

常用兔耳草类药材的6种有效成分含量对比研究

高必兴^{1,2}, 何芳², 齐景梁², 苟琰^{1,2}, 耿昭², 钟恋^{1,2}, 蒋桂华^{1*}, 周娟², 蒋运斌^{3*}

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 610072

2. 四川省药品检验研究院 国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室, 四川 成都 611731

3. 西南大学药学院中医药学院, 重庆 北碚 400715

摘要: 目的 建立测定兔耳草类药材主要有效成分苯丙素苷类(毛蕊花糖苷、松果菊苷、大车前苷及鞭打绣球苷 B)及环烯醚萜苷类(10-*O-trans-p*-methoxycinnamoyl-catalpol 及 10-*O-[(E)-3,4-dimethoxycinnamoyl]-catalpol*)的 HPLC-PDA 含量测定方法, 并比较不同基原兔耳草的含量差异, 为其质量控制方法及临床有效性提供依据。方法 采用资生堂 SPOLAR C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.4%甲酸溶液, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长为 325 nm; 柱温为 30 °C; 进样量为 10 μL。依据测定结果使用聚类分析和偏最小二乘法判别分析(orthogonal partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA)法进行分析。结果 在此条件下, 34 批全缘兔耳草 *Lagotis integra*、21 批短筒兔耳草 *L. brevityba*、10 批圆穗兔耳草 *L. ramalana*、6 批草叶兔耳草 *L. alutacea*、5 批短穗兔耳草 *L. brachystachya* 及 4 批紫叶兔耳草 *L. praecox* 的 6 种有效成分的色谱峰分离度均良好, 线性关系良好。不同基原所含的主要有效成分类型及含量均不一致, 有共性也有差异性。运用 SIMCA 14.1 和 SPSS 25.0 软件分析结果显示, 短筒兔耳草与圆穗兔耳草聚为一类, 紫叶兔耳草与短穗兔耳草聚为一类, 内在组成及含量差异小; 全缘兔耳草不同产区差异大, 草叶兔耳草组间差异最大。结论 建立的含量测定分析方法能有效地对多种基原兔耳草进行分析, 能有效地对其进行质量控制; 通过比较不同基原的兔耳草, 为兔耳草资源的开发及利用提供有效依据。

关键词: 全缘兔耳草; 短筒兔耳草; 圆穗兔耳草; 草叶兔耳草; 短穗兔耳草; 紫叶兔耳草; 苯丙素苷类; 环烯醚萜苷类; 毛蕊花糖苷; 松果菊苷; 大车前苷; 鞭打绣球苷 B; HPLC-PDA

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)09-2810-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.09.025

Comparison study on contents of six active ingredients of *Lagotidis Herba*

GAO Bi-xing^{1,2}, HE Fang¹, QI Jing-liang², GOU Yan^{1,2}, GENG Zhao², ZHONG Lian^{1,2}, JIANG Gui-hua¹, ZHOU Juan², JIANG Yun-bin³

1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China

2. Sichuan Institute for Drug Control/Key Laboratory of Quality Evaluation of Chinese Patent Medicines, NMPA, Chengdu 611731, China

3. College of Pharmaceutical Sciences and Chinese Medicine, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Objective HPLC-PDA content determination method was established to determinate the main active ingredients of Honglian (*Lagotidis Herba*), which included phenylpropanoid glycosides (verproside, echinacoside, plantamajoside, hemiphroside B) and iridoid glycosides (10-*O-trans-p*-methoxycinnamoyl-catalpol and 10-*O-[(E)-3,4-dimethoxycinnamoyl]-catalpol* and compared with the other primitive species, so as to provide evidence for quality control methods and clinical effectiveness. **Methods** The HPLC analysis was performed on SPOLAR C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), using acetonitrile and 0.4% formic acid solution as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min, the detection wave-length was 325 nm and column temperature was 30 °C with 10 μL injection volume. The combined determination results were analyzed using partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) and cluster analysis. **Results** Under this condition, the chromatographic peak resolution of the six active ingredients had good separation in 34 batches of *Lagotis integra*, 21 batches of *L. brevityba*, 10 batches of *L. ramalana*, six batches of *L. alutacea*, five

收稿日期: 2021-09-06

基金项目: 国家食药监总局药化司专项“特色民族药材检验方法示范性研究”; 国家重点研发计划子课题(2019YFC1712302); 成都中医药大学杏林学者项目(XSGG2019023); 成都中医药大学杏林学者项目(QNXZ2019024)

作者简介: 高必兴, 男, 博士研究生, 研究方向为中药及民族药质量研究。Tel: (028)87877141 E-mail: laughgao@foxmail.com

*通信作者: 蒋桂华, 女, 教授, 博士生导师。Tel: 18980923782 E-mail: 11469413@qq.com

蒋运斌, 男, 讲师, 研究方向为民族药, Tel: 13368082556 E-mail: yunbinjiang@swu.edu.cn

batches of *L. brachystachya* Maxim. and four batches of *L. praecox*. The six ingredients had a good linear relationship. The types and contents of the main active ingredients contained in different bases were all inconsistent, with commonalities and differences. The results analyzed by SPSS 25.0 and SIMCA 14.1 software showed that *L. brevituba* and *L. ramalana* were clustered, *L. brachystachya* and *L. praecox* were clustered together, and there were large difference in different producing areas of *L. integra*, and the difference between groups of *L. alutacea* was the greatest. **Conclusion** The established content determination and analysis method could effectively analyze a variety of *Lagotis Herba* and could effectively control its quality. By comparing the species from different origins, it provided an effective basis for the development and utilization of its resources.

