

道地药材黔党参的HPLC指纹图谱研究[△]

孙庆文*,王悦云,徐文芬#,何顺志,温芳芳(贵阳中医学院药学系,贵阳 550002)

中图分类号 R284.1;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)07-0628-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.07.19

摘要 目的:建立道地药材黔党参的指纹图谱研究方法,为其质量控制提供理论依据。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为依利特-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-0.2%冰醋酸水溶液(梯度洗脱),流速为0.8 ml/min,柱温为30 ℃,检测波长为270 nm。结果:所测10批黔党参样品有13个共有峰,共有峰峰面积的RSD为49.67%~100.93%,峰面积比值的RSD为40.86%~127.97%;共有峰相对保留时间为0.441~1.675,相对保留时间的RSD为0.11%~1.50%;该方法具有良好的稳定性和重复性。结论:所建黔党参HPLC指纹图谱分析方法可较全面地反映该药材中化学成分的信息,可为该药材的质量控制提供理论依据。

关键词 黔党参;指纹图谱;高效液相色谱法;道地药材

Study on HPLC Fingerprints of Genuine Regional Drug *Codonopsis tubulosa* in Guizhou

SUN Qing-wen, WANG Yue-yun, XU Wen-fen, HE Shun-zhi, WEN Fang-fang (Dept. of Pharmacy, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for fingerprint study of genuine regional drug *Codonopsis tubulosa* in Guizhou. METHODS: HPLC method was adopted. The separation was performed on Hypersil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.2% glacial acetic acid aqueous solution (gradient elution) at the flow rate of 0.8 ml/min. The column temperature was 30 ℃ and UV detection wavelength was set at 270 nm. RESULTS: There were 13 common peaks of 10 batches of *C. tubulosa* samples. The RSD of common peak area was from 49.67% to 100.93%. The RSD of relative peak area was from 40.86% to 127.97%. The relative retention time of common peak was 0.441-1.675. The RSD of relative retention time was from 0.11% to 1.50%. The method is of good stability and repeatability. CONCLUSION: Established HPLC chromatographic fingerprints of *C. tubulosa* could express its chemical information, and provide a basis for quality control of *C. tubulosa*.

KEY WORDS *Codonopsis tubulosa*; Fingerprints; HPLC; Genuine regional drug

“黔党参”又名“贵州党参”、“臭参”等,为桔梗科党参属植物管花党参*Codonopsis tubulosa* Kom.的干燥根。其体结实肥大,质坚而木质不重,有香气,嚼之能化渣,曾是历史上有名的“叙党”,享有较高声誉。该药材为《贵州省中药材、民族药材质量标准》2003年版收载品种,具有补中益气、健脾益肺等功效,用于治疗脾胃虚弱、气短心悸、食少便溏、虚喘咳嗽、内热消渴等证^[1]。现代药理研究表明,黔党参还具增强造血功能、抗血栓、调血脂、抗心肌缺血缺氧、改善血液循环、增强机体免疫力等作用。黔党参为贵州的道地药材,在民间常作为党参入药使用,其原植物管花党参在贵州西北部分布广、适应性强、产藏量大,具有广阔的开发利用前景。笔者采用高效液相色谱(HPLC)法对黔党参的化学成分指纹图谱进行研究^[2-13],以期对其质量进行较为全面、客观地评价,为其质量控制提供理论依据。

1 材料

[△] 基金项目:贵阳市科学技术计划项目资助(筑科合同[2011207]22号;[2010]筑科农合同字第1-中-14号);贵阳中医学院科研项目资助(贵中医科院内[2010]09)

* 副教授。研究方向:药用植物教学和科研。E-mail:sqw1978_2006@126.com

通信作者:教授。研究方向:中药质量控制的教学和科研。E-mail:wenfenu@126.com

1.1 仪器

1100型HPLC仪、化学工作站(美国Agilent公司);AG135型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司);CSF-1B型超声波清洗机(上海超声波仪器厂,功率:100 W,频率:50 kHz);中药色谱指纹图谱相似度评价系统2004A版、2004B版(国家药典委员会,以下简称“指纹图谱软件”)。

