

穿山龙超高效液相色谱特征指纹图谱的研究

郑雅楠¹, 廖茂梁¹, 孙 卫^{1*}, 任为之²

1. 天津药物研究院有限公司, 天津 300193

2. 天津世纪天龙药业有限公司, 天津 301741

摘要: 目的 建立穿山龙药材的超高效液相色谱 (UPLC) 特征指纹图谱分析方法。方法 采用 Agilent Poroshell 120 Bonus-RP 色谱柱 (50 mm×3.0 mm, 2.7 μm); 流动相: 乙腈-水, 梯度洗脱; 体积流量: 0.8 mL/min; 检测波长: 203 nm; 柱温: 25 °C; 进样量: 10 μL。应用相似度分析软件建立穿山龙药材指纹图谱的共有模式, 并对色谱峰进行指认。结果 建立了穿山龙药材的 UPLC 特征指纹图谱共有模式, 标定了 14 个共有峰, 指认了其中 3 个共有峰, 10 批穿山龙药材的相似度为 0.9 以上。通过聚类分析, 将 13 批穿山龙药材聚为 4 类。结论 该方法快速, 可用于评价穿山龙药材质量。

关键词: 穿山龙; 超高效液相色谱; 特征指纹图谱; 相似度

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2015)01-0028-05

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2015.01.006

UPLC characteristic chromatographic profile of *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma*

ZHENG Ya-nan¹, LIAO Mao-liang¹, SUN Wei¹, REN Wei-zhi²

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research Co., Ltd., Tianjin 300193, China

2. Tianjin Tianlong Pharmacy, Tianjin 301741, China

Abstract: Objective To establish a UPLC method for determination the characteristic chromatographic profiles of *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma*. **Methods** The UPLC characteristic chromatographic profiles was carried on Agilent Poroshell 120 Bonus-RP column (50 mm × 3.0 mm, 2.7 μm) with acetonitrile – water as mobile phase in gradient elution. The detective wavelength was set at 203 nm. The temperature of column was set at 25 °C. The flow rate was 0.8 mL/min with injection volume of 10 μL. The UPLC characteristic chromatographic profiles of *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma* were established with similarity analyses and the peaks were identified. **Results** The common mode of the UPLC characteristic chromatographic profile was set up. There were 14 common peaks, and three of them were identified. The similarities of 10 samples to the common mode were above 0.9. The 13 batches of samples were classified into four clusters by cluster analysis. **Conclusion** The method is rapid, and can be used for the quality control for *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma*.

Key words: *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma*; UPLC; characteristic chromatographic profile; similarity

穿山龙为薯蓣科植物穿龙薯蓣 *Dioscorea nipponica* Makino 的干燥根茎, 主产辽宁、吉林、黑龙江等地。其味甘、苦, 归肝、肾、肺经, 具有祛风除湿、舒筋通络、活血止痛、止咳平喘之功效, 用于风湿痹病、关节肿痛、疼痛麻木、跌扑损伤、闪腰岔气、咳嗽气喘^[1]。穿山龙在我国有着悠久的药用历史, 其药用价值越来越受到重视。现代药理研究表明穿山龙有调节免疫、祛痰平喘、改善心血

管功能等多种作用, 其中薯蓣皂苷元是合成甾体激素药的主要原料之一^[2], 皂苷类化合物为心脑血管治疗药物地奥心血康的重要组成成分^[3]。目前穿山龙的质量控制通常以薯蓣皂苷、薯蓣皂苷元为定性、定量评价其质量^[4-5], 然而单一成分往往难以科学的评价、表征中药复杂体系, 中药指纹图谱研究对其全面控制具有重要作用^[6]。通过 HPLC 方法建立穿山龙药材指纹图谱已有文献报道^[7-8], 但皂苷类成分

收稿日期: 2014-08-21

基金项目: 天津市科技计划项目 (12ZCDZSY11600、14ZCZDSY00005); 天津市应用基础与前沿技术研究计划项目 (14JCQNJC13800)

