

鼠曲草饮片的RP-HPLC指纹图谱研究[△]

赵颖^{1*}, 李文¹, 李鹏², 芮海波¹, 谈瑄忠^{1#} (1.南京市中医院, 南京 210001; 2.南京海昌中药集团有限公司, 南京 210061)

中图分类号 R284.1; R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)15-1391-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.15.17

摘要 目的: 建立鼠曲草饮片的反相-高效液相色谱(RP-HPLC)指纹图谱。方法: 以绿原酸和异鼠李素为内参照物, 色谱柱为YMC-Pack ODS-A(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为0.1%磷酸水溶液-乙腈(梯度洗脱), 流速为1.0 ml/min, 检测波长为320 nm, 柱温为35 ℃。结果: 在RP-HPLC指纹图谱中确立了20个共有峰, 建立了鼠曲草饮片的共有模式。10批鼠曲草饮片的相似度均大于0.900。结论: 该方法简便、准确、重复性好, 可为鼠曲草饮片的质量评价提供依据。

关键词 鼠曲草; 指纹图谱; 反相-高效液相色谱法; 绿原酸; 异鼠李素

Study on RP-HPLC Fingerprints of *Gnaphalium affine* Decoction Pieces

ZHAO Ying¹, LI Wen¹, LI Peng², RUI Hai-bo¹, TAN Xuan-zhong¹ (1. Nanjing Hospital of TCM, Nanjing 210001, China; 2. Nanjing Haichang TCM Group Corporation, Nanjing 210061, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish RP-HPLC fingerprint of *Gnaphalium affine* decoction pieces. METHODS: Using chlorogenic acid and isorhamnetin as reference substance, the determination was performed on YMC-Pack ODS-A (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of 0.1% phosphate acid-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 320 nm, and the column temperature was 35 ℃. RESULTS: In RP-HPLC fingerprint, 20 common peaks were identified, and common model of *G. affine* tablets was established. The similarities of 10 batches were exceeded 0.9. CONCLUSION: The method is simple, accurate and reproducible, and it provide reference for quality control of *G. affine* decoction pieces.

KEY WORDS *Gnaphalium affine*; Fingerprint; RP-HPLC; Chlorogenic acid; Isorhamnetin

鼠曲草为菊科鼠曲草属植物鼠曲草 *Gnaphalium affine* Don的全草, 又名佛耳草、鼠耳、追风草, 性平, 味甘, 主要含有

黄酮、有机酸、三萜等成分^[1-3], 具有祛痰、止咳、平喘、祛风湿等功效, 可用于治疗咳嗽、痰喘和风湿痹痛等。全国各地均盛产

鼠曲草。鼠曲草饮片的质量评价提供依据。

离。

3.2 样品提取条件的考察

采用单因素循环的方法, 分别考察了提取方式(超声, 回流)、提取溶剂(甲醇、75%甲醇、50%甲醇、25%甲醇)、溶剂量(50、100、150倍)、提取时间(20、30、40、50 min)对试验结果的影响, 以出峰个数和峰面积大小进行比较, 最终确定了文中的样品提取条件。

3.3 系统聚类分析与指纹图谱相似度评价

由聚类分析树状图可看出, 14批川芎样品被分成两大类、五小类。4批四川产道地药材(编号: 1~4)与云南丽江(编号: 5)、陕西汉中(编号: 7)非道地药材聚为第一小类, 说明四川产川芎道地药材之间的内在质量相对一致, 云南丽江和陕西汉中产川芎的质量也较好, 接近四川产道地川芎。其他产地的川芎(编号: 6、8、9)与市售统货(编号: 10~14)交织聚在其他四小类中, 说明市售统货质量一般。相似度低于0.900的2批

药材(编号: 6、13)被聚为一类, 表明系统聚类分析与指纹图谱相似度评价这两种方法的结果得到了相互验证。

综上, 本试验首次建立了川芎的UPLC指纹图谱, 可为今后有效控制川芎的质量提供依据。

参考文献

- [1] 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: 38.
- [2] 曹阳. 川芎质量评价方法的研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2004.
- [3] 常新亮, 马云保, 张雪梅, 等. 川芎化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(15): 1 533.
- [4] 王英婷, 韩勇. 川芎药材HPLC法指纹图谱的研究[J]. 中国药事, 2011, 25(10): 1 017.
- [5] 刘小丽, 石丽, 李华. 川芎药材HPLC指纹图谱及阿魏酸测定研究[J]. 中成药, 2011, 33(8): 1 289.
- [6] 宋金春, 胡传芹, 刘红, 等. 川芎高效液相指纹图谱的建立[J]. 中国药房, 2005, 16(9): 716.
- [4] 沈旭, 李清, 王振中, 等. 桃仁药材UPLC特征指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 718.

