

质量分析

蒙古族药塔日努及其不同炮制品 HPLC 指纹图谱研究*

李佟拉嘎^{1,2}, 奥·乌力吉³, 王秀兰³, 包晓花³, 龚千锋^{1**}

(1. 江西中医药大学, 南昌 330004; 2. 内蒙古民族大学附属医院, 通辽 028000;

3. 内蒙古民族大学蒙医药学院, 通辽 028000)

摘要 目的: 建立蒙古族药材塔日努及其牛奶制、酒制及诃子汤制品指纹图谱, 为塔日努不同炮制品质量控制及炮制原理研究提供依据。**方法:** 采用 HPLC, Hypersil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.4% 磷酸水, 梯度洗脱, 柱温 40 °C, 检测波长 254 nm, 对塔日努及其 3 种炮制品进行指纹图谱研究, 采用指纹图谱相似度软件进行分析。**结果:** 建立了塔日努及其 3 种炮制品指纹图谱, 塔日努经炮制后, 其成分发生了变化, 塔日努生品及牛奶、诃子汤制品的指纹图谱有明显区别, 而生品塔日努及酒制塔日努指纹图谱较为相似。奶制品中 5 号峰消失, 诃子汤制品中新增 7 号和 8 号峰、新增的 7 号峰峰面积较大。**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, 可作为塔日努及其炮制品的质量控制方法。**关键词:** 蒙古族药塔日努; 牛奶制塔日努; 酒制塔日努; 诃子汤制塔日努; 指纹图谱

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2018) 05-0902-07

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.05.24

Study on HPLC fingerprints of Mongolian medicine Tarinu and its different processed products*

LI Tong-la-ga^{1,2}, AO Wu-li-ji³, WANG Xiu-lan³,
BAO Xiao-hua³, GONG Qian-feng^{1**}

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. Affiliated Hospital of Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028000, China;

3. College of Traditional Medicine and Pharmacy of Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028000, China)

Abstract Objective: To provide a basis for quality control and processing principle research of Tarinu and its different processed products by establishing HPLC fingerprints. **Methods:** HPLC was performed on a Hypersil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with mobile phase of acetonitrile-0.4% phosphoric acid in gradient elution at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The column temperature was 40 °C and the detection wavelength was 254 nm. The fingerprints of Tarinu and its 3 kinds of processed products were analyzed by fingerprint similarity software.

* 内蒙古自治区蒙医药科技重大专项 (GCY20161219)

** 通信作者 Tel: (0791) 87118852; E-mail: gongqf2002@163.com

第一作者 Tel: 15894864839; E-mail: litonglaga@163.com

Results: There were significant differences in fingerprints of raw products and milk and *Terminalia chebula* Retz soup processing products. But fingerprints of raw products and alcohol processing products were relatively similar. Compared with the fingerprint of Tarinu, peak 7 and peak 8 were found as new components in *Terminalia chebula* Retz soup processing product and the peak area of peak 7 was relatively larger. On the other hand, peak 5 disappeared in milk processing product. **Conclusion:** The method is stable and accurate with good reproducibility and can be used in quality control of Tarinu and its processed products.

Keywords: Mongolian medicine Tarinu; milk processing Tarinu; alcohol processing Tarinu; *Terminalia chebula* Retz soup processing Tarinu; fingerprint

