

中药一支箭 HPLC 指纹图谱

胡文超, 孟庆艳, 万传星*

(新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室,
塔里木大学 生命科学学院, 新疆 阿拉尔 843300)

[摘要] **目的:**建立中药一支箭3种基源植物尖头瓶尔小草(*Ophioglossum pedunculosum*)、狭叶瓶尔小草(*O. thermal*)和瓶尔小草(*O. vulgatum*)的HPLC指纹图谱,为科学评价药材质量提供依据。**方法:**采用HPLC方法,Waters Xbridget色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇(A)-0.3%甲酸水(B)梯度洗脱,流速1.0 mL·min⁻¹,柱温40℃,检测波长260 nm,进样量10 μL,用聚类分析、相似度分析和主成分分析方法对一支箭指纹图谱进行分析。**结果:**15批一支箭中药材归为3类,确定14个主要共有峰,在亲缘关系上狭叶瓶尔小草和瓶尔小草较近,离尖头瓶尔小草较远,利用4个对照品瓶尔小草醇,3-O-甲基槲皮素,瓶尔小草醇4'-O-β-D-葡萄糖苷和3-O-甲基槲皮素7-O-β-D-葡萄糖基-4'-O-β-D-葡萄糖苷的相对含量作为化学分类学标签可区分3个种。**结论:**一支箭HPLC指纹图谱的构建为其基源植物的质量控制和品种鉴定提供了参考。

[关键词] 一支箭; 尖头瓶尔小草; 狭叶瓶尔小草; 瓶尔小草; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)06-0061-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2016060061

Fingerprint Analysis of *Ophioglossum* by HPLC

HU Wen-chao, MENG Qing-yan, WAN Chuan-xing*

(Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin of
Xinjiang Production & Construction Corps, School of Life Science, Tarim University, Alar 843300, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the HPLC fingerprints of *Ophioglossum pedunculosum*, *O. vulgatum* and *O. thermal* of *O.* and provide basis for its quality evaluation. **Method:** HPLC method was used on Waters Xbridget column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with the mobile phase of methanol (A) -0.3% methanoic acid solution (B) for gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the column temperature was 40℃. The detection wavelength was set at 260 nm, and the injection volume was 10 μL. The fingerprints of *Ophioglossum* were analyzed by cluster analysis, similarity comparative analysis and principal component analysis. **Result:** Fifteen batches of *Ophioglossum* were classified into three kinds, and 14 main common peaks were identified in the fingerprints. The genetic relationship of *O. vulgatum* and *O. thermal* was close to each other, while far away from *O. pedunculosum*. Four control substances including ophioglonol, 3-O-methylquercetin, ophioglonol4'-O-β-D-glucopyranoside, and 3-O-methylquercetin7-O-β-D-glucopyranosyl4'-O-β-D-glucopyranoside can be served as chemotaxonomy tags for distinguishing the above three kinds. **Conclusion:** The establishment of HPLC fingerprint of *Ophioglossum* provides a reference method for quality control and species identification of its original plants.

[Key words] *Ophioglossum*; *Ophioglossum pedunculosum*; *Ophioglossum thermal*; *Ophioglossum vulgatum*; fingerprint

[收稿日期] 20150318(027)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31160074)