1.2 试剂

党参炔苷对照品(江西本草天工科技有限责任公司,纯度>98%);乙腈为色谱纯,正丁醇、甲醇、乙醇、磷酸、冰醋酸均为分析纯,水为重蒸水。

1.3 药材

10批药材样品均由笔者于2009年7月采集,并经贵阳中医学院何顺志教授鉴定为管花党参*C. tubulosa* Kom.的干燥根,凭证标本存放于贵阳中医学院标本馆。鲜品采回后洗净,60 ℃烘干,粉碎过40目筛,置干燥器中,备用。样品产地及编号如下:贵州威宁县马摆大山(S1),贵州威宁县黑石镇(S2),贵州清镇市站街镇(S3),贵州清镇市麦格乡(S4),贵州普安县盘水镇(S5),贵州贵阳市金华镇(S6),贵州大方县凤山乡(S7),贵州大方县百纳乡(S8),贵州毕节市朱昌镇(S9),贵州织金县珠藏镇(S10)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:依利特-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.2%冰醋酸水溶液(B),梯度洗脱(0~10 min, 2%→5% A; 10~30 min, 5%→6% A; 30~55 min, 6%→12% A; 55~65 min, 12%→16% A; 65~100 min, 16%→17% A; 100~120 min, 17%→25% A; 120~165 min, 25%→80% A);流速:0.8 ml/min;检测波长:270 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μl。

2.2 对照品溶液的制备

取党参炔苷对照品适量,精密称定,加甲醇溶解并制成每1 ml含党参炔苷0.1 mg的溶液,备用。

2.3 供试品溶液的制备

取样品粉末约5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加甲醇超声提取3次(30、30、30 ml),每次30 min,滤过,合并滤液,减压回收溶剂,残渣用水溶解后,以水饱和正丁醇分别萃取4次(40、30、30、20 ml),合并提取液,挥干正丁醇,残渣用甲醇溶解、转移至5 ml量瓶中,并稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 精密度试验

取同一供试品溶液适量,连续进样6次,在上述色谱条件下测定,所得图谱导入指纹图谱软件(2004A版)进行分析,可得相似度计算结果均>0.999,表明本方法精密度良好,符合指纹图谱技术要求。

2.5 重复性试验

取同一样品粉末6份,每份约5 g,精密称定,分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下测定,所得图谱导入指纹图谱软件(2004A版)进行分析,可得相似度计算结果均>0.995,表明本方法重复性良好,符合指纹图谱技术要求。

2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液适量,在上述色谱条件下,分别于0.6、12、24 h依法测定,所得图谱导入指纹图谱软件(2004A版)进行分析,可得相似度计算结果均>0.980,表明供试品溶液至少在24 h内保持稳定。

2.7 样品测定

取10批黔党参药材样品,分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液,取空白溶剂、党参炔苷对照品溶液及供试品溶液,分别注入HPLC仪测定,记录190 min的色谱图,即得。

2.8 指纹图谱共有峰的确定

将10批黔党参药材样品的HPLC图谱导入指纹图谱软件(2004A版),经设定参照谱及自动匹配,对其峰数、峰值(积分值)和峰位(相对保留时间)等相关参数进行分析、比较,制定优化的指纹图谱。确定13个峰为共有峰,根据党参炔苷对照品HPLC图与供试品HPLC图对应色谱峰的保留时间及紫外光谱图比较结果,确认9号峰为党参炔苷峰,并设定其为参照峰。计算可得,13个共有峰峰面积的RSD为49.67%~100.93%,峰面积比值的RSD为40.86%~127.97%;共有峰的相对保留时间为0.441~1.675,相对保留时间的RSD为0.11%~1.50%。10批黔党参药材样品的HPLC指纹图谱及其共有模式见图1;对照指纹图谱见图2。

3 讨论

由图1可知,10批黔党参药材样品指纹图谱中主要色谱峰的整体图貌基本一致;从相似度评价结果来看,不同产地黔党参药材指纹图谱的相似度均在0.923以上,相似度较高,且每批药材13个共有峰相对保留时间的RSD均<3%,表明本方法建立的黔党参药材对照指纹图谱具有较好的代表性和重复

