

连钱草中黄酮、有机酸类成分的 HPLC 指纹图谱

黄天赐^{1,2}, 聂晶², 张立群^{2*}

(1. 湖北中医药大学, 武汉 430065; 2. 湖北省食品药品监督检验研究院, 武汉 430064)

[摘要] 目的: 建立连钱草药材中黄酮、有机酸类成分的 HPLC 指纹图谱分析方法, 为整体控制和评价连钱草药材的质量提供依据。方法: 采用大连依利特 Hypersil BDS C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1% 磷酸梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 330 nm。结果: 建立了连钱草药材黄酮、有机酸类成分的 HPLC 指纹图谱, 标定了 17 个共有峰, 其精密度、稳定性、重复性均符合指纹图谱技术要求 (RSD < 5%), 13 批连钱草药材的相似度在 0.713 ~ 0.987。结论: 该指纹图谱方法简便、准确、重复性好, 可作为连钱草药材质量控制的依据。

[关键词] 连钱草; 黄酮; 有机酸; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0132-04

Studies on Fingerprint of *Glechoma longituba* Flavone and Organic Acid Compounds by HPLC

HUANG Tian-ci^{1,2}, NIE Jing², ZHANG Li-qun^{2*}

(1. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;

2. Hubei Institute of Food and Drug Control, Wuhan 430064, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method of flavone and organic acid compounds by HPLC fingerprint, providing the basis for whole control and evaluating the quality of medicinal materials. **Method:** The separation was performed on an BDS C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column of Hypersil. The mobile phase was methanol-0.1% phosphoric acid solution, gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the wavelength was set at 330 nm. **Result:** HPLC fingerprint of flavone and organic acid compounds was established. found 17 co-possessing peaks, RSD of precision and reproducibility was in the range of < 5%, and the similarity of 13 batches of *Glechoma longituba* (Nakai) Kupr was between 0.713-0.987. **Conclusion:** This method is simple and accurate, reproducible and can be used to provide a base for the quality of the herbs.

[Key words] *Glechoma longituba*; flavone; organic acid; fingerprint

连钱草为唇形科多年生草本植物活血丹 *Glechoma longituba* (Nakai) Kupr. 的干燥地上部分, 春至秋季采收, 除去杂质, 晒干, 主产于江苏、浙江, 味辛、微苦, 性微寒, 归肝、肾、膀胱经, 功擅利湿通淋、清热解毒、散瘀消肿, 适用于热淋、石淋、湿热黄疸、疮痍肿痛、跌打损伤, 临床用于治疗热淋, 石

淋, 湿热黄疸, 疮痍肿痛, 跌扑损伤等症^[1]。目前已有一些文献报道连钱草的指纹图谱分析方法^[2], 但尚缺少对这些黄酮、有机酸类成分^[3-6]的指纹图谱研究。本实验对连钱草药材中黄酮、有机酸类成分进行了指纹图谱^[7-12]的研究, 以期全面控制连钱草药材的质量提供参考依据。

1 仪器与试剂

DIONEX Ultimate 3000 型高效液相色谱仪 (包括二元泵, 自动进样器, 柱温箱, VWD 检测器), 以及配套 Chromeleon 色谱工作站, MS 204S 梅特勒精密电子分析天平 (梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司), Millipore 超纯水机。甲醇 (色谱纯, Tedia),

[收稿日期] 20120603 (002)

[第一作者] 黄天赐, 在读硕士, 从事中药材及其制剂的质量标准研究, E-mail: 469704716@qq.com

[通讯作者] * 张立群, 主任药师, 硕士生导师, 从事中药材及其制剂的质量标准研究, Tel: 13507127920, E-mail: liqunzh@163.com

甲醇(分析纯,上海振兴化工一厂),磷酸(分析纯,上海联合化工厂);绿原酸,咖啡酸,木犀草苷,迷迭香酸,木犀草素,芹菜素对照品(购自中国药品生物制品检定所),新绿原酸,隐绿原酸对照品(购自北京上立方联合化工技术研究院);连钱草药材来自湖北,安徽,河南,湖南,广东,江西等地,2011年或2012年收集,均经湖北省食品药品监督检验研究院中药检验所冯海龙主任药师鉴定,各批次药材来源列于表1。

表1 连钱草样品的来源及序号

样品	产地	样品	产地
LQC-1	安徽宣城	LQC-8	湖南
LQC-2	南昌桑海	LQC-9	广东
LQC-3	河南新县	LQC-10	河南固始
LQC-4	湖北咸宁	LQC-11	江苏
LQC-5	湖北麻城	LQC-12	湖北
LQC-6	湖北襄樊	LQC-13	四川
LQC-7	大别山		

