

续断的HPLC指纹图谱研究[△]

朱净民^{1*} 李隆云^{2#} 马鹏² 秦剑² 向丽³ 张雪²(1.北京中医药大学,北京 100102 2.重庆市中药研究院,重庆 400065 3.重庆天生药业有限公司,重庆 408500)

中图分类号 R284.1 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2012)11-1012-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2012.11.20

摘要 目的:建立续断的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并对不同产地续断的指纹特征进行比较,为其质量评价提供新的方法。方法:采用HPLC法测定了19批不同产地的续断样品,色谱柱为Ultimate XB-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-0.05%磷酸水(梯度洗脱),柱温为25℃,流速为1 mL·min⁻¹,检测波长为212 nm。并对不同产地样品的相似度进行了比较。结果:利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)》建立了续断药材的指纹图谱共有模式,标出了21个特征峰。除了10号样品,其他18批样品的相似度均较高。结论:本方法具有较好的重复性、精密性、稳定性,可为续断的质量控制提供科学依据。
关键词 续断;高效液相色谱法;指纹图谱

Study on HPLC Fingerprints of *Dipsacus asper*

ZHU Jing-min(Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

LI Long-yun, MA Peng, QIN Jian, ZHANG Xue(Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China)

XIANG Li(Chongqing Tiansheng Pharmaceutical Co., Ltd., Chongqing 408500, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish HPLC fingerprints of *Dipsacus asper*, and to compare the fingerprints of *D. asper* from different regions so as to set up new method for the quality control of *D. asper*. METHODS: 19 batches of samples from different regions were analyzed by HPLC. Ultimate XB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column was adopted with mobile phase consisted of acetonitrile-0.05% H₃PO₄(gradient elution) at the flow rate of 1 mL·min⁻¹. The column temperature was 25℃, and the detective wavelength was set 212 nm. The similarity of samples from different regions was compared. RESULTS: The mutual mode of the fingerprints of *D. asper* was set up with Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM (2004 A version), and 21 characteristic marks were marked. The samples had high similarity, except for No. 10 sample. CONCLUSION: The method has a good repeatability, precision and stability. It can provide scientific basis for the quality control of *D. asper*.

KEY WORDS *Dipsacus asper*; HPLC; Fingerprints

质⁹。还有学者做了三黄泻心汤各单味药的配伍研究,发现黄芩有利于大黄中大黄酸的煎出¹⁰。但在笔者的试验中,虎杖配伍黄芩和黄连后,大黄酸的煎出率并不高。而笔者同时进行了三黄泻心汤中蒽醌类成分含量测定的研究,发现三黄泻心汤中大黄酸含量比虎杖泻心汤中高。由于有效成分在药用植物中的存在形式不仅决定提取方法的不同,也会影响含量测定结果,故这一点可为大黄酸在虎杖和大黄2味药材中存在形式是否存在不同提供参考。

参考文献

- [1] 邓中甲.方剂学[M].北京:中国中医药出版社,2004:101.
- [2] 马越鸣,闫晶超,王天明,等.泻心汤在急性炎症动物模型上的抗炎效应[J].中国药理学通报,2006,24(11):1393.
- [3] 蒋爱品.三黄泻心汤的药理研究概况[J].北京中医,2001,

20(5):45.

- [4] 耿慧春,杨波,李彦冰.三黄泻心汤对实验性糖尿病大鼠影响的研究[J].中医药信息,2010,27(4):57.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[S].北京:中国医药科技出版社,2010:194.
- [6] 邹佳丽,黄萍,袁月梅,等.大黄黄连泻心汤不同配伍浸渍剂中主要化学成分变化研究[J].世界科学技术-中医药现代化,2009,11(2):263.
- [7] 郭洁云,朱文庆,赵维中,等.虎杖苷对实验性急性胃黏膜损伤的保护作用[J].时珍国医国药,2006,17(11):2183.
- [8] 邓翀,吴怡,孟宪丽,等.大黄抗内毒素有效组分血清药物化学研究[J].中药药理与临床,2008,24(2):31.
- [9] 朱伟,阮新民,吴焕林,等.大黄酸在寒、热证人体内药动学过程比较[J].中华中医药杂志,2006,21(10):630.
- [10] 李奕,许旭,等.三黄泻心汤主要药效成分的含量表征[J].中国中药杂志,2006,31(5):383.

