

· 实验研究 ·

# 藏药宽筋藤 HPLC 指纹图谱研究<sup>※</sup>

● 朱小芳 谢一辉 马亚娟 白文婷 平欲晖 黄丽萍<sup>▲</sup>

**摘要** 目的:建立宽筋藤 HPLC 指纹图谱,为其质量控制提供比较全面快速的评价方法。方法:采用 HPLC 色谱法,Spursil C18 (250mm × 4.6mm, 5 $\mu$ m),流动相为乙腈-0.1% 甲酸水,梯度洗脱,检测波长为 272nm,柱温 25 $^{\circ}$ C,采用指纹图谱相似度软件进行分析。结果:8 批宽筋藤药材的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%。通过相似度评价软件计算出 8 批药材的相似度均大于 0.8。结论:该法精密度、重复性、稳定性良好,符合指纹图谱技术要求,可为藏药宽筋藤质量控制提供科学的监测方法。

**关键词** 宽筋藤;指纹图谱;HPLC;相似度

宽筋藤为防己科植物中华青牛胆 *Tinosporasinensis* (Lour.) Merr. 的干燥茎藤,藏药名为勒哲,又名大接筋藤、松根藤、舒筋藤、牛挣藤、大松身,广泛分布于广西、广东、西藏、云南、海南等地区<sup>[1-2]</sup>,其味微苦,性寒,归肝经,主要有舒筋通络,祛风止痛之功能,用于腰肌劳损,风湿痹痛,跌打损伤等<sup>[3]</sup>。该属植物的块根、藤茎常作为中药入药。近年来,在藏药质量管理中出现的多种问题,如基原不统一或不清楚<sup>[4]</sup>,药用部位不清楚,药名混乱,同名异源或应用混乱<sup>[5]</sup>等。目前藏药宽筋藤在质量控制上还没有一种系统性的监测方法,为此本文试图建立其 HPLC 指纹图谱,为产品的质量控制奠定基础。

## 1 仪器与材料

**1.1 仪器** 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 有限公司),Sartoris BS214-D 型电子天平(德国赛托利斯仪器有限公司),Milli-Q 超纯水仪(江西鼎技科学仪器有限公司),B-260 恒温水浴锅(上海亚荣生化仪器厂),SHZ-III 循环水真空泵(巩义市予华仪器有限公

司),KQ-50E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),AE-240 型十万分之一电子天平(瑞士梅特勒公司),FZ102 微型植物粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司)。

**1.2 试剂** 甲醇,乙腈,甲酸均为色谱级(美国 ACS 公司),水为 Milli-Q 超纯水仪制备,其他试剂均为分析纯。

**1.3 试药** 丁香苷、Tinoscorside D、3,4-二甲氧基苯基-O- $\beta$ -D-呋喃芹糖基(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷对照品,为本实验室分离得到,通过碳氢谱和质谱数据等确定它们的结构,纯度经 HPLC 面积归一化法检测大于 98%。

**1.4 样品** 本实验药材由西藏医学院格桑次仁副教授采购,共 8 批宽筋藤样品,经西藏医学院格桑 B 次仁副教授鉴定为防己科植物青牛胆属中华青牛胆 *Tinosporasinensis* (Lour.) Merr. 的藤茎。见表 1。

表 1 药材来源

样品	采集地点	采集时间
S1	西藏拉萨市场	2016.07
S2	内地	2015.09
S3	藏医学院藏药厂	2015.12
S4	西藏拉萨市场	2013.05
S5	西藏医学院标本室	2014.05

※基金项目 国家自然科学基金项目(No. 81660713)

▲通讯作者 黄丽萍,Email:286529404@qq.com

• 作者单位 江西中医药大学药学院(江西 南昌 330004)