塔日努 , 汉语名为狼毒, 是蒙医临床常用“泻下类”药材, 味辛, 性温, 有毒, 具有泻下, 消肿, 消奇哈, 燥协日乌素, 杀黏虫的功效, 主治白喉, 炭疽, 黏肿, 协日乌素疮, 疥癣, 水肿, 赫如虎, 协日乌素病^[1]。据查阅蒙医药古籍文献, 蒙药材“塔日努”始见于《医药月帝》(最早的藏蒙医药文献, 蒙古语版 1985 年^[2], 藏文本的汉译名为《月王药诊》, 约 8 世纪), 自《医药月帝》开始, 历代本草均对其进行了记载。现代考证认为, 历代本草记载的蒙药材塔日努植物基原为大戟科植物狼毒大戟 *Euphorbia fischeriana* Steud. 的干燥根。《中华人民共和国药典》2015 年版^[3] 记载的狼毒来源于大戟科植物狼毒大戟 *Euphorbia fischeriana* Steud. 或月腺大戟 *E. ebracteolata* Hayata. 的根, 大量研究资料显示, 狼毒大戟主要含有二萜类和苯乙酮类化合物^[4-10]。蒙药炮制是在蒙医药理论指导下进行的一种传统制药技术, 蒙古语将炮制称为“淖莫特哈勒”, 其意思是“驯服, 使之顺从也”, 旨在对有毒、性峻猛, 或功不及、效不遂、用不便之蒙药, 通过“驯服”, 使其“顺从”于临床需要, 以保障临床用药的安全和有效。炮制为蒙药最常用的减毒方法之一, 通过炮制可降低或改变药物中有毒成分或杂质的含量, 灭活或分解某些有毒成分, 减少有毒成分的溶出率等^[11]。关于塔日努的蒙医特色炮制品的指纹图谱研究未见报道。本实验采用 HPLC, 对塔日努及其 3 种炮制品的指纹图谱进行研究, 建立指纹图谱检测方法并生成标准对照, 对内蒙古地区不同产地 13 批塔日努的生品及炮制品进行质量评价, 为塔日努及其炮制品的质量控制提供依据, 并对塔日努炮制前后的化学成分变化进行了初步分析。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent-1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司)系列, 包括在线脱气机, 四元泵, 自动进样器, 柱温箱,

二极管阵列检测器。BS224S 电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); KQ-600DB 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司, 200 W, 40 kHz)。

1.2 试药

岩大戟内酯 B(批号: M10A7519200, HPLC 测得纯度 $\geq 98\%$) 对照品购自上海源叶生物科技有限公司; 色谱纯乙腈和乙醇购自通辽市鑫海实验器材商行。超纯水由实验室自制。其余试剂均为市售分析纯。

1.3 样品

13 批塔日努药材, 收集于 11 个不同产地, 经内蒙古民族大学蒙药生药教研室布和巴特尔教授鉴定为大戟科植物狼毒大戟 *Euphorbia fischeriana* Steud. 的干燥根。饮片由收集的塔日努来源药材按蒙药炮制著作《炮制明藏》^[12] 中奶、酒、诃子汤制塔日努炮制方法制得(即将塔日努放入 8 倍量的辅料中(1 kg 塔日努用 8 L 辅料)用文火煮至辅料被吸尽时取出, 晒干), 药材及饮片信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Hypersil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 检测波长: 254 nm; 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 柱温: 40 °C; 流动相: 乙腈(A)-0.4% 磷酸水(B), 梯度洗脱(0~10 min, 12%A; 10~40 min, 12% → 19%A; 40~55 min, 19% → 50%A; 55~65 min, 50% → 60%A, 65~80 min; 60% → 70%A)。

2.2 对照品溶液的制备

取岩大戟内酯 B 对照品, 精密称定, 加乙醇制成浓度为 201 μg · mL⁻¹ 的对照品储备液。

2.3 供试品溶液的制备

取塔日努生品及不同炮制品粉末约 1.0 g, 精密称定, 置于 50 mL 锥形瓶中, 精密加入 70% 乙醇 25 mL, 称量, 超声(200 W, 40 kHz) 30 min, 放冷, 称量, 用乙醇补足减失的量, 0.22 μm 微孔滤膜滤过。

表 1 收集的 13 批塔日努药材及奶、酒、诃子汤制样品信息

Tab. 1 The samples information of 13 batches of Tarinu and its processed products