Key words: *Lagotis integra* W. W. Smith; *Lagotis brevituba* Maxim; *Lagotis ramalana* Batalin; *Lagotis alutacea* W. W. Smith; *Lagotis brachystachya* Maxim; *Lagotis praecox* W. W. Smith.; phenylpropanoid glycosides; iridoid glycosides; verproside; echinacoside; plantagoside; hemiphroside B; HPLC-PDA

兔耳草为常用藏药, 始载于《月王药诊》^[1], 音译名为“洪连”^[2]。主要分布于甘肃省、青海省、云南省、四川省及西藏自治区。于《四部医典》^[3]列为藏草药之首, 药用价值极高。具有清热、解毒、利湿、平肝、行血、调经等作用。可用于发热烦渴、肺热咳嗽、头痛眩晕、湿热黄疸、月经不调、药食中毒等症^[2]。我国现存兔耳草属植物有 17 种, 多分布于西南高山, 部分可药用^[4]。不同地区使用的兔耳草药用基原不一样, 大部分基原可作“洪连”使用, 其中有一种基原“短穗兔耳草”作藏药“直打瓦曾”使用, 在藏区主要用于治疗“黄水病”^[5]。

前期调研发现, 市售及临床使用的兔耳草为兔耳草属多种植物, 以短筒兔耳草 *Lagotis brevituba* Maxim、全缘兔耳草 *L. integra* W. W. Smith、圆穗兔耳草 *L. ramalana* Batalin、短穗兔耳草 *L. brachystachya* Maxim. 及革叶兔耳草 *L. alutacea* W. W. Smith 等使用居多, 但仅有短筒兔耳草、全缘兔耳草及革叶兔耳草有标准收载^[6-7], 同时仅有短筒兔耳草收载于《中国药典》2020 年版一部中, 以松果菊苷为对照品规定含量测定, 其他基原均无含量测定的相关研究。据文献报道, 苯丙素苷类及环烯醚萜苷类成分为玄参科兔耳草属植物的主要活性成分, 具有明显的药理活性^[8-10]。本实验经前期研究发现, 兔耳草类药材中苯丙素苷类成分以毛蕊花糖苷、松果菊苷、大车前苷、鞭打绣球苷 B 居多, 环烯醚萜苷类成分以 10-*O-trans-p*-methoxy-cinnamoyl-catalpol 及 10-*O-[(E)-3,4-dimethoxy-cinnamoyl]-catalpol* 居多^[11], 故针对此 6 种成分进行含量测定, 并比较不同植物之间的成分差异, 为兔耳草资源的合理开发、市场的规范发展及临床的正确使用提供科学的依据。

1 仪器及试药

日本岛津 LC-20AD 高效液相色谱仪, PDA 检测器; 资生堂 SPOLAR C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 德国 Sartorius BP211D 型十万分之一电子天平; Milli-Q 超纯水机。

对照品毛蕊花糖苷(批号 111530-201512, 质量分数为 96.7%)、松果菊苷(批号 111670-201907, 质量分数为 91.8%)、大车前苷(批号 111914-201604, 质量分数为 90.2%)均购自中国食品药品检定研究院。鞭打绣球苷 B(质量分数为 99.6%), 10-*O-trans-p*-methoxy-cinnamoyl-catalpol(质量分数为 99.0%), 10-*O-[(E)-3,4-dimethoxy-cinnamoyl]-catalpol*(质量分数为 99.0%), 均为实验室分离纯化的对照品; 甲醇和乙腈为色谱纯(Fisher 公司); 水为 Milli-Q 纯化水。

34 批全缘兔耳草 *L. integra* W. W. Smith、21 批短筒兔耳草 *L. brevituba* Maxim、10 批圆穗兔耳草 *L. ramalana* Batalin、6 批革叶兔耳草 *L. alutacea* W. W. Smith、5 批短穗兔耳草 *L. brachystachya* Maxim. 及 4 批紫叶兔耳草 *L. praecox* W. W. Smith 均经四川省药品检验检测院黎跃成主任中药师鉴定为基原准确的药材。具体样品信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 含量测定方法