续表 1

样品	采集地点	采集时间
S6	藏医学院藏药厂	2016. 04
S7	西藏	2015. 05
S8	新疆乌鲁木齐	2016. 08

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Spursil C18 (250mm × 4.6mm, 5μm), 流动相为乙腈(A) - 0.1% 甲酸水(B), 梯度洗脱(0 - 15min 3% A; 15 - 40min, 3% - 13% A; 40 - 60min, 13% - 13% A; 60 - 68min, 13% - 18% A; 68 - 83min, 18% - 18% A; 83 - 90min, 18% - 20%), 检测波长为 272nm, 柱温 25℃, 流速为 1ml/min, 进样量为 10μL。

2.2 对照品溶液的制备 取丁香苷、Tinoscorside D、3,4 - dimethoxyphenyl - O - β - D - apiofuranosyl - (1 → 6) - β - D - glucopyranoside 的对照品约 2.0mg, 精密称定, 置于 10ml 容量瓶中, 用甲醇溶解定容。即得

对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取宽筋藤粉末 2.0g(过二号筛), 精密称定, 加入 60% 甲醇 20ml, 回流提取 3 次, 每次 20min, 合并滤液, 回收试剂浓缩至干, 用甲醇溶液超声溶解并定容至 10ml, 过 0.22μm 膜, 即得到供试品溶液。

2.4 方法学考察 为了分析方法的可行性, 以西藏拉萨市场采集的宽筋藤药材为研究对象, 对其精密度, 稳定性和实验方法的重复性进行相应考察, 选择保留时间为 40.7min 左右的色谱峰为参照峰, 计算 HPLC 色谱图中色谱峰的相对保留时间和相对峰面积。

2.4.1 精密度试验 取宽筋藤药材, 按 2.3 方法制备同一供试品溶液, 按 2.1 色谱条件连续进样 6 次, 考察仪器的精密度, 测得相对峰面积和相对保留时间。结果显示, 相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%, 所用仪器的精密度良好。结果见表 2 和表 3。

表 2 相对保留时间精密度实验

峰号	供试液 1	供试液 2	供试液 3	供试液 4	供试液 5	供试液 6	RSD(%)
1	0.1119	0.1120	0.1120	0.1122	0.1124	0.1109	0.47
2	0.1513	0.1515	0.1518	0.1524	0.1519	0.1538	0.60
3	0.1705	0.1707	0.1713	0.1722	0.1713	0.1695	0.52
4	0.2856	0.2857	0.2874	0.2889	0.2871	0.2854	0.48
5	0.4399	0.4400	0.4413	0.4425	0.4414	0.4408	0.23
6	0.6949	0.6948	0.6959	0.6960	0.6959	0.6921	0.22
7	0.7937	0.7938	0.7945	0.7944	0.7945	0.7923	0.10
8	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.00
9	1.0177	1.0177	1.0173	1.0171	1.0168	1.0155	0.08
10	1.0899	1.0904	1.0901	1.0901	1.0901	1.0879	0.08
11	1.1135	1.1140	1.1145	1.1145	1.1140	1.1114	0.10
12	1.1279	1.1282	1.1280	1.1274	1.1306	1.1261	0.13
13	1.7642	1.7661	1.7661	1.7656	1.7667	1.7629	0.08
14	1.7965	1.7983	1.7984	1.7980	1.8013	1.7965	0.10

表 3 相对峰面积精密度实验

峰号	供试液 1	供试液 2	供试液 3	供试液 4	供试液 5	供试液 6	RSD(%)
1	0.2949	0.2950	0.2948	0.2944	0.2947	0.2949	0.07
2	0.6703	0.6699	0.6705	0.6706	0.6706	0.6703	0.04
3	2.0561	2.0552	2.0571	2.0549	2.0564	2.0564	0.04
4	0.5630	0.5632	0.5636	0.5633	0.5632	0.5631	0.04
5	0.4945	0.4946	0.5094	0.4983	0.4940	0.5029	1.23
6	0.3625	0.3634	0.3638	0.3629	0.3627	0.3638	0.15
7	0.7342	0.7339	0.7355	0.7341	0.7344	0.7355	0.09
8	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.00
9	3.0403	2.9940	3.0405	2.9840	3.0140	3.0244	0.78
10	4.6202	4.6137	4.6452	4.5982	4.6513	4.6611	0.53
11	0.4140	0.4139	0.4141	0.4136	0.4143	0.4135	0.08
12	0.9783	0.9789	0.9802	0.9786	0.9796	0.9785	0.08
13	0.4595	0.4599	0.4594	0.4597	0.4599	0.4593	0.05
14	0.3685	0.3693	0.3688	0.3691	0.3693	0.3690	0.09

