

假茼蒿 HPLC 指纹图谱

马雯芳, 唐玉荣, 谢凤凤, 蔡毅*
(广西中医药大学药学院, 南宁 530001)

[摘要] 目的:建立假茼蒿药材 HPLC 指纹图谱,对多批次药材进行质量控制。方法:采用 Phenomenex C₁₈ ODS2 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相梯度洗脱,流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 328 nm,柱温 30 ℃;建立假茼蒿药材 HPLC 指纹图谱,对 13 批药材进行相似度评价,并进行聚类分析。结果:假茼蒿药材 HPLC 指纹图谱精密性、重复性和稳定性均较好;13 批假茼蒿指纹图谱相似度 >0.97;对 13 批药材进行聚类分析,总共可聚为 4 类。结论:将 HPLC 指纹图谱与聚类分析相结合,可对假茼蒿进行质量评价,可为质量控制提供参考。

[关键词] 假茼蒿; 高效液相; 指纹图谱; 聚类分析

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)10-0076-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016100076

HPLC Fingerprint of *Crassocephalum crepidioides*

MA Wen-fang, TANG Yu-rong, XIE Feng-feng, CAI Yi*

(College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the HPLC fingerprint chromatogram of *Crassocephalum crepidioides* coupled with chemometrics means for the quality control of multi-batches of medicinal material. **Method:** The separation was developed on C₁₈ column (Phenomenex, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm) by gradient elution with acetonitrile-water (both containing 0.1% phosphoric acid) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, the detection wavelength at 328 nm and column temperature at 30 ℃. The HPLC fingerprint chromatogram of *C. crepidioides* was set up. The quality of 13 batches of medicinal material was evaluated by similarity assay as well as cluster analysis. **Result:** The establish HPLC fingerprint chromatogram of *C. crepidioides* was specific, precise, reproducible and stable. The similarities of 13 batches of *C. crepidioides* were more than 0.97. Further cluster analysis was carried out for the quality consistency of 13 batches of *C. crepidioides* and accordingly they were divided into 4 clusters. **Conclusion:** With the cluster analysis, the HPLC fingerprint chromatogram *C. crepidioides* provides a method for quality control of *C. crepidioides*.

[Key words] *Crassocephalum crepidioides*; HPLC; fingerprint; cluster analysis

假茼蒿,又称野茼蒿、革命菜、安南草等,是土地革命时期常用的野菜,同时具有药用及食用价值,是一味常用的壮族药^[1-2],《中药大辞典》、《全国中草药名鉴》等中均有记载,其性辛,平,具有通利水道、消肿、清热解毒的功效,可用于水肿、淋证、痢疾、伤

风发热、咽喉肿痛等病证^[3]。现代研究表明其具有清除自由基活性和保肝作用^[4],临床用于治疗泌尿系结石具有较好的疗效^[5],但目前对其化学成分及质量控制的相关研究较少,曾祥燕等^[6]对其植物形态、药材性状、显微特征、薄层特征进行鉴别研究,为

[收稿日期] 20151201(007)

[基金项目] 广西壮瑶药重点实验室项目(桂科基字[2014]32号);壮瑶药协同创新中心项目(桂教科研[2013]20号);广西重点学科(壮药学)项目(桂教科研[2013]16号);《广西壮药质量标准(第三卷)》质量评价与标准研究项目(MZY 2013016)

[第一作者] 马雯芳,博士,讲师,从事中药品种、品质研究, Tel:0771-4953513, E-mail: alswen@163.com

[通讯作者] *蔡毅,教授,从事中药品种鉴定与质量评价, Tel:0771-4953513, E-mail: caiyi118@163.com

其质量标准制定奠定基础。指纹图谱能标示药材中某类或数类成分,具有特征性和稳定性的特点,通过指纹图谱的特征性,能有效鉴别样品的真伪,全面、综合地反应和控制中药或者天然药物的质量^[7],2002 年国家药品监督管理局要求所有申报的中药注射剂都要有相关的指纹图谱资料,并以注射剂为突破口,逐步实现中药、民族药的现代质量标准化^[8],在中药质量控制中有广泛的使用^[9-11]。至今未见有对假茛蒿进行指纹图谱研究的相关报道。不同产地、气候、生态环境对假茛蒿的成分有较大影响,可使其次生代谢产物的生成与积累发生较大差异,本文采用 HPLC 法分析广西各地多批次假茛蒿药材,建立其 HPLC 指纹图谱并采用聚类分析方法进行模式识别,可较全面反映假茛蒿中化学成分信息,为该药材质量评价提供依据。

