

远志药材的 HPLC 指纹图谱

姜 勇, 张 娜, 崔 振, 屠鹏飞*

(北京大学 药学院 天然药物学系, 北京 100083)

摘要: 目的 研究并建立远志药材的指纹图谱。方法 采用反相高效液相色谱法, Kromasil C₁₈ 色谱柱, 乙腈-0.05% 磷酸水溶液梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 318 nm, 建立了远志药材的指纹图谱, 并对 14 个不同来源的商品药材进行了检测。另外, 利用指纹图谱技术对不同商品和不同加工方法的远志药材进行了比较。结果 14 批不同来源的商品远志药材指纹图谱相似度较高, 并且利用“中药色谱指纹图谱相似度评价软件”生成了远志药材的对照指纹图谱, 共有 29 个色谱峰, 各色谱峰的分离较好, 符合指纹图谱检测要求。结论 采用 HPLC 指纹图谱技术可以有效地控制远志药材的质量。

关键词: 远志; 高效液相色谱法; 指纹图谱

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2006)02 - 0179 - 05

Fingerprint of *Polygala tenuifolia* by high performance liquid chromatography

JIANG Yong, ZHANG Na, CUI Zhen, TU Peng-fei*

(Department of Natural Medicines, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract: **Aim** To study and establish the fingerprint of *Polygala tenuifolia* by RP-HPLC. **Methods** The fingerprint of *P. tenuifolia* was built by using Kromasil C₁₈ as column and acetonitrile-0.05% phosphoric acid aqueous in gradient as mobile phase. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the detecting wavelength was set at 318 nm. Total 14 batches of *P. tenuifolia* from different habitats were detected, and different commodities and preparative methods were compared. **Results** Samples from different habitats were of high similarities, and the qualities of “yuanzhitong” and “yuanzhirou” were better than that of “yuanzhigun”, while the fingerprints of *P. tenuifolia* with different preparative methods have not obvious differences. Moreover, the standard fingerprint of *P. tenuifolia* was originated from the “Computer Aided Similarity Evaluation” software, and 29 common peaks existed in the fingerprint. Each peak in the fingerprint was separated very well under the above chromatographic condition, with good accuracy, stability and repeatability, satisfied to the requests of fingerprint. **Conclusion** The RP-HPLC fingerprint method can be used in the quality control of *P. tenuifolia*.

Key words: *Polygala tenuifolia*; HPLC; fingerprint

远志为远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* Willd. 和卵叶远志 *Polygala sibirica* L. 的根, 是一种常用中药, 始载于《神农本草经》, 被列为上品, 有益智安神、祛痰消肿等功效^[1]。远志所含的化学成分

复杂, 迄今为止本课题组已从远志中分离鉴定了近 60 个化合物, 主要是皂苷类、糖酯类 (2~6 个糖的糖酯类) 和吡啶酮类成分^[2-4]。不同来源的远志药材由于受产地、气候、不同的采收时间及加工方法的影响致使其所含的有效成分的含量具有一定的差别, 从而影响了临床疗效, 因此, 如何有效地控制远志药材的质量, 成为科研工作者探讨的一个课题。

以前关于远志的质量控制多数都停留在性状和

收稿日期: 2005-04-19.

基金项目: 教育部博士点基金项目 (20030001042).

* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 10 - 82802750,

E-mail: pengfeitu@bjmu.edu.cn

薄层鉴别上,后来陆续有文章报道对远志中的总皂苷 羟基皂苷元进行含量测定^[5,6]。虽然这些方法能在一定程度上控制远志药材的质量,但是对于远志这样的有效成分类型多、组分复杂的中药材,仅测定某类成分的含量,难以客观、有效地评价或控制药材的质量。而指纹图谱技术作为一种多组分复杂样品的有效质量控制方法,能够反映出待测样品的整体性、特征性,目前已被广泛用于中草药及其各种制剂的质量控制。

本文采用高效液相色谱法,研究并建立中药远志的指纹图谱,并对不同来源的远志药材进行对比,以期对远志的质量控制建立有效的方法,并为远志的临床用药提供参考。

材料与方法

仪器 高效液相色谱仪 HP 1100 系列:四元泵,在线脱气机,自动进样器,柱温箱,二极管阵列检测器。

药品与试剂 色谱柱 Kromasil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm ID, 5 μm)。对照品为 3,6'-二芥子酰基蔗糖酯由本室分离鉴定,纯度大于 95%。远志药材购于 14 个地区,均由本院屠鹏飞教授鉴定为远志科植物远志 *P. tenuifolia* 的干燥根或根皮。乙腈为色谱纯(美国 J. T. Baker 公司产品)。