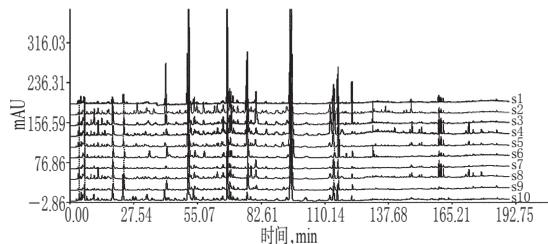


图1 10批黔党参药材样品的HPLC指纹图谱及其共有模式(中位数法)

Fig 1 HPLC fingerprints of 10 batches of *C. tubulosa* and common pattern (median method)

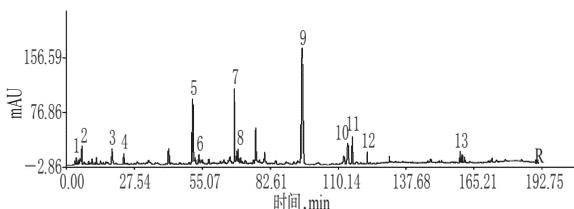


图2 对照指纹图谱(中位数法)

9. 党参炔苷

Fig 2 Contrast fingerprints (median method)

9. lobetyolin

性,为该药材的质量控制提供了有效的信息。但从其共有峰的峰面积比值计算结果来看,同一采收时间不同产地黔党参所含成分的含量差异相对较大,表明黔党参所含成分含量受地域性差异影响较明显。

另外,笔者还将在市场购买的其他党参药材——洛龙党参(S11)、潞党(S12)、甘肃党参(S13),照上述方法测定并记录HPLC图,分别导入指纹图谱软件(2004B版)进行分析,并与黔党参对照指纹图谱比较,其相似度评价计算结果分别为甘肃党参0.522、潞党0.093、洛龙党参0.121。同属其他党参药材与黔党参的指纹图谱相似度较低,表明它们之间的化学成分差异较大,所建立的黔党参对照指纹图谱具有较强的专属性。黔党参与其他品种党参药材的原始图谱比较见图3。

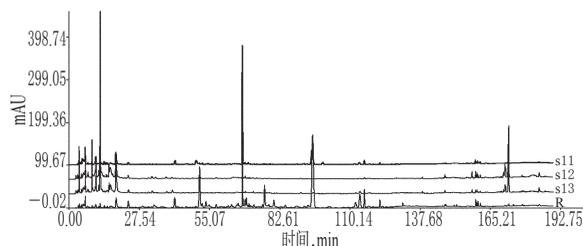


图3 黔党参与其他品种党参药材的原始图谱比较

Fig 3 Original map of *C. tubulosa* and other variety

在本试验中,笔者分别采用甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸水溶液、甲醇-乙腈-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.2%冰醋酸水溶液作为流动相进行梯度洗脱。结果表明,流动相为乙腈-水和乙腈-0.1%磷酸水溶液时的洗脱效果差异不甚明显,色谱峰分离情况不够好;流动相为甲醇-乙腈-0.1%磷酸水溶液和甲醇-水的洗脱效果较差;流动相为乙腈-0.2%冰醋酸水溶液时各色谱峰分离度大,峰形也较好,故选择之。

笔者分别采用依利特-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent Zorbax Extend-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent Zorbax SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)和 Diamonsil(钻石)-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱进行洗脱,结果表明采用依

RP-HPLC法同时测定布渣叶中牡荆苷和异牡荆苷的含量^Δ

孙冬梅^{1*}, 谭志灿², 毕晓黎¹, 罗文汇¹(1.广东省中医研究所, 广州 510095; 2.广州中医药大学, 广州 510405)

中图分类号 R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)07-0630-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.07.20

摘要 目的:建立同时测定布渣叶中牡荆苷和异牡荆苷含量的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为SHISEIDO Capcell pak MG C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.4%甲酸溶液(30:70, V/V), 流速为1.0 ml/min, 检测波长为339 nm, 柱温为30 ℃。结果:牡荆苷和异牡荆苷的进样量分别在53.40~1 334.00、73.90~1 847.00 ng范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系(r 均为0.999 9);平均加样回收率分别为99.00%和99.37%, RSD分别为1.87%和1.77%(n 均为9)。结论:本方法重复性好、操作简便、结果准确可靠, 可为布渣叶的质量评价和资源利用提供试验依据。