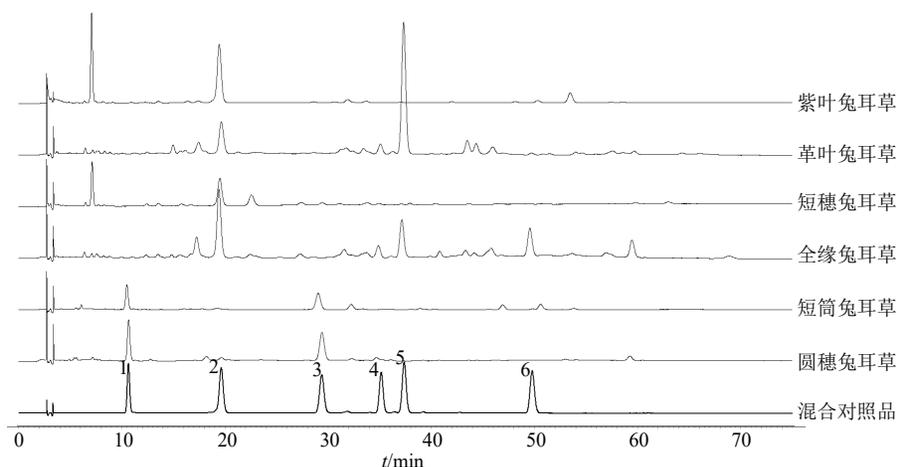
2.1.1 色谱条件与系统适用性 色谱柱: 资生堂 SPOLAR C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.4%甲酸溶液(B)梯度洗脱(0~20 min, 14% A; 20~35 min, 14%~17% A, 35~60 min, 17%~20% A; 60~70 min, 20%~14% A; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 325 nm; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL。色谱图见图 1。

2.1.2 对照品溶液的制备 取毛蕊花糖苷、大车前

表1 样品信息

Table 1 Sample information

编号	基原	采集地	编号	基原	采集地
QY-1	全缘兔耳草	四川省甘孜州石渠县	DG-7	短筒兔耳草	青海省某供应商
QY-2	全缘兔耳草	四川省甘孜州德格藏医院	DG-8	短筒兔耳草	甘肃省武夷天柱县旦马乡
QY-3	全缘兔耳草	四川省甘孜州宗萨县	DG-9	短筒兔耳草	青海省八一路药材市场
QY-4	全缘兔耳草	甘孜州藏医院	DG-10	短筒兔耳草	青海省藏医院(2018 采收)
QY-5	全缘兔耳草	宇妥藏药	DG-11	短筒兔耳草	青海省藏医院(2019 采收)
QY-6	全缘兔耳草	西藏自治区藏药厂	DG-12	短筒兔耳草	泽库县藏医院
QY-7	全缘兔耳草	西藏奇正藏药	DG-13	短筒兔耳草	青海省海南州藏医院
QY-8	全缘兔耳草	金珂藏药	DG-14	短筒兔耳草	青海三智商贸有限公司
QY-9	全缘兔耳草	西藏诺迪康药业有限公司	DG-15	短筒兔耳草	湟中县藏医院
QY-10	全缘兔耳草	青海省八一路药材市场	DG-16	短筒兔耳草	果洛州藏医院
QY-11	全缘兔耳草	西藏药检所	DG-17	短筒兔耳草	移多藏药
QY-12	全缘兔耳草	四川省甘孜州石渠县城关五村	DG-18	短筒兔耳草	西藏奇正药业
QY-13	全缘兔耳草	居麦旁藏药	DG-19	短筒兔耳草	色达县藏医院
QY-14	全缘兔耳草	云南药检所	DG-20	短筒兔耳草	荷花池药材市场(产地西藏)
QY-15	全缘兔耳草	西藏自治区	DG-21	短筒兔耳草	青海省贵南县马营镇直亥雪山
QY-16	全缘兔耳草	甘孜州藏医院	YS-1	圆穗兔耳草	四川省甘孜州石渠县
QY-17	全缘兔耳草	青海省八一路药材市场(2017)	YS-2	圆穗兔耳草	德格藏医院
QY-18	全缘兔耳草	青海省八一路药材市场(2020)	YS-3	圆穗兔耳草	宗萨藏医院
QY-19	全缘兔耳草	青海省海南州藏医院	YS-4	圆穗兔耳草	四川省阿坝州壤塘县中壤塘乡中壤塘村
QY-20	全缘兔耳草	四川省甘孜州稻城海子山垭口	YS-5	圆穗兔耳草	四川省阿坝若尔盖藏医院
QY-21	全缘兔耳草	四川省甘孜州理塘县藏坝乡	YS-6	圆穗兔耳草	湟中县藏医院
QY-22	全缘兔耳草	四川省甘孜州理塘县兔耳山垭口	YS-7	圆穗兔耳草	阿坝药检所
QY-23	全缘兔耳草	四川省甘孜州理塘县德巫乡	YS-8	圆穗兔耳草	青海优润堂商贸有限责任公司(2017)
QY-24	全缘兔耳草	四川省甘孜州理塘县拉波乡拉美村	YS-9	圆穗兔耳草	青海优润堂商贸有限责任公司(2019)
QY-25	全缘兔耳草	四川省甘孜州乡城县藏医院	YS-10	圆穗兔耳草	小金县美沃乡
QY-26	全缘兔耳草	玉树藏族自治州藏医院	GY-1	革叶兔耳草	西藏错那雷达站
QY-27	全缘兔耳草	甘南州藏医院	GY-2	革叶兔耳草	四川阿坝年宝叶则
QY-28	全缘兔耳草	囊谦县藏医院	GY-3	革叶兔耳草	红原藏医院
QY-29	全缘兔耳草	理塘藏医院	GY-4	革叶兔耳草	西藏山南市错那县波拉山
QY-30	全缘兔耳草	西藏拉萨蓝屋石药材公司	GY-5	革叶兔耳草	拉萨市当雄县羊八井镇雪古拉山
QY-31	全缘兔耳草	得荣藏医院	GY-6	革叶兔耳草	云南迪庆州白马雪山第二垭口
QY-32	全缘兔耳草	西藏藏医学院藏药有限公司	DS-1	短穗兔耳草	藏瀚阁
QY-33	全缘兔耳草	凉山州木里藏族自治县中藏医院	DS-2	短穗兔耳草	青海省海晏县三联村
QY-34	全缘兔耳草	雅江县雅江县柯拉山上	DS-3	短穗兔耳草	西藏医学院
DG-1	短筒兔耳草	马尔康藏医院	DS-4	短穗兔耳草	青海省八一路药材市场
DG-2	短筒兔耳草	仁青藏药行	DS-5	短穗兔耳草	迪庆州藏医院
DG-3	短筒兔耳草	青海省果洛州	ZY-1	紫叶兔耳草	四川省甘孜州理塘县拉波乡拉德村
DG-4	短筒兔耳草	青海省西宁市大通回族土族自治县	ZY-2	紫叶兔耳草	四川阿坝藏医院
DG-5	短筒兔耳草	青海省门源回族自治县岗什卡雪峰	ZY-3	紫叶兔耳草	云南迪庆州白马雪山
DG-6	短筒兔耳草	青海省大东树山	ZY-4	紫叶兔耳草	甘孜州巴塘县禾尼乡山上



