 L·min⁻¹,进样量10 μL。

2.4.3 方法学考察 取TD01号天冬饮片供试品溶液按2.4.2项下条件连续进样6次,以2号峰原薯蓣皂苷为参照峰,计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD,同时,运用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件(2012版)计算各样品HPLC指纹图谱的相似度。结果各共有峰相对保留时间的RSD均<0.5%,相对峰面积的RSD均<5.3%,指纹图谱相似度均>0.99,表明仪器精密度良好。取TD01号饮片样品适量,按2.4.1项下平行制备6份供试品溶液,按2.4.2项下色谱条件测定,以2号峰原薯蓣皂苷为参照峰,计算各共有峰相对保留时间的RSD均<0.4%,相对峰面积的RSD均<6.8%,指纹图谱相似度均>0.99,表明该方法重复性良好。取TD01号饮片供试品溶液适量,分别于制备后0, 2, 4, 8, 12, 18, 24 h按2.4.2项下条件测定,以2号峰原薯蓣皂苷为参照峰,计算各共有峰相对保留时间的RSD均<0.3%,相对峰面积的RSD均<5.5%,指纹图谱相似度均>0.99,表明天冬饮片供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.4.4 指纹图谱采集 精密吸取10批天冬饮片的供试品溶液适量,按2.4.2项下色谱条件测定,采用

“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件(2012版)进行色谱峰匹配,计算相似度;找出10批天冬饮片的共有峰,见图2。结果发现所有样品HPLC指纹图谱的相似度处于0.900~0.999,符合HPLC指纹图谱要求,共找出10个峰形较好、稳定且易辨识的共有峰。以2号峰原薯蓣皂苷作参照,计算10个共有峰的相对保留时间与相对峰面积,见表3。



1.原新薯蓣皂苷;2.原薯蓣皂苷;9.伪原薯蓣皂苷;S1~S10.TD01~10
图2 天冬饮片的HPLC指纹谱

Fig. 2 HPLC fingerprint of Asparagus Radix decoction pieces

表3 天冬饮片HPLC指纹图谱中共有峰的色谱参数

Table 3 Chromatographic parameters of common peaks in HPLC fingerprint of Asparagus Radix decoction pieces

共有峰	t_R /min	相对保留时间	峰面积	相对峰面积
1	28.92	0.98	292.4	0.59
2	29.62	1.00	499.4	1.00
3	34.73	1.17	41.1	0.08
4	35.92	1.21	35.0	0.07
5	41.40	1.40	133.8	0.27
6	43.09	1.45	40.3	0.08
7	44.01	1.49	289.6	0.58
8	45.10	1.52	15.0	0.03
9	45.72	1.54	32.5	0.07
10	46.22	1.56	14.2	0.03

2.5 质谱指认

2.5.1 色谱条件 采用ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm),流动相选择乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~6 min, 24%A; 6~8 min, 24%~27%A; 8~12 min, 27%~28%A; 12~14 min, 28%~32%A; 14~20 min, 32%~42%A; 20~23 min, 42%~80%A; 23~25 min, 80%A),流速设定0.3 mL·min⁻¹,柱温30℃。

2.5.2 质谱条件 离子源为ESI,正、负离子模式扫描,加热器温度350℃,毛细管温度350℃,毛细管电压25 V,喷雾电压4 kV,鞘气(N₂)流速40 arb,辅

助气(N₂)流速20 arb。一级质谱在傅里叶变换(FT)模式下全扫描(分辨率3万, m/z 100~1400),二级及三级质谱采用数据依赖性扫描(data dependent scan)。

2.5.3 色谱峰的指认 精密吸取2.4.1项下天冬饮片供试品溶液2 μL注入UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS系统,记录质谱信号。通过对照品比对鉴定2号峰为原薯蓣皂苷,9号峰为伪原薯蓣皂苷,采用Xcalibur 2.1定性分析软件对正、负离子模式总离子流图进行处理,通过各化学成分峰的保留时间和精确相对分子质量,并结合化学成分数据库及相关文献数据,进行其他化学成分的结构推断,见表4。以原薯蓣皂苷为例研究天冬皂苷的质谱裂解过程。在负离子模式下原薯蓣皂苷的准分子离子峰为 m/z 1047.53870 [M-H]⁻ 与 m/z 1093.54651 [M+HCOO]⁻。观察[M-H]⁻的二级质谱,碎片离子包括 m/z 901.47559 [M-H-Rha]⁻, m/z 755.53479 [M-H-2Rha]⁻, m/z 593.55420 [M-H-2Rha-Glc]⁻, m/z 431.32791 [M-H-2Rha-2Glc]⁻,以上碎片离子依次为原薯蓣皂苷逐步丢失了2个鼠李糖基(Rha)和2个葡萄糖基(Glc)形成苷元的碎片,见图3。