1 材料

1260 系列高效液相色谱仪[在线真空脱气机(G-1322A),高压四元泵(G-1313A),二极管阵列检测器,Agilent1260 series 色谱工作站,美国 Agilent]。

绿原酸对照品(供含量测定用,中国食品药品检定研究院,批号 110842-201106);假茛蒿药材分别采于广西各地,共 13 个批次,经广西中医药大学中药鉴定教研室蔡毅教授鉴定为菊科植物野茛蒿 *Crassocephalum crepidioides* 的全草。乙腈色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸对照品适量(2.26 mg),置 10 mL 量瓶中,用适量甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度为 0.226 0 g · L⁻¹ 的对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 取假茛蒿药材干燥粉末约 1 g,精密称定,精密加入 70% 甲醇 25 mL 称重,超声提取 90 min,放冷至室温,用 70% 甲醇补重,滤过,13 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,取续滤液,即得。

2.3 色谱条件 Phenomenex C₁₈ ODS2 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸水梯度洗脱(0 ~ 8 min, 5% ~ 10% 乙腈; 8 ~ 48 min, 10% ~ 20% 乙腈; 48 ~ 60 min, 20% 乙腈; 60 ~ 80 min, 20% ~ 45% 乙腈; 80 ~ 100 min, 45% 乙腈),检测波长 328 nm,柱温 30 °C,流速 1 mL · min⁻¹,进样量 10 μL。

2.4 方法学考察

2.4.1 空白试验 精密吸取甲醇溶液 10 μL 注入液相色谱仪,按 2.3 项下色谱条件进行测定。结果

表明,空白溶液对测定结果无干扰。

2.4.2 精密度试验 精密称取假茛蒿供试品(S5) 1 g,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,在 2.3 项下的色谱条件测定,连续进样 6 次,记录图谱。结果各色谱峰的相对保留时间 RSD 在 0.03% ~ 0.1%,各峰相对峰面积 RSD 为 0.2% ~ 1.1%,表明仪器的精密度良好。

2.4.3 重复性试验 精密称定假茛蒿供试品(S5) 1 g,6 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,在 2.3 项下的色谱条件测定。结果 6 份样品中各色谱峰相对保留时间的 RSD 在 0.06% ~ 0.3%,各峰相对峰面积 RSD 在 1.8% ~ 2.6%,均 < 3.0%,表明重复性良好,符合指纹图谱的要求。

2.4.4 稳定性试验 取假茛蒿供试品(S5) 1 g,制备后 0, 2, 4, 8, 16, 36 h 分别进样,考察样品溶液的稳定性。结果各色谱峰的相对保留时间 RSD 在 0.04% ~ 0.2%,各峰相对峰面积 RSD 在 0.1% ~ 2.8%,表明假茛蒿样品在 36 h 之内稳定性良好。

2.5 指纹图谱共有模式的建立及相似度分析 取 13 批各批次的假茛蒿药材粉末 1 g,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,在 2.3 项下的色谱条件依次进样测定,记录 13 批次假茛蒿 HPLC 色谱图。根据 13 批供试品溶液 HPLC 指纹图谱给出的数据,比较供试品图谱,其中 7 个峰是各批供试品所共有的,因此,确定这 7 个峰为 13 个不同批次假茛蒿药材的共有峰,并指认了 2 号峰为绿原酸,因绿原酸是假茛蒿药材的指标性成分之一,含量较高,较稳定,在各个不同批次的假茛蒿药材样品中均有此峰,确定其为参比峰,标号为 S。将 13 批假茛蒿色谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版),以 S5 药材的图谱为参照图谱,标定其中 7 个色谱峰为共有指纹峰,得到不同产地假茛蒿药材共有模式图谱,见图 1;以中位数法生成对照指纹图谱,见图 2。对图谱间的相似度进行评价,结果见表 1。

