

飞龙掌血根皮与茎皮指纹图谱对比研究

魏茂陈¹, 刘凯¹, 易琴¹, 张丽艳^{2*}, 周汉华², 窦圣姗³, 张杰³

1. 贵阳新天药业股份有限公司, 贵州 贵阳 550000

2. 贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550002

3. 上海海天医药科技开发有限公司, 上海 200023

摘要: 目的 建立了飞龙掌血 *Toddalia asiatica* 根皮、茎皮高效液相色谱法指纹图谱, 并运用相似度评价软件对指纹图谱进行相似度对比, 从而为促进飞龙掌血综合利用提供理论依据。方法 采用乙腈-0.1%磷酸水溶液梯度系统, C₁₈ 柱 (200 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 测定波长 269 nm, 体积流量 1.0 mL/min。通过对 10 批不同产地不同季节采收的飞龙掌血根皮与 10 批不同产地不同季节的茎皮对比研究, 从而建立飞龙掌血的指纹图谱, 并计算相似度。结果 不同产地及不同季节采集的飞龙掌血根皮与茎皮共有峰的相对保留时间相对一致, 但相对峰面积差异较大, 说明产地和采收季节的不同会导致相关物质活性成分的量有一定的差异。结论 飞龙掌血根皮与茎皮指纹图谱相似度大于 0.9, 其组成高度相似。

关键词: 飞龙掌血; 根皮; 茎皮; 相似度; 指纹图谱; 高效液相色谱

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)14-2540-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.14.025

Analysis on fingerprint for root barks and stem barks of *Toddalia asiatica*

WEI Mao-chen¹, LIU Kai¹, YI Qin¹, ZHANG Li-yan², ZHOU Han-hua², DOU Sheng-shan³, ZHANG Jie³

1. Guiyang Xintian Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550000, China

2. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China

3. Shanghai Haitian Pharmaceutical Science and Technology Co., Ltd., Shanghai 200023, China

Abstract: Objective To promote the comprehensive utilization in the root barks and stem barks of *Toddalia asiatica* and to establish an HPLC method for the determination of the fingerprints for the root barks and stem barks of *T. asiatica*. Meanwhile, the similarity was compared by similarity evaluation software based on the fingerprints. **Methods** HPLC analysis was performed on C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile and 0.1% aqueous solution of phosphoric acid as mobile phase in gradient mode at the wavelength of 269 nm, and the flow rate was 1 mL/min. The similarity was calculated by comparison on the fingerprints derived from 10 batches of *T. asiatica* root barks and 10 batches of *T. asiatica* stem barks, all the samples were collected from the different areas in different seasons. **Results** The mutual mode of HPLC fingerprints was set up and the similar degrees to the crude drugs of different sources were compared. The content ratio of active ingredients is different from samples in different areas and seasons. **Conclusion** The fingerprint similarity is greater than 0.9 between *T. asiatica* root barks and *T. asiatica* stem barks, so the compositions are highly similar.

Key words: *Toddalia asiatica*; root barks; stem barks; similarity; fingerprints; HPLC

飞龙掌血 *Toddaliae Asiaticae Radix* 为芸香科 (Rutaceae) 植物飞龙掌血 *Toddalia asiatica* (L.) Lam. 的干燥根。四季可采挖, 切段, 洗净, 晾干。其为贵州省少数民族用药, 具有祛风止痛、散瘀止血、消肿解毒的功效, 用于风湿痹痛、胃痛、吐血、衄血、跌打损伤、刀伤出血、痛经、闭经牙龈出血、口舌生疮^[1]。飞龙掌血在不同的地方标准中规定略有不同, 云南省中药材标准 (2005 版) (第四册 彝族药) 规定, 飞龙掌血为芸香科植物飞龙掌血 *Toddalia asiatica* (L.)

