

蒙药材砂引草 HPLC 指纹图谱及 6 个成分含量测定研究*

郝俊生^{1,3}, 包红英², 斯日古冷⁴, 孟和¹, 任娅婷¹, 红艳², 辛颖^{2,3**}

(1. 通辽市市场检验检测中心, 通辽 028000; 2. 内蒙古民族大学蒙医药学院, 通辽 028000;

3. 蒙药研发国家地方联合工程研究中心, 通辽 028000; 4. 扎赉特旗市场监督管理局, 兴安盟 137600)

摘要 目的: 建立不同产地蒙药材砂引草 *Tournefortia sibirica* Linnaeus 的 HPLC 指纹图谱并测定其 6 个成分(咖啡酸、异槲皮苷、槲皮苷、迷迭香酸、紫草酸和丹酚酸 B)的含量, 为砂引草质量控制提供依据。方法: 采用 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以 0.2% 磷酸溶液(A) - 乙腈(B)为流动相, 进行梯度洗脱(0 ~ 60 min, 9%B → 38%B), 检测波长 330 nm。对不同产地砂引草进行分析, 采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件”(2012 版), 建立砂引草指纹图谱, 同时测定 6 个成分含量。结果: HPLC 指纹图谱共标定了不同产地砂引草中 11 个共有峰, 指认了咖啡酸、异槲皮苷、槲皮苷、迷迭香酸、紫草酸和丹酚酸 B 6 个成分, 17 批砂引草药材与对照指纹图谱之间的相似度在 0.931 ~ 0.996。经方法学考察, 咖啡酸、异槲皮苷、槲皮苷、迷迭香酸、紫草酸和丹酚酸 6 个成分精密密度试验 RSD 依次为 1.9%、1.0%、1.4%、0.19%、1.1% 和 0.32%; 重复性试验 RSD 依次为 3.5%、2.3%、3.3%、0.14%、1.1% 和 0.19%; 稳定性试验 RSD 依次为 0.80%、1.1%、1.7%、0.52%、0.54% 和 0.78%。咖啡酸、异槲皮苷、槲皮苷、迷迭香酸、紫草酸和丹酚酸 B 在 0.003 3 ~ 0.029 5、0.011 9 ~ 0.107 3、0.014 8 ~ 0.132 8、0.092 8 ~ 0.835 2、0.068 9 ~ 0.105 8、0.068 8 ~ 0.619 9 μg · mL⁻¹ 浓度范围内线性关系良好(均为 $r = 1.000$); 平均回收率在 93.9% ~ 102.3%, 按干燥品计含量在 0.004% ~ 0.013%、0.030% ~ 0.259%、0.032% ~ 0.256%、0.256% ~ 1.246%、0.018% ~ 0.072% 和 0.062% ~ 0.499%。结论: 建立的砂引草 HPLC 指纹图谱及 6 个成分含量测定方法稳定、可靠、重复性好, 可为砂引草质量控制及开发研究提供参考。

关键词: 蒙药材; 砂引草; 指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析; 含量测定; 咖啡酸; 异槲皮苷; 槲皮苷; 迷迭香酸; 紫草酸; 丹酚酸 B

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793(2024)05 - 0816 - 11

doi: 10.16155/j.0254 - 1793.2024.05.09

Study on HPLC fingerprint and determination of 6 components in Mongolian medicinal material *Tournefortia sibirica* Linnaeus*

HAO Jun - sheng^{1,3}, BAO Hong - ying², Si - ri - gu - leng⁴,
MENG He¹, REN Ya - ting¹, HONG Yan², XIN Ying^{2,3**}

(1. Tongliao Market Inspection and Testing Center, Tongliao 028000, China; 2. College of Mongolian Medicine, Inner Mongolia Minzu University, NMPA Key Laboratory for Quality Control of Traditional Chinese Medicine, Mongolian Medicine, Tongliao 028000, China;

3. National and Local Joint Engineering Research Center for Mongolian Medicine Research and Development, Tongliao 028000, China;

4. Zhalaite Banner Market Supervision Administration, Xing'an League 137600, China)

Abstract Objective: To establish HPLC fingerprint and determine caffeic acid, isoquercitrin, quercitrin,

* 内蒙古自治区重大基础研究开放课题(NMKJZX1702); 内蒙古自治区卫生健康科技计划项目(202202259)

** 通信作者 Tel: 15148788838; E-mail: xinying20081115@163.com

第一作者 Tel: 15047480712; E-mail: gcjsheng@163.com

rosmarinic acid, lithospermic acid and salvianolic acid B in *Tournefortia sibirica* Linnaeus, and to provide evidence for quality control of *Tournefortia sibirica* Linnaeus. **Methods:** The chromatographic separation was performed on an Agilent Eclipse Plus C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with gradient elution (0–60 min, 9%B→38%B) of 0.2% phosphoric acid(A) and acetonitrile(B). The detection wavelength was 330 nm. The column temperature was kept at 40 °C and the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹. The HPLC fingerprint of all batches of *Tournefortia sibirica* Linnaeus was established using Similarity Evaluation Software for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (2012 edition) and the common peaks were identified by reference standards. Six constituents in *Tournefortia sibirica* Linnaeus were quantified. **Results:** Eleven common peaks were confirmed, and 6 common peaks were identified by reference standards including caffeic acid, isoquercetin, quercetin, rosmarinic acid, purple oxalic acid, and salvianolic acid B. The similarities of 17 batches samples were 0.931 to 0.996. By the methodology examination, RSDs for the precision test were 1.9%, 1.0%, 1.4%, 0.19%, 1.1% and 0.32%, respectively. RSDs for the reproducible test were 3.5%, 2.3%, 3.3%, 0.14%, 1.1% and 0.19%, respectively. RSDs for the stability test were 0.80%, 1.1%, 1.7%, 0.52%, 0.54% and 0.78%, respectively. Caffeic acid, isoquercitrin, quercitrin, rosmarinic acid, lithospermic acid and salvianolic acid B had good separation and showed good linearity in their respective linear ranges. The average recoveries ranged from 95% to 105%, and the contents (calculated with reference to the dried drug) were between 0.004% to 0.013%, 0.030% to 0.259%, 0.032% to 0.256%, 0.256% to 1.246%, 0.018% to 0.072% and 0.062% to 0.499%, respectively. **Conclusion:** The established HPLC fingerprint and quantification method is stable and reliable, which can provide basis for the quality control of *Tournefortia sibirica* Linnaeus.