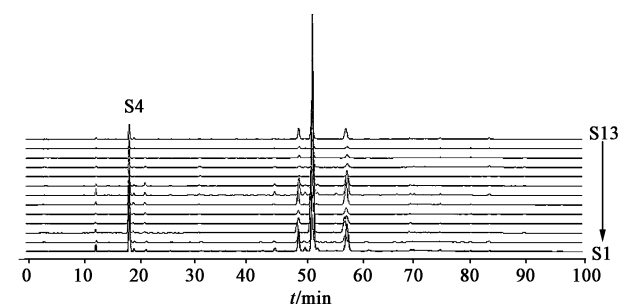


图 1 13 批假茛蒿药材 HPLC 指纹谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of 13 batches of *Crassocephalum crepidioides* Herba

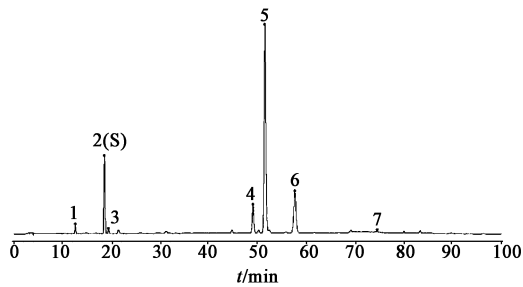


图 2 假茛蒿药材对照指纹谱

Fig. 2 Reference fingerprint of *Crassocephalum crepidioides*

表 1 假茛蒿药材相似度

Table 1 Similarity analysis of HPLC fingerprint of *Crassocephalum crepidioides*

No.	产地	采集时间	相似度
S1	南宁四塘	2013-11-02	0.997
S2	南宁武鸣腾翔村	2013-10-31	0.997
S3	扶绥县昌平乡中华村周府山	2013-11-04	0.991
S4	来宾金秀长垌乡大进村	2013-11-12	0.995
S5	来宾兴宾区凤凰镇牛角村	2013-11-06	0.992
S6	上思县在妙镇佛子村	2013-11-08	0.974
S7	玉林兴业石南镇七团村塘格晒谷岭	2013-11-30	0.995
S8	桂平江口镇长江村	2013-11-30	0.995
S9	上林古粉	2013-12-26	0.986
S10	柳州市沙塘镇江湾村	2014-01-18	0.997
S11	南宁老虎岭	2014-06-26	0.978
S12	玉林兴业石南镇七团村塘格	2014-09-15	0.993
S13	南宁老虎岭	2014-09-15	0.991

由结果可知,13 批不同产地假茛蒿指纹图谱的相似度均 > 0.97,地域差异不显著。

表 2 13 批假茛蒿药材共有峰相对峰面积

Table 2 Relative peak area of common peaks of 13 batches of *Crassocephalum crepidioides*

No.	1	3	4	5	6	7
S1	0.069	0.041	0.392	3.968	0.785	0.019
S2	0.069	0.041	0.392	3.968	0.785	0.019
S3	0.074	0.067	0.436	2.681	0.946	0.027
S4	0.129	0.127	0.856	4.584	1.740	0.042
S5	0.093	0.091	0.511	3.104	1.249	0.031
S6	0.125	0.140	1.071	4.596	2.449	0.059
S7	0.089	0.046	0.446	5.047	0.895	0.026
S8	0.121	0.094	0.662	6.598	2.189	0.033
S9	0.273	0.255	0.616	5.172	2.356	0.049
S10	0.192	0.136	0.398	5.757	1.561	0.046
S11	0.294	0.252	1.767	6.591	2.972	0.266
S12	0.15	0.118	0.942	3.762	1.204	0.118
S13	0.104	0.086	1.107	4.302	1.551	0.079

注:2 号峰均为 1。

2.6 聚类分析 对 13 批假茛蒿药材进行聚类分析,采用组间连接法、Euclidean 距离作为测量的距离变量,13 批假茛蒿可聚为 4 类,S1,S7 聚为一类;S2,S13 聚为一类;S3,S6,S8 聚为一类;S4,S5(对照药材),S9 ~ S12 聚为一类。

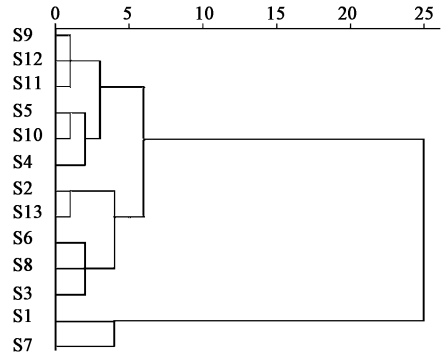


图 3 13 批假茛蒿药材聚类树状关系

Fig. 3 Clustering analysis of fingerprint of 13 batches of *Crassocephalum crepidioides*