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取经五氧化二磷干燥48h的各对照品适量,用甲醇溶解并定容,配成含新绿原酸 $0.123\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、绿原酸 $0.563\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、隐绿原酸 $0.233\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、咖啡酸 $0.252\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、木犀草苷 $0.544\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、迷迭香酸 $0.754\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、木犀草素 $0.197\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、芹菜素 $0.241\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液,备用。

2.2 供试品溶液制备 准确称取连钱草(LQC-9)药材粉末1g(过60目筛),加入80%甲醇30mL,加热回流45min,过滤,充分洗涤残渣和容器,合并至滤液中,蒸干,再加入80%甲醇超声溶解,定容至10mL量瓶中,过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜,备用。

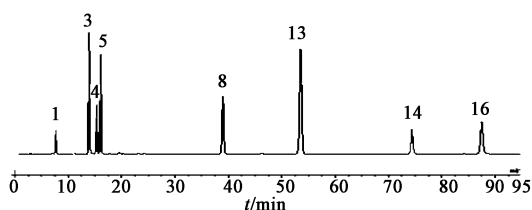
2.3 色谱条件与系统适应性试验 依利特Hypersil BDS C_{18} 色谱柱($4.6\text{ mm}\times 250\text{ mm}, 5\text{ }\mu\text{m}$),流速 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,检测波长330nm,柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$,进样量 $10\text{ }\mu\text{L}$,流动相为甲醇和0.1%磷酸水溶液,梯度条件见表2。

表2 色谱梯度条件

t/min	0.1% 磷酸	甲醇	t/min	0.1% 磷酸	甲醇
0~5	85	15	30~60	70~65	30~35
5~10	85~80	15~20	60~65	65~60	35~40
10~30	80~70	20~30	65~90	60~55	40~45

在上述条件下,新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖

啡酸、木犀草苷、迷迭香酸、木犀草素、芹菜素的分离均 >1.5 ,各主要峰分离良好(图1)。



1. 新绿原酸;3. 绿原酸;4. 隐绿原酸;5. 咖啡酸;
8. 木犀草苷;13. 迷迭香酸;14. 木犀草素;16. 芹菜素

图1 混合对照品 HPLC

2.4 特征峰与参照物峰的确 按上述测定条件,记录各批次的色谱图,采用对照品确认其中的已知成分为1号峰,新绿原酸;3号峰,绿原酸;4号峰,隐绿原酸;5号峰,咖啡酸;8号峰,木犀草苷;13号峰,迷迭香酸;14号峰,木犀草素;16号峰,芹菜素,样品的色谱图见图2。通过观察13个产地的色谱图,选取17个色谱峰作为指纹图谱的共有峰,共有指纹峰的峰面积占总峰面积的90%以上,迷迭香酸为主要的有效成分之一,从指纹图谱中可知其分离度较好,保留时间适中,峰面积较大因此选择迷迭香酸作为参照物峰(S)。

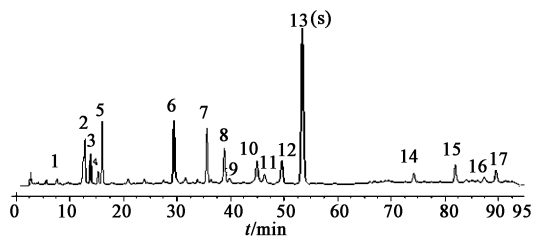


图2 连钱草样品 HPLC

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度实验 取同一份供试品溶液,连续进样6次,测定,考察仪器的精密度。其共有峰的相对保留时间的RSD在0.053%~0.312%, $<1\%$,相对峰面积的RSD在0.8%~3.939%, $<5\%$,符合指纹图谱的技术要求。表明仪器精密度良好。

2.5.2 稳定性实验 取同一份供试品溶液,分别在0,2,4,8,16h检测,考察样品溶液的稳定性。结果表明,其共有峰的相对保留时间的RSD在0.060%~0.312%之间, $<1\%$,相对峰面积的RSD在0.7%~3.936%之间, $<5\%$,样品溶液在16h内基本稳定。

2.5.3 重复性实验 按2.3项下的方法制备5份连钱草药材样品溶液并进行检测,考察实验方法的重复性,结果表明,共有峰的的相对保留时间的

RSD 在 0.101% ~ 0.382% (< 1%), 相对峰面积的 RSD 在 0.200% ~ 2.545% (< 5%), 符合色谱指纹图谱研究的技术要求。

2.6 指纹图谱的建立及分析 按照 2.2 项下的供试溶液制备方法和 2.3 项所示的色谱条件分析了 13 个批次的连钱草药材, 将所得的色谱图采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 A 版(国家药典委员会)软件进行自动校正匹配(图 3) HPLC 图谱的相关数据, 生成可全面反映多个色谱图特征的对照色谱图(图 4), 并以此模式为基准, 计算每个色谱图与之比较的相似度, 在 0.713 ~ 0.987。