Keywords: Mongolian medicinal material; *Tournefortia sibirica* Linnaeus; fingerprint; cluster analysis; principal component analysis; content determination; caffeic acid; isoquercitrin; quercitrin; rosmarinic acid; lithospermic acid; salvianolic acid B

砂引草为紫草科砂引草属砂引草 *Tournefortia sibirica* Linnaeus 的全草, 蒙古文名浩吉格热额布苏、额日古勒根其其格, 异名紫丹草、挠挠糖, 其味苦, 性寒, 具有清热解毒、排脓、敛疮、杀粘等功效, 主治疗痢、疮疡溃破、久不收口、皮肤湿疹, 收载于《内蒙古植物药志》^[1]、《锡林郭勒盟草原药物诠释典》^[2]。查阅相关文献可知: 张欣等^[3]对砂引草多糖的提取工艺进行优化; Morteza - Semnani 等^[4]利用 GC - MS 技术分析鉴定了砂引草挥发油中 23 个成分; 高超等^[5]又通过 GC - MS 技术从砂引草挥发油中鉴定出 58 个化合物; 阿如汗等^[6]应用 LC - MS 技术从砂引草中鉴定出 78 个化合物; Hikichi 等^[7]从砂引草中分离得到 Lycopsamine, O - 9 - Angelylretronecine 和 Pyrrolizidine; 宋志忠等^[8-9]等先后从砂引草中分离得到 2 个木质素化合物 (messerschmidin, messerschmidin)、2 个木脂素衍生物 (sibiricin A, sibiricin B) 和 1 个三萜类化合物 α - 香脂醇二十烷酸酯; 吴永江等^[10]分离得到 4', 5, 7 - 三羟基黄酮醇 - 3 - O - 葡萄糖苷和 3', 4', 5, 7 - 四羟基黄酮醇 - 3 - O - 葡萄糖苷; 红

艳等^[11]分离得到 1 个新生物碱成分 tournesibirin; 刁胜宝等^[12]分离到 1 个新黄烷酮苷类成分 (2S) - dihydro-oroxylin A 7 - O - [b - D - apiosyl (1fi2)] - b - D - glucoside 和 4 个已知化合物 (2'' - O - 乙酰基 - 7 - O - 甲基维他命, 5 - 羟基 - 7 - 甲氧基 - 8 - C - β - 葡萄糖基黄酮、菠菜素 3 - O - β - 吡喃葡萄糖苷和 9' - 甲氧基脱氢二癸二烯醇 4 - O - β - D - 吡喃葡萄糖苷)。

以上文献表明, 砂引草主要集中在化学成分研究, 未发现其质量控制研究, 这给本次研究提供了空间。为保证砂引草的临床用药安全有效, 本研究在已报道文献基础上, 结合超高效液相色谱 - 高分辨质谱联用 (UPLC - Q TOF/MS) 技术, 通过分析砂引草化合物的保留时间、多级质谱信息, 结合天然产物高分辨质谱数据库及相关文献^[13-15], 从砂引草中指认 9 个指定色谱峰, 采用 HPLC 建立砂引草指纹图谱, 同时测定咖啡酸、异槲皮苷、槲皮苷、迷迭香酸、紫草酸和丹酚酸 B 6 个成分的含量, 为砂引草深入提供基础研究。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-20 高效液相色谱仪(岛津公司);Agilent Q-TOF 6545 LC/MS 高分辨串联质谱(安捷伦科技有限公司);Agilent Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);SQP 型电子天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司, 0.01 mg);KQ-200VDE 型三频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);乙腈(色谱纯, 天津市大茂化学试剂厂);乙腈(质谱纯, I0928729804, Merck 公司);甲酸(质谱纯, U9260048, CNW 公司);水为超纯水;其他试剂均为分析纯。

1.2 试药

对照品:咖啡酸(批号 110885-201703, 含量 99.7%)、异槲皮苷(批号 111809-201804, 含量 97.2%)、槲皮苷(批号 111538-202007, 含量 93.5%)、迷迭香酸(批号 111871-202007, 含量 98.1%)、丹酚酸 B(批号 111562-201917, 含量 96.6%), 均购自中国食品药品检定研究院;紫草酸(批号 10406, 含量 99.4%, 上海诗丹德生物技术有限公司)。

17 批砂引草(见表 1)均采自内蒙古, 由内蒙古民族大学蒙医药学院红艳副教授鉴定为砂引草 *Tournefortia sibirica* Linnaeus 的全草。

表 1 砂引草药材信息

Tab. 1 The samples information of *Tournefortia sibirica*

样品编号 (sample No.)	收集日期 (collection date)	产地 (origin)	批号 (lot No.)
S1	2018-06-20	内蒙古通辽市科左后旗海鲁吐镇(Hailutu Town, Horqin Left Back Banner, Tongliao, Inner Mongolia)	2018620
S2	2018-06-26	内蒙古通辽市科左后旗(Horqin Left Back Banner, Tongliao, Inner Mongolia)	2018626
S3	2018-07-15	内蒙古通辽市万里城(Wanli City, Tongliao, Inner Mongolia)	2018715
S4	2019-08-08	内蒙古呼伦贝尔市新巴尔虎左旗(New Barag Left Banner, Hulun Buir, Inner Mongolia)	2019808
S5	2019-08-11	内蒙古通辽市辽河公园(Liaohu Park, Tongliao, Inner Mongolia)	2019811
S6	2019-08-15	内蒙古锡林郭勒盟苏尼特左旗巴彦淖尔镇(Bayannur Town, Sonid Left Banner, Xilingol League, Inner Mongolia)	2019815
S7	2019-08-24	内蒙古通辽市科尔沁区(Horqin District, Tongliao, Inner Mongolia)	2019824
S8	2019-08-25	内蒙古通辽市开鲁县丰田镇(Fengtian Town, Kailu County, Tongliao, Inner Mongolia)	2019825
S9	2019-08-26	内蒙古通辽市科左中旗(Horqin Left Middle Banner, Tongliao, Inner Mongolia)	2019826
S10	2019-08-27	内蒙古兴安盟科右中旗(Horqin Right Middle Banner, Hinggan League, Inner Mongolia)	2019827
S11	2019-09-01	内蒙古通辽市科左后旗(Horqin Left Back Banner, Tongliao, Inner Mongolia)	2019901
S12	2019-09-02	内蒙古通辽市库伦旗(Hure Banner, Tongliao, Inner Mongolia)	2019902
S13	2019-09-10	内蒙古呼伦贝尔市新巴尔虎右旗(New Barag Right Banner, Hulun Buir, Inner Mongolia)	2019910
S14	2019-09-11	内蒙古呼伦贝尔市扎赉诺尔区(Jalainur District, Hulun Buir, Inner Mongolia)	2019911
S15	2019-09-13	内蒙古呼伦贝尔市新巴尔虎左旗(New Barag Left Banner, Hulun Buir, Inner Mongolia)	2019913
S16	2019-09-14	内蒙古呼伦贝尔市满洲里西郊机场(Manzhouli Xijiao Airport, Hulun Buir, Inner Mongolia)	2019914
S17	2019-09-15	内蒙古呼伦贝尔市新巴尔虎右旗呼伦湖(Hulun Lake, New Barag Right Banner, Hulun Buir, Inner Mongolia)	2019915