作者简介: 郑雅楠, 副研究员, 研究方向为中药新药开发。Tel: (022) 23006323 E-mail: zhengyn@tjipr.com

*通信作者 孙 卫, 副研究员。Tel: (022) 23006323 E-mail: sunw@tjipr.com

为末端吸收，灵敏度低，分析时间长。超高效液相色谱（UPLC）具有高分离度、高灵敏度、高效的特点已成为中药指纹控制的重要手段^[9]。本实验采用 UPLC 法建立穿山龙药材的特征指纹图谱分析方法，其谱峰的保留时间全部在 10 min 内，为高效、科学、快速地评价穿山龙内在质量提供了依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司)，带有二元高压梯度泵、自动进样器、柱温箱、DAD 全波长检测器以及 Agilent 数据处理工作站；Model C5860A 超声仪（CBL Photoelectron Technology Co. Ltd.）；AB204-N(瑞士 Mettler Toledo 天平公司)

1.2 试药

13 个不同来源的穿山龙样品由天津世纪天龙药业有限公司提供，经天津药物研究院有限公司孙卫副研究员鉴定为穿龙薯蓣 *Dioscorea nipponica* Makino 的干燥根茎，见表 1。乙腈、甲醇均为色谱纯；水为屈臣氏蒸馏水。薯蓣皂苷（批号 111707-200501）、原薯蓣皂苷（批号 111937-201201）、伪原薯蓣皂苷（批号 111855-201302）对照品均购自中国食品药品检定研究院。

表 1 不同批次穿山龙样品

Table 1 Different batches of *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma*

编号	批号	产地
S1	12091201	吉林
S2	13091202	辽宁
S3	13091203	河北
S4	13091205	黑龙江
S5	13091206	吉林
S6	13091208	黑龙江
S7	13091210	河北
S8	1009072	吉林
S9	1010115	吉林
S10	1103301	吉林
S11	13112801	河北
S12	13112802	山西
S13	13112803	河北

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent Poroshell 120 Bonus-RP 色谱柱（50

mm×3.0mm, 2.7 μm)；流动相：乙腈(A) - 水(B)，梯度洗脱，0~8 min, 18%~80%A, 8~10 min, 80%~100%A；体积流量：0.8 mL/min；检测波长：203 nm；柱温：25 °C；进样量：10 μL。

2.2 对照品溶液的制备

取薯蓣皂苷、原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷对照品适量，精密称定，用甲醇配制成含薯蓣皂苷、原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷质量浓度分别为 286.4、555.0、517.0 μg/mL 的混合对照品溶液，备用。

2.3 供试品溶液的制备

称取 S1~S13 号穿山龙样品粉末约 1 g，精密称定，置 100 mL 具塞三角瓶中，加甲醇 25 mL，称定质量，超声提取 30 min(功率 100 W, 频率 40 Hz)，放至室温，加甲醇补足减失的质量，摇匀，经 0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 精密度试验取同一份批号 12091201 样品供试品溶液，连续进样 6 次，计算得其各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均小于 3%，符合指纹图谱技术要求^[10]。

2.4.2 重复性试验 取同一批批号 12091201 样品 6 份，制备供试品溶液，分别进样，计算得其各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均小于 3%，符合指纹图谱技术要求^[10]。

2.4.3 稳定性试验 取同一份批号 12091201 样品供试品溶液，分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 进样测定，计算得其各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均小于 3%，表明样品溶液在 24 h 内稳定，符合指纹图谱技术要求^[10]。

2.5 指纹图谱的建立与共有指纹峰的指认

2.5.1 指纹图谱的建立 取 13 批穿山龙样品，制备供试品溶液，分别进样，记录不同批次穿山龙 UPLC 指纹图谱。将药材指纹图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(国家药典委员会发布, 2004A 版)，根据色谱图中各色谱峰的相对保留时间进行谱峰匹配，并生成对照指纹图谱，结果见图 1、2。

2.5.2 共有指纹峰的标定与确认 13 批穿山龙药材生成的 UPLC 对照指纹图谱共有指纹峰 14 个，通过与对照品对照，分别指认 5 号峰为原薯蓣皂苷，6 号峰伪原薯蓣皂苷，9 号峰为薯蓣皂苷。以 9 号峰为参照峰(S)，计算各色谱峰保留时间和保留峰面积与同一图谱 S 峰的保留时间和保留峰面积比值，得到的相对保留时间和相对峰面积见表 2、3。

