

伸筋草药材 UPLC 指纹图谱的鉴别研究

杨焱, 王祥培*, 孙庆文, 徐锋
(贵阳中医学院, 贵阳 550002)

[摘要] **目的:** 建立伸筋草药材的超高效液相特征性指纹图谱鉴别方法, 为有效控制和科学评价伸筋草药材质量提供依据。**方法:** 采用 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 流动相甲醇-乙腈(1:1)-0.05% 磷酸水, 梯度洗脱, 检测波长 256 nm, 流速 0.1 mL·min⁻¹, 测定 10 批伸筋草药材及混淆品的指纹图谱, 并作相似度比较分析。**结果:** 建立了伸筋草药材 UPLC 特征指纹图谱共有模式, 标定了 19 个共有峰, 10 批伸筋草药材的相似度为 0.923~0.985, 而与混淆品的指纹图谱比较, 结果具有明显差异。**结论:** 方法快速、高效, 可用于伸筋草药材的质量评价。

[关键词] 伸筋草; 超高效液相色谱; 指纹图谱; 鉴别

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0117-04

[doi] 10.11653/syfy2013150117

Identification of Lycopodii Herba by UPLC Fingerprint

YANG Ye, WANG Xiang-pei*, SUN Qing-wen, XU Feng

(Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a UPLC and develop an UPLC fingerprint for the identification of Lycopodii Herba for controlling the drug quality quickly and accurately. **Method:** The UPLC fingerprint of ten batches of Lycopodii Herba and adulterants were determined on an Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) column eluted with the mobile phase consisted of methanol-acetonitrile (1:1) -water containing 0.05% phosphoric acid in gradient mode and the detection wavelength was at 256 nm, the flow rate of 0.1 mL·min⁻¹. **Result:** The method of HPLC fingerprints was established and the 19 mutual peaks were indicated. The similar degrees of the ten batches were between 0.923-0.985. The similarities among the Lycopodii Herba and adulterants from different sources were obtained, there were apparent difference in fingerprint. **Conclusion:** The method is quick and accurate. The UPLC fingerprint of Lycopodii Herba with high specificity can be used to control the quality of Lycopodii Herba.

[Key words] Lycopodii Herba; UPLC; fingerprint; identification

伸筋草为石松科植物石松的干燥全草。性温, 味微苦、辛, 具有祛风除湿、舒筋活络的功效, 在临床上用于关节疼痛, 屈伸不利等症^[1]。药理研究表明

伸筋草具有抗炎镇痛、调节免疫、治疗矽肺等作用^[2]。在广东、广西、江西、云南、浙江、四川等地区常将同科同属植物玉柏石松 *L. obscurum* L.、垂穗石松 *L. cernuum* L.、地刷子石松 *L. complanatum* L. 和石子藤石松 *L. casuarinoides* Spring 的干燥全草混作伸筋草药用^[3-5], 由于性状相似, 难以分辨, 并且化学组分复杂^[6-9], 现有的形态鉴别等^[3-5]方法难以对伸筋草药材的品种及质量进行较为完整的评价。中药指纹图谱技术能够标示其特征的共有峰图谱, 借以辨别真伪、评价原料药材、半成品以及成品质量的均一性和稳定性^[10-11]。因此, 本文采用 UPLC 新型色谱分离分析技术建立了伸筋草药材的 UPLC 指纹

[收稿日期] 20130116(012)

[基金项目] 贵州省优秀科技教育人才省长专项基金(黔省专合字[2011]60号)

[第一作者] 杨焱, 硕士, 从事中药、民族药的品种鉴定与质量控制研究

[通讯作者] * 王祥培, 教授, 博士, 从事中药、民族药的品种鉴定与质量控制研究, Tel: 13809494182, E-mail: wxp0123@126.com

