

## 车前子指纹图谱研究及其 2 种指标成分的测定

何新荣, 古今, 刘萍

中国人民解放军总医院 中药房, 北京 100853

**摘要:** 目的 建立不同产地车前子药材的高效液相色谱指纹图谱并测定京尼平苷酸和毛蕊花糖苷 2 种指标成分的量。方法 Zorbax sbac-C<sub>18</sub> 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.5%的醋酸水溶液, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 254 nm, 采用梯度洗脱, 建立车前子 HPLC 指纹图谱。结果 建立了车前子的指纹图谱, 确立 13 个共有峰, 京尼平苷酸和毛蕊花糖苷质量分数均值分别为 0.794 3% 和 0.664 2%。结论 本研究建立的指纹图谱与指标成分测定相结合分析方法快速, 可用于评价车前子的质量, 并为下一步建立车前子配方颗粒的质量控制方法提供依据。

**关键词:** 车前子; HPLC; 京尼平苷酸; 毛蕊花糖苷; 指纹图谱

中图分类号: R286.022 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)21-3053-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.21.021

## Fingerprint of *Plantaginis Semen* and determination of its two index contents

HE Xin-rong, GU Jin, LIU Ping

Department of Chinese Materia Medica, PLA General Hospital, Beijing 100853, China

**Abstract: Objective** To establish the fingerprint of *Plantaginis Semen* and to determine the two index contents of geniposidic acid and verbascoside. **Methods** The chromatographic separation was performed on a C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was a mixture of acetonitrile-0.5% acetic acid aqueous solution in gradient elution. The flow rate was 1.0 mL/min, and the detection wave length was 254 nm. Similarity evaluation system was used in data analysis. **Results** The HPLC fingerprint of *Plantaginis Semen* showed 13 characteristic peaks with high similarity, and contents of geniposidic acid and verbascoside were 0.794 3% and 0.664 2%, respectively. **Conclusion** The method that combining the determination of index contents with fingerprint analysis is timesaving and could be used for the quality control of *Plantaginis Semen*. It could provide a reference for the further research on the quality control of formular granule with *Plantaginis Semen* extracts.

**Key words:** *Plantaginis Semen*; HPLC; geniposidic acid; verbascoside; fingerprint

车前子为车前科植物车前 *Plantago asiatica* L. 或平车前 *P. depressa* Willd. 的干燥成熟种子, 具有清热利尿、渗湿通淋、明目祛痰的功效<sup>[1]</sup>。目前, 由于车前子品种多、分布广、药源杂, 伪品多, 如葶苈子、荆芥子、党参子、青葙子、茺蔚子、小车子等<sup>[2]</sup>, 故其质量控制一直是个难题, 同时车前子的 GAP 建设也缺少足够的科技支撑<sup>[3]</sup>。指纹图谱是一种顺应中药多组分、多靶点, 从“全成分”的角度出发的现代中药质量控制方法, 现已成为国内外广泛接受的中药质量控制评价模型<sup>[4-5]</sup>。《中国药典》2010 年版规定了京尼平苷酸和毛蕊花糖苷为车前子的 2 个质量控制成分, 而目前只有关于车前子中车前子苷、桃叶珊瑚苷和芦丁等成分的定量测定

的报道<sup>[6-9]</sup>, 未见有车前子中质控成分京尼平苷酸和毛蕊花糖苷的测定报道, 因此, 为全面控制车前子质量, 本实验首次将其指纹图谱与《中国药典》2010 年版规定的 2 个指标成分结合起来进行研究。

### 1 材料与仪器

#### 1.1 材料

京尼平苷酸对照品 (批号 A0526, 成都曼思特生物科技有限公司); 毛蕊花糖苷对照品 (批号 A0280, 成都曼思特生物科技有限公司); 车前子 13 个不同来源饮片 S1~S13, 见表 1; 乙腈为色谱纯; 醋酸为分析纯; 超纯水。

