

# 黔产苗药石吊兰的 HPLC 指纹图谱研究

谭家华<sup>1</sup>, 张丽艳<sup>2\*</sup>, 徐昌艳<sup>2</sup>, 黄健<sup>2</sup>, 汪毅<sup>2</sup>, 杨玉琴<sup>2</sup>

(1. 贵阳中医学院第一附属医院, 贵阳 550002; 2. 贵阳中医学院, 贵阳 550002)

**[摘要]** 目的: 建立黔产苗药石吊兰的 HPLC 指纹图谱, 比较了贵州不同产地石吊兰的差异, 为科学评价石吊兰的质量提供参考依据。方法: 采用 HPLC 法, Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 乙腈-0.05% 磷酸水为流动相梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C, 检测波长 334 nm。结果: 建立了黔产石吊兰药材的 HPLC 指纹图谱, 并对 12 批样品的相似度进行了比较, 标定了 15 个共有峰; 贵州不同产地石吊兰的主成分组成基本相同, 但各组分的含量有较大的差异。结论: 所建立的方法简便, 重复性良好, 特征性强, 可用于黔产石吊兰的 HPLC 指纹图谱测定, 并可为其今后规范药材资源及质量评价提供科学依据。

**[关键词]** 苗药; 石吊兰; 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)11-0108-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013110108

## Study on HPLC Fingerprint of the Miao Medicine *Lysionotus pauciflorus* from Guizhou

TAN Jia-hua<sup>1</sup>, ZHANG Li-yan<sup>2\*</sup>, XU Chang-yan<sup>2</sup>, HUANG Jian<sup>2</sup>, WANG Yi<sup>2</sup>, YANG Yu-qin<sup>2</sup>

(1. The First Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China;  
2. Guiyang College of Chinese Traditional Medicine, Guiyang 550002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the HPLC fingerprint of *Lysionotus pauciflorus* from Guizhou, and to compare the difference of *L. pauciflorus*, so as to provide scientific basis for quality evaluation of *L. pauciflorus*. **Method:** HPLC analysis was performed on a Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with the eluting system of gradient consisted of acetonitrile-0.05% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The column temperature was maintained at 30 °C and the detection wavelength was set at 334 nm. **Result:** The HPLC fingerprint was established and compared by 12 batch of samples similarity with 15 common peaks. The main

**[收稿日期]** 20120421(004)

**[基金项目]** 贵阳市科技局现代药业计划项目(筑科合同[2011204]13号); 贵州省优秀科技教育人才省长专项资金项目[黔省专合字(2011)80号]

**[通讯作者]** \*张丽艳, 教授, 从事中药、民族药质量控制及新药研究, Tel: 13984870641, E-mail: zly1964@163.com

[5] 王晓炜, 张大威, 魏小龙, 等. 田基黄的研究进展[J]. 中国现代药物应用, 2009, 22(3): 183.

[6] 王永刚, 杨立伟, 苏薇薇. 田基黄药材指纹图谱研究[J]. 南方医科大学学报, 2006, 26(7): 1001.

[7] 蒋佳雯, 徐文芬, 杨亮, 等. 秋海棠属药材的质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1): 40.

[8] 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: 附录 34, 215.

[9] 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, 2005: 159.

[10] 郑丽会, 茅向军, 许乾丽, 等. HPLC 法测定润燥止痒胶囊中游离蒽醌的含量[J]. 中国药物警戒, 2011, 6: 327.

[责任编辑 顾雪竹]

composition of different origin samples is basically the same. But there is large difference between each component.

**Conclusion:** This method is reliable and repeatable, it can be used to determine HPLC fingerprint in different origin *L. pauciflorus* from Guizhou. And it helps to regulate the quality of medical resources and provide scientific basis in the future.

[**Key words**] Miao medicine; *Lysionotus pauciflorus*; HPLC; fingerprint

石吊兰为苦苣苔科植物吊石苣苔的全草<sup>[1]</sup>。又称为岩豇豆、岩泽兰、石豇豆;苗族药名为 *Cherbnex jenl vieeb* (肝努尽烟)<sup>[2]</sup>。具有化痰止咳,软坚散结之功;临床用于咳嗽痰多,瘰癧痰核<sup>[3]</sup>。石吊兰始见于《植物名实图考》,现被 2010 年版《中国药典》(一部)、2003 年版《贵州省中药材、民族药质量标准》收录。主要分布于贵州、云南、江西、湖南、湖北、台湾、浙江、江苏、四川、广西、广东等省区,其中贵州全省均有分布,生于海拔 300~2 000 m 的丘陵或山地林中石上或树上<sup>[4]</sup>。目前,石吊兰是我省“岩果止咳蜜”、“马兰感寒胶囊”、“咳康含片”等制剂的主要原料药材。色谱指纹图谱技术由于其所特有的整体性和模糊性,非常适用于具有复杂成分的中药化学成分的分析<sup>[5]</sup>。石吊兰质量控制研究中,现行质量标准仅以石吊兰素作为含量测定指标,文献报道仅对其中石吊兰素<sup>[6-7]</sup>、总黄酮<sup>[8]</sup>等单一或一类成分进行含量测定,并未见其 HPLC 指纹图谱研究的相关报道。本实验采用 HPLC 建立贵州地区不同产地石吊兰药材的指纹图谱,并对 12 批样品进行相似度比较,旨在进一步完善石吊兰药材的质量控制方法,并为今后规范该药材资源及质量评价提供依据。

