

藏药独一味 RP-HPLC 色谱指纹图谱的建立及其质量评价

纪兰菊^{1,2}, 冯丽娟^{1,2}, 赵明存³, 李生萍³ (1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海西宁 810001; 2. 青海省青藏高原特色生物资源研究重点实验室, 青海西宁 810001; 3. 青海普兰特藏药研究所, 青海西宁 810007)

摘要 [目的]建立独一味药材 HPLC 指纹图谱,研究不同地区独一味药材的质量,为其质量控制提供有效的方法。[方法]采用 RP-HPLC 方法梯度洗脱,测定 10 批不同地区的独一味样品。[色谱条件]Kromasil C18 柱(250 mm ×4.60 mm,5 μm),流动相为甲醇-0.4% 的磷酸水溶液(55:45),梯度洗脱程序为 0~70 min,甲醇的体积分数由 1% 线性增加至 15%;70~100 min 内,甲醇由 15% 线性增加至 17%;100~130 min 内,甲醇由 17% 线性增加至 20%;130~150 min,甲醇由 20% 线性增加至 100%;流速为 1 ml/min,检测波长为 254 nm,柱温为 30℃。[结果]确定了独一味药材中的 7 个共有峰。根据聚类分析结果,将独一味药材分为 3 类。[结论]该研究建立的方法重复性好,可用于不同地区独一味药材的质量评价,结合含量测定可用于独一味药材的质量的全面控制。

关键词 独一味;RP-HPLC 法;色谱指纹图谱

中图分类号 S567 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)31-09900-02

Establishment of Chromatographic Fingerprint and Quality Assessment of *Lamiophlomis* by RP-HPLC

Ji Lan-ju et al (Northwest Plateau Institute of Biology, The Chinese Academy of Sciences, Xining Qinghai 810001)

Abstract [Objective] To establish the chromatographic fingerprint analysis for the quality control of *Lamiophlomis*. [Method] RP-HPLC method was applied to establish the chromatographic fingerprint. Use Kromasil C18 column, [The mobile phase]:methanol and 0.4% phosphoric acid, gradient elution program: 0~70 min methanol's volume percent(as follow) is from 1% to 15%, 70~100 min from 15% to 17%, 100~130 min from 17% to 20%, 130~150 min from 20% to 100%; flow velocity:1ml/min, temperature: 30℃, detection wavelength:254 nm. [Results] The HPLC chromatographic fingerprint of *Lamiophlomis* showing 7 characteristic peaks was established. The 10 batches of *Lamiophlomis* were classified by cluster analysis. [Conclusion] The RP-HPLC fingerprint method is repeatable in analysis of *Lamiophlomis* and can be used to evaluate the quality of *Lamiophlomis* with quantitative assessment.

Key words *Lamiophlomis*; RP-HPLC; chromatographic fingerprint

独一味[*Lamiophlomis rotata* (Benth) Kudo]为唇形科独一味属植物,又名独步通,以全草或根、根茎入药,是藏、蒙、纳西等少数民族常用草药。独一味生长于海拔 3 000 m 以上的石质高山草甸、河滩地,分布于甘肃、青海、西藏、四川等地区^[1],具有止血、镇痛消肿、活血化淤、补髓、行气、续筋接骨等功效^[2]。独一味中的化学成分报道主要有黄酮类化合物^[3]、环烯醚萜类化合物^[4-5]等。独一味全草中的黄酮类化合物有木犀草素、木犀草素-7-O-葡萄糖苷、槲皮素、槲皮素-3-O-阿拉伯糖苷、芹菜素-7-O-新陈皮糖苷。环烯醚萜苷类化合物有山梔苷甲酯、8-O-乙酰山梔苷甲酯和 Seamside^[6]。中国药典以独一味中的总黄酮含量为质控标准^[7],用紫外-可见分光光度法测定独一味药材中的总黄酮含量。木犀草素为黄酮类化合物主要成分之一。木犀草素及其苷类具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤等药理作用^[8]。该研究在指标性成分木犀草素含量测定的基础上,建立了独一味药材的 HPLC 指纹图谱,分析了 10 批不同产地的独一味药材,并应用 SPSS 软件中系统聚类法对独一味样品的 HPLC 指纹图谱中各特征峰的相对峰面积进行分析,为独一味药材的质量控制提供有效方法。