[第一作者] 胡文超,在读硕士,从事天然产物化学研究,Tel:15701923001,E-mail:hwhchhuwenchao@163.com

[通讯作者] *万传星,博士,教授,从事天然产物的农用及医用研究,Tel:13565169329,E-mail:wanchuanxing@163.com

中药一支箭^[1]为瓶尔小草科瓶尔小草属的蕨类植物,该属植物主要分布于东北、四川、江苏、云南、贵州、广西和台湾等地,被列为国家二级保护植物^[2]。中药一支箭具有清热解毒、活血散瘀之功效,主治毒蛇咬伤、痈肿疮毒、疥疮身痒、跌打损伤、瘀血肿痛、烧烫伤、瘀滞腹痛、肝炎、肺炎等^[3],在台湾地区称之为“药王”^[4]。现代研究发现主要含有黄酮、甘油酯类和氨基酸等化学成分,其特征化合物为高黄酮及其苷类化合物,此类黄酮在 C 环或 B 环骨架上通过 C-C 键多连一个碳而有别于黄酮、黄酮醇、查耳酮等其他类型黄酮,具有抗炎和抗乙型肝炎病毒(HBV)活性^[5-6],因而备受关注。中药一支箭通常只有一片全缘的叶片,孢子体在形态上虽然极为简单,然而在细胞学上却具有生物界最高的染色体数目(400~600),正是由于形态过于简单,反而给分类造成很大困难^[7]。目前关于瓶尔小草种属的鉴别仅限于植物形态学上,而从化学分类学角

度鉴别尚未见报道,本论文拟通过 HPLC 指纹图谱的建立为中药一支箭的鉴别和质量控制提供依据。

1 材料

1.1 仪器 LC-20AT 型高效液相色谱仪(含 LC-20AT 二元高压梯度泵,SPD-M20A 型紫外检测器,Lab Solutions 色谱工作站,日本岛津公司),BT125D 型电子分析天平(德国塞多利斯公司),XT-250A 型中药粉碎机(浙江省永康市溪安五金厂)。

1.2 试药 瓶尔小草醇,3-O-甲基槲皮素,瓶尔小草醇 4'-O-β-D-葡萄糖苷和 3-O-甲基槲皮素 7-O-β-D-葡萄糖基-4'-O-β-D-葡萄糖苷对照品为本课题组从尖头瓶尔小草中分离得到,经 NMR 鉴定其结构,纯度均 >95%。15 批一支箭药材来源见表 1,经塔里木大学万传星教授鉴定为尖头瓶尔小草 *Ophioglossum pedunculatum*,瓶尔小草 *O. vulgatum* 和狭叶瓶尔小草 *O. thermale* 的干燥全草。

表 1 一支箭药材来源

Table 1 Sources of *Ophioglossum* Spp.

No.	来源	产地	采集日期	No.	来源	产地	采集日期
S1	狭叶瓶尔小草	河北保定	2014-07	S9	狭叶瓶尔小草	广西宜州	2014-08
S2	狭叶瓶尔小草	贵州贵阳	2014-07	S10	瓶尔小草	四川阿坝	2014-07
S3	狭叶瓶尔小草	湖北咸宁	2014-09	S11	瓶尔小草	四川绵阳	2014-08
S4	狭叶瓶尔小草	四川眉山	2014-08	S12	瓶尔小草	广西河池	2014-09
S5	狭叶瓶尔小草	广西南宁	2014-07	S13	瓶尔小草	广西宜州	2014-07
S6	狭叶瓶尔小草	四川穹隆	2014-08	S14	尖头瓶尔小草	云南昆明	2014-07
S7	狭叶瓶尔小草	四川攀枝花	2014-07	S15	尖头瓶尔小草	云南大理	2014-09
S8	狭叶瓶尔小草	福建仙游	2014-07				

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters Xbridget C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),检测波长 260 nm,流动相甲醇(A)-0.3% 甲酸水(B)梯度洗脱(0~30 min, 10%~50% A; 30~50 min, 50%~80% A; 50~60 min, 80%~100% A; 100% A 保持 10 min),柱温 40 °C,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液制备 精密称取 3-O-甲基槲皮素 7-O-β-D-葡萄糖基-4'-O-β-D-葡萄糖苷 1.5 mg,瓶尔小草醇 2.0 mg,3-O-甲基槲皮素 1.5 mg 和瓶尔小草醇 4'-O-β-D-葡萄糖苷 1.5 mg 置 10 mL 量瓶中,加 50% 甲醇至刻度,摇匀,配成质量浓度分别为 0.15, 0.20, 0.15, 0.15 g·L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备 称取尖头瓶尔小草、狭叶瓶尔小草和瓶尔小草的干燥品(过 100 目筛)各 5.0

g,分别用 75% 甲醇溶液 150 mL,80 °C 热回流提取 4 h,室温冷却后,取 1 mL 提取液过 0.45 μm 的微孔滤膜,备用。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一供试品溶液(S1),按 2.1 项下方法重复进样 6 次,结果各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%,表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取 S1 药材粉末 6 份,按 2.3 项方法平行制备 6 份供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样分析,各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%,表明本方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一供试品溶液(S1),按 2.1 项下色谱条件,分别在 0, 4, 8, 12, 24 h 进样,各

