

返魂草药材的 HPLC 指纹图谱研究

马鸿雁^{1,2}, 杨莉¹, 王长虹¹, 王峥涛^{1*}

(1. 上海中医药大学中药研究所 中药标准化教育部重点实验室, 上海 201203;
2. 广东药学院中药学院, 广州 510000)

[摘要] 目的: 研究返魂草药材的 HPLC 指纹图谱方法, 为科学评价该药材质量提供了新方法。方法: 利用 HPLC 方法, 色谱条件 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温 30 ℃, 流动相为乙腈-0.1% 三氟乙酸溶剂系统, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm。对不同产地的返魂草药材进行研究, 采用药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004A 对指纹图谱进行分析。结果: 得到分离度, 重复性均较好的返魂草药材 HPLC-UV 指纹图谱, 标定 14 个共有峰, 11 批返魂草药材的相似度均 > 0.900。结论: 该方法简便可靠, 重复性好, 可用于返魂草药材的质量控制。

[关键词] 返魂草; 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(2012)13-0101-04

Studies on HPLC Fingerprint of *Senecio cannabinifolius*

MA Hong-yan^{1,2}, YANG Li¹, WANG Chang-hong¹, WANG Zheng-tao^{1*}

(1. Key Laboratory of Standardization of Chinese Medicine Ministry of Education, Shanghai
Univeristiy of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

2. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical College, Guangzhou 510000, China)

[Abstract] **Objective:** The chromatographic fingerprint of *Senecio cannabinifolius* was established, which created a new method for evaluating and controlling the quality. **Method:** HPLC analysis was carried out on Agilent

[收稿日期] 20111213(018)

[基金项目] 上海市科学技术委员会择优委托项目(09dz1974302); 中药现代化专项项目(10DZ1975900)

[通讯作者] * 王峥涛, 博士, 教授, 从事中药的物质基础及质量评价研究, Tel: 021-51322507, Fax: 021-51322519, E-mail: wangzht@hotmail.com

采用超声处理 30 min、加热回流 1 h、索氏提取 2 h 进行提取方法考察, 超声提取含量测定结果较低, 加热回流与索氏提取结果相差不大, 但加热回流更简便、快捷, 故采用加热回流法。采用甲醇、水、50% 甲醇作提取溶剂进行考察, 用 50% 甲醇提取所得含量比高, 且杂质较少, 故采用 50% 甲醇作为提取溶剂。以加热回流 30 min, 1, 2 h, 进行提取时间考察, 加热回流 30 min, 测得结果较低, 加热回流 1, 2 h, 两者无明显差别, 故加热回流时间定为 1 h。

[参考文献]

[1] 陈素珍. 滇白株挥发油化学成分的研究[J]. 中草药, 1990, 21(6): 42.

[2] 马学毅, 魏涛, 翟建军, 等. 贵阳滇白株精油化学成分

研究[J]. 分析测试通报, 1992, 11(1): 63.

[3] 马小军, 杜程芳, 郑俊华, 等. 滇白株地上部分化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(12): 844.

[4] 张治针, 果德安, 李长龄, 等. 滇白株化学成分的研究(I)[J]. 中草药, 1998, 29(8): 508.

[5] 张治针, 小池一男, 果德安, 等. 滇白株化学成分的研究(II)[J]. 中草药, 1999, 30(3): 167.

[6] 张治针, 果德安, 李长龄, 等. 滇白株木脂素苷的研究[J]. 药学学报, 1999, 34(2): 128.

[7] 中国药典. 一部[S]. 2010: 135.

[8] 宋志钊, 刘元, 李文琪. HPLC 法测定亮叶杨桐叶中槲皮苷的含量[J]. 中国民族民间医药杂志, 2011, 20(5): 27.

[责任编辑 顾雪竹]

Zorbax SB-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), with a mobile phase of acetonitrile-1% trifluoroacetic acid system (gradient elution). The detection wavelength was set at 254 nm and flow rate was 1.0 mL · min⁻¹. Column temperature was set at 30 °C. The obtained data was analyzed by computer aided similarity evaluation. **Result:** Fourteen common peaks were confirmed in fingerprints. The similarity degree of the samples was found to be higher than 0.900. **Conclusion:** This method is simple, credible and of good reproducibility, which can be used for their quality control.

