

藏族药翼首草的 HPLC 指纹图谱分析

张小梅^{1,2}, 柯秀梅³, 励娜², 姚媛媛², 梁旭明^{2*}

(1. 成都中医药大学, 成都 611137;

2. 重庆市中药研究院 重庆市中药资源重点实验室, 重庆 400065;

3. 九江学院, 江西 九江 332000)

[摘要] 目的:建立藏药翼首草的高效液相色谱指纹图谱,并对不同产地翼首草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 测定了 10 批不同产地的翼首草样品。Boston Symmetrix 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.1 mol·L⁻¹乙酸铵水溶液(81:19),流速 0.8 mL·min⁻¹,检测波长 210 nm,柱温 30 ℃。并对不同产地样品的相似度进行了比较。结果:利用《药典会指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)》建立了翼首草药材的指纹图谱共有模式,标出了 11 个特征峰。10 批样品的相似度均较高。结论:该方法具有较好的重复性、精密性、稳定性,可为翼首草的质量控制提供科学依据。

[关键词] 藏族药;翼首草;高效液相色谱;指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)23-0075-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014230075

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141027.1534.014.html>

[网络出版时间] 2014-10-27 15:34

HPLC Fingerprint of Tibetan Medicine Pterocephali Herba

ZHANG Xiao-mei^{1,2}, KE Xiu-mei³, LI Na², YAO Yuan-yuan², LIANG Xu-ming^{2*}

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 611137, China;

2. Chongqing Academy of Chinese Traditional Materia Medica, Key Laboratory of

Chongqing TCM Resources, Chongqing 400065, China;

3. Jiujiang University, Jiujiang 332000, China)

[Abstract] **Objective:** The aim of this study was to establish the HPLC fingerprint of Tibetan medicine Pterocephali Herba, and compare the fingerprints of Pterocephali Herba from different places, in order to provide a new method for its quality evaluation. **Method:** HPLC method was adopted to determine 10 groups of Pterocephali Herba from different places, with Boston Symmetrix (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) chromatographic column. The mobile phase was methanol-0.1 mol·L⁻¹ ammonium acetate solution (81:19) at a flow rate of 0.8 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 210 nm, column temperature was maintained at 30 ℃. And the similarities of Pterocephali Herba from different places were compared. **Result:** The common mode of HPLC fingerprint of Tibetan medicine Pterocephali Herba was established according to the fingerprint similarity evaluation system of Pharmacopoeia Convention (2004A version), and 11 characteristic peaks were marked. The 10 groups of samples had high similarity. **Conclusion:** This method has good repeatability, precision, and stability, providing scientific basis for quality control of Pterocephali Herba.

[Key words] Tibetan medicine; Pterocephali Herba; HPLC; fingerprint

[收稿日期] 20130715(010)

[基金项目] 重庆市卫生局中医药科技项目(2010-1-139);中药新产品开发研究能力提升建设项目(cstc2012pt-kyys10004);《中国药典》一部标准研究项目(YS-262)

[第一作者] 张小梅,在读博士,副研究员,从事中药新药开发及物质基础研究, Tel:023-89029025, E-mail:605050963@qq.com

[通讯作者] *梁旭明,在读博士,副研究员,从事中药新药开发及质量标准研究工作, Tel:023-89029010, E-mail:609832205@qq.com

翼首草具有解毒除瘟、清热止痢、祛风通痹之功效^[1-5],主要成分为齐墩果烷型五环三萜皂苷类化合物,此外还含有生物碱、多糖等化学成分^[6]。由于产地多、药材采收混乱,且缺乏相应的质量控制手段,致使市场上的翼首草药材质量良莠不齐。现有《中国药典》标准和文献多以齐墩果酸和熊果酸为定性和定量指标对该药材进行质量评价^[1,3,7-9],而这 2 种成分并非翼首草独有,多种药用植物中也同时含这 2 种成分,故仅以齐墩果酸和熊果酸为定性和定量的标准缺乏专属性;另外有测定马钱苷^[10]、马钱子素^[11]的含量来控制其质量,但研究表明皂苷^[5]为翼首草的主要药效成分。尽管有报道分离得到了翼首草皂苷 A,B,C,D,但仍未能对其进行含量测定^[12],仅以翼首草皂苷 D 为对照品对翼首草进行了薄层鉴别^[13]。

