

不同产地单芽狗脊蕨 HPLC 指纹图谱

马秉智¹, 朱立平¹, 鞠海¹, 高增平^{2*}

(1. 中日友好医院药学部, 北京 100029; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的: 建立不同产地单芽狗脊蕨 HPLC 指纹图谱测定方法。方法: 采用 HPLC 测定了 9 个不同产地单芽狗脊蕨样品。色谱条件为 Diamonsil™ C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm); 流动相 A 相为乙腈, B 相为水 (梯度洗脱 0 ~ 60 min 22% A → 100% A); 检测波长 265 nm; 流速 1.0 mL · min⁻¹; 柱温 25 °C。结果: 建立了不同产地单芽狗脊蕨的 HPLC 指纹图谱, 并进行了相似度比较, 进一步对其中的山柰素-3-O-α-L-鼠李糖基-7-O-α-L-鼠李糖苷、山柰素-3-O-α-L-(4-O-乙酰基)鼠李糖基-7-O-α-L-鼠李糖苷进行了归属。结论: 该法操作简便、重复性好, 可用于单芽狗脊蕨质量控制。

[关键词] 单芽狗脊蕨; 高效液相色谱法; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)09-0151-03

Study on Fingerprints of *Woodwardiae unigemmata* from Different Habitats by HPLC

MA Bing-zhi¹, ZHU Li-ping¹, JU Hai¹, GAO Zeng-ping^{2*}

(1. China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China; 2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the fingerprints of *Woodwardiae unigemmata* from different habitats by HPLC. **Method:** HPLC was applied to detect *W. unigemmata* samples from 9 different habitats with a Diamonsil™ C₁₈ column by acetonitrile A-water B as mobile phase (gradient elute: 0-60 min, 22% -100% A). The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹. The column temperature was at 25 °C and the UV detection wavelength was set at 265 nm. **Result:** The HPLC fingerprints of *W. unigemmata* from different habitats were established and the correlation coefficients of them were calculated. Furthermore, two peaks in HPLC chromatogram were identified as kaempferol-3-O-α-L-rhamnopyranoside-7-O-α-L-rhamnopyranoside, kaempferol-3-O-α-L-(4-O-acetyl)-rhamnopyranoside-7-O-α-L-rhamnopyranoside respectively. **Conclusion:** The method is simple, reproducible and

[收稿日期] 20111115(006)

[第一作者] 马秉智, 硕士, 主管药师, 从事医院中药制剂研究与开发, Tel: 010-84205688, E-mail: mbz20052002@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 高增平, 博士, 教授, 从事中药新药研究与开发, Tel: 13661035777, E-mail: gaozengping2008@yahoo.com.cn

酯类成分[J]. 中草药, 2005, 36(12): 1763.

[3] Pan L, Zhou P, Zhang X, et al. Skeleton-rearranged pentacyclic diterpenoids possessing a cyclobutane ring from *Euphorbia wallichii* [J]. Org Lett, 2006, 8(13): 2775.

[4] Shi Q W, Su X H, Kiyota H. Chemical and pharmacological research of the plants in genus *Euphorbia* [J]. Chem Rev, 2008, 108(10), 4295.

[5] 王环, 张晓峰, 潘莉, 等. 大果大戟的化学成分[J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15(6): 483.

[6] 王环, 张晓峰, 马云保, 等. 大果大戟的二萜成分

[J]. 中草药, 2004, 35(6): 611.

[7] 王环, 张晓峰, 罗晓东. 大果大戟中的一个对映-贝壳杉烷型二萜[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(1): 53.

[8] Wang H, Zhang X F, Cai X H, et al. Three new diterpenoids from *Euphorbia wallichii* [J]. Chin J Chem, 2004, 22(2): 199.

[9] Zhang X F, Wang H, Sheng J W, et al. A new guaiane diterpenoid from *Euphorbia wallichii* [J]. Nat Prod Res, 2004, 20(1): 89.

[责任编辑 邹晓翠]

can be used for quality control of *W. unigemmata*.