3 讨论

本课题组前期共采集了7个产地的天冬(包括药材和饮片),包括四川内江,广西玉林,四川广元,贵州贵阳,贵州遵义与四川万源等。从外观性状方面观察,主要分为三类:四川内江的天冬质地较脆,有外壳,个头较小,长3~7 cm,表面棕黄色,不符合2015年版《中国药典》中天冬的性状要求“半透明,光滑或具深浅不等的纵皱纹”;广西玉林与四川广元的天冬质地较软,个头较小,长3~7 cm,表面呈淡黄棕色;贵州、贵州贵阳、贵州遵义与四川万源的天冬质地较软,个头较大,呈长纺锤形,略弯曲,长7~15 cm,表面黄白色至淡黄棕色。本课题组对上述三类天冬的指纹图谱均进行了研究,结果显示以上3类指纹轮廓差异很大。根据古籍文献记载天冬的优质特征为肥大、大如手指、长二、三寸;质地性糯、糯润、圆实;色黄明亮、根白^[23]等,因此本研究选择了个头较大的4个产地的天冬饮片进行了标准汤剂的制备和研究。

本实验含量测定所用的原薯蓣皂苷对照品经HPLC-ELSD检测,结果显示色谱图中呈现2个峰,另一个成分的峰面积占比23%以上,经高分辨质谱鉴定其为原薯蓣皂苷的差向异构体,并根据文献确定该成分为原新薯蓣皂苷,这2个成分只是C-25的

表4 正、负离子模式下天冬饮片HPLC指纹图谱中共有峰的鉴定

Table 4 Identification of common peaks in HPLC fingerprint of Asparagi Radix decoction pieces under positive and negative ion modes

No.	t_R /min	成分	分子式	m/z 实测值	m/z 理论值	离子模式	δ /ppm	MS/MS
1	10.82	原新薯蓣皂苷 ^[18]	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₂	1 047.539 06	1 047.537 05	[M-H] ⁻	1.4	901.526 49, 755.511 47, 883.466 19, 737.556 40, 593.536 01, 575.483 46, 431.537 60
2	11.05	原薯蓣皂苷 ¹⁾	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₂	1 047.538 70	1 047.537 05	[M-H] ⁻	1.1	901.475 59, 755.534 79, 593.554 20, 431.327 91
3	12.68	天冬皂苷甲 ^[10]	C ₄₅ H ₇₆ O ₁₈	903.497 62	903.494 79	[M-H] ⁻	2.5	757.499 45, 739.555 36, 595.547 42, 577.526 67, 433.482 79
4	13.10	天冬皂苷甲同分异构体	C ₄₅ H ₇₆ O ₁₈	903.497 44	903.494 79	[M-H] ⁻	2.3	757.479 80, 739.483 84, 595.444 03, 577.500 31, 433.549 07
5	15.42	甲基原薯蓣皂苷 ^[19]	C ₅₂ H ₈₆ O ₂₂	1 061.556 40	1 061.552 70	[M-H] ⁻	3.0	915.494 63, 769.510 99, 607.532 35, 445.228 45
6	16.69	asparagoside F ^[20]	C ₅₀ H ₈₂ O ₂₂	1 035.536 25	1 035.537 05	[M+H] ⁺	-1.3	873.483 22, 741.441 16, 579.387 76, 417.335 36
7	17.98	(25 <i>R</i>)-26- <i>O</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖吡喃糖基-呋甙-5,20-二烯-3 β ,26-二醇-3- <i>O</i> -[α - <i>L</i> -鼠李吡喃糖基(1 \rightarrow 2)]-[β - <i>D</i> -葡萄糖吡喃糖基(1 \rightarrow 4)]- α - <i>L</i> -鼠李吡喃糖基(1 \rightarrow 4)]- β - <i>D</i> -葡萄糖吡喃糖苷 ^[21]	C ₅₇ H ₉₂ O ₂₆	1 193.594 73	1 193.594 95	[M+H] ⁺	-0.7	1 031.541 38, 885.483 28, 739.424 93, 577.372 13, 415.319 70
8	18.14	26- <i>O</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖吡喃糖基-呋甙-20(22)-烯-3 β ,26-二醇-3- <i>O</i> -[α - <i>L</i> -鼠李吡喃糖基(1 \rightarrow 2)]-[α - <i>L</i> -鼠李吡喃糖基(1 \rightarrow 4)]- β - <i>D</i> -葡萄糖吡喃糖苷	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₁	1 033.556 15	1 033.557 78	[M+H] ⁺	-2.1	887.488 78, 741.440 80, 579.387 82, 417.335 45
9	18.27	伪原薯蓣皂苷 ¹⁾	C ₅₁ H ₈₂ O ₂₁	1 029.529 05	1 029.526 48	[M-H] ⁻	2.0	883.527 95, 737.551 33
10	19.11	aspacochioside C ^[22]	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₇	885.487 73	886.492 05	[M-H] ⁻	3.3	739.425 54, 577.555 36