## 1 材料

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(DAD 检测器),AG135 电子天平(梅特勒-托利多公司),CH-250 型超声波清洗机(天津恒奥科技公司,功率 250 W,频率 33 kHz),101-2AB 型电热鼓风干燥箱(天津泰斯特仪器公司)。

石吊兰素(批号 111555-200602)、芦丁(批号 100080-200707)、阿魏酸(批号 110773-200611)等对照品均购于中国药品生物制品检定所,供含量测定用。甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂为分析纯,水为娃哈哈纯净水。12 批石吊兰药材均自采于贵州各地,经贵阳中医学院魏升华副教授鉴定为苦苣苔科植物吊石苣苔 *Lysionotus pauciflorus* Maxim. 的全草。样品来源见表 1。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6

表 1 石吊兰药材来源

No.	来源地	No.	来源地
S1	贵州纳雍	S7	贵州凯里炉山
S2	贵州铜仁松桃	S8	贵州六枝
S3	贵州盘县珠东	S9	贵州普安县地瓜镇
S4	贵州贵阳花溪	S10	贵州黔南龙里县
S5	贵州毕节黔西	S11	贵州清镇
S6	贵州施秉县城关镇	S12	贵州黔南荔波

mm × 250 mm, 5 μm), 乙腈(A)-0.05% 磷酸水(B)为流动相,梯度洗脱:0~80 min, 10%~48% A, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL, 检测波长 334 nm。

**2.2 对照品溶液的制备** 分别精密称取干燥至恒重的石吊兰素、芦丁、阿魏酸等对照品适量,分别加甲醇制成 0.072 6, 0.251 0, 0.004 9 g·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液。

**2.3 供试品溶液的制备** 取干燥至恒重的样品粉末(过 60 目筛)约 0.5 g, 精密称定,置 100 mL 具塞锥形瓶中,加 75% 甲醇 25 mL, 称重,超声 20 min, 放冷,称重,补足减失的质量,滤过,取续滤液适量,以 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

### 2.4 方法学考察

**2.4.1 精密度试验** 取同一供试品溶液,连续进样 6 次,按 2.1 项下色谱条件进行测定,以石吊兰素为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间及相对峰面积,各共有峰的相对保留时间的 RSD 0.036%~0.102%, 相对峰面积的 RSD 0.119%~1.508%, 表明仪器的精密度良好。

**2.4.2 重复性试验** 分别取同一样品,按 2.3 项下方法制备 6 份供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行测定,以石吊兰素为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间及相对峰面积,各共有峰的相对保留时间的 RSD 0.032 3%~0.472%, 相对峰面积的 RSD 0.483%~2.017%, 表明该方法的重复性良好。

**2.4.3 稳定性试验** 取同一供试品溶液,分别于 0, 6, 9, 15, 21, 24 h 进样,按 2.1 项下色谱条件进行测定,以石吊兰素为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间及相对峰面积,各共有峰的相对保留时间的

RSD 0.037% ~ 0.448%，相对峰面积的 RSD 0.317% ~ 2.894%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

## 2.5 黔产石吊兰的 HPLC 指纹图谱分析

### 2.5.1 参照特征峰的标定

分别将 12 批石吊兰样品按 2.3 项下方法制备供试品溶液，按 2.1 项下色谱条件测定，获得贵州不同产地石吊兰的 HPLC 指纹图谱叠加图(图 1)和共有模式图(图 2)。从图 2 可见，12 批黔产石吊兰样品中有 15 个共有峰，通过与对照品比对，考察对照品保留时间，鉴别了石吊兰药材的 HPLC 指纹图谱中的芦丁、阿魏酸、石吊兰素等 3 个成分，其中 15 号共有峰为石吊兰素峰，分离度良好，峰面积相对较大、较稳定，选作参照峰。