1-松果菊苷 2-大车前苷 3-毛蕊花糖苷 4-鞭打绣球苷 B 5-10-*O*-*trans*-*p*-methoxycinnamoyl-catalpol 6-10-*O*-[(*E*)-3,4-dimethoxycinnamoyl]-catalpol
 1-echinacoside 2-plantagoside 3-verproside 4-hemiphroside B 5-10-*O*-*trans*-*p*-methoxycinnamoyl-catalpol 6-10-*O*-[(*E*)-3,4-dimethoxycinnamoyl]-catalpol

图1 对照品及各样品 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC fingerprint of reference substance and samples

苷、松果菊苷、鞭打绣球苷 B、10-*O*-*trans*-*p*-methoxycinnamoyl-catalpol 及 10-*O*-[(*E*)-3,4-dimethoxycinnamoyl]-catalpol 对照品适量，精密称定，加 70% 甲醇分别制成质量浓度均为 0.1 mg/mL 的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取上述样品粉末（过三号筛）约 0.1 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 70% 甲醇 50 mL，称定质量，超声处理（功率 250 W，频率 33 kHz）30 min，放冷，再称定质量，用 70% 甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取

续滤液，即得。

2.2 方法学考察

2.2.1 线性关系 分别精密吸取“2.1.2”项下的混合对照品储备溶液 0.25、0.5、1.0、2.0、2.5、5.0、10 mL 置 10 mL 的量瓶中，加 70% 甲醇稀释至刻度，摇匀，即得。按“2.1.1”项色谱条件下进样分析，记录其峰面积。以峰面积为纵坐标（*Y*），其质量浓度为横坐标（*X*），绘制标准曲线，6 种成分线性关系良好（ $R^2 \geq 0.9998$ ）。各成分标准曲线的回归方程、线性范围及相关系数见表 2。

表 2 各被测成分的标准曲线方程、线性范围和相关系数

Table 2 Calibration curve, linear range, correlation coefficient of each component

成分	回归方程	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	R^2
松果菊苷	$Y=9\ 220.6 X+34\ 201.3$	2.882 5~115.300 0	0.999 8
大车前苷	$Y=14\ 700.3 X+28\ 163.1$	3.087 5~123.500 0	0.999 9
毛蕊花糖苷	$Y=13\ 677.2 X-101\ 358.1$	2.987 5~119.500 0	0.999 8
hemiphroside B	$Y=13\ 958.6 X+3\ 408.5$	2.762 5~110.500 0	1.000 0
10- <i>O</i> - <i>trans</i> - <i>p</i> -methoxycinnamoyl-catalpol	$Y=18\ 785.4 X-5\ 173.9$	3.012 5~120.500 0	0.999 9
10- <i>O</i> -[(<i>E</i>)-3,4-dimethoxycinnamoyl]-catalpol	$Y=17\ 757.5 X-2\ 081.4$	2.888 5~115.400 0	0.999 9

