

两头尖的HPLC指纹图谱研究

张彦飞*,李智萌,赵利利,贡济宇,蔡广知[#](长春中医药大学药学院,长春 130117)

中图分类号 R927.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)03-0399-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.03.39

摘要 目的:建立两头尖的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱。方法:采用HPLC法。色谱柱为Phemomenex Gemini C₁₈,流动相为0.1%磷酸-乙腈(梯度洗脱),流速为1 ml/min,检测波长为206 nm,柱温为30 ℃,进样量为20 μl。以竹节香附素A为参照物,分析13批两头尖样品,采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件进行相似度分析,并采用SPSS 13.0统计软件对样品进行聚类分析。结果:13批两头尖样品有11个共有峰,相似度>0.90。经验证,两头尖的指纹图谱与对照指纹图谱具有较好的一致性。13批药材产地中吉林桦甸、吉林蛟河、吉林天岗、吉林左家、黑龙江尚志、吉林舒兰、吉林通化、吉林抚松为第1类,黑龙江哈尔滨、黑龙江亚布力镇、辽宁清原、黑龙江一面坡、山东济南为第2类。结论:所建指纹图谱可为两头尖的鉴别和质量评价提供参考。
关键词 两头尖;高效液相色谱法;指纹图谱

Study on the HPLC Fingerprint of *Anemone raddeana*

ZHANG Yanfei, LI Zhimeng, ZHAO Lili, GONG Jiyu, CAI Guangzhi (School of Pharmacy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the HPLC fingerprint for *Anemone raddeana*. METHODS: HPLC was performed on the column of Phemomenex Gemini C₁₈ with mobile phase of 0.1% phosphoric acid-acetonitrile (gradient elution) at a flow rate of 1 ml/min, the detection wavelength was 206 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 20 μl. With the reference of raddeanin A, 13 batches of *A. raddeana* were analyzed, chromatographic fingerprint similarity evaluation system software was conducted for similarity analysis, and SPSS 13.0 was conducted for cluster analysis. RESULTS: There were 11 common peaks in the 13 batches of *A. raddeana* with similarity of higher than 0.90. According to the verification, the fingerprint and control fingerprint shows good consistency. The drugs in Huadian, Jiaohe, Tiangang, Shulan, Tonghua and Fusong of Jilin and Shangzhi of Heilongjiang were regarded as category 1, and in Harbin, Yabuli town and Yimianpo of Heilongjiang, Qingyuan of Liaoning, Jinan of Shandong were category 2. CONCLUSIONS: The established fingerprint can provide reference for the identification and quality evaluation of *A. raddeana*.
KEYWORDS *Anemone raddeana*; HPLC; Fingerprint

中药两头尖又名竹节香附,为毛茛科(Ranunculaceae)银莲花属多被银莲花 *Anemone raddeana* Regel 的干燥根茎。药材多夏季采收,除去残茎及须根,晒干。该中药首载于明朝刘文泰所著《本草品汇精要》,具有祛风除湿、消水肿的功效^[1],现

果显示其测量结果基本无差别,远志呋酮Ⅲ含量分别为0.063%和0.064%,说明该方法有较好的耐用性。
改进方法不仅适宜远志蜜炙品,也适宜于生远志,经两种方法对比研究发现,同批远志改进方法的测定结果约为药典方法测定结果的1/3(见表3),可见2010年版《中国药典》方法测定的远志呋酮Ⅲ含量结果偏高,标准所定限度也偏高(2010年版《中国药典》规定远志呋酮Ⅲ含量不得少于0.15%)。
综上所述,本方法操作简便、稳定、重复性好,虽测定时间有所延长,但提高了测定的准确度,更适用于远志中远志呋酮Ⅲ的含量测定。

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, 2010:146.
[2] 易东阳, 闫磊, 张慧, 等. 远志的化学成分及治疗阿尔茨海

默病的药理作用研究进展[J]. 中国药房, 2014, 25(11): 1 049.
[3] 万德光, 陈林, 刘友平, 等. 远志炮制沿革考[J]. 中药材, 2005, 28(3): 233.
[4] 康卫东, 梁永枝. 远志炮制品减毒增效的实验研究[J]. 中国民族民间医药, 2010, 19(12): 55.
[5] 官仕杰, 闫小平, 林开敬, 等. 远志不同炮制品的急性毒性比较研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 3(32): 398.
[6] 王光志. 远志资源与品质评价[D]. 成都: 成都中医药大学, 2006.
[7] 郭娟, 王建. 生远志及炮制品对小鼠止咳化痰作用[J]. 中药药理与临床, 2003, 19(4): 29.
[8] 河南省食品药品监督管理局. 河南省中药饮片炮制规范[S]. 郑州: 河南人民出版社, 2005: 67.
[9] 浙江省食品药品监督管理局. 浙江省中药炮制规范[S]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 2005: 51.