色谱条件与系统适用性 以十八烷基键合硅胶为填充剂;乙腈-0.05%磷酸水溶液为流动相梯度洗脱,运行时间为 80 min,洗脱梯度如下:11:89(0~7 min),11:89→15:85(7~8 min),15:85(8~20 min),15:85→20:80(20~23 min),20:80→25:75(23~28 min),25:75(28~40 min),25:75→29:71(40~48 min),29:71→35:65(48~56 min),35:65→40:60(56~57 min),40:60→43:57(57~70 min),43:57→11:89(70~75 min);柱温为 30℃;流速为 1.0 mL·min⁻¹;检测波长为 318 nm;理论塔板数以 3,6'-二芥子酰基蔗糖酯计不低于 3 000。

对照品溶液 精密称取真空干燥的 3,6'-二芥子酰基蔗糖酯对照品适量,加水制成 0.648 mg·mL⁻¹的对照品溶液。

供试品溶液 取本品粉末(过 4 号筛)1.0 g,精密称定,置具塞三角瓶中,加 70%甲醇 10 mL,称重,超声提取 0.5 h,称重,补足减失重量,静置,过滤。取续滤液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

测定法 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 5 μL,注入液相色谱仪,记录 80 min 的色谱图,

即得。

数据处理 用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”(国家药典委员会编)软件进行数据处理,将多个色谱图进行比较,得到可全面反映多个色谱图特征的共有模式色谱图。以此模式为基准,计算每个色谱图与之相比较的相似度。

结果

1 精密度、稳定性和重现性试验

从 14 个地区购得商品远志药材 a~n(表 1),取陕西产(样品 j)的供试品溶液连续进样 5 次,以考察指纹图谱的精密度;另取该产地的供试品溶液分别在 0, 3, 6, 9, 12 和 24 h 进样,以考察指纹图谱的稳定性;最后取样品 j 的药材 5 份,按供试品溶液的制备方法制备供试品溶液,注入液相色谱仪,检测指纹图谱的重现性。上述结果通过数据处理软件分析,结果表明各色谱峰的相对保留时间和峰面积基本一致,与对照模式的色谱图相似度均大于 0.99,说明样品的稳定性、仪器的精密度和方法重现性良好,符合指纹图谱的要求。

Table 1 The habitat of the *P. tenuifolia* commodities

No.	Habitat	No.	Habitat
a	Anguo, Hebei Prov. (1)	h	Baotou, Neimenggu Prov.
b	Bozhou, Anhui Prov.	i	Heyang, Shaanxi Prov.
c	Guangzhou, Guangdong Prov.	j	Xi'an, Shaanxi Prov.
d	Shijiazhuang, Hebei Prov.	k	Shenyang, Liaoning Prov.
e	Harbin, Heilongjiang Prov.	l	Tonghua, Jilin Prov.
f	Zhengzhou, Henan Prov.	m	Anguo, Hebei Prov. (2)
g	Nanchang, Jiangxi Prov.	n	Lanzhou, Gansu Prov.

2 远志药材 HPLC 指纹图谱中的特征峰

根据 14 批不同来源远志药材指纹图谱的检测结果,利用“中药色谱指纹图谱相似度评价软件”,生成远志药材共有模式的对照指纹图谱(图 1,表 2),其中共有色谱峰 29 个,峰 10 为对照品 3,6'-二芥子酰基蔗糖酯的色谱峰。

3 各地商品远志药材的指纹图谱相似度评价

采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”软件对从各地购得的商品远志药材的指纹图谱进行数据处理,生成对照指纹图谱(图 1)。远志药材 a~n 与对照指纹图谱的相似度分别为 0.958, 0.972, 0.960, 0.974, 0.993, 0.990, 0.984, 0.990, 0.989, 0.983, 0.992, 0.982, 0.994, 0.843。从上述结果可以看出,除兰州以外的其他产地的远