(收稿日期 2011-11-21 修回日期 2012-01-29)

△ 重庆市科技攻关计划项目(CSTC 2009AA5009)

* 硕士研究生。研究方向:中药材质量标准。电话:023-89029048。E-mail: zhujingmin05@163.com

通讯作者,研究员,博士。研究方向:药用植物栽培与中药材质量分析。电话:023-89029118。E-mail: lilongyun8@163.com

续断为川续断科川续断属植物川续断 *Dipsacus asper* Wall.ex Henry 的干燥根,始载于《神农本草经》,被列为上品。性微温,味苦、辛,归肝、肾经,具有补肝肾、强筋骨、续折伤、止崩漏之功效^[1]。续断是骨伤科和妇科常用中药,主要含三萜皂苷、生物碱、环烯醚萜类成分^[2]。续断苷能促进人成骨细胞的分化和形成,具有抗骨质疏松的作用^[3]。总生物碱具有松弛子宫平滑肌、对抗催产素的作用,研究表明生物碱类成分与续断的安胎作用有关^[4]。

续断属于常用大宗药材之一,其药材质量随产地不同而差异显著。2010年版《中国药典》规定续断药材中川续断皂苷的含量不得少于2%。鉴于中医用药的整体性和中药材成分的复杂性,应用单一成分的质量控制方法并不能全面客观地评价药材质量。指纹图谱技术具有整体性和模糊性,既能体现中药材的真伪,又能体现不同产地、不同环境的样品特性,为中药材的质量控制提供了有效方法^[5,6]。本研究采用高效液相色谱(HPLC)技术建立了续断的指纹图谱控制方法,测定了19批采自不同产地的续断样品,建立了续断的指纹图谱共有模式,以期进一步为续断的质量控制提供科学依据。

1 仪器与试剂

LC-20AT型HPLC仪,含Shimadzu色谱工作站、二极管阵列检测器(DAD,日本岛津公司);KQ-250B型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司,频率:40 kHz,功率:250 W);Millipore-Q纯水制备仪(美国密里博公司);十万分之一电子天平(日本岛津公司)。

川续断皂苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:11685-200802,纯度98%);乙腈为色谱纯,磷酸为分析纯,水为超纯水。续断药材由重庆市中药研究院李隆云研究员鉴定为川续断科植物川续断 *D. asper* Well.ex Henry 的干燥根,标本现存于重庆市中药研究院种植所,样品来源见表1。

表1 续断样品来源

Tab 1 The origins of *D. asper*

批号	样品编号	产地
110502	1	湖北五峰县鱼溪镇
111401	2	重庆奉节县尖山村
110601	3	湖北玉峰县城关镇
111802	4	重庆秀山县隘口镇
110701	5	湖北鹤峰县燕子镇
111801	6	重庆酉阳县李溪镇
112001	7	重庆武隆县
111602	8	贵州大方县
112001	9	重庆黔江县
110201	10	贵州息烽县
110301	11	湖北恩施州茅田乡
111901	12	重庆秀山县涌洞乡川河坝
111902	13	重庆酉阳县板溪镇
110501	14	湖北农阳县大堰镇
110702	15	湖北鹤峰县五里乡
110802	16	湖北鹤峰县走马镇铁路乡
110401	17	湖北巴东县野三关铁厂荒林场
110902	18	湖南龙山县
110801	19	湖北鹤峰县走马镇万施坪

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Ultimate XB-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动

相:乙腈(A)-0.05%磷酸水(B),梯度洗脱(0~10 min,A为3%~18%;10~35 min,A为18%~23%;35~45 min,A为23%~40%;45~55 min,A为40%~80%;55~60 min,A为80%)检测波长212 nm;流速:1 mL·min⁻¹;进样量:10 μL;柱温:25℃;运行时间:60 min。

2.2 对照品溶液的制备

取川续断皂苷对照品3.30 mg,精密称定,置于10 mL量瓶中,加甲醇适量,超声使溶解,冷却,用甲醇定容至10 mL,摇匀,得浓度为0.330 mg·mL⁻¹的对照品溶液,备用。

