

藏药三果汤散抗氧化有效成分的薄层色谱-生物自显影 及 HPLC 指纹图谱

德洛, 姚喆, 冀静, 杨继家, 罗尚华, 兰莎, 唐策, 张艺*
(成都中医药大学民族医药学院, 成都 611137)

[摘要] 目的:初步建立藏药三果汤散的 HPLC 指纹图谱,研究藏药三果汤散的抗氧化活性,初步筛选出三果汤散中抗氧化有效成分。方法:采用薄层色谱-生物自显影技术和 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)分光光度法对不同来源的三果汤散、单味药对照药材及其中单体成分没食子酸、没食子酸乙酯、鞣花酸、柯里拉京进行抗氧化作用初步测定,并采用高效液相色谱法初步建立了三果汤散的指纹图谱。结果:不同来源的三果汤散的抗氧化作用差异不大,所含化学成分以没食子酸抗氧化作用最强,揭示没食子酸可能是三果汤散抗氧化的主要有效成分之一。结论:该方法准确、简便可行,为进一步探索三果汤散抗氧化有效成分提供了科学依据。

[关键词] 藏药; 三果汤散; 抗氧化; 薄层色谱-生物自显影; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0098-05

Preliminary Study for Antioxidant Components of Tibetan Medicine Sanguo Tang San by TLC-bioautography and HPLC Fingerprinting

DE Luo, YAO Zhe, JI Jing, YANG Ji-jia, LUO Shang-hua, LAN Sha, TANG Ce, ZHANG Yi *

(College of Ethnic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the antioxidant ability and preliminarily screen antioxidant components in Tibetan medicine Sanguo Tang San with TLC-bioautography, HPLC fingerprinting and spectrophotography. **Method:** The antioxidant ability of Sanguo Tang San from different areas, single herbs and formula's chemical components, including gallic acid, ethyl gallate, ellagic acid and corilagin, were initially evaluated. And then the analysis methods for antioxidant components were established. **Result:** Sanguo Tang San from different sources had similar antioxidant activity revealed, as well as gallic acid had the best antioxidant activity of all components. It indicated that gallic acid might be one of the major antioxidant active components in Sanguo Tang San from different resources. **Conclusion:** This method was accurate and reliable, which supplied scientific basis for further exploring antioxidant components of Sanguo Tang San.

[Key words] Tibetan medicine; Sanguo Tang San; antioxidant; TLC-bioautography; HPLC

藏药三果汤散由诃子 *Terminalia chebula* Retz.、毛诃子 *T. billerica* (Gaertn.) Roxb. 以及余甘子 *Phyllanthus emblica* L. 三味药组成^[1], 主治瘟疫、紊乱热症、促使热症成型^[2]。三果汤散作为高原地区治疗高原疾病的特殊疗法“放血疗法”实施前的常用方剂, 具有促使坏血与机体正血分离的作用^[3]。现代研究表明, 三果汤散中主要化学成分为没食子酸、鞣花酸等有机酸类成分^[4]。

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)是较普遍用于体外测定物质抗氧化能力的试药, 具有稳定性好、

[收稿日期] 20110528(003)
[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973957, 30960507); 教育部博士点专项科研基金项目(20095132110008)
[第一作者] 德洛, 硕士, 助教, 从事藏医药基础理论及藏药药效物质基础研究, Tel: 13558772006, E-mail: DeLuo2006@Yahoo.com.cn
[通讯作者] * 张艺, 研究员, 博士生导师, 从事中药及民族药药效物质基础研究, Tel: 13730605702, E-mail: 9006zmy@sina.com

简便易行、灵敏可靠等优点。薄层色谱-生物自显影(TLC-bioautography)是一种将薄层色谱分离和生物活性测定相结合的药物筛选方法,具有操作简单、成本低、灵敏度高和专属性强等优点,是一种快速测定生物抗氧化活性的方法^[5]。

本实验对不同来源的三果汤散、各单味药对照药材及部分化学成分单体采用薄层色谱-生物自显影及 HPLC 指纹图谱法进行了研究,结合分光光度法实现对三果汤散内各种抗氧化成分进行快速筛选,以期初步揭示三果汤散的抗氧化有效成分。

