

文章编号 :1000-4025(2004)04-0683-05

# 藏药花锚指纹图谱研究\*

纪兰菊, 陈桂琛, 孙洪发, 卢学峰

(中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001)

**摘要** 采用反相高效液相色谱-二极管阵列的检测方法, 对不同产地的 10 批野生花锚药材的水溶性成分进行了分析, 建立了花锚药材的指纹图谱, 并对栽培花锚进行了指纹图谱的特征比较。结果证明, 栽培花锚中的主要化学成分及数量符合花锚药材的指纹特征, 可以代替野生花锚药材入药。

**关键词** 藏药; 花锚; 指纹图谱; 反相高效液相色谱-二极管阵列的检测方法  
中图分类号 Q 946.83 文献标识码 A

## Chromatographic fingerprint study on *Halenia elliptica* of Tibet herb

JILAN-ju, CHEN Gui-chen, SUN Hong-fa, LU Xue-feng

(Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China)

**Abstract** The chromatographic fingerprint of *Halenia elliptica* D. Don has been set up by high performance liquid chromatography-diode-array detection method for ten batches wild herbs collected in different districts of Qinghai-Tibet Plateau. The result showed that the species cultivated can be used as the wild ones by comparing of fingerprint data of major constituents in wild and cultivated *H. elliptica*.

**Key words** Tibet herb; *Halenia elliptica* D. Don; chromatographic fingerprint; high performance liquid chromatography-diode-array detection

花锚 (*Halenia elliptica* D. Don) 为龙胆科 (Gentianaceae) 花锚属植物, 是藏医药系统中用于治疗肝胆系统疾病的常用植物药之一, 泛称“藏茵陈”<sup>[1]</sup>。主要分布于青藏高原, 为藏药习用药材。研究表明花锚全草含有三萜类、黄酮类、吡啶酮类等近 20 种化学成分<sup>[2-5]</sup>, 其中水溶性成分花锚苷 (haleniaside) 和去甲氧基花锚苷 (demethoxyhaleniaside) 为抗肝炎主要有效成分<sup>[5]</sup>。由于近些年对花锚的过度采挖使得生态环境日益恶化, 为保护脆弱的高原生态环境和保证药用资源, 本课题组在野生花锚分布集中的地区, 开展了引种栽培试验, 种植植物生长状况良好。但栽培花锚的品质, 能否代替野生花锚入药需进一步研究。本研究对不同产地的 10 批野生花锚药材中的药用部位群, 以花锚苷 (苷 3) 和去甲氧基花锚苷 (苷 1) 及 1-O- $\beta$ D-木吡喃糖-(1-6)- $\beta$ D-葡

萄吡喃糖]-2, 3, 4, 5-四甲氧基吡啶酮 (苷 2) 为指征性成分, 采用反相高效液相色谱-二极管阵列的检测方法, 建立了花锚药材的高效液相色谱及紫外光谱指纹图谱, 为栽培藏药花锚代替野生花锚入药, 提供了科学依据。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器、试剂和材料

LC-10A TVP 二元泵 (岛津); Rheodyne 7725 进样器 (美国); SPD-M 10A VP 二极管阵列检测器 (岛津); Class-V P 液相色谱工作站 (岛津); 2200B 超声波仪; Millipore 超纯水装置; C<sub>18</sub> 硅胶小柱 (1 mL Waters)。

HPLC 级乙腈购自美国 Tedia 公司; 分析纯甲

\* 收稿日期: 2003-07-22; 修改稿收到日期: 2003-10-20

基金项目: 国家中西部重点项目 (2001BA901A 47)

作者简介: 纪兰菊 (1952-), 女 (汉族), 副研究员, 主要从事藏药药化研究工作。

醇 磷酸购自上海化学试剂公司。

苷 1, 苷 2, 苷 3 对照品由中国科学院西北高原生物研究所孙洪发教授提供。

10 批成熟期野生花锚药材分别采集：青海省察汗河；大通县 71 km；天祝县；黑泉水库；西藏鲁朗；青海省果洛洲；西藏拉萨；青海省北山林场；青海省青沙山。10 对照品药材及栽培药材采集自于青海省湟中县群加乡。