关键词 反相高效液相色谱法; 布渣叶; 牡荆苷; 异牡荆苷; 含量测定

Simultaneous Determination of Vitexin and Isovitexin in *Microcos paniculata* by RP-HPLC

SUN Dong-mei¹, TAN Zhi-can², BI Xiao-li¹, LUO Wen-hui¹(1.Guangdong Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095, China; 2.Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop a method for simultaneous determination of vitexin and isovitexin in *Microcos paniculata*. METHODS: RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on SHISEIDO Capcell pak MG C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) with mobile phase composed of methanol-0.4% formic acid (30:70, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 339 nm and the column temperature was maintained at 30 ℃. RESULTS: The linear ranges of vitexin and isovitexin were 53.40-1 334.00 ng($r=0.999\ 9$) and 73.90-1 847.00 ng($r=0.999\ 9$). The average recoveries were 99.00% (RSD=1.87%, $n=9$) and 99.37% (RSD=1.77%, $n=9$). CONCLUSION: The method is reproducible, simple and accurate, and it provides reference for quality evaluation and resource application of *M. paniculata*.

KEY WORDS RP-HPLC; *Microcos paniculata*; Vitexin; Isovitexin; Content determination

布渣叶为椴树科植物破布叶 *Microcos paniculata* L. 的干燥叶^[1], 产于广东、广西、海南、云南等地, 印度、印度尼西亚亦

有分布; 在我国, 尤以两广地区资源丰富, 其中广东的阳西、湛江为主产地, 均以野生为主。本品味微酸, 性凉, 无毒, 具有清

利特-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱所得谱峰最多, 各色谱峰分离度大, 且峰形最好, 故选择之。

本试验采用二极管阵列检测器同时考察5个波长——220、240、254、270、300 nm 的色谱峰分离情况, 发现在220 nm 波长处色谱峰分离不好, 且漂移现象严重; 240 nm 和254 nm 波长处虽然漂移不严重, 但色谱峰分离也不好; 在270 nm 和300 nm 波长处的色谱峰分离较好, 但在300 nm 波长处检测的色谱峰个数不及270 nm 波长处多, 故选择270 nm 作为检测波长。

参考文献

- [1] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[S]. 2003年版. 贵阳: 贵州科技出版社, 2003: 280.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 264.
- [3] 谢培山. 中药色谱指纹图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 175.
- [4] 孙庆文, 何顺志, 黄敏. 黔产管花党参中党参炔苷的含量

- 测定[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(8): 1 931.
- [5] 封士兰, 胡芳弟, 刘欣, 等. HPLC研究甘肃产白条党参指纹图谱[J]. 中成药, 2005, 27(7): 745.
- [6] 李黎星, 康杰芳. 中药党参的研究进展[J]. 现代生物学进展, 2009, 9(12): 2 371.
- [7] 朱恩圆, 贺庆, 王峰涛. 党参化学成分研究[J]. 中国药科大学学报, 2001, 32(2): 94.
- [8] 焦红军. 党参的药理作用及其临床应用[J]. 临床医学, 2005, 25(4): 92.
- [9] 邵建强. 中药指纹图谱的研究进展[J]. 中草药, 2009, 40(6): 994.
- [10] 王丽霞, 万素君. 指纹图谱在中药研究中的应用[J]. 中国中医药, 2003(8): 35.
- [11] 武果桃, 贺东昌, 张东俊, 等. 中药党参的HPLC指纹图谱研究[J]. 中兽医医药杂志, 2009(5): 54.
- [12] 曹瑞敏. 中药指纹图谱及其在中药质量控制中的应用[J]. 中国药房, 2004, 15(10): 635.
- [13] 陈恒冲, 贾超, 马彬峡, 等. 轮叶党参质量标准研究[J]. 中国药房, 2010, 21(23): 2 172.

(收稿日期: 2012-03-09 修回日期: 2012-05-17)

^Δ 基金项目: 广东省中医药局建设中医药强省课题资助(No. 201111131)

* 主任中药师, 硕士。研究方向: 中药质量评价。电话: 020-83482683。E-mail: tcmgdp@163.com