2.4.2 稳定性试验 取宽筋藤药材,按 2.3 法制备同一供试品溶液,依照 2.1 色谱条件,分别在 0h,2h,4h,8h,16h,24h 测定,记录色谱图,测得相对保留时间和相对峰面积。结果显示(见表 4 和表 5)相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%,供试品溶液在 24h 内稳定。

表 4 相对保留时间稳定性实验

峰号	供试液 1	供试液 2	供试液 3	供试液 4	供试液 5	供试液 6	RSD(%)
1	0.1124	0.1119	0.1119	0.1122	0.1124	0.1122	0.19
2	0.1524	0.1513	0.1517	0.1519	0.1519	0.1524	0.27
3	0.1715	0.1705	0.1712	0.1710	0.1713	0.1722	0.32
4	0.2889	0.2856	0.2872	0.2861	0.2871	0.2889	0.49
5	0.4423	0.4399	0.4444	0.4387	0.4414	0.4425	0.45
6	0.6961	0.6949	0.6969	0.6939	0.6959	0.6960	0.15
7	0.7944	0.7937	0.7948	0.7932	0.7945	0.7944	0.07
8	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.00
9	1.0208	1.0177	1.0211	1.0159	1.0168	1.0171	0.21
10	1.0898	1.0899	1.0901	1.0887	1.0901	1.0901	0.05
11	1.1135	1.1135	1.1139	1.1131	1.1140	1.1145	0.04
12	1.1326	1.1279	1.1329	1.1260	1.1306	1.1281	0.25
13	1.7671	1.7642	1.7677	1.7634	1.7667	1.7660	0.10
14	1.7997	1.7965	1.8003	1.7958	1.8013	1.7997	0.12

表 5 相对峰面积稳定性实验

峰号	供试液 1	供试液 2	供试液 3	供试液 4	供试液 5	供试液 6	RSD(%)
1	0.2903	0.2812	0.2879	0.2868	0.2947	0.2847	1.62
2	0.6425	0.6546	0.6521	0.6533	0.6706	0.6439	1.54
3	1.9930	1.9832	1.9870	2.0017	2.0564	1.9942	1.35
4	0.5472	0.5311	0.5494	0.5488	0.5632	0.5339	2.15
5	0.4872	0.4974	0.5027	0.4972	0.5097	0.4957	1.51
6	0.3737	0.3747	0.3748	0.3748	0.3627	0.3737	1.29
7	0.6892	0.6866	0.6994	0.6994	0.6944	0.6892	0.80
8	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.00
9	2.9300	2.9971	2.9527	2.9527	2.9545	2.9100	0.99
10	4.6510	4.6450	4.6424	4.6524	4.6437	4.6610	0.15
11	0.3999	0.4054	0.4032	0.4116	0.4143	0.3999	1.49
12	0.9782	0.9884	0.9526	0.9399	0.9796	0.9816	1.98
13	0.4401	0.4360	0.4475	0.4524	0.4599	0.4390	2.05
14	0.3594	0.3732	0.3588	0.3664	0.3693	0.3594	1.68

2.4.3 重复性试验 取宽筋藤药材 2.0g,精密称定,方法重复性好,符合指纹图谱的要求测得相对保留时间共 6 份,按 2.3 法制备同一供试品溶液,按 2.1 色谱条件和相对峰面积的 RSD 均小于 3%。  
条件进样分析。结果显示(见表 6 和表 7),样品制备

