

# 光石韦药材 HPLC 指纹图谱研究

黄艳<sup>1,2</sup>, 温幼敏<sup>3</sup>, 马军花<sup>3</sup>, 刘布鸣<sup>1,2\*</sup>, 陈露<sup>1,2</sup>, 陈明生<sup>1,2</sup>

(1. 广西中药质量标准研究重点实验室, 南宁 530022;

2. 广西中医药研究院, 南宁 530022; 3. 广西万通制药有限公司, 南宁 530003)

**[摘要]** 目的: 建立光石韦药材的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱, 评价与控制药材内在质量。方法: 采用 HPLC, 大连依利特 SinoChrom ODS-BP 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 乙腈-0.2% 磷酸水溶液梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 205 nm。结果: 检测了 10 批不同来源的光石韦药材, 确定 12 个色谱峰为共有峰, 建立了光石韦药材指纹图谱, 并计算各被测样品的 HPLC 指纹图谱的整体相似度。结论: 所建立的指纹图谱具有良好的精密度、稳定性、重复性, 可作为光石韦药材质量控制标准。

**[关键词]** 光石韦; 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(2013)11-0152-04

**[doi]** 10.11653/syfyj2013110152

## Study on HPLC fingerprint of *Pyrrosia calvata*

HUANG Yan<sup>1,2</sup>, WEN You-min<sup>3</sup>, MA Jun-hua<sup>3</sup>, LIU Bu-ming<sup>1,2\*</sup>, CHEN Lu<sup>1,2</sup>, CHEN Ming-sheng<sup>1,2</sup>

(1. Guangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards, Nanning 530022, China;

2. Guangxi Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Science, Nanning 530022, China;

3. Wantong Pharmaceutical Co. Ltd., Nanning 530003, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the fingerprint of *Pyrrosia calvata* for evaluating its quality by HPLC. **Method:** The HPLC analysis was carried out on SinoChrom ODS-BP (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with mobile phase of acetonitrile-0.2% phosphoric acid solution (gradient elution) at the flow of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, and the detection wavelength was 205 nm. **Result:** The established fingerprint of *P. calvata* was used to determine 10 batches of sample from different sources. 12 common peaks were confirmed as the character fingerprints through similarity analysis on the fingerprint of the *P. calvata*. **Conclusion:** The method has good precision, stability and reproducibility, providing a scientific base for controlling the quality of *P. calvata* by establishing fingerprint of the *P. calvata*.

**[Key words]** *Pyrrosia calvata*; HPLC; fingerprint

光石韦为水龙骨科植物的干燥叶, 能清热、利尿、止咳、止血。主治肺热咳嗽, 痰中带血, 小便不利, 热淋, 沙淋, 颈淋巴结核, 烧烫伤, 外伤出血<sup>[1]</sup>。

目前, 对于光石韦的研究较少, 《中国药典》2010 年版一部只制定了石韦的质量标准, 药典中规定石韦为庐山石韦、石韦、有柄石韦<sup>[2]</sup>, 并未将光石韦包含其中。《广西中药材标准》1990 年版收载光石韦药材<sup>[3]</sup>, 只介绍了其性状、功能主治, 未见全面的质量标准。而对于石韦的研究较多, 李洁等<sup>[4]</sup>从石韦、庐山石韦、有柄石韦中分离出了芒果苷、异芒果苷、绿原酸; 李开通等<sup>[5]</sup>用 HPLC 测定了不同产地和品种石韦中绿原酸和芒果苷的含量; 吴怀恩等<sup>[6]</sup>对石韦配方颗粒中绿原酸、咖啡酸及芒果苷的含量进行了测定。而光石韦中含有 β-谷甾醇、豆甾醇、胡萝卜苷、齐墩果酸、芒果苷、异芒果苷和蔗糖等多种成

