

冬凌草高效液相指纹图谱研究

王坤¹, 李可强², 张振秋^{1*} (1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600; 2. 辽宁省中药研究所, 沈阳 110161)

摘要:目的 建立冬凌草高效液相指纹图谱的测定方法。方法 采用 Phenomexsil C₁₈ 色谱柱 (250 × 4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-0.5%磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 柱温 25 ℃, 检测波长 238 nm, 记录时间 65 min, 对 10 批冬凌草药材的指纹图谱进行研究, 并采用夹角余弦和相关系数进行相似度评价。结果 以 11 个共有峰为评价指标, 精密度和重复性实验中各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 5%, 多数冬凌草药材相似度较好, 个别药材有一定的质量差异, 并利用对照品对其中的冬凌草甲素进行了标记。结论 此方法精密度高、稳定性和重复性好, 作为鉴定和评价冬凌草药材质量的依据是切实可行的。

关键词:冬凌草; 指纹图谱; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101; R927.11; R931.5

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693(2008)06-0509-04

Studies on Fingerprint of *Rabdosia rubescens* by HPLC

WANG Kun¹, LI Ke-qiang², ZHANG Zhen-qiu^{1*} (1. Pharmacology School, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Da lian 116600, China; 2. Liaoning Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 100161, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the fingerprint of *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara by HPLC for quality evaluation. **METHODS** The analysis was performed on a Phenomexsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with methanol-0.5% phosphoric acid as mobile phase in a gradient mode at a flow rate of 0.8 mL·min⁻¹ and at a column temperature of 25 ℃. The detection of wavelength was set at 238 nm. **RESULTS** Eleven peaks were selected as the common fingerprint peaks. The relative standard deviations for relative retention values and relative peak areas were less than 5% in the precision and repeated test. Samples from different places were of high similarity though a few samples showed some differences in fingerprint graphics. And oridonin is indentified by reference substance. **CONCLUSION** The HPLC Fingerprint method is feasible and reliable for identifying and evaluating the quality of *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara.

KEY WORDS: *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara; fingerprint; HPLC

冬凌草, 学名碎米桠 [*Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara], 是唇形科香茶菜属植物, 具有清热解毒、活血止痛的功效。中国药典 1977 年版和中华人民共和国卫生部药品标准 1992 年版将其收载。冬凌草化学成分复杂, 主要含有萜类、黄酮类和酚酸类化合物等, 研究表明对咽喉肿痛、扁桃体炎、虫蛇咬伤等疗效确切。冬凌草资源丰富, 广布于我国黄河、长江流域, 因此对冬凌草药材的质量进行系统地研究, 建立冬凌草药材的质量评价方法, 有利于控制药材的质量, 合理开发和利用药材资源。目前, 对冬凌草指纹图谱的研究甚少, 笔者通过收集全国各地共 10 批冬凌草药材, 采用 HPLC 测定, 建立了冬凌草的指纹图谱, 并结合夹角余弦和相关系数对其进行了相似度评价, 为合理控制药材质量提供了一定的实验依据^[1]。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪, 含四元梯度泵, 在线真空脱气机; AS3120A 超声波清洗器; AR2140 电子分析天平。

1.2 试剂

冬凌草甲素对照品购自深圳市牌牌科技有限公司, 批号: 111721-200602, 纯度 > 98%; 甲醇为色谱纯; 水为重蒸水; 其他试剂均为分析纯; 冬凌草药材经辽宁中医药大学李峰教授鉴定均为唇形科香茶菜属植物冬凌草 *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara 的干燥地上部分, 来源如下: 批 1: 来源于河北 (安国), 收集于 2005 年 10 月; 批 2: 来源于湖北 (武汉), 收集于 2006 年 5 月; 批 3: 来源于北京, 收集于 2006 年 5 月; 批 4: 来源于浙江 (温州), 收集于 2006 年 3 月; 批 5: 来源于山东 (济南), 收集于 2006 年 3 月; 批 6: 来源于山西 (太原), 收集于 2006 年 6 月; 批 7: 来源于江苏 (南京), 收集于 2006 年 11 月; 批 8: 来源于安徽 (徐州), 收集于 2006 年 11 月; 批 9: 来源于河北 (石家庄), 收集于 2006 年 4 月; 批 10: 来源于