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Agilent Eclipse Plus C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为 0.2% 磷酸溶液(A) - 乙腈(B), 梯度洗脱(0~60 min, 9%B→38%B), 检测波长 330 nm, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 40 °C, 进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液 取本品粉末(过 3 号筛)约 0.2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 密塞, 称量, 超声(功率 250 W, 频率 40 kHz)处理 0.5 h, 放冷, 再称量, 用甲醇补足减失的量, 摇匀, 滤过, 即得。

2.2.2 混合对照品溶液 取咖啡酸、异槲皮苷、槲皮苷、迷迭香酸、紫草酸和丹酚酸 B 的对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含咖啡酸 0.001 6 mg、异槲皮苷 0.006 0 mg、槲皮苷 0.007 4 mg、迷迭香酸 0.046 0 mg、紫草酸 0.005 9 mg 和丹酚酸 B 0.034 4 mg 的混合溶液, 即得。

2.3 砂引草指纹图谱研究^[16-17]

2.3.1 精密度试验 精密称定 S1 号样品, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 以 6 号色谱峰(迷迭香酸峰)为参照峰, 计算指纹图谱中各共有峰相对保留时间

及相对峰面积,结果各共有峰相对保留时间的 RSD 在 0.050%~0.74%,共有峰相对峰面积的 RSD 在 1.2%~2.7%,表明仪器精密度高。

2.3.2 稳定性试验 精密称定 S1 号样品,按“2.2.1”项方法制备供试品溶液,按“2.1”项色谱条件,分别在 0、2、4、6、8、12 h 进样测定,以 6 号色谱峰(迷迭香酸峰)为参照峰,计算指纹图谱中各共有峰相对保留时间及相对峰面积,结果各共有峰相对保留时间的 RSD 在 0.45%~0.73%,共有峰相对峰面积的 RSD 在 1.5%~2.2%,说明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.3.3 重复性试验 精密称定 S1 号样品,按“2.2.1”项方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.1”项色谱条件进样测定,以 6 号色谱峰(迷迭香酸峰)为参照峰,计算指纹图谱中各共有峰相对保留时间及相对峰面积,结果各共有峰相对保留时间的 RSD 在 0.59%~1.2%,共有峰相对峰面积的 RSD 在

1.8%~2.9%,表明所用方法重复性良好。

2.3.4 指纹图谱特征峰的确证与指认 采用 UPLC-Q TOF/MS 技术,通过分析砂引草化合物的保留时间、多级质谱信息,并结合天然产物高分辨质谱数据库及相关文献,从砂引草中指认 9 个指定色谱峰,除 8 号峰未推断出具体结构外,其余 8 个色谱峰鉴定结果分别为:1 号峰 Schizotenuin A,2 号峰异槲皮苷,3 号峰槲皮素 3-O-丙二酰基葡萄糖苷,4 号峰迷迭香酸,5 号峰紫草酸,6 号峰为丹酚酸 H,7 号峰丹酚酸 B,9 号峰迷迭香酸甲酯异构体(见表 2 及图 1)。取“2.2.1”项下供试品溶液(S1 号样品)和“2.2.2”项下混合对照品溶液,按“2.1”项色谱条件进样,通过保留时间和 UV 紫外图谱对照分析,确定 1 号峰为咖啡酸,3 号峰为异槲皮苷,5 号峰为槲皮苷,6 号峰为迷迭香酸,7 号峰为紫草酸,10 号峰为丹酚酸 B,砂引草供试品溶液及混合对照品的 HPLC 色谱图见图 2。

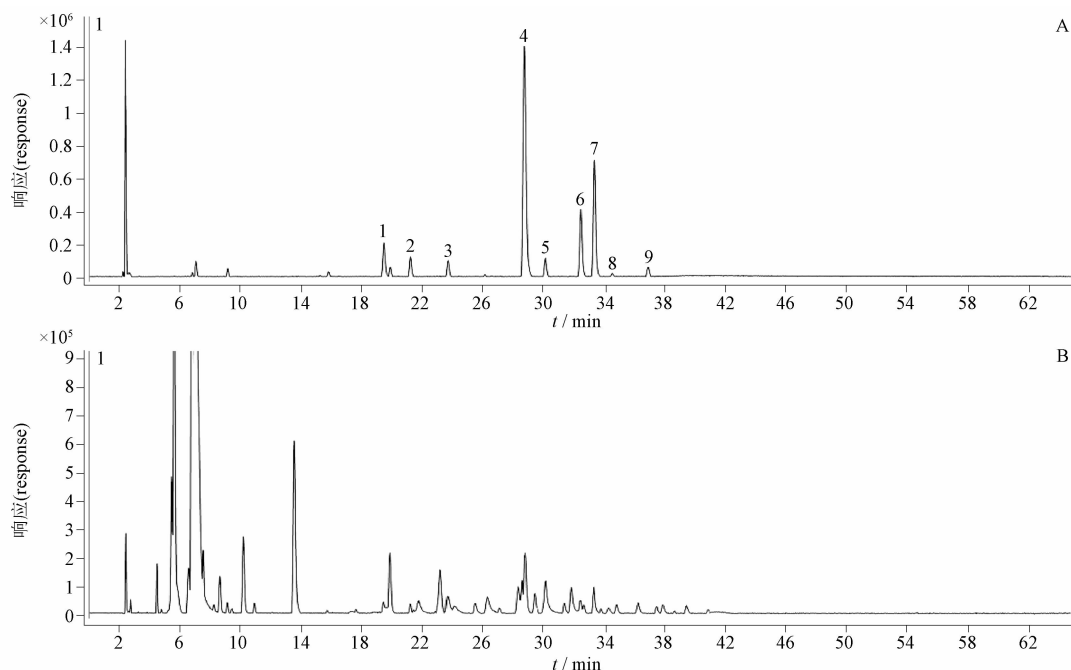
表 2 砂引草目标化合物鉴定结果

Tab. 2 The identification results of target compounds from *Tournefortia sibirica*

序号 (No.)	t_R / min	加合离子 (adduct ion)	m/z		化学位移 (chemical shift)	分子式 (molecular formula)	相对分子质量 (relative molecular mass)	化合物 (compound)	MS/MS 数据 (MS/MS data)
			实际值 (actual value)	理论值 (theoretical value)					
1	19.46	[M-H] ⁻	715.1307	715.1299	1.1	C ₃₆ H ₂₈ O ₁₆	716.14	schizotenuin A	715.1292, 473.0841, 429.0965, 403.1180, 307.0587
2	21.21	[M-H] ⁻	463.0882	463.0877	1.1	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.10	异槲皮苷(isoquercitrin)	463.0873, 300.0280, 271.0255, 255.0300
3	23.70	[M-H] ⁻	549.0866	549.0881	-2.7	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₅	550.10	槲皮素 3-O-丙二酰基葡萄糖苷(queretin3-O-malonylglucoside)	549.0873, 505.1004, 300.0275, 271.0257
4	28.73	[M-H] ⁻	359.0775	359.0767	2.2	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	360.08	迷迭香酸(rosmarinic acid)	375.0771, 179.0344, 161.0245, 133.0298
5	30.12	[M-H] ⁻	537.1037	537.1033	0.7	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₂	538.11	紫草酸(lithospermic acid)	537.1019, 295.0619, 185.0247, 109.0293
6	32.45	[M-H] ⁻	537.1068	537.1033	6.5	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₂	538.11	丹酚酸 H(salvianolic acid H)	537.1031, 295.0616, 197.0444, 179.0351, 161.0246
7	33.34	[M-H] ⁻	717.1459	717.1456	0.4	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	718.15	丹酚酸 B(salvianolic acid B)	717.1450, 519.0948, 339.0524, 321.0428, 295.0624
8	34.53	[M-H] ⁻	1073.2012	1073.2052	-3.7	C ₄₇ H ₄₆ O ₂₉	1074.21	未知(unknown)	1073.1965, 985.2239, 787.1641, 589.1134
9	36.91	[M-H] ⁻	373.0932	373.0924	2.1	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	374.10	迷迭香酸甲酯异构体(methyl rosmarinate isomer)	373.0921, 179.0343, 160.0160, 135.0458