## 1.2 色谱分析条件

色谱柱 VP-ODS C<sub>18</sub> 柱 (5 μm, 150 mm × 4.6 mm)；流动相：由乙腈-水-磷酸 (0.1%) 组成。流速 1.0 mL/min；检测波长 254 nm；柱温：室温；分析时间 60 min；进样量 20 μL。

## 1.3 供试品溶液的制备

分别取上述不同产地的花锚药材，全株剪碎，置超微粉碎机中粉碎 20 min，精密称取 0.5 g，置 100 mL 锥形瓶中，加甲醇 20 mL，置 80℃ 水浴锅上回流 2 h，放冷至室温，过滤，滤液于 25 mL 容量瓶中，用

甲醇定容。摇匀后经 C<sub>18</sub> 硅胶小柱做脱脂处理，即先用 5 mL 蒸馏水活化小柱，即用 5 mL 甲醇预先淋洗，再用 10 mL 蒸馏水洗脱后，将样品提取液直接上柱，弃取初滤液，收集续滤液为供试品溶液。

## 2 结果与讨论

### 2.1 流动相及检测波长的选择

精密吸取供试品溶液 20 μL 进样，分别以甲醇-水，甲醇-醋酸水溶液 (0.02% ~ 0.1%)，甲醇-磷酸水溶液 (0.02% ~ 0.1%)，乙腈-磷酸水溶液 (0.02% ~ 1%)，不同比例的等度及梯度试验，记录 190~370 nm 波长处的色谱图，结果表明，以乙腈-磷酸水溶液 0.1%，梯度洗脱程序为 0~5 min，乙腈的体积分数 (下同) 为 12%；5~15 min，乙腈由 12% 线性增加至 15%；15~40 min，乙腈由 15% 线性增加至 35% 的洗脱条件和检测波长为 254 nm 条件为佳。供试品中各色谱分离峰基本达到基线分离 (图 1)。

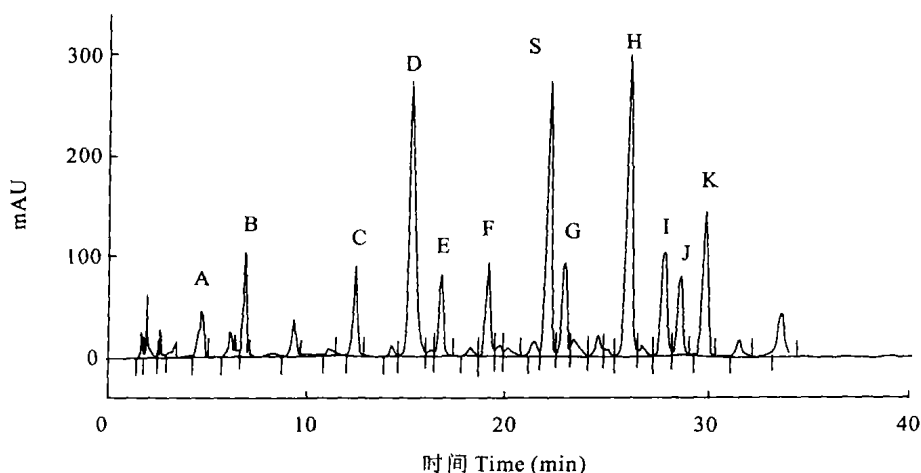


图 1 分离色谱图

S 去甲氧基花锚苷, D1 8, 1-O-樱草糖-2, 3, 4, 5-四甲氧基山酮, D2 9, 花锚苷, D3

Fig 1 Chromatogram of separation

S Demethoxyhaleniaside, D1 8, 1-O-primeverosyl-2, 3, 4, 5-tetraethoxyxanthone, D2 9, haleniaside, D3

### 2.2 精密度试验

以同一供试品溶液进样，每次 20 μL，重复 5 次。检测供试品药材中的主要指征性成分苷 1、苷 2、苷 3 (标准样品添加法和紫外光谱法确认) 的峰面积，其中苷 1 峰面积积分值的 RSD 为 1.9%，苷 2 峰面积积分值的 RSD 为 3.15%，苷 3 峰面积积分值的 RSD 为 3.18%。

