

藏族药翼首草不同药用部位 UFLC 指纹图谱比较

李聪颖, 范刚*, 张艺, 高燕, 李文婕

(成都中医药大学 民族医药学院, 成都 611137)

[摘要] 目的:建立藏族药翼首草不同药用部位的指纹图谱,并比较翼首草地上、地下部位指纹图谱的差异。方法:采用 Agilent Proshell 120 SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 100 mm, 2.7 μm),以乙腈-0.2% 磷酸水溶液为流动相,梯度洗脱,流速 1.0 mL · min⁻¹,检测波长 238 nm,柱温 30 ℃。结果:建立了 17 个批次翼首草地上、地下部位的指纹图谱,地上部分共提取了 15 个色谱峰,其中 6,7 号峰为地下部分缺失峰,并结合对照品对其中的 5 个色谱峰进行了指认,分别为绿原酸、马钱苷、獐牙菜苷、吴茱萸苷、大花双参苷 A。相似度结果表明,地下部分相似度较好,均 > 0.9;地上部分第 2,3,7,11,16,17 批次相似度 < 0.9,其他批次均 > 0.9。结论:该方法稳定、可靠、重复性好,可用来控制翼首草的质量。

[关键词] 藏族药; 翼首草; 不同部位; 超快速液相色谱仪; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)09-0042-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015090042

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150317.1055.015.html>

[网络出版时间] 2015-03-17 10:55

UFLC Fingerprints of Different Medicinal Parts of Pterocephali Herba LI Cong-ying, FAN Gang*, ZHANG Yi, GAO Yan, LI Wen-jie (College of Ethnic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an UFLC-PDA method for the fingerprint of Pterocephali Herba, and compare the fingerprints of different medicinal parts. **Method:** The separation was performed on an Agilent Proshell 120 SB-C₁₈ (4.6 mm × 100 mm, 2.7 μm) using gradient elution with water-formic acid (100:0.2) and acetonitrile, at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The column temperature was kept at 30 ℃, and detection wavelength was set at 238 nm. **Result:** The UFLC-PDA fingerprints of 17 batches were set up. The results showed that 15 chromatographic peaks were extracted as the common peaks of fingerprint of aboveground part, while in underground part peak 6 and peak 7 were nonexistent. 5 peaks were identified as chlorogenic acid, loganin, sweroside, evodia rutaecarpa glycosides and triplotoside A. The similarity degrees were above 0.9 excepted 6 batches of aboveground part. **Conclusion:** The method has good precision, stability and repeatability that it could provide basis for quality control and evaluation of Pterocephali Herba

[Key words] Tibetan medicine; Pterocephali Herba; different medicinal parts; UFLC; fingerprint

藏族药翼首草具有解毒除瘟、清热止痢、祛风通痹^[1]等功效。现代化学及药理研究表明,翼首草中含有齐墩果烷型五环三萜皂苷类、环烯醚萜苷类、生物碱、多糖等化合物^[2-3],其中环烯醚萜苷类和五环三萜皂苷类成分是其治疗类风湿性关节炎(与藏医“真布病”相当)的主要有效成分^[4-5]。本课题组前

期对翼首草进行了植物化学成分的分离,得到了马钱苷、獐牙菜苷、吴茱萸苷、大花双参苷 A 等环烯醚萜苷类成分。翼首草为多年生草本植物,2000 年收录于由瑞士红十字会、西藏红十字会制定的濒危藏族药物种目录,2010 年版《中国药典》规定其药用部位为全草^[6],而目前其研究主要集中在对不同产

[收稿日期] 20140924(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81274193);四川省教育厅四川省省属高校科研创新团队建设计划项目(11TD004)

[第一作者] 李聪颖,在读硕士,从事中药及民族药药效物质基础及质量标准研究,Tel:13679021504,E-mail:215836002@qq.com

[通讯作者] *范刚,博士,副研究员,从事民族药质量标准及药效物质基础研究,Tel:028-61800160,E-mail:fangang1111@163.com

地^[7]、不同药用部位^[8]翼首草中总皂苷的含量比较研究,对全草指纹图谱及含量测定研究^[9-10],未能整体性体现翼首草不同药用部位所含环烯醚萜苷类和五环三萜皂苷类成分情况。本实验采用 UFLC 对翼首草不同药用部位建立指纹图谱,为翼首草资源的可持续利用提供参考。

1 材料

1.1 仪器 LC-20AD XR 型色谱仪(日本岛津公司),CQ-250 型超声波清洗器[必能信超声(上海)有限公司],BP211D 型 1/10 万电子天平(德国 Sartorius 公司)。