2.3.5 指纹图谱建立与相似度评价 取 17 批(S1~S17)不同产地砂引草,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项色谱条件进样并记录色谱数据,得 17 批次砂引草 HPLC 色谱图(图 3)。将其导入国家药典委员会中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012.130723 版),以样品(S1)图谱为参照指纹图谱,

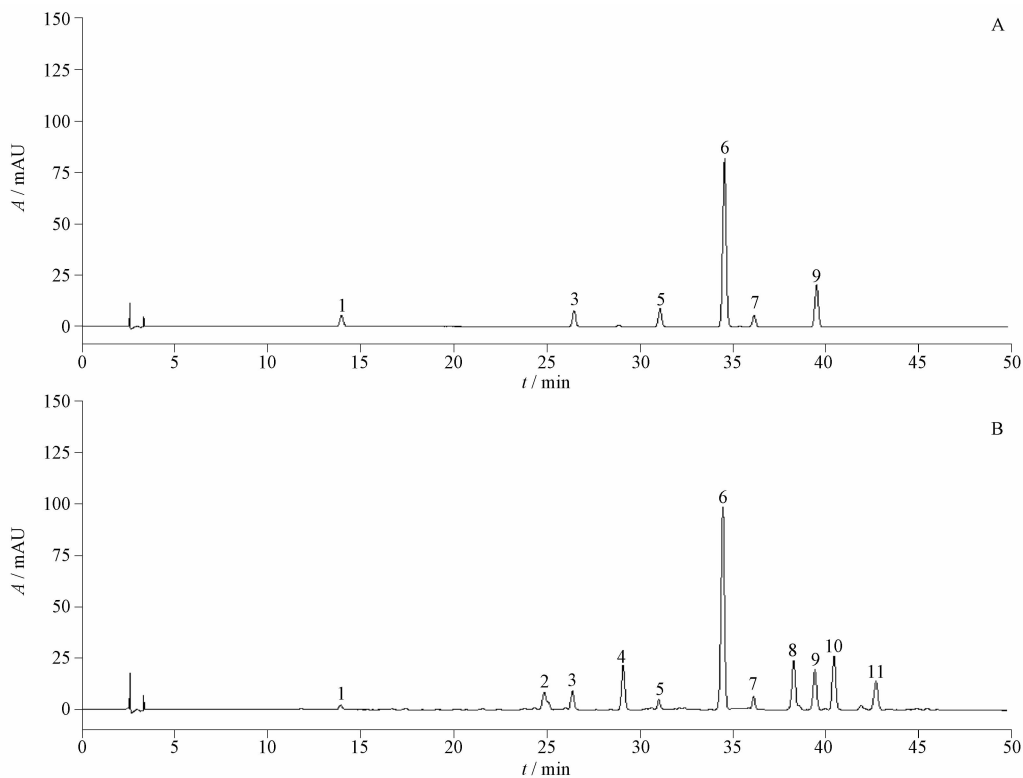
中位数法生成对照指纹图谱,多点校正得到砂引草样品的指纹图谱与对照图谱并进行相似度分析,共得到 11 个共有峰,6 号色谱峰有较好的峰形,且峰面积大,故以 6 号峰为参照峰。结果显示 17 批砂引草药材与对照指纹图谱之间的相似度在 0.931~0.996。说明 17 批次砂引草药材总体相似度较高,药材质量稳定。



A. 负离子模式(negative ion mode) B. 正离子模式(positive ion mode)

图1 砂引草 UPLC-HRMS 基峰离子流图

Fig. 1 UPLC-HRMS base peak chromatograms of *Tournefortia sibirica*



1. 咖啡酸(caffeic acid) 3. 异槲皮苷(isoquercitrin) 5. 槲皮苷(quercitrin) 6. 迷迭香酸(rosmarinic acid) 7. 紫草酸(lithospermic acid) 9. 丹酚酸 B(salvianolic acid B)

图2 砂引草混合对照品溶液(A)和供试品溶液(B)色谱图

Fig. 2 Chromatograms of *Tournefortia sibirica* mixed reference substance solution (A) and test solution (B)

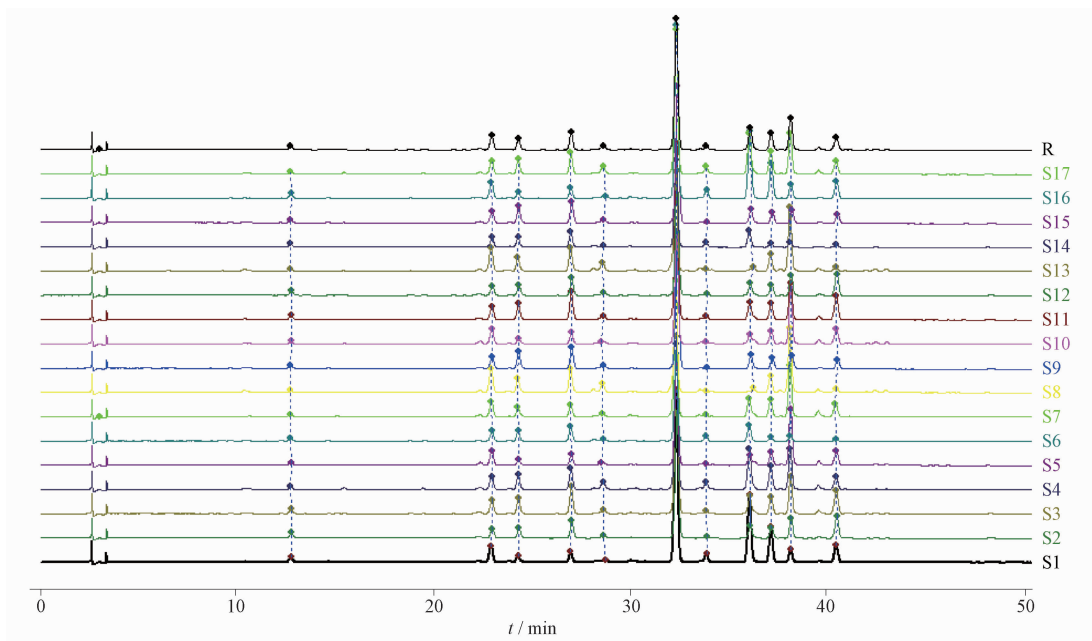


图3 砂引草 HPLC 指纹图谱 (S1 ~ S17) 及其对照指纹图谱 (R)