(收稿日期: 2012-05-14 修回日期: 2012-07-16)

[△] 基金项目: 南京市科技发展计划资助项目(No. 201007005)

* 中药师, 硕士。研究方向: 中药饮片质量标准。电话: 025-52276123。E-mail: zhaoying12314@163.com

通信作者: 主任中药师。研究方向: 中药复方质量标准、药物经济学。电话: 025-52276121。E-mail: txz282@sohu.com

鼠曲草,滇南胜境关等地称之“绵菇”,四川、重庆等地则以“清明菜”相称^[4]。目前尚未见鼠曲草指纹图谱的相关研究报道,故笔者采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法首次建立了鼠曲草饮片的指纹图谱。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AB HPLC 系统,包括在线脱气机、Prominence SIL-20A 自动进样器、SPD-M20A 二极管阵列检测器和 CTO-20A 柱温箱(日本岛津公司);KQ-500E 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率:500 W,频率:40 kHz);AG285 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.2 试剂

绿原酸、异鼠李素对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110753-200413、110860-200608);甲醇为分析纯,乙腈、磷酸为色谱纯,水为纯化水。

1.3 药材

鼠曲草饮片来自江苏、湖北等地(详见表 1),均经南京市中医院李文副教授(主任药师)鉴定为菊科植物鼠曲草 *G. affine* D. Don 的全草。

表 1 鼠曲草饮片的来源信息

Tab 1 The information sheet of *G. affine* decoction pieces

序号	产地	生产批号
1	江苏	111014
2	湖北	100401
3	安徽	100222
4	四川	110115
5	浙江	110520
6	湖北	20700625
7	江苏	120301
8	河南	110815
9	江苏	120218
10	安徽	110511

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:YMC-Pack ODS-A(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:0.1%磷酸水溶液-乙腈,梯度洗脱(洗脱程序见表 2);流速:1.0 ml/min;柱温:35 ℃;检测波长:320 nm;进样量:10 μl。

表 2 流动相梯度洗脱程序

Tab 2 The condition list of mobile phase gradient elution

时间, min	0.1%磷酸水溶液	乙腈
0	98	2
10	90	10
30	80	20
35	80	20
50	70	30
70	65	35
100	35	65
120	20	80

2.2 混合对照品溶液的制备

精密称取绿原酸和异鼠李素对照品各适量,用 75% 甲醇溶解并稀释制成每 1 ml 含绿原酸 40 μg 和异鼠李素 10 μg 的混合对照品溶液,摇匀,即得。

2.3 供试品溶液的制备

取饮片粉末约 2 g,精密称定后置具塞锥形瓶中,精密加入

75% 甲醇 40 ml,称定质量,超声处理 30 min,静置,再称定质量,用 75% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一供试品溶液 10 μl,按拟定的方法连续进样 6 次,测定。结果,20 个共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 2%,相对峰面积的 RSD 均 < 3%,表明本方法精密度良好,符合指纹图谱技术要求。

2.4.2 稳定性试验 取同一供试品溶液 10 μl,分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定。结果,20 个共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 3%,相对峰面积的 RSD 均 < 3%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 取同一批样品适量,分别按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,各取 10 μl 进样测定。结果,20 个共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3%,表明本方法重复性良好。

2.5 样品测定

精密吸取混合对照品溶液与供试品溶液各 10 μl,按拟定的方法进样测定。

2.6 指纹图谱的建立与分析

2.6.1 指纹图谱的建立及共有峰的标定 按“2.1”项下色谱条件测定并记录 10 批鼠曲草饮片的 HPLC 图谱,详见图 1。通过不同产地鼠曲草饮片指纹图谱比较,选择稳定性较好、特征明显的峰为共有峰,详见图 2。以绿原酸峰(2 号峰)为参照峰,其保留时间和峰面积设为 1,计算其他各峰的相对保留时间和相对峰面积,结果分别见表 3、表 4。结果表明,来源于不同产地的 10 批鼠曲草饮片有 20 个共有峰,且共有峰面积之和 > 总峰面积的 90%。