### 2.3 稳定性试验

取上述供试品溶液，分别间隔 2 h 进样，每次 20 μL，重复 5 次，计算苷 1、苷 2、苷 3 的峰面积积分值，

其中苷 1 峰面积积分值的 RSD 为 1.8%，苷 2 峰面积积分值的 RSD 为 3.76%，苷 3 峰面积积分值的 RSD 为 3.01%。

### 2.4 重复性试验

按供试品溶液制备方法分别制备 5 份样品，分别测定，计算苷 1、苷 2、苷 3 的峰面积积分值，其中苷 1 峰面积积分值的 RSD 为 2.85%，苷 2 峰面积积分值的 RSD 为 4.70%，苷 3 峰面积积分值的 RSD 为 5.18%。

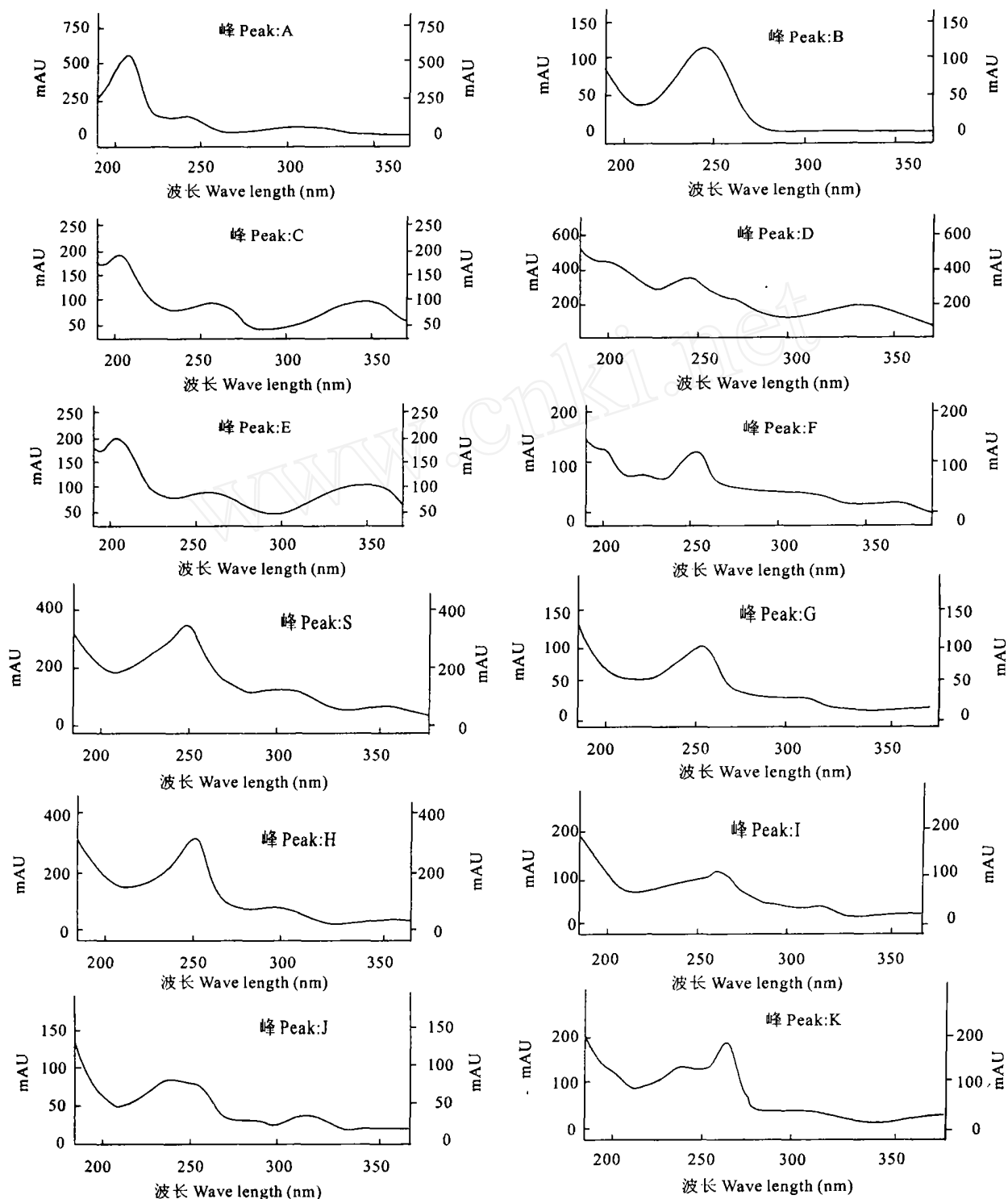


图 2 特征峰 A~K 紫外光谱图(S,H,I 同图 1)