作者简介: 王坤, 女, 硕士研究生 Tel: 15842392268
Tel: (0411) 87586058

E-mail: wangkunsy@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 张振秋, 男, 教授, 博士

河南(鹤壁),收集于 2007 年 4 月;其中批 1 至批 9 为干燥全草,批 10 为新鲜全草。

2 方法与结果

2.1 测定条件的选择^[2]

2.1.1 波长的选择 实验考察了 238、254、329 nm 波长处的色谱图,结果在 238 nm 处各色谱峰均有较好的紫外吸收,峰形较好,色谱信息较为丰富,因此选择 238 nm 作为检测波长。

2.1.2 色谱条件的选择 冬凌草药材所含成分复杂,且极性范围跨度很大,等度洗脱很难分离,故采用梯度洗脱方式。实验考察了甲醇-水系统,甲醇-磷酸水系统,结果表明,甲醇-磷酸水系统各色谱峰的分离好于甲醇-水系统,又分别比较了 0.1%, 0.3%, 0.5% 的磷酸,结果使用甲醇-0.5% 磷酸水系统可得到较好的峰形,且分离较好,故确定甲醇-0.5% 磷酸水系统不同的比例为流动相。

2.1.3 流速的确定 考察了 0.8 mL·min⁻¹ 和 1.0 mL·min⁻¹ 两种流速,结果表明 0.8 mL·min⁻¹ 的流速,各色谱峰分离度较好,保留时间适中。

2.2 色谱条件

色谱柱为 Phenomenex C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 检测波长 238 nm, 柱温 25 ℃, 流动相为甲醇-0.5% 磷酸水溶液, 梯度洗脱, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 运行时间 65 min, 进样量 20 μL。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient stages of mobile phase

时间 /min	甲醇 /%	0.5% 磷酸 /%
0	20	80
10	40	60
35	70	30
45	85	15
65	85	15

2.3 对照品溶液的制备

精密称取冬凌草甲素对照品 7.54 mg 用甲醇溶解并稀释至 25 mL 量瓶中,作为对照品溶液,冬凌草甲素对照品溶液浓度为 0.301 7 mg·mL⁻¹。

2.4 供试品溶液的制备

取各地冬凌草药材粉末(过 40 目筛) 1 g 精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,称重,超声 40 min,放至室温,称重,用甲醇补至原重,经微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.5 测定方法

分别精密吸取供试品溶液 20 μL,注入高效液相色谱仪,记录 65 min 色谱图,即得。以冬凌草甲素色谱峰的保留时间和峰面积为 1 计算其它各峰的相对保留时间和相对峰面积。

2.6 方法学考察

2.6.1 重复进样精密度试验 取同一供试品溶液(河北),连续进样 5 次,结果表明各色谱峰的相对保留时间几乎一致, RSD 均 < 0.2%, 相对峰面积 RSD 均 < 4%, 仪器精密度良好,符合指纹图谱的要求。

2.6.2 稳定性试验 取同一供试品溶液(河北),分别于 0

2、6、10、18、24 h 检测高效液相色谱图谱。并对图谱中各峰进行考察,相对保留时间的 RSD 均 < 0.5%, 相对峰面积 RSD 均 < 5%, 符合指纹图谱的要求,冬凌草供试品溶液在常温下 24 h 内稳定。

2.6.3 重复性试验 取同一批样品(河北) 5 份,每份 1 g 精密称定,按供试品溶液制备方法制备,检测高效液相色谱图谱。结果表明各色谱峰的相对保留时间的 RSD 均 < 0.5%, 相对峰面积 RSD 均 < 5%。符合指纹图谱的要求。

2.7 指纹图谱的建立及分析

2.7.1 冬凌草药材 HPLC 指纹图谱中共有峰的标定 10 批冬凌草药材供试品指纹图谱见图 1。其色谱图有 11 个主要的共有特征峰,其中 S 峰为冬凌草甲素的色谱峰,并将其作为参比峰。