图谱分析方法,为高效、快速地评价伸筋草药材的质量提供参考。

1 仪器与试剂

Agilent 1290 型超高效液相色谱仪(配有二极管阵列检测器,四元泵溶剂洗脱系统、柱温箱、自动进样器),AL204-IC 型 1/万天平(METTLER TOLEDO 仪器有限公司),HS-10260T 型超声波清洗机(天津市恒奥科技发展有限公司),HH-6 型数显恒温水浴锅(常州澳华仪器有限公司)。《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版》(国家药典委员会),甲醇、乙

腈为色谱纯(美国 TEDIA),其余试剂均为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

伸筋草药材共 10 份样品,经贵阳中医学院王祥培教授鉴定为石松科植物石松 *Lycopodium japonicum* Thunb. 的干燥全草。伸筋草混淆品经贵阳中医学院王祥培教授鉴定,分别为石松科植物玉柏石松 *L. obscurum* L.、垂穗石松 *L. cernuum* L.、地刷子石松 *L. complanatum* L.、石子藤石松 *L. casuarinoides* Spring 的干燥全草。具体来源见表 1。

表 1 伸筋草与混淆品的相似度

No.	样品	药材名	来源	收集时间	相似度
S1	伸筋草	石松 <i>L. japonicum</i>	贵州龙里湾寨乡	2012-07	0.923
S2	伸筋草	石松 <i>L. japonicum</i>	河南郑州仝禧堂药店	2012-08	0.949
S3	伸筋草	石松 <i>L. japonicum</i>	贵州贵阳同仁堂药店	2012-12	0.977
S4	伸筋草	石松 <i>L. japonicum</i>	贵州贵阳花果园药材市场	2012-12	0.944
S5	伸筋草	石松 <i>L. japonicum</i>	河南郑州济仁堂大药房	2012-12	0.919
S6	伸筋草	石松 <i>L. japonicum</i>	湖南长沙青苹果健康药房	2012-06	0.985
S7	伸筋草	石松 <i>L. japonicum</i>	重庆华西健康药房	2012-12	0.948
S8	伸筋草	石松 <i>L. japonicum</i>	重庆万和大药房(1)	2012-12	0.937
S9	伸筋草	石松 <i>L. japonicum</i>	重庆万和大药房(2)	2012-12	0.924
S10	伸筋草	石松 <i>L. japonicum</i>	四川成都杏林大药房	2012-07	0.930
S11	伸筋草混淆品	玉柏石松 <i>L. obscurum</i>	贵州贵阳三江农场	2012-07	0.859
S12	伸筋草混淆品	垂穗石松 <i>L. cernuum</i>	广西宜州永定村	2012-10	0.691
S13	伸筋草混淆品	垂穗石松 <i>L. cernuum</i>	贵州龙里湾寨乡	2012-07	0.642
S14	伸筋草混淆品	地刷子石松 <i>L. complanatum</i>	贵州龙里湾寨乡	2012-07	0.614
S15	伸筋草混淆品	地刷子石松 <i>L. complanatum</i>	贵州贵阳万东桥药材市场	2012-12	0.493
S16	伸筋草混淆品	石子藤石松 <i>L. casuarinoides</i>	贵州龙里湾寨乡	2012-07	0.481

2 方法与结果^[12-13]

2.1 色谱条件 采用 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) 色谱柱,流动相 A 为甲醇-乙腈(1:1),B 为 0.05% 磷酸水溶液,梯度洗脱(0~3 min,1% A;3~5.5 min,1% A~10% A;5.5~8 min,10% A~25% A;8~16 min,25% A~30% A;16~18 min,30% A~50% A;18~23 min,50% A~80% A;23~28 min,80% A~100% A;28~35 min,100% A)。流速 0.1 mL·min⁻¹,检测波长 256 nm,柱温 15℃,进样量 0.5 μL。