2.3 供试品溶液的制备

取续断药材低温烘干,粉碎,过40目筛。精密称取粉末1.0 g,置于100 mL三角瓶中,加甲醇100 mL,称定重量,超声提取30 min,取出放置10 min,再称定重量,甲醇补足失重,常压过滤,吸取续滤液,0.45 μm微孔滤膜滤过,滤液作为供试品溶液,备用。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 精密称取续断粉末1.0 g,按2.3项下方法制样,连续进样5次,记录指纹图谱。结果表明,指定共有峰相对保留时间的RSD在0.989%~1.132%之间,相对峰面积的RSD在1.501%~2.300%之间,表明本方法精密度良好。

2.4.2 重复性试验 精密称取6份同一批号续断(样品编号:7)粉末各1.0 g,分别按2.3项下方法制样,按上述色谱条件进样,记录指纹图谱。结果表明,指定共有峰相对保留时间的RSD在0.530%~1.670%之间,相对峰面积的RSD在2.332%~2.732%之间,表明本方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一供试品溶液适量,分别于0、2、4、8、12、20、24、36 h进样测定。结果表明,指定共有峰相对保留时间的RSD<1.622%,相对峰面积的RSD<2.880%,表明供试品溶液在36 h内稳定性良好。

2.5 续断指纹图谱共有模式的建立

取各样品,分别照2.3项下方法制样,按上述色谱条件进样,记录指纹图谱。将图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)软件,选择S12为参照图谱,通过中位数法自动匹配,生成对照指纹图谱,并根据匹配结果确定了21个共有峰。川续断皂苷对照品的HPLC图见图1;19批续断药材的HPLC指纹图谱叠加图见图2,指纹图谱的共有模式见图3。

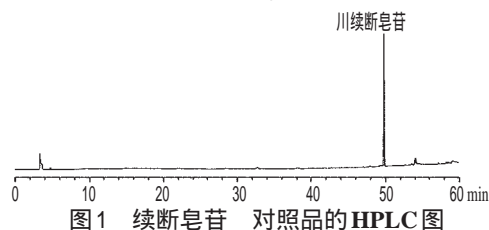


图1 HPLC chromatogram of asperosaponin control

2.6 相似度评价

通过中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)软件得到与共有模式相比较的19批样品的相似度,见表2。结果表明,不同产地样品的相似度均较高。

选择川续断皂苷所在的19号峰为内参照峰,分别计算19批样品21个共有峰的相对保留时间和相对峰面积,其平均值和RSD见表3。由表3可知,不同产地样品各共有峰相对保留时间的RSD均<0.41%,而相对峰面积的RSD却差别较大。

3 讨论

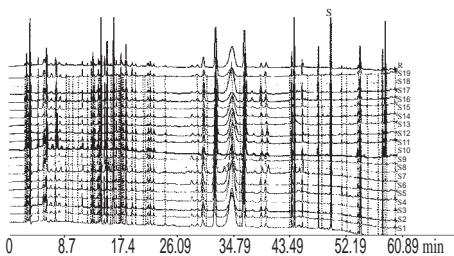


图2 19批续断药材的HPLC指纹图谱叠加图

Fig 2 HPLC chromatogram of 19 batches of *D. asper*

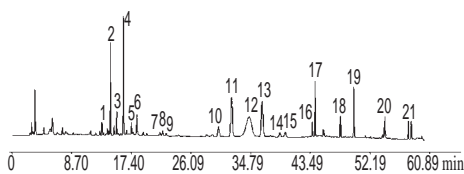


图3 指纹图谱共有模式

Fig 3 The mutual mode of fingerprints

表2 与共有模式相比较的19批样品的相似度

表2 Similarity of 19 batches of samples compared with mutual mode

样品号	相似度	样品号	相似度
1	0.931	11	0.952
2	0.957	12	0.975
3	0.946	13	0.752
4	0.949	14	0.922
5	0.979	15	0.870
6	0.960	16	0.903
7	0.812	17	0.983
8	0.935	18	0.990
9	0.983	19	0.901
10	0.645		