根据 10 批供试品指纹图谱的检测结果,进行分析比对,总结出供试品指纹图谱中的特征峰有 11 个,其中 S 峰为冬凌草甲素峰,部分特征峰的峰形为: 1 号峰基本存在,有时分裂为两个小峰。2 号峰个别样品峰值较低。3、4、5 号峰为多个小峰组成。6、7、8 号峰比较稳定。9 号峰都由两小峰组成,前峰高于后峰。10 号峰个别样品峰值较低。结果表明 S、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 号峰在 10 批样品的色谱图中均出现。以冬凌草甲素对照品保留时间为参照,计算各共有特征指纹峰的相对保留时间,相对保留时间的 RSD 小于 1.5% (n = 10), 结果见表 2。因此标定此 11 个峰为共有指纹峰,并据此建立冬凌草药材的 HPLC 指纹图谱。

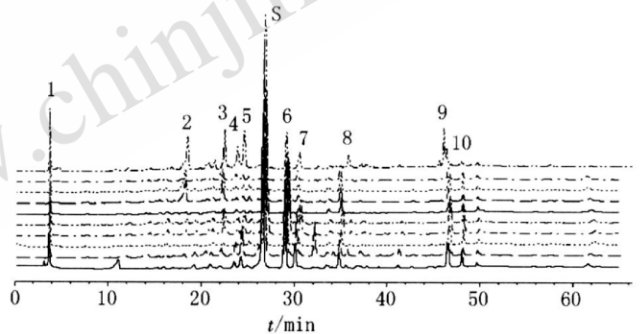


图 1 10 批各地冬凌草药材指纹图谱共有模式

Fig 1 Common pattern of ten batches *Rabdosia rubescens* (Hemsli) Hara samples

2.7.2 冬凌草药材共有指纹峰面积与参照物峰面积的比值

以冬凌草甲素峰面积为参照,计算各批供试品共有指纹峰的峰面积比值,结果见表 3。由表 3 和图 1 可见,各批供试品指纹图谱的重现性较好,但各批样品间共有指纹峰的相对峰面积有一定差异。

2.7.3 冬凌草药材的相似度评价^[3] 以选择的 10 个共有指纹峰的峰面积为变量,用 EXCEL2002 按照相关系数公式和夹角余弦公式计算相关系数和夹角余弦,采用这两种统计量对其相似度进行评价,并采用中位数矢量法来确定对照药材指纹图谱,结果见图 2 表 2 表 3。

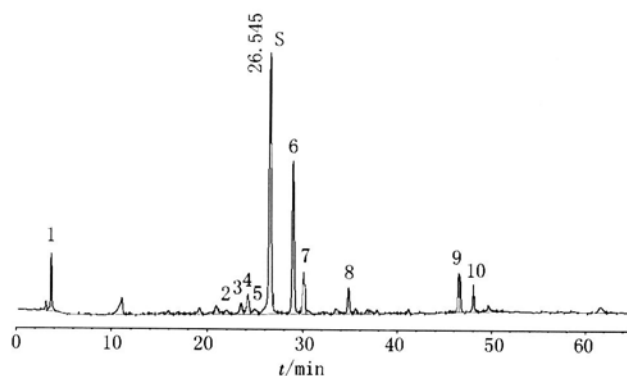


图 2 冬凌草药材对照指纹图谱

Fig 2 Reference fingerprint chromatogram of *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara

表 2 10批冬凌草药材共有特征指纹峰的相对保留时间及相似度评价

Tab 2 Relative retention time of common peaks and similarity evaluation in fingerprints of ten batches *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara

峰号	样品批号										均值	RSD /%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	0.136	0.140	0.136	0.139	0.139	0.140	0.140	0.135	0.140	0.136	0.138	1.5
2	0.827	0.828	0.831	0.832	0.833	0.831	0.830	0.830	0.829	0.838	0.831	0.4
3	0.885	0.885	0.885	0.885	0.886	0.885	0.885	0.885	0.885	0.889	0.886	0.1
4	0.912	0.912	0.912	0.913	0.913	0.913	0.912	0.913	0.885	0.917	0.910	0.9
5	0.937	0.934	0.937	0.940	0.941	0.939	0.937	0.937	0.936	0.937	0.938	0.2
S	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.0
6	1.090	1.089	1.089	1.090	1.090	1.089	1.069	1.090	1.089	1.086	1.087	0.5
7	1.132	1.131	1.134	1.137	1.137	1.135	1.134	1.134	1.133	1.138	1.134	0.2
8	1.309	1.307	1.307	1.305	1.304	1.304	1.305	1.305	1.305	1.335	1.309	0.7
9	1.749	1.744	1.739	1.732	1.732	1.735	1.737	1.736	1.739	1.718	1.736	0.4
10	1.808	1.803	1.798	1.789	1.789	1.793	1.796	1.795	1.798	1.791	1.796	0.3
夹角余弦	0.999 9	0.999 9	0.999 9	0.999 9	0.999 9	0.999 9	0.999 9	0.999 9	0.999 9	0.999 9	1	
相关系数	0.999 9	0.999 9	0.999 9	0.999 9	0.999 9	0.999 9	0.999 9	0.999 9	0.999 8	0.999 7	1	

表 3 10批冬凌草药材共有特征指纹峰的相对峰面积及相似度评价

Tab 3 Relative peak area of common peaks and similarity evaluation in fingerprints of ten batches *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara

峰号	样品批号										平均值
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	0.128	0.021	0.154	0.061	0.063	0.215	0.157	0.157	0.132	0.130	0.122
2	0.029	0.064	0.096	0.148	0.151	0.142	0.475	0.474	0.334	0.271	0.219
3	0.059	0.073	0.116	0.062	0.062	0.167	0.112	0.108	0.178	0.231	0.117
4	0.082	0.154	0.135	0.092	0.092	0.132	0.166	0.167	0.178	0.300	0.150
5	0.037	0.021	0.124	0.062	0.062	0.114	0.125	0.125	0.090	0.018	0.078
S	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	0.518	0.416	0.473	0.451	0.450	0.404	0.480	0.480	0.419	0.440	0.453
7	0.147	0.192	0.172	0.194	0.195	0.204	0.134	0.160	0.185	0.300	0.188
8	0.091	0.075	0.252	0.107	0.106	0.492	0.280	0.279	0.450	0.560	0.269
9	0.098	0.038	0.455	0.099	0.101	0.469	0.282	0.281	1.070	1.420	0.431
10	0.073	0.029	0.205	0.096	0.095	0.250	0.125	0.136	0.970	1.170	0.315
夹角余弦	0.923	0.904	0.991	0.942	0.942	0.979	0.962	0.964	0.899	0.851	1.000
相关系数	0.913	0.895	0.979	0.926	0.926	0.948	0.907	0.910	0.744	0.631	1.000

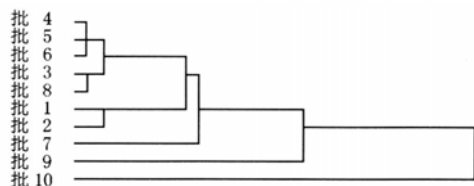


图 3 各批次样品相对保留时间聚类分析图

Fig 3 Rescaled Distance Cluster Combine of relative retention time

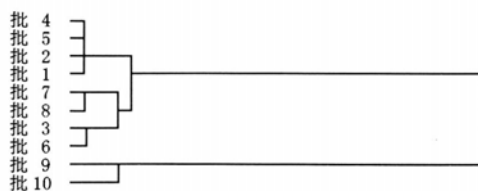


图 4 各批次样品相对峰面积聚类分析图

Fig 4 Rescaled Distance Cluster Combine of relative area

批 7 批 8 批 3 批 6 相似程度较高,可聚为一类,批 9、批 10 相似程度较低,可明显区分。10 批冬凌草样品的聚类分析结果与相似度计算结果比较接近,但由于分析方法不完全相同,在某些结果上还有不同,补充聚类分析以更加精确地判断 10 批冬凌草样品间的相似关系与分类状况。