Fig 2 UV spectra of characteristic peak A~K (S,H,I same as in Fig 1)

### 2.5 花锚药材的指纹图谱及技术参数

2.5.1 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<sup>[5]</sup>要求,根据 10 批供试品的 HPLC 图谱所给出的相关参数,花锚药材中水溶性的所有药用成分色谱峰自 60 min 之内全部出现,其

中苷 1、苷 2、苷 3 为花锚药材中主要水溶性成分 (RT 22.044 min, A% 12.05, RT 26.005 min, A% 14.42, RT 27.766 min, A% 5.25) 根据积分面积的大小,苷 1 与苷 2 相近,由于苷 1 为花锚中的主要有效成分<sup>[4]</sup>,选择苷 1 为参考峰(S),其它特

征峰依次标号为A~K(图1),同时给出了12个指定成分(特征峰)的紫外吸收光谱(图2).根据色谱归一化分析,花锚药材HPLC指纹图谱的共有特征峰面积总和>90%.

2.5.2 特征峰相对保留时间及相对峰面积积分值 以苷2为参考峰(S),对10批供试品中,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(表1).

表1 花锚药材的HPLC特征峰 $R_{RT}$ 和 $R_A$

Table 1 HPLC  $R_{RT}$  and  $R_A$  of *Halimolobos elliptica*

样品 Sample	特征峰的 $R_{RT}$ Ratio of retention time: $R_{RT}$											
	1	2	3	4	5	6	S	7	8	9	10	11
1	0.22	0.32	0.58	0.73	0.78	0.86	1.00	1.03	1.17	1.26	1.29	1.34
2	0.21	0.31	0.57	0.71	0.76	0.86	1.00	1.04	1.18	1.26	1.30	1.35
3	0.21	0.32	0.58	0.72	0.78	0.86	1.00	1.03	1.17	1.25	1.29	1.34
4	0.23	0.32	0.59	0.72	0.78	0.87	1.00	1.03	1.17	1.25	1.29	1.34
5	0.22	0.32	0.58	0.69	0.77	0.87	1.00	1.03	1.17	1.25	1.29	1.34
6	0.22	0.31	0.57	0.70	0.76	0.86	1.00	1.03	1.18	1.25	1.29	1.34
7	0.22	0.31	0.58	0.71	0.77	0.86	1.00	1.03	1.17	1.25	1.29	1.34
8	0.22	0.31	0.58	0.71	0.77	0.86	1.00	1.03	1.17	1.26	1.29	1.34
9	0.21	0.31	0.56	0.69	0.75	0.86	1.00	1.03	1.18	1.26	1.29	1.35
10	0.21	0.31	0.56	0.69	0.75	0.86	1.00	1.03	1.18	1.26	1.29	1.35

样品 Sample	特征峰的 $R_A$ Ratio of area: $R_A$											
	1	2	3	4	5	6	S	7	8	9	10	11
1	0.12	0.19	0.26	0.71	0.13	0.26	1.00	0.24	0.92	0.39	0.22	0.37
2	0.33	0.20	0.27	1.34	0.19	0.32	1.00	0.29	0.90	0.38	0.25	0.38
3	0.08	0.11	0.28	0.71	0.13	0.23	1.00	0.21	0.85	0.49	0.27	0.12
4	0.08	0.13	0.23	0.56	0.13	0.18	1.00	0.23	1.31	0.48	0.32	0.11
5	0.15	0.55	0.13	0.72	0.45	0.33	1.00	0.23	0.55	0.34	0.38	0.11
6	0.28	0.31	0.47	2.41	0.59	0.39	1.00	0.50	1.43	0.57	0.78	0.15
7	0.12	0.16	0.21	0.66	0.12	0.15	1.00	0.13	0.90	0.66	0.28	0.58
8	0.14	0.18	0.24	1.06	0.25	0.29	1.00	0.31	1.13	0.39	0.28	0.18
9	0.19	0.24	0.36	1.29	0.32	0.36	1.00	0.35	1.19	0.43	0.33	0.22
10	0.10	0.14	0.16	0.58	0.20	0.25	1.00	0.24	1.22	0.42	0.55	0.06