(收稿日期: 2015-04-03 修回日期: 2015-08-28)
(编辑: 张 静)

* 硕士研究生。研究方向: 药物分析新方法与新技术。E-mail: zhangyanfei69@126.com
[#] 通信作者: 讲师, 博士。研究方向: 中药的鉴定及质量分析。电话: 0431-86172193。E-mail: caiguangzhi@126.com

已证实其具有显著的抗肿瘤、抗炎、解热镇痛、抗惊厥、镇静等作用。

两头尖中含有三萜皂苷类、挥发油类、内酯类、多糖类等多种活性成分,其中含量最多的为三萜皂苷类^[1]。随着两头尖药材中抗风湿、抗肿瘤等有效成分的不断开发,该药材质量与其产地的相关性研究意义日渐重要。目前,2010年版《中国药典》只规定采用高效液相色谱(HPLC)法测定两头尖药材中竹节香附素A的含量^[1]。由于该方法是采用皂苷的紫外末端吸收进行测定,响应信号较弱,对样品和仪器要求均较高,且测定单一成分无法全面控制和评价两头尖药材的质量。因此,建立全面、系统的两头尖药材质量控制和评价方法,对于其资源开发利用具有重要意义。

吉林省是两头尖药材的主产区,相关资源丰富。笔者以吉林省为主选择了13个不同来源的两头尖药材进行研究,参考2010年版《中国药典》对竹节香附素A含量的规定来评价药材质量^[1],以该成分为参照物,建立了两头尖的HPLC指纹图谱,为其质量控制提供了依据,也为其后续研究奠定了基础。

1 材料

1.1 仪器

1100型HPLC仪,包括二极管阵列检测器(美国Agilent公司);AB135-S型电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];KQ3200DB型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

竹节香附素A对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111712-200501,纯度≥98%);乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 药材

各地两头尖药材样品(见表1)经长春中医药大学药学院姜大成教授鉴定为真品。

表1 两头尖药材来源

Tab 1 Origins of *A. raddeana*

编号	来源	编号	来源
S1	吉林桦甸	S8	吉林左家
S2	黑龙江哈尔滨	S9	黑龙江尚志
S3	吉林蛟河	S10	吉林舒兰
S4	黑龙江亚布利镇	S11	山东济南
S5	吉林天岗	S12	吉林通化
S6	辽宁清原	S13	吉林抚松
S7	黑龙江一面坡		

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Phenomenex Gemini C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:0.1%磷酸(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~12 min,99% A;12~22 min,99%→85% A;22~27 min,85% A;27~32 min,85%→75% A;32~45 min,75%→65% A;45~55 min,65% A;55~65 min,65%→53% A;65~71 min,53% A;71~79 min,53%→45% A;79~109 min,45%→15% A;109~124 min,15%→0A;124~140 min,0A);流速:1 ml/min;检测波长:206 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取竹节香附素A对照品2.5 mg,置于25 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液 取样品粉末(过80目筛)约2.5 g,精密称

定,置于锥形瓶中,加入10倍量70%乙醇,超声(功率:200 W,频率:40 kHz)提取40 min,滤过,滤液回收溶剂至干,残渣用甲醇溶解,转移至25 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,滤过,即得。

2.3 方法学验证

2.3.1 精密度试验 取“2.2.1”项下对照品溶液和“2.2.2”项下供试品溶液(编号:S3)适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,以竹节香附素A的峰为参照,记录各色谱峰相对保留时间与峰面积。结果,各色谱峰相对保留时间的RSD=0~0.90%(n=6),相对峰面积的RSD=0~1.36%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取同一供试品溶液(编号:S3)适量,分别放置0、2、4、8、12、24 h时进样测定,以竹节香附素A的峰为参照,记录各色谱峰相对保留时间与峰面积。结果,各色谱峰相对保留时间的RSD=0~0.93%(n=6),相对峰面积的RSD=0~0.96%(n=6),表明供试品溶液在24 h内基本稳定。