Fig. 3 HPLC fingerprints (S1 ~ S17) and control fingerprints (R) of *Tournefortia sibirica*

2.3.6 聚类分析结果 以 17 批砂引草样品的 11 个共有峰峰面积为变量,通过 SPSS 27.0 软件,运用组间对比法进行系统聚类分析 (CA),以平方欧氏距离为标尺计算样品的相似程度,连接方法为组间连接,17 批药材的聚类分析树状图见图 4。可看出,不同地区的砂引草可以被较好地分开。当距离为 5 时,样品可被划分为 4 类:第 I 类为 S2、S4、S5、S7 ~ S9、S11、S13;第 II 类为 S6、S10、S14、S16;第 III 类为 S1、S3、S12、S15;第 IV 类为 S17。当距离为 20 时,样品可被划分为 2 类:第 I 类为 S1 ~ S16;第 II 类为 S17。

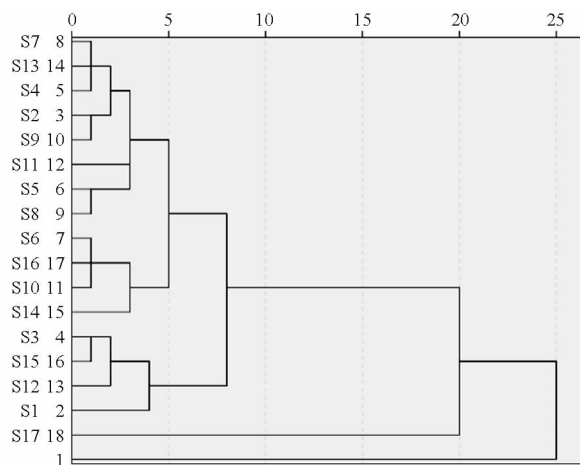


图4 17 批砂引草样品的 CA 图

Fig. 4 CA of 17 batches of *Tournefortia sibirica* samples

2.3.7 主成分分析结果 为更深入地探究不同批次间蒙药砂引草的质量差异,将 17 批药材样品中 11 个共有峰面积导入 SPSS 27.0 软件,进行主成分分析 (PCA),结果以特征值 >1 为筛选条件,提取出 4 个主成分,且 4 个主成分特征根分别为 5.199、2.068、1.276、1.038,方差贡献率分别为 47.265、18.801、11.603、9.432,累计贡献率达到 87.1%,表明这 4 类主成分包含了全部测量指标所含有的主要信息,达到了降维的目的。PCA 碎石图 (图 5) 显示,率先提取出来的 4 个成分的坡度较为陡峭,而后续形成的坡度较为平缓,说明这 4 个主成分可能就是鉴别砂引草最主要的色谱峰。

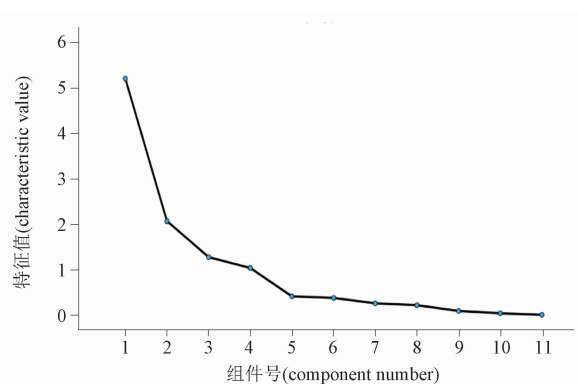


图5 PCA 碎石图

Fig. 5 PCA scree plot

为进一步分析样品之间的相似性,用 SIMCA 14.1 软件绘制 17 批样品的主成分得分图,见图 6。以 11 个共有峰峰面积为变量,可以直观看出各产地样品特征分布情况,17 批样品分布比较集中,与 CA 结果大致相同。

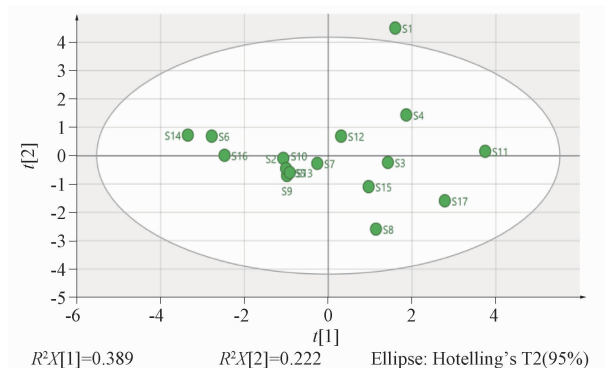


图 6 17 批砂引草 PCA 得分图

Fig. 6 PCA score chart of 17 batches of *Tournefortia sibirica*

2.3.8 正交偏最小二乘法 - 判别分析结果 采用 SIMCA 14.1 软件对 17 批样品进行正交偏最小二乘法 - 判别分析(OPLS - DA),得分矩阵图见图 7。该模型 $R^2 X(\text{cum}) = 0.315$, $R^2 Y(\text{cum}) = 0.203$, $Q^2 = -0.616$,该模型各数值均小于 0.5,说明模型不是很稳定可靠,不适合作为砂引草指纹图谱的模式识别方法。通过变量重要性投影值(VIP)筛选能引起砂引草菌株成分差异的主要标记性成分,其中,拥有较大 VIP 值的变量,对分类的贡献越大。以 $VIP > 1$ 为标准,从图 8 可以看出,大于 1 者有 5 个,分别为峰 3、峰 6、峰 2、峰 8、峰 7。通过“2.3.4”项下的指认,峰 3 为异槲皮苷,峰 6 为迷迭香酸,峰 7 为紫草酸。综上所述,结合 OPLS - DA 中 VIP 值筛选、对照品指认及相关药效学文献,说明异槲皮苷、迷迭香酸以及紫草酸是砂引草的差异标志物。

表 3 砂引草中 6 种化学成分线性关系考察结果

Tab. 3 Linear regression results of 6 components in *Tournefortia sibirica*

成分 (component)	线性方程 (linear equation)	<i>r</i>	线性范围 (linear range)/ μg
咖啡酸 (caffeic acid)	$Y = 5.4 \times 10^6 X - 501.933$	1.000	0.003 3 ~ 0.029 5
异槲皮苷 (isoquercitrin)	$Y = 2.0 \times 10^6 X - 787.587$	1.000	0.011 9 ~ 0.107 3
槲皮苷 (quercitrin)	$Y = 2.0 \times 10^6 X - 666.982$	1.000	0.014 8 ~ 0.132 8
迷迭香酸 (rosmarinic acid)	$Y = 3.0 \times 10^6 X - 6 818.789$	1.000	0.092 8 ~ 0.835 2
紫草酸 (lithospermic acid)	$Y = 1.5 \times 10^6 X - 241.434$	1.000	0.068 9 ~ 0.105 8
丹酚酸 B (salvianolic acid B)	$Y = 1.0 \times 10^6 X - 1 141.888$	1.000	0.068 8 ~ 0.619 9