[Key words] *Woodwardiae unigemmata*; HPLC; fingerprint

狗脊贯众为商品贯众的一种,为乌毛蕨科植物单芽狗脊蕨 *Woodwardia unigemmata* (Makono) Nakai 和狗脊蕨 *W. japonica* Sm. 带叶柄残基的干燥根茎^[1]。历代本草记载和临床使用的贯众品种甚多,20 世纪以来据调查,我国大部分地区使用的贯众是药典收载的绵马贯众和狗脊贯众^[2]。贯众具有清热解毒、杀虫散瘀的功能,主治感冒、疮痍肿毒,虫积腹痛,便血,血崩等,可预防感冒、流感及流行性脑膜炎^[3],李玉洁等^[4]研究紫萁贯众和荚果蕨贯众醇提物对内毒素致小鼠全身炎症反应综合征模型有一定保护作用。在贯众质量控制方面,厉博文等^[5]建立了紫萁贯众中总多糖的含量测定方法,结果发现,紫萁贯众多糖含量因产地和采收期变化而不同;本实验收集了 9 个不同地区的单芽狗脊蕨样品,采用 HPLC,建立了它们的甲醇提取物指纹图谱,并对其中的山柰素-3-O- α -L-鼠李糖基-7-O- α -L-鼠李糖苷、山柰素-3-O- α -L-(4-O-乙酰基)鼠李糖基-7-O- α -L-鼠李糖苷进行了归属。

1 材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪,包括 G1311A 四元泵、G1313A 在线脱气机、G1316A 柱温箱、G1315BDAD 检测器、Agilent Chem 工作站;ER-182A 型电子天平(Tokyo Japan)。样品来源见表 1;对照品山柰素-3-O- α -L-鼠李糖基-7-O- α -L-鼠李糖苷(简称 a)、山柰素-3-O- α -L-(4-O-乙酰基)鼠李糖基-7-O- α -L-鼠李糖苷(简称 b)(自制,HPLC 归一化法测定纯度分别为 99.9%、98.5%)。乙腈为色谱纯,甲醇为分析纯,水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Diamonsil™ C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm),流动相乙腈-水,梯度洗脱 60 min,乙腈比例从 22% 逐渐变化到 100%,流速 1.00 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,检测波长 265 nm,进样量 20 μL。
2.2 对照品溶液的制备 精密称取 a、b 对照品适量,加甲醇分别制成 1 mL 含 16.88、20.45 μg 的溶液,摇匀,备用。

2.3 供试品溶液的制备 取成都样品粉末(过 60 目筛)约 1.0 g,精密称定,置 50 mL 锥形瓶中,加甲醇 25.00 mL,称定质量,回流提取 1 h,冷却至室温,用甲醇补足质量,摇匀,0.20 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取成都样品制备的供试品溶液,连续进样 5 次,测定指纹图谱,经国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A 版)进行评价,结果表明,相似度 > 0.999,单峰面积 > 10% 总峰面积的色谱峰,其相对保留时间和峰面积的 RSD 均 < 3%,表明精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取成都样品 5 份,按照 2.1 项下色谱条件进样分析,经国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版》进行评价,结果表明,相似度 > 0.997,单峰面积 > 10% 总峰面积的色谱峰,其相对保留时间和峰面积的 RSD 均 < 3%,表明重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取成都样品在 0, 2, 4, 6, 8 h 分别进样,按照 2.1 项下色谱条件进样分析,经国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版》进行评价,结果表明,相似度 > 0.998,单峰面积 > 10% 总峰面积的色谱峰,其相对保留时间和峰面积的 RSD 均 < 3%,表明供试品溶液在 8 h 内稳定性良好。

2.5 HPLC 指纹图谱的建立及评价

2.5.1 样品测定 取 9 个产地单芽狗脊蕨样品,分别按照 2.3 项下供试品溶液的制备方法制备样品,再按照 2.1 项下色谱条件进样分析,记录 60 min 色谱图。根据样品溶液 HPLC 提供的相关参数,确定单芽狗脊蕨共有峰为 9 个,见图 1。