1 材料与方法

1.1 原料 以青海、甘肃地区野生的独一味药材为样品,由中国科学院西北高原生物研究所陈桂琛研究员鉴定为正品,药材来源见表 1。

编号	样品来源	编号	样品来源
1	青海久治县	6	青海囊谦县
2	青海达日县	7	甘肃甘南地区
3	青海同仁县	8	青海泽库县
4	青海河南县	9	青海玛沁县
5	青海玉树县	10	西藏拉多地区

1.2 仪器与试剂 LC-10ATVP 二元泵(岛津公司);Rheodyne 7725 进样器(美国);SPD-M10AVP 二极管阵列检测器(岛津公司);Class-VP 液相色谱工作站(岛津公司);AT-130 柱温箱(天津);ZM 震动超微粉碎机;AB104-N 电子天平(Mettler-toledo 公司);Milli-Q 超纯水装置。甲醇(山东禹王试剂公司)为色谱纯,其他试剂均为分析纯。水为重蒸水,经 0.45 μm 滤膜过滤。木犀草素对照品购自中国药品生物制品检定所。

1.3 测定方法

1.3.1 独一味药材中木犀草素的测定。

1.3.1.1 色谱条件。色谱柱为 KromasilC18 (250 mm × 4.60 mm,5 μm),流动相为甲醇-0.4%磷酸水溶液(55:45),梯度洗脱,洗脱条件为 0 min~20 min~30 min,甲醇:55%~55%~100%;流速为 1 ml/min,检测波长为 350 nm,柱温为 30℃。

1.3.1.2 对照品溶液的制备。精确称取木犀草素对照品 0.002 0 g,加甲醇制成 0.02 mg/ml 的对照品溶液。

1.3.1.3 供试品溶液的制备。将样品置粉碎机中粉碎成细粉,精确称取 1.0 g,置具塞锥形瓶中,精确加入 2.5 mol/L 盐酸甲醇溶液 25 ml,密塞,称定重量,加热回流 30 min,放冷后再称定重量,用 2.5 mol/L 盐酸甲醇溶液补足减失的重量,摇匀并过滤。精确量取续滤液 2 ml,置 100 ml 量瓶中,加甲醇稀释至刻度即可。

1.3.1.4 线性试验。精密吸取木犀草素对照品溶液 2、4、8、

基金项目 西宁市重点项目(2006-G01)。

作者简介 纪兰菊(1952-),女,北京人,研究员,从事藏药药化方面的研究。

收稿日期 2007-06-05

12、16、20 μl ,按上述色谱条件测定。以相应组分的色谱峰面积(y)对其进样量($x, \mu\text{g}$)进行线性回归,回归方程为 $y = 16\ 679.9x + 59\ 710.2$ ($r = 0.999\ 4$),其线性范围为0.038 ~ 0.340 mg。

1.3.1.5 精密度试验。精确吸取木犀草素对照品溶液,按上述色谱条件进行测定。进样10 μl ,重复5次,测定木犀草素峰面积, RSD 为0.46%,表明精密度良好。

1.3.1.6 重复性试验。精密称取同一样品5份,依样品测定方法测定, RSD 为1.06%。

1.3.1.7 稳定性试验。取上述供试品溶液,分别间隔2 h 进样,每次10 μl ,重复5次,进行测定方法的稳定性试验,求得 RSD 为1.2%。

1.3.1.8 回收率试验。精密称取已知木犀草素含量的独一味药材全草样品5份,加入一定量的对照品,按“1.3.1.3”在上述色谱条件下测定,计算平均加样回收率为101.7%。