12 批石吊兰的 HPLC 特征图谱进行相似度分析，以样品 S4 的图谱为参照图谱，采用中位数矢量计算得出石吊兰样品的共有模式图谱，进行全谱的相似度评价，12 批黔产石吊兰的相似度分别为 S1 (0.941)，S2 (0.950)，S3 (0.909)，S4 (0.972)，S5 (0.806)，S6 (0.867)，S7 (0.895)，S8 (0.807)，S9 (0.792)，S10 (0.612)，S11 (0.640)，S12 (0.465)。从相似度分析结果看，不同产地石吊兰的质量差异较大，推测其化学成分及含量可能受生长环境的影响较大，提示固定的产地来源能保证虎耳草药材及其制剂的质量稳定。

### 2.5.3 共有峰的相对保留时间、相对峰面积

采用相对保留时间标定共有峰，即将各色谱图的保留时间和峰面积分别与同一色谱图中 15 号参照峰的保留时间和峰面积进行比较，其比值即为各样品图谱中共有峰的相对保留时间及相对峰面积，结果见表 2、3。

## 3 讨论

分别比较以水，25% 甲醇，50% 甲醇，75% 甲醇，甲醇，75% 乙醇等提取溶剂，加热回流、超声的提取方法，及超声 10, 20, 30, 40 min 的提取时间，考察了峰数、峰面积、分离度等因素，结果以 75% 甲醇超声 20 min 效果较好，色谱峰较多且达到基线分离，色谱图信息丰富。

比较了 Hypersil C<sub>18</sub> 柱、Diamensil C<sub>18</sub> 柱、Agilent Zorbax C<sub>18</sub> 柱等色谱柱，结果表明 Agilent Zorbax C<sub>18</sub> 柱在石吊兰化学成分的线性梯度洗脱中，具有柱效高、分离度好、重复性好等特点，比较适用于黔产石

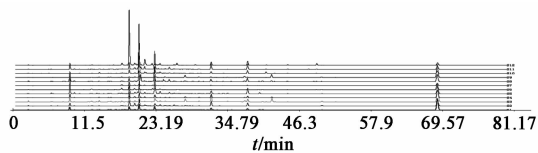
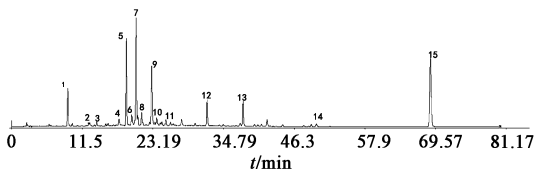


图 1 12 批样品的 HPLC 指纹图谱叠加



7. 芦丁; 8. 阿魏酸; 15. 石吊兰素

图 2 石吊兰药材的共有模式

### 2.5.2 相似度评价

运用国家药典委员会推荐的中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)对

表 2 12 批样品共有峰的相对保留时间

峰号	相对保留时间												RSD /%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	
1	0.134	0.134	0.134	0.134	0.134	0.134	0.134	0.134	0.134	0.135	0.134	0.134	0.126
2	0.186	0.186	0.185	0.185	0.186	0.186	0.186	0.185	0.185	0.186	0.186	0.186	0.271
3	0.203	0.203	0.203	0.203	0.203	0.203	0.203	0.203	0.203	0.204	0.203	0.204	0.115
4	0.256	0.256	0.256	0.257	0.256	0.256	0.257	0.256	0.256	0.258	0.257	0.257	0.222
5	0.274	0.274	0.274	0.274	0.274	0.274	0.274	0.274	0.274	0.274	0.274	0.274	0.086
6	0.287	0.287	0.287	0.286	0.287	0.286	0.286	0.286	0.288	0.288	0.287	0.287	0.197
7	0.297	0.298	0.298	0.297	0.298	0.297	0.297	0.297	0.297	0.297	0.297	0.297	0.096
8	0.311	0.311	0.311	0.310	0.311	0.310	0.310	0.310	0.310	0.310	0.310	0.311	0.112
9	0.334	0.334	0.334	0.334	0.334	0.336	0.336	0.334	0.334	0.334	0.334	0.336	0.261
10	0.342	0.343	0.343	0.342	0.342	0.342	0.342	0.342	0.342	0.342	0.342	0.342	0.090
11	0.359	0.359	0.359	0.358	0.359	0.359	0.359	0.358	0.358	0.359	0.359	0.359	0.098
12	0.467	0.467	0.467	0.466	0.467	0.467	0.467	0.467	0.467	0.467	0.467	0.467	0.044
13	0.553	0.553	0.553	0.552	0.553	0.553	0.553	0.553	0.553	0.553	0.553	0.553	0.031
14	0.728	0.728	0.728	0.715	0.728	0.727	0.728	0.728	0.727	0.728	0.728	0.728	0.495
15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0

