

冬凌草的质量控制研究

郑晓珂, 董三丽, 冯卫生
(河南中医学院, 河南 郑州 450008)

摘要:目的: 采用 HPLC 法建立冬凌草的质量控制方法。方法: Shim-pack CLC-ODS(150mm×4.6mm) 为色谱柱, 甲醇和 0.5% 磷酸采用梯度洗脱, 检测波长 280nm, 流速 0.8mL/min, 柱温 25℃。结果: 精密度、重复性和稳定性试验中各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 3%, 符合有关规定。结论: 本方法可以作为控制冬凌草内在质量的方法之一。

关键词: 冬凌草; HPLC; 指纹图谱; 质量控制

中图分类号: R284.1 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2005)02-0010-04

Study on the Quality Control of *Rabdosia Rubescens* (Hemsl.) Hara

ZHENG Xiao-ke, DONG San-li, FENG Wei-sheng

(Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

Abstract: Objective: The method of high performance liquid chromatography was established for the quality control of *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara. Method: The separation was performed on an analytical Shim-pack CLC-ODS (150mm×4.6mm) column. The mobile phase was methanol and 0.5% phosphoric acid with a gradient elution. The UV detector was set at 280nm, the flow rate was 0.8mL/min, and the temperature of column was 25℃. Results: Precision and accuracy assessment, reproduction and stability assessment were made, RSDs in each assessment was less than 3%. Conclusion: The method can be used for the quality control of *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara.

Key words: *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara; HPLC; fingerprint; quality control

冬凌草为唇形科香茶菜属植物碎米亚 *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara 的干燥全草, 广布于黄河、长江流域, 主产地在河南济源太行山一带^[1]。冬凌草味甘苦, 性微寒, 具清热解毒, 消炎止痛, 健胃活血及抗肿瘤之功效^[2]。用于治疗咽喉肿痛、扁桃体炎、蛇虫咬伤及食管癌、贲门癌、肝癌、乳腺癌等。临床实验证明冬凌草对食管癌、贲门癌、肝癌、乳腺癌等有一定疗效, 对食管上皮增生有显著疗效。1991 年我国卫生部批准将其干燥叶及地上部分作为中药材, 收入部颁中药材标准。迄今, 冬凌草还没有一个统一的质量控制标准, 本文通过对河南济源五龙口镇国家十五科技攻关项目冬凌草规范化种植基地生产的冬凌草药材及附近的野生冬凌草药材进行 HPLC 指纹图谱研究, 建立了冬凌草 HPLC 指纹图谱, 并且

对冬凌草中水溶性成分迷迭香酸和脂溶性成分冬凌草甲素进行了同时定量, 结合均值偏移度法对其作了质量评价, 结果可作为控制其内在质量的方法之一。

1 实验材料

1.1 仪器与材料 岛津 LC-10ATvp 型高效液相色谱仪, SPD-10Avp 可见紫外检测器及浙江大学 N-2000 双通道色谱工作站。冬凌草药材采集于河南济源五龙口镇绿村, 共 19 批(见表 1), 由河南中医学院陈随清教授鉴定为唇形科香茶菜属植物碎米亚 *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara 的干燥地上部分。甲醇为色谱纯, 磷酸为分析纯, 水为双蒸水。

1.2 对照品的选择 冬凌草中含有单萜, 倍半萜, 二萜, 三萜等一系列萜类成分。药理及临床研究证明冬凌草甲素(Rubescensin A)为该植物的抗癌有效成分之一^[2], 本实验室又从冬凌草中分离得到水溶性成分迷迭香酸(rosmarinic acid), 为首次从该植物中得到, 因此本文选择冬凌草甲素和迷迭香酸作为对照品。

收稿日期: 2004-05-17

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2001BA701A23-05), 河南省高校杰出科研人才创新工程项目(2003kycx002)