2.2.2 检测限与定量限测定 取“2.1.2”项下对照品混合溶液用 70% 甲醇逐级稀释后进样测定，以色谱图中信噪比（*S/N*）3 : 1 为检测限，*S/N* 10 : 1 为定量限。结果表明，各成分检测限为 2.8~10.6 ng，定量限为 9.3~34.9 ng，灵敏度高。

2.2.3 精密度试验 精密吸取“2.1.2”项下对照品

混合溶液 10 μL ，连续进样 6 次，记录峰面积。结果毛蕊花糖苷、大车前苷、松果菊苷、鞭打绣球苷 B、10-*O*-*trans*-*p*-methoxycinnamoyl-catalpol、10-*O*-[(*E*)-3,4-dimethoxycinnamoyl]-catalpol 的峰面积的 RSD 分别为 0.14%、0.21%、0.31%、0.34%、0.42% 及 0.21%，表明仪器精密度良好。

2.2.4 重复性试验 取样品粉末(QY-1)6份,分别按照“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱方法测定,记录峰面积,计算含量。结果各份供试品溶液的毛蕊花糖苷、大车前苷、松果菊苷、鞭打绣球苷B、10-*O-trans-p*-methoxycinnamoyl-catalpol、10-*O-[(E)-3,4-dimethoxy*-cinnamoyl]-catalpol的质量分数的RSD分别为0.89%、1.21%、0.82%、0.82%、0.76%及0.94%。

2.2.5 稳定性试验 取同一份供试品溶液(QY-1),分别于0、2、4、8、12、24 h进样测定。结果毛蕊花糖苷、大车前苷、松果菊苷、鞭打绣球苷B、10-*O-trans-p*-methoxycinnamoyl-catalpol、10-*O-[(E)-3,4-dimethoxy*-cinnamoyl]-catalpol的峰面积的RSD分别为0.45%、1.01%、0.73%、0.97%、0.84%及0.74%,结果表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.2.6 加样回收率试验 分别取松果菊苷和毛蕊花糖苷适量,精密称定,置量瓶中,加70%甲醇溶解配制成质量浓度分别为1.040 2、1.016 6 mg/mL的对照品溶液。取已测定的供试品粉末(YS-1)6份,每份各约0.05 g,精密称定,分别置具塞锥形

瓶中,分别精密加入上述2种对照品溶液贮备液各1.0 mL。另分别取大车前苷、鞭打绣球苷B、10-*O-trans-p*-methoxycinnamoyl-catalpol、10-*O-[(E)-3,4-dimethoxy*-cinnamoyl]-catalpol适量,精密称定,置量瓶中,加70%甲醇溶解配制成质量浓度分别为1.011 2、0.301 2、0.511 5、0.253 8 mg/mL的对照品溶液。取已测定的供试品粉末(QY-1)6份,每份各约0.05 g,精密称定,分别置具塞锥形瓶中,分别精密加入上述2种对照品溶液贮备液各1.0 mL。按照“2.1.3”项下方法平行制备供试品溶液,进样分析,计算回收率,表明该方法加样回收率试验结果良好。松果菊苷、毛蕊花糖苷、大车前苷、鞭打绣球苷B、10-*O-trans-p*-methoxy-cinnamoyl-catalpol、10-*O-[(E)-3,4-dimethoxy*-cinnamoyl]-catalpol的回收率分别为97.5%、99.9%、99.8%、99.2%、101.3%及100.3%,RSD分别为0.90%、2.11%、2.49%、1.38%、1.48%及0.95%。

2.2.7 样品含量测定 称取样品兔耳草粉末(过3号筛)0.1 g,精密称定,分别按照“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱方法测定,记录6种成分的峰面积,计算含量。结果见表3。

表3 样品测定结果 ($n=3$)Table 3 Results of samples determination ($n=3$)

编号	质量分数/%							
	松果菊苷	大车前苷	毛蕊花糖苷	鞭打绣球苷B	10- <i>O-trans-p</i> -methoxy-cinnamoyl-catalpol	10- <i>O-[(E)-3,4-dimethoxy</i> -cinnamoyl]-catalpol	苯丙素苷类	环烯醚萜苷类
QY-1	/	2.47	/	0.47	1.09	0.49	2.94	1.58
QY-2	/	2.48	/	0.88	0.68	0.27	3.36	0.95
QY-3	/	3.19	/	1.30	2.52	0.27	4.49	2.79
QY-4	/	1.00	/	0.17	0.01	0.01	1.17	0.02
QY-5	/	2.78	/	1.77	0.44	0.15	4.55	0.59
QY-6	/	1.47	/	2.52	0.11	0.05	3.99	0.16
QY-7	/	3.10	/	1.12	1.38	1.01	4.22	2.39
QY-8	/	2.88	/	1.72	0.85	0.11	4.60	0.96
QY-9	/	2.88	/	1.72	0.85	0.11	4.60	0.96
QY-10	/	2.21	/	1.77	0.12	0.03	3.98	0.15
QY-11	/	5.89	/	0.82	2.67	1.51	6.71	4.18
QY-12	/	1.78	/	0.21	0.41	0.15	1.99	0.56
QY-13	/	3.34	/	0.88	1.23	0.59	4.22	1.82
QY-14	/	2.80	/	0.68	0.80	0.15	3.48	0.95
QY-15	/	2.90	/	1.99	0.18	0.04	4.89	0.22
QY-16	/	1.87	/	0.28	0.01	0.01	2.15	0.02
QY-17	/	2.11	/	1.83	0.12	0.03	3.94	0.15
QY-18	/	3.42	/	2.11	1.62	0.48	5.53	2.10
QY-19	/	3.38	/	1.42	3.11	0.36	4.80	3.47
QY-20	/	2.19	/	0.19	0.03	0.01	2.38	0.04
QY-21	/	7.70	/	0.20	0.06	0.01	7.90	0.07
QY-22	/	5.72	/	1.55	0.01	0.01	7.27	0.02
QY-23	/	5.76	/	0.64	0.04	0.01	6.40	0.05
QY-24	/	6.13	/	0.33	0.06	0.01	6.46	0.07
QY-25	/	2.29	/	0.94	0.17	0.04	3.23	0.21
QY-26	/	1.77	/	1.34	0.07	0.01	3.11	0.08