表 3 12 批样品共有峰的相对峰面积

峰号	相对峰面积												RSD
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	/%
1	0.150	0.247	0.134	1.515	0.989	0.024	0.050	0.791	0.037	0.021	0.969	0.091	121.777
2	0.018	0.038	0.028	0.045	0.013	0.060	0.097	0.022	0.013	0.036	0.039	0.127	78.012
3	0.020	0.016	0.040	0.232	0.010	0.019	0.054	0.030	0.017	0.199	0.096	0.050	113.941
4	0.025	0.054	0.028	0.156	0.063	0.202	0.299	0.068	0.026	0.103	0.045	0.634	124.210
5	0.177	0.853	0.121	0.885	0.598	0.442	0.821	0.228	0.024	0.781	1.057	11.482	218.181
6	0.034	0.248	0.037	0.314	0.090	0.117	0.133	0.059	0.029	0.197	0.385	0.402	80.344
7	0.303	0.577	0.149	5.323	0.875	0.087	0.415	0.786	0.040	6.753	7.488	1.870	135.085
8	0.036	0.090	0.018	0.226	0.111	0.053	0.145	0.059	0.008	0.274	0.508	1.530	167.100
9	0.181	0.265	0.187	2.467	1.540	0.129	0.181	1.187	0.070	1.611	3.354	0.345	113.137
10	0.002	0.011	0.002	0.463	0.035	0.005	0.032	0.026	0.003	0.200	0.128	0.100	160.392
11	0.006	0.068	0.033	0.096	0.015	0.014	0.017	0.038	0.033	0.095	0.128	0.042	80.415
12	0.104	0.463	0.233	0.055	0.262	0.037	0.096	0.203	0.025	0.505	1.036	0.826	102.336
13	0.078	0.323	0.114	0.406	0.493	0.041	0.105	0.303	0.019	0.825	1.131	1.073	97.201
14	0.014	0.091	0.028	0.046	0.017	0.041	0.025	0.019	0.031	0.044	0.019	0.105	73.296
15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0

吊兰的 HPLC 指纹图谱研究。

分别采用甲醇-水,乙腈-水,乙腈-0.05% 甲酸水溶液,乙腈-0.05% 三乙胺水溶液,乙腈-0.05% 磷酸水溶液 5 种流动相,考察了 25,30,35,40 °C 等柱温及流速为 0.8,1.0,1.2 mL·min<sup>-1</sup> 等,结果以乙腈-0.05% 磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱,柱温 30 °C,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 334 nm 时,色谱峰较多且达到基线分离,峰型对称,分离效果较好,谱图整体较为理想。

在同样的色谱条件下,通过石吊兰素、芦丁、阿魏酸、槲皮苷、 $\beta$ -谷甾醇、咖啡酸、熊果酸等对照品比对,鉴别了所建立黔产石吊兰的 HPLC 指纹图谱中芦丁、阿魏酸、石吊兰素等 3 个成分峰。

据文献报道,石吊兰素为石吊兰的主要有效成分之一,其在石吊兰的 HPLC 特征图谱中出峰时间约为 68.5 min,此峰分离度好、峰形好、稳定,且是现行质量标准中仅有的 1 个含量测定指标。因此,选择石吊兰素峰作为石吊兰的 HPLC 指纹图谱的参照峰。

由图 2 可见,各色谱峰分离效果较好,且所建立的方法具有良好的精密度、重复性、稳定性,可用于石吊兰药材的质量控制并评价。今后进一步对石吊兰的生长环境进行考察,以保证石吊兰的 HPLC 指

纹图谱良好的特征性和代表性,并为石吊兰药材的 GAP 基地建设奠定基础,保障石吊兰药材及其制剂质量稳定。

#### [参考文献]

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴: 第 4 册 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 119.
- [2] 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: 84.
- [3] 贵州省中药资源普查办公室. 贵州中药资源 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1992: 835.
- [4] 张敬杰, 胡成刚, 杨立勇, 等. 布依药岩豇豆本草学研究 [J]. 中国民族民间医药, 2003, 65: 362.
- [5] 邓仕任, 夏林波, 董倩, 等. 芫花药材的 HPLC 指纹图谱及 ESI-MS 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(24): 32.
- [6] 王绍云, 周光明, 黄成, 等. 反相高效液相色谱法测定吊石苣苔中石吊兰素的含量 [J]. 药物分析杂志, 2006, 26(11): 1617.
- [7] 盛卫国, 熊阳, 徐莲英. 高效液相色谱法测定石吊兰中石吊兰素的含量 [J]. 中成药, 2009, 31(2): 321.
- [8] 李燕, 张丽艳, 杨玉琴, 等. 黔产苗药石吊兰黄酮类成分含量对比研究 [J]. 中国现代中药杂志, 2011, 3(13): 9.

[责任编辑 顾雪竹]