3 讨论

3.1 冬凌草甲素是冬凌草中含有的一种主要的二萜类化合物,也是冬凌草发挥药理效应主要的有效成分之一,冬凌草甲素出峰时间居中,且与其他各峰有较好的分离,因此选择冬凌草甲素为参照物。

3.2 本实验在考察样品前处理方法时,分别比较了甲醇、95%乙醇和水对冬凌草药材的提取效果。结果表明水提取液指纹图谱中色谱信息最丰富,因主要有效成分萜类难溶于水,因此,冬凌草甲素含量非常低。甲醇提取液指纹图谱色谱信息比较丰富,各色谱峰分离较好,理论塔板数高,且冬凌草甲素的含量最高,效果最佳,故供试品溶液提取溶剂定为甲醇。提取方法的考察中,比较了甲醇超声提取 20 min, 40 min, 60 min, 索氏提取 4 h, 对冬凌草药材的提取效果。结果表明,甲醇超声提取 40 min 溶液中冬凌草甲素的含量最高,最终确定供试品溶液制备方法为甲醇超声处理 40 min。

3.3 冬凌草不同部位的考察,冬凌草为地上部分入药,本实验对其叶和茎分别制备供试品溶液,检测指纹图谱,结果叶和茎均有 11 个共有指纹峰,冬凌草甲素及其他各成分,叶的含量明显高于茎,见图 5、图 6。

3.4 本试验建立了冬凌草药材的 HPLC 指纹图谱方法,从结果分析,多数药材化学成分相对稳定,质量较高,个别药材的差异与冬凌草的产地、采收、加工及存放有一定关系。同时说明单以一个或几个成分含量为主的质量控制方法已不能真正反映中药材质量,而利用指纹图谱对药材进行综合、宏观的评价,可比较全面的反映药材的特性,制定出系统性、特征性和稳定性均较好的指纹图谱,为中药材的质量评价提供了依据。

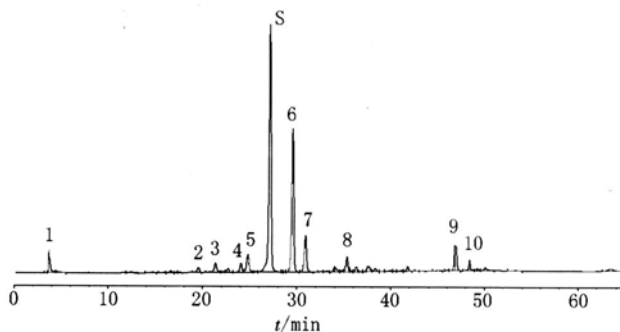


图 5 冬凌草叶指纹图谱

Fig 5 Fingerprint of *Radosia rubescens* (Hemsl.) Hara leaves

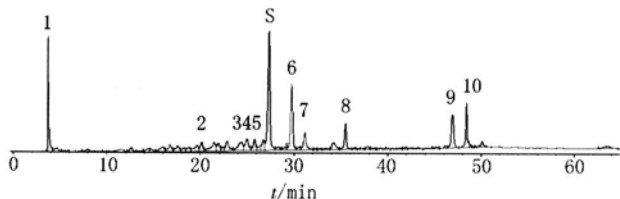


图 6 冬凌草茎指纹图谱

Fig 6 Fingerprint of *Radosia rubescens* (Hemsl.) Hara stem

REFERENCES

- [1] LIU C J, ZHAO Z H. Development of *Radosia rubescens* (Hemsl.) Hara [J]. Chin Pharm J (中国药理学杂志), 1998, 33 (10): 577-581.
- [2] ZHENG X K, DONG S L, FENG W S. Study on the Quality Control of *Radosia rubescens* (Hemsl.) Hara [J]. Chin Exp Tradit Med Fom (中国实验方剂学杂志), 2005, 11 (2): 10-12.
- [3] MIAO A D, SUN D J. Application of Microsoft Excel 2002 to Calculate the similarity in Fingerprints in Chinese Herbs [J]. Prog Pharm Sci (药理学进展), 2003, 27 (1): 51-54.

收稿日期: 2007-09-28