表 6 相对保留时间重复性实验

峰号	供试液 1	供试液 2	供试液 3	供试液 4	供试液 5	供试液 6	RSD(%)
1	0.1124	0.1120	0.1118	0.1122	0.1109	0.1119	0.47
2	0.1524	0.1528	0.1522	0.1519	0.1538	0.1513	0.55
3	0.1715	0.1720	0.1714	0.1710	0.1695	0.1705	0.52
4	0.2889	0.2914	0.2889	0.2861	0.2829	0.2856	1.04
5	0.4423	0.4444	0.4424	0.4387	0.4359	0.4399	0.69
6	0.6961	0.6969	0.6962	0.6939	0.6921	0.6949	0.26
7	0.7944	0.7948	0.7944	0.7932	0.7923	0.7937	0.11
8	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.00
9	1.0217	1.0211	1.0208	1.0211	1.0400	1.0177	0.79
10	1.0906	1.0901	1.0906	1.0902	1.0918	1.0899	0.06
11	1.1140	1.1139	1.1141	1.1135	1.1138	1.1135	0.02
12	1.1341	1.1329	1.1337	1.1330	1.1601	1.1279	1.02
13	1.7662	1.7677	1.7695	1.7669	1.7717	1.7642	0.15
14	1.7988	1.8003	1.8021	1.7993	1.8038	1.7965	0.14

表 7 相对峰面积重复性实验

峰号	供试液 1	供试液 2	供试液 3	供试液 4	供试液 5	供试液 6	RSD(%)
1	0.2984	0.2972	0.3070	0.3086	0.2949	0.3058	1.93
2	0.6739	0.6646	0.6712	0.6562	0.6703	0.6768	1.11
3	1.9942	1.9932	2.0020	2.0070	2.0561	2.0754	1.75
4	0.5439	0.5411	0.5449	0.5494	0.5630	0.5498	1.41
5	0.5028	0.4939	0.4910	0.4860	0.4855	0.4892	1.30
6	0.3737	0.3747	0.3793	0.3748	0.3625	0.3739	1.50
7	0.6892	0.6866	0.6847	0.6934	0.6934	0.6837	0.62
8	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.00
9	3.0000	2.9971	3.0494	2.9827	3.0027	3.0004	0.76
10	4.6510	4.6450	4.6573	4.6424	4.6522	4.6083	0.38
11	0.4144	0.4135	0.4196	0.4116	0.4140	0.4163	0.66
12	0.9816	0.9840	0.9587	0.9699	0.9783	0.9870	1.08
13	0.4720	0.4706	0.4775	0.4724	0.4695	0.4696	0.63
14	0.3724	0.3732	0.3722	0.3694	0.3685	0.3701	0.51

## 2.5 藏药宽筋藤药材指纹图谱分析

2.5.1 藏药宽筋藤药材指纹图谱的采集 取不同产地,不同采收时间的宽筋藤药材,按 2.3 法制备供试品溶液,按 2.1 色谱条件进样分析。根据色谱图,并对其色谱图进行积分,同时标定 14 个共有峰。所选择的共有峰可以较全面的体现出宽筋藤中极性部位化学成分的信息。通过安捷伦化学工作站输出不同产地药材的 HPLC 色谱图。

2.5.2 藏药宽筋藤药材的指纹图谱相似度分析 根

根据国家药典委员会制定的《中国色谱指纹图谱相似度评估系统》(2010 版)对不同产地,不同采收时间的宽筋藤药材指纹图谱数据进行分析,宽筋藤药材指纹图谱的相关参数进行了自动匹配,标定了 14 个共有峰,同时给出了对照指纹图谱图 1,将各样品和对照指纹图谱进行比较,计算各产地宽筋藤药材提取物指纹图谱的相似度。不同产地指纹图谱见图 2,指纹图谱相似度结果见表 8。