药材编号 (No. of raw material)	饮片编号 (No. of prepared slices)	批号 (lot No.)	植物来源 (plant source)	产地 (habitat)
S1	N1、J1、H1	20160628	狼毒大戟 (<i>Euphorbia fischeriana</i> Steud)	内蒙古扎鲁特旗前进镇 (Qianjin Town, Zhalute Qi, Inner Mongolia)
S2	N2、J2、H2	20160719	狼毒大戟 (<i>Euphorbia fischeriana</i> Steud)	内蒙古特金罕山 (Tejinhan Mountain, Inner Mongolia)
S3	N3、J3、H3	20161112	狼毒大戟 (<i>Euphorbia fischeriana</i> Steud)	内蒙古海拉尔伊敏公社 (Yimin Commune, Hailaer, Inner Mongolia)
S4	N4、J4、H4	20170615	狼毒大戟 (<i>Euphorbia fischeriana</i> Steud)	内蒙古海拉尔新巴尔虎旗塞达盖 (Saidagai, Xinbaerhu Qi, Hailaer, Inner Mongolia)
S5	N5、J5、H5	20170616	狼毒大戟 (<i>Euphorbia fischeriana</i> Steud)	内蒙古海拉尔鄂温克旗维特根 (Weitegen, Ewenke Qi, Hailaer, Inner Mongolia)
S6	N6、J6、H6	20170617	狼毒大戟 (<i>Euphorbia fischeriana</i> Steud)	内蒙古海拉尔鄂温克旗维纳河 (Weina River, Ewenke Qi, Hailaer, Inner Mongolia)
S7	N7、J7、H7	20170617	狼毒大戟 (<i>Euphorbia fischeriana</i> Steud)	内蒙古海拉尔伊敏公社 (Yimin Commune, Hailaer, Inner Mongolia)
S8	N8、J8、H8	20170701	狼毒大戟 (<i>Euphorbia fischeriana</i> Steud)	内蒙古扎鲁特旗巴区 (Baqu, Zhalute Qi, Inner Mongolia)
S9	N9、J9、H9	20170702	狼毒大戟 (<i>Euphorbia fischeriana</i> Steud)	内蒙古兴安盟第五连队 (the fifth company, Xinganmeng League, Inner Mongolia)
S10	N10、J10、H10	20170702	狼毒大戟 (<i>Euphorbia fischeriana</i> Steud)	内蒙古兴安盟第七连队 (the seventh company, Xinganmeng League, Inner Mongolia)
S11	N11、J11、H11	20170702	狼毒大戟 (<i>Euphorbia fischeriana</i> Steud)	内蒙古赤峰市阿鲁科尔沁 (Alukeerqin, Chifeng City, Inner Mongolia)
S12	N12、J12、H12	20170720	狼毒大戟 (<i>Euphorbia fischeriana</i> Steud)	内蒙古锡林郭勒盟乌拉盖 (Wulagai, Xilinguole League, Inner Mongolia)
S13	N13、J13、H13	20170726	狼毒大戟 (<i>Euphorbia fischeriana</i> Steud)	内蒙古蒙格罕山 (Menggehan Mountain, Inner Mongolia)

注 (note): S. 生品 (raw product); N. 奶制 (milk processing); J. 酒制 (alcohol processing); H. 诃子汤制 (*Terminalia chebula* Retz.soup processing)