1.3.1.9 样品测定。按“1.3.1.3”项所述的方法制备各样品的供试品溶液,在选定的色谱条件下测定,根据峰面积计算不同地区的独一味药材全草中木犀草素的含量,结果见表2。

编号	木犀草素	编号	木犀草素
1	0.16	6	0.23
2	0.13	7	0.19
3	0.13	8	0.12
4	0.14	9	0.15
5	0.29	10	0.26

1.3.2 独一味药材指纹图谱的建立。

1.3.2.1 供试品溶液的制备。按“1.3.1.3”项下方法处理样品。

1.3.2.2 色谱条件。色谱柱为 KromasilC18 (250 mm \times 4.60 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.4%磷酸,梯度洗脱程序为0~70 min,甲醇的体积分数由1%线性增加至15%;70~100 min,甲醇由15%线性增加至17%;100~130 min,甲醇由17%线性增加至20%;130~150 min,甲醇由20%线性增加至100%;检测波长254 nm;柱温30 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3.2.3 方法学考察。

1.3.2.3.1 精密度试验。精确吸取独一味供试品溶液,在上述色谱条件下,重复进样5次,记录色谱指纹图谱。结果表明,各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于5,符合指纹图谱要求。

1.3.2.3.2 重现性试验。精确称取独一味样品5份,按“1.3.1.3”项所述方法进行的操作,在上述色谱条件下进样分析,记录指纹图谱。结果表明,各色谱峰的相对保留时间及其相对峰面积比值基本一致, RSD 均小于5%,说明重现性良好,符合指纹图谱要求。

1.3.2.3.3 稳定性试验。精确称取独一味样品,按“1.3.1.3”项下操作,分别在0、2、4、8、24 h 进样分析,记录指纹图谱。结果表明,各色谱峰的相对保留时间和其相对峰面积比值基本一致, RSD 均小于5%,符合指纹图谱要求。

2 结果与分析

2.1 指纹图谱及技术参数

2.1.1 指纹图谱的选择及特征峰的标定。按照中药指纹图谱研究技术要求,根据10批供试品的HPLC图谱所给出的相关参数,独一味药材中水溶性的所有有效成分色谱峰在130 min内全部出现。按照“中药色谱指纹图谱相似度评价系

统(2004A)”进行对照指纹图谱的模拟,标准指纹图谱的生成原理为中位矢量法,标准指纹图谱如图1所示。对各个峰紫外光谱图进行对比分析,找到7个共有峰,选择43 min左右的峰为参考峰(S),其他特征峰标号依次为1~6。根据色谱归一化分析,独一味药材HPLC指纹图谱的共有特征峰面积总和 > 90%。典型色谱图和各产地独一味色谱图见图1、2。

2.1.2 特征峰相对保留时间及相对峰面积积分比值。以43 min左右的峰为参考峰(S),对10批样品中,各指纹特征峰进行相对保留时间(R_{RT})及相对峰面积(R_A)的计算。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)”进行相似度计算。10批独一味样品指纹图谱相似度均大于0.80,说明该方法较为稳定,用该方法对独一味药材进行质量控制较为可靠。