**[收稿日期]** 20120817(003)

**[基金项目]** 广西科技攻关项目(桂科攻 1099062-4); 南宁技术创新项目(2009-2-15)

**[第一作者]** 黄艳, 助理研究员, 硕士研究生, 从事中药、天然药化学成分与质量标准研究

**[通讯作者]** \* 刘布鸣, 研究员, 硕士研究生导师, 从事中药、天然药化学成分与质量标准研究, Tel: 0771-5883405, E-mail: liubuming@yahoo.com.cn

分(不含有绿原酸),芒果苷是光石韦的主要有效成分<sup>[7-8]</sup>。张艺轩等对不同产地和品种石韦药材的高效液相指纹图谱进行了研究<sup>[9]</sup>,其中发现光石韦药材与《中国药典》品种区别显著。为了确保光石韦用药安全、减少品种乱用现象,控制药材质量,本文在化学成分比较分析的基础上,利用 HPLC 建立了 10 批不同来源的光石韦药材的指纹图谱,为光石韦药材的质量标准研究及其质量控制提供科学依据。

## 1 仪器与试剂

江苏昆山 KQ5200B 型超声波清洗器(160 W, 40 KHz)、瑞士梅特勒 XS-205 型电子天平、美国 Waters 分析型色谱仪(1525 二元梯度色谱泵、2998 二极管检测器)、Waters Empower 色谱工作站。乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。光石韦药材共 10 批,采自广西等地,原植物经广西中医药研究院何开家主任药师鉴定为水龙骨科石韦属植物光石韦 *Pyrrhosia calvata* (Bak.) Ching, 植物标本保存在广西中医药研究院标本馆(GXMI)。芒果苷对照品(中国药品生物制品检定所,供含量测定用,批号 111607-200402)。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 大连依利特 SinoChrom ODS-BP 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相 乙腈(A)-0.2% 磷酸(B), 0 ~ 65 min 7% ~ 18% A, 65 ~ 66 min 18% ~ 7% A, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 205 nm, 柱温 25 °C, 进样量 20 μL, 分析时间 66 min。

**2.2 供试品溶液** 取光石韦药材粉末(60 目筛)约 0.1 g, 精密称定, 置 100 mL 锥形瓶中, 精密加入 70% 乙醇 50 mL, 称定质量, 回流 1 h, 取出, 放冷, 用 70% 乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 5 mL, 水浴蒸干, 残渣加流动相溶解, 并转移至 10 mL 量瓶中, 定容, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

**2.3 参照物溶液的制备** 参照物溶液的制备: 精密称取芒果苷对照品适量, 置于 5 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇溶解至刻度, 摇匀, 制成 50 mg·L<sup>-1</sup> 的溶液, 即得。

**2.4 特征峰与内参照峰的确** 按 2.1 项测定条件记录各批样品的色谱图, 从中选取了 12 个共有峰作为可以构成指纹图谱的稳定的特征峰, 采用对照品确认已知成分芒果苷为 7 号峰, 其他共有峰为未知成分。选择芒果苷为内参照物, 确定芒果苷峰(7 号峰)为内参照峰, 标记为 S, 色谱图见图 1, 2。比较各批样品的色谱图, 确定 12 个色谱峰共有指纹特征峰, 峰面积占总峰面积的 90% 以上。从光石韦 2 h 指纹图谱(图 3)可见, 66 min 后无有意义峰出现, 故

确定记录时间为 66 min。以芒果苷色谱峰(S 峰)的保留时间和峰面积为 1, 计算各共有峰的相对保留时间和峰面积相对比值。记录图谱: 取供试品溶液和参照物溶液进行分析, 以归一化法计算各主要色谱峰的相对峰面积。记录 66 min 色谱, 66 min 以后基本出峰完全。