#### 1.2 仪器

Agilent 1100 型高效液相色谱仪 (美国), G1313A

收稿日期: 2013-01-13

作者简介: 何新荣, 药师, 研究方向为中药学。Tel: (010)66937426 E-mail: hexinrong666@163.com

表 1 不同来源车前子饮片

Table 1 *Plantaginis Semen* from various sources

批次	批号	产地
S1	20110301	四川 (购自新绿色药业公司)
S2	11010603	亳州 (购自北京同仁堂药业公司)
S3	20100901	河北 (购自北京三和药业公司)
S4	散货	江西 (购自广州清平市场)
S5	110300811	江西 (购自广西市场)
S6	散货	江西 (购自江西药材市场)
S7	20100601	河北 (购自北京三和药业公司)
S8	11030102	亳州 (购自北京同仁堂药业公司)
S9	20100801	河北 (购自北京三和药业公司)
S10	10061601	江西 (购自北京绿野药业公司)
S11	11010802	黑龙江 (购自北京绿野药业公司)
S12	散货	四川 (购自四川市场)
S13	11010702	黑龙江 (购北京绿野药业公司)

自动进样器, 数据由 Agilent Chemstation on-line 系统处理, G1315B 紫外检测器 (DAD), 色谱柱为 Agilent SBAQ-C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 电子天平 (Sartorius CP225D); KQ2200DB 型数控超声波清洗器 (昆山超声仪器)。

## 2 方法与结果

### 2.1 优化后的色谱条件

Agilent Zorbax sbaq-C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 254 nm; 进样量 20 μL, 以乙腈 (A)-0.5% 醋酸水 (B) 为流动相, 梯度洗脱: 0~10 min, 90% B, 10~20 min, 80% B, 20~50 min, 20% B, 50~60 min, 90% B。

### 2.2 对照品溶液的制备

精密称取京尼平苷酸 4.4 mg, 毛蕊花糖苷对照品各 3.9 mg, 用 60% 甲醇溶解并定容至 25 mL 量瓶中, 混匀, 即得母液, 冰箱中保存备用。

### 2.3 供试品溶液的制备

分别取不同来源的车前子样品, 将其粉碎后过 2 号筛。精密称取 0.5 g, 加入 25 mL 60% 甲醇, 密塞, 称定质量, 超声 (250 W, 40 kHz) 60 min, 放至室温, 称定质量, 用甲醇补足质量, 过滤, 取滤液, 备用。

### 2.4 指纹图谱方法学的考察

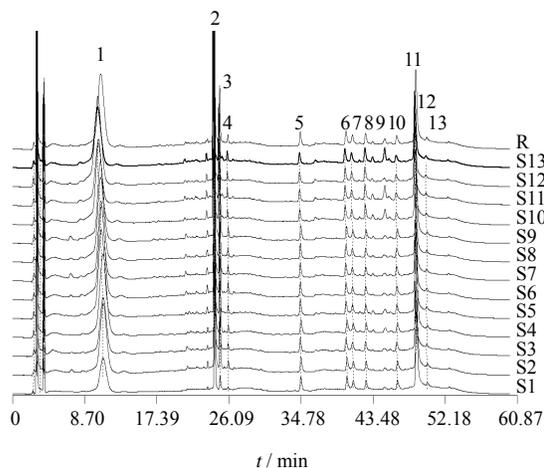
**2.4.1 精密度试验** 取样品 S1 供试品溶液, 连续进样 6 次, 结果显示各色谱峰的相对保留时间及峰面积的比值基本没有明显变化, 各色谱峰的相对保留时间和峰面积的 RSD 值均 ≤ 3.0%, 表明仪器精密度良好, 符合指纹图谱的要求。

**2.4.2 稳定性试验** 取样品 S1 供试品溶液, 分别在 0、3、6、12、24 h 进样, 结果显示各共有色谱峰的相对保留时间和峰面积的比值基本没有明显变化, 各色谱峰的相对保留时间 RSD < 1.02%, 相对峰面积的 RSD < 2.38%, 符合指纹图谱的要求, 且各时间点色谱图相似度均大于 0.98, 表明在该供试品在 24 h 内供试品溶液的成分基本稳定。

**2.4.3 重复性试验** 取样品 S1 的供试品溶液 6 份, 按“2.3”项下供试品溶液制备方法制备供试品溶液, 然后按“2.1”项下检测方法依次进样检测, 记录色谱峰, 各共有峰与内参比峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均小于 2.8%, 表明该方法重现性良好, 符合指纹图谱要求。