2.2 空白溶液的制备 取 50% 甲醇,用微孔滤膜(0.22 μm)滤过,取续滤液,即得。

2.3 供试品溶液的制备 精确称取样品粉末 1.0 g,置锥形瓶中,加 70% 乙醇 50 mL,超声提取 45 min,滤过,药渣加 70% 乙醇 50 mL,超声提取 45 min,滤过,合并滤液。滤液置蒸发皿中挥干,残渣加 50% 甲醇溶解并定容至 10 mL,用微孔滤膜(0.22 μm)滤过,取续滤液,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 空白试验 精密吸取空白溶液 0.5 μL,注入超高效液相色谱仪,按规定的梯度条件洗脱,结果表明空白不干扰测定。

2.4.2 精密度试验 取同一供试品溶液,按 2.1 项下的色谱测试条件连续进样 6 次,结果显示各共有峰与参比峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%,表明仪器精密度良好,符合指纹图谱要求。

2.4.3 稳定性试验 取同一供试品溶液,按 2.1 项下的色谱测试条件分别在 0,3,6,11,18 h 进样测定,结果显示各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%,表明样品溶液在 18 h 内稳定。

2.4.4 重复性试验 取同一批样品 6 份,按 2.2 项下操作制备供试品溶液,按 2.1 项下的色谱测试条件进样分析,结果显示各共有峰与参比峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%,表明该方法重复性良好。

2.5 指纹图谱建立 按 2.1 项下的色谱条件对供试品溶液进行检测。测得的所有供试品 UPLC 的色谱指纹图谱(图 1,2)。伸筋草药材色谱指纹图谱以保留时间约为 11.508 min 的 12 号峰作为参照峰 S,对各批次伸筋草药材的指纹图谱进行考察,确定了 19 个共有峰(图 1,表 2)。并对各色谱峰的相对保留时间及相对峰面积进行了计算(表 2,3)。

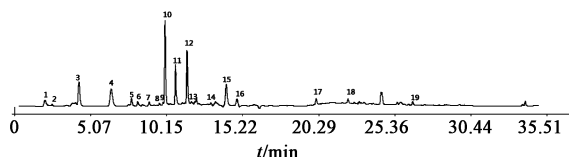


图 1 伸筋草药材 UPLC 指纹

2.6 指纹图谱分析

2.6.1 伸筋草指纹图谱相似度评价 分别将收集

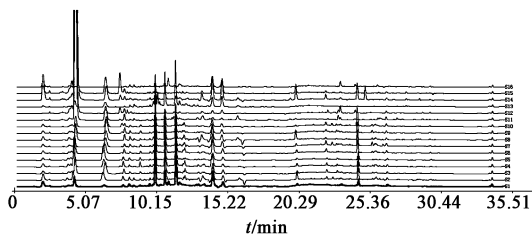


图 2 伸筋草药材与混淆品的 UPLC 指纹

的伸筋草样品的色谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004 年 A 版软件,考察色谱峰相似度的一致性。见表 1。

2.6.2 伸筋草药材与混淆品的指纹图谱比较 从伸筋草药材与混淆品的指纹图谱中,可以看出色谱指纹图谱明显不同,其共有峰数目、位置(相对保留时间)有差异。见表 2。