2.5.3 指纹图谱的相似度分析 根据中药色谱指纹图谱的相似度计算方法<sup>[6]</sup>,由于有超常样本的存在,积分面积相对比值( $R_A$ )按中位数矢量法计算,确定花锚药材指纹图谱的共有模式的参数,即核心参数积分面积相对比值( $R_A$ )及范围,并与栽培花锚

药材指纹图谱参数进行比较,同时对10批野生药材的色谱分离图进行叠加比较,同一产地的野生与栽培花锚药材色谱分离图叠加比较,显示了良好的相似度(表2,图3、4).

表2 花锚药材指纹图谱共有模式参数与栽培种的比较

Table 2 Comparison of fingerprint data in wild and cultivated *H. elliptica*

参数 Data	特征峰的 $R_A$ Ratio of area: $R_A$											
	1	2	3	4	5	6	S	7	8	9	10	11
Median	0.13	0.19	0.25	0.96	0.19	0.27	1.00	0.24	1.03	0.42	0.30	0.44
Cultivated	0.28	0.33	0.33	1.11	0.34	0.39	1.00	0.47	1.29	0.69	0.68	0.96

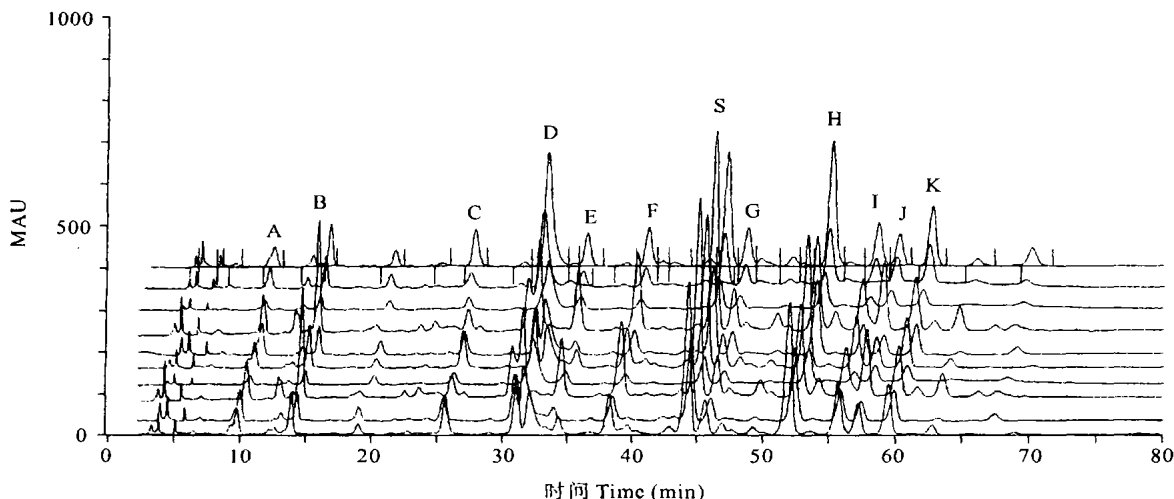


图3 10批野生药材色谱分离叠加图(色谱分离图从下到上依次为样品1~10)

Fig. 3 Overlap chromatogram of separation ten batches of wild herbs (From below to top chromatogram of separation 1~10)