2.3.3 重复性试验 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液(编号:S3)适量,共6份,再分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,以竹节香附素A的峰为参照,记录各色谱峰相对保留时间与峰面积。结果,各色谱峰相对保留时间的RSD=0~1.43%(n=6),相对峰面积的RSD=0~1.64%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.4 指纹图谱的建立及共有峰的指认

2.4.1 指纹图谱的建立 取13批两头尖样品各适量,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,得特征指纹图谱,详见图1。

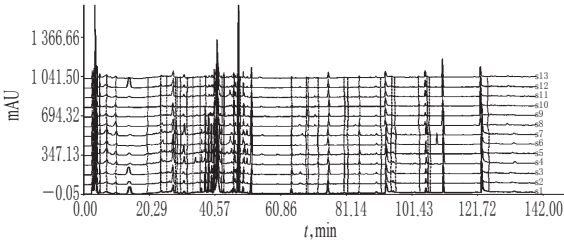


图1 13批两头尖高效液相色谱叠加图

Fig 1 Overlay plots of HPLC chromatograms of 13 batches of *A. raddeana*

2.4.2 两头尖对照图谱的生成 采用国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004 A版)软件对13批两头尖样品进行对照图谱拟合,详见图2。结果表明,13批两头尖共有的特征峰有11个,以7号峰(竹节香附素A)为参照峰。

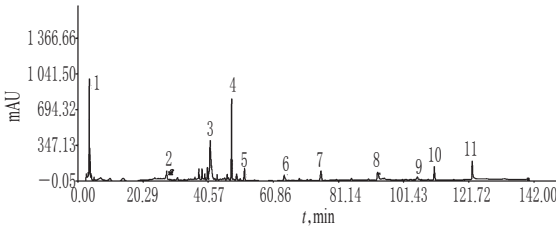


图2 13批两头尖共有峰高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of 13 batches of *A. raddeana* common peaks

2.4.3 相似度分析^[2-6] 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004 A版)软件对13批两头尖样品的色谱图进行比较分析。结果表明,在上述色谱条件下,两头尖各样品的特征峰

均能较好地分离,保留时间较为稳定,同时11个特征峰均能稳定出现,两头尖的指纹图谱与对照指纹图谱具有较好的一致性。13批两头尖各共有峰的相对保留时间的统计结果见表2,相似度评价结果见表3。

表2 13批两头尖各共有峰相对保留时间

Tab 2 Relative retention time of common peaks of 13 batches of *A. raddeana*

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
S1	2.448 1	1.306 4	1.814 3	1.298 4	12.064 0	7.287 2	1	0.200 6	1.956 0	2.233 9	0.394 9
S2	2.641 3	1.547 4	1.928 1	1.097 4	11.980 2	8.112 8	1	0.279 9	1.815 3	2.202 1	0.316 6
S3	2.415 6	1.397 5	1.743 3	1.304 8	10.742 4	6.976 2	1	0.166 0	2.020 4	2.227 0	0.344 9
S4	3.446 1	1.186 3	1.945 2	1.123 1	11.506 8	7.117 4	1	0.228 5	2.158 5	1.963 4	0.335 9
S5	2.994 1	1.348 3	1.901 7	1.240 4	11.791 7	7.2855	1	0.225 8	1.699 2	2.301 4	0.334 9
S6	3.208 0	1.533 5	1.827 2	1.234 5	12.230 8	6.848 2	1	0.253 4	1.966 9	2.089 19	0.374 2
S7	3.056 8	1.411 2	1.895 1	1.220 5	11.379 6	6.939 2	1	0.297 5	2.186 2	2.248 02	0.369 8
S8	2.559 1	1.468 4	1.752 7	0.957 1	12.319 7	7.138 2	1	0.234 5	1.884 1	2.417 9	0.377 5
S9	2.748 6	1.488 7	1.926 2	1.025 7	11.734 2	7.053 5	1	0.244 0	2.240 2	1.889 5	0.311 6
S10	2.971 9	1.697 2	1.841 4	1.301 4	12.332 7	6.852 1	1	0.253 2	1.693 6	2.127 2	0.365 3
S11	3.253 9	1.598 7	1.824 7	0.939 4	12.011 9	6.988 3	1	0.245 6	1.770 4	1.962 7	0.375 8
S12	3.063 1	1.444 4	1.912 1	1.083 5	11.448 1	6.851 3	1	0.222 8	1.651 5	2.020 1	0.381 9
S13	2.511 9	1.687 1	1.930 9	0.963 3	12.211 5	7.007 8	1	0.231 0	1.858 8	2.120 9	0.345 8