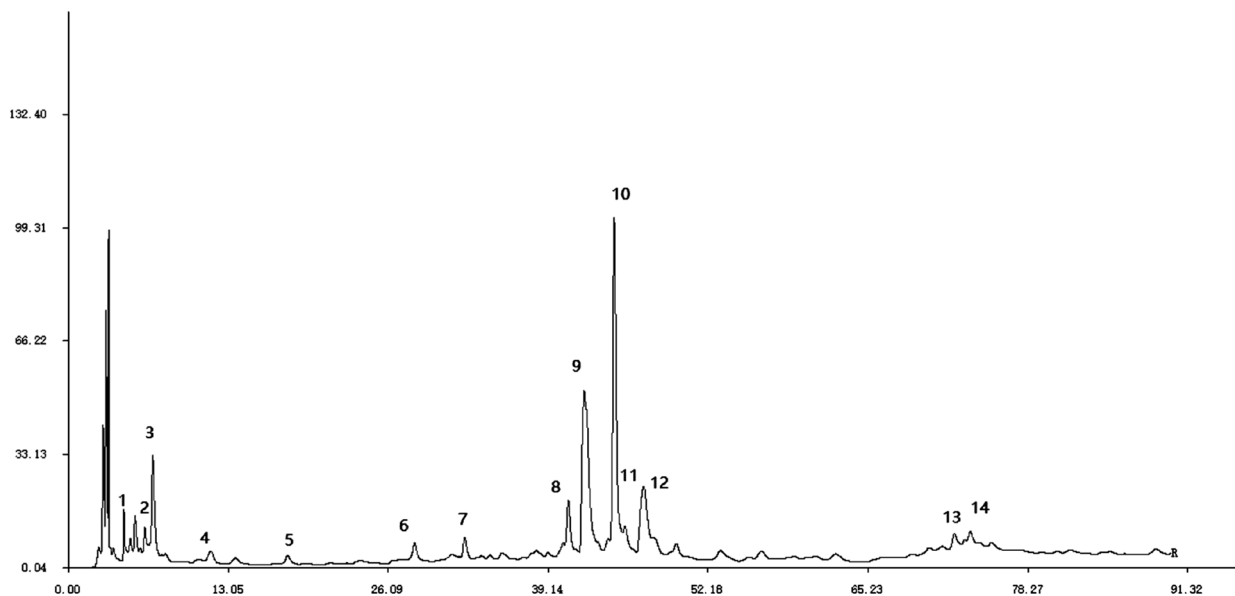


图 1 宽筋藤对照指纹图谱

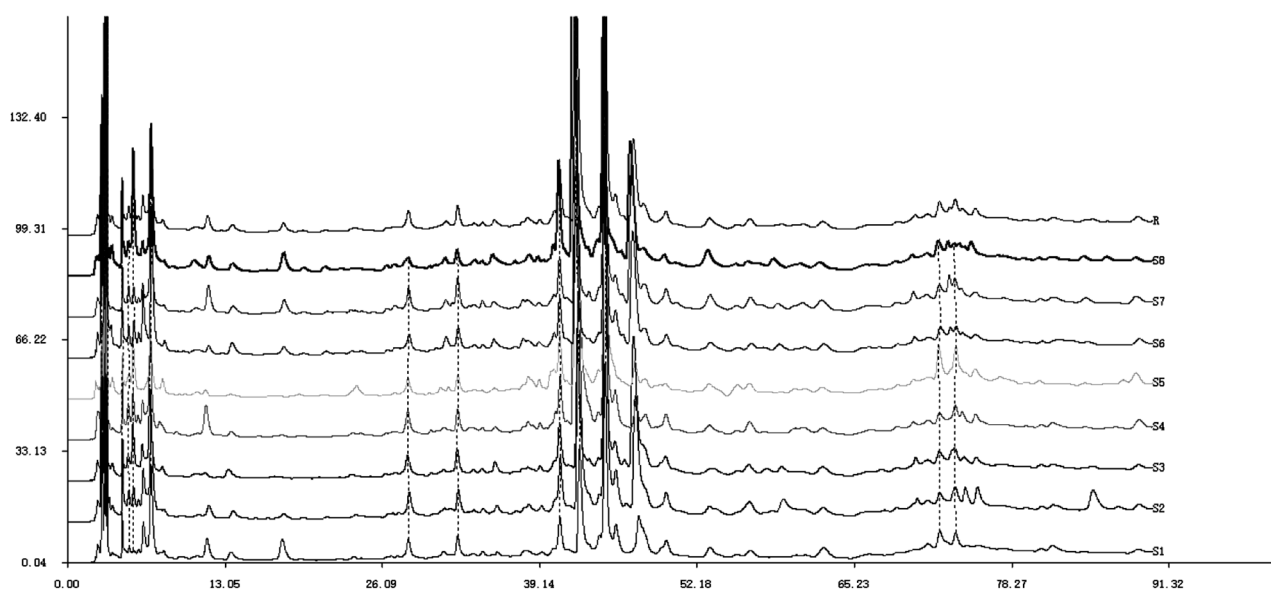


图 2 不同产地宽筋藤高效液相指纹图谱

表 8 不同产地宽筋藤指纹图谱相似度结果表

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	对照指纹图谱
S1	1	0.86	0.781	0.75	0.879	0.88	0.851	0.814	0.896
S2	0.86	1	0.953	0.807	0.913	0.954	0.957	0.917	0.98
S3	0.781	0.953	1	0.627	0.802	0.963	0.974	0.825	0.905
S4	0.75	0.807	0.627	1	0.887	0.672	0.661	0.926	0.885
S5	0.879	0.913	0.802	0.887	1	0.849	0.852	0.914	0.957
S6	0.88	0.954	0.963	0.672	0.849	1	0.976	0.841	0.932
S7	0.851	0.957	0.974	0.661	0.852	0.976	1	0.837	0.929
S8	0.814	0.917	0.825	0.926	0.914	0.841	0.837	1	0.965
对照指纹图谱	0.896	0.98	0.905	0.885	0.957	0.932	0.929	0.965	1