续表 3

编号	质量分数/%							
	松果菊苷	大车前苷	毛蕊花糖苷	鞭打绣球苷 B	10- <i>O</i> - <i>trans</i> - <i>p</i> -methoxy-cinnamoyl-catalpol	10- <i>O</i> -[(<i>E</i>)-3,4-dimethoxy-cinnamoyl]-catalpol	苯丙素苷类	环烯醚萜苷类
QY-27	/	1.59	/	0.41	0.61	0.02	2.00	0.63
QY-28	/	4.98	/	0.90	0.16	0.04	5.88	0.20
QY-29	/	4.61	/	0.42	3.52	0.26	5.03	3.78
QY-30	/	2.54	/	3.18	0.29	0.08	5.72	0.37
QY-31	/	4.19	/	1.23	1.57	0.10	5.42	1.67
QY-32	/	3.57	/	0.16	0.18	0.01	3.73	0.19
QY-33	/	3.01	/	1.10	1.98	1.10	4.11	3.08
QY-34	/	3.22	/	0.24	0.02	0.01	3.46	0.03
均值	/	3.27	/	1.07	0.79	0.22	4.34	1.02
DG-1	1.06	0.11	0.48	/	/	/	1.65	/
DG-2	1.16	0.01	0.79	/	/	/	1.96	/
DG-3	0.86	0.08	0.85	/	/	/	1.79	/
DG-4	0.70	0.10	0.63	/	/	/	1.43	/
DG-5	0.73	0.09	0.45	/	/	/	1.27	/
DG-6	1.15	0.21	0.45	/	/	/	1.81	/
DG-7	1.64	0.05	1.45	/	/	/	3.14	/
DG-8	1.05	0.15	0.55	/	/	/	1.75	/
DG-9	0.60	0.05	0.43	/	/	/	1.08	/
DG-10	1.49	0.16	0.71	/	/	/	2.36	/
DG-11	1.48	0.02	0.68	/	/	/	2.18	/
DG-12	1.26	0.03	1.19	/	/	/	2.48	/
DG-13	1.72	0.05	0.98	/	/	/	2.75	/
DG-14	1.38	0.13	0.76	/	/	/	2.27	/
DG-15	1.00	0.19	0.84	/	/	/	2.03	/
DG-16	1.71	0.15	0.94	/	/	/	2.80	/
DG-17	1.19	0.01	0.66	/	/	/	1.86	/
DG-18	2.04	0.04	1.65	/	/	/	3.73	/
DG-19	1.85	0.15	0.85	/	/	/	2.85	/
DG-20	1.17	0.02	1.15	/	/	/	2.34	/
DG-21	1.20	0.04	0.97	/	/	/	2.21	/
均值	1.26	0.09	0.83	/	/	/	2.18	/
YS-1	1.31	0.12	1.35	/	/	/	2.78	/
YS-2	0.96	0.13	0.74	/	/	/	1.83	/
YS-3	1.35	0.25	1.11	/	/	/	2.71	/
YS-4	0.93	0.22	1.17	/	/	/	2.32	/
YS-5	1.61	0.21	2.53	/	/	/	4.35	/
YS-6	0.65	0.37	0.63	/	/	/	1.65	/
YS-7	1.19	0.01	1.22	/	/	/	2.42	/
YS-8	1.25	0.21	0.70	/	/	/	2.16	/
YS-9	1.11	0.49	0.87	/	/	/	2.47	/
YS-10	0.86	0.11	2.05	/	/	/	3.02	/
均值	1.12	0.21	1.24	/	/	/	2.57	/
GY-1	/	2.77	/	0.88	0.38	2.77	3.65	3.15
GY-2	/	1.44	/	0.05	0.05	1.44	1.49	1.49
GY-3	/	2.37	/	0.80	0.21	2.37	3.17	2.58
GY-4	/	1.17	/	0.37	3.80	1.17	1.54	4.97
GY-5	/	2.09	/	1.95	0.04	2.09	4.04	2.13
GY-6	/	4.84	/	0.03	0.05	4.84	4.87	4.89
均值	/	2.45	/	0.68	0.76	2.45	3.13	3.20
DS-1	/	0.84	0.40	0.01	0.84	0.40	1.25	1.24
DS-2	/	0.93	0.04	0.08	0.93	0.04	1.05	0.97
DS-3	/	1.25	0.24	0.02	1.25	0.24	1.51	1.49
DS-4	/	0.63	0.28	0.03	0.63	0.28	0.94	0.91
DS-5	/	0.75	0.11	0.14	0.75	0.11	1.00	0.86
均值	/	0.88	0.21	0.06	0.88	0.21	1.15	1.09
ZY-1	/	2.15	/	0.05	/	/	2.20	/
ZY-2	/	0.33	/	0.07	/	/	0.40	/
ZY-3	/	0.31	/	0.11	/	/	0.42	/
ZY-4	/	0.24	/	0.10	/	/	0.34	/
均值	/							