表3 13批两头尖相似度评价结果

Tab 3 Results of similarity evalution of 13 batches of *A. raddeana*

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.940	S8	0.930
S2	0.961	S9	0.919
S3	0.933	S10	0.932
S4	0.969	S11	0.968
S5	0.948	S12	0.939
S6	0.962	S13	0.942
S7	0.956		

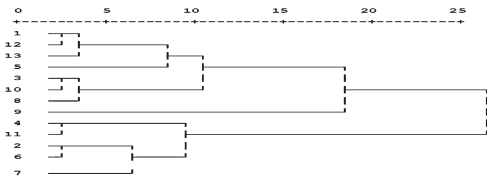


图3 13批两头尖指纹图谱的聚类分析树状图

Fig 3 Cluster Analysis dendrogram of fingerprints of 13 batches of *A. raddeana*

2.5 聚类分析

以不同来源的13批两头尖样品HPLC指纹图谱的11个共有峰的相对峰面积为指标,使用SPSS 13.0统计软件,采用组间连接法,以欧式平方距离为测度,对样品进行聚类分析^[7-9]。结果表明,13批两头尖可聚为类,其中吉林桦甸、吉林蛟河、吉林天岗、吉林左家、黑龙江尚志、吉林舒兰、吉林通化、吉林抚松为第1类,黑龙江哈尔滨、黑龙江亚布力镇、辽宁清原、黑龙江一面坡、山东济南为第2类,详见图3。

3 讨论

中药指纹图谱是一种综合的、量化的鉴定手段,它是建立在中药化学成分系统研究的基础上,主要用于评价中药材

以及中药制剂半成品质量的真实性、优良性和稳定性,“整体性”和“模糊性”为其显著特点。以指纹图谱作为中药(天然药物)提取物及其制剂的质量控制方法,已成为目前国际共识,各种符合中药(天然药物)特色的指纹图谱控制技术体系正在研究和建立^[10]。色谱方法是指纹图谱研究的首选方法,本试验利用HPLC法建立了中药两头尖的HPLC指纹图谱,该指纹图谱既可用于综合评价药材的内在质量,也可用于药材的快速鉴别。

本试验中对样品的提取方法、提取溶剂、提取溶剂浓度、提取溶剂量以及提取时间等参数进行了优化,并对色谱条件检测波长、柱温、流动相和色谱柱进行了考察。最终确定了10倍量70%的乙醇超声提取40 min作为样品前处理方法;色谱条件为“2.1”项下条件。试验所得数据采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件(2004 A版,国家药典委员会颁布)进行分析,确定了11个共有峰,各样品所得到的图谱峰形比较一致,相似度比较高,均>0.90。

综上所述,本研究所建立的HPLC指纹图谱可为两头尖的鉴别和质量评价提供参考。不同地区的两头尖药材之间的相似度较高,但通过聚类分析可以发现不同地区药材之间的细微差别,说明两头尖药材质量与药材产地的土壤类型、气候条件、经度及纬度等可能存在一定的相关性,而影响药材质量的具体内在原因还待进一步研究。

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,2010:157.

[2] 谢郁峰,李斌,陈卓瀚,等.不同来源的穿心莲药材HPLC指纹图谱研究[J].广东药学院学报,2011,28(4):231.

[3] 黄勇红,黄艳萍.飞扬草药材HPLC指纹图谱研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(16):72.

[4] 王克英,郭思好.黔产钩藤HPLC指纹图谱的研究[J].中国中药指南,2012,10(35):69.

[5] 邵林,郭庆梅,冉蓉,等.山东金银花HPLC指纹图谱研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,17(19):222.

[6] 关洪月,李林,刘晓,等.中药指纹图谱相似度计算方法探讨[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(18):282.

[7] 郝子博,王丽莉,张铁军.落花生茎叶HPLC指纹图谱研究[J].天津中医药大学学报,2012,14(6):10.

[8] 吴丽丽,张冰,刘小青,等.菊苣根HPLC指纹图谱的研究[J].中药新药与临床药理,2012,23(6):658.

[9] 宋潇,谢昭明,黄丹,等.茯苓皮药材的HPLC指纹图谱研究[J].中国药房,2015,26(15):2 109.

[10] 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):3 095.

(收稿日期:2015-04-13 修回日期:2015-07-15)

(编辑:张 静)