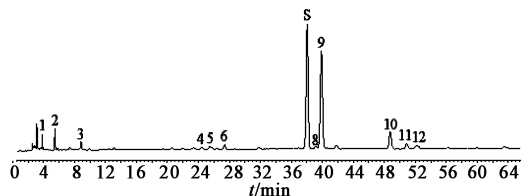


图 1 光石韦药材 HPLC 指纹

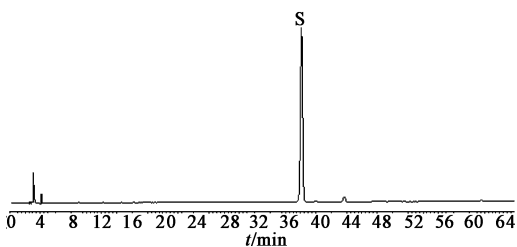


图 2 芒果苷对照品 HPLC 指纹

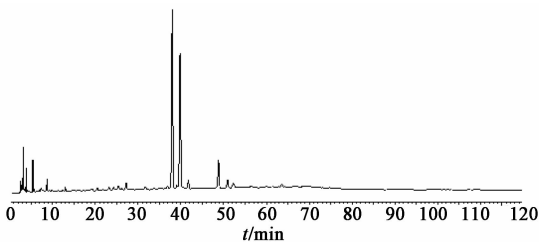


图 3 光石韦药材 2 h HPLC 指纹

## 2.5 指纹图谱方法学考察

**2.5.1 精密度试验** 取同一供试品溶液, 在上述色谱条件下重复进样 6 次, 记录色谱图。各共有峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致, RSD 均 < 3%, 符合指纹图谱要求。

**2.5.2 重复性试验** 取同一批样品 6 份, 分别制备供试品溶液, 在上述色谱条件下测定, 记录色谱图, 各共有峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致, 相对保留时间 RSD < 3%, 相对峰面积 RSD < 5%, 符合指纹图谱要求。

**2.5.3 稳定性试验** 取同一供试品溶液, 分别于 0, 1, 3, 6, 12, 24 h, 在上述色谱条件下测定进样分析, 记录色谱图, 各共有峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致, 各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3%, 表明供试品在 24 h 内相对稳定性、相似性良好, 符合指纹图谱要求。

**2.6 指纹图谱的建立** 分别取不同样品制备供试

溶液,检测指纹图谱,以芒果苷色谱峰的保留时间和峰面积积分为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果显示,各批样品 12 个共有指纹

特征峰的相对保留时间、相对峰面积比值,重叠率和相似度较好,测定结果见表 1~2。

表 1 光石韦药材样品共有峰相对保留时间

No	药材	样品批号										平均值
		081017	081226	090514	090615	091022	091208	100315	100609	100830	101012	
1	0.101 0	0.101 7	0.101 0	0.101 1	0.100 8	0.099 8	0.100 1	0.100 6	0.101 2	0.101 0	0.100 3	0.100 8
2	0.143 0	0.143 4	0.143 1	0.142 9	0.142 4	0.142 8	0.142 4	0.143 0	0.142 9	0.142 5	0.142 5	0.142 8
3	0.229 9	0.229 7	0.229 9	0.231 3	0.228 0	0.231 5	0.228 9	0.229 5	0.230 1	0.229 5	0.229 6	0.229 8
4	0.640 6	0.641 3	0.641 8	0.644 6	0.640 3	0.643 5	0.641 4	0.640 7	0.641 5	0.639 4	0.640 7	0.641 5
5	0.668 8	0.669 7	0.669 0	0.671 7	0.668 4	0.671 9	0.670 0	0.669 0	0.669 1	0.667 4	0.669 1	0.669 5
6	0.718 9	0.720 8	0.718 2	0.721 0	0.718 1	0.720 0	0.719 1	0.718 4	0.718 8	0.717 4	0.717 9	0.719 0
7(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
8	1.030 0	1.031 9	1.032 0	1.035 5	1.030 2	1.035 8	1.032 8	1.029 8	1.028 5	1.029 5	1.031 9	1.031 8
9	1.048 5	1.050 1	1.049 6	1.050 9	1.048 9	1.050 2	1.049 0	1.048 4	1.048 1	1.048 5	1.049 1	1.049 3
10	1.283 8	1.285 4	1.283 3	1.282 7	1.283 8	1.280 7	1.283 5	1.283 7	1.285 5	1.283 6	1.282 8	1.283 5
11	1.340 3	1.342 0	1.339 4	1.340 6	1.340 8	1.338 3	1.339 8	1.340 4	1.341 9	1.340 2	1.339 2	1.340 3
12	1.375 4	1.376 1	1.374 5	1.372 6	1.375 5	1.371 8	1.375 1	1.376 6	1.378 9	1.376 7	1.375 1	1.375 3