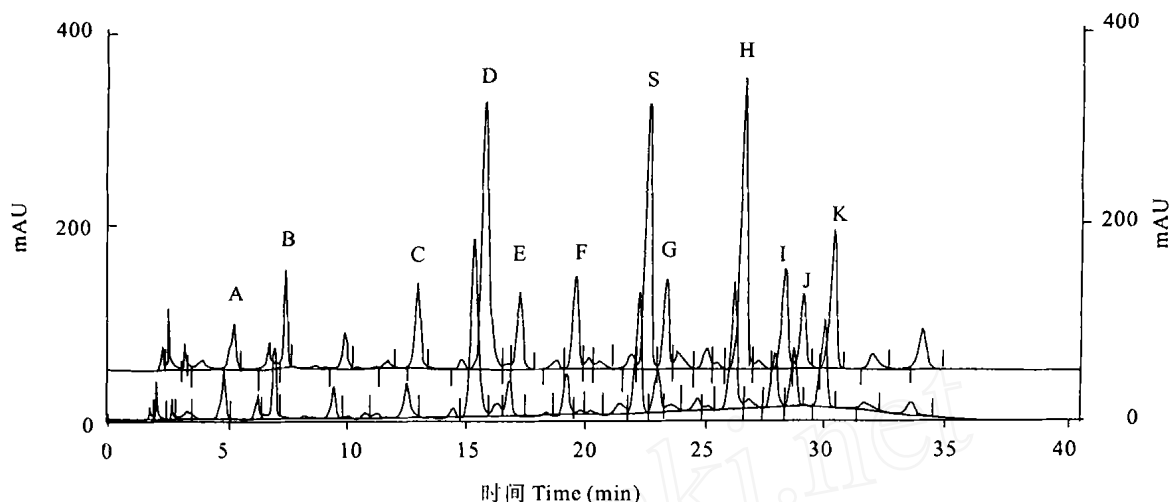


图 4 野生和栽培药材色谱分离叠加图

Fig 4 Overlap chromatogram of separation of wild and cultivated herbs

### 3 结 论

选用反相高效液相色谱法与二极管阵列检测器联用方法,对中药材进行指纹图谱的研究,解决了中药缺乏测定标准品的难题,同时可获得全面反映药材特性的色谱分离图,制定出系统性、特征性和稳定性均较好的药材指纹图谱,并转换成稳定、易于比较的共有模式参数,为中药材的质量标准检测和品质评价,提供了快速、准确、全面的分析方法。

花锚药材的指纹图谱应具有自身的化学条码特征,是其内在化学成分种类与数量的反映,本研究对

不同产地的 10 批野生花锚药材的水溶性成分的 HPLC 及 UV 指纹图谱进行了技术参数的分析,建立了花锚药材的指纹图谱。并对栽培花锚进行了指纹图谱的特征比较,结果证明,栽培花锚中的化学成分及数量符合花锚药材的指纹特征,可以代替野生花锚药材入药。

值得注意的是,花锚指纹图谱中共有峰(4)在不同产地的分析样品中出现了裂分,但其总面积符合指纹图谱参数计算要求,造成这种现象是否与样品的产地或采集季节有关,值得进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志[M]. 西宁:青海人民出版社,1991:113- 114
- [2] SUN H F(孙洪发),FAN SH F(樊淑芬),DING J Y(丁经业),HU B L(胡伯林),ZHANG X F(张晓峰). A quantitative analysis of oleanolic acid in six zangyinchen drugs from Qinghai Province[J]. *Acta Biologica Plateau Sinica* (高原生物学集刊),1987,6:243- 244(in Chinese).
- [3] HU B L(胡伯林),SUN H F(孙洪发),DING J Y(丁经业),FAN SH F(樊淑芬). Xanthone constituents of *Halenia elliptica* [J]. *Acta Biologica Plateau Sinica* (高原生物学集刊),1984,2:21- 214(in Chinese).
- [4] SUN H F(孙洪发),HU B L(胡伯林),FAN SH F(樊淑芬),DING J Y(丁经业). Three new xanthones from *Halenia elliptica* D. Don[J]. *Acta Botanica Sinica* (植物学报),1983,25(5):460- 467(in Chinese).
- [5] SUN H F(孙洪发),HU B L(胡伯林),DING J Y(丁经业),FAN SH F(樊淑芬). Three new glycosides from *Halenia elliptica* D. Don [J]. *Acta Botanica Sinica* (植物学报),1987,29(4):422- 428(in Chinese).
- [6] 周玉新主编. 中药指纹图谱研究技术[M]. 北京:化学工业出版社,2002:115- 116