2.5.3 指纹图谱中色谱峰的化学指认 用化学结构已被鉴定的部分化合物做对照,对照指纹图谱中部分共有指纹峰进行确认,通过保留时间和图谱,确认 8 号峰为 3,4-二甲氧基苯基-O- $\beta$ -D-呋喃芹糖基(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷,9 号峰为丁香苷,10 号峰为 Tinoscorside D。

### 3 讨论

本实验对提取溶剂种类与方式、体积分数、料液比、时间均进行了考察,对比了甲醇、乙醇,超声、回流两种方式所得供试品溶液的指纹图谱,结果表明:甲醇回流 > 乙醇回流 > 甲醇超声 > 乙醇超声,故选择甲醇回流法进行提取。比较了体积分数 40%、60%、

80%、100% 甲醇所提取的供试品溶液图谱,结果表明甲醇浓度为 40% 和 100% 浓度提取出的色谱峰少,而且峰面积偏低;甲醇浓度为 60% 和 80% 时,色谱峰数量以及峰面积相差不大,故从色谱峰数量,峰面积以及溶剂成本多方面考虑,选择 60% 甲醇溶液为提取溶剂。分别考察了料液比为 1:10,1:15,1:20,1:25 后的供试品溶液图谱,发现不同的料液比对于宽筋藤提取液的影响甚小,从节约成本等方面考虑,本实验的料液比选择 1:10。分别考察了回流提取 20min,40min,60min 后的供试品溶液图谱,结果表明:从峰数量上看,不同提取时间所得到峰数量几乎相同;从峰面积和峰型上看,提取 20min 最佳。故本实验选择提取时间为 20min。

用乙腈-0.1%甲酸水为流动相进行洗脱条件的考察,反复调整流动相比例后,确定洗脱比例,采用 DAD 检测器在 190-400nm 处进行紫外吸收全波段扫描,并获取不同波长下的数据(210, 254, 272nm, 280, 323, 365nm),对于指纹图谱的确认必须遵循信息量最大化的原则,结果显示,272nm 下色谱峰的数量较多且分离度较好。故选择 272nm 下作为指纹图谱的检测波长。

