

灯心草药材 RP-HPLC 指纹图谱研究

简伟杰, 段琼, 段天璇, 游杰舒, 黄建梅*

(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的: 建立灯心草药材的 RP-HPLC 指纹图谱, 探讨指纹图谱在灯心草质量评价方面的应用。方法: 采用 Agilent HC-C₁₈ 为色谱柱, 以甲醇-水为流动相梯度洗脱, 检测波长为 254 nm, 在 40 min 内获得灯心草药材的 HPLC 指纹图谱。采用国家药典委员会的中药色谱指纹图谱相似度评价系统生成对照指纹图谱, 并进行相似度分析, 结果: 11 批灯心草药材的指纹图谱包含 16 个共有峰, 其中灯心草的生物活性成分去氢厄弗酚吸收峰的峰面积百分比为 45.14% ~ 67.86%。11 批药材的指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均 ≥ 0.933。结论: 市售灯心草药材的指纹图谱有很高的相似度, 说明市售灯心草的化学成分有较高的均一性, HPLC 指纹图谱可用于灯心草的质量评价。

[关键词] 灯心草; 指纹图谱; 高效液相色谱; 质量评价; 去氢厄弗酚

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)10-0060-04

HPLC Fingerprint of Medulla Junci

JIAN Wei-jie, DUAN Qiong, DUAN Tian-xuan, YOU Jie-shu, HUANG Jian-mei*

(School of Chinese Materia Medica Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the HPLC fingerprint of Medulla Junci for its quality evaluation. **Method:** HPLC fingerprint was achieved on an Agilent HC-C₁₈ column with methanol-water as mobile phase in gradient elution and 254 nm as detection wavelength. The time for analysis was 40 minutes. Similarity of HPLC fingerprint was performed on the Similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of Traditional Chinese Medicine. **Result:** Eleven samples were analyzed. The common pattern of HPLC fingerprint of Medulla Junci consisted of 16 peaks. The rate of peak area of dehydroeffusol, a bioactive compound of Medulla Junci, was from 45.14% to 67.86% in the fingerprints of 11 samples. The HPLC fingerprints of 11 samples showed over 90% similarity to the common pattern of HPLC fingerprint. **Conclusion:** The fingerprints of Medulla Junci on market have high similarity, indicating a high chemical homogeneity of Medulla Junci. HPLC fingerprint can be used in quality evaluation of Medulla Junci.

[Key words] Juncus effusus; fingerprint; HPLC; quality evaluation; dehydroeffusol

灯心草 *Juncus effusus* L. 为灯心草科灯心草属多年生草本植物。我国灯心草资源较为丰富, 广泛分布于长江南北各地区, 通常生长在草甸, 沼泽, 水边及阴湿的环境中^[1]。灯心草药材为灯心草的干燥茎

髓, 甘、淡, 微寒; 归心、肺、小肠经; 能清心火, 利小便; 用于治疗心烦失眠, 尿少涩痛, 口舌生疮^[2]。灯心草中主要化学成分为菲类衍生物^[3]和三萜类化合物^[4-5], 并含有甙类化合物。其中菲类化合物是灯心草重要的生物活性成分^[6]。国内外学者的研究发现灯心草中的菲类化合物具有很强的抗菌、抗氧化、抗肿瘤及抗藻类的活性^[7]。本研究小组的研究表明, 去氢厄弗酚等多个菲类化合物为灯心草清心除烦的物质基础之一^[8]。

灯心草广泛用于临床, 但 2010 年版《中国药典》

[收稿日期] 20110111(001)

[基金项目] 新世纪优秀人才支持计划

[第一作者] 简伟杰, 硕士研究生, 从事中药质量控制研究, Tel: 13810826017, E-mail: jwj1004@163.com

[通讯作者] * 黄建梅, Tel: 010-84738619, E-mail: huangjm@mail.bucm.edu.cn

中还没有相应的理化标准,而且不同产地灯心草质量差异也不清楚。本文采用 RP-HPLC 建立灯心草药材的对照指纹图谱,并对不同来源的灯心草药材进行比较研究和相似度考察,为灯心草的质量控制提供有效方法和依据。