主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%, 表明供试品溶液 24 h 内稳定。

2.5 样品测定 取 9 批狭叶瓶尔小草、4 批瓶尔小草及 2 批尖头瓶尔小草药材样品, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 在 2.1 项下色谱条件依次进样测定, 记录 HPLC 色谱图。所有药材的 HPLC 指纹图谱, 见图 1。

2.6 指纹图谱分析

2.6.1 相似度评价^[8] 将 S1 ~ S15 样品色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004 版软件, 通过多点校正法对色谱峰进行自动匹配, 得到 15 批一支箭药材提取物色谱指纹图谱, 并根据匹配结果确定了 14 个主要共有峰, 以 S1 样品图谱作为参照图谱, 进行相似度计算, 见表 2。狭叶瓶尔小草

共有模式之间的相似度除 S8 外均 > 0.90, 瓶尔小草 4 个样本间的相似度均 > 0.70, 尖头瓶尔小草 2 个样本之间的相似度为 0.95, 从上述结果可以看出不同地区同种一支箭药材相似度较高但存在一定的差异。

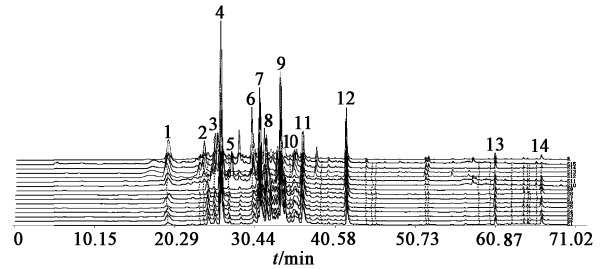


图 1 中药一支箭 HPLC 指纹图谱

Fig.1 HPLC fingerprint chromatograms of *Ophioglossum* Spp.

表 2 15 批次样品相似度评价

Table 2 Similarities for 15 batches of samples

批次	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	R
S1	1.00	0.97	0.94	0.99	0.96	0.94	0.99	0.87	0.94	0.59	0.71	0.63	0.60	0.44	0.50	0.97
S2	0.97	1.00	0.98	0.96	0.96	0.99	0.97	0.74	0.88	0.68	0.78	0.72	0.70	0.46	0.52	0.99
S3	0.94	0.98	1.00	0.93	0.98	0.98	0.94	0.70	0.89	0.69	0.78	0.73	0.71	0.45	0.51	0.98
S4	0.99	0.96	0.93	1.00	0.96	0.94	0.99	0.87	0.94	0.57	0.70	0.62	0.59	0.43	0.49	0.97
S5	0.96	0.96	0.98	0.96	1.00	0.94	0.96	0.80	0.96	0.59	0.71	0.64	0.60	0.41	0.46	0.98
S6	0.94	0.99	0.98	0.94	0.94	1.00	0.94	0.68	0.84	0.72	0.81	0.75	0.74	0.46	0.53	0.98
S7	0.99	0.97	0.94	0.99	0.96	0.94	1.00	0.85	0.93	0.60	0.71	0.64	0.62	0.47	0.53	0.97
S8	0.87	0.74	0.70	0.87	0.80	0.68	0.85	1.00	0.92	0.26	0.42	0.35	0.32	0.33	0.38	0.77
S9	0.94	0.88	0.89	0.94	0.96	0.84	0.93	0.92	1.00	0.44	0.59	0.51	0.47	0.38	0.42	0.91
S10	0.59	0.68	0.69	0.57	0.59	0.72	0.60	0.26	0.44	1.00	0.94	0.77	0.81	0.61	0.65	0.66
S11	0.71	0.78	0.78	0.70	0.71	0.81	0.71	0.42	0.59	0.94	1.00	0.79	0.80	0.66	0.70	0.77
S12	0.63	0.72	0.73	0.62	0.64	0.75	0.64	0.35	0.51	0.77	0.79	1.00	0.95	0.56	0.70	0.70
S13	0.60	0.70	0.71	0.59	0.60	0.74	0.62	0.32	0.47	0.81	0.80	0.95	1.00	0.58	0.73	0.69
S14	0.44	0.46	0.45	0.43	0.41	0.46	0.47	0.33	0.38	0.61	0.66	0.56	0.58	1.00	0.95	0.47
S15	0.50	0.52	0.51	0.49	0.46	0.53	0.53	0.38	0.42	0.65	0.70	0.70	0.73	0.95	1.00	0.54
R	0.97	0.99	0.98	0.97	0.98	0.98	0.97	0.77	0.91	0.66	0.77	0.70	0.69	0.47	0.54	1.00