作者在制定翼首草药材标准载入《中国药典》2010 年版后,采用高效液相色谱技术建立了翼首草药材的指纹图谱并对其进行了系统研究,测定了 10 批不同产地的翼首草药材,建立了翼首草指纹图谱共有模式,为翼首草的质量控制及科学评价,提供试验依据。

1 仪器与试剂

2695 型高效液相色谱仪(包括 Waters 2996 检测器,Waters Empower 化学工作站,美国 Waters 公司),AEG-45SM 型电子天平(1/10 万,日本岛津公司),BP121S 型电子天平(1/1 万,北京赛多利斯科学仪器有限公司)。

齐墩果酸(批号 110709-200505)、熊果酸(批号 110742-200516,纯度 ≥99.0%)均由中国食品药品检定研究院提供,甲醇为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯(重庆川东化工集团有限公司化学试剂厂)。

10 批翼首草为本院生药研究所研究人员收购或采自四川、西藏等地,采集时间多为 2008 年 7 月至 8 月,经重庆市中药研究院院长钟国跃研究员鉴定为川续断科植物匙叶翼首草 *Pterocephalus hookeri* 的干燥带根全草。样品来源见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Symmetry Shield Rp18 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相甲醇-0.1 mol·L⁻¹乙酸铵水溶液(81:19),检测波长 210 nm,柱温 30 ℃,流速 0.8 mL·min⁻¹,进样量 20 μL。

2.2 对照品溶液的制备 取齐墩果酸和熊果酸对照品适量,精密称定,加入甲醇溶解并制成质量浓度

表 1 翼首草药材来源、产地一览

批号	产地	采集时间 / 月	购买厂家
1	四川	7—8	甘孜州藏医院
2	四川	7—8	甘孜州藏医院
3	四川	开花期	道孚县
4	甘肃	7—8	青海卓玛藏中蒙药材行
5	四川	7—8	青海雪域中藏药材批发部
6	甘肃	7—8	青海亚朗中藏药材批发部
7	青海	7—8	西宁藏聚堂商贸公司
8	四川	7—8	西宁雪源药材有限公司
9	甘肃	7—8	青海九康中药销售部
10	四川	7—8	西宁九康中药饮片销售中心

约为 1 g·L⁻¹的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取翼首草粉末(过五号筛)5 g,精密称定,置具塞锥形瓶,加入乙醚 50 mL,超声处理(功率 250 W,频率 40 Hz)20 min,冷却,滤过,用少量乙醚润洗滤渣,合并滤液,蒸干,残渣加甲醇转移至 5 mL 量瓶,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密密度试验 取同一批翼首草药材(第 2 批),按 2.3 项下方法制备供试品溶液,连续进样 6 次,记录指纹图谱。结果,各主要色谱峰峰面积积分值和相对保留时间,其 RSD 分别为 1.2% ~ 2.9%,0.04% ~ 0.1%,表明该仪器精密密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取同一批翼首草药材(第 2 批),按 2.3 项下方法制备供试品溶液,分别在 0,4,8,12,16,24 h 记录指纹图谱。结果,各主要色谱峰峰面积积分值和相对保留时间,其 RSD 分别为 1.2% ~ 2.1%,0.2% ~ 0.4%,说明样品在 24 h 内稳定。

2.4.3 重复性试验 取同一批翼首草药材(第 2 批),按 2.3 项下方法制备供试品溶液,平行操作制备 6 份,分别记录指纹图谱。结果,各主要色谱峰峰面积积分值和相对保留时间,其 RSD 分别为 1.5% ~ 2.9%,0.07% ~ 0.1%,说明重复性良好。

2.5 翼首草指纹图谱共有模式的建立 取 10 批翼首草样品,分别按 2.3 项下方法制备供试品溶液,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)”,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 11 个共有峰。齐墩果酸和熊果酸对照品的 HPLC 图见图 1;10 批翼首草药材的 HPLC