志药材指纹图谱的相似度均较高,说明远志药材所含化学成分随产地变化较小。兰州产地远志药材的指纹图谱与其他产地药材的指纹图谱相比,所含的主要色谱峰基本相似,只是色谱峰的面积比有所不同,其 35 min 之前的色谱峰峰面积大于其他产地远志药材的相应色谱峰,尤其是 2, 3, 4, 9, 10 和 13 号峰,而 35 min 之后的色谱峰面积则明显小于其他产地相应的色谱峰(图 2n)。

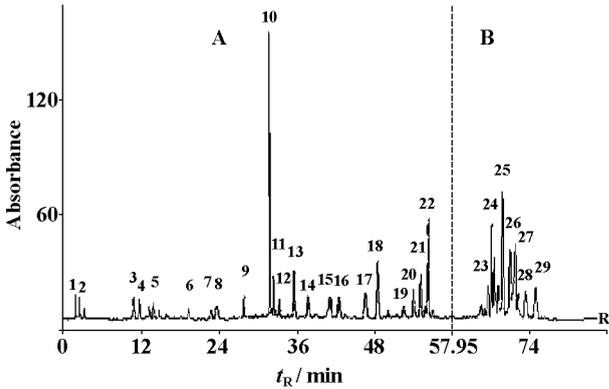


Figure 1 Fingerprint graphic of *Polygala tenuifolia*. Peak 10: 3, 6'-disinapoyl sucrose ester; Peak 1 - 29 see Table 2

Table 2 Chromatography data of fingerprint graph

Peak No.	t_R / min	Area	Peak No.	t_R / min	Area
1	1.99	110.64	16	41.08	308.14
2	2.49	118.79	17	45.00	474.40
3	10.40	213.41	18	46.83	655.98
4	11.36	185.62	19	50.72	242.38
5	12.81	155.48	20	52.18	363.02
	13.40	126.88	21	53.27	434.65
	14.25	71.10	22	54.37	705.65
6	18.66	114.38	23	63.30	261.39
7	22.01	119.00	24	63.83	662.99
8	22.81	235.48		64.20	625.73
9	26.90	204.34		64.83	320.82
10	30.65	1413.08	25	65.47	1125.13
11	31.36	304.48	26	66.60	901.07
12	32.20	187.30	27	67.34	1039.17
13	34.04	394.47		67.80	321.12
14	36.43	344.46	28	68.89	436.39
15	39.73	466.89	29	70.40	451.40

4 不同加工方法商品远志的指纹图谱分析

远志药材的商品主要有去除木心的“远志筒”、“远志肉”及不去木心的“远志棍”3种^[7]。为了比较去与不去木心的差别,分别对这3种不同加工方法的远志药材和去除的木心进行了指纹图谱的分析。结果发现“远志筒”、“远志肉”、“远志棍”及

“远志木心”的色谱峰基本相似,只是峰面积有所不同:“远志木心”的各色谱峰面积远小于“远志筒”、“远志肉”和“远志棍”;“远志棍”中的色谱峰面积略低于“远志筒”和“远志肉”;“远志肉”与“远志筒”各色谱峰面积相当,结果见图 3。

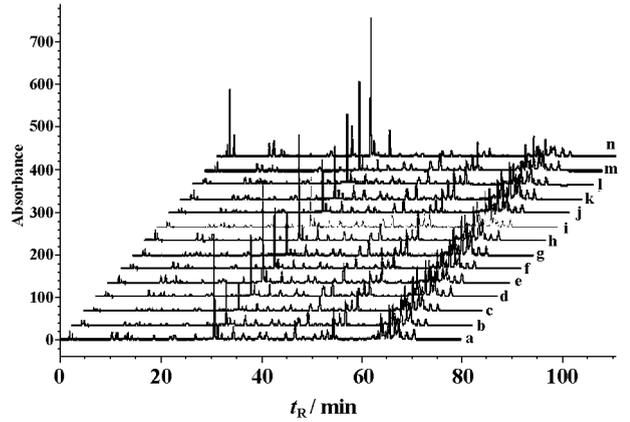


Figure 2 Fingerprint graphs of *P. tenuifolia* commodities from different habitats. a: Anguo, Hebei Prov. (1); b: Bozhou, Anhui Prov.; c: Guangzhou, Guangdong Prov.; d: Shijiazhuang, Hebei Prov.; e: Haerbin, Heilongjiang Prov.; f: Zhengzhou, Henan Prov.; g: Nanchang, Jiangxi Prov.; h: Baotou, Neimenggu Prov.; i: Heyang, Shaanxi Prov.; j: Xi'an, Shaanxi Prov.; k: Shenyang, Liaoning Prov.; l: Tonghua, Jilin Prov.; m: Anguo, Hebei Prov. (2); n: Lanzhou, Gansu Prov.