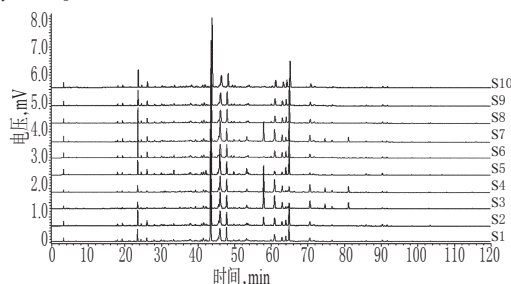


图 1 10 批鼠曲草饮片的指纹图谱

Fig 1 Fingerprint of 10 batches of *G. affine* decoction pieces

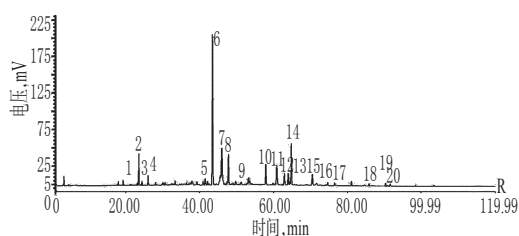


图 2 鼠曲草饮片的 HPLC 图

Fig 2 HPLC chromatogram of *G. affine* decoction pieces

2.6.2 色谱峰的鉴定 按“2.1”项下色谱条件测定绿原酸和异鼠李素对照品,并与样品指纹图谱中相应的色谱峰进行比较,分别发现样品指纹图谱中的 2 号峰、16 号峰的保留时间及紫外光谱与绿原酸和异鼠李素对照品吻合,故样品指纹图谱中 2 号特征峰为绿原酸、16 号特征峰为异鼠李素。绿原酸和异鼠李

素对照品的HPLC图见图3。

表3 10批鼠曲草饮片指纹图谱各共有峰的相对保留时间
Tab 3 Relative retention time of each common peak in the fingerprint of 10 batches of *G. affine* decoction pieces

峰号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均值	RSD, %
1	0.819	0.819	0.820	0.819	0.820	0.819	0.820	0.820	0.820	0.819	0.819	0.051
2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
3	1.038	1.038	1.038	1.039	1.038	1.038	1.038	1.038	1.038	1.038	1.038	0.031
4	1.106	1.107	1.107	1.108	1.107	1.108	1.108	1.108	1.104	1.107	1.107	0.118
5	1.768	1.766	1.765	1.766	1.762	1.765	1.764	1.763	1.765	1.763	1.765	0.106
6	1.851	1.850	1.849	1.850	1.846	1.849	1.848	1.846	1.848	1.846	1.848	0.098
7	1.959	1.958	1.956	1.958	1.953	1.952	1.954	1.952	1.955	1.953	1.955	0.136
8	2.035	2.036	2.033	2.035	2.030	2.032	2.031	2.030	2.032	2.029	2.032	0.118
9	2.116	2.119	2.115	2.117	2.112	2.115	2.113	2.112	2.115	2.111	2.115	0.109
10	2.459	2.467	2.462	2.465	2.459	2.462	2.460	2.460	2.461	2.457	2.461	0.123
11	2.584	2.595	2.589	2.591	2.585	2.589	2.587	2.584	2.587	2.583	2.587	0.141
12	2.672	2.681	2.675	2.681	2.674	2.675	2.672	2.672	2.673	2.669	2.674	0.148
13	2.715	2.726	2.720	2.724	2.717	2.720	2.717	2.715	2.718	2.714	2.718	0.147
14	2.749	2.761	2.755	2.760	2.752	2.756	2.752	2.751	2.753	2.749	2.754	0.150
15	2.989	3.005	2.998	3.003	2.995	2.998	2.995	2.993	2.995	2.991	2.996	0.165
16	3.141	3.157	3.149	3.178	3.169	3.170	3.145	3.167	3.145	3.141	3.156	0.437
17	3.245	3.264	3.255	3.259	3.251	3.254	3.251	3.251	3.250	3.247	3.253	0.172
18	3.634	3.662	3.652	3.655	3.646	3.650	3.646	3.610	3.644	3.640	3.644	0.387
19	3.821	3.853	3.842	3.847	3.837	3.841	3.836	3.835	3.835	3.830	3.838	0.231
20	3.873	3.905	3.894	3.899	3.889	3.893	3.889	3.886	3.887	3.883	3.890	0.229

表4 10批鼠曲草饮片指纹图谱各共有峰的相对峰面积
Tab 4 Relative peak area of each common peak in the fingerprint of 10 batches of *G. affine* decoction pieces