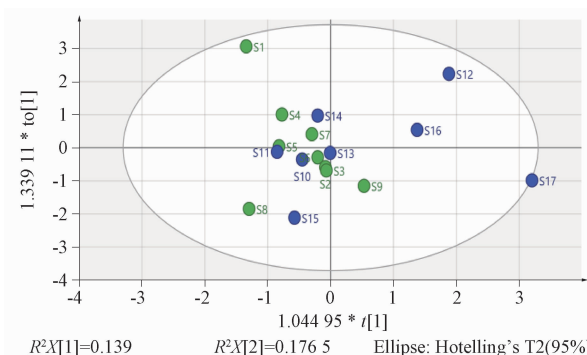


图 7 17 批砂引草 OPLS - DA 得分图

Fig. 7 OPLS - DA score chart of 17 batches of *Tournefortia sibirica*

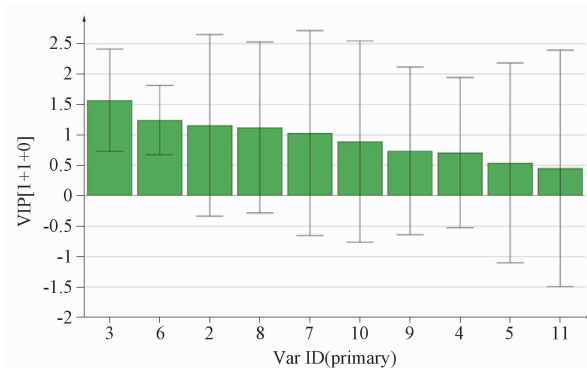


图 8 17 批砂引草 OPLS - DA VIP 值

Fig. 8 OPLS - DA VIP value of 17 batches of *Tournefortia sibirica*

2.4 砂引草中 6 个化学成分的含量测定

2.4.1 线性关系考察 分别精密吸取“2.2.2”项混合对照品溶液 2.0、5.0、10.0、15.0、18.0 μL ,注入液相色谱仪,测定其峰面积值。以混合对照品溶液的进样量 X 为横坐标,峰面积积分值 Y 为纵坐标,进行线性分析,结果见表 3。砂引草中 6 个化学成分在相应的质量浓度范围与峰面积线性关系良好。

2.4.2 精密度试验 精密吸取 S1 号样品的供试品溶液各 10 μL , 分别连续注入液相色谱仪 6 次, 测定峰面积, 并统计分析。结果咖啡酸、异槲皮苷、槲皮苷、迷迭香酸、紫草酸和丹酚酸 B 峰面积的 RSD 依次为 1.9%、1.0%、1.4%、0.19%、1.1% 和 0.32%。表明该仪器精密度良好。

2.4.3 重复性试验 取 S1 号样品, 按“2.2.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行 HPLC 分析, 进样体积 10 μL , 计算含量, 测得咖啡酸、异槲皮苷、槲皮苷、迷迭香酸、紫草酸和丹酚酸 B 的平均含量分别为 0.012%、0.045%、0.033%、0.77%、0.079% 和 0.46%, RSD 分别为 3.5%、2.3%、3.3%、0.14%、1.1% 和 0.19%。

2.4.4 稳定性试验 取 S1 号样品, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 分别在 0、2、4、8、10、12 h 进样 10 μL 测定, 结果咖啡酸、异槲皮苷、槲皮苷、迷迭香酸、紫草酸和丹酚酸 B 峰面积的 RSD 分别为 0.80%、1.1%、1.7%、0.52%、0.54% 和 0.78%。表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.4.5 加样回收率试验 取已知含量的 S1 号样品约 0.1 g, 共 9 份, 精密称定, 分为 3 组, 按 0.5、1、1.5 的比例分别依次精密加入咖啡酸、异槲皮苷、槲皮苷、迷迭香酸、紫草酸和丹酚酸 B 对照品, 制备供试溶液, 精密吸取 10 μL 进样测定, 计算咖啡酸、异槲皮苷、槲皮苷、迷迭香酸、紫草酸和丹酚酸 B 的回收率, 结果见表 4。

表 4 加样回收率结果

Tab. 4 The results of recovery rate

成分 (component)	取样量 (sample quantity)/g	样品中含量 (content)/mg	加入量 (added)/mg	测得量 (measured)/mg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/ %
咖啡酸 (caffeic acid)	0.102 4	0.012 3	0.006 7	0.018 9	98.7	97.6	1.3
	0.103 6	0.012 4	0.006 7	0.018 9	96.5		
	0.102 8	0.012 3	0.006 7	0.018 8	96.5		
	0.110 4	0.013 2	0.013 4	0.026 4	98.1		
	0.107 4	0.012 9	0.013 4	0.025 4	93.4		
	0.108 1	0.013 0	0.013 4	0.025 8	95.7		
	0.102 1	0.012 3	0.020 1	0.030 9	92.8		
	0.110 9	0.013 3	0.020 1	0.032 4	95.0		
	0.101 1	0.012 1	0.020 1	0.032 6	94.9		
异槲皮苷 (isoquercitrin)	0.102 4	0.046 1	0.023 5	0.068 8	98.0	97.2	0.81
	0.103 6	0.046 6	0.023 5	0.069 2	97.1		
	0.102 8	0.046 3	0.023 5	0.071 0	96.5		
	0.110 4	0.049 7	0.047 0	0.096 8	98.0		
	0.107 4	0.048 3	0.047 0	0.097 5	102.2		
	0.108 1	0.048 6	0.047 0	0.095 7	97.6		
	0.102 1	0.045 9	0.070 5	0.115 2	95.2		
	0.110 9	0.049 9	0.070 5	0.120 2	97.5		
	0.101 1	0.045 5	0.070 5	0.114 6	94.9		
槲皮苷(quercitrin)	0.102 4	0.033 8	0.017 5	0.050 6	97.8	99.7	3.4
	0.103 6	0.034 2	0.017 5	0.052 9	103.6		
	0.102 8	0.033 9	0.017 5	0.050 7	97.8		
	0.110 4	0.036 4	0.035 0	0.069 0	94.5		
	0.107 4	0.035 4	0.035 0	0.070 5	100.2		
	0.108 1	0.035 7	0.035 0	0.072 7	103.4		
	0.102 1	0.033 7	0.052 5	0.084 9	96.1		
	0.110 9	0.036 6	0.052 5	0.088 6	98.6		
	0.101 1	0.033 4	0.052 5	0.084 5	95.8		

表 4(续)