2.6.2 聚类分析 将 15 批一支箭基源植物色谱峰相对峰面积导入 SPSS 19.0 软件对其进行系统聚类分析, 采用组间联接聚类法, 度量标准采用欧氏距离, 聚类结果见图 2, 样品被聚为 3 类, S1 ~ S9 狭叶瓶尔小草聚为一类, S10 ~ S13 瓶尔小草聚为一类, S14 ~ S15 尖头瓶尔小草聚为一类。当 $0 \leq R \leq 10$ 时, 狭叶瓶尔小草除 S8 以外已聚在一块, 说明狭叶瓶尔小草间的相似度较高, 当 $R = 19$ 时狭叶瓶尔小草和瓶尔小草聚为一块, 而当 $R = 25$ 时 3 个种才能

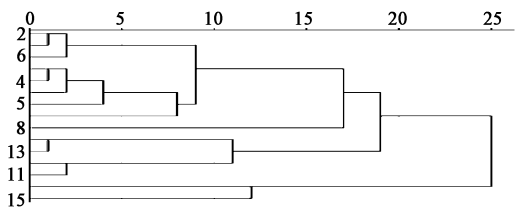


图 2 中药一支箭样品聚类分析

Fig.2 Hierarchical cluster analysis of *Ophioglossum* Spp. samples

聚为一块, 可以认为狭叶瓶尔小草和瓶尔小草的亲缘关系较近, 离尖头瓶尔小草较远。

2.6.3 主成分分析 以 S1 ~ S15 15 个样品 14 个共有峰相对峰面积为变量,采用 SPSS 19.0 软件进行主成分(PCA)分析,一共提取 3 个主成分,对于主成分 1,狭叶瓶尔小草除 S8 的贡献系数在 0.521,其余样品贡献系数均 >0.8,瓶尔小草的贡献系数均 >0.7,对于主成分 2 尖头瓶尔小草的贡献系数均 >0.6,见表 3。从三维主成分图来看,主要聚集在 3 部分;S1 ~ S9, S10 ~ S13 和 S14 ~ S15,可以区分 3 个种且这 3 组之间有不同程度的离散,说明一支箭基源植物常见 3 个种间有不同程度的差异,见图 3。

表 3 3 种主成分矩阵

Table 3 Component matrix

No.	1	2	3
S1	0.943	-0.319	0.041
S2	0.982	-0.103	-0.082
S3	0.983	-0.068	-0.099
S4	0.937	-0.326	0.064
S5	0.952	-0.270	-0.047
S6	0.975	0.005	-0.139
S7	0.947	-0.289	0.084
S8	0.521	-0.702	0.371
S9	0.812	-0.542	0.175
S10	0.795	0.461	-0.246
S11	0.798	0.453	-0.195
S12	0.742	0.555	-0.174
S13	0.723	0.591	-0.163
S14	0.352	0.648	0.629
S15	0.430	0.724	0.515