本实验的结果表明 8 批宽筋藤药材的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%。通过《中国色谱指纹图谱相似度评估系统》(2010 版)计算出 8 批药材的相似度均大于 0.8,符合指纹图谱的分析要求。表明 HPLC 指纹图谱方法可作为藏药宽筋藤质量控制的检测方法。一方面通过比较图谱,可以直观看出各共有峰的比例变化,来判断产品质量的变;另一方

面也可以通过测定各峰峰面积对活性指标成分进行定量。本实验所建立的 HPLC 指纹图谱可以有效分析和监测其质量。

参考文献

[1] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编[M]. 上册. 北京:人民卫生出版社,1978:652.  
 [2] 广东中药志编辑委员会. 广东中药志[M]. 广州:广东科技出版社,1994:501-502.  
 [3] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药材标准(第一册)[S]. 广州:广东科技出版社,2004:183.  
 [4] 钟国跃,周福成,石上梅,等. 藏药材常用品种及质量标准现状调查分析研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(16):2349-2355.  
 [5] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草:藏药卷[M]. s 上海:上海科学技术出版社,2002.

(收稿日期:2017-11-25)

(本文编辑:金冠羽)

(上接第 62 页)

便溏,睡眠欠佳。舌淡胖,苔白腻,脉沉。胃镜示:胆汁反流性胃炎,幽门口炎,HP(+). 证属:中焦虚寒。治以:补气温中,和胃止痛。处方:党参 20g,半夏 10g,干姜 10g,桂枝 10g,沉香 10g,郁金 10g,荷叶 15g,陈皮 10g,香橼 10g,佛手 10g,甘草 10g。7 剂,水煎 450ml 分早中晚 3 次,日 1 剂。

2012 年 3 月 1 日二诊:服后胀痛减轻,偶有发作,月经量较前增多,纳寐改善。原方加砂仁 10g、木香 10g。又进 7 剂。

2012 年 3 月 8 日三诊:胃胀痛已不明显,偶呃逆,便溏改善,上方加白术 15g、防风 10g、枳壳 10g。继服 14 剂而愈。

按 平素畏寒怕冷,四肢不

温,喜热饮恶冷食,胃脘部喜揉喜按,为中焦虚寒所致;便溏为脾虚生湿;舌淡胖,苔白腻,脉沉亦为中焦虚寒之征象。分析可知患者中焦虚寒久病为其本,胃胀痛 1 年有余为其标,非三、五剂所能立效者。上方中以党参、白术、甘草健脾温中治其本;干姜、桂枝、半夏温中止痛治其标;木香、砂仁、沉香、陈皮理其气;荷叶、香橼、佛手化其湿。三诊时加枳壳降气,加防风取风药“风能胜湿”之意。先后诊治约 1 个月,收效满意。

6 小结

陈宝贵教授治疗胃脘痛从整体出发,抓主症,辨舌苔脉象,最后确定处方。在药物的选择上斟酌

甚细,和胃常用陈皮、白芍、荷叶等;益胃常选元参、沙参、石斛、玉竹等;养胃常用麦冬、佛手、香橼、藿香等;清胃常用川黄连、青皮、丹皮等;温胃常用桂枝、吴茱萸、细辛等;健胃常用白术、茯苓、山药、苍术等;开胃常用草豆蔻、砂仁、厚朴等。临证组方选药八至十味,一般不过 15 味,药少力专,切中病所,药量宜轻,否则药过病所,反伤正气。不可全仗药物攻治以求所谓除邪务尽,另外配以膳食调养,怡情悦性,节饮食,慎起居,待脾气健旺,正气恢复,余邪自去。

参考文献

[1] 周仲英. 中医内科学[M]. 北京:中国中医药出版社,2007:186.

(收稿日期:2017-10-19)

(本文编辑:蒋艺芬)