## 2.5 指纹图谱的建立与评价<sup>[10]</sup>

**2.5.1 共有峰的标定** 按上述色谱条件对 13 批样品进行测定, 根据 HPLC 指纹图谱检测结果, 按中国药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004A)”进行计算, 分别对各批次样品指纹图谱进行匹配, 得出相应的对照图谱, 标定了 13 个共有特征峰, 见图 1。色谱图中峰 1 为京尼平苷酸的色谱峰, 峰 2 为毛蕊花糖苷的色谱峰, 两峰均与相邻峰分离度较好, 峰高合适且为配方中 2 个重要质量控制指标成分, 故选定京尼平苷酸和毛蕊花糖苷为特征峰。



1-京尼平苷酸 2-毛蕊花糖苷  
1-geniposidic acid 2-verbascoside

图 1 13 批样品 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprint for 13 batches of samples

**2.5.2 相似度评价** 按中国药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004A)”比较样品的色谱图和计算相对保留时间, 对各批样品指纹图谱采用多点校正后进行自动匹配, 生成的对照图谱

R, 计算相似度, 结果表明各批次相似度较高, 见表2。

**2.5.3 车前子样品聚类分析** 将各色谱峰面积相对于称样量量化, 应用“SPSS 11.5”软件对其进行系

统聚类分析, 采用组间均联法 (between-group linkage), 以夹角余弦 (cosin) 作为样品相似度的测度。聚类分析将13批车前子样品分为2类, 聚类分析结果见图2。

表2 13批次样品相似度评价  
Table 2 Similarities for 13 batches of samples

批次	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	R
S1	1.000	0.826	0.803	0.941	0.940	0.803	0.771	0.914	0.774	0.790	0.935	0.916	0.923	0.912
S2	0.826	1.000	0.997	0.822	0.823	0.995	0.989	0.956	0.990	0.994	0.844	0.781	0.845	0.962
S3	0.803	0.997	1.000	0.789	0.789	0.989	0.991	0.938	0.992	0.991	0.822	0.748	0.824	0.946
S4	0.941	0.822	0.789	1.000	0.999	0.830	0.777	0.949	0.779	0.807	0.962	0.991	0.955	0.939
S5	0.940	0.823	0.789	0.999	1.000	0.832	0.782	0.950	0.783	0.810	0.969	0.993	0.964	0.941
S6	0.803	0.995	0.989	0.830	0.832	1.000	0.991	0.961	0.992	0.997	0.851	0.796	0.855	0.966
S7	0.771	0.989	0.991	0.777	0.782	0.991	1.000	0.935	1.000	0.995	0.831	0.748	0.837	0.946
S8	0.914	0.956	0.938	0.949	0.950	0.961	0.935	1.000	0.936	0.950	0.952	0.929	0.951	0.998
S9	0.774	0.990	0.992	0.779	0.783	0.992	1.000	0.936	1.000	0.996	0.831	0.748	0.837	0.946
S10	0.790	0.994	0.991	0.807	0.810	0.997	0.995	0.950	0.996	1.000	0.842	0.775	0.847	0.958
S11	0.935	0.844	0.822	0.962	0.969	0.851	0.831	0.952	0.831	0.842	1.000	0.969	0.999	0.955
S12	0.916	0.781	0.748	0.991	0.993	0.796	0.748	0.929	0.748	0.775	0.969	1.000	0.965	0.920
S13	0.923	0.845	0.824	0.955	0.964	0.855	0.837	0.951	0.837	0.847	0.999	0.965	1.000	0.955
R	0.912	0.962	0.946	0.939	0.941	0.966	0.946	0.998	0.946	0.958	0.955	0.920	0.955	1.000

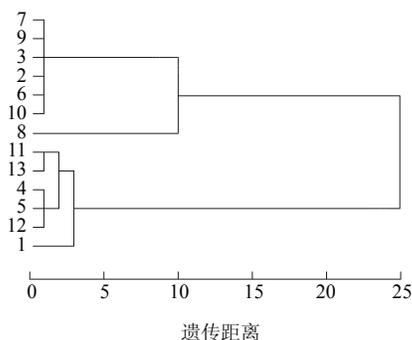


图2 车前子样品聚类分析结果  
Fig. 2 Hierarchical cluster analysis of *Plantaginis Semen* samples