[**Key words**] *Senecio cannabifolius*; HPLC; fingerprint

返魂草为我国长白山地区的一种特色资源,该药材为菊科植物麻叶千里光和其变种单麻叶千里光的干燥全草,具清热祛痰、镇咳平喘之功效^[1]。以其为原料的制剂如返魂草颗粒(肺宁颗粒)、肺宁口服液等被广泛用于治疗肺内感染、慢性支气管炎、喘息性支气管炎等疾病。目前,返魂草药材及其相关制剂的质量控制水平还很低,卫生部部颁标准仅有采用薄层色谱法对返魂草颗粒定性鉴别的描述,有少量文献报道对其绿原酸或咖啡酸含量进行测定^[2-4],但未见其指纹图谱研究的报道。本课题组对返魂草进行了系统的化学成分研究,发现其主要活性成分为有机酸和黄酮成分^[5-8]。本文采用 HPLC 方法,建立返魂草药材的这两类化学成分指纹图谱,并将其与千里光属其他 5 种药用植物的液相图谱进行比较研究和相似度考察,为该药材的质量控制研究提供参考。

1 材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(自动进样器,四元泵,柱温箱,DAD 检测器)(Agilent,美国),BP211D 型电子天平(Satorius Co. Ltd.,德国),Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。甲醇、乙醇、醋酸均为分析纯(上海国药集团化学试剂有限公司),乙腈为色谱纯(Merck 公司),超纯水为 Milli-Q 处理水(Millipore Co.)。对照品绿原酸、金丝桃苷为自制,纯度经高效液相按面积归一化法测定均 >98%。

从吉林省共收集了不同产地的单麻叶千里光样品 8 份,麻叶千里光样品 3 份(表 1)。从全国共收集千里光属羽叶千里光,菊状千里光,欧洲千里光,峨眉千里光,千里光药材各一份(表 2)。以上药材均为自采,经上海中医药大学中药研究所吴立宏博士鉴定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 三氟乙酸溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 25 min, 8% ~ 18% A,

表 1 返魂草药材来源

No.	采集地	基源
SC01	柳河县凉水	<i>Senecio cannabifolius</i> var. <i>integrilifolius</i>
SC02	哈泥湿地自然保护区	<i>S. cannabifolius</i> var. <i>integrilifolius</i>
SC03	江源县三岔子	<i>S. cannabifolius</i> var. <i>integrilifolius</i>
SC04	通化县兴林	<i>S. cannabifolius</i> var. <i>integrilifolius</i>
SC05	安图县白河	<i>S. cannabifolius</i> var. <i>integrilifolius</i>
SC06	通化县江甸子	<i>S. cannabifolius</i> var. <i>integrilifolius</i>
SC07	抚松县松江河	<i>S. cannabifolius</i> var. <i>integrilifolius</i>
SC08	靖宇县燕平	<i>S. cannabifolius</i> var. <i>integrilifolius</i>
SC09	柳河县凉水	<i>S. cannabifolius</i>
SC10	哈泥湿地自然保护区	<i>S. cannabifolius</i>
SC11	江源县三岔子	<i>S. cannabifolius</i>

表 2 千里光属其他药材来源

No.	采集地	基源
SA01	吉林	<i>S. argunensis</i>
SL01	四川	<i>S. laetus</i>
SV01	吉林	<i>S. vulgaris</i>
SF01	四川	<i>S. faberi</i>
SS01	安徽	<i>S. scandens</i>

25 ~ 50 min, 18% ~ 22% A), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 254 nm, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。

2.2 供试品溶液的制备 取药材粉末 0.25 g(过 40 目筛),精密称定,精密加入 70% 甲醇 10 mL,称定质量,浸泡 30 min 后超声提取 60 min,静置到室温,补足质量,摇匀,3 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。

2.3 对照品溶液的制备 称取对照品绿原酸、金丝桃苷适量,精密称定,用 70% 甲醇溶解,制成分别含对照品 148, 50 mg · L⁻¹ 的溶液,0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密密度试验 取同一供试品溶液,连续进样

6 次测定,记录指纹图谱。以金丝桃苷峰为参照峰,计算 14 个特征色谱峰的相对保留时间和相对峰面积, RSD 均 < 3%,符合色谱指纹图谱要求,说明精密密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取同一份供试品溶液,分别于 2, 6, 12, 16, 24 h 进样测定,以金丝桃苷峰为参照峰,分别计算 14 个特征色谱峰的相对保留时间和相对峰面积, RSD 均 < 3%,说明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.3 重复性试验 同一样品粉末分别精密称定 6 份,按照上述样品溶液制备方法制成供试品溶液,进样检测,以金丝桃苷峰为参照峰,计算 14 个特征色谱峰的相对保留时间和相对峰面积, RSD 均 < 3%,符合色谱指纹图谱要求,重复性良好。