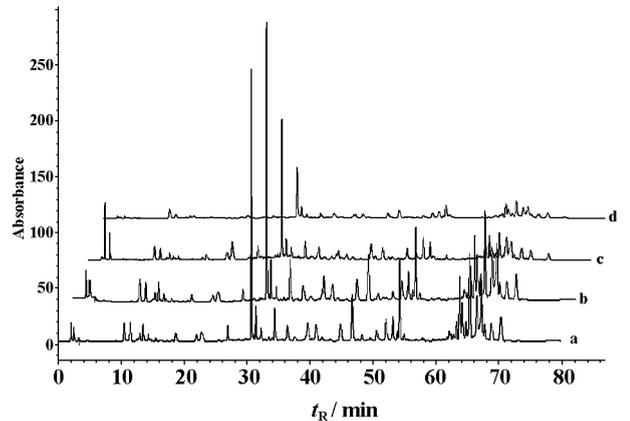


Figure 3 Fingerprints of different *P. tenuifolia* commodities. a: Cortex of *P. tenuifolia* (Yuanzhi tong); b: Cortex of *P. tenuifolia* (Yuanzhi rou); c: Root of *P. tenuifolia* (Yuanzhi gun); d: Duramen of *P. tenuifolia* (Yuanzhi muxin)

5 远志不同炮制品的指纹图谱分析

远志药材的炮制方法有制远志、蜜远志、炒远志和朱远志^[7]。作者收集了市面上最常见的制远志

(甘草炙)和蜜远志(蜜炙)进行了指纹图谱分析,以比较其与生品的区别,分析结果表明远志的两种炮制品与生品的指纹图谱基本相似(图4)。

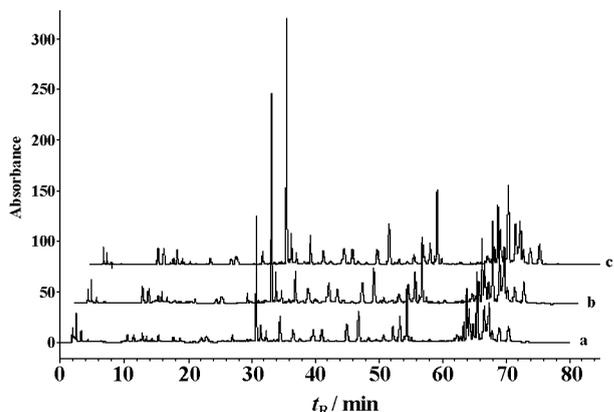


Figure 4 Fingerprints of *P. tenuifolia* with different preparative methods. a: Mizhi preparation; b: Gancaozhi preparation; c: Shengpin

讨论

检测方法 如前所述,远志主要含皂苷类、寡糖酯类和吡啶酮类等成分,化学成分类型多,组分复杂,但远志的皂苷和寡糖酯类均有一个共同的特征,即在其糖链上一般都有部分羟基与肉桂酰基、芥子酰基或苯甲酰基成酯,在 200 ~ 400 nm 有紫外吸收,同时吡啶酮类化合物在这个波长范围内也有紫外吸收,所以选择 HPLC 方法建立指纹图谱,紫外检测器检测,具有明显的优势。

对照品的选择 远志中主要含有皂苷类、糖酯类及吡啶酮类成分,经过作者多年的活性成分研究发现,各类成分均能在一定程度上代表远志的某些药理活性。其中 3, 6'-二芥子酰基蔗糖酯 (3, 6'-disinapoyl sucrose ester) 为其主要活性成分之一,同时该成分在远志药材中含量最高,因此本文选择 3, 6'-二芥子酰基蔗糖酯作为对照品。

流动相的选择 远志药材所含成分复杂,且各种类型的化合物极性差别较大,故采用梯度洗脱的方式。比较了甲醇-水系统、乙腈-水系统及乙腈-磷酸水溶液系统,结果发现乙腈-0.05%磷酸水溶液系统可以使样品得到较好的分离,且色谱峰峰形较好,故选用该系统为流动相。