表3 共有峰相对保留时间和相对峰面积的平均值及RSD

表3 Average value of RT and RA of common peak and RSD

样品号	相对保留时间的平均值	相对保留时间的RSD/%	相对峰面积的平均值	相对峰面积的RSD/%
1	0.263	0.34	0.418	0.56
2	0.288	0.27	1.928	0.62
3	0.306	0.21	0.627	0.63
4	0.326	0.22	2.976	0.62
5	0.349	0.11	0.430	0.61
6	0.365	0.14	0.826	0.46
7	0.433	0.14	0.278	1.04
8	0.440	0.13	0.335	0.82
9	0.451	0.15	0.249	1.33
10	0.605	0.35	0.738	0.71
11	0.643	0.41	2.522	0.62
12	0.694	0.16	4.331	0.67
13	0.732	0.36	2.476	0.80
14	0.784	0.17	0.346	0.73
15	0.799	0.30	0.470	0.61
16	0.879	0.04	0.483	0.49
17	0.887	0.04	1.339	0.54
18	0.961	0.02	0.505	0.34
19	1.000	0.00	1.000	0.00
20	1.092	0.13	0.299	1.18
21	1.160	0.04	0.497	0.68

3.1 提取方法的选择

本试验比较了不同提取方法(水浴回流法、索氏提取法、超声提取法)对提取结果的影响,以化学成分信息的多少及川续断皂苷的含量来判断。结果表明,超声提取法和水浴回流法的提取效果相当,所以选择相对简捷的超声提取法。又进一步对超声提取时间、提取溶剂用量等分别进行考察,最后确定了文中提取方法,即以甲醇为提取溶剂,精密称取药材粉末1.0 g,加入100 mL甲醇,超声提取30 min。

3.2 流动相的选择

本试验对甲醇-水、乙腈-水、乙腈-醋酸缓冲液、乙腈-磷酸缓冲液等流动相分别进行了考察,由于甲醇的末端吸收在190 nm波长处,用甲醇-水梯度洗脱基线不稳;乙腈-水虽然基线平稳,但分离度较差、峰形较宽。后在水相中加入柠檬酸和醋酸,结果表明,各指纹峰分离度有所改善,但这2种酸在216~220 nm波长处有紫外吸收,影响检测结果。最后,通过考察乙腈-0.1%磷酸水和乙腈-0.05%磷酸水,最终选择乙腈-0.05%磷酸水作为流动相进行梯度洗脱,所得图谱具有较好的分离度和峰形。

3.3 检测波长的选择

续断药材中主要含三萜皂苷类成分,其最大吸收波长一般在200 nm波长左右。本试验采用DAD对所得图谱进行全波长扫描,结果在212和220 nm波长处谱峰信息较多,且大多谱峰具有较大吸收,而内参照峰川续断皂苷在212 nm波长处具有最大吸收,故采用212 nm作为检测波长。

3.4 数据结果分析

从表2可以看出,除了10号样品,其他样品的相似度均较高,表明来自重庆和湖北地区的药材由于产地环境相似,而使积累的药材化学成分相似。此结果也符合传统药材的道地性分类方法。另外,从其相对峰面积的RSD值可以看出,由于药材的采收期和地点的差异,其有效成分含量差别较大。

相对于单一成分的质量控制和模式,本研究建立的续断指纹图谱具有较好的专属性和稳定性,分析时间控制在60 min以内,符合指纹图谱的技术标准要求。本研究结果可为进一步控制续断的质量提供科学依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[S]. 2010年版.北京:中国医药科技出版社, 2010: 325.
- [2] 王岩,周莉玲,李锐.川续断的研究进展[J].时珍国医国药, 2002, 13(4): 233.
- [3] 郑智永.续断苷对成人成骨细胞增殖和分化作用研究[J].山东中医药大学学报, 2006, 30(5): 388.
- [4] 龚晓健,季琿,王青,等.川续断总生物碱对妊娠大鼠子宫的抗致痉及抗流产作用[J].中国药科大学学报, 1997, 29(6): 459.
- [5] 李萍,刘耀.中药指纹图谱的研究现状和发展趋势[J].药学专论, 2009, 18(8): 19.
- [6] 严奉坤,许兴.关于中药指纹图谱用于枸杞子质量控制的探讨[J].中国药房, 2007, 18(15): 195.

(收稿日期 2011-03-11 修回日期 2011-07-01)