2.2.8 聚类分析 (hierarchical clustering alg, HCA) 采用SPSS 25.0统计软件进行HCA分析, 选用组内联接聚类法, 以欧式平方距离度量标准, 数据统计分析。当欧式平方距离为2.5时, 短筒兔耳草与圆穗兔耳草聚成了一类, 紫叶兔耳草与短穗兔耳草聚成了一类; 当欧式平方距离为10时, 大部分全缘兔耳草与草叶兔耳草聚成了一类, 剩下的全缘兔耳草单独聚成了一类, 此类全缘兔耳草实地采样均是来源于甘孜州理塘周边区域, 稻城, 巴塘等区域, 植物形态上与西藏所产兔耳草存在着一定的差异, 说明其种内存在着一定的差异。

2.2.9 偏最小二乘法判别分析 (orthogonal partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA) 法采用SIMCA 14.1统计软件, 先对数据进行分类识别, 进行OPLS-DA分析, 采用无监督模式识别方法观察样品的自然聚集, 结果见图2。结果表明短筒兔耳草与圆穗兔耳草相互聚集, 可与其他4种兔耳草明显的区分; 紫叶兔耳草与短穗兔耳草聚集, 草叶兔耳草不同样品间分散, 组间差异大; 全缘兔耳草大部分相互聚集, 不同样品间存在一定差异, 与HCA结果大体一致。

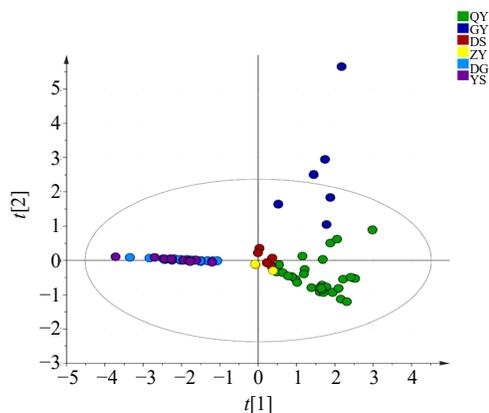


图2 不同基原兔耳草的 OPLS-DA 得分图

Fig. 2 OPLS-DA score diagram of *Lagotidis Herba*

3 讨论

本研究针对色谱条件与系统适用性及供试品溶液的制备进行了考察。色谱柱的考察了资生堂 SPOLAR C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), Waters X-Bridge C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 及 Hypersil GOLD C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 最终以资生堂 SPOLAR C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 分离度最佳; 检测波长在 190~700 nm 进行紫外-可见光全波长扫描, 发现检测波长在 325 nm 时各色谱峰的峰面积最高; 流动相系统及比例针对了乙腈-

水、甲醇-水、乙腈-0.2%甲酸溶液、乙腈-0.4%甲酸溶液、乙腈-0.5%甲酸溶液及乙腈-0.2%磷酸溶液, 最终以乙腈(A)-0.4%甲酸溶液梯度洗脱分离效果最佳。供试品溶液的制备针对了样品的提取溶剂, 提取方法及料液比进行了考察, 最终以“2.1.3”项所述方法为最佳。