1.2 试药 马钱苷、獐牙菜苷、大花双参苷 A 和吴茱萸苷对照品均为实验室自制,经 UFLC-PDA 检测纯度均 > 98%;绿原酸购自成都瑞芬斯生物科技有限公司(批号 L-007-13011B,纯度 > 98%),乙腈(色谱纯,Fisher),磷酸(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司),水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

1.3 药材 本文共收集 17 批翼首草药材,经成都中医药大学民族医药学院张艺研究员鉴定为川续断科匙叶翼首草 *Pterocephalus hookeri* 的干燥全草,共收集 17 个样品。

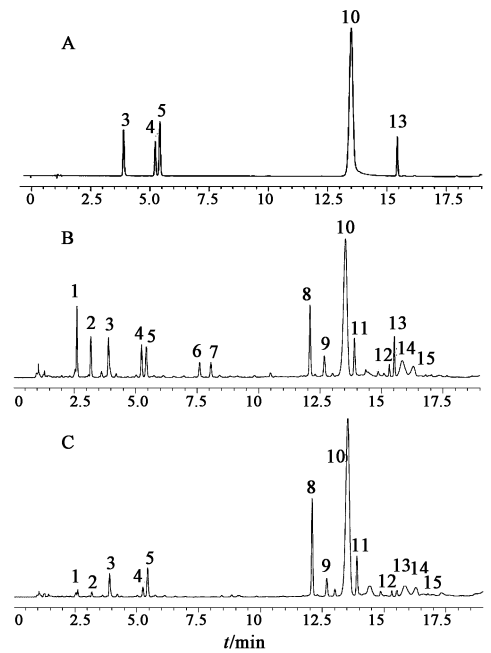
2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液 分别取绿原酸、马钱苷、獐牙菜苷、大花双参苷 A 对照品 10 mg,吴茱萸苷 20 mg,精密称定,加 25% 乙腈水溶液溶解并定容至 25 mL,作为对照品储备液。分别精密吸取适量上述对照品储备液于同一量瓶中,定容至 25 mL,配制成质量浓度分别为 28.20,22.28,38.35,31.10,487.00 mg·L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液 称取翼首草药材粉末(过 2 号筛)约 0.5 g,精密称定,置于 100 mL 具塞锥形瓶中,加入 70% 甲醇 50 mL,超声处理 30 min,取出,放冷,用 70% 甲醇补足减失质量,摇匀,滤过,取续滤液,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

2.2 色谱条件 Agilent proshell 120 SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 100 mm,2.7 μm),检测波长 237 nm,柱温 30 °C,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 4 μL,流动相乙腈(A)-0.2% 磷酸水(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min,10% ~ 19% A;10 ~ 17 min,19% ~ 30% A;17 ~ 25 min,30% ~ 100% A)。在此条件下,绿原酸、马钱苷、獐牙菜苷、吴茱萸苷、大花双参苷 A 均能达到色谱分离,理论塔板数均大于 3 000。见图 1。



A. 混合对照品溶液;B. 地上部分;C. 地下部分;3. 绿原酸;4. 马钱苷;5. 獐牙菜苷;10. 吴茱萸苷;13. 大花双参苷 A

图 1 翼首草 UFLC 指纹图谱

Fig. 1 UFLC fingerprint of *Pterocephali Herba*

2.3 方法学考察

2.3.1 精密性 取翼首草供试品溶液,按照 2.2 项下色谱条件连续进样 6 次,以 10 号峰吴茱萸苷为参照峰,15 个共有峰的相对保留时间与相对峰面积 RSD 均 < 3%,以“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件”(2004 版 A)进行评价,指纹图谱的相似度均 > 0.999,表明仪器精密性良好^[11]。

2.3.2 重复性 取翼首草药材粉末 6 份,每份 0.5 g,精密称定,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,照 2.2 项下色谱条件进样测定,记录各色谱图。以 10 号峰吴茱萸苷为参照峰计算。结果表明,15 个共有峰的相对保留时间及相对峰面积的 RSD 均 < 3%,以 2.3.1 项下方法进行评价,6 份样品的相似度均 > 0.999,表明本方法重复性良好^[11]。

2.3.3 稳定性 取翼首草地上部分药材粉末 0.5 g,精密称定,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,室温下保存,照 2.2 项下的色谱条件进样,分别于 0,2,4,8,12,24 h 进样测定。结果表明,15 个共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3%,以 2.3.1 项下方法进行评价,6 个时间点的指纹图谱的相似度均 > 0.998,表明供试品溶液在 24 h 内稳定^[11]。