Lam. 的干燥茎^[2]; 然而, 湖南省中药材标准 (2009 版) 规定, 飞龙掌血为芸香科植物飞龙掌血的干燥根^[3]; 与此同时, 广西中药材标准第二册规定, 飞龙掌血为芸香科植物飞龙掌血干燥根及茎^[4]。

根据现行各地方标准, 飞龙掌血的用药部位主要包括了根及茎, 上述各地方标准及相关研究^[5-8]表明, 其根与茎均可入药, 且具有相同药理活性的可能。为加强中药资源的保护和可持续利用, 保护中药种质和遗传资源, 加强中药新品种研究, 确保

收稿日期: 2015-12-21

基金项目: 贵州省科技厅项目[黔科合 SY 字 (2015) 3031]

作者简介: 魏茂陈, 男, 博士。Tel: (0851)86317631 E-mail: weimc168@163.com

*通信作者 张丽艳, 女, 教授, 从事中药质量控制与新药研究。Tel: (0851)86298351 E-mail: zly1964@163.com

中药材可持续发展,研究飞龙掌血根皮与茎皮指纹图谱的相似性具有重要的理论和现实意义。本研究采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2.0版)》分析根皮与茎皮指纹图谱的相似度,从而了解根皮与茎皮化学组成的差异,为促进飞龙掌血综合利用提供理论依据,进而提高该品种的利用度,达到中药资源保护及可持续利用的目的。

1 仪器和材料

1.1 仪器与设备

岛津 LC-20AD 型高效液相色谱仪, SPD-M20A 二极管阵列检测器, LC Solution 工作站; 超声波清洗器(上海冠特超声仪器有限公司); 岛津

AUW120D 型电子天平(十万分之一)。

1.2 材料与试剂

飞龙掌血根皮对照药材(批号 121410-200701), 白屈菜红碱对照品(批号 111718-200501), 均购于中国食品药品检定研究院。冰醋酸、磷酸为分析纯, 甲醇、乙腈、异丙醇为色谱纯, 水为重蒸馏水。供试品由贵阳新天药业股份有限公司提供, 所采集各批次药材经贵阳中医学院周汉华教授鉴定为飞龙掌血 *Toddalia asiatica* (L.) Lam. 根皮和茎皮, 药材产地及采收季节见表 1。飞龙掌血茎皮照飞龙掌血根皮质量标准(《贵州省中药材、民族药材质量标准(2003 版)》, DB52/YC059-2003, P63) 检验合格^[1]。

表 1 药材产地及采收季节

Table 1 Origins and collecting seasons of *T. asiatica*

编号	批号	来源	部位	采收季节	编号	批号	来源	部位	采收季节
1	111230	安顺	根皮	秋季	11	111230	安顺	茎皮	秋季
2	120210	安顺	根皮	冬季	12	120210	安顺	茎皮	冬季
3	120212	安顺	根皮	冬季	13	120212	安顺	茎皮	冬季
4	120418	安顺	根皮	春季	14	120418	安顺	茎皮	春季
5	130130	息烽	根皮	冬季	15	130130	息烽	茎皮	冬季
6	130624	高坡	根皮	春季	16	130624	高坡	茎皮	春季
7	130723	贵阳	根皮	夏季	17	130723	贵阳	茎皮	夏季
8	130813	大方	根皮	夏季	18	130813	大方	茎皮	夏季
9	130901	息烽	根皮	秋季	19	130901	息烽	茎皮	秋季
10	140723	凯里	根皮	夏季	20	140723	凯里	茎皮	夏季

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱为 Hypersil GOLD ODS (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相^[9-11]采用乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)系统进行梯度洗脱, 程序为 0~5 min, 15% A; 5~30 min, 15%~80% A; 30~35 min, 80% A; 35~37 min, 80%~15% A; 37~50 min, 15% A; 检测波长 269 nm; 体积流量 1.0 mL/min。白屈菜红碱保留时间为 23.6 min, 50 min 内色谱峰全部检出。

