

鬼针草属药材的 HPLC 指纹图谱鉴别

夏清^{1,2}, 刘圆^{2*}

(1. 四川中医药高等专科学校, 四川 绵阳 621000; 2. 西南民族大学民族医药研究院, 成都 610041)

[摘要] 目的: 建立鬼针草属药材的 HPLC 指纹图谱方法, 鉴别 5 种鬼针草药材。方法: 采用 Kromasil C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以甲醇-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 290 nm, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。结果: 通过对 10 批鬼针草属药材的研究建立了鬼针草属药材的指纹图谱, 利用 HPLC 指纹图谱相似性评价软件评价, 应用主成分分析法、系统聚类分析法将药材分成 5 类, 计算相似度。结论: 该提取方法简单, 具有很好的稳定性、重复性和可行性, 可使大部分化学成分得到较好的分离, 可为鬼针草属药材提供更为科学的依据和有效的鉴别方法。

[关键词] 鬼针草属; HPLC; 指纹图谱; 系统聚类法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0073-04

[doi] 10.11653/zgsyxfjxzz2013070073

Study on HPLC Fingerprint of Herba Bidentis

XIA Qing^{1,2}, LIU Yuan^{2*}

(1. Shichuan College of Traditional Chinese Medicine, Mianyang 621000, China;

[收稿日期] 20120908(001)

[基金项目] 国家科技部“重大新药创制”项目(2011ZX09307-002-01); 国家科技支撑计划项目(2012BAI27B07); 国家自然科学基金项目(81173653); 四川省杰出青年学术技术带头人后续计划项目(2011JQ0051)

[第一作者] 夏清, 讲师, 硕士, 从事中药药剂的教学与科研, Tel: 18030999327, E-mail: qingxia4663@yahoo.cn

[通讯作者] * 刘圆, 教授, 从事少数民族药物的研究与教学, Tel: 13808091609, E-mail: yuanliu163@yahoo.com.cn

种的指纹图谱, 色谱峰分离良好, 基线平稳, 信息量丰富, 峰的数目、强度较为理想, 基本可以呈现姜化学成分的全貌, 并经过方法学的验证, 结果符合指纹图谱的技术要求^[13]。

[参考文献]

[1] 邱琴, 张国英, 刘辛欣, 等. 超临界 CO₂ 流体萃取法与水蒸气蒸馏法提取干姜片挥发油化学成分的比较[J]. 上海中医药杂志, 2005, 39(3): 55.
[2] 黄鹤归, 叶晓川, 田连起, 等. 超临界 CO₂ 萃取法与水蒸气蒸馏法提取桂枝-干姜药对的化学成分比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 24(17): 85.
[3] 孟江, 卢国勇, 程轩轩, 等. 一测多评法同时测定干姜中 4 种姜酚类成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 7(18): 77.
[4] 吕力, 高晓雨, 张君严, 等. 生姜有效成分的研究进展[J]. 科技信息, 2012, 19: 194.
[5] 周洪雷, 张义虎, 魏璐. 雪干姜化学成分的研究[J]. 中医药学报, 2001, 29(4): 33.

[6] Kikuzaki H, Tsai Saiu-Mei, Nakatain N. Gingerdiol related compounds from the rhizomes of *Zingiber officinale* [J]. Phytochemistry, 1992, 31(5): 1783.
[7] 何文珊, 严玉霞, 郭宝江. 生姜的化学成分及生物活性研究概况[J]. 中药材, 2001, 24(5): 376.
[8] 孔维军, 赵艳玲, 山丽梅, 等. 正交法优选干姜挥发油提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(3): 19.
[9] 王维皓, 王智民. 姜的化学、药理研究进展[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(20): 1569.
[10] 贾玉梅, 段红福, 崔瑛, 等. 怀鲜地黄 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中成药, 2011, 33(5): 732.
[11] 李计萍, 王跃生, 马华, 等. 干姜与生姜主要化学成分的比较研究[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(11): 748.
[12] 营大礼. 干姜化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国药房, 2008, 19(18): 1435.
[13] 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)[J]. 中成药, 2000, 22(10): 673.