注: ¹⁾通过对对照品指认。

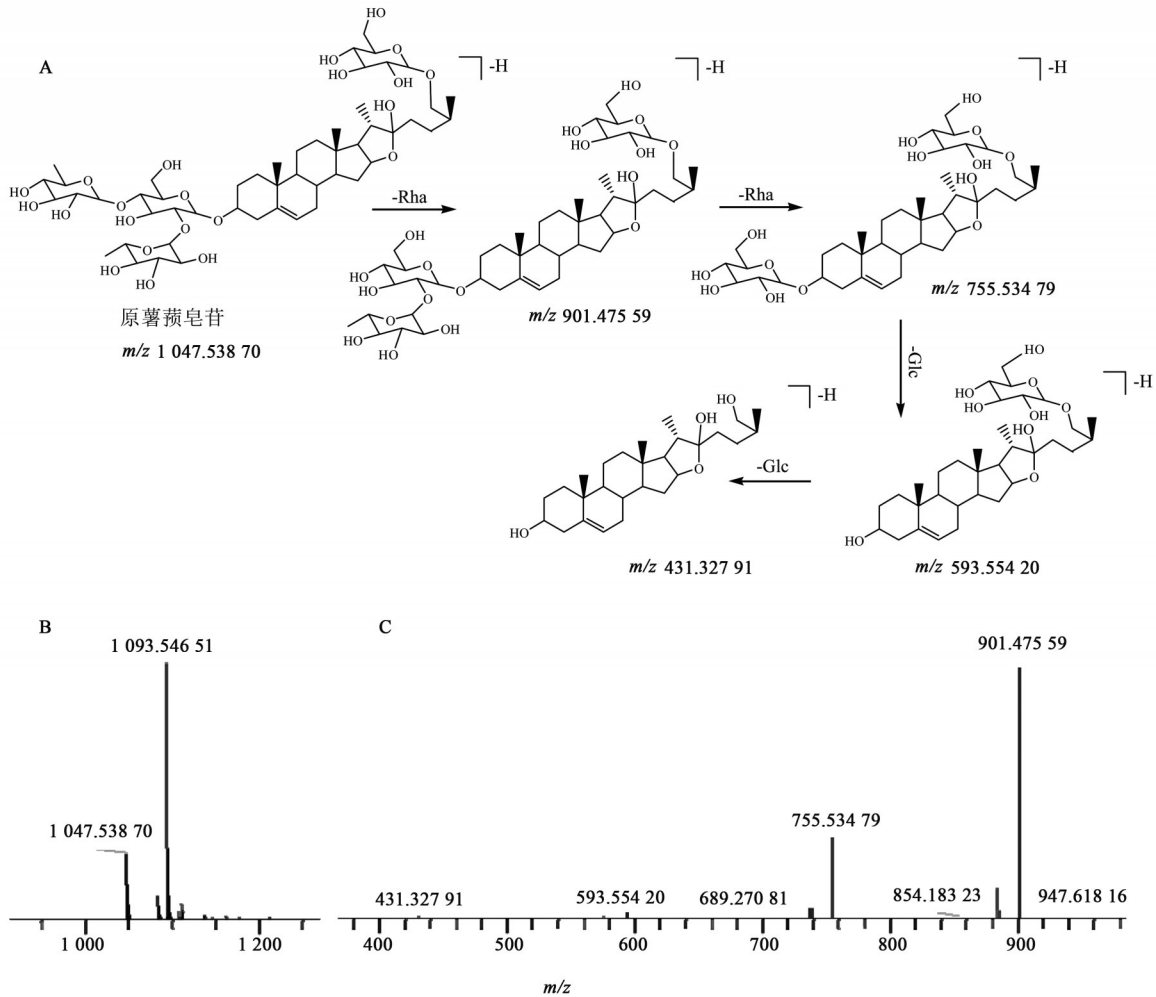
构型不一致,原薯蓣皂苷的构型为*R*构型,原新薯蓣皂苷的构型则为*S*构型^[18]。样品中这2个成分含量均比较高,且调整色谱条件,两者很难达到完全分离,故选择两者总量为定量指标。含量测定结果显示,二者在天冬饮片和标准汤剂中的总质量分数分别为0.41%~0.72%,0.33%~0.59%,转移率73.6%~98.3%,不同产地之间差异不大,转移率都比较高。但有个别样品的指标成分转移率差异过大,原因可能与饮片厚度不一致有关,市售的天冬饮片有的厚度相差3倍以上。因此,建议标准汤剂研究时应严格把控天冬饮片的厚度。