1 材料

1.1 仪器 MAPADA UV-1600 型紫外-可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司),电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司),LC-10ATvp 型高效液相色谱仪及 SPD-10Avp 型紫外检测器(日本岛津公司),N2000 色谱工作站(浙江大学智达信息工程有限公司),KQ3200E 型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司),BSA-124D 型电子天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司),Ultimate-LP RP-C₁₈ 色谱柱(美国 Welch 公司),薄层色谱层析缸(200 mm × 100 mm,上海信谊仪器厂),聚酰胺薄膜(20 cm × 10 cm,浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂),微量毛细点样管(内径 0.3 mm,华西医科大学仪器厂),有机相微孔滤头(0.45 μm,天津市津腾实验设备有限公司),UPT-I-10T 型超纯水机(上海优普实业有限公司)。

1.2 药品与试剂 DPPH(批号 S43654-098,购于美国 Sigma 公司);其他试剂均为分析纯;水为超纯水。没食子酸对照品(批号 110831-200302),诃子对照药材(批号 121015-200503),毛诃子对照药材(批号 121200-101),余甘子对照药材(批号 121289-20040)均购自于中国药品生物制品检定所。选择没食子酸为 DPPH 分光光度法测定的阳性药物。鞣花酸、没食子酸乙酯、柯里拉京对照品为实验室自制,采用面积归一化法计算,纯度 ≥ 98%。不同来源三果汤散(过 3 号筛)见表 1。

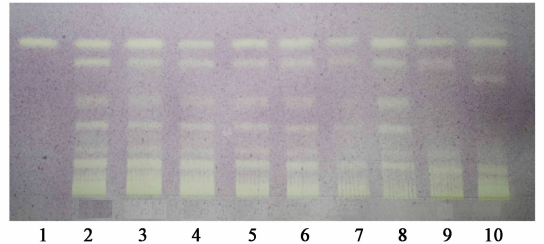
表 1 三果汤散列表

No.	批次	样品来源
1	2011010501	西藏藏医学院标本馆
2	2011010502	西藏藏医学院
3	2011010503	西藏藏医学院藏药厂
4	2011010504	西藏自治区藏药厂
5	2011010505	山南藏医院
6	2011010506	拉萨藏药材专营店

2 藏药三果汤散抗氧化成分薄层色谱-生物自显影研究

2.1 供试品、对照品及 DPPH 溶液制备 称取不同来源的三果汤散样品粉末及余甘子、诃子、毛诃子对照药材各约 0.5 g,加入甲醇 20 mL,超声 30 min,过滤,即得。称取没食子酸对照品适量,加甲醇配制成浓度约 0.2 g · L⁻¹ 的对照品溶液即得。称取 DPPH 约 0.05 g,溶于 50 mL 无水乙醇溶液中,即得 0.1% DPPH 无水乙醇溶液,避光冷藏保存。

2.2 不同批次三果汤散样品抗氧化成分薄层鉴别 对 6 批不同来源三果汤散进行薄层鉴别,点于同一聚酰胺薄膜上,以乙酸乙酯-丁酮-甲酸-水(10:1:2:0.45)为展开体系,采用同种展开剂二次展开的方法进行展开,取出,晾干,喷以 0.1% DPPH 无水乙醇溶液,置于 30 °C 烘箱内显色 30 min,于日光下检视,薄层色谱图见图 1。



1. 没食子酸对照品; 2~7. 分别为三果汤散样品(2011010501-2011010506); 8. 余甘子对照药材; 9. 诃子对照药材; 10. 毛诃子对照药材
(T=9 °C, RH=20%)

图 1 三果汤散薄层色谱-生物自显影图谱

3 分光光度法测定藏药三果汤散及各单体化合物抗氧化作用

3.1 DPPH 待测溶液制备 称取 DPPH 适量,置 25 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,配制成浓度为 0.484 g · L⁻¹ 的储备液,置 4 °C 下避光保存;精密吸取 12 mL DPPH 储备液,置 100 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,即得浓度为 0.058 g · L⁻¹ 的 DPPH 待测溶液。

3.2 供试品、对照药材、对照品及阳性药溶液制备 称取不同来源三果汤散样品粉末 0.025 g,加入 30% 甲醇 50 mL,称重,超声提取 30 min,冷却,用 30% 甲醇补足质量,滤过,再取续滤液 2 mL 至 50 mL 量瓶内,加甲醇定容至刻度,即得。