2.5 指纹图谱建立及相似度分析

2.5.1 返魂草药材的 HPLC 指纹图谱的建立 按 2.1 项下方法测定样品,将 11 批返魂草药材的液相图谱导入国家药典委员会指定的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版”(图 1),以样品 SC01 为参照图谱,时间窗宽度为 0.5,采用中位数法计算。采用该软件生成返魂草共有模式的对照指纹图谱,得到 14 个共有峰,见图 2。通过与对照品图谱比对,指认 4 号峰为绿原酸,9 号峰为金丝桃苷。因金丝桃苷峰面积大且峰形最稳定故以其为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间,11 批样品的相对保留时间的 RSD < 3%,符合指纹图谱的要求。

利用该软件对 11 批样品的指纹图谱进行数据处理,相似度分析结果见表 3 所示。结果可以看出,11 批返魂草指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均 > 0.9,说明各产地的药材具有较高的均一性。

2.5.2 千里光属其他药材与返魂草指纹图谱的相似度研究 按 2.1 项下方法测定样品,将 5 份千里光属其他药材的液相图谱和按 2.5.1 项下得到的返魂草对照指纹图谱导入国家药典委员会指定的“中

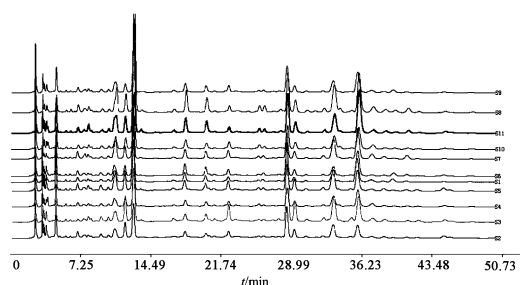


图 1 11 批返魂草药材的 HPLC 指纹图谱

表 3 返魂草药材相似度分析

No.	相似度	No.	相似度
SC01	0.977	SC07	0.976
SC02	0.940	SC08	0.963
SC03	0.988	SC09	0.994
SC04	0.951	SC10	0.923
SC05	0.985	SC11	0.992
SC06	0.976		

表 4 返魂草药材与千里光属 5 种药用植物的相似度分析

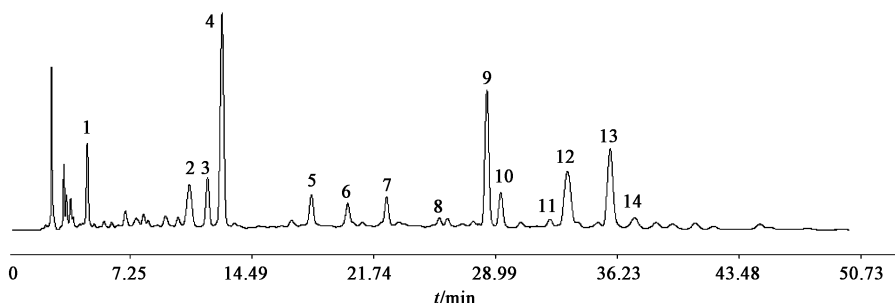
No.	相似度	No.	相似度
SA01	0.767	SF01	0.401
SL01	0.771	SS01	0.744
SV01	0.641		

药色谱指纹图谱相似度评价系统 B 版”,相似度分析结果见表 4。

3 讨论

3.1 流动相的选择 比较了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-1% 三氟乙酸(磷酸)、乙腈-0.1% 甲酸(磷酸)等不同溶剂系统。结果表明,乙腈-0.1% 三氟乙酸溶液的流动相中,色谱峰的分布、峰形和分离度均优于其他系统。因此,选择其为该指纹图谱的流动相。

3.2 检测波长的选择 根据文献及前面的化学成分研究工作,可以看出返魂草中的主要化学成分有



4. 绿原酸; 9. 金丝桃苷

图 2 返魂草药材的对照指纹图谱

酚酸、黄酮类及萜类成分。由于萜类成分的紫外吸收不明显,本文建立的方法主要是获得酚酸和黄酮类成分的指纹峰。绿原酸类成分在 310,325 nm 有最大吸收,黄酮类成分在 260,360 nm 有最大吸收,通过初步分析,样品中还有一类成分在 230 nm 有最大吸收,经实验比较,通过综合考虑在不同波长下出峰的多少和各成分分离情况及各色谱峰的丰度,最后选择 254 nm 下检测,这三类成分都有良好的吸收值。