注:7(S)成分为芒果苷(表 2 同)。

表 2 光石韦药材样品共有峰相对峰面积

No	药材	样品批号										平均值
		081017	081226	090514	090615	091022	091208	100315	100609	100830	101012	
1	0.023 9	0.032 1	0.016 2	0.018 6	0.026 3	0.031 5	0.022 0	0.024 9	0.014 7	0.033 1	0.028 3	0.024 8
2	0.060 6	0.044 7	0.065 3	0.044 1	0.063 7	0.059 0	0.067 0	0.058 9	0.074 4	0.091 0	0.137 7	0.070 6
3	0.037 7	0.031 2	0.013 7	0.021 1	0.026 5	0.024 2	0.007 9	0.038 4	0.014 6	0.008 4	0.039 9	0.022 6
4	0.011 4	0.009 3	0.005 3	0.020 6	0.006 8	0.008 8	0.008 5	0.011 7	0.022 4	0.015 5	0.016 4	0.01 25
5	0.028 8	0.055 5	0.018 6	0.005 0	0.003 3	0.014 9	0.009 1	0.029 4	0.024 2	0.013 1	0.024 5	0.019 8
6	0.035 5	0.028 6	0.028 2	0.038 9	0.035 6	0.015 3	0.060 8	0.035 8	0.037 2	0.047 9	0.027 2	0.035 6
7(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
8	0.019 0	0.079 2	0.096 8	0.028 4	0.027 1	0.095 9	0.036 0	0.018 2	0.022 0	0.074 8	0.011 5	0.049 0
9	0.853 2	0.556 3	0.713 0	0.653 6	0.556 6	0.597 7	0.600 2	0.851 8	0.629 2	0.665 1	0.661 9	0.648 5
10	0.853 2	0.177 5	0.056 2	0.070 8	0.082 5	0.023 0	0.026 4	0.159 6	0.007 0	0.022 9	0.202 8	0.082 9
11	0.046 6	0.041 3	0.013 0	0.021 1	0.018 8	0.007 3	0.005 7	0.048 3	0.003 0	0.005 1	0.055 0	0.021 9
12	0.039 1	0.073 5	0.050 9	0.064 8	0.060 7	0.114 6	0.077 5	0.038 1	0.072 7	0.106 3	0.041 4	0.070 1

2.7 不同批号样品指纹图谱比较 取 10 个不同批号的光石韦药材粉末,分别按供试品制备方法制备,进样,检测指纹图谱,记录以芒果苷色谱峰的保留时间和峰面积为参照,计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积。比较 10 批供试品色谱图,各批次药材的 12 个共有指纹特征峰峰面积之和均占其总峰面积的 90% 以上,见表 3。

2.8 相似度评价 将在拟定色谱条件下记录的 10 批药材色谱图转换成数值数据导出后,采用中药色

谱指纹图谱相似度评价软件 2004 版(国家药典委员会)进行数据导入、匹配、校正(图 4),生成能够综合反映所有样品指纹特征信息的对照指纹图谱(图 5)。通过与对照指纹图谱比较,计算各批次药材相似度,见表 3。

### 3 讨论

采用 DAD 检测器考察了 200 ~ 400 nm 检测情况,比较了 205,254,340 nm 3 个波长,在 254 nm 时色谱峰较少,在 340 nm 时色谱响应值偏低,在 205

表 3 光石韦药材共有峰面积、指纹图谱相似度计算结果

产地	批号	共有峰面积 百分比/%	相似度
广西上思	081017	90.50	0.986
广西上思	081226	93.75	0.997
广西靖西	090514	93.38	0.999
广西上思	090615	92.83	0.997
广西靖西	091022	91.62	0.997
广西上思	091208	93.27	0.999
广西武鸣	100315	92.12	0.985
广西靖西	100609	91.27	0.999
广西靖西	100830	92.44	0.998
广西武鸣	101012	90.09	0.987

芒果苷对照品,未能最终指认该成分。

对 10 批不同产地的光石韦药材进行了指纹图谱研究,不同来源的光石韦主要成分基本相同,共有峰的相对保留时间 RSD% 均 < 3%,表明其在 HPLC 色谱的相对位置稳定,可作为定性鉴别的指标参数;相对含量部分成分存在差异,提示该部分成分的含量稳定性稍差,虽有差别,但均为共有构成特征。12 个指标成分群是从 10 批样品中选出的相对含量较大、特征性较强的共有峰,12 个共有指纹峰占总峰面积的 90% 以上,具有代表性。不同样品之间相对含量比值有差异,但其指纹图谱的整体面貌极其相似,所建立的指纹图谱相对保留时间重复性好,相似度较高,可以作为鉴别光石韦质量的指标之一。