[责任编辑 顾雪竹]

2. Ethnic Medicine Institute of Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the fingerprint method of Herba Bidentis and identify five species of Herb Bidens. **Method:** The methanol extraction of Herba Bidentis was separated on a Kromasil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) eluted with Methanol- (0.1% phosphoric) acid water in linear gradient condition with DAD detected at 290 nm. Flow rate was 1 mL · min⁻¹ and 10 μL was injected and the column temperature was 30 °C. **Result:** The fingerprint of Herba Bidentis was established for 10 samples of different sources. Principal components analysis and clustering analysis were used in the identification of the samples, and the similitude was computed by computer. **Conclusion:** It was also the simple extraction and the most chemical components could be separated very well by HPLC. This method was stable, repeatable and feasible. And it provided scientific reference and effective method for the quality control of Herba Bidentis. The fingerprint could be used to distinguish Herba Bidentis.

[Key words] Herba Bidentis; HPLC; fingerprint; clustering analysis

鬼针草为菊科植物鬼针草属多种植物的全草,广泛分布于热带及温带地区。鬼针草类全草入药,味苦而无毒,具有清热毒、活血散瘀消肿之功效,用于治疗痢疾、腹泻、感冒、炎症等^[1-2]。鬼针草属多种植物含有黄酮类和酚酸类等成分^[3]。药典尚未收载鬼针草药材的质量标准^[4]。贵州中药材标准收载三叶鬼针草 *Bidens poilsa* L.、鬼针草 *Bidens bipinata* Linn. 的干燥全草,甘肃中药材标准 1995 年收载鬼针草 *Bidens bipinata* Linn., 广西中药材标准 1990 年收载三叶鬼针草 *Bidens poilsa* L.、白花鬼针草 *Bidens poilsa* L. var. *radiata* Sch.-Bip. 的干燥全草,河南中药材标准 1991 年收载三叶鬼针草 *Bidens poilsa* L.、鬼针草 *Bidens bipinata* Linn.、金盏银盘 *Bidens biternata* (Lour.) Merr. Et Sherff. 的干燥全草^[5]。从国内地方标准收载情况可以看出全国各地入药部位为全草。本实验拟对不同种及不同产地 10 批鬼针草药材进行了 HPLC 指纹图谱方法学研究,并进行比较分析,以期建立鬼针草药材的质量评价新方法。

1 材料

美国 waters2695 高效液相色谱仪, DAD 检测器, Empower 色谱工作站, KQ-250B 型超声波清洗器 (功率 250 W, 频率 40 kHz)。甲醇为色谱纯, 水为二次重蒸水, 其余试剂均为分析纯。

槲皮素 (批号 081-9304, 中国药品生物制品检定所), 金丝桃苷 (批号 111521-200303, 中国药品生物制品检定所, 含量测定用), 没食子酸 (批号 110831-200302, 中国药品生物制品检定所), 鬼针草药材 7 批样品采于广西, 3 批样品采于云南, 共 10 批药材, 药材来源见表 1。由西南民族大学刘圆教

授鉴定为菊科鬼针草属植物狼把草 *B. tripartita* Linn., 白花鬼针草 *B. pilosa* L. var. *radiata* Sch-Bip., 婆婆针 *B. bipinata* Linn., 三叶鬼针草 *B. pilosa* Linn., 金盏银盘 *B. biternata* (Lour.) Merr. Et Sherff. 的干燥全草。

表 1 鬼针草药材来源

No.	品种	来源	采收时间
1	婆婆针	广西临桂盘山	(2007-06)
2	婆婆针	广西临桂盘山	(2007-06)
3	白花鬼针草	广西南宁	(2007-04)
4	白花鬼针草	广西平乐	(2007-06)
5	白花鬼针草	广西临桂盘山	(2007-06)
6	狼把草	广西全州材湾	(2006-07)
7	三叶鬼针草	云南红河州	(2007-06)
8	金盏银盘	云南景洪	(2008-01)
9	婆婆针	云南勃海菜科所	(2007-12)
10	白花鬼针草	广西泉州	(2008-01)

2 方法

2.1 色谱条件 色谱柱 Kromasil C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以甲醇 (A)-0.1% 磷酸水溶液 (B) 为流动相梯度洗脱见表 2, 流速 1 mL · min⁻¹, 检测波长 290 nm, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。

2.2 样品溶液的制备 称取鬼针草药材 1 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中加入甲醇-25% 盐酸溶液 (4:1) 25 mL, 称定质量, 超声 1 h, 取出, 用上述混合溶液补足减失质量, 摇匀, 过滤, 取续滤液, 过 0.45 μm 的微孔滤膜, 作为样品溶液。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取槲皮素、金丝桃苷、没食子酸对照品适量, 加甲醇配置成 0.04 g · L⁻¹ 的溶液。