据相关文献与标准记载, 兔耳草于藏区主要用于清肝胆热, 用于治疗热性肝病^[2,12]等, 本实验所测成分均为其活性成分。结果表明, 不同基原兔耳草含有此 6 种成分的种类及含量具有共性及差异性: 首先在种类方面, 全缘兔耳草主要含有苯丙素苷类成分(大车前苷及鞭打绣球苷 B)与环烯醚萜苷类(10-*O-trans-p*-methoxycinnamoyl-catalpol 及 10-*O-[(E)-3,4-dimethoxycinnamoyl]-catalpol*), 无毛蕊花糖苷及松果菊苷; 草叶兔耳草与全缘兔耳草相似, 含有此 4 类成分; 短穗兔耳草除此 4 类成分外, 还含有少量的松果菊苷。短筒兔耳草主要含有苯丙素苷类成分(毛蕊花糖苷、大车前苷及松果菊苷), 无上述环烯醚萜苷类成分。圆穗兔耳草同短筒兔耳草。紫叶兔耳草含有大车前苷及少量的鞭打绣球苷 B。其次在含量方面, 单体成分平均含量方面, 大车前苷: 全缘兔耳草(3.27%)>草叶兔耳草(2.28%)>短穗(0.88%)>紫叶(0.76%)>圆穗(0.21%)>短筒(0.09%); 松果菊苷: 短筒(1.26%)>圆穗(1.12%); 毛蕊花糖苷: 圆穗(1.24%)>短筒(0.83%)>短穗(0.21%); 鞭打绣球苷 B: 全缘(1.07%)>草叶(0.68%)>紫叶(0.08%)>短穗(0.06%)。10-*O-trans-p*-methoxycinnamoyl-catalpol: 短穗(0.88%)>全缘(0.79%)>草叶(0.76%); 10-*O-[(E)-3,4-dimethoxycinnamoyl]-catalpol*: 草叶(2.45%)>全缘(0.22%)>短穗(0.21%)。大类成分的总量方面, 苯丙素苷类: 全缘(4.34%)>草叶(3.13%)>圆穗(2.57%)>短筒(2.18%)>短穗(1.15%)>紫叶(0.84%), 环烯醚萜苷类: 草叶(3.20%)>短穗(1.09%)>全缘(1.02%)。

通过上述实验结果同时说明, 不同基原兔耳草所含成分的种类及含量很多不一致, 作同一药材使用有待商榷; HCA 分析及 OPLS-DA 法分析结果表明圆穗兔耳草与短筒兔耳草明显的聚成了一类, 互相聚集, 2 种内在化学组成与含量相似, 圆穗兔耳草与短筒兔耳草同属于“雄洪连”^[11], 此研究结果表明短筒兔耳草与圆穗兔耳草在成分的种类及含

量上具有很大的相似性,而圆穗兔耳草未被现行国家和地方标准收载,但在市场及临床有一定的应用基础,与短筒兔耳草等同入药,并取得了相应的临床疗效,以缓解当前短筒兔耳草资源紧缺的问题。而全缘兔耳草所含成分的种类和含量与短筒兔耳草有很大的差异,从大类成分的含量来看,无论从苯丙素苷类还是环烯醚萜苷类成分全缘兔耳草的含量均大于短筒兔耳草,前期通过调研及本草文献考证发现,圆穗兔耳草与短筒兔耳草同属于“雄洪连”,全缘兔耳草属“雌洪连”,雄洪连的临床疗效优于雌洪连^[13],短筒兔耳草优于全缘兔耳草有待进一步的研究。

现有标准中,《中国药典》2020年版^[2]洪连(基原:短筒兔耳草)中收载的以松果菊苷(苯丙素苷类成分)作为对照品进行含量测定。全缘兔耳草作为药材“兔耳草”的基原收载于《部颁藏药材》标准^[6],但无含量测定项,革叶兔耳草作为药材“兔耳草”的基原收载于《云南省药品标准》(1996)^[7]中,但无含量测定项。圆穗兔耳草、紫叶兔耳草及短穗兔耳草则未有相关标准收载;本研究针对其有效成分进行研究,也为不同基原兔耳草质量标准的建立和提高打下基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 毛继祖. 月王药诊 [M]. 上海: 上海科学技术出版社,

2012: 59.

- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 286-287.
- [3] 宇妥·元丹贡布等著. 马世林等译注. 四部医典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987: 79.
- [4] 中国科学院中药植物志编委会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 123.
- [5] 朱继孝, 欧阳香, 张红阳, 等. 短穗兔耳草葫芦烷型三萜化学成分研究 [J]. 中药材, 2020, 43(5): 1123-1126.
- [6] 中华人民共和国卫生部药品标准: 藏药第一册 [S]. 1995: 98.
- [7] 云南省卫生厅. 云南省药品标准 [M]. 云南大学出版社. 1996: 84-85.
- [8] 刘婕, 许浚, 张铁军. 苯丙素苷类化合物防治神经退行性疾病的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2009, 32(1): 62-66.
- [9] 郭梦环, 甘露, 司婧, 等. 毛蕊花糖苷的药理作用及作用机制研究进展 [J]. 中成药, 2020, 42(8): 2119-2125.
- [10] 薛长松, 徐晶, 李萃萍, 等. 环烯醚萜苷类化合物体内代谢及代谢物药理活性研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(1): 39-45.
- [11] 高必兴, 苟琰, 齐景梁, 等. 多基原兔耳草 HPLC 指纹图谱对比研究 [J]. 中草药, 2020, 51(15): 4019-4024.
- [12] 朱继孝, 张红阳, 钟国跃, 等. 藏族药兔耳草属药用植物化学成分与药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(12): 214-222.
- [13] 毛继祖, 卡洛. 蓝琉璃 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2012: 236.

[责任编辑 时圣明]