峰号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均值	RSD, %
1	0.120	0.148	0.143	0.164	0.162	0.138	0.118	0.133	0.129	0.126	0.138	11.640
2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
3	0.153	0.185	0.173	0.190	0.144	0.187	0.149	0.128	0.158	0.159	0.162	12.685
4	0.385	0.457	0.519	0.302	0.557	0.463	0.398	0.333	0.388	0.393	0.420	18.873
5	0.319	0.489	0.398	0.579	0.451	0.322	0.297	0.276	0.376	0.382	0.389	24.369
6	7.471	8.548	8.085	13.027	14.440	8.183	7.332	7.442	7.998	8.005	9.053	27.807
7	2.096	3.130	2.591	0.547	6.214	3.170	2.096	2.413	2.426	2.417	2.710	52.708
8	1.507	1.826	1.404	3.243	2.306	1.492	1.363	1.084	0.152	1.507	1.588	50.254
9	0.259	0.293	0.286	0.255	0.377	0.355	0.229	0.198	0.269	0.275	0.280	19.075
10	0.249	0.283	1.008	6.355	6.142	0.201	0.197	1.595	0.248	0.261	1.654	149.025
11	0.976	1.389	1.242	3.745	4.207	0.552	0.935	1.273	1.126	1.113	1.656	75.418
12	0.679	0.765	0.599	1.558	1.707	0.353	0.624	0.629	0.725	0.721	0.836	52.184
13	0.735	0.736	0.616	0.424	0.370	0.541	0.606	0.354	0.685	0.689	0.576	25.484
14	2.860	2.396	2.051	1.390	0.339	2.193	2.407	1.846	2.272	2.286	2.004	34.944
15	0.473	0.639	0.574	2.373	2.426	0.275	0.428	0.650	0.525	0.518	0.888	90.497
16	0.062	0.068	0.056	0.989	1.042	0.048	0.061	0.245	0.056	0.055	0.268	148.580
17	0.079	0.170	0.101	0.408	0.413	0.069	0.083	0.143	0.109	0.105	0.168	78.180
18	0.085	0.143	0.134	0.152	0.139	0.179	0.086	0.079	0.105	0.104	0.121	27.831
19	0.120	0.201	0.169	0.261	0.206	2.133	0.120	0.037	0.155	0.144	0.355	177.019
20	0.110	0.145	0.123	0.173	0.247	0.049	0.111	0.083	0.123	0.119	0.128	41.568

2.6.3 相似度评价 将“2.6.1”项下所得图谱用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A版)软件进行处理,得出鼠曲草饮片的HPLC指纹图谱共有模式。经过与共有模式比较,计算相似度。结果,10批鼠曲草饮片的相似度按样品编号依次

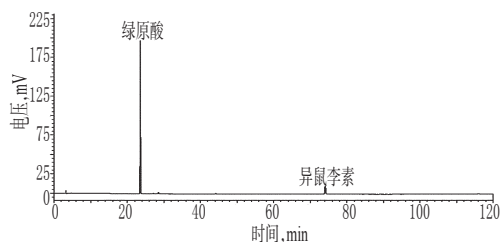


图3 绿原酸和异鼠李素对照品的HPLC图(320 nm)

Fig 3 HPLC chromatograms of chlorogenic acid and isorhamnetin (320 nm)

为0.994、0.992、0.901、0.989、0.916、0.996、0.983、0.998、0.998、0.994,表明10批饮片的相关性良好。

3 讨论

本试验对供试品溶液的制备方法进行了筛选,通过对不同提取溶媒(甲醇、75%甲醇、50%甲醇、水)、提取方式(直接超声提取、浸泡过夜后超声提取、回流提取、索氏提取)进行考察,经HPLC分析,结果表明以75%甲醇超声提取对黄酮类成分提取效率较高,供试品指纹图谱出峰多,提取方式简捷、有效。

本试验对流动相(甲醇-0.2%磷酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液)进行了比较,结果发现以乙腈-0.1%磷酸水溶液梯度洗脱,能使供试品色谱峰分离效果良好。通过对检测波长(210、245、280、320、365 nm)进行优选,结果以320 nm为检测波长所得图谱所含的峰数较多、信息量较大、各色谱峰分离较好。

中药饮片成分复杂,药效的发挥强调整体性,相对而言中药指纹图谱技术可以较全面地反映中药化学成分的种类与数量,进而反映中药的质量和中医用药所体现的整体疗效^[5]。本试验研究了市售10批次鼠曲草饮片的RP-HPLC指纹图谱,结果表明各批样品的指纹图谱之间较为吻合;由于受产地、环境因素及生长年龄等方面的影响,各批次鼠曲草的有效成分含量和比例有一定差异,如4号峰、10号峰对应的有效成分含量差异比较明显,说明不同批次鼠曲草饮片的质量存在一定的差异,其差异与药效的相关性有待进一步研究。

综上,本方法简便、准确,重复性、稳定性与精密度均较好,可为评价鼠曲草饮片的质量提供依据。

参考文献

- [1] 徐玉婷,吴丹慧. 鼠曲草的研究进展[J]. 医药导报, 2012, 31(2):192.
- [2] 胡熙明. 中华本草:第21卷[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1999:7 848.
- [3] 田东升. 鼠曲草治疗呼吸道疾病的疗效观察[J]. 中医药信息, 1997(6):22.
- [4] 王长松,周仲瑛. 习用冷僻草药选介[J]. 中医杂志, 2011, 52(24):2 151.
- [5] 刘文,蒋世云. 中药指纹图谱研究与应用进展[J]. 中国药房, 2011, 22(19):1 819.

(收稿日期:2012-05-28 修回日期:2012-08-27)

《中国药房》杂志——《化学文摘》(CA)收录期刊, 欢迎投稿、订阅