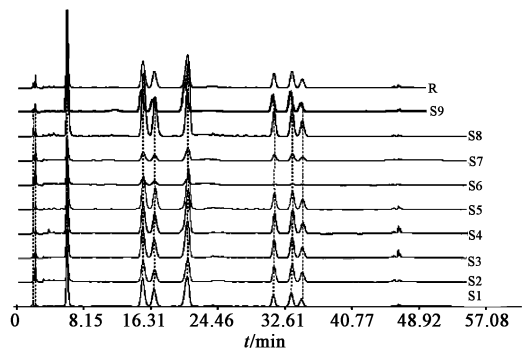


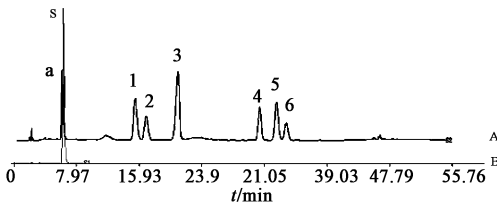
图 1 不同产地单芽狗脊蕨 HPLC 指纹图谱

2.5.2 指纹图谱相似度计算 将 9 个样品的色谱图导入国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A 版),设定匹配模块,进行谱峰自动匹配,结果见图 1 和表 1。

表 1 单芽狗脊蕨来源及 HPLC 指纹图谱相似度分析

No.	来源	相似度
S ₁	新疆	0.943
S ₂	山西	0.983
S ₃	宁夏	0.987
S ₄	内蒙	0.980
S ₅	河南	0.977
S ₆	吉林	0.681
S ₇	山东	0.944
S ₈	北京	0.934
S ₉	成都	0.995
R	对照	

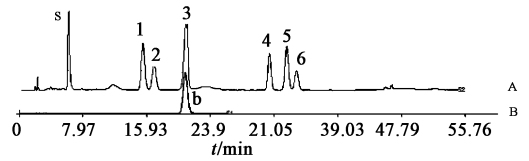
2.5.3 主要色谱峰的鉴定 按照 2.1 项下色谱条件,分别测定 a, b 对照品,并与样品色谱指纹图谱中相应色谱峰进行比较,发现样品色谱指纹图谱中 S 号峰和 4 号峰的保留时间分别与 a, b 对照品吻合,故样品色谱指纹图谱中 S 号峰鉴定为 a, 3 号峰鉴定为 b, 结果见图 2, 3。



A. 样品; B. 对照品;

a. 山柰素-3-O- α -L-鼠李糖基-7-O- α -L-鼠李糖苷

图 2 对照品 a 色谱峰的确认



A. 样品; B. 对照品;

b. 山柰素-3-O- α -L-(4-O-乙酰基)鼠李糖基-7-O- α -L-鼠李糖苷

图 3 对照品 b 色谱峰的确认

3 讨论

本文是在文献[2]的基础上,对收集到的 9 个单芽狗脊蕨样品进行指纹图谱研究。结果发现,吉林产单芽狗脊蕨的指纹图谱与其他产地差异较大,有待于进一步结合药理实验进行研究。

检测波长的确定:吸取山柰素-3-O- α -L-鼠李糖基-7-O- α -L-鼠李糖苷对照品溶液适量,以甲醇为空白,在 200 ~ 600 nm 扫描,测定其紫外吸收光谱,结果表明在 265, 342 nm 有最大吸收峰。比较两个波长下记录的供试品色谱图,色谱峰的数目相同,但在 265 nm 波长下得到的色谱图中各峰面积均较大,因此选定 265 nm 作为检测波长。

[参考文献]

- [1] 吴兆洪. 中国植物志. 第 4 卷. 第 2 分册[M]. 北京: 科学出版社, 1999:203.
- [2] 高增平, 王宝华, 江海龙, 等. 商品贯众的品种调查[J]. 中医药学刊, 2003, 21(5):824.
- [3] 肖培根. 新编中药志. 第 2 卷[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002:615.
- [4] 李玉洁, 杨庆, 杨岚. 内毒素致小鼠 SIRS 模型建立及两种贯众醇提物对其保护作用的初步观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8):187.
- [5] 厉博文, 张东, 杨岚. 紫萁贯众中多糖的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10):41.

[责任编辑 邹晓翠]