1 材料

1.1 样品来源 从各地药材市场购买灯心草药材共 11 批,经北京中医药大学中药学院生药系杨瑶珺副教授鉴定为灯心草 *J. effusus* 的干燥茎髓。市售灯心草药材大多切段、密封包装,仅购自西安和广州的未密封包装。11 批药材从性状角度看,其新鲜度略有差别(表 1)。

表 1 灯心草药材来源

批号	购买地	产地	饮片新鲜度
S ₁	江西	江西	一般
S ₂	安徽	四川	一般
S ₃	广州	未知	较好
S ₄	黑龙江	河南	一般
S ₅	湖北	湖北	一般
S ₆	安国	江西	一般
S ₇	贵州	四川	一般
S ₈	西安	安徽	较差
S ₉	云南	未知	一般
S ₁₀	福建	福建	一般
S ₁₁	成都	未知	一般

1.2 仪器与试剂 岛津 LC-20A 高效液相色谱仪(DGU-20A_s 脱气机,LC-20AT 高效泵,SPD-20A 检测器,SIL-20A 自动进样器,CTO-10ASvp 柱温箱,LCsolution 工作站),KQ3200DE 型数控超声提取器,BL-100 型高速多功能粉碎机;甲醇为色谱醇(fisher 试剂),水为娃哈哈纯净水;去氢厄弗酚对照品为本研究小组自制,结构经 UV,IR,NMR,MS 等波谱方法鉴定。纯度经 HPLC 检测超过 98%。

2 方法

2.1 色谱分析条件 Agilent HC-C₁₈(4.6 mm × 250 mm,5 μm)(Made in USA),DIKMA C₁₈ 保护柱,水与甲醇梯度洗脱(0~30 min,甲醇 50%~90%;30~40 min,甲醇 90%~100%),流速 1 mL·min⁻¹,柱温为 23 ℃,检测波长 254 nm,指纹谱图采集时间 40 min。

2.2 溶液制备

2.2.1 供试品溶液制备 药材粉碎成 60 目粉末,称取 0.6 g,精密加入 50 mL 甲醇,称定质量,超声提取 30 min,静置至室温,补足质量,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜过滤,进样 10 μL。

2.2.2 对照品溶液制备 称取去氢厄弗酚对照品 0.003 g,精密加入 50 mL 甲醇,摇匀使充分溶解,0.45 μm 微孔滤膜过滤,进样 10 μL。

2.3 方法学考察 为了考察分析方法的可靠性,选用购自江西的灯心草药材为样品(表 1 中 S₁),对其稳定性、仪器精密度、实验方法重复性作了相应考察。

2.3.1 精密度试验 取供试品溶液,连续进样 6 次,考察仪器精密度,以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”计算其相似度均 >0.999,表明仪器的精密度较好。

2.3.2 稳定性试验 取 2.3.1 项下第 1,5 次进样作为供试品溶液制备 0,4 h 后稳定性的考察,另外在供试品制备后 8,12,24 h 分别进样进行稳定性考察,以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”计算其相似度均 >0.995,结果表明灯心草供试品溶液在室温下 24 h 内稳定。

2.3.3 重复性试验 取灯心草药材平行制备供试品溶液 6 份,按 2.1 项下方法测定,考察色谱条件的稳定性,以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”计算其相似度均 >0.999,结果表明灯心草指纹图谱的分析方法重复性良好。

3 灯心草样品测定及对照指纹图谱的建立

灯心草指纹图谱中主要色谱峰及溶剂峰的指认 分别将去氢厄弗酚对照品溶液,空白,与灯心草供试品溶液按 2.1 项下方法平行进行分析,根据同一化合物相同色谱分离条件下保留时间相同,紫外光谱图一致的原则,指认出保留时间为(18.82 ± 0.5) min 的 7 号峰为去氢厄弗酚的色谱峰,0~5 min 的峰为色谱溶剂峰,32 min 之后的峰为溶剂杂质干扰峰。