天冬皂苷主要为甾体皂苷,成分结构中大多无共轭体系,紫外吸收弱,故本研究采用HPLC-ELSD建立了天冬饮片及其标准汤剂中原薯蓣皂苷及原新薯蓣皂苷的含量测定方法,并建立了天冬饮片的指纹图谱方法。在方法优化过程中,对不同色谱柱(Waters XSelect[®] HSS T3, Thermo Acclaim 120 C₁₈, SilGreen C₁₈)进行了考察,结果发现使用Waters XSelect[®] HSS T3色谱柱所得色谱图的峰形及各峰

分离效果较其他2根色谱柱更好,故选用Waters XSelect[®] HSS T3色谱柱。同时,本研究还对其他色谱参数进行了考察,包括漂移管温度、载气流速、洗脱梯度、流动相组成、流速(0.6, 0.8, 1 mL·min⁻¹)和柱温(25, 30, 35 °C)等,根据峰形及色谱峰分离效果,最终确定为本文所用的色谱条件。

天冬饮片含量测定样品制备方法优化时,分别比较了溶剂水,5%甲醇,30%甲醇和65%甲醇的提取效果,结果显示水提取液中原薯蓣皂苷及原新薯蓣皂苷的含量最高,而65%甲醇^[17]提取液中两者含量比水提液中两者含量低一半,故确定以水为提取溶剂。后续又比较了回流与超声2种提取方式,结果显示2种提取方式提取率相同,但是超声提取所得结果的RSD较大,故最终选择回流提取的方式。

在HPLC指纹图谱研究时,最初采用天冬标准汤剂建立指纹图谱,结果显示标准汤剂谱图中只有2个明显的大峰(原薯蓣皂苷与原新薯蓣皂苷,即峰1,2),而一些极性偏小的成分(即峰3~10)几乎检测不到,故选择一定体积分数的甲醇作为提取溶剂,