分别称取余甘子、毛诃子、诃子对照药材粉末 0.025, 0.025, 0.05 g,加入 30% 甲醇 50 mL,称重,超声提取 30 min,冷却,用 30% 甲醇补足质量,滤过,再取续滤液 2 mL 至 50 mL 量瓶内,加甲醇定容

至刻度,即得。

称取没食子酸没食子酸对照品适量,加甲醇配制成浓度为 $0.003 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。

称取没食子酸乙酯对照品适量,加甲醇配制成浓度为 $0.0062 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。

称取鞣花酸对照品适量,加甲醇配制成浓度为 $0.0042 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。

称取柯里拉京对照品适量,加甲醇配制成浓度为 $0.0084 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。

3.3 空白溶剂吸光度 (A_0) 的测定 精密量取 DPPH 待测溶液 2 mL,再加入甲醇 2 mL,混合均匀,30 ℃ 水浴 30 min,于 517 nm 波长下测定其 $A_0 = 0.696$ 。

3.4 清除率测定方法 分别取 3.2 项下各溶液不同体积适量,置 10 mL 离心管中,加甲醇至 2 mL,摇匀。再分别加入 2 mL DPPH 溶液,摇匀,30 ℃ 水浴放置 30 min(避光),在 517 nm 下测定 A_s 。计算清除率。抗氧化活性的清除率计算公式为:

$$\text{清除率} = (A_0 - A_s) \times 100 / A_0$$

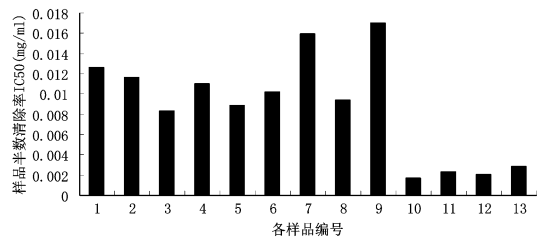
将清除率 ($Y, \%$) 对生药浓度 ($X, \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 求其函数方程。根据函数方程求出清除率为 50% 时药物的浓度 (IC_{50}),见表 2 及图 2。

表 2 各批次三果汤、各对照药材、单体及阳性药的 IC_{50} 测定

各批次、对照药材、单体及阳性药	方程	R^2	$\text{IC}_{50} / \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
2011010501	$Y = 3.355X + 7.7719$	0.9924	0.0126
2011010502	$Y = 4.378.3X - 0.726$	0.9978	0.0116
2011010503	$Y = 5.150.9X + 7.5284$	0.9988	0.0083
2011010504	$Y = 4.327.1X + 2.2436$	0.9965	0.0110
2011010505	$Y = 4.683.9X + 8.3341$	0.9932	0.0089
2011010506	$Y = 4.166.7X + 7.4425$	0.9940	0.0102
余甘子	$Y = 3.241.2X - 1.6289$	0.9986	0.0159
毛诃子	$Y = 6.425.4X - 10.627$	0.9937	0.0094
诃子	$Y = 2.548X + 6.221$	0.9965	0.0170
没食子酸	$Y = 27.394X + 3.9949$	0.9988	0.0017
没食子酸乙酯	$Y = 21.689X - 0.394$	0.9921	0.0023
鞣花酸	$Y = 22.682X + 3.1062$	0.9976	0.0021
柯里拉京	$Y = 14.002X + 8.7576$	0.9927	0.0029

4 藏药三果汤散化学指纹图谱研究

4.1 色谱条件 Ultimate-LP RP- C_{18} 色谱柱 (4.60 mm \times 250 mm 5 μm),流动相乙腈 (A)-0.25% 甲酸 (B) 溶液梯度洗脱 (0 ~ 6 min, 1% ~ 4% A, 99% ~ 96% B, 6 ~ 25 min, 4% ~ 5% A, 96% ~ 95% B, 25 ~ 65 min, 5% ~ 18% A, 95% ~ 82% B, 65 ~ 85 min, 18% ~ 18% A, 82% ~ 82% B, 85 ~ 90 min, 18% ~



- 1 ~ 6. 分别为三果汤散样品 (2011010501-2011010506);
7. 余甘子对照药材; 8. 毛诃子对照药材; 9. 诃子对照药材;
10. 没食子酸对照品; 11. 没食子酸乙酯对照品;
12. 鞣花酸对照品; 13. 柯里拉京对照品