2.6.4 对照指纹图谱及相对含量分析 将 9 份狭叶瓶尔小草、4 份瓶尔小草和 2 份尖头瓶尔小草分别建立指纹图谱,将其与对照指纹图谱进行比较。在 40 ~ 60 min,尖头瓶尔小草比瓶尔小草多出 2 个明显的色谱峰(15, 18 号峰),比狭叶瓶尔小草多出 4 个色谱峰(15 ~ 18 号峰),见图 4。通过对比 4 个对照品在 3 个种中的相对峰面积。瓶尔小草主要含

表 4 中药一支箭对照品相对峰面积

Table 4 Relative contents of reference substances of *Ophioglossum* Spp.

品种	3-O-甲基槲皮素 7-O-β-D-葡萄糖基-4'-O-β-D-葡萄糖糖苷	瓶尔小草醇 4'-O-β-D-葡萄糖糖苷	瓶尔小草醇	3-O-甲基槲皮素
狭叶瓶尔小草	16.77	13.61	7.71	6.46
瓶尔小草	24.94	5.46	1.90	3.43
尖头瓶尔小草	8.19	10.61	4.23	2.39

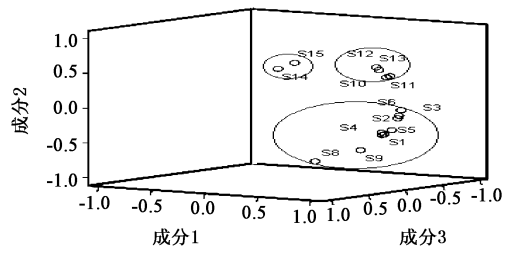
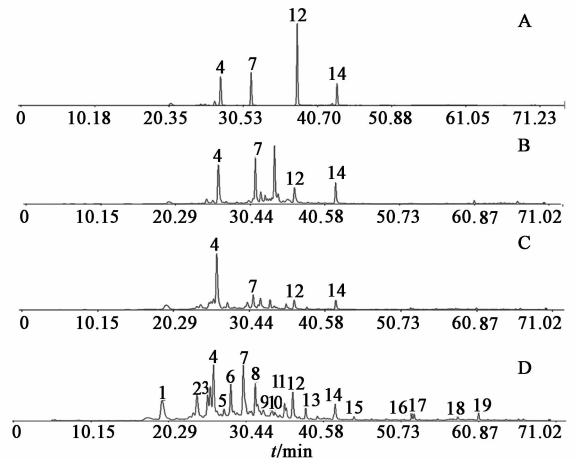


图 3 中药一支箭主成分分析

Fig. 3 PCA analysis of *Ophioglossum* samples

有 3-O-甲基槲皮素 7-O-β-D-葡萄糖基-4'-O-β-D-葡萄糖糖苷,狭叶瓶尔小草和尖头瓶尔小草主要含有 3-O-甲基槲皮素 7-O-β-D-葡萄糖基-4'-O-β-D-葡萄糖糖苷和瓶尔小草醇 4'-O-β-D-葡萄糖糖苷,瓶尔小草醇和 3-O-甲基槲皮素的相对含量较低,而尖头瓶尔小草的化学成分较复杂,通过对比一支箭基源植物 3 个种的对照指纹图谱及对照品的相对含量,可以看出种间差别是比较明显的,见表 4。



A. 混合对照品; B. 狭叶瓶尔小草; C. 瓶尔小草; D. 尖头瓶尔小草; 4. 3-O-甲基槲皮素 7-O-β-D-葡萄糖基-4'-O-β-D-葡萄糖糖苷; 7. 瓶尔小草醇 4'-O-β-D-葡萄糖糖苷; 12. 瓶尔小草醇; 14. 3-O-甲基槲皮素

图 4 中药一支箭对照特征图谱及混合对照品 HPLC

Fig. 4 HPLC chromatograms of *Ophioglossum* samples and mixed reference substances