指纹图谱叠加图见图 2;指纹图谱的共有模式见图 3。

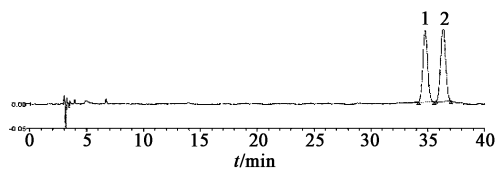


图 1 齐墩果酸(1)和熊果酸(2)对照品 HPLC

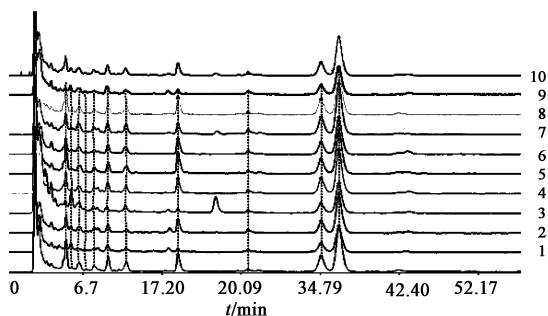


图 2 10 批翼首草药材 HPLC 指纹谱叠加

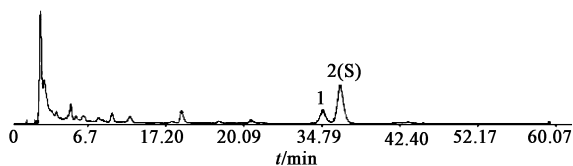


图 3 翼甘草指纹图谱共有模式

2.6 相似度分析 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 10 批样品的相似度。结果表明,不同产地样品的相似度均较高,10 批样品的相似度分别为 0.993, 0.975, 0.995, 0.932, 0.996, 0.991, 0.992, 0.995, 0.993, 0.981。选择 11 号峰为内参照峰,分别计算 10 批样品 11 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 2。由表 2 可知,不同产地样品各共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 1.39%,而相对峰面积的 RSD 却差别较大。

3 讨论

3.1 流动相和色谱柱的选择 考察了甲醇-0.1 mol·L⁻¹乙酸铵水溶液、乙腈-0.1 mol·L⁻¹乙酸铵水溶液、甲醇-乙腈-0.1 mol·L⁻¹乙酸铵水溶液、乙腈-水、乙腈-0.2% 乙酸水溶液、乙腈-0.1% 磷酸水溶液等流动相的梯度洗脱;除了乙腈-水,乙腈-磷酸水洗脱时基线较平,其他梯度洗脱基线不稳。熊果酸与齐墩果酸为翼首草已知有效成分,可以作为参照物,但其结构互为同分异构体,较难分离。仅甲醇与 0.1 mol·L⁻¹乙酸铵水溶液的等度洗脱,色谱峰之间才能较好地分离。

表 2 10 批翼首草共有峰的相对保留时间和峰面积

共有峰	相对保留时间		相对峰面积	
	平均值	RSD/%	平均值	RSD/%
1	0.185	0.2	0.171	54.1
2	0.200	0.4	0.066	95.4
3	0.223	1.1	0.093	35.9
4	0.244	0.5	0.011	37.3
5	0.267	1.3	0.061	15.6
6	0.310	0.1	0.109	16.1
7	0.364	0.2	0.103	25.0
8	0.519	0.4	0.140	52.4
9	0.729	0.2	0.045	39.5
10	0.947	0.1	0.317	5.4
11	1.000	0.0	1.000	0.0

考察了 Boston Symmetrix ODS-R(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Boston Symmetrix ODS-AQ(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Waters Nova-Pak C₁₈ WAT086344(3.9 mm × 150 mm, 4 μm), Welcrom C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Venusil MP C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Ultimate MP C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Boston Luna Clone(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Phenomenex Gemini C₁₈ 110A(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Inertsil(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 等色谱柱,结果,由于熊果酸与齐墩果酸互为同分异构体,在以上色谱柱的考察中发现较少有色谱柱能很好的分开齐墩果酸和熊果酸,特别是分离度和拖尾因子都能达到要求的较少。采用色谱柱 Boston Symmetrix ODS-R(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.1 mol·L⁻¹乙酸铵溶液(81:19)所测成分齐墩果酸和熊果酸的分离度、拖尾因子及分析时间能得到满意的结果。

3.2 检测波长、柱温及流速的选择 考察了翼首草供试品溶液在波长(205, 210, 215, 220 nm)下,柱温(25, 30, 35 °C),流速(1.0, 0.8 mL·min⁻¹)的色谱图及结果,翼首草药材中主要含皂苷类成分,其最大吸收波长一般在 200 nm 波长左右,本实验采用 HPLC 法结合紫外分光光度法,选择检测波长 210 nm,流速 0.8 mL·min⁻¹,柱温 30 °C。