表 2 伸筋草药材与混淆品 UPLC 指纹图谱的相对保留时间

共有峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16
1	0.175 7	0.176 1	0.176 2	0.176 3	0.176 0	0.176 4	0.176 7	0.176 9	0.176 6	0.177 1	0.178 1	0.175 4	0.174 2	0.176 2	0.174 5	0.176 4
2	0.218 5	0.217 1	0.218 0	0.217 7	0.217 6	0.217 4	0.217 1	0.218 0	0.217 8	0.217 7	-	0.217 3	0.216 7	0.217 3	0.215 6	0.218 3
3	0.372 1	0.361 9	0.375 5	0.369 1	0.367 0	0.373 2	0.374 0	0.380 2	0.379 5	0.379 9	0.375 0	0.376 2	0.376 4	0.379 3	0.373 4	-
4	0.555 3	0.547 3	0.561 3	0.553 7	0.550 0	0.560 7	0.564 9	0.568 3	0.571 2	0.570 6	0.563 6	0.564 0	0.563 4	0.567 4	0.560 1	-
5	0.672 9	0.670 5	0.677 4	0.674 4	0.672 5	0.679 7	0.681 6	0.682 9	0.683 6	0.684 3	0.683 2	0.680 3	0.680 0	0.681 2	0.676 4	0.691 0
6	0.710 8	0.709 7	0.713 5	0.712 6	0.711 0	0.715 6	0.716 4	0.717 2	0.717 3	0.718 3	0.717 2	0.715 0	0.720 5	-	-	0.717 0
7	0.777 4	0.777 2	0.778 9	0.778 8	0.777 6	0.781 0	0.781 9	0.781 6	0.782 7	0.783 6	-	-	-	-	-	0.788 9
8	0.838 1	0.838 0	0.838 5	0.840 0	0.838 4	0.840 5	0.840 1	0.840 5	0.839 7	0.840 6	0.841 8	-	-	0.837 6	0.833 7	0.840 7
9	0.859 9	0.859 6	0.860 2	0.861 6	0.859 8	0.861 7	0.861 2	0.861 7	0.861 2	0.862 1	0.862 9	0.853 3	0.853 0	0.858 9	0.854 9	-
10	0.870 9	0.870 7	0.871 4	0.872 6	0.871 0	0.873 0	0.872 6	0.873 2	0.872 8	0.873 7	0.874 6	0.871 2	0.871 4	0.870 4	0.866 3	0.873 8
11	0.932 1	0.932 1	0.932 2	0.933 6	0.932 3	0.933 3	0.932 7	0.933 1	0.932 9	0.933 7	0.934 4	0.930 7	0.930 5	0.930 1	0.926 0	0.933 8
12(s)	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0
13	1.022 8	1.022 0	1.022 3	1.031 7	1.022 4	1.024 1	1.024 0	1.024 3	1.024 3	1.024 8	1.025 4	1.019 4	1.020 1	1.019 8	1.015 6	-
14	1.139 6	1.138 1	1.138 9	1.140 0	1.138 7	1.138 8	1.136 8	1.136 2	1.136 1	1.135 3	1.138 0	1.132 4	1.133 1	1.132 8	1.127 8	1.137 5
15	1.228 6	1.226 8	1.227 3	1.226 2	1.227 7	1.228 5	1.227 4	1.227 3	1.226 9	1.226 8	1.229 5	1.226 4	1.224 2	1.223 9	1.218 1	1.228 6
16	1.291 5	1.289 3	1.290 3	1.291 9	1.290 3	1.289 7	1.287 9	1.286 9	1.286 7	1.286 0	1.289 2	1.282 5	1.283 3	1.283 2	1.277 0	1.287 8
17	1.751 6	1.746 5	1.749 6	1.752 0	1.749 3	1.747 9	1.746 0	1.745 3	1.745 6	1.745 3	1.748 0	1.740 8	1.739 9	1.739 7	1.730 6	-
18	1.935 3	1.931 0	1.932 6	1.936 4	1.933 3	1.931 5	1.930 9	1.932 6	1.932 6	1.932 5	-	1.939 2	1.938 1	1.924 6	1.915 0	1.948 7
19	2.309 9	2.304 8	2.306 4	2.312 1	2.307 6	2.305 6	2.305 6	2.308 5	2.307 5	2.308 1	-	2.300 4	2.298 9	2.300 5	2.288 5	2.330 6

3 讨论

对不同体积分数的甲醇与乙醇并采用回流提取和超声提取进行考察发现,70% 乙醇超声提取效率高且色谱峰多。还对超声提取中不同提取时间,不同提取次数进行比较,结果表明 70% 乙醇提取 2 次(45,45 min)后基本完全。故拟定上述供试品的制备方法。