2.2 对照品溶液及对照药材的制备

精密称取白屈菜红碱对照品适量, 加 60%乙醇溶解, 定容至 100 mL, 即得。精密称取飞龙掌血根皮对照药材 0.2 g, 加 60%乙醇超声提取 1 h 时, 滤过, 即得。

2.3 供试品溶液制备

精密称取飞龙掌血根皮或茎皮粉末 0.2 g, 采用不同体积分数的乙醇 50 mL 超声提取 1 h,

提取液过 0.45 μm 的微孔滤膜后吸取 10 μL, 注入高效液相色谱仪观察, 在使用 60%乙醇提取时, 能够得到较多的色谱峰, 药材成分提取率高。采用 60%乙醇 50 mL 提取 0.5、1.0、1.5 h, 提取液过 0.45 μm 的微孔滤膜后吸取 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 提取 1.0 h 得到的色谱峰与 1.5 h 的一致。故提取方法为精密称取飞龙掌血药材 0.2 g, 加 60%乙醇 50 mL 超声提取 1.0 h, 滤过, 即得。

3 结果与分析

3.1 方法学考察

3.1.1 精密度试验 取批号为 140723 的飞龙掌血根皮粉末, 按照“2.3”项方法制备供试品溶液, 连续进样 6 次, 记录色谱图。以 8 号峰白屈菜红碱的保留时间和峰面积为参照, 计算样品中共有峰与白屈菜红碱的相对峰面积和相对保留时间的 RSD 分别为 0~1.89%、0~0.38%, 结果表明, 精密度良好。

3.1.2 稳定性试验 取批号为 140723 的飞龙掌血根皮粉末,按照“2.3”项方法制备供试品溶液,分别在 0、3、6、9、12、18、21 h 进样,记录色谱图。以 8 号峰白屈菜红碱的保留时间和峰面积为参照,计算样品中共有峰与白屈菜红碱的相对峰面积与相对保留时间 RSD 分别为 0~2.78%、0~2.21%。结果表明,稳定性良好。

3.1.3 重复性试验 取批号为 140723 的飞龙掌血根皮粉末,按照“2.3”项方法制备样品,同时制备 6 份,记录色谱图。以 8 号峰白屈菜红碱的保留时间和峰面积为参照,计算样品中共有峰与白屈菜红碱的相对峰面积和相对保留时间 RSD 分别为 0~1.69%、0~0.32%。

3.2 指纹图谱建立

3.2.1 共有峰的标定 采用不同产地,不同采收季节的飞龙掌血根皮或茎皮,依“2.3”项制备供试品溶液,测定。取“2.2”项对照药材溶液,按照“2.1”项色谱条件测定,得到对照指纹图谱,并标定 9 个色谱峰为共有指纹峰,见图 1,根皮与茎皮指纹图

谱见图 2。共有峰相对保留时间与相对峰面积见表 2 和表 3。

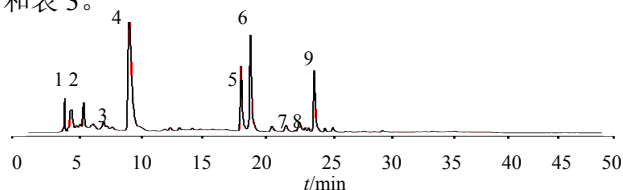


图 1 飞龙掌血根皮与茎皮对照图谱

Fig. 1 Fingerprints of root barks and stem barks of *T. asiatica*

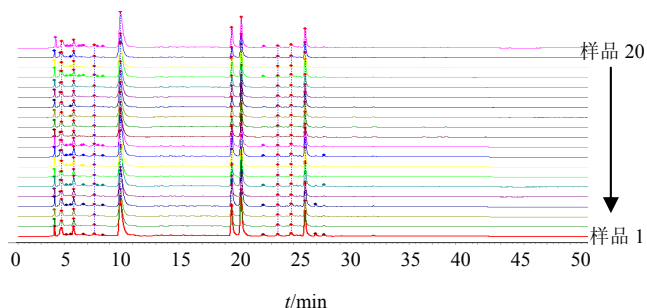


图 2 不同批次飞龙掌血根皮与茎皮的指纹图谱

Fig. 2 Fingerprints of root barks and stem barks of different batches of *T. asiatica*