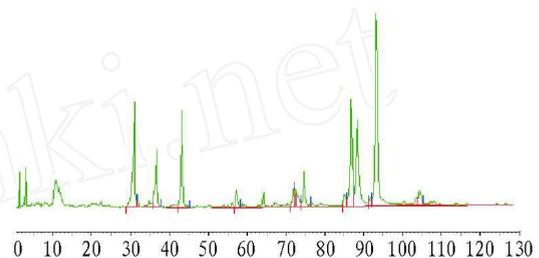


图1 独一味色谱指纹图谱

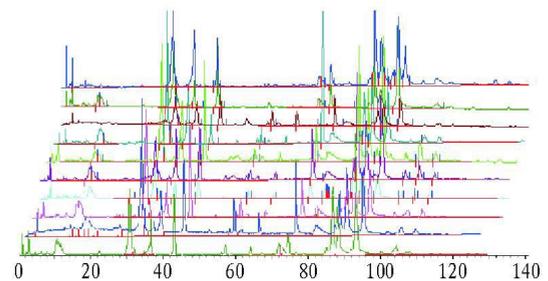


图2 10个不同产地独一味色谱

2.1.3 指纹图谱相似度评价。采用国家药典委员会提供的中药指纹图谱评价软件计算10批药材的指纹图谱相似度。10批独一味药材指纹图谱的相似度均大于0.8,其中相似度在0.887~1.000的1、5、9、10、6号样品相似性较好。

2.2 系统聚类分析 使用SPSS软件,采用组间关联法(Between-groups linkage)聚类,对10批独一味药材的HPLC中各特征峰的峰面积进行分析,以欧氏距离(Euclidean distance)作为测度的聚类结果。由图3可知,10批样品可分为3类,即1、5、9、10、6为第1类;样品2、3、7为第2类;样品4、8为第3类。

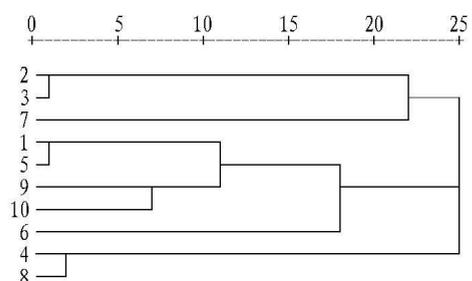


图3 系统聚类分析结果

(下转第9904页)

表2 规范法与改进法测定破碎率的比较

平行样 编号	1L水中细胞数 个	研磨后1L水中 细胞数 个	破碎率 %	冻融后1L水 中细胞数 个	破碎率 %
1	8.0 ×10 ⁷	2.4 ×10 ⁷	70.0	2.0 ×10 ⁷	75.0
2	8.4 ×10 ⁷	4.8 ×10 ⁷	42.9	1.6 ×10 ⁷	81.0
3	8.8 ×10 ⁷	4.0 ×10 ⁷	55.7	2.4 ×10 ⁷	72.7
4	5.6 ×10 ⁷	2.8 ×10 ⁷	50.0	1.6 ×10 ⁷	71.4
5	7.6 ×10 ⁷	2.4 ×10 ⁷	68.4	1.6 ×10 ⁷	79.0
6	9.2 ×10 ⁷	4.4 ×10 ⁷	52.2	2.0 ×10 ⁷	78.3
7	1.0 ×10 ⁸	4.8 ×10 ⁷	53.9	3.2 ×10 ⁷	69.2
8	8.0 ×10 ⁷	3.6 ×10 ⁷	55.0	2.4 ×10 ⁷	70.0
9	5.6 ×10 ⁷	3.2 ×10 ⁷	60.5	2.0 ×10 ⁷	73.7
10	8.0 ×10 ⁷	4.0 ×10 ⁷	50.0	2.0 ×10 ⁷	75.0

3 结论

研究表明,规范法处理样品烦琐、耗时,在研磨和转移过程中样品易损失,重复测定的精密度较低,而且长时间与丙酮接触会危害人体健康;改进法所测得的叶绿素a提取率明显高于规范法,且重复性较好,具有人为误差小、稳定性好、提取率高、结果准确、操作简便等特点。改进法中反复冻融使得细胞破碎率明显增大;多次反复振摇冷藏静置使得叶绿素a提取率也明显增大;用90%丙酮一次性定容,减少了丙酮的挥发,使得750 nm处的吸收值完全满足低于0.005的要求,测定结果更准确。通过试验残渣的镜检结果计算细胞破碎率,发现采用改进法的植物细胞破碎率比采用规范法的效果更佳。

(上接第9901页)

3 讨论

(1) 将系统聚类结果结合独一味药材中指针性成分木犀草素的含量测定结果(样品1、5、9、10、6中木犀草素含量0.15%,符合药典规定),可判定第 类为推荐品,第 、类为非推荐品。

