

东北地区铁线透骨草药材的HPLC指纹图谱研究^Δ

贾媛^{1*}, 张恒玉^{1#}, 柴尧², 彭九嫚³, 杜俊潮³(1.南京市江宁区中医医院, 南京 211100; 2.南京同仁堂药业有限责任公司, 南京 210012; 3.南京中医药大学药学院, 南京 210023)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)09-1265-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.09.31

摘要 目的: 建立铁线透骨草药材的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱。方法: 采用HPLC法。色谱柱为Hedera ODS-2 C₁₈, 流动相为乙腈-0.5%磷酸溶液(梯度洗脱), 流速为1.0 mL/min, 检测波长为338 nm, 柱温为30 ℃, 进样量为20 μL。以芦丁为参照物, 测定10批铁线透骨草药材的HPLC图谱, 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A版)进行共有峰确定和相似度评价。结果: 10批铁线透骨草药材有16个共有峰, 相似度均>0.9。经验证, 10批药材样品HPLC图谱与对照指纹图谱具有较好的一致性。结论: 所建指纹图谱可为东北地区铁线透骨草药材的鉴别和质量评价提供参考。

关键词 东北地区; 铁线透骨草; 高效液相色谱法; 指纹图谱

Study on the HPLC Fingerprints of *Herba clematidis* in Northeast

JIA Yuan¹, ZHANG Hengyu¹, CHAI Yao², PENG Jiuman³, DU Junchao³(1.Chinese Medicine Hospital of Nanjing Jiangning District, Nanjing 211100, China; 2.Nanjing Tongrentang Pharmaceutical Co. Ltd., Nanjing 210012, China; 3.College of Pharmacy, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the HPLC fingerprints for *Herba clematidis* in northeast. METHODS: HPLC was performed on the column of Hedera ODS-2 C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-0.5% phosphoric acid solution (gradient elution) at a flow rate of 1.0 mL/min, detection wavelength was 338 nm, column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 20 μL. Using rutin as a reference, the HPLC profiles of 10 batches of *H. clematidis* were determined, *Similarity Evaluation Software for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine* (2004A edition) was used for the common peaks identification and similarity evaluation. RESULTS: There were 16 common peaks in the 10 batches of *H. clematidis*, similarity degree was higher than 0.9. It was proved that the HPLC profiles and control fingerprint profile of 10 batches of *H. clematidis* had good consistency. CONCLUSIONS: The established fingerprints can provide reference for the identification and quality evaluation of *H. clematidis* in northeast.

KEYWORDS Northeast; *Herba clematidis*; HPLC; Fingerprint chromatogram

透骨草 *Herba clematidis* 是我国一味常用传统中药, 在民间具有悠久的药用历史, 具有祛风除湿、舒筋活络、止痛之功效, 主治风湿痹痛、筋骨挛缩、寒湿脚气、痲疹肿毒等症^[1]。透骨草有多个品种, 主要为珍珠透骨草、凤仙透骨草、铁线透骨草^[2], 但《中国药典》和部颁标准均未收载。现有研究发现, 铁线透骨草药材的化学成分主要有黄酮、皂苷、花色苷、香豆素、生物碱等^[3-6], 但缺乏全面的质量控制体系。目前通过建立指纹图谱来控制中药的质量已成为共识^[7-9]。本研究采用高效液相色谱法(HPLC)对东北地区铁线透骨草药材进行指纹图谱研究, 以期为该药材质量控制提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

e2695 型 HPLC 仪, 包括 2998UV 检测器(美国

Δ 基金项目: 南京市江宁区科技项目(No.2015Eg04)

* 药师, 硕士。电话: 025-52137929。研究方向: 中药制剂。

E-mail: jnjiny@126.com

通信作者: 副主任药师。电话: 025-52137929。研究方向: 医院药学。E-mail: chaiyao2012@163.com

Waters公司); KQ-1000E型医用超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司, 功率: 300 W, 频率: 40 kHz); BP-211D型电子分析天平(德国Satorius公司)。

1.2 试剂

芦丁对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 100080-201408, 纯度: >98%); 甲醇、乙腈、磷酸为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为重蒸水。

1.3 药材

铁线透骨草药材由安徽省亳州市药材总公司提供(见表1), 购于2015年10月。经江苏省中医院制剂部刘志辉主任中药师鉴定为真品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Hedera ODS-2 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.5%磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0~15 min, 8%→15% A; 15~35 min, 15%→17% A; 35~50 min, 17%→28% A; 50~65 min, 28%→75% A); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 338 nm; 柱温: 30 ℃, 进样量: 20 μL。

表1 铁线透骨草药材来源

Tab 1 Sources of *H. clematidis*

编号	批号	产地
1	141106	内蒙古
2	141210	辽宁
3	150110	黑龙江
4	150208	吉林
5	150312	辽宁
6	150515	吉林
7	150613	辽宁
8	150709	黑龙江
9	150810	内蒙古
10	150908	吉林