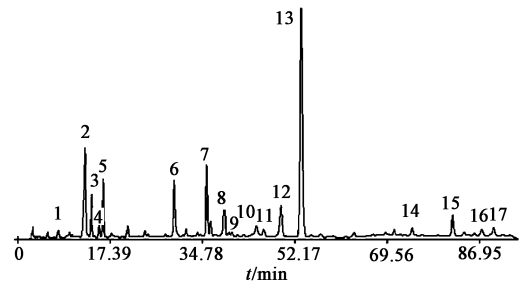


图 4 连钱草药材对照指纹图谱

峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示, 各批样品 17 个指纹峰的相对保留时间、相对峰面积比值, 重叠率和相似度较好, 测定结果见表 3, 4。

3 讨论

在选择流动相时以纯水-甲醇, 纯水-乙腈, 磷酸水溶液-乙腈以及甲醇乙腈-磷酸水溶液, 对连钱草进行了分离, 结果表明, 0.1% 的磷酸水溶液和甲醇作为流动相时, 绞股蓝黄酮类成分分离效果最好, 峰较多且峰形对称, 此时酚酸类成分指纹图谱结果稳定, 重现性好。

结果表明, 13 批连钱草药材指纹图谱中主要峰群的整体图貌基本一致, 其共有峰保留时间的比值基本一致, 但其共有峰面积的比值有一定差异, 说明不同批次药材含量有所差异, 可能与药材的种植、采收、贮存等环节有关, 正是由于不同产地的连钱草

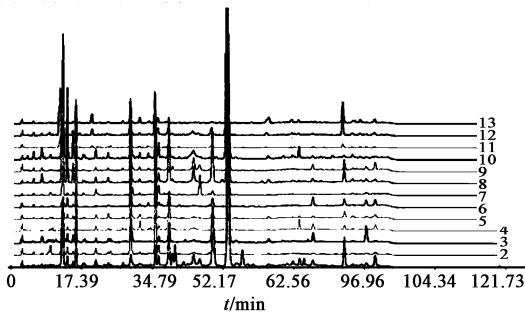


图 3 13 批连钱草药材图谱(时间窗 0.5)比较

分别取不同样品制备供试品溶液, 检测指纹图谱, 记录各共有峰的保留时间和峰面积, 以迷迭香酸色谱峰的保留时间和峰面积作为参照, 计算各共有

表 3 不同产地连钱草药材共有峰相对保留时间

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	均值	RSD%
1	0.144	0.143	0.144	0.143	0.143	0.143	0.143	0.144	0.144	0.144	0.143	0.144	0.141	0.143	0.597
2	0.241	0.240	0.240	0.240	0.240	0.240	0.240	0.241	0.240	0.242	0.230	0.230	0.230	0.238	1.933
3	0.261	0.260	0.260	0.260	0.260	0.260	0.260	0.261	0.260	0.262	0.261	0.262	0.261	0.261	0.295
4	0.288	0.287	0.287	0.287	0.287	0.286	0.287	0.288	0.287	0.289	0.287	0.288	0.287	0.287	0.261
5	0.301	0.301	0.301	0.300	0.300	0.300	0.300	0.302	0.301	0.303	0.302	0.302	0.301	0.301	0.317
6	0.393	0.391	0.391	0.391	0.391	0.391	0.391	0.392	0.391	0.394	0.376	0.377	0.376	0.388	1.743
7	0.554	0.551	0.554	0.551	0.551	0.550	0.552	0.554	0.551	0.555	0.552	0.553	0.552	0.552	0.280
8	0.668	0.665	0.667	0.666	0.666	0.665	0.666	0.669	0.667	0.670	0.666	0.688	0.667	0.667	0.225
9	0.682	0.681	0.681	0.680	0.680	0.680	0.680	0.683	0.681	0.685	0.680	0.682	0.680	0.681	0.223
10	0.729	0.728	0.728	0.727	0.727	0.727	0.728	0.729	0.728	0.733	0.729	0.730	0.729	0.729	0.221
11	0.844	0.841	0.841	0.840	0.840	0.840	0.841	0.844	0.842	0.846	0.843	0.842	0.843	0.842	0.219
12	0.936	0.928	0.928	0.927	0.927	0.927	0.927	0.931	0.929	0.934	0.927	0.930	0.928	0.929	0.325
S	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
14	1.394	1.390	1.390	1.389	1.389	1.388	1.389	1.395	1.390	1.399	1.396	1.399	1.394	1.393	0.281
15	1.539	1.535	1.535	1.533	1.534	1.532	1.528	1.540	1.535	1.545	1.534	1.538	1.533	1.536	0.276
16	1.641	1.636	1.635	1.634	1.634	1.632	1.633	1.641	1.636	1.646	1.642	1.646	1.642	1.638	0.298
17	1.682	1.678	1.679	1.675	1.675	1.674	1.664	1.683	1.678	1.691	1.681	1.686	1.681	1.679	0.388