A. 裂解途径; B. 一级质谱; C. 二级质谱; Rha. 鼠李糖基; Glc. 葡萄糖基
图3 原薯蓣皂苷在负离子模式下的MS/MS及裂解途径

Fig. 3 MS/MS and fragmentation patterns of protodioscin under negative ion mode

分别考察了50%甲醇,65%甲醇,85%甲醇的提取效果,结果显示65%甲醇提取时的色谱图基线平整且色谱峰高度比例适中,故选择65%甲醇为提取溶剂。本文仅建立了天冬饮片的指纹图谱,因为天冬标准汤剂的指纹图谱和含量测定的图谱一致,没有必要再建立其指纹图谱。本文检测发现10批天冬饮片的HPLC指纹图谱相似度均>0.9,说明所用天冬药材化学轮廓相似度高,质量相对稳定。10个共有峰结构鉴定均为甾体皂苷类成分,可为天冬甾体皂苷类成分的轮廓分析提供参考。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:55-56.
[2] 费曜. 天冬规范化种植(GAP)研究[D]. 成都:成都中医药大学,2004.
[3] 王加锋,滕佳林. 天冬历代应用沿革[J]. 山东中医药

大学学报,2012,36(5):385-386.
[4] 梁飞. 道地药材考[D]. 北京:北京中医药大学,2013.
[5] 朱国磊. 天冬的化学成分及其细胞毒活性研究[D]. 昆明:昆明理工大学,2013.
[6] 宫兆燕,张君利. 天冬活性化合物的提取及其药理活性研究进展[J]. 医学综述,2018,24(24):4938-4942.
[7] 李敏,费曜,李丽霞,等. 天冬中总皂苷含量测定方法的探讨[J]. 成都中医药大学学报,2004,27(4):46-48.
[8] 张志勇,熊慧林,茅向军. 天冬中菝葜皂苷元含量的双波长薄层扫描测定[J]. 时珍国医国药,2012,23(1):93-94.
[9] 曹旭林. 天冬等级划分的合理性及其遗传多样性研究[D]. 贵阳:贵州医科大学,2018.
[10] 王树春,王琰,王慕邹,等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测器法测定天冬中天冬皂苷甲含量[J]. 中国药学杂志,2004,39(7):64-65.
[11] 徐从立,陈海生,谭兴起,等. HPLC-ELSD法测定天冬总呋甾皂苷中AR-I的含量[J]. 第二军医大学学报,

- 2006,27(4):427-428.
- [12] 王贝,高琳,王杰,等.中药天冬中甾体皂苷 25-*epi*-*officinalis*nin II 的液相色谱含量测定方法的建立[J].国际药学研究杂志,2018,45(8):799-803.
- [13] LIN C L, LEE C H, CHEN C M, et al. Protodioscin induces apoptosis through ROS-mediated endoplasmic reticulum stress via the JNK/p38 activation pathways in human cervical cancer cells [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46(1):322-334.
- [14] GUO C R, DONG Y P, ZHU H Q, et al. Ameliorative effects of protodioscin on experimental diabetic nephropathy[J]. Phytomedicine, 2018, 51:77-83.
- [15] SHU K, ZHANG Y L. Protodioscin protects PC12 cells against oxygen and glucose deprivation-induced injury through miR-124/AKT/Nrf2 pathway [J]. Cell Stress Chaperones, 2019, 24(6):1091-1099.
- [16] 陈士林,刘安.中药饮片标准汤剂:第二卷[M].北京:科学出版社,2019:159-163.
- [17] 中华人民共和国香港特别行政区卫生署.香港中药材标准:第九册[M].香港:香港特别行政区中医药卫生事务部,2018:44-55.
- [18] HU K, DONG A, YAO X, et al. Antineoplastic agents. II. Four furostanol glycosides from rhizomes of *Dioscorea collettii* var. *hypoglauca* [J]. Planta Med, 1997, 63(2):161-165.
- [19] LIANG Z Z, AQUINO R, DE-SIMONE F, et al. Oligofurostanosides from *Asparagus cochinchinensis* [J]. Planta Med, 1988, 54(4):344-346.
- [20] GORYANU G M, KINTIA P K. Steroid glycosides from *Asparagus officinalis* asparagosides F and H [J]. Chem Nat Compd, 1977, 13(6):682-684.
- [21] 徐从立.中药天冬活性成分研究[D].上海:第二军医大学,2004.
- [22] SHI J G, LI G Q, HUANG S Y, et al. Furostanol oligoglycosides from *Asparagus cochinchinensis* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2004, 6(2):99-105.
- [23] 罗向东,徐国钧,徐璐珊,等.中药天门冬类的本草考证[J].中国中药杂志,1996,21(10):579-580.
- [责任编辑 刘德文]