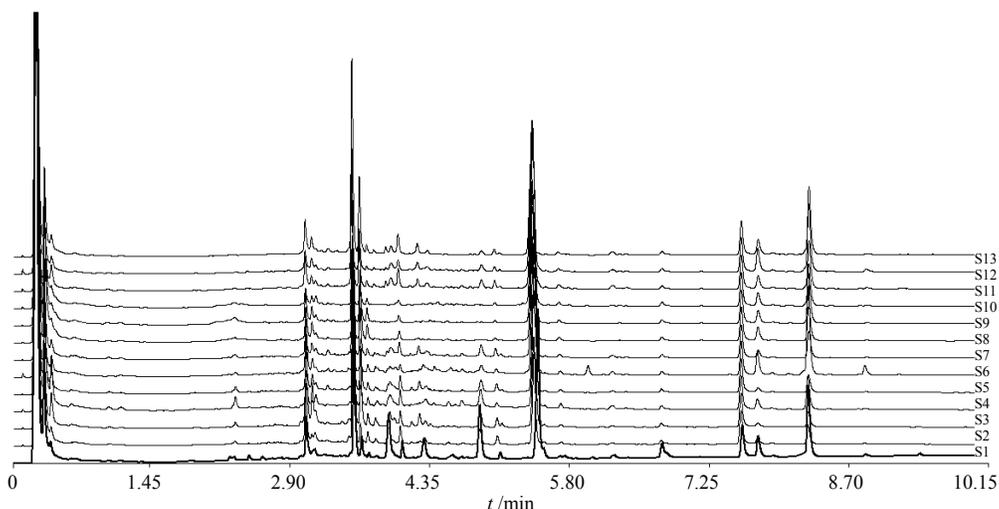
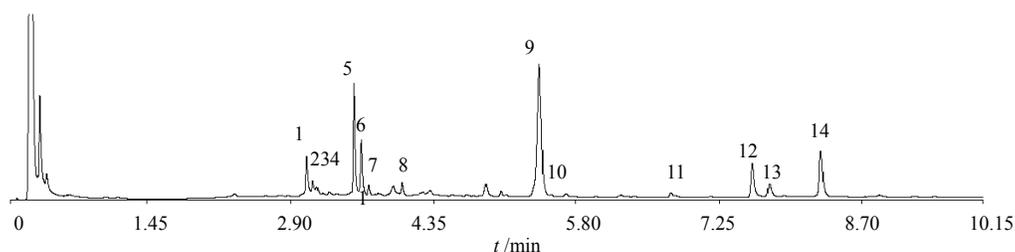


图1 穿山龙药材 UPLC 指纹图谱叠加图

Fig.1 UPLC overlapped fingerprint of *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma*



5-原薯蓣皂苷 6-伪原薯蓣皂苷 9-薯蓣皂苷
5-protodioscin 6-pseudoprotodioscin 9-dioscin

图2 穿山龙药材 UPLC 对照指纹图谱

Fig.2 UPLC reference fingerprint of *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma*

表2 13批穿山龙指纹图谱共有峰的相对保留时间

Table 2 Relative retention time of common peaks in 13 batches of *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma*

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	平均值	RSD/%
1	0.565	0.564	0.565	0.564	0.566	0.565	0.566	0.566	0.566	0.565	0.565	0.566	0.567	0.565	0.152
2	0.576	0.576	0.577	0.576	0.577	0.577	0.578	0.578	0.578	0.577	0.577	0.578	0.579	0.577	0.155
3	0.582	0.582	0.583	0.582	0.584	0.584	0.585	0.585	0.586	0.585	0.585	0.586	0.587	0.584	0.269
4	0.604	0.604	0.606	0.605	0.607	0.607	0.608	0.608	0.608	0.608	0.609	0.610	0.612	0.607	0.381
5	0.654	0.654	0.655	0.653	0.655	0.654	0.655	0.655	0.655	0.654	0.655	0.655	0.657	0.655	0.132
6	0.669	0.669	0.670	0.668	0.670	0.669	0.670	0.670	0.670	0.670	0.669	0.670	0.671	0.670	0.124
7	0.683	0.683	0.684	0.682	0.684	0.683	0.684	0.684	0.684	0.683	0.683	0.684	0.685	0.683	0.124
8	0.745	0.745	0.745	0.743	0.745	0.744	0.745	0.745	0.745	0.743	0.743	0.744	0.746	0.744	0.107
9(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
10	1.050	1.052	1.052	1.049	1.052	1.051	1.052	1.051	1.051	1.050	1.051	1.051	1.054	1.051	0.102
11	1.239	1.243	1.244	1.241	1.245	1.245	1.248	1.248	1.249	1.247	1.249	1.250	1.253	1.246	0.316
12	1.391	1.395	1.396	1.392	1.397	1.396	1.400	1.400	1.401	1.399	1.401	1.402	1.406	1.398	0.296
13	1.422	1.426	1.428	1.424	1.429	1.427	1.432	1.431	1.433	1.431	1.433	1.434	1.438	1.430	0.304
14	1.518	1.522	1.524	1.520	1.526	1.524	1.529	1.529	1.530	1.529	1.530	1.532	1.536	1.527	0.332