考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-醋酸水和乙腈-醋酸水、甲醇-磷酸水、乙腈-磷酸水、甲醇-乙腈(1:

1)-醋酸水、甲醇-乙腈(1:1)-磷酸水等流动相系统,结果发现甲醇-乙腈(1:1)-0.05% 磷酸水流动相系统,各峰的分度度较好,且基线平稳,有利于指纹图谱的分析;通过 Agilent DAD 多通道波长检测,结果表明 256 nm 检测波长信息量丰富,特征峰较明显,故选择 256 nm 作为本文的检测波长。Agilent 1290 超高效液相色谱仪的柱温箱具有恒温系统,故考察柱温分别为 15,20,22,25,30 ℃ 时对色谱峰分离度的影响,随着柱温的下降峰的分度度有所改善,且

表 3 伸筋草药材与混淆品 UPLC 指纹图谱的相对峰面积

共有峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16
1	0.268 3	0.408 7	0.157 0	0.096 9	0.165 3	0.160 2	0.288 3	0.243 1	0.399 0	0.232 5	0.048 8	0.212 7	0.936 8	9.702 2	9.217 9	4.177 3
2	0.021 6	0.027 0	0.024 6	0.012 3	0.037 0	0.025 8	0.035 6	0.036 3	0.092 1	0.029 1	-	0.101 9	1.589 5	0.389 0	1.821 2	0.183 9
3	0.390 1	0.457 1	0.846 0	0.677 9	0.445 6	0.832 7	0.471 5	0.842 5	1.051 9	0.818 8	0.187 4	84.801 4960.105 3188.433 7897.240 2	-	-	-	-
4	0.092 5	0.663 6	0.847 6	0.252 0	1.330 3	0.651 2	1.140 8	0.702 8	2.109 2	1.062 6	0.223 8	5.843 6	10.526 3	5.795 2	22.245 8	-
5	0.060 2	0.178 2	0.179 2	0.100 7	0.164 6	0.160 5	0.184 2	0.232 8	0.469 8	0.212 1	0.018 0	1.413 0	7.431 6	0.788 3	4.184 4	0.264 2
6	0.100 6	0.123 3	0.080 8	0.036 5	0.110 9	0.069 9	0.190 5	0.139 1	0.208 1	0.088 2	0.043 7	0.391 9	2.736 8	-	-	0.923 1
7	0.055 9	0.042 7	0.069 8	0.075 8	0.103 9	0.072 2	0.125 1	0.052 5	0.214 2	0.106 5	-	-	-	-	-	0.364 5
8	0.058 8	0.052 9	0.032 2	0.022 1	0.028 8	0.039 1	0.046 6	0.037 5	0.037 8	0.029 1	0.028 1	-	-	0.299 5	0.636 9	0.334 4
9	0.033 3	0.058 2	0.035 2	0.021 7	0.019 6	0.055 2	0.070 6	0.075 0	0.057 4	0.030 4	0.098 2	0.342 7	1.073 7	0.172 1	0.631 3	-
10	0.960 0	2.292 7	1.358 0	0.871 7	1.079 1	1.686 3	2.225 5	2.063 8	1.751 7	1.236 0	0.468 6	1.694 2	2.294 7	2.342 5	6.430 2	1.592 0
11	0.379 2	0.978 0	0.742 5	0.465 3	0.518 5	0.796 7	1.283 1	0.863 4	1.200 7	0.726 2	0.663 3	1.843 6	4.221 1	2.669 5	1.670 4	2.180 6
12(s)	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0
13	0.126 5	0.131 5	0.046 2	0.011 8	0.050 3	0.039 4	0.110 9	0.114 1	0.075 0	0.071 7	0.131 1	0.346 2	2.273 7	0.736 7	0.977 7	-
14	0.050 0	0.166 1	0.040 7	0.031 9	0.035 9	0.038 5	0.072 2	0.221 9	0.072 6	0.040 9	0.028 1	0.550 1	0.831 6	0.490 5	0.435 8	0.618 7
15	0.712 9	0.966 5	0.590 0	0.384 4	0.474 1	0.752 5	1.303 5	1.072 5	1.053 7	0.725 3	0.324 7	0.912 1	5.347 4	7.497 4	16.117 3	6.076 9
16	0.319 2	0.334 4	0.198 9	0.070 4	0.176 8	0.222 5	0.521 7	0.320 6	0.398 4	0.259 0	0.348 8	0.727 6	5.821 1	6.018 9	14.469 3	3.645 5
17	0.057 6	0.337 4	0.091 4	0.052 1	0.072 5	0.110 7	0.168 0	0.377 2	0.200 7	0.069 1	0.028 3	0.326 9	1.210 5	3.506 0	4.536 3	-
18	0.037 6	0.097 7	0.102 3	0.042 4	0.056 2	0.115 8	0.291 5	0.056 6	0.164 1	0.202 5	-	0.209 1	3.368 4	1.055 1	1.268 2	0.197 3
19	0.050 7	0.104 6	0.071 4	0.033 1	0.087 6	0.091 4	0.188 9	0.089 4	0.167 8	0.194 7	-	0.557 1	3.178 9	0.502 6	1.251 4	1.093 6