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取芦丁对照品适量,加50%甲醇溶液制成每1 mL含芦丁0.1 mg的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取药材样品粉末(过3号筛)约1.0 g,精密称定,置于具塞瓶中,精密加入50%甲醇溶液30 mL,称定质量,超声处理2 h,放冷,再次称定质量,用50%甲醇溶液补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:150515)适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,以芦丁的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果,各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均 $\leq 3\%$ ($n=6$),表明方法精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:150515)适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8、10 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,以芦丁的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果,各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均 $\leq 3\%$ ($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置10 h内基本稳定。

2.3.3 重复性试验 精密称取同一批样品(批号:150515)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,以芦丁的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果,各共有峰相对保留时间的RSD $< 0.11\%$ ($n=6$),相对峰面积的RSD $< 3.0\%$ ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.4 HPLC 指纹图谱的生成及共有峰的确定

2.4.1 HPLC 指纹图谱的生成 取10批样品药材适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,得HPLC指纹图谱,详见图1、图2。

2.4.2 共有峰的确定 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A版),选取时间窗宽度为0.1 min,以中位数生成对照指纹图谱,经过多点校正后自动匹配,生成药材样品HPLC指纹图谱共有模式,并确定共有峰。

结果表明,10批药材样品具有16个共有峰,详见图2。

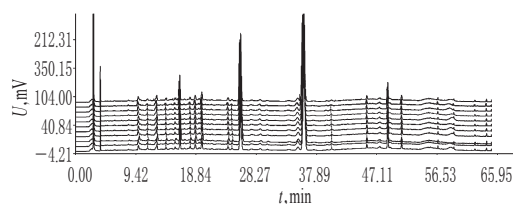


图1 10批药材样品的HPLC叠加指纹图谱

Fig 1 HPLC overlay fingerprint chromatograms of 10 batches of medicinal materials

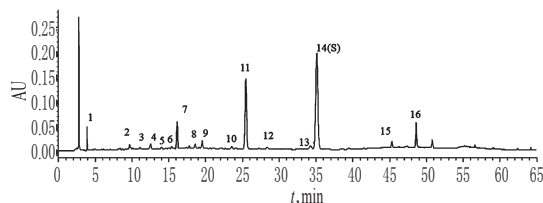


图2 药材样品的HPLC对照指纹图谱

Fig 2 HPLC reference fingerprint chromatograms of medicinal materials

2.4.3 峰面积限度的确定 根据《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》中的相关规定,单峰面积占总峰面积 $> 10\%$ 的共有峰(主要峰)应限定峰面积比值($\pm 30\%$)。由于图2中共有峰除了芦丁(峰S)和峰11外,其余单峰面积占总峰面积均 $< 10\%$ 。根据实际情况,笔者还选择了具有代表性且峰面积较大的峰7、峰9作为主要峰,对其与峰S的峰面积比值进行了限定,可见10批药材样品中的非共有峰面积总和占总峰面积平均值 $\leq 10\%$,详见表2。由于主要峰除峰S、峰11外,其余峰面积所占百分比均较低($< 6\%$),因此对于峰面积比值限度差值根据实际适当放宽,峰7、峰9均不得超出 $\pm 40\%$ 范围,详见表3。

2.5 相似度分析

采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A版)对10批药材样品进行比较分析,以平均数法进行多点校正、自动匹配生成HPLC对照指纹图谱,并比较10批药材样品HPLC图谱的相似度情况。结果,药材样品编号1~10的相似度分别为0.98、0.97、0.97、0.96、0.95、0.96、0.97、0.95、0.96、0.98,各批次药材样品的主要色谱峰均能找到,且10批药材样品的相似度均 > 0.9 ,说明10批药材样品的相似性良好。

3 讨论

铁线透骨草药材中有效成分主要为黄酮类成分,同时根据药材样品HPLC叠加指纹图谱,选择其中含量最高、保留时间适中、具有代表性的黄酮类成分芦丁为参照物。本试验通过对供试品溶液进行全波长(190~400 nm)扫描,结果显示,在338 nm波长处整体色谱峰较好,尤其是黄酮类有效成分能够充分体现,因此检测波长选择为338 nm。