2.4 方法学考察

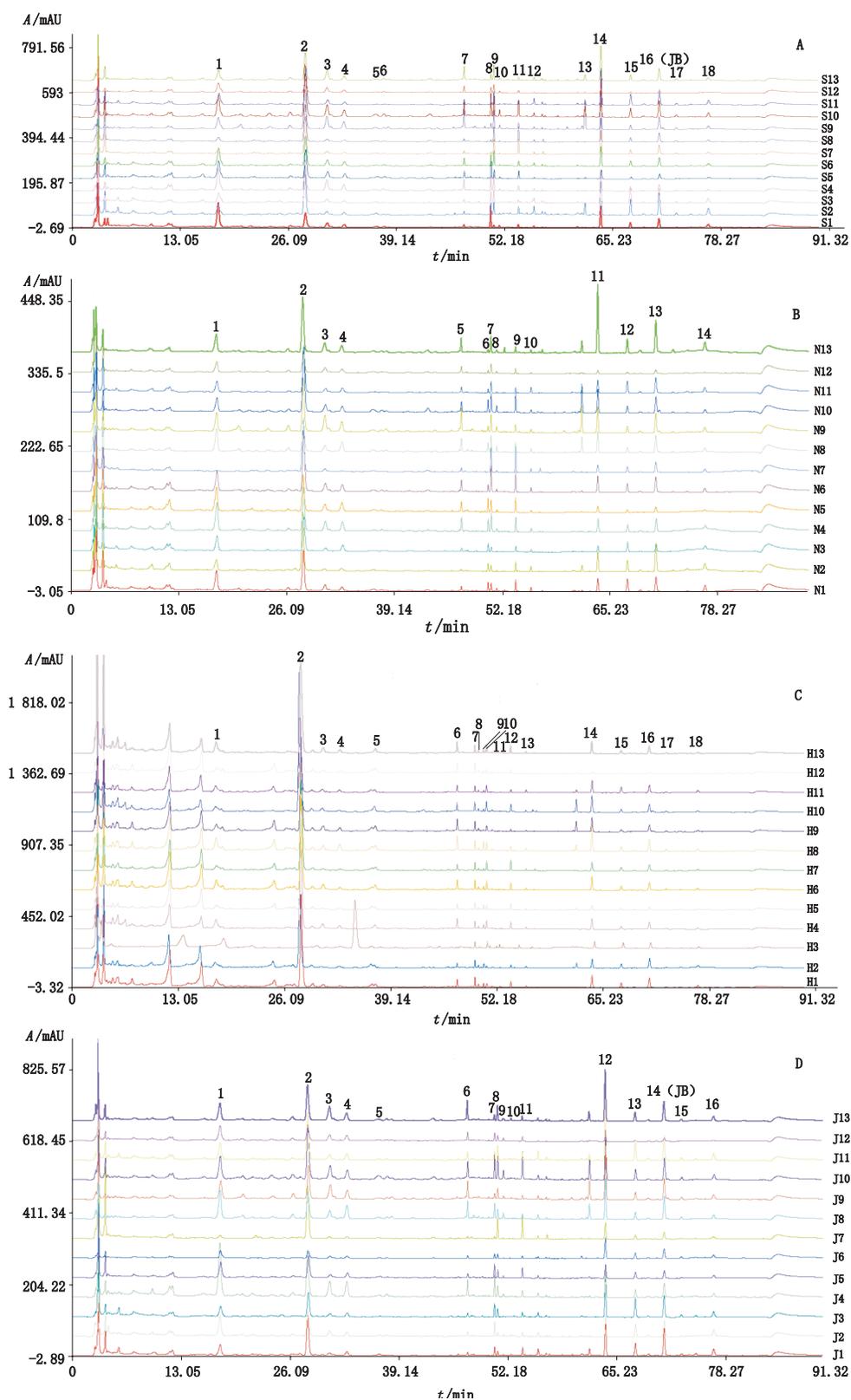
2.4.1 精密度试验 取同一份供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件连续测定 6 次,记录指纹图谱。结果表明,各供试品溶液中共有峰的保留时间及各主要峰(占总峰面积 5% 以上)的峰面积基本保持一致 (RSD<3%),以第 1 次进样所得指纹图谱作为对照图谱计算相似度,结果相似度均不小于 0.99,符合指纹图谱的相关技术要求(应不小于 0.95)。表明该方法精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取同一份供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件,分别在 0、2、4、8、12、24 h 测定,记录色谱图,以 0 h 所得指纹图谱为对照,计算相似度,各指纹图谱相似度结果均不小于 0.99,符合指纹图谱相关技术要求(应不小于 0.95)。表明供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 取同一批药材,按“2.3”项下方法制备供试品溶液 6 份,按“2.1”项下色谱条件测定,计算相似度,结果均不小于 0.97,符合指纹图谱的技术要求(不小于 0.95),说明本方法重复性良好。