表 2 飞龙掌血根皮与茎皮指纹图谱共有峰相对保留时间

Table 2 Relative retention time of common peaks for fingerprint of root barks and stem barks of *T. asiatica*

样品	相对保留时间								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
对照	0.160	0.204	0.279	0.372	0.785	0.820	0.951	1.000	1.055
1	0.160	0.204	0.279	0.373	0.785	0.820	0.951	1.000	1.055
2	0.160	0.204	0.279	0.374	0.785	0.819	0.950	1.000	1.055
3	0.160	0.204	0.278	0.374	0.784	0.819	0.950	1.000	1.054
4	0.160	0.204	0.279	0.373	0.784	0.819	0.951	1.000	1.054
5	0.161	0.204	0.279	0.375	0.784	0.818	0.950	1.000	1.053
6	0.160	0.204	0.279	0.373	0.784	0.818	0.950	1.000	1.053
7	0.160	0.204	0.279	0.375	0.783	0.818	0.950	1.000	1.052
8	0.160	0.204	0.279	0.374	0.783	0.818	0.950	1.000	1.052
9	0.160	0.204	0.279	0.374	0.783	0.817	0.950	1.000	1.052
10	0.160	0.204	0.279	0.374	0.783	0.817	0.950	1.000	1.051
11	0.160	0.204	0.279	0.376	0.782	0.816	0.950	1.000	1.050
12	0.160	0.203	0.279	0.376	0.782	0.816	0.950	1.000	1.050
13	0.160	0.204	0.280	0.374	0.782	0.816	0.950	1.000	1.050
14	0.160	0.203	0.279	0.376	0.781	0.816	0.950	1.000	1.049
15	0.160	0.203	0.279	0.376	0.781	0.815	0.950	1.000	1.049
16	0.160	0.203	0.280	0.376	0.781	0.815	0.950	1.000	1.049
17	0.160	0.203	0.280	0.374	0.781	0.815	0.950	1.000	1.048
18	0.160	0.203	0.280	0.374	0.781	0.815	0.950	1.000	1.048
19	0.160	0.203	0.279	0.376	0.780	0.815	0.950	1.000	1.048
20	0.155	0.203	0.279	0.374	0.780	0.815	0.950	1.000	1.048

表 3 飞龙掌血根皮与茎皮指纹图谱共有峰相对峰面积值

Table 3 Relative areas of common peaks for fingerprint of root barks and stem barks of *T. asiatica*

样品	相对峰面积								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
对照	2.464	2.022	1.156	18.257	4.239	7.203	0.576	1.000	3.809
1	2.907	2.319	1.106	20.027	7.184	12.539	0.613	1.000	5.556
2	3.612	2.986	1.371	25.093	4.684	9.050	0.974	1.000	6.199
3	2.658	2.294	0.900	15.767	3.395	7.844	0.796	1.000	4.576
4	2.946	2.345	1.089	18.163	7.133	10.750	0.623	1.000	5.402
5	3.280	2.919	1.357	24.924	4.643	9.834	0.998	1.000	4.664
6	1.835	2.803	1.334	22.783	5.912	10.350	0.806	1.000	5.813
7	2.115	2.929	1.338	24.742	4.696	9.944	1.007	1.000	4.762
8	1.951	2.849	1.366	24.311	5.495	11.069	0.881	1.000	5.433
9	1.889	2.877	1.398	22.984	6.035	10.416	0.802	1.000	5.846
10	1.439	2.065	1.202	18.707	4.512	7.552	0.534	1.000	3.872
11	1.896	2.174	1.079	16.458	4.072	7.720	0.920	1.000	4.148
12	2.929	2.263	1.201	19.056	3.672	8.406	0.741	1.000	4.720
13	1.678	1.979	0.932	14.326	6.735	10.356	0.572	1.000	5.189
14	2.896	2.210	1.102	15.874	3.668	8.352	0.760	1.000	4.710
15	1.926	2.219	1.121	16.767	4.131	7.866	0.928	1.000	4.219
16	1.909	2.178	1.197	20.368	4.194	8.603	0.775	1.000	4.158
17	1.437	1.811	1.203	18.583	4.361	7.724	0.545	1.000	4.399
18	1.437	1.811	1.203	18.583	4.361	7.724	0.545	1.000	4.399
19	2.830	2.182	1.105	15.573	3.568	8.123	0.730	1.000	4.839
20	2.369	1.847	1.245	18.978	4.558	7.690	0.549	1.000	3.981