通讯作者: 冯卫生, Tel: (0371) 5680699, Fax: (0371) 5680011, E-mail: fwsh@371.net

表 1 冬凌草药材

编号	1	2	3	4	5	6	7
采收年月	02. 6. 2	02. 6. 1	02. 7. 1	02. 7. 1	02. 8. 1	02. 8. 1	02. 8. 1
品种	栽培(头茬)	野生	栽培(头茬)	野生	栽培(头茬)	野生	栽培(二茬)
编号	8	9	10	11	12	01	02
采收年月	02. 9. 1	02. 9. 1	02. 9. 1	02. 10. 2	02. 10. 2	02. 10. 2	02. 10. 2
品种	栽培(头茬)	野生	栽培(二茬)	栽培(头茬)	栽培(二茬)	老杆	野生茎
编号	03	04	05	06	07		
采收年月	02. 10. 2	02. 10. 2	02. 10. 2	02. 10. 2	02. 10. 2		
品种	栽培茎	野生全草	栽培全草	野生叶	栽培叶		

2 实验部分

2.1 色谱条件 色谱柱: Shim-pack CLC-ODS(150mm × 4.6mm) 柱; 检测波长: 335nm; 柱温: 25℃; 流速: 0.8mL/min。流动相: 甲醇: 0.5% 磷酸梯度洗脱, 洗脱时间为 50min。梯度程序见表 2。

表 2 流动相梯度程序表

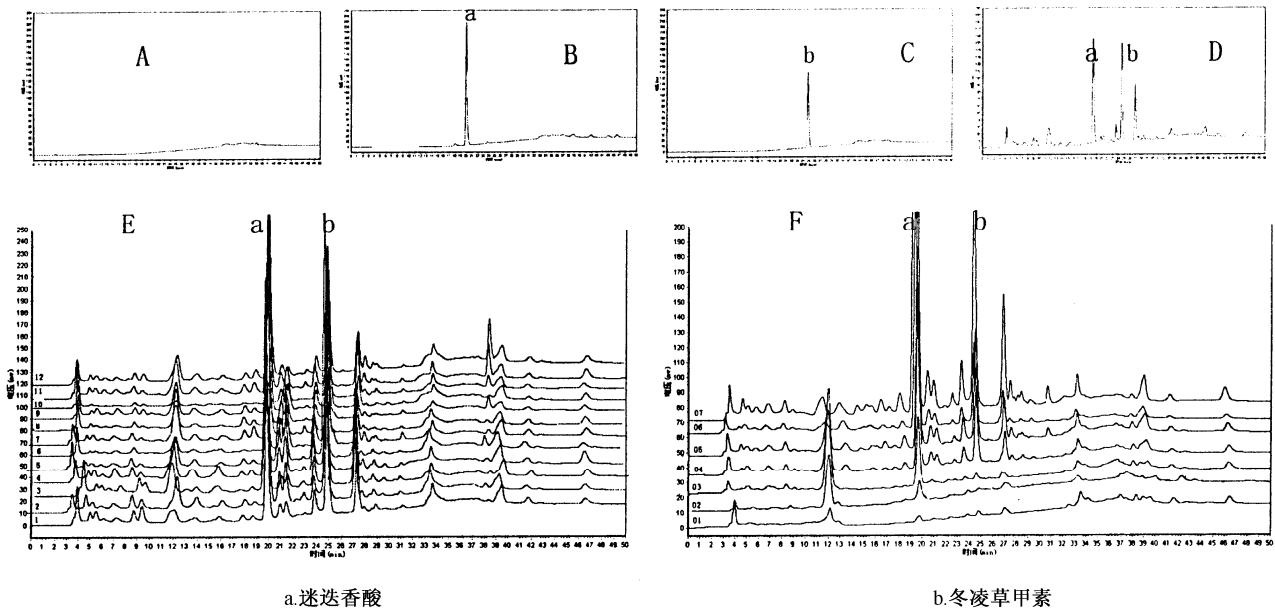
时间(min)	甲醇(%)	0.5% 磷酸(%)
0.01	30	70
10	40	60
30	85	15

2.2 供试品溶液的制备 取不同批次过 40 目筛的冬凌草粉末, 在 105℃ 条件下干燥至恒重, 各取 1g, 精密称定, 精密加入甲醇 50mL, 称定重量, 超声提取