表 2 梯度洗脱条件表

t/min	A%	t/min 时间	A%
0	5	70	50
13	20	90	65
25	30	100	85
60	45	110	100

2.4 方法学考察

2.4.1 精密性试验 精密称取鬼针草样品粉末(4号)1 g,按 1.2.2 项下方法制备溶液后,按 1.2.1 项下色谱条件进行分析,连续进样 6 次,记录色谱图,以中国药典委员会主持开发的中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版进行相似度评价,结果相似度均 >0.99,说明仪器精密性良好。

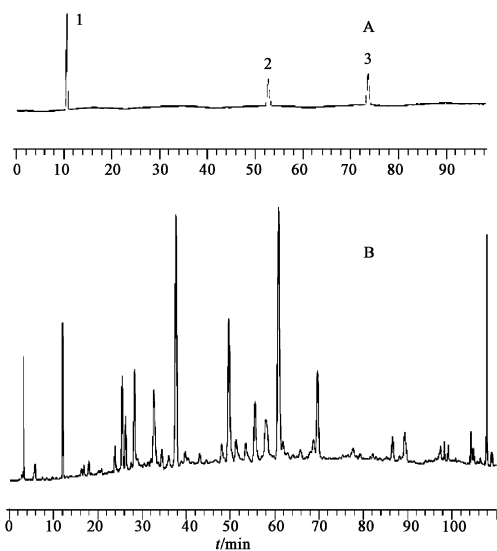
2.4.2 重复性试验 按上述方法重复提取 5 份药材(4号)制备样品溶液并进行测定,记录色谱图,用相似度评价软件评价相似度,结果相似度均 >0.99,说明方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 按上述方法提取药材(4号)制备供试品溶液,分别在 0,4,8,16,24,48 h 进样,记录色谱图,用相似度评价软件评价相似度,结果相似度均大于 0.99,说明样品 48 h 内稳定。

3 结果与分析

3.1 相似度评价 根据 10 批样品 HPLC 图谱所给出的相关系数,鬼针草原药材的化学成分的色谱峰在 110 min 全部出现,记录 110 min 色谱图(图 1)。

数据处理软件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)进行数据处理^[6],将多个色谱图进行比较,得到可全面反映多个色谱图特征的共有模式色谱图。以此模式为基准,计算每个色谱图与之相比较的相似度^[7-9]。



1. 没食子酸; 2. 槲皮素; 3. 金丝桃苷

图 1 对照品(A)、样品(B)色谱

10 批鬼针草药材,记录指纹图谱(图 2),并采用“计算机辅助相似度评价系统”软件进行数据处理^[10-11],结果见表 3。

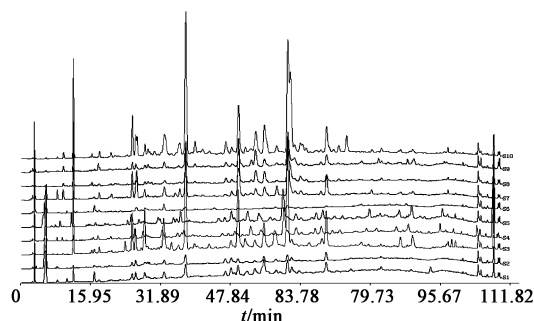


图 2 10 批鬼针草属药材的指纹图谱

相似度评价结果分析:从相似度评价结果可以看出,白花鬼针草与婆婆针、金盏银盘、狼把草、三叶

表 3 样品相似度计算

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照指纹图谱
S1	1.000	0.750	0.710	0.369	0.438	0.520	0.624	0.596	0.642	0.667	0.808
S2	0.750	1.000	0.619	0.233	0.339	0.588	0.593	0.532	0.527	0.607	0.718
S3	0.710	0.619	1.000	0.345	0.345	0.603	0.858	0.780	0.792	0.859	0.924
S4	0.369	0.233	0.345	1.000	0.720	0.334	0.264	0.312	0.402	0.243	0.514
S5	0.438	0.339	0.345	0.720	1.000	0.308	0.329	0.372	0.440	0.285	0.562
S6	0.520	0.588	0.603	0.334	0.308	1.000	0.506	0.458	0.537	0.428	0.622
S7	0.624	0.593	0.858	0.264	0.329	0.506	1.000	0.824	0.790	0.837	0.912
S8	0.596	0.532	0.780	0.312	0.372	0.458	0.824	1.000	0.850	0.787	0.856
S9	0.642	0.527	0.792	0.402	0.440	0.537	0.790	0.850	1.000	0.755	0.901
S10	0.667	0.607	0.859	0.243	0.285	0.428	0.837	0.787	0.755	1.000	0.903
对照指纹图谱	0.808	0.718	0.924	0.514	0.562	0.622	0.883	0.856	0.877	0.888	1.000