2.4 样品测定 取不同批次的翼首草药材(地上部分、地下部分)各 0.5 g,按 2.1.2 项下方法制备供

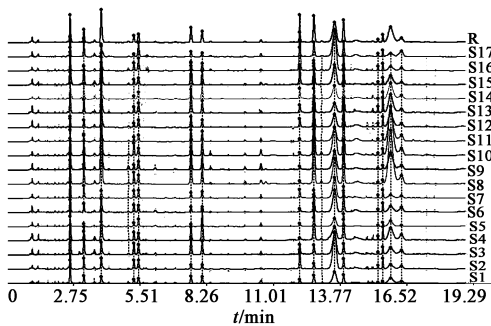
试品溶液,将供试品溶液各进样 4 μL ,记录色谱图,共获得 15 个共有峰(地下部分为 13 个共有峰)地上部分药材生成的对照指纹图谱见图 2;地下部分药材生成的对照指纹图谱见图 3。通过对照品指认,其中 5 个共有峰分别为绿原酸(3 号峰)、马钱苷(4 号峰)、獐芽菜苷(5 号峰)、吴茱萸苷(10 号峰)、

大花双参苷 A(13 号峰)。色谱图共标定了量较高的 15 个峰,其中 1,2,3,4,5,8,9,10,11,12,13,14,15 号峰为翼首草地上、地下部分共有峰;6,7 号峰为地下部分缺失峰。根据 10 号峰量高且比较稳定,将其作为参照峰(S),分别求出各峰与其相对保留时间和峰面积比值,结果见表 1。

表 1 17 批次翼首草地上、地下部分共有峰相对保留时间、相对峰面积计算

Table 1 Relative peak area and relative retention time of overgroundpart, under ground part of Pterocephali Herba

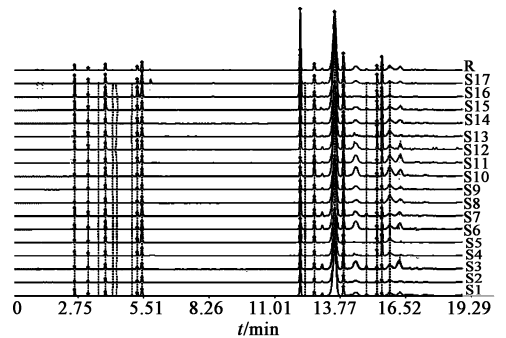
峰号	化合物	地上部分				地下部分			
		相对保留时间	RSD /%	相对峰面积	RSD /%	相对保留时间	RSD /%	相对峰面积	RSD /%
1		0.193	0.0	0.415	45.5	0.193	0.1	0.037	55.4
2		0.235	0.0	0.204	43.6	0.235	0.1	0.018	44.4
3	绿原酸	0.288	0.1	0.604	75.8	0.288	0.6	0.050	31.5
4	马钱苷	0.388	0.1	0.114	37.3	0.388	0.1	0.032	63.1
5	獐芽菜苷	0.402	0.1	0.179	39.5	0.402	0.1	0.074	36.4
6		0.562	0.06	0.306	77.1	-	-	-	-
7		0.596	0.04	0.229	68.4	-	-	-	-
8		0.894	0.06	0.186	69.2	0.893	0.06	0.164	79.5
9		0.937	0.03	0.567	73.2	0.937	0.03	0.062	29.8
10	吴茱萸苷	1.000	0.0	1.000	0.0	1.000	0.0	1.000	0.0
11		1.027	0.0	0.483	66.3	1.027	0.03	0.148	43.1
12		1.132	0.09	0.052	75.3	1.132	0.03	0.029	88.3
13	大花双参苷 A	1.147	0.08	0.128	87.4	1.147	0.03	0.071	103.2
14		1.171	0.09	1.050	84.6	1.172	0.1	0.116	50.7
15		1.204	0.09	0.235	44.5	1.204	0.04	0.091	77.3



R. 对照指纹谱;S1~S17. 17 批样品

图 2 17 批翼首草药材地上部分 UFLC 指纹谱

Fig. 2 Overlay chart of UFLC fingerprint of Pterocephali Herba (overground part) from 17 habitats



R. 对照指纹谱;S1~S11. 17 批样品

图 3 17 批翼首草药材地下部分 UFLC 指纹谱

Fig. 3 Overlay chart of UFLC fingerprint of Pterocephali Herba (underground part) from 17 habitats

2.5 相似度评价 将所得到的 17 批次翼首草药材的地上地下 UFLC 图谱以 AIA 格式依次导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件”(2004 版 A)软件,以批次 S15 药材图谱为参照谱,进行谱峰匹

配,确定了 15 (地下部位 13 个)个共有峰,生成对照指纹谱(R),进行各批次样品的相似度计算,17 批样品的地上、地下部分相似度分别见表 2。其中地上部分除 S2, S3, S7, S11, S16, S17 批次样品的相