2.5 塔日努生品和不同炮制品指纹图谱的建立及分析

2.5.1 指纹图谱的建立 将 13 批塔日努药材、牛奶制塔日努、酒制塔日努及诃子汤制塔日努分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,记录色谱图。分别将 13 批生品和炮制品指纹图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”软件,用中位数矢量法多点校正,分别生成塔日努生品、牛奶制品、酒制品及诃子汤制品的对照指纹图谱。共有模式及对照指纹图谱见图 1。



A. 塔日努生品 (raw Tarinu) B. 牛奶制塔日努 (milk processing Tarinu) C. 诃子汤制塔日努 (*Terminalia chebula* Retz.soup processing Tarinu) D. 酒制塔日努 (alcohol processing Tarinu)

图 1 共有模式指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of the common mode

共有峰标定: 经过比较, 塔日努生品和诃子汤制品均有 18 个共有峰, 酒制品有 16 个共有峰, 奶制品有 14 个共有峰。生品和诃子汤制品的 16 号峰、奶制品 13 号峰、酒制品 14 号峰为岩大戟内酯 B 色谱峰, 计算各峰的相对保留时间和峰面积, 相对保留时间无

显著性差异, 相对峰面积的差异性较大, 说明塔日努药材存在地域性差异。

2.5.2 色谱峰的指认与对比 将 13 批塔日努药材指纹图谱中的主要共有峰与“2.2”项对照品的色谱峰进行对照, 见图 2。

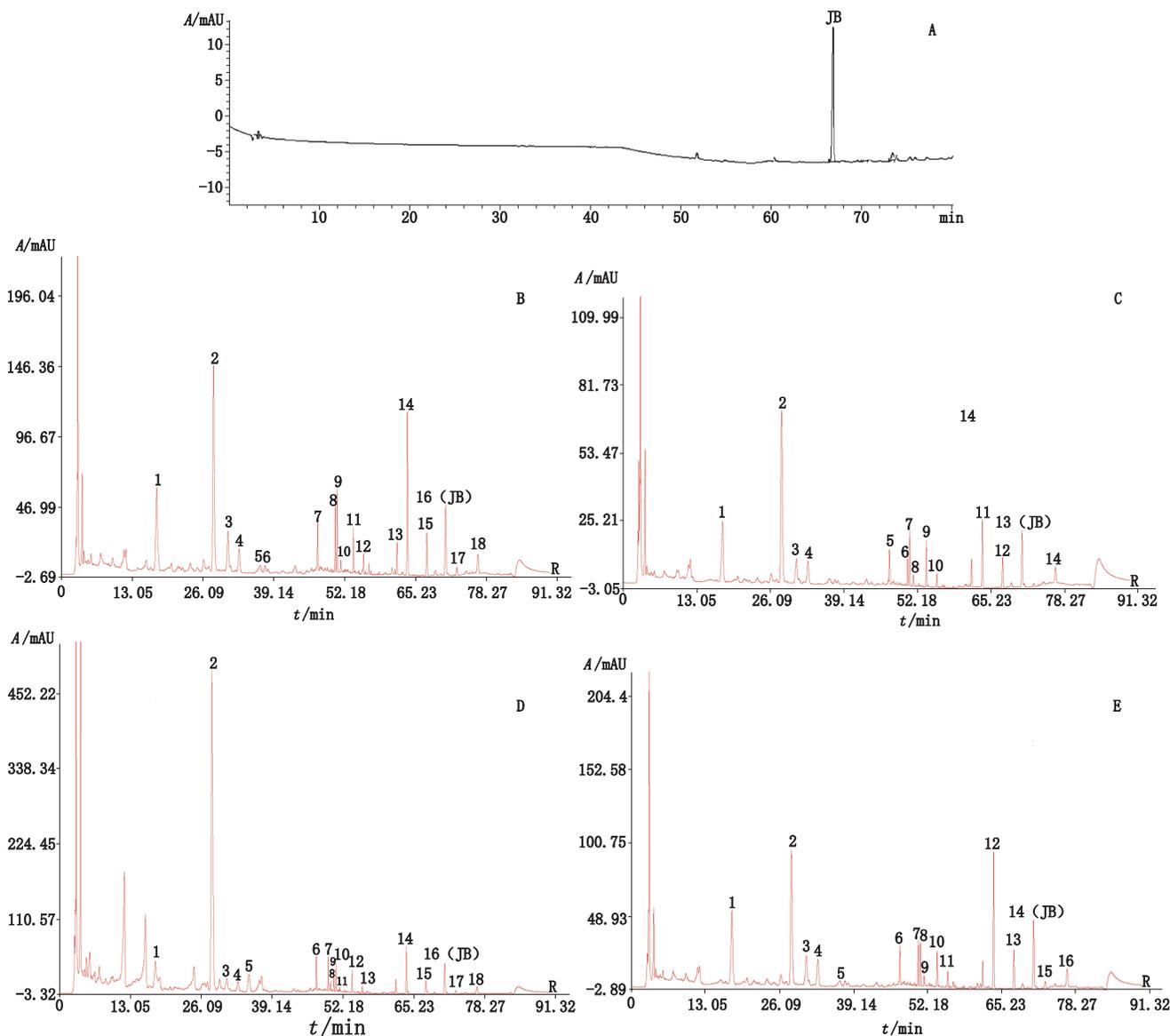


图 2 塔日努对照品 (A)、塔日努生品 (B)、奶制品 (C)、诃子汤制品 (D) 及酒制品 (E) 的指纹图谱
 Fig. 2 The fingerprints of reference substance (A), raw Tarinu (B) and its processed products (C, D, E)

从生成的对照图谱可以看出, 塔日努经炮制后, 其成分发生了变化, 塔日努生品及炮制品的指纹图谱有明显区别。奶制品中 5 号峰消失, 诃子汤制品中新增 7 号和 8 号峰、新增的 7 号峰峰面积较大。