本实验建立的光石韦指纹图谱与文献[9]报道的石韦品种的指纹图谱有明显的差别,具有专属性,可区别同属其他植物,为有效鉴别光石韦药材真伪,控制药材质量提供参考。

#### [参考文献]

- [1] 国家中医药管理局. 中华本草. 第 4 卷[M]. 上海: 上海科技出版社, 1999: 253.
- [2] 国家药典委员会. 中国药典[S]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 834.
- [3] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准[S]. 南宁: 广西科学技术出版社, 1990: 184.
- [4] 李洁, 童玉懿. 石韦有效成分的高效液相色谱测定[J]. 药学学报, 1992, 27(12): 153.
- [5] 李开通, 张艺轩, 曹阳, 等. HPLC 法测定不同产地和品种石韦中绿原酸和芒果苷的含量[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(16): 2075.
- [6] 吴怀恩, 劳深, 王雯慧, 等. HPLC 测定石韦配方颗粒中绿原酸、咖啡及芒果苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(16): 54.
- [7] 包文芳, 席晓红. 光石韦的两个甾酮类化合物[J]. 西北药学杂志, 1989, 4(1): 16.
- [8] 郑兴, 许云龙, 徐军. 光石韦化学成分的研究[J]. 中草药, 1999, 30(4): 253.
- [9] 张艺轩, 李开通, 李秋月, 等. 不同产地和品种石韦药材的高效液相指纹图谱研究[J]. 中药材, 2011, 34(1): 20.
- [10] 韦志疆. RP-HPLC 法测定光石韦中芒果苷的含量[J]. 中国医药导报, 2012, 9(10): 137.
- [11] 温金莲, 周清, 宋粉云. RP-HPLC 测定栀子金花丸中芒果苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17): 65.

[责任编辑 邹晓翠]

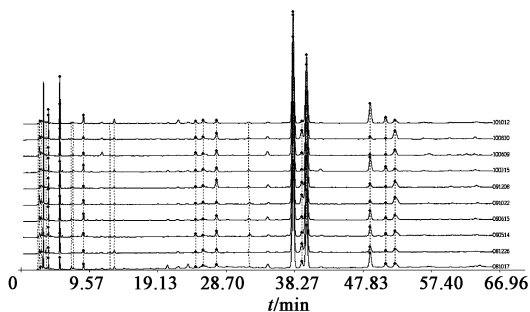


图 4 光石韦药材指纹

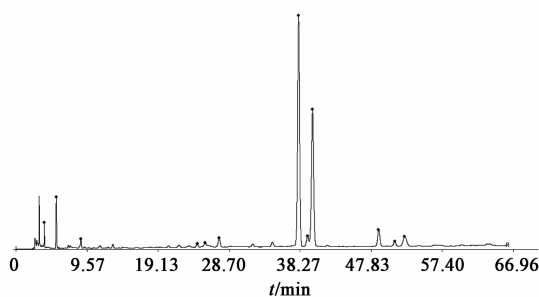


图 5 光石韦药材对照指纹

nm 处色谱峰较多且峰形较好,各成分均有较好吸收,各峰分离较好,基线平稳,芒果苷有较强吸收,综合考虑,选择 205 nm 作为指纹图谱的检测波长。

以不同比例的甲醇-0.2% 磷酸溶液作为流动相,但各峰形不好且分离效果不好,参照文献[10-11],选择乙腈-0.2% 磷酸溶液作为流动相,峰形较好,各峰分离理想,故选择该系统为流动相。

光石韦含有多种化学成分,由于条件有限仅指认了其中的芒果苷成分。但根据文献[6]报道的光石韦中芒果苷和异芒果苷占总峰面积 60% 以上,参考其测定的光石韦样品的色谱图,推测本文测定的色谱图中 9 号峰应为异芒果苷成分,但由于没有异