成分 (component)	取样量 (sample quantity)/g	样品中含量 (content)/mg	加入量 (added)/mg	测得量 (measured)/mg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/ %
迷迭香酸 (rosmarinic acid)	0.102 4	0.790 5	0.377 0	1.178 0	102.8	102.3	0.60
	0.103 6	0.799 8	0.377 0	1.182 9	101.6		
	0.102 8	0.793 6	0.377 0	1.180 3	102.6		
	0.110 4	0.852 3	0.754 0	1.622 2	102.1		
	0.107 4	0.829 1	0.754 0	1.590 8	101.0		
	0.108 1	0.834 5	0.754 0	1.592 0	100.5		
	0.102 1	0.788 2	1.131 0	1.934 0	101.3		
	0.110 9	0.856 1	1.131 0	1.971 9	98.7		
紫草酸 (lithospermic acid)	0.101 1	0.780 5	1.131 0	1.878 3	97.1	97.0	1.4
	0.102 4	0.080 9	0.041 4	0.121 4	97.8		
	0.103 6	0.081 8	0.041 4	0.121 4	95.5		
	0.102 8	0.081 2	0.041 4	0.121 7	97.8		
	0.110 4	0.087 2	0.082 8	0.168 3	97.9		
	0.107 4	0.084 8	0.082 8	0.163 8	95.4		
	0.108 1	0.085 4	0.082 8	0.162 3	92.9		
	0.102 1	0.080 7	0.124 2	0.198 1	94.6		
丹酚酸 B (salvianolic acid B)	0.110 9	0.087 6	0.124 2	0.206 7	95.9	95.0	0.90
	0.101 1	0.079 9	0.124 2	0.197 1	94.4		
	0.102 4	0.468 0	0.236 0	0.696 3	96.8		
	0.103 6	0.473 5	0.236 0	0.696 2	94.4		
	0.102 8	0.469 8	0.236 0	0.691 2	93.8		
	0.110 4	0.504 5	0.472 0	0.972 1	99.1		
	0.107 4	0.490 8	0.472 0	0.976 9	103.0		
	0.108 1	0.494 0	0.472 0	0.945 4	95.6		
	0.102 1	0.466 6	0.708 0	1.154 1	97.1	99.2	3.7
	0.110 9	0.506 8	0.708 0	1.219 0	100.6		
	0.101 1	0.462 0	0.708 0	1.167 0	99.6		

2.4.6 样品测定 取砂引草样品各约 0.2 g,精密称定,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,精密吸取 10 μL ,分别注入液相色谱仪,测定,并计算含量。结果 17 批次砂引草中咖啡酸、异槲皮苷、槲皮苷、迷迭香酸、紫草酸和丹酚酸 B 含量(以干燥品计)分别在 0.004%~0.013%、0.030%~0.259%、0.032%~0.256%、0.256%~1.246%、0.018%~0.072% 和 0.062%~0.499%。见表 5。

3 讨论

本研究制定了蒙药材砂引草的性状、鉴别(显微鉴别和薄层色谱鉴别)、检查(水分、总灰分、酸不溶性灰分)、浸出物(醇溶性、水溶性)、指纹图谱和含量测定等内容。

3.1 性状

本品茎圆柱形,单一或数条丛生,直立或斜

升,通常分枝,长 10~30 cm;表面黄绿色、黄棕色或灰棕色,密生糙伏毛或白色长柔毛;体轻,质脆,断面类白色或淡黄色。叶多脱落并破碎,展平后披针形、倒披针形或长圆形,长 1~5 cm,宽 6~10 mm,先端渐尖或钝,基部楔形或圆,密生糙伏毛或长柔毛,无柄或近无柄。花序顶生。气微,味淡。

3.2 鉴别(1)

本品粉末绿色。非腺毛单细胞,长可达 1 000 μm ,壁厚,表面有微细疣状突起。腺毛头部圆形或类圆形,柄具 1~5 个细胞。草酸钙簇晶直径约 10 μm ,单个散在或成行排列于纤维或晶纤维。花粉粒类圆形,直径约 30 μm 。导管主为环纹导管或螺旋导管,直径约 10~30 μm 。气孔多为不定式。

表 5 17 批砂引草含量测定结果

Tab. 5 Results of content determination of 17 batches *Tournefortia sibirica*

编号 (No.)	含量(以干燥品计)[content(calculated by drying product)]/%					
	咖啡酸 (caffeic acid)	异槲皮苷 (isoquercitrin)	槲皮苷 (quercitrin)	迷迭香酸 (rosmarinic acid)	紫草酸 (lithospermic acid)	丹酚酸 B (salvianolic acid B)
S1	0.013	0.05	0.037	0.843	0.086	0.499
S2	0.013	0.072	0.032	0.605	0.020	0.153
S3	0.012	0.106	0.049	0.833	0.031	0.231
S4	0.007	0.101	0.075	0.704	0.072	0.322
S5	0.007	0.039	0.034	0.507	0.028	0.189
S6	0.008	0.066	0.034	0.418	0.047	0.062
S7	0.007	0.071	0.048	0.673	0.025	0.254
S8	0.006	0.097	0.075	0.515	0.039	0.242
S9	0.008	0.114	0.041	0.662	0.023	0.158
S10	0.007	0.056	0.043	0.442	0.018	0.391
S11	0.006	0.135	0.256	0.707	0.049	0.384
S12	0.007	0.096	0.041	0.952	0.041	0.396
S13	0.005	0.068	0.104	0.674	0.018	0.157
S14	0.004	0.03	0.042	0.256	0.029	0.144
S15	0.009	0.125	0.132	0.86	0.018	0.123
S16	0.004	0.105	0.034	0.533	0.019	0.139
S17	0.006	0.259	0.063	1.246	0.025	0.307

3.3 鉴别(2)

取本品 2 g, 加二氯甲烷 30 mL, 超声(功率 250 W, 频率 40 kHz) 处理 30 min, 过滤, 滤液浓缩至 1 mL, 作为供试品溶液, 滤渣备用。另取 β -谷甾醇对照品, 加二氯甲烷制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法(通则 0502) 试验, 吸取上述 2 种溶液各 10 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以石油醚-丙酮(7:1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点; 置紫外光灯(365 nm) 下检视显相同颜色的荧光斑点。

3.4 鉴别(3)

取鉴别(2) 项下的滤渣, 加甲醇 30 mL 超声(功率 250 W, 频率 40 kHz) 处理 30 min, 过滤, 滤液浓缩至 1 mL, 作为供试品溶液。另取迷迭香酸对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法(通则 0502) 试验, 吸取上述 2 种溶液各 3 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以环己烷-乙酸乙酯-甲酸(8:10:1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 在紫外光灯(365 nm) 下检视。供试品色谱

中在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点。

3.5 检查和浸出物

参照 2020 年版《中华人民共和国药典》四部对 17 批样品进行检查和浸出物项考察测定, 结果水分在 7.3%~10.8%; 总灰分在 6.1%~9.9%; 酸不溶性灰分在 0.65%~1.9%; 醇溶性浸出物在 9.8%~14.7%; 水溶性浸出物在 24.2%~34.9%。