塔日努、酒制塔日努及诃子汤制塔日努指纹图谱分别导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004A) 版”, 计算各批次样品指纹图谱与各自生成的对照图谱的相似度。其中塔日努生品及 3 种炮制品与对照图谱的相似度除 S1 (内蒙古扎鲁特旗前进镇) 外, 其他也均在 0.9 以上。见表 2。

2.5.3 相似度计算 将各个批次的塔日努生品、奶制

表 2 13 批塔日努药材及其 3 种炮制品与各自生成的对照图谱的相似度

Tab. 2 Similarities of 13 batches of Tarinu medicines and 3 kinds of processed products

样品 (sample)	相似度 (similarity)												
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13
塔日努 (Tarinu)	0.951	0.914	0.960	0.956	0.937	0.979	0.917	0.97	0.946	0.985	0.98	0.938	0.974
牛奶制 (milk processing)	0.894	0.968	0.952	0.971	0.96	0.985	0.977	0.963	0.944	0.958	0.983	0.976	0.904
酒制 (alcohol processing)	0.892	0.974	0.967	0.954	0.972	0.989	0.957	0.952	0.967	0.972	0.977	0.935	0.957
诃子汤制 (<i>Terminalia chebula</i> Retz. soup processing)	0.958	0.974	0.900	0.976	0.983	0.977	0.975	0.978	0.98	0.918	0.962	0.978	0.978

3 讨论

3.1 相似度结果

通过本实验建立的指纹图谱方法及对照指纹图谱,分析比较了内蒙古不同产地 13 批塔日努及其 3 种炮制品的指纹图谱,相似度大多在 0.9 以上,但亦有 1 批差异较大,这也验证了中药材具有明显的地域性,受生态环境、物种资源和栽培条件的影响,药材品质有所不同。