**2.6 车前子中京尼平苷酸与毛蕊花糖苷的测定**

**2.6.1 线性关系考察** 分别精密吸取“2.2”项的对照品溶液, 用甲醇配制成混合对照品溶液5份 (京尼平苷酸为0.220、0.440、2.200、4.400、22.200 μg/mL; 毛蕊花糖苷为0.195、0.390、1.950、3.900、19.500 μg/mL)。按“2.1”项色谱条件, 以质量浓度 (X) 为横坐标, 峰面积 (Y) 为纵坐标进行线性回归, 京尼平苷酸回归方程为  $Y=1\ 516.2 X-46.925$  ( $r=0.999\ 3$ ), 结果表明京尼平苷酸在0.220~22.200 μg/mL 线性关系良好; 毛蕊花糖苷回归方程为  $Y=1\ 396.2 X+2.1$  ( $r=0.999\ 4$ ), 结果

表明毛蕊花糖苷在 0.195~19.500 μg/mL 线性关系良好。对照品溶液及供试品溶液色谱图见图3。

**2.6.2 精密度试验** 精密吸取供试品溶液 (S2), 同“2.1”项色谱条件, 重复进样6次, 记录峰面积, 结果京尼平苷酸与毛蕊花糖苷峰面积的 RSD 值分别为 0.18%、0.23%。

**2.6.3 重复性试验** 取药材粉末 (S2) 6份, 按“2.3”

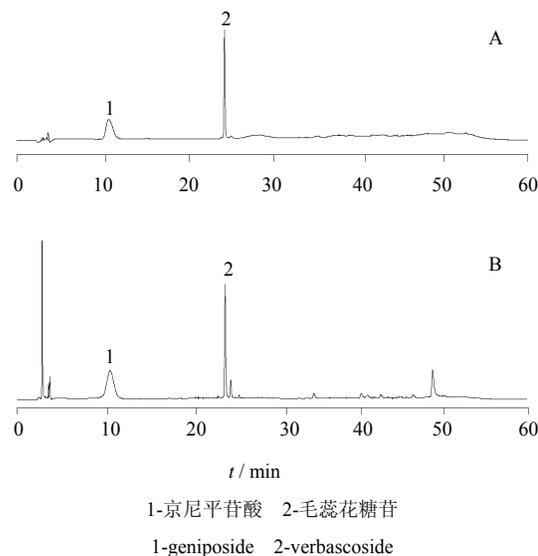


图3 对照品 (A) 与车前子样品 (B) 色谱图  
Fig. 3 HPLC chromatograms of reference substances (A) and *Plantaginis Semen* samples (B)

项下供试品溶液制备方法进行处理后,各取 20  $\mu$ L 进样,结果京尼平苷酸与毛蕊花糖苷质量分数的 RSD 值分别为 1.12%、0.99%。

**2.6.4 稳定性试验** 精密吸取供试品溶液 (S2),于制备后 0、1、2、4、12、24 h,同“2.1”项色谱条件进样,结果京尼平苷酸与毛蕊花糖苷量的 RSD 值分别为 2.00%、2.37%。

**2.6.5 加样回收率试验** 精密称取已测定的样品 (S2) 6 份,分别精密加入一定量的京尼平苷酸与毛蕊花糖苷对照品溶液,按“2.3”项下供试品溶液制备方法进行处理后,按“2.1”项色谱条件进样,结果京尼平苷酸与毛蕊花糖苷平均回收率分别为 97.2%和 95.5%,RSD 值分别为 1.75%和 1.08%。

**2.6.6 样品测定** 分别精密吸取各批药材的供试品溶液 20  $\mu$ L,按“2.1”项下色谱条件进行测定,计算 13 批车前子中京尼平苷酸与毛蕊花糖苷量,测定结果见表 3。

表 3 车前子中京尼平苷酸与毛蕊花糖苷的测定结果

Table 3 Contents of geniposidic acid and verbascoside in *Plantaginis Semen* samples