似度较低 (<0.9), 其余批次的翼首草药材相似度较好 (>0.9)。地下部分各批次相似度均较高 (>0.9)。

表2 翼首草样品信息

Table 2 Sample source of Pteroccephali Herba

No.	产地	采集时间	相似度	
			地上部分	地下部分
S1	四川省炉霍县雅德乡	2012-08	0.946	0.994
S2	四川省白玉县纳塔乡	2012-08	0.793	0.995
S3	四川省康定县江世乡	2012-08	0.887	0.962
S4	四川省得荣县茨巫乡	2012-08	0.950	0.991
S5	四川省德格县差垭乡	2012-08	0.956	0.989
S6	四川省康定县塔公乡	2012-08	0.920	0.988
S7	四川省炉霍县更知乡	2012-08	0.847	0.988
S8	四川省阿坝县甲尔多乡	2012-08	0.917	0.990
S9	四川省阿坝县洛尔达乡	2012-08	0.922	0.992
S10	四川省阿坝县查理乡	2012-07	0.937	0.981
S11	四川省阿坝县安斗乡	2012-07	0.884	0.978
S12	四川省阿坝县麦昆乡	2012-06	0.977	0.939
S13	四川省若尔盖县垭口唐克乡	2012-07	0.931	0.973
S14	四川省阿坝县各莫乡	2012-08	0.941	0.996
S15	四川省阿坝县德格乡	2012-09	0.957	0.995
S16	云南省迪庆州香格里拉县藏医院	2012-09	0.770	0.908
S17	云南省迪庆州香格里拉县龙蟠乡	2012-09	0.847	0.993

3 讨论

翼首草为临床常用的藏族药, 常用制剂有十二味翼首草丸、十三味清肺丸、二十五味余甘子丸、七味翼首草丸、达斯玛布丸等上百首方剂, 其中有多个方剂收录于2010年版《中国药典》、《卫生部药品标准》(藏药)、《国家中成药标准汇编》等标准中, 如二十五味驴血丸、九味青鹏散、石榴普安散、洁白丸、清肺止咳丸等。2010年版《中国药典》规定其用药部位为全草^[6], 而《藏药志》中规定其药用部位是全草或根, 如果长期连根采挖, 势必对其生长和繁衍遭到严重破坏, 并限制翼首草临床广泛用药及其可持续发展应用。

本实验通过对不同地区不同药用部位翼首草指纹图谱的比较发现, 翼首草地上部分指纹图谱较

地下部分全面, 且本实验室前期分离纯化所得的环烯醚萜苷类化合物在地上及地下部位指纹图谱中均得到指认; 本实验室前期对翼首草不同药用部位总皂苷的含量测定发现, 翼首草地上部分总皂苷平均含量高达5%^[8], 同时对翼首草不同药用部位中环烯醚萜苷类化合物马钱苷含量进行测定, 结果表明药材地上部分马钱苷含量较药材地下部分含量高。翼首草不同药用部位总皂苷及马钱苷含量测定结合本实验不同药用部位指纹图谱比较研究, 提示从资源保护的角度并不影响其疗效的情况下可以考虑以翼首草地上部分入药。为藏族药翼首草的资源合理开发利用提供科学依据。

[参考文献]

- [1] 宇妥, 云单贡布. 四部医典[M]. 李永年, 译. 北京: 人民卫生出版社, 1983.
- [2] 庞伟. 藏药翼首草的研究与应用[J]. 中国民族医药杂志, 2007(5): 63-65.
- [3] Tian J, Wu F E, Qiu M H, et al. Triterpenoid saponins from *Pteroccephalus hookeri*[J]. Phytochemistry, 1993, 32(6): 1535-1542.
- [4] 沈芄. 藏药翼首草抗类风湿性关节炎作用与机理研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2002.
- [5] 张艺. 藏药翼首草及其复方然降多吉胶囊的品质评价研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2003.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 358.
- [7] 何正友, 张艺, 张旭, 等. 分光光度法测定藏药翼首草中总皂苷的含量[J]. 华西药学杂志, 2002, 17(1): 43-45.
- [8] 林升得, 江道峰, 张艺, 等. 分光光度法测定藏药翼首草不同药用部位总皂苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(5): 101-104.
- [9] 高燕, 李文婕, 李聪颖, 等. 藏药翼首草 UFLC 指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(7): 38-42.
- [10] 李文婕, 高燕, 陈一龙, 等. UFLC-PDA 同时快速测定藏药翼首草中5种化学成分的含量[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2014, 16(1): 161-166.
- [11] 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)[J]. 中成药, 2000, 22(10): 671-675.

[责任编辑 顾雪竹]