3.3 样品提取条件的优化 试验比较了不同比例的甲醇(5%,20%,50%,70%,90%)通过不同提取方法(超声 30 min,超声 60 min,加热回流 2 h)得到的 HPLC 指纹图谱,结果显示 70% 甲醇超声 60 min 得到色谱图信息最丰富,分离效果最好,故最终采用的方法,取药材 0.25 g(过 40 目筛),精密称定,精密加入 70% 甲醇 10 mL,浸泡 30 min 后,超声提取 60 min,放冷,补重,3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,过滤,即得。

3.4 返魂草指纹图谱在药材质量评价方面的意义
通过建立返魂草对照指纹图谱,采用相似度软件对各批药材进行比较,返魂草不同产地药材与对照指纹图谱之间的相似度均 >0.9,说明不同产地的返魂草药材化学成分很相似,麻叶千里光和单麻叶千里光的相似度很高。绿原酸和金丝桃苷的色谱峰占比较高的比例,说明这两者可作为返魂草质量评价中含量测定的指标性成分,从而完善返魂草质量评价

的指标。

建立的返魂草指纹图谱与千里光属其他药材的比较中,相似度均很低,表明建立的方法可很好的区别返魂草药材与其他品种。

[致谢] 通化师范学院于俊林教授对本实验的药材采集提供帮助。

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第 7 册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:943.
- [2] 卫昌华. 高效液相色谱法测定返魂草颗粒中绿原酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(4):15.
- [3] 姜振邦,刘有平,李小童,等. RP-HPLC 同时测定返魂草中 3 种酚酸类成分[J]. 中草药,2009,40(11):1819.
- [4] 刘艳清,汪洪武,鲁湘鄂. RP-HPLC 测定返魂草颗粒中绿原酸和咖啡酸含量[J]. 中成药,2007,29(10):1451.
- [5] 马鸿雁,杨莉,张勉,等. 单麻叶千里光的一个新化学成分[J]. 药学学报,2008,43(6):626.
- [6] 马鸿雁,王长虹,杨莉,等. 单麻叶千里光的化学成分[J]. 中国天然药物,2009,7(1):28.
- [7] 马鸿雁,王峥涛. 单麻叶千里光的化学成分研究(Ⅲ)[J]. 广东药学院学报,2010,26(3):246.
- [8] 马鸿雁,杨莉,王峥涛,等. 单麻叶千里光中肝毒性吡咯里西啶生物碱的分离与鉴定[J]. 中国中药杂志,2011,36(2):9.

[责任编辑 顾雪竹]

《中国中药杂志》2012 年征订启事

《中国中药杂志》系中国科协主管,中国药学会主办,中国中医科学院中药研究所承办的综合性中药学术期刊。创刊于 1955 年 7 月,是创刊最早、发行量最大的中药学术刊物。《中国中药杂志》全面反映我国中医科研最高学术水平,主要报道该领域新成果、新技术、新方法与新思路,内容包括栽培、资源与鉴定、炮制、药剂、化学、药理、不良反应、临床等。设有专论、综述、研究论文、研究报告、临床、学术探讨、药事管理、经验交流、信息等栏目。主要读者对象为医药领域各级管理部门、研究院所、大专院校、企业以及医院等从事医药科研、管理、生产、医院制剂及临床研究等方面的专业人员。

《中国中药杂志》现为半月刊,128 页,2012 年定价每期 30 元,全年 24 期定价为 720 元。国内刊号 11-2272/R,国际刊号 1101-5302。

本刊现已全面实现网络编辑办公,如欲投稿或联系本刊、获取本刊各种信息动态请登录中国中药杂志网站 www.cjemm.com.cn 或 www.中国中药杂志.com。

联系电话:稿件查询 010-64045830 转 602;主任电话 010-64058556;资源与栽培栏编辑:010-64048925;制剂栏编辑:010-64040392;化学栏编辑:010-64040113;药理栏编辑:010-84022522;临床栏编辑:010-64059766;电子杂志制作发行及网上维护:010-64030625。