3.3 供试品溶液制备方法的考察 对翼首草粉末进行了不同提取溶媒(甲醇、95% 乙醇、无水乙醇、乙醚、乙酸乙酯、三氯甲烷)、溶解样品的溶剂[甲醇、无水乙醇-乙酸乙酯(2:1)]、粉碎度(分别过二、三、四、五号筛)、提取方法(超声提取法、回流提取

法)、超声时间(功率 250 W, 频率 40 KHz, 10, 20, 30, 40 min)、提取溶媒用量(乙醚 25, 50, 75, 100 mL)、定容体积等因素进行了考察。结果确定提取方法为:取翼首草粉末(过五号筛)5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 分别加入乙醚 50 mL, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 KHz)20 min, 冷却, 滤过, 用少量乙醚润洗滤渣, 合并滤液, 蒸干, 分别加甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过即得。

3.4 数据结果分析 本研究仅以位于 37 min 的 11 号峰为内参照峰进行计算, 该成分在各批药材中的含量均较高且分离良好。实验采用 HPLC 对 10 批翼首草药材进行了测定, 10 批药材有 11 个共有峰, 分离效果好, 且各色谱峰保留时间相当稳定, 所建立的指纹图谱具有可控性。由图 2 可见, 10 批药材指纹图谱特征峰基本一致; 表 2 显示, 不同方法所得相似度结果趋于一致, 相似度均在 0.95 以上, 说明翼首草药材质量稳定。本研究建立的翼首草指纹图谱相对于单一成分的质量控制和模式具有较好的专属性, 分析时间控制在 60 min 以内, 符合指纹图谱的技术标准要求。本研究结果可为翼首草的质量控制提供一定的科学依据。

3.5 对藏族药翼首草药材质量评价的思考 藏族药翼首草药材在 1977 年首次载入《中国药典》后, 于 2010 年再次载入《中国药典》, 证明该药材疗效确切, 应用广泛。作者曾经就翼首草的成分进行过分离, 发现翼首草的提取物再加水时呈现出与一般浸膏不一样的状态, 很难分离, 或许这是翼首草皂苷类成分分离难以得到的较大因素, 也是翼首草药材以有效成分来评价其质量的一个瓶颈, 仍是翼首草质量评价亟待解决的一大难题, 同时也是翼首草总皂苷指纹图谱在分离上的一大困难, 有待学者们进一步研究。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国中医药科技出版社, 2010: 358.
- [2] 张小梅, 梁旭明, 孙冠芸, 等. HPLC 测定不同批次、不同产地翼首草中齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(12): 1125.
- [3] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草·藏药卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 366.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准(藏药). 第一册[S]. 1995: 138.
- [5] 关昕璐, 阎玉凝, 魏大明, 等. 翼首草的抗炎作用与急毒实验研究[J]. 北京中医药大学学报, 2004, 27(2): 71.
- [6] 张小梅, 杨荣平, 励娜, 等. 藏药翼首草薄层鉴别方法研究[J]. 天然产物开发与研究, 2012, 24(增刊): 74.
- [7] 冯瑜娟, 张艺. HPLC-ELSD 法测定藏药翼首草中齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 成都中医药大学学报, 2007, 30(3): 54.
- [8] 邓科君, 张勇, 杨宝寿, 等. RP-HPLC 法测定藏药翼首草中齐墩果酸与熊果酸的含量[C]. 深圳: 药用植物化学与中药有效成分分析研讨会论文集(上), 2008: 16.
- [9] 张小梅, 梁旭明, 励娜, 等. 高效液相色谱法测定翼首草不同药用部位齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(2): 155.
- [10] 谭德, 古锐, 张艺, 等. HPLC 测定藏药翼首草中马钱苷的含量[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(24): 3472.
- [11] 李文军. 藏药翼首草的化学成份及品质评价研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2001: 33.
- [12] Tian J, Wu F E, Qiu M H, et al. Triterpenoid saponins from *Pterocephalus hookeri* [J]. Phytochem, 1993, 32(6): 1535.
- [13] 关昕璐, 阎玉凝, 任子和, 等. 翼首草的鉴别研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(11): 1027.

[责任编辑 顾雪竹]