图 2 不同来源三果汤散、单味药对照药材及单体化合物 IC_{50} ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 比较

19% A, 82% ~ 81% B)。流速为 $0.85 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 280 nm, 柱温 30 ℃。

4.2 供试品及对照品溶液制备 称取三果汤散 0.1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶内, 加入 20% 乙腈^[6] (乙腈-水 = 2: 8) 50 mL, 称定质量, 超声 (功率 150 W, 频率 33 kHz) 处理 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 20% 乙腈补足减失质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

分别称取没食子酸对照品、没食子酸乙酯对照品及鞣花酸对照品适量, 加甲醇配制成质量浓度分别为 $0.105, 0.072, 0.132 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液, 见图 3。

4.3 方法学考察

4.3.1 精密度试验 取同一批三果汤散供试品溶液连续进样 6 次, 记录指纹图谱。其主要共有峰相对保留时间与相对峰面积的 RSD 分别为 0.43% ~ 1.38%, 0.77% ~ 1.95%, 结果表明仪器精密度较好, 符合要求。

4.3.2 稳定性试验 取同一批三果汤散供试品溶液分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进针 6 次, 记录指纹图谱。其主要共有峰相对保留时间与相对峰面积的 RSD 分别为 0.39% ~ 0.88%, 0.68% ~ 2.74%, 结果表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

4.3.3 重复性试验 取同一批三果汤散供试品 6 份, 按 4.2 项下方法制成供试品溶液, 依次进针, 记录指纹图谱。其主要共有峰相对保留时间与相对峰面积的 RSD 分别为 0.20% ~ 0.85%, 1.44% ~ 2.57%, 结果表明实验方法重复性较好。

4.4 不同来源三果汤指纹图谱分析及相似度评价 取不同来源三果汤散按 4.2 项下进行制备, 按 4.1 项下色谱条件进行测定。对共有峰进行选择, 进行相似度评价, 如图 4。

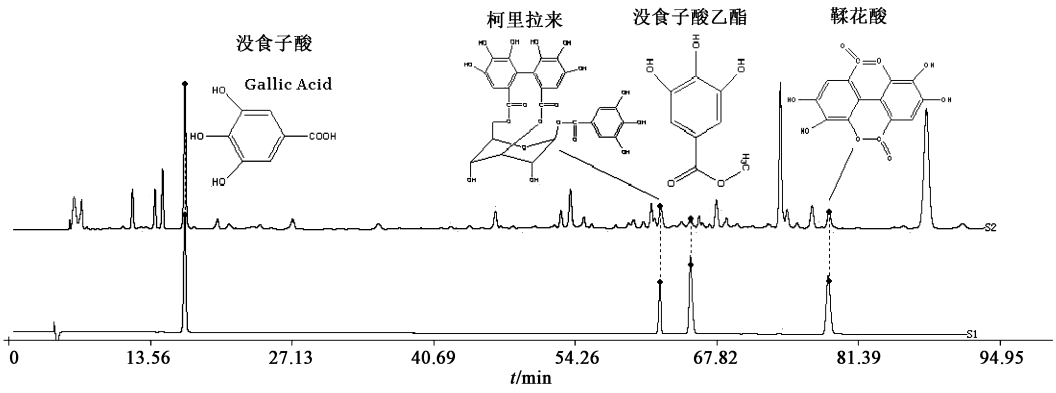
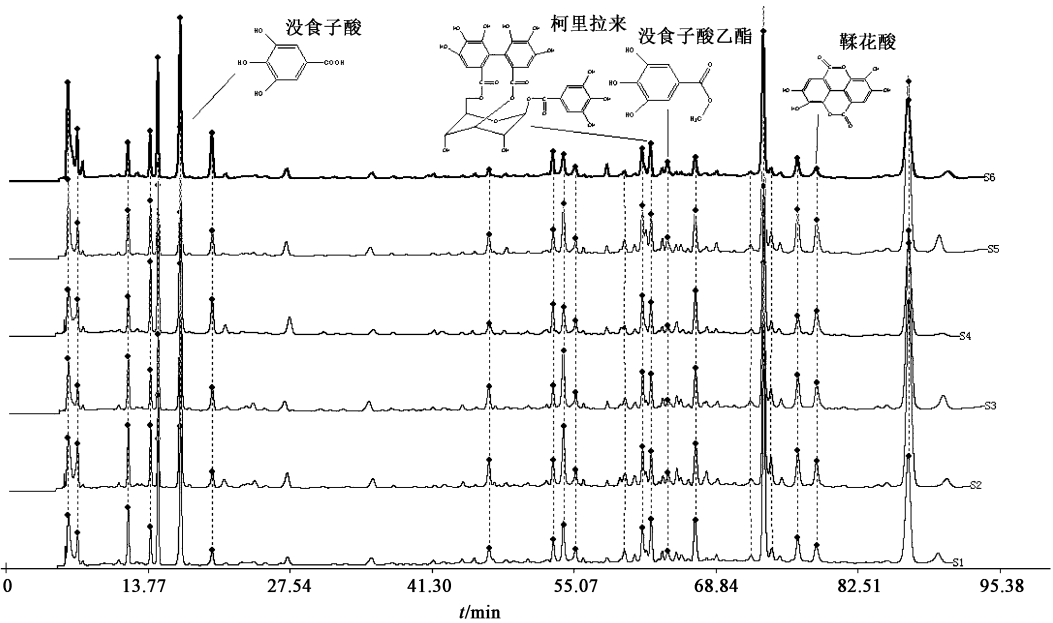