15 ℃ 时分离度已较好,故选择 15 ℃ 作为柱温。对不同体积流量(0.1,0.18,0.2 mL·min⁻¹)对色谱峰分离度的影响进行考察,发现 0.1 mL·min⁻¹分离度良好,压力适中。

对目前收集到的伸筋草药材与混淆品的研究表明,各批次伸筋草药材指纹图谱相似度较好并有 19 个共有峰,而伸筋草药材与混淆品的指纹图谱相似度却均 < 0.9,伸筋草药材与混淆品共有峰的个数也 ≤ 17 个,说明本文建立的超高效液相色谱指纹图谱与文献报道^[3-4]的比较,具有方法简便,操作性强、信息丰富等特点,可用于伸筋草药材的识别,为控制和评价伸筋草药材的整体质量提供依据。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:165.
 [2] 滕翠翠,何永志,王颖,等. 伸筋草化学成分及药理作用研究进展[J]. 医学综述,2008,14(20):47.
 [3] 冯倩茹,黄颖雅. 中药伸筋草与习用伸筋草的鉴别[J]. 医疗保健器具,2008,15(8):41.
 [4] 赵志远. 最新草药真伪鉴别实用大全[M]. 北京:中国电子音像出版社,2003:528.

[5] 南京中医药大学. 中药大辞典. 上册[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006:1138.
 [6] 滕翠翠,何永志,冯金磊,等. 伸筋草的化学成分研究[J]. 中草药,2010,41(12):1961.
 [7] 冯毅凡,郭晓玲,韩亮. 伸筋草挥发性成分 GC-MS 分析[J]. 广东药学院学报,2005,21(5):515.
 [8] 杨再波,钟才宁,孙成斌,等. 伸筋草挥发油成分的固相微萃取分析[J]. 中国医院药学杂志,2008,28(13):1067.
 [9] 卑占宇,黄志勤,丁治春,等. 火焰原子吸收光谱法对伸筋草中金属元素含量的测定分析[J]. 广东微量元素科学,2007,14(1):37.
 [10] 周玉新. 中药指纹图谱研究技术[M]. 北京:化学工业出版社,2003:131.
 [11] 洪筱坤. 中药数字化色谱指纹图谱[M]. 上海:上海科学技术出版社,2003:69.
 [12] 王祥培,孙宜春,靳风云,等. 芭蕉根 HPLC 指纹图谱鉴别研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(12):30.
 [13] 马培,许利嘉,刘延泽,等. 虎杖药材 UPLC 特征图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(2):72.

[责任编辑 邹晓翠]