3 讨论

比较了乙酸乙酯,100% 甲醇,70% 甲醇,50% 甲醇,30% 甲醇等提取溶剂,结果表明以 70% 甲醇为提取溶剂时,峰分离度好,提取所得含量也较高,峰高较高,整体基线好。比较了超声、回流 2 种提取方法,结果以超声提取各峰面积较大,峰高较高。还考察了超声时间长短、溶剂用量等,最终确定的样品制备方法为样品中加入 70% 甲醇 25 mL 超声处理 90 min。

考察了 Diamonsil C₁₈(2)(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Welch C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Phenomenex C₁₈ODS2(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 3 种色谱柱,3 个色谱柱中各峰的分离效果以 Phenomenex C₁₈ODS2 柱较好。流动相比较了乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸水溶液 2 个流动相系统进行梯度洗脱,结果以乙腈-0.1% 磷酸水溶液梯度洗脱时,基线相对比较稳定,出峰时间适宜,峰型对称度好。还对吸收波长进行了考察,最终选定 328 nm 作为检测波长。

聚类分析是根据相似程度大小把样品归类,目前在中药的真伪鉴别、质量评价、品种分类等方面有较多的应用^[12-15]。本文对 13 批假茛蒿药材进行聚类分析,共分为 4 类,S1,S7 因绿原酸峰面积明显高于其他 3 类而分为一类;S2,S13 均在南宁采收,且各峰面积相近,故分为同一类;S3,S6,S8 因 52,58 min 两处的峰面积相近且明显高于其他 3 类而分为同一类;S4,S5,S9 ~ S12,由于绿原酸峰面积均较

低,且其他各峰面积也不高聚为一类。结合相似度评价结果,13 批药材的相似度均 >0.97 ,表明不同批次假茺蒿药材质量较为稳定,成分组成差异性不大,但药材成分含量差异较大,聚类分析结果将 13 批假茺蒿分为 4 类,可能假茺蒿质量与生长环境、贮藏方法等有关,各成分与药材质量之间的具体关系如何尚未见有报道,有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编写委员会. 中华本草. 第 7 册 [M]. 上海:上海科技出版社,1999:792-793.

[2] 朱华,蔡毅. 中国壮药原色图谱 [M]. 南宁:广西民族出版社,2003:158.

[3] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区壮药质量标准. 第 2 卷 [S]. 南宁:广西科学技术出版社,2011:134.

[4] 胡军影. 野茺蒿的自由基清除活性和保肝作用 [J]. 国外医药:植物药分册,2005,20(6):260-261.

[5] 陈元. 假茺蒿治疗泌尿系结石 [J]. 中国民族民间医药杂志,2003(3):181.

[6] 曾祥燕,颜萍花,蔡毅,等. 壮药假茺蒿生药学研究 [J]. 时珍国医国药,2016,27(1):115-117.

[7] 曾建红,徐刚标,何川. 色谱指纹图谱在中药材质量控制中的应用进展 [J]. 时珍国医国药,2012,23(6):1501-1502.

[8] 杨颂,刘文,王群,等. 中药指纹图谱的研究进展 [J]. 贵阳中医学院学报,2012,34(4):21-24.

[9] 陈妍,姚志红,戴毅,等. 白花蛇舌草药材的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中药材,2012,35(6):886-892.

[10] 田成旺,张铁军,蒋伶活. 藏茵陈 HPLC 指纹图谱及模式识别研究 [J]. 中国药学杂志,2013,48(18):1545-1549.

[11] 宋潇,谢昭明,黄丹,等. 茯苓 HPLC 指纹图谱及化学模式识别 [J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(17):36-39.

[12] 朱晓勤,尹莲. 化学模式识别在中药分类和质量评价中的应用 [J]. 中华中医药学刊,2007,25(10):2111-2114.

[13] 黄琪,黄彩虹,雷鹏,等. 地锦草药材 HPLC 指纹图谱及模式识别研究 [J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(12):95-98.

[14] 潘伟东,杜义龙,赵胜男,等. 韩信草的高效液相色谱指纹图谱及化学模式识别 [J]. 药物分析杂志,2015,35(2):250-254.

[15] 吴玲芳,林琛,袁永兵,等. 叶下珠指纹图谱及模式识别研究 [J]. 中草药,2015,46(4):572-575.

[责任编辑 顾雪竹]