表 4 不同产地连钱草药材共有峰相对峰面积

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	均值	RSD/%
1	0.008	0.014	0.046	0.011	0.022	0.030	0.029	0.028	0.022	0.019	0.017	0.010	0.013	0.021	51.101
2	0.198	0.534	0.339	0.143	0.310	0.263	0.673	0.243	0.261	0.266	1.251	0.309	0.597	0.414	71.736
3	0.028	0.048	0.045	0.038	0.060	0.157	0.033	0.224	0.102	0.100	0.062	0.059	0.049	0.077	73.282
4	0.013	0.017	0.039	0.011	0.031	0.039	0.046	0.044	0.046	0.037	0.018	0.016	0.028	0.030	44.490
5	0.124	0.097	0.125	0.241	0.347	0.371	0.184	0.055	0.198	0.045	0.334	0.124	0.283	0.195	57.497
6	0.024	0.050	0.027	0.059	0.068	0.030	0.097	0.018	0.025	0.018	0.182	0.036	0.223	0.066	99.067
7	0.056	0.336	0.149	0.268	0.382	1.155	0.134	0.065	0.292	0.114	0.325	0.093	0.100	0.267	108.68
8	0.071	0.722	0.006	0.201	0.347	1.345	0.739	0.046	0.244	0.096	0.743	0.214	0.326	0.392	99.177
9	0.032	0.069	0.037	0.050	0.031	0.091	0.191	0.025	0.016	0.027	0.073	0.025	0.101	0.056	87.218
10	0.162	0.079	0.158	0.425	0.289	0.392	0.049	0.237	0.175	0.041	0.317	0.033	0.024	0.183	75.930
11	0.092	0.036	0.058	0.080	0.082	0.070	0.015	0.089	0.188	0.062	0.019	0.059	0.012	0.066	69.27
12	0.235	0.069	0.383	0.070	0.186	0.236	0.119	0.234	0.159	0.017	0.304	0.052	0.062	0.164	67.840
S	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
14	0.025	0.010	0.081	0.089	0.036	0.254	0.012	0.014	0.053	0.005	0.042	0.003	0.003	0.048	141.39
15	0.125	0.028	0.006	0.063	0.123	0.195	0.027	0.059	0.100	0.018	0.376	0.105	0.502	0.133	111.50
16	0.019	0.019	0.182	0.028	0.043	0.209	0.066	0.016	0.040	0.004	0.076	0.008	0.010	0.055	119.34
17	0.052	0.028	0.015	0.101	0.044	0.200	0.020	0.007	0.104	0.011	1.131	0.027	0.126	0.067	90.207

药材,其有效成分的种类和含量存在一定的差异,因此导致有些产地的相似度较低。

[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,2010:134.

[2] 廖亚玲,安徽,胡光煦. 连钱草高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 医药导报,2011,30(8):1075.

[3] 杨念云,段金敖. 连钱草黄酮类化学成分的研究[J]. 中国药科大学学报,2005,36(3):223.

[4] 杨念云,段金敖,李萍,等. 连钱草的化学成分[J]. 中国天然药物,2006,4(2):98.

[5] 杨念云,段金敖. 连钱草的化学成分研究[J]. 药学学报,2006,41(5):431.

[6] 张前军. 连钱草、假木豆化学成分及其抗菌活性研究[D]. 贵阳:贵州大学,2006.

[7] 詹雪艳,史新元,段天璇,等. 色谱指纹图谱相似度方法的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(2):248.

[8] 谢培山. 中药色谱指纹图谱[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:485.

[9] 关洪月,李林,刘晓,等. 中药指纹图谱相似度计算方法探析[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(48):282.

[10] 刘布鸣,刘偲翔,林霄,等. 十大功劳 HPLC 指纹图谱及聚类分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(4):95.

[11] 聂磊,曹进,罗国安,等. 中药指纹图谱相似度评价方法的比较[J]. 中成药,2005,27(3):249.

[12] 涂华,陈碧琼,张燕军. 天然类黄酮类物质的提取工艺研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(6):277.

[13] 颜月园,萧伟,吴云,等. 散结镇痛胶囊中黄酮类成分的指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(5):58.

[责任编辑 顾雪竹]