结果表明,不同产地及不同季节采集的飞龙掌血根皮与茎皮共有峰的相对保留时间相对一致,但相对峰面积差异较大,说明产地和季节的不同会导致相关物质活性成分的量有一定的差异。

3.2.2 相似度计算 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2.0版)》分析^[9],对照图谱生成方法为中位数,时间窗宽度 0.5,多点校正,全峰匹配,相似度结果见表 4。由此结果可见,不同产地、不同季节采收的飞龙掌血根皮及茎皮指纹图谱相近,相似度均大于 0.90,表明其成分相近。

4 讨论

根据文献报道进行实验^[10-12],结果表明,有大量色谱峰较早被洗脱,且未能有效分离,故本研究调整流动相,将洗脱方式从等度洗脱改为梯度洗脱。调整后的结果显示,不仅共有峰数量较多,且各色谱峰间分离度较好,因而有利于不同产地不同季节采收的根皮及茎皮指纹图谱对比研究。同时,对样品进行 3D 图像考察,各峰在 269 nm 处均有较强的吸收,且多个峰均有最大吸收,故分析波长定为 269 nm。为充分提取药材中有效物质成分,因而本研究

表 4 相似度评价结果

Table 4 Evaluation of similarity

样品	相似度	样品	相似度
对照药材	1.000	11	0.998
1	0.976	12	0.993
2	0.996	13	0.975
3	0.993	14	0.991
4	0.976	15	0.998
5	0.998	16	0.998
6	0.997	17	0.999
7	0.998	18	0.999
8	0.998	19	0.994
9	0.996	20	0.996
10	1.000		

还对前处理方法进行系统研究,不同体积分数的乙醇提取效果表明,采用 60%的乙醇提取,色谱峰较为丰富,峰面积较大,同时,考察提取时间为 0.5、1.0、1.5 h 的结果表明,提取时间为 1.0 h 时白屈菜红碱峰面积与 1.5 h 的相近,因此,最优提取方式为 60%的乙醇提取 1.0 h。

虽有相关文献研究了飞龙掌血的指纹图谱^[11-12],但迄今并未有根皮与茎皮的指纹图谱相似性进行对

比研究报道,然而,较多的中成药成方制剂是采用飞龙掌血根皮入药,若茎皮能替代根皮入药将极大促进了中药资源的可持续发展。本研究结果表明,飞龙掌血根皮与茎皮化学组成相近,因此,此研究为飞龙掌血茎皮替代根皮的使用提供理论依据,进而为提高飞龙掌血的利用率,促进野生资源的合理利用具有非常重要的意义。