3 讨论

比较了热回流、超声等提取方法,热回流的提取

效果最佳,分别对提取溶剂50%,75%,100%甲醇进行了考察,结果表明,以75%甲醇提取的样品,色谱峰个数较多,且峰面积较大,提取时间分别考察了2,3,4,5 h,最终提取方法确定用75%甲醇热回流4 h。

分别考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.3%甲酸水和甲醇-0.3%甲酸水等溶剂系统,流动相选择甲醇-0.3%甲酸水分离效果最佳,使用二极管阵列检测器对样品进行190~400 nm全波长扫描,重点考察了260,330,350,380 nm的图谱^[9],结果显示,检测波长在260 nm下出峰较多,各峰分离效果较好,特征峰明显。

本论文采用HPLC指纹图谱方法将15批一支箭中药材归为3类,确定了一支箭3种基源植物的14个主要共有峰,在3个种的种间亲缘关系上,狭叶瓶尔小草和瓶尔小草较近,离尖头瓶尔小草较远。采用瓶尔小草醇,3-O-甲基槲皮素,瓶尔小草醇4'-O-β-D-葡萄糖苷和3-O-甲基槲皮素7-O-β-D-葡萄糖基4'-O-β-D-葡萄糖苷4种对照品的相对含量来区分3个种,HPLC指纹图谱的建立为中药一支箭品种鉴定和质量控制提供了依据。

[参考文献]

[1] 秦仁昌. 中国植物志. 第2卷[M]. 北京: 北京科学出版社, 1959: 6-10.

- [2] 秦仁昌. 中国蕨类植物科属的系统排列和历史来源[J]. 植物分类学报, 1978, 16(3): 1-19.
- [3] 赵继祖. 中药一枝箭治疗蛇咬伤1例体会[J]. 甘肃中医, 2001, 14(4): 51.
- [4] 卢伟, 陈晟玮, 董心怡. 一叶草的性状及显微鉴别[J]. 福建中医学院学报, 2009, 19(3): 10-13.
- [5] Lin Y L, Shen C C, Huang Y J, et al. Homoflavonoids from *Ophioglossum petiolatum* [J]. J Nat Prod, 2005, 68(3): 381-384.
- [6] Wan C X, Zhang P H, Luo J G, et al. Homoflavonoid glucosides from *Ophioglossum pedunculatum* and their anti-HBV activity [J]. J Nat Prod, 2011, 74(4): 683-689.
- [7] 王中仁. 有梗瓶尔小草叶的多形性和染色体数目[J]. 植物学报, 1986, 28(5): 472-476.
- [8] 薛丹丹, 张科卫, 钱璉. 干姜、姜皮和姜炭的HPLC指纹图谱比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(5): 57-60.
- [9] Wan C X, Luo J G, Gu Y C, et al. Characterisation of homoflavonoids from three *Ophioglossum* species using liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionisation tandem mass spectrometry [J]. Phytochem Anal, 2013, 24(6): 541-549.

[责任编辑 顾雪竹]

《中国实验方剂学杂志》入选2015—2016年度CSCD(E)

经过中国科学院“中国科学引文数据库(Chinese Science Citation Database,简称CSCD)”定量遴选、专家定性评估,《中国实验方剂学杂志》入选2015—2016年度CSCD(E)。

2015—2016年度CSCD收录来源期刊1200种,其中中国出版的英文期刊194种,中文期刊1006种。CSCD来源期刊分为核心库和扩展库两部分,其中核心库872种(以备注栏中C为标记);扩展库328种(以备注栏中E为标记)。

CSCD具有建库历史最为悠久、专业性强、数据准确规范、检索方式多样、完整、方便等特点,自提供使用以来,深受用户好评,被誉为“中国的SCI”。CSCD是我国第一个引文数据库,曾获中国科学院科技进步二等奖。该数据库已在我国科研院所、高等学校的课题查新、基金资助、项目评估、成果申报、人才选拔以及文献计量与评价研究等多方面作为权威文献检索工具获得广泛应用。