(2) 1、5、9、10、6号样品相似性较好,可作为推荐品。这与上述结论相一致。

(3) 中药指纹图谱能有效鉴别样品的真伪或产地,但不能说明药材品质的优与劣。该试验研究的10批不同产地的独一味药材,其指纹图谱的相似度均大于0.8,均属地道药材,但样品2、3、4、8中指针性成分木犀草素的含量<0.15%,按照药典规定则不是合格的药材。由此可见,将中药指纹图谱与中药材指针性成分的含量测定相结合,将会进一步完善中药材质量的评价体系。

参考文献

- [1] 杨彩根,宋学宏,孙丙耀.浮游植物叶绿素a含量简易测定方法比较[J].海洋科学,2007,31(1):6-8.
- [2] 国家环保总局.环境监测技术规范(第4册)[M].北京:中国环境科学出版社,1986:17-18.
- [3] 金相灿,屠清英.湖泊富营养化调查规范[M].2版.北京:中国标准出版社,1999:77-79.
- [4] 孙利芹,王长海,江涛.紫球藻细胞破碎方法研究[J].海洋通报,2004,23(4):1-4.
- [5] 美国公共卫生协会.水和废水标准检验法[M].15版.宋仁元,张亚杰,王维,等,译.北京:中国建筑工业出版社,1985:901-904.
- [6] 张幅.对生产力测定中叶绿素a测定方法的探讨[J].环境研究与监测,2006,19(1):20-21.
- [7] NEVEUX J, PANOUSE M. Spectrofluorometric determination of chlorophylla and pheophytins[J]. Arch Hydrobiol, 1987, 109:567-581.
- [8] 韩桂春.淡水中叶绿素a测定方法的探讨[J].中国监测,2005(1):55-57.
- [9] 李振国.分光光度法测定浮游植物叶绿素a的比较研究[J].中国环境监测,2006,22(2):21-23.
- [10] 王振祥.测定叶绿素a方法探讨[J].安徽化工,2004,131(5):48.
- [11] 司大英.测定生产力中“叶绿素a”的探讨[J].环境工程,2000,18(3):52-53.
- [12] 陈宇焯.浮游植物叶绿素a含量测定方法的比较测定[J].湖泊科学,2000,12(2):185-187.
- [13] 吴志旭.浮游植物体内叶绿素a测定方法的改进[J].化学分析计量,2002,11(6):37-38.

参考文献

- [1] 吴征镒.西藏植物志[M].北京:北京出版社,1985.
- [2] 曾阳,陈学军,陈振宁.藏药独一味研究进展[J].中草药,2001,32(12):1141.
- [3] 梁重栋.藏药独一味的基础与临床研究[J].兰州医学院学报,1987,40(2):47.
- [4] 张承忠,李冲,石建功,等.藏药独一味中的环烯醚萜苷[J].中草药,1992,23(10):509.
- [5] 易进海,黄小平,陈燕,等.藏药独一味根环烯醚萜苷的研究[J].药学学报,1997,32(5):357.
- [6] LINDASY T J, ENNETH M, BRIAN W, et al. The minor iridoid glucosides of *Barleria lupulina*: Isolation, crystal structure and plant growth-inhibiting properties of 6-O-acetylshanzhiside methyl ester[J]. Aust J Chem, 1987, 40:785.
- [7] 中国药典,2000年版[S].一部.2000:533.
- [8] CHAN E C. Relaxation to flavones and flavonols in rat isolated thoracic aorta: mechanism of action and structure-activity relationships[J]. Cardiovascular Pharmacology, 2000, 35(2):326-329.

科技论文写作规范——引言

扼要地概述研究工作的目的、范围、相关领域的前人工作和知识空白、理论基础和分析、研究设想、研究方法和实验设计、预期结果和意义等。一般文字不宜太长,不需作详尽的文献综述。在最后引出文章的目的及试验设计等。“引言”两字省略。