图3 三果汤散供试品(S₂)及混合对照品溶液(S₁) HPLC 色谱



S₁. 拉萨藏药材专营店; S₂. 山南藏医院; S₃. 西藏藏医学院; S₄. 西藏藏医学院标本馆; S₅. 西藏藏医学院藏药厂; S₆. 西藏自治区藏药厂

图4 6批不同来源三果汤散 HPLC 指纹图谱色谱图

共选择反映三果汤散色谱情况的 19 个色谱峰为共有峰,所选共有峰之和超过总峰面积的 90%。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版》对 6 批次三果汤散进行相似度评价,以西藏自

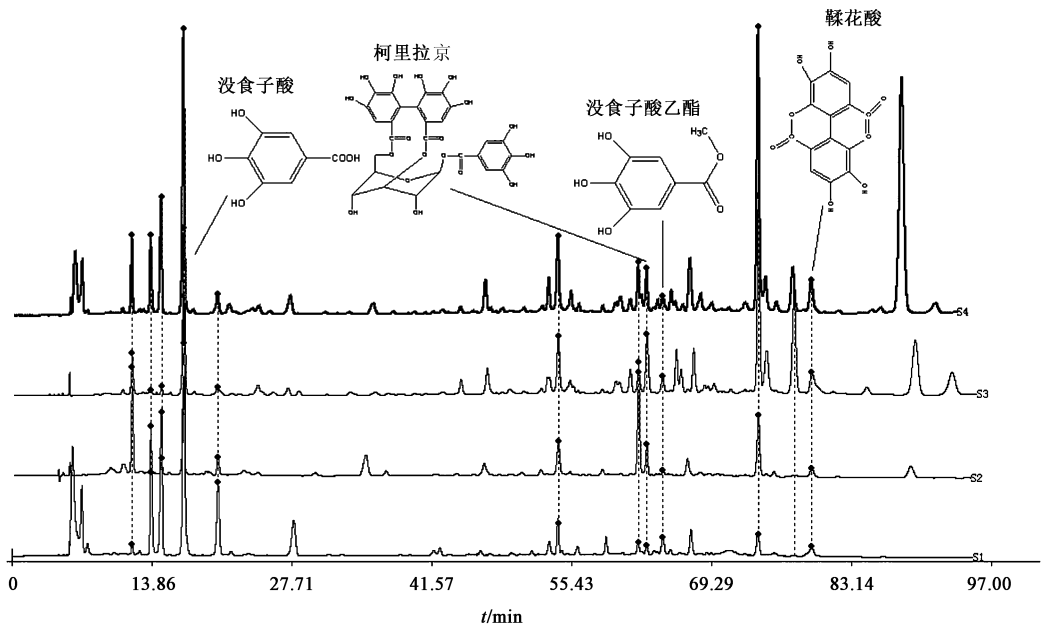
治区藏药厂指纹图谱为参照谱,根据相关系数法计算三果汤散图谱相似度,结果显示各批次三果汤散相似度均在 0.90 以上,说明该方剂品质较为稳定,差异不大。见表 3。