60min, 取出静置, 放置室温, 加甲醇补足损失的重量, 过滤, 滤液水浴挥干, 残渣加甲醇溶解, 定容于 25mL 容量瓶中, 即得。用时用 0.45μm 的微孔滤膜过滤。

2.3 对照品溶液的制备 分别精密称取在 105℃ 干燥至恒重的对照品迷迭香酸和冬凌草甲素适量, 加甲醇制成浓度为 1.04mg/mL 和 1.1mg/mL 的溶液, 作为对照品溶液。

2.4 测定方法 分别精密吸取对照品溶液各 5μL 和各供试品溶液各 10μL 以及甲醇液(空白对照) 注入高效液相色谱仪中, 记录色谱图(图 1), 计算, 即得。



A. 空白对照 B. 迷迭香酸对照品 C. 冬凌草甲素对照品 D. 冬凌草药材 E. 不同采收期 F. 不同部位

图 1 冬凌草药材 HPLC 指纹图谱

2.5 方法学考察

2.5.3 标准曲线的制备 分别精密吸取上述对照品溶液, 各 1mL, 置于(100、50、25、10、1)mL 容量瓶

中, 加甲醇稀释到刻度, 各精密吸取 10μL 注入高效液相色谱仪, 测定峰面积, 以峰面积为因变量(Y), 以进样量为自变量(X), 计算: 迷迭香酸的回归方程

为: $Y = -1990573.478X + 1005139006.000$ ($r = 0.9994$), 线性范围为: $0.104 \times 10^{-3} \sim 10.4 \times 10^{-3} \text{ mg}$; 冬凌草甲素的回归方程为: $Y = 1246370.428X + 434412422.1$ ($r = 0.9998$), 线性范围为: $0.11 \times 10^{-3} \sim 11.0 \times 10^{-3} \text{ mg}$ 。

2.5.4 稳定性试验 取同 1 批冬凌草药材, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24h 检测指纹图谱, 结果各主要色谱峰保留时间和峰面积的相对标准偏差 RSD 均小于 3%。

2.5.5 精密度试验 取同 1 批冬凌草药材, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 连续进样 5 次, 测定指纹图谱, 结果各色谱峰保留时间和峰面积的相对标准偏差 RSD 均小于 3%。

2.5.6 重复性试验 取同 1 批冬凌草药材, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 平行操作制备 5 份, 分别检测指纹图谱, 结果各色谱峰保留时间和峰面积的相对标准偏差 RSD 均小于 3%。

2.5.7 加样回收率试验 取已知含量的冬凌草生药粉末适量(过 40 目筛), 精密称取 5 份同一样品粉末适量, 分别精密加入迷迭香酸和冬凌草甲素对照品适量, 按“2.4”项下所述方法, 进行迷迭香酸和冬凌草甲素的含量测定, 计算回收率, 结果两种成分的平均回收率分别为 98.56% 和 99.22%, RSD 值分别为 2.16% 和 2.37%, 符合 HPLC 定量分析要求。

3 实验结果

3.1 指纹图谱及各项技术参数 根据 19 批供试品溶液 HPLC 谱给出的相关参数, 比较供试品谱图, 其中 14 个峰是各批供试品所共有的, 因此确定这 14 个峰为共有指纹峰。冬凌草药材指纹图谱见图 1。

供试品色谱中, 以参照物迷迭香酸对应的色谱峰(S)为参照峰, 计算 19 批冬凌草药材指纹图谱中 14 个共有指纹峰的相对保留时间为: 1(0.182~0.201), 2(0.599~0.628), 3(0.688~0.709), 4(0.902~0.950), 5(1.000~1.000), 6(1.050~1.071), 7(1.076~1.097), 8(1.159~1.215), 9(1.233~1.261), 10(1.369~1.403), 11(1.670~1.718), 12(1.957~2.027), 13(2.071~2.146), 14(2.315~2.392)。其峰面积与参照物峰面积比值为: 1(0.033~2.881), 2(0.062~4.858), 3(0.016~4.858), 4(0.016~0.447), 5(1.000~1.000), 6(0.038~0.580), 7(0.017~0.876), 8(0.018~0.597), 9(0.119~5.784), 10(0.036~2.548), 11(0.042~4.002), 12(0.047~1.089), 13(0.011~2.548), 14(0.006~1.470)。