按 2.1 项下方法测定了 11 批灯心草药材,将 11 批药材的指纹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”,以购自江西的灯心草图谱为参照谱图,取两个校正点,时间窗宽度为 0.5,采用中位数法计算,剪切去 0~5 min 的溶剂峰及 32~40 min 的色谱峰尾部生成灯心草对

照指纹图谱,各共有峰与去氢厄弗酚的色谱峰的相对保留时间分别为 1(0.62),2(0.69),3(0.79),4(0.89),5(0.92),6(0.95),7(1.00),8(1.05),9(1.08),10(1.11),11(1.16),12(1.20),13(1.44),14(1.58),15(1.61),16(1.67);并测定 11 批样品的相似度。结果见图 1 及表 2。

11 批灯心草指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均 > 0.9,而且各市售灯心草指纹图谱间的峰形吻合度也较好,说明市售灯心草的化学成分有较高的均一性,变异比较小。

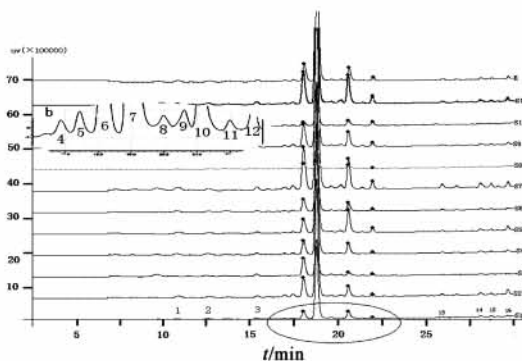


图 1 11 批灯心草指纹图谱及灯心草对照指纹图谱(R)

表 2 11 批灯心草相似度计算

相似度	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11
S ₁	1										
S ₂	0.997	1									
S ₃	0.924	0.944	1								
S ₄	0.999	0.999	0.934	1							
S ₅	0.998	0.994	0.919	0.997	1						
S ₆	0.999	0.998	0.936	1	0.997	1					
S ₇	0.998	0.999	0.942	0.999	0.997	0.999	1				
S ₈	0.996	0.997	0.944	0.997	0.994	0.998	0.997	1			
S ₉	0.996	0.999	0.949	0.998	0.995	0.999	0.999	0.998	1		
S ₁₀	0.997	0.993	0.916	0.996	0.996	0.996	0.995	0.993	0.993	1	
S ₁₁	0.996	0.997	0.948	0.998	0.997	0.998	0.999	0.997	0.998	0.993	1
R	0.999	0.999	0.933	1	0.997	1	0.999	0.997	0.998	0.996	0.997

4 讨论

4.1 供试品溶液制备方法优化 试验考察比较了纯甲醇超声 20,30,40 min 提取灯心草组分的 HPLC 指纹谱图,超声提取 30,40 min 各主要色谱峰峰面积百分数无明显差异,故最终确定操作简便、提取组分丰富的供试品溶液制备方法,药材粉碎成 60 目粉末,称取 0.6 g,精密加入 50 mL 甲醇,称定质量,超声提取 30 min,静置至室温,补足质量,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜过滤,进样 10 μL。

4.2 检测波长选择 分别在 254,276,284,290 nm 波长下进行 HPLC 检测波长的考察,选用分离度与强度最好的 254 nm 作为检测波长。

4.3 色谱条件方法学考察的统计学计算 目前,国内学者常用统计学计算方法有①以共有峰的相对保留时间、相对峰面积计算各指纹图谱的 RSD 考察精密度、稳定性、重复性,要求 RSD 均 < 5%^[9];②以峰面积百分数 > 5% 的全部色谱峰的相对保留时间、相对峰面积计算各指纹图谱的 RSD 考察精密度、稳定

性、重复性,要求 RSD 均 < 5%^[10];③以国家药典委员会制定的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版”计算其相似度,要求相似度值均 > 0.9^[11]。