表3 6批次三果汤散指纹图谱相似度分析

	拉萨藏药材 专营店	山南藏医院	西藏藏医 学院	西藏藏医学院 标本馆	西藏藏医学院 藏药厂	西藏自治区 藏药厂	对照指纹 图谱
拉萨藏药材专营店	1	0.963	0.964	0.916	0.969	0.951	0.988
山南藏医院	0.963	1	0.989	0.899	0.96	0.922	0.987
西藏藏医学院	0.964	0.989	1	0.883	0.968	0.915	0.985
西藏藏医学院标本馆	0.916	0.899	0.883	1	0.855	0.928	0.935
西藏藏医学院藏药厂	0.969	0.96	0.968	0.855	1	0.901	0.974
西藏自治区藏药厂	0.951	0.922	0.915	0.928	0.901	1	0.959
对照指纹图谱	0.988	0.987	0.985	0.935	0.974	0.959	1

4.5 三果汤及各单味药化学成分归属指纹图谱分析 取诃子、毛诃子及余甘子对照药材按 4.2 项下

进行制备,按 4.1 项下色谱条件进行测定。将其与三果汤散指纹图谱进行比较,如图 5。



S₁. 余甘子对照药材; S₂. 诃子对照药材; S₃. 毛诃子对照药材; S₄. 三果汤散供试品;

图 5 三果汤散及各单味药 HPLC 指纹图谱色谱图

HPLC 指纹图谱结果揭示了三果汤散中化学成分如没食子酸、没食子酸乙酯、鞣花酸、柯里拉京在各单味药中都存在,而各单味药之间毛诃子的化学成分较余甘子、诃子更为丰富。

5 总结与讨论

薄层色谱-生物自显影技术不仅具有传统薄层鉴别检识的目的,还能直接揭示药物中的抗氧化成分,实现快速筛选。本文结合高效液相指纹图谱和分光光度法,将单一的整体数据与各成分进行关联,具有互补作用。在此基础上对三果汤散药效物质基础的进一步研究提供科学依据。

DPPH 自由基清除及薄层色谱-生物自显影实验结果表明不同批次三果汤散抗氧化作用差异不大。没食子酸在薄层检识中显示出较强的抗氧化作用,为三果汤散主要化学成分之一。以半数清除率(IC₅₀)进行比较,西藏藏医学院标本馆样品抗氧化作用略低于其他批次。余甘子、诃子、毛诃子体外抗氧化作用强弱顺序为毛诃子 > 余甘子 > 诃子。此外没食子酸较没食子酸乙酯、鞣花酸以及柯里拉京显示出更强的体外抗氧化作用。

藏医传统理论中高原疾病的主要诱因为“血”和“隆”紊乱。余甘子作为治疗“血”病的重要药物,在三果汤散中有着重要的作用,但在自由基清除能力测定中,毛诃子的抗氧化能力高于余甘子,指纹图

谱研究中也表明毛诃子所含化学成分也更为丰富。说明毛诃子做为三果汤中重要的抗氧化药物,有进一步研究的意义和必要性。

[参考文献]

- [1] 贾敏如,王张,邝婷婷,等. 印度《阿育吠陀药典》所载药物与我国相应传统药物的比较[A]. 中医药创新与发展-民族医药发展与创新[C]. 成都:四川科学技术出版社,2010:123.
- [2] 宇妥·元丹贡布,著,马世林,译. 四部医典[M]. 上海:上海科学技术出版社,1987.
- [3] 占堆,赵军宁. 藏医成方制剂现代研究与临床应用[M]. 四川:四川科学技术出版社,2009.
- [4] 姚喆,冯冠榕,伍文彬,等. 基于藏医药理论与临床经验防治高原病的藏药初步研究[C]. 成都:四川科学技术出版社,2010:99.
- [5] 谷丽华,吴毅,张紫佳,等. 应用薄层色谱-生物自显影技术评价乌药等三种中药的抗氧化活性[J]. 药学报,2006,41(10):956.
- [6] V Pawar, P Lahorkar, D B Anantha Narayana. Development of a RP-HPLC method for analysis of *Triphala curna* and its applicability to test variations in *Triphala curna* preparation[J]. Indian J Pharmac Sci, 2009,71(4):382.

[责任编辑 顾雪竹]