3.2 指认已知化合物

本实验采用 HPLC 法,建立了塔日努及其 3 种炮制品的指纹图谱,其中塔日努生品和诃子汤制品均有 18 个共有特征峰,酒制品有 16 个共有峰,奶制品有 14 个共有峰。对特征峰的指认过程中,根据文

献记载^[13-14],采用岩大戟内酯 B 作为对照品,对塔日努及其 3 种炮制品的指纹图谱进行指认,岩大戟内酯 B 得以确认。另外,指纹图谱中峰面积较大的几个峰的成分未能确认其成分,后续将采用 LC-MS 对样品进行分析,对塔日努炮制品的化学成分做进一步研究。

3.3 塔日努炮制前后化学成分变化情况

从图 1、2 塔日努生品、牛奶制品、酒制品和诃子汤制品的指纹图谱及其对照指纹图谱可直观看出,塔日努炮制前后化学成分发生较大变化。奶制品中与生品相对应的 5 号峰消失,诃子汤制品中新增 7 号和 8 号峰、新增的 7 号峰峰面积较大,其他共有峰在量上有不同程度的变化。结果见表 3。

表 3 3 种炮制品及其塔日努生品中峰面积较大的 10 个共有峰平均峰面积及对应峰的比较

Tab. 3 Comparison of average peak area of 10 common peaks with large peak area and corresponding peak in three kinds of processed products

塔日努生品 (raw Tarinu)		奶制塔日努 (milk processing Tarinu)		诃子制塔日努 (<i>Terminalia chebula</i> Retz.soup processing Tarinu)		酒制塔日努 (alcohol processing Tarinu)	
峰号 (peak No.)	峰面积 (peak area)	峰号 (peak No.)	峰面积 (peak area)	峰号 (peak No.)	峰面积 (peak area)	峰号 (peak No.)	峰面积 (peak area)
1	1 452.23	1	566.28 ↓	1	1 168.06 ↓	1	1 120.91 ↓
2	2 689.76	2	1 435.14 ↓	2	1 0384.1 ↑	2	1 780.63 ↓
3	616.90	3	96.99 ↓	3	439.74 ↓	3	454.15 ↓
4	389.59	4	199.80 ↓	4	341.10 ↓	4	419.31 ↑
7	313.19	5	120.23 ↓	6	347.28 ↑	6	231.97 ↓
8	432.10	6	77.67 ↓	9	136.34 ↓	7	216.92 ↓
9	440.57	7	212.61 ↓	10	304.19 ↓	8	231.85 ↓
14	1 217.61	11	294.92 ↓	14	727.61 ↓	12	1 091.84 ↓
15	371.33	12	143.47 ↓	15	263.01 ↓	13	357.44 ↓
16 (JB)	672.90	13 (JB)	295.47 ↓	16 (JB)	552.22 ↓	14 (JB)	712.82 ↑

注 (note): “JB”表示岩大戟内酯 B (“JB” meant Jolkinolide B)