参考文献

- [1] 贵州省中药材、民族药材质量标准 [S]. 2003.
- [2] 云南省中药材标准 [S]. 第四册. 2007.
- [3] 湖南省中药材标准 [S]. 2009.
- [4] 广西中药材标准 [S]. 第二册. 1996.
- [5] 温玲玲, 郑润生, 许雅萍, 等. 飞龙掌血根的质量研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2009, 32(1): 136-140.
- [6] 陈小雪, 热合曼·司马义, 龙盛京. 飞龙掌血茎的化学成分研究 [J]. 西北药学杂志, 2013, 28(4): 337-339.
- [7] 石磊, 李东, 康文艺. 飞龙掌血化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 中国药房, 2011, 22(7): 666-668.
- [8] 刘志刚, 王翔宇, 毛北萍, 等. 飞龙掌血化学成分研究 [J]. 中药材, 2014, 37(9): 1601-1604.
- [9] 李强, 杜思邈, 张忠亮, 等. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3095-3104.
- [10] 徐世霞. HPLC 法测定飞龙掌血中白屈菜红碱的含量 [J]. 北方药学, 2011, 8(4): 5-6.
- [11] 杨亮, 郭晶, 范宝成. 苗族药材飞龙掌血药材指纹图谱研究 [J]. 中国药业, 2011, 20(14): 21-22.
- [12] 刘志刚, 刘晓燕, 秦晋颖. 飞龙掌血的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中药材, 2010, 33(8): 1240-1243.

• 综 述 •

基于现代中药制剂发展的核心内容探讨引经药的研究思路

柯仲成^{1,2,3}, 侯雪峰⁴, 贾晓斌^{2,3*}

1. 黄山学院化工学院, 安徽 黄山 245041

2. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

3. 江苏省中医药研究院 国家中医药管理局中药释药系统重点实验室, 江苏 南京 210028

4. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230038

摘 要: 精致原料和优良辅料是现代中药制剂发展的核心内容, 而引经药作为长期中医临床的实践总结, 具有制剂载体的类似功能。对引经中药的研究现状进行分析, 尝试性地提出研究思路: 一方面要利用引经作用加强对中药活性成分群的筛选, 制备精致原料, 另一方面要科学阐述引经作用的物质基础及作用机制, 开发优良辅料, 促进现代中药制剂的快速发展。

关键词: 中药制剂; 引经药; 精致原料; 辅料; 研究思路

中图分类号: R283.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)14-2545-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.14.026

Research ideas of meridian guided medicine based on key parts of modern Chinese medicine preparation

KE Zhong-cheng^{1,2,3}, HOU Xue-feng⁴, JIA Xiao-bin^{2,3}

1. College of Chemical Engineering, Huangshan University, Huangshan 245041, China

2. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

3. Affiliated Hospital on Integration of Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

4. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China

Abstract: Exquisite materials and excellent excipients are the key parts of modern Chinese medicine development. Long-term clinical researches indicate that the meridian guided medicine has the property of carriers. In this paper, the status of the meridian guided medicine was analyzed, and the research ideas were tried to be put forward. On the one hand, to take advantage of the meridian guided action, the screening of active ingredients should be strengthened. On the other hand, the material basis and mechanism of meridian guided action were clearly explained. In summary, deep research of the meridian guided medicine can exploit the excellent excipients to promote the rapid development of modern Chinese medicine.

Key words: Chinese medicine preparation; meridian guided medicine; exquisite materials; excipients; research ideas

在药物防病治病的发展过程中, 不论中药还是化学药, 都通过“组方配伍、增溶靶向”等手段, 促协同、助吸收、策分布, 获得“治疗效果”的高涌现性, 不断推动药物的创新发展与临床应用。传统中药制剂具有多成分、多靶点的特性, 正是由于这种成分的复杂性, 造成了其物质基础不明确、作

用机制不明、人体内吸收、分布、代谢、排泄(ADME)性质不清楚的弊端, 这也使得中药的“治疗效果”常常难以直击病灶, 在一定程度上限制了中药制剂的临床应用。在传统中药临床实践中, 临床医生常常通过引经配伍改善药物的临床疗效, 久而久之便形成用药经验。这其中引经药作为外来要

收稿日期: 2016-02-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81274088); 安徽省高校省级自然科学基金重点项目(KJ2014A242)

作者简介: 柯仲成, 博士在读, 副教授。Tel: 18055960325 E-mail: xiaoke1020@126.com

*通信作者 贾晓斌, 教授, 博士生导师。Tel: (025)85637809 E-mail: jxiaobin2005@hotmail.com