在流动相的考察中,分别考察了甲醇-0.5%磷酸溶

表2 10批药材样品HPLC图谱共有峰的相对出峰时间

Tab 2 Relative retention time of common peaks of 10 batches medicinal materials

峰号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	RSD, %
1	0.110 3	0.111 0	0.108 6	0.108 4	0.108 6	0.108 5	0.109 1	0.108 6	0.108 8	0.109 3	0.803
2	0.275 2	0.275 5	0.278 7	0.273 9	0.275 2	0.274 5	0.276 1	0.274 6	0.275 2	0.273 9	0.506
3	0.317 3	0.317 3	0.318 7	0.314 5	0.315 6	0.315 6	0.317 2	0.315 1	0.315 7	0.314 7	0.430
4	0.358 9	0.358 2	0.358 8	0.354 4	0.355 9	0.355 3	0.357 0	0.355 0	0.355 6	0.354 8	0.481
5	0.400 5	0.399 7	0.398 5	0.394 7	0.396 2	0.395 5	0.397 0	0.395 5	0.396 2	0.395 5	0.496
6	0.440 7	0.439 5	0.439 5	0.434 8	0.436 2	0.435 9	0.436 5	0.435 8	0.436 0	0.435 6	0.468
7	0.461 8	0.460 6	0.459 6	0.456 1	0.457 2	0.457 0	0.457 3	0.456 7	0.457 1	0.456 5	0.425
8	0.531 7	0.531 0	0.526 7	0.523 9	0.524 1	0.524 2	0.525 2	0.524 0	0.525 3	0.524 2	0.561
9	0.558 9	0.558 2	0.555 7	0.553 4	0.553 1	0.553 1	0.553 7	0.553 1	0.554 0	0.553 0	0.403
10	0.672 4	0.671 9	0.670 1	0.668 7	0.667 7	0.668 1	0.668 3	0.668 1	0.669 0	0.668 0	0.254
11	0.726 5	0.726 4	0.725 2	0.723 4	0.722 6	0.723 2	0.723 3	0.723 2	0.723 6	0.723 0	0.197
12	0.808 3	0.808 3	0.811 6	0.809 7	0.808 9	0.809 8	0.808 8	0.809 6	0.809 1	0.809 0	0.118
13	0.975 4	0.975 4	0.974 1	0.973 8	0.974 0	0.974 0	0.973 5	0.973 7	0.973 6	0.973 9	0.071
14(s)	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0
15	1.293 3	1.293 1	1.273 9	1.275 7	1.275 1	1.276 8	1.278 0	1.277 9	1.280 2	1.279 5	0.550
16	1.388 8	1.388 0	1.365 4	1.367 0	1.366 5	1.368 1	1.369 6	1.369 4	1.372 1	1.371 3	0.625

表3 药材样品的标准指纹图谱数据(%)

Tab 3 Data of HPLC fingerprint chromatograms of medicinal materials(%)

峰号	相对保留时间(±10%)	峰面积比值/范围
1	0.109	
2	0.275	
3	0.316	
4	0.356	
5	0.397	
6	0.437	
7	0.458	0.103±40%/0.062~0.144
8	0.526	
9	0.555	0.040±40%/0.024~0.055
10	0.669	
11	0.724	0.504±30%/0.353~0.656
12	0.809	
13	0.974	
14(s)	1.000	1.000
15	1.280	
16	1.373	
非共有峰面积		<10%

液、乙腈-0.5%磷酸溶液、乙腈-水。结果表明,以乙腈-0.5%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱时,该药材样品整体色谱峰能呈现良好分离,因此选择乙腈-0.5%磷酸溶液为流动相。

本试验通过对不同提取溶剂、提取方法进行考察,结果表明,50%甲醇溶液提取率最高,超声法比回流法更简便,且提取效率高,因此选择50%甲醇溶液为溶剂,超声法为提取方法。

根据以上10批药材样品分析结果可看出,不同批次

的药材样品一致性较好。结果表明,本研究所建指纹图谱可为铁线透骨草药材的鉴别和质量评价提供参考。

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典:上册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1977:485-487.
- [2] 陈津慧. 中药透骨草的异物同名品种辨析[J]. 内蒙古中医药,2014,33(25):50-51.
- [3] 赵卫星,姜红波,王艳,等. 透骨草化学成分的研究进展[J]. 应用化工,2011,40(4):696-697.
- [4] 张永峰,曾常茜,黄雯,等. 透骨草化学成分和药理学作用研究进展[J]. 中华中医药学刊,2010,28(9):1960-1962.
- [5] 王威,刘小红,高华,等. 东北铁线莲地上部位化学成分研究[J]. 中草药,2014,45(17):2440-2446.
- [6] 刘慧,张钦德. 铁线莲属药用植物的研究进展[J]. 安徽农业科学,2012,40(27):13324-13327.
- [7] 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):1819-1822.
- [8] 韩炜,周刚,康廷国. 从美国首个批准植物药 veregen 软膏看我国中药质量控制[J]. 中国新药与临床杂志,2010,29(4):244-247.
- [9] 李强,杜思邈,张忠亮,等. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望[J]. 中草药,2013,44(22):3095-3104.

(收稿日期:2016-04-24 修回日期:2016-08-05)

(编辑:张静)

《中国药房》杂志——《文摘杂志》(AJ) 收录期刊, 欢迎投稿、订阅