3.2 含量测定 根据各供试品色谱图所得数据, 按外标法计算迷迭香酸和冬凌草甲素的百分含量。结果见表 3。

表 3 迷迭香酸和冬凌草甲素含量测定结果

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
迷迭香酸(%)	0.59	0.99	0.78	0.79	0.50	0.22	0.92	0.48	0.90	0.08
冬凌草甲素(%)	1.05	1.48	1.27	1.59	1.69	0.66	0.80	0.90	0.95	1.02
编号	11	12	01	02	03	04	05	06	07	
迷迭香酸(%)	0.81	0.03	0.03	0.05	0.23	0.59	0.83	1.53	1.66	
冬凌草甲素(%)	1.07	0.75	0.03	0.03	0.06	0.47	0.68	0.87	1.50	

3.3 冬凌草的质量评价 12 批不同采收期冬凌草药材和 7 个冬凌草药材不同部位 HPLC 色谱峰相对保留时间是一致的, 但每批样品在相同保留时间的相对峰面积(样品峰面积/迷迭香酸峰面积)却波动很大, 反映出各批样品在化学成分含量上的差异, 因此本文采用了活性成分的定量分析和指纹图谱相结合的方法进行评价, 从定量结果和图谱特点可以明显的反映出不同来源的样品在质量上的差异, 其不同部位质量优劣顺序为: 栽培叶> 野生叶> 栽培全草> 野生全草> 栽培茎> 野生茎> 老杆; 不同采收期质量优劣顺序为: 7 月份> 6 月份> 8 月份> 9 月份> 10 月份; 另外从指纹图谱和 2 种活性成分含量

测定结果显示栽培冬凌草头茬和二茬质量差异并不显著。综上对冬凌草的质量评价为: 规范化种植基地的冬凌草药材质量优于野生冬凌草药材, 冬凌草头茬与二茬质量没有显著差异, 以 7 月份采收冬凌草质量最佳。

4 讨论

在中药材的质量控制上, 首次采用了活性成分的定量分析和指纹图谱相结合的方法进行评价, 从定量结果和图谱特点可以明显的反映出不同来源的样品在质量上的差异, 对于活性成分相对清楚的中药材而言, 这种采取定量分析和指纹图谱相结合的质量控制模式有利于全面控制中药材的质量, 可以

作为冬凌草的质量控制方法之一。

样品前处理方法的选择以水溶性成分为指标比较了甲醇超声、甲醇回流、丙酮超声和丙酮回流等提取方法,又以脂溶性成分冬凌草甲素为指标,比较了上述几种提取方法,结果表明以甲醇超声提取 60min 两种成分含量最高,其它成分含量稳定,杂质较少,提取方法简单。

流动相的选择^[4-5]采用甲醇-水不同比例进行等度洗脱,冬凌草中极性较强成分不能得到最佳分离,极性较弱成分较分散。考虑到冬凌草中含有较多酸性成分,不易被洗脱,故向流动相中加入一定比例的磷酸,选用梯度洗脱,结果分离效果较好。

参考文献:

[1] 郑虎占,董泽宏,余靖. 中药现代化研究与应用[M]. 北

京:学苑出版社,1997(2),1632.

- [2] 刘晨江,赵志鸿. 冬凌草的研究进展[J]. 中国药学杂志,1998,33(10):577-581.
- [3] 阴健,郭力弓. 中药现代研究与临床应用[M]. 北京:学苑出版社,1995.223-227.
- [4] 冯毅凡,苏薇薇,吴忠,等. 华佗再造丸气相色谱指纹特征鉴别及质量评价[J]. 中药材,1999,22(7):373-376.
- [5] 冀春茹,冯卫生,胡润淮,等. HPLC 法测定冬凌草萜含片中冬凌草甲素的含量[J]. 中国现代应用药学,1999,16(5):35-36.
- [6] 袁珂,董留民. 不同产地、不同季节冬凌草叶中的熊果酸和齐墩果酸的含量比较[J]. 中药材,1998,21(10):519-520.