检测波长 采用二极管阵列检测器对样品进行了全波长扫描,结果在 318 nm 处各色谱峰均有较好的紫外吸收,色谱信息最为丰富。因此,选择该波长作为检测波长。

提取溶剂 分别比较了 50% 甲醇、70% 甲醇及甲醇对远志药材的提取效果。结果表明各种溶剂提取的色谱峰的种类相差不多,而 70% 甲醇提取的各色谱峰含量相对较高,故选择 70% 甲醇作为提取溶剂。

提取方法 分别比较了加热回流和超声提取两种方法,结果发现二者提取效率基本一致,考虑到操作的方便,选择超声提取 0.5 h。

根据以上 14 批不同产地远志药材的分析结果可看出,不同来源的远志药材指纹图谱相似度较高,绝大多数大于 0.95,说明不同产地远志药材的化学组成一致性较好,质量稳定。但同时也应看到各色谱峰的相对面积还有一定的差别,尤其是含量最高的 10 号色谱峰差别最为明显。因此,在生产相关的制剂产品时,远志药材的来源应该固定产地,这将保证产品质量的稳定性具有重要意义。

中国药典规定远志的药用部位为根,但市面上销售的绝大多数都是去除木心的远志筒和远志肉,这与远志传统为根皮入药相符。并且通过分析发现,木心中所含的成分与根皮基本相同,只是含量甚微,因此,去除木心,用根皮入药还是具有一定的科学道理。建议以后应统一用根皮入药。

关于远志的用法,素有生用和炙用之说。通过分析发现,炮炙品与生品的指纹图谱未发生明显改变,说明炮炙并不会改变远志中所含有的化学成分的结构。李光巍等^[8]通过研究也发现,生与炙远志在药理和薄层色谱结果无显著差别,临床多用蜜炙和甘草炙远志,其目的是减少胃肠道的刺激。

除上述工作外,作者还利用分离得到的对照品对远志指纹图谱中的一些色谱峰进行了指认。根据所含化学成分的类别不同,将其指纹图谱大致分为两个区域(图 1): 0 ~ 47 min 为蔗糖酯和吡啶酮的混合色谱峰区域(A区),其中峰 3, 4, 8, 13, 14, 16, 18 和 19 分别为化合物 sibiricose A₃, sibiricose A₆, polygalaxanthone III, tenuifoliside A, tenuifoliose L, polygalaxanthone IV, tenuifoliose I 和 tenuifoliose H 所对应的色谱峰。在这个区域经常是蔗糖酯、吡啶酮和寡糖酯的色谱峰交替存在, 60 min 之后为皂苷的色谱峰区域(B区),经与对照品对照,峰 24, 26 和 29 分别为化合物 onjisaponin A, polygalasaponin XXXII 和 onjisaponin K 所对应的色谱峰。从图中可以看出糖酯类成分(包括蔗糖酯和寡糖酯)和吡啶酮类成分在远志药材的色谱图中所占的比例还是很大的,所以以往认为远志的主要药效成分只是皂苷

类的观点还是很局限的,今后应该对远志中所含有的其他类型的成分进行深入研究。

References

- [1] State Pharmacopoeia Committee of China. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2000 Ed. Part I. Beijing: Chemical Industry Press, 2000: 123.
- [2] Jiang Y, Tu PF. Xanthone O-glycosides from *Polygala tenuifolia* [J]. Phytochemistry, 2002, 60: 813 - 816.
- [3] Jiang Y, Tu PF. Tenuifolioside Q, a new oligosacchaside ester from *Polygala tenuifolia* Willd [J]. J Asian Nat Prod Res, 2003, 5: 279 - 283.
- [4] Jiang Y, Tu PF. Study on the chemical constituents from *Polygala tenuifolia* (I) [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2002, 33: 874 - 877.
- [5] Liu YP, Wan DG, Liu T, et al. The contents of the total saponins from *Polygala tenuifolia* from different areas by UV [J]. J Chengdu Univ Tradit Chin Med (成都中医药大学学报), 2000, 23: 46 - 47.
- [6] Liu YP, Wan DG, Song Y. Determination of dehydroxyphenegenin in *Polygala tenuifolia* by HPLC [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2001, 32: 786 - 787.
- [7] Zhonghuabencao editing committee of State TCM Administration. Chinese Herb (中华本草) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing House, 1999: 62 - 67.
- [8] Li GW, Yang JK, Shen XY. Study on the preparation methods of *Polygala tenuifolia* [J]. Heilongjiang J Tradit Chin Med (黑龙江中医药), 1994, 5: 41 - 42.