3.6 色谱条件的选择

对供试品溶液进行 200~400 nm 的波长扫描, 结果显示波长在 330 nm 时有较大吸收, 且分离度好, 故本研究检测波长选择为 330 nm; 分别考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.2% 磷酸水溶液、乙腈-0.2% 磷酸水溶液为流动相的不同比率梯度洗脱, 结果流动相为乙腈-0.2% 磷酸水溶液为流动相时分离度较好, 故选择了乙腈-0.2% 磷酸水溶液为流动相; 对选定的流动相以 (1.0 ± 0.2) mL \cdot min⁻¹ 的不同流速进行了考察试验, 结果咖啡酸、异槲皮苷、槲皮苷、迷迭香酸、紫草酸和丹酚酸 B 色谱峰的保留时间, 随流速提高依次有所前移, 且不影响分离度与峰面积值, 故本试验研究采用流动相流速为

1.0 mL · min⁻¹;对色谱柱温度的控制,以(30 ± 10) °C 的不同温度进行了考察试验,结果咖啡酸、异槲皮苷、槲皮苷、迷迭香酸、紫草酸和丹酚酸 B 色谱峰的保留时间,随柱温提高渐有前移,且不影响分离度与峰面积值,故本试验研究采用了柱温为 40 °C。

3.7 提取条件的选择

本研究考察了不同溶剂(甲醇、70% 甲醇、50% 甲醇)、不同提取方法(超声提取、回流提取)、不同提取时间(30、45、60 min),结果不同溶剂、提取方法及提取时间的 HPLC 色谱峰数、分离度以及主峰的峰面积差别不大,考虑到甲醇提取的杂质少,超声提取简便,30 min 时节能,故本研究提取方法为取本品粉末(过 3 号筛)约 0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,密塞,称量,超声(250 W, 40 kHz)处理 0.5 h,放冷,再称量,用甲醇补足减失的量,摇匀,滤过,即得。

参考文献

- [1] 内蒙古植物志编辑委员会. 内蒙古植物志·第二卷[M]. 呼和浩特:内蒙古人民出版社,1989:425
Mongolia Botanical Medicine Records. Inner Mongolia Botanical Medicine Records. Vol II[M]. Hohhot: Inner Mongolia People's Publishing House, 1989:425
- [2] 敖德毕力格,那顺巴雅尔. 锡林郭勒盟草原药物诠释典[M]. 呼和浩特:内蒙古人民出版社,2012:293
Ao - De - Bi - Li - Ge, Na - Shun - Ba - Ya - Er. Xilingol League Grassland Medicine Annotation Code [M]. Hohhot: Inner Mongolia People's Publishing House, 2012:293
- [3] 张欣,贝鑫临,丁春霞. 响应面法优化砂引草多糖的提取工艺[J]. 饲料工业,2015, 36(21):29
ZHANG X, BEI ZL, DING CX. Response surface methodology was used to optimize the extraction process of polysaccharide from *Leymus chinensis* [J]. Feed Ind, 2015, 36 (21):29
- [4] MORTEZA - SEMNANI K, SAEEDI M, AKBARZADEH M. The essential oil composition of *Messerschmidia sibirica* L. [J]. J Essent Oil Res, 2008, 20(2):107
- [5] 高超,张海波,闫繁,等. 砂引草挥发油化学成分的气质联用分析[J]. 科技经济导刊,2015,15(2):152
GAO C, ZHANG HB, YAN F, et al. GC - MS Analysis of the essential oil composition from *Messerschmidia sibirica* L. [J]. Technol Econ Guid, 2015, 15(2):152
- [6] 阿如汗,斯日古冷,郝俊生,等. 应用液质联用鉴定分析蒙药砂引草的化学成分[J]. 大众医学,2021, 1(1):105
A - Ru - Han, Si - Ri - Gu - Leng, HAO JS, et al. Identification of the composition from *Messerschmidia sibirica* L. by LC - MS [J]. Popul Med, 2021, 1(1):105
- [7] HIKICHI M, ASADA Y, FURUYA T. Pyrrolizidine alkaloids from *Messerschmidia sibirica* [J]. Plant Med, 1980, 40(S1):1
- [8] SONG ZZ, LIU ZM, JIA ZJ, et al. Two new neolignans from *Messerschmidia sibirica* L. ssp. [J]. Chin Chem Lett, 1992 (12):975
- [9] SONG ZZ, WANG BG, JIA ZJ. Lignan derivatives of caffeic acids and terpenoids from *Messerschmidia sibirica* L. ssp. [J]. Indian J Chem B, 1996, 35:955
- [10] 吴永江,井上谦一郎. 日本产砂引草叶中黄酮类化合物的分析[J]. 浙江医科大学学报,1996(1):1
WU YJ, KENICHIRO I. Analyses of flavonoids in leaves of *Messerschmidia argentea* Johnston from Japan [J]. J Zhejiang Med Univ, 1996(1):1
- [11] HU H, BAO A, PAN S, et al. Structural elucidation of a new alkaloid from *Tournefortia sibirica* L. [J]. Nat Prod Res, 2020, 6:1
- [12] DIAO S, JIN M, JIN CS, et al. A new flavanone glycoside isolated from *Tournefortia sibirica* [J]. Nat Prod Res, 2019, 33(20):3021
- [13] SWAMY MK, SINNIHAH UR, GHASEMZADEH A, et al. Anti-cancer potential of rosmarinic acid and its improved production through biotechnological interventions and functional genomics [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102(18):7775
- [14] KOJIRO T, YUKIMI N, SHUNSUKE A, et al. Comparative proteomic analysis of *Lithospermum erythrorhizon* reveals regulation of a variety of metabolic enzymes leading to comprehensive understanding of the shikonin biosynthetic pathway[J]. Plant Cell Physiol, 2019, 60(1):19
- [15] KRZYZANOWSKA - KOWALCZYK J, PECIO Ł, MOLDOCH J, et al. Novel phenolic constituents of *Pulmonaria officinalis* L. LC - MS/MS comparison of spring and autumn metabolite profiles [J]. Molecules, 2018, 23(9):2277
- [16] 叶梦倩,吴孟华,马志国,等. 香薷 HPLC 指纹图谱及多指标成分定量分析[J]. 药物分析杂志, 2023, 43(2):236
YE MQ, WU MH, MA ZG, et al. HPLC fingerprint and multi - components quantitative analysis of *Moslae Herba* [J]. Chin J Pharm Anal, 2023, 43(2):236
- [17] 宁二娟,陈玲,王学方,等. 河南牡丹叶的 HPLC 指纹图谱及化学模式识别研究[J]. 药物分析杂志, 2023, 43(3):486
NING EJ, CHEN L, WANG XF, et al. HPLC fingerprint combined with chemical pattern recognition for quality evaluation of poeny leaves from Henan province [J]. Chin J Pharm Anal, 2023, 43(3):486

(本文于 2023 年 7 月 6 日收到)