笔者分析因灯心草样品中各成分质量分数差异较大,少数成分在同一色谱条件下可能超出线性范围,相对峰面积较难同时满足 RSD < 5%,且灯心草中所含部分成分含量很低,接近于仪器检测的最低限,易产生系统误差,其相对峰面积不稳定,本实验最终选择信息量较为全面的计算方法③。

4.4 灯心草指纹图谱在药材质量评价方面的意义 通过建立灯心草对照指纹图谱,采用相似度软件对各批灯心草药材进行比较,各市售药材的指纹图谱与对照指纹图谱之间的相似度均 > 0.9,可以初步得出结论,市售灯心草药材质量无明显差异,灯心草指纹图谱可用于判别灯心草药材的质量差异。

通过灯心草指纹图谱研究可知,7 号峰可做灯心草质量评价中含量测定的指标性成分,从而完善灯心草质量评价的指标。

HPLC 同时测定五味子中 6 种木脂素类成分

黄文倩^{1,2}, 李丽¹, 肖永庆^{1*}, 张村¹, 于定荣¹, 麻印莲¹, 田国芳¹, 王云¹

(1. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立同时测定五味子中 6 种木脂素类成分的 HPLC 含量测定方法。方法: 采用 HPLC, 以甲醇-0.5% 冰醋酸为流动相, 梯度洗脱, 检测波长 254 nm, 流速 0.9 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 同时测定五味子药材中五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素、五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲等 6 种木脂素类成分的含量。结果: 不同产地五味子药材中均含有上述 6 种成分, 且均以五味子醇甲的含量最高, 五味子丙素含量最低。结论: 建立的方法可以同时测定五味子药材中的 6 种木脂素类成分, 为五味子及其炮制品的质量评价提供了更为全面的科学依据。

[关键词] 五味子; 木脂素; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)10-0063-04

Simultaneous Determination of Six Lignan Components in Schisandrae Chinensis Fructus by HPLC

HUANG Wen-qian^{1,2}, LI Li¹, XIAO Yong-qing^{1*}, ZHANG Cun¹,
YU Ding-rong¹, MA Yin-lian¹, TIAN Guo-fang¹, WANG Yun¹

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China;
2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[收稿日期] 2010-12-29

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973874)

[通讯作者] * 肖永庆, 首席研究员, Tel: 010-84040221, E-mail: x. heqi@163.com

[参考文献]

- [1] 吴国芳. 中国灯心草属植物的研究[J]. 植物分类学报, 1994, 32(5): 433.
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2010: 137.
- [3] Katsuhito Shima, Masao Toyota, Yoshinori Sakawa. Phenanthrenederivatives from the medullae of *Juncus effusus* [J]. *Phytochemistry*, 1991, 30(9): 3149.
- [4] Mariamichela Corsaro, Marina Della Greca, Antonio Fiorentino, et al. Cycloartane glucosides from *Juncus effusus* [J]. *Phytochemistry*, 1994, 37(2): 515.
- [5] Marina Della Greca, Antonio Fiorentino, Pietromonaco, et al. Cycloartane triterpenes from *Juncus effusus* [J]. *Phytochemistry*, 1994, 35(4): 1017.
- [6] 陈玉, 杨光忠. 灯心草属植物萜类化合物结构和生物活性的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(4): 496, 505.
- [7] 金东哲, 闵知大, 孔令义, 等. 灯心草科植物中二萜成分[J]. 国外医药·植物药分册, 1995, 10(5): 208.
- [8] Liao Y J, Zhai H F, J M Huang, et al. Anxiolytic and sedative effects of dehydroeffusol from *Juncus effusus* in mice [J]. *Planta Medica*, 2011, 77(5): 416.
- [9] 逢楠楠, 毕开顺, 闫宝庆, 等. 芫花高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中草药, 2010, 5(5): 818.
- [10] 王花红, 郭五保, 顾莹, 等. 山茱萸药材指纹图谱的研究[J]. 西北植物学报, 2004, 24(10): 1922.
- [11] 苏娟, 吴立军, 屠鹏飞, 等. 黄芪药材 RRLC-UV-MS 指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(6): 732.

[责任编辑 蔡仲德]