鬼针草有较大差异,而金盏银盘与婆婆针较相似。比较 5 者色谱图,发现在保留时间约为 53.0 min(槲皮素)和 74.0 min(金丝桃苷)时,狼把草基本上没有组分流出,与金盏银盘、婆婆针、三叶鬼针草有明显差异,比较金盏银盘、婆婆针、三叶鬼针草,直观上较难看出两者的差异,因此必须从量化指标对两者进行进一步比较。

3.2 主成分分析 应用 DPS v2.00 统计软件对取得的 HPLC 数量化特征进行主成分分析,主成分投影见图 3。

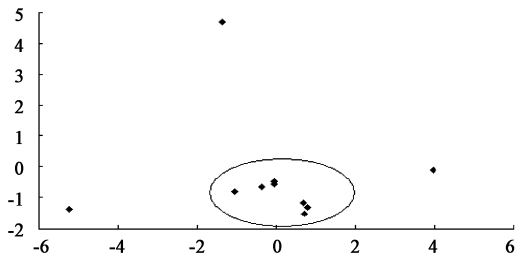


图 3 主成分分析

3.3 系统聚类分析 应用 DPS v2.00 统计软件对取得的 HPLC 数量化特征以及 10 批样品的主成分得分进行系统聚类分析,结果见图 4。

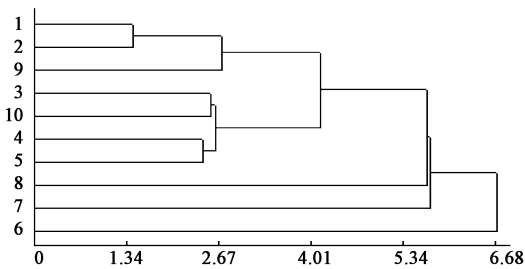


图 4 聚类分析

4 讨论

4.1 样品溶液制备方法的选择 考察了甲醇、甲醇-25% 磷酸水溶液为提取溶媒进行提取,考察了超声提取、回流提取等方法,最后确定用甲醇-25% 磷酸水溶液超声提取 1 h 效果最好,且方法简便。

4.2 流动相的选择 考察了甲醇-水、甲醇-水(0.1% 磷酸)、乙腈:水 3 种流动相,结果表明以甲醇-水(0.1% 磷酸)为佳。

4.3 检测波长的选择 采用二极管阵列检测器分别记录在 274,360,290 nm 的色谱图,结果表明:在 290 nm 处各色谱峰均有较好的紫外吸收,可以尽可能多地反映样品化学成分信息,出峰较多,主要特征峰分离度好,因此,选择该波长作为检测波长。待收集更多确定种和来源的样品后,可建立鬼针草属药材的判别函数,用以确定未知样品的归属,或建立人工神经网络模型,以更好的区分鬼针草属药材,以后的研究中将会结合气相色谱的指纹图谱研究,以提高鬼针草属药材辨别的准确性,更好地应用于中成药的质量标准控制。

[参考文献]

[1] 张传伟,王育良. 鬼针草的现代研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2010,12(6):38.
[2] 胡伟,陈飞虎,吴繁荣,等. 鬼针草药材质量标准初步研究[J]. 中华中医药杂志,2011,26(6):1370.
[3] 张延昌,张永民. 鬼针草的研究现状与应用前景[J]. 山东教育学院学报,2004,104(3):79.
[4] 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.
[5] 黎跃成. 药材标准品种大全[M]. 成都:四川科学技术出版社,2001:43,59,82.
[6] 魏刚,蔡庆群,黄月纯,等. 川芎饮片及其煎剂 HPLC 指纹图谱相关性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(2):48.
[7] 范莉,濮润,赵海誉,等. 红花药材的 HPLC 指纹图谱及质量研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(1):37.
[8] 刘超,刘圆,彭镰心. 白花丹药材 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 西南农业大学学报,2006,28(6):930.
[9] 邓亚利,孙冬梅,卢生杰. 木芙蓉药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(6):96.
[10] 刘圆,孟庆艳,彭镰心,等. 共有峰和变异峰率双指标序列法分析藏药材红毛五加特定(指纹)图谱[J]. 药物分析杂志,2007,27(8):1182.
[11] 李莹,黄艳菲,刘圆,等. 四川藏羌地区五加属主要资源种类的 HPLC 指纹图谱特征和种类鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(4):142.

[责任编辑 顾雪竹]