批次	京尼平苷酸 / %	毛蕊花糖苷 / %
S1	0.570 1	0.439 1
S2	0.882 9	0.676 0
S3	0.628 8	0.464 6
S4	0.960 1	0.641 7
S5	0.939 1	0.684 3
S6	0.997 3	0.815 6
S7	0.742 6	0.734 5
S8	0.766 3	0.575 2
S9	0.767 2	0.756 3
S10	0.957 2	0.812 1
S11	0.639 6	0.707 5
S12	1.044 7	0.798 0
S13	0.629 8	0.729 3
均值	0.794 3	0.664 2

### 3 讨论

本实验考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-醋酸水以及乙腈-醋酸水梯度洗脱系统,根据指标成分的性质,采取乙腈-醋酸水溶液系统时车前子能达到较好的分离,保留时间适中。还考察了 Agilent Zorbax C<sub>18</sub>, Agilent Zorbax sbaq-C<sub>18</sub> 和 Agilent TC-C<sub>18</sub> 3 种色谱柱。结果表明,Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> 色谱柱上车前子中各个成分能在较短洗脱时间内达到较好的分离。用二极管阵列检测器全波长扫描考察了不同吸收波长图谱,重点考察了 200、240、254、280、

326 nm 的图谱。结果表明,在 254 nm 下检测到的车前子指纹图谱信息量均较大,特征性强,且不同成分的响应值较为均匀,因此选择 254 nm 为检测波长。车前子提取实验中主要对时间 (30、60、90 min) 和甲醇的比例 (50%、60%、80%、100%) 都进行了考察,结果表明,60%甲醇超声 60 min 样品峰较多,京尼平苷酸和毛蕊花糖苷 2 个指标成分峰型好且峰高,100%甲醇提取样品出峰少。

中药指纹图谱能够全面反映中药的质量<sup>[11-12]</sup>。相似度评价和聚类分析的结果表明该 2 种不同测度间可互相认证。用该法分析未知样品时,只需测得该样品的指纹图谱,计算未知样品与共有模式间的相似度,即可对样品进行分类鉴定和评价。本实验建立的方法测定了车前子制剂中京尼平苷酸和毛蕊花糖苷的量,并结合该饮片指纹图谱进行研究,可从多方面多角度控制其质量,为其质量标准建立提供可靠数据。

依据《中国药典》2010 年版车前子中京尼平苷酸不少于 0.50%;毛蕊花糖苷不少于 0.40%。本实验结果表明,从各地区收集来的车前子样品质量均达到要求,而且发现与其他地区产比较,江西产样品 S6 和 S10 中京尼平苷酸和毛蕊花糖苷量均较高。

### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 倪福祿, 赵 艳, 霍 旺. 车前子人工掺伪品的鉴别 [J]. 长春中医药大学学报, 2008, 24(6): 668-668.
- [3] 曾金祥, 朱继孝, 朱玉野, 等. 车前子的高效液相指纹图谱研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(2): 329-331.
- [4] 郝子博, 王丽莉, 张铁军. 落花生茎叶 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2012, 43(10): 2050-2054.
- [5] 丁 婕, 黄 松, 张柏明, 等. 凉粉草的特征指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2012, 43(11): 2284-2288.
- [6] 高明哲. 中药车前子的质量研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医学院, 2000.
- [7] 阴 月. 车前子质量标准规范化研究黄酮类成分的提取分离、定性鉴别和含量测定 [D]. 沈阳: 辽宁中医学院, 2000.
- [8] 吴祥松, 刘贤旺, 黄慧莲, 等. 江西道地药材车前子中桃叶珊瑚苷含量的测定 [J]. 中药研究与信息, 2002, 4(11): 18-20.
- [9] 曾金祥, 罗光明, 朱玉野, 等. 车前子化学模式识别及芦丁含量测定研究 [J]. 中药材, 2010, 33(8): 1237-1239.
- [10] 屠鹏飞. 中药指纹图谱指定的方法学探讨 [A]. // 现代化中药产业关键技术系列研讨会—国际色谱指纹评价中药质量研讨会 [C]. 广州: 广州药学会, 2001.
- [11] 孙国祥, 胡玥珊, 智雪枝. 用复杂性科学原理揭示中药指纹图谱的本质特征 [J]. 中南药学, 2008, 6(5): 600-605.
- [12] 黄立兰, 程文胜, 陈耀娣, 等. 人参指纹图谱的研究进展 [J]. 中草药, 2013, 44(2): 241-246.