塔日努河子汤制品色谱图中 2 号峰峰面积明显增大:与塔日努生品色谱图比较,2 号峰峰面积平均增大 4 倍;与奶制品色谱图比较,2 号峰峰面积平均增大 7 倍,其余的 8 个峰均在量上呈现降低趋势。牛奶制塔日努色谱图中 6、11 号峰峰面积减少较明显,与生品色谱图比较,10 个共有峰均在量上呈现降低趋势,经指纹图谱初步检测,峰面积变化较大的 2 号峰和 12 号峰,需要进一步研究确认,从而确定塔日努炮制前后化学成分的变化,酒制品中除 4 号峰和岩大戟内酯 B 峰面积增加外,其余 8 个共有峰均在量上呈现降低趋势。推测炮制使塔日努中的某些二萜(如对照品岩大戟内酯 B)含量发生变化,同时某些二萜转化成了其他物质。所选的 10 个共有峰在量上有不同程度的变化,其中奶制品 10 个共有峰全部在量上呈现降低趋势,酒和河子汤制品有 8 个峰均在量上呈现降低趋势,可能是毒性成分经炮制后有所下降,导致塔日努毒性降低,各峰成分的确认有待进一步的研究。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 蒙药卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,2004:325
“Chinese Materia Medica” editorial board of State Administration of Traditional Chinese Medicine. Chinese Materia Medica. Mongolian Medicine Volume[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2004: 325
- [2] 哲里木盟蒙医研究所. 医药月帝[M]. 赤峰:内蒙古科学技术出版社,2013:375
The Mongolian Medicine Research Institute of Jirem League. Medicine Moon Emperor[M]. Chifeng: Inner Mongolia Science and Technology Press, 2013: 375
- [3] 中华人民共和国药典 2015 年版. 一部[S]. 2015: 286
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 286
- [4] LI WJ, LIN Y, WANG YC, et al. Development of a matrix solid-phase dispersion extraction combined with UPLC/Q-TOF-MS for determination of phenolics and terpenoids from the *Euphorbia fischeriana* [J]. Molecules, 2017, 22(9): 1510
- [5] WANG CJ, YAN QL, MA YF, et al. ent-Abietane and tiglane diterpenoids from the roots of *Euphorbia fischeriana* and their inhibitory effects against mycobacterium smegmatis [J]. J Nat Prod, 2017, 80(5): 1248
- [6] CAI DF, ZHAI WY, ZHANG Q, et al. Development of matrix solid-phase dispersion coupled with high-performance liquid chromatography for determination of jolkinolide A and jolkinolide B in *Euphorbia fischeriana* Steud [J]. Nat Prod Res, 2017, 31(15): 1805
- [7] LEE JW, LEE C, JIN QH, et al. Diterpenoids from the roots of *Euphorbia fischeriana* with inhibitory effects on nitric oxide production [J]. J Nat Prod, 2016, 79(1): 126
- [8] SUN YX, LIU JC. Chemical constituents and biological activities of *Euphorbia fischeriana* Steud [J]. Chem Biodiv, 2011, 8(7): 1205
- [9] XU L, ZHI GL, YUN FC, et al. Chemotaxonomic and chemical studies on two plants from genus of *Euphorbia*: *Euphorbia fischeriana* and *Euphorbia ebracteolata* [J]. Biochem Syst Ecol, 2014, 57: 345
- [10] XIN ZK, WWI L, YUICHIRO K. Euphorins A-H: bioactive diterpenoids from *Euphorbia fischeriana* [J]. J Nat Med, 2016, 70(3): 412
- [11] 王璞,王亚旭,王聿成,等. 有毒蒙药常用减毒方法研究探讨 [J]. 云南中医学院学报, 2013, 36(5): 68
WANG P, WANG YX, WANG YC, et al. Study on common attenuation methods for toxic Mongolian drugs [J]. J Yunnan Univ Tradit Chin Med, 2013, 36(5): 68
- [12] 丹增彭措. 炮制明藏[M]. 赤峰:内蒙古科学技术出版社,2013:88
DANZENG PENGCUO. Processing the Ming Dynasty [M]. Chifeng: Inner Mongolia Science and Technology Press, 2013: 88
- [13] 王宏伟,王海香,顾雅静,等. 狼毒大戟化学成分和药效作用研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(12): 1853
WANG HW, WANG HX, GU YJ, et al. The progress of chemical constituents of *Euphorbia fischeriana* and pharmacodynamic study [J]. Nat Prod Res Dev, 2012, 24(12): 1853
- [14] 么焕开,张文婷,郑雪晶,等. 狼毒大戟化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中成药, 2010, 32(8): 1404
YAO HK, ZHANG WT, ZHENG XJ, et al. Research progress in chemical constituents and pharmacological effects of *Euphorbia fischeriana* Steud [J]. Chin Tradit Pat Med, 2010, 32(8): 1404

(本文于 2017 年 10 月 9 日收到)