表3 13批穿山龙指纹图谱共有峰的相对峰面积值

Table 3 Relative peak area of common peaks in 13 batches of *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma*

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	平均值	RSD/%
1	0.380	0.428	0.529	0.118	0.184	0.210	0.112	0.098	0.096	0.058	0.104	0.078	0.277	0.206	74.049
2	0.040	0.045	0.233	0.014	0.059	0.056	0.038	0.044	0.039	0.024	0.034	0.045	0.125	0.061	94.228
3	0.032	0.075	0.083	0.034	0.027	0.020	0.026	0.014	0.018	0.025	0.018	0.015	0.024	0.031	69.830
4	0.012	0.021	0.013	0.007	0.026	0.018	0.029	0.007	0.008	0.005	0.010	0.008	0.032	0.015	59.381
5	0.514	1.080	0.884	0.393	0.642	0.231	0.461	0.267	0.268	0.118	0.359	0.213	1.273	0.516	69.456
6	0.074	0.134	0.391	0.053	0.243	0.045	0.190	0.188	0.184	0.069	0.116	0.118	0.515	0.179	77.373
7	0.039	0.075	0.053	0.019	0.034	0.022	0.025	0.047	0.045	0.015	0.016	0.011	0.056	0.035	54.700
8	0.062	0.136	0.069	0.044	0.076	0.030	0.059	0.032	0.032	0.022	0.059	0.037	0.149	0.062	63.454
9(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
10	0.029	0.033	0.027	0.022	0.030	0.026	0.021	0.019	0.016	0.016	0.022	0.022	0.042	0.025	29.219
11	0.689	0.040	0.032	0.016	0.026	0.019	0.028	0.028	0.026	0.022	0.019	0.021	0.034	0.077	239.023
12	1.400	0.399	0.308	0.161	0.273	0.193	0.228	0.177	0.187	0.154	0.155	0.171	0.375	0.322	104.003
13	0.182	0.082	0.041	0.059	0.050	0.148	0.066	0.083	0.084	0.070	0.068	0.128	0.192	0.096	51.591
14	0.559	0.224	0.136	0.163	0.139	0.620	0.187	0.183	0.223	0.191	0.228	0.350	0.769	0.306	67.915

2.6 相似度分析

应用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(国家药典委员会发布, 2004A版)对穿山龙药材指纹图谱进行相似度计算。结果表明, S4、S5、S7~S9、S11、S12 相似度良好, 大于 0.95; S3、S6、S10 相似度大于 0.9, 均符合要求; S1、S2、S13 相似度均在 0.9 以下, 分别为 0.836、0.893、0.470, 这 3 个药材样品相似度低; 说明不同产地药材质量有明显差异, 见表 4。

表4 13批穿山龙药材的相似度

Table 4 Similarity of 13 samples of *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma*

编号	批号	相似度
S1	12091201	0.836
S2	13091202	0.893
S3	13091203	0.909
S4	13091205	0.981
S5	13091206	0.972
S6	13091208	0.941
S7	13091210	0.991
S8	1009072	0.981
S9	1010115	0.984
S10	1103301	0.948
S11	13112801	0.990
S12	13112802	0.976
S13	13112803	0.470

2.7 不同批次穿山龙系统聚类分析

从 13 批不同批次穿山龙指纹图谱中获得 14 个共有特征峰, 以这 14 个共有特征峰的相对峰面积为原始数据, 得到 13×14 阶数据矩阵, 运用 SPSS 11.5 统计分析软件, 采用组间联结法, 利用欧式距离平方 (Squared Euclidean Distance) 作为度量, 对其进行系统聚类分析, 结果见图 3。可见以相似性系数 5.0 为阈值, 可将 13 批供试品分为 4 类。第 1 类为 S4~S12; 第 2 类为 S2、S3; 第 3 类为 S1; 第 4 类为 S13。该结果与相似度分析结果一致, 除样品 S13 外, 其他样品间具有较好的相似性。

本实验采用相似度分析和聚类分析对不同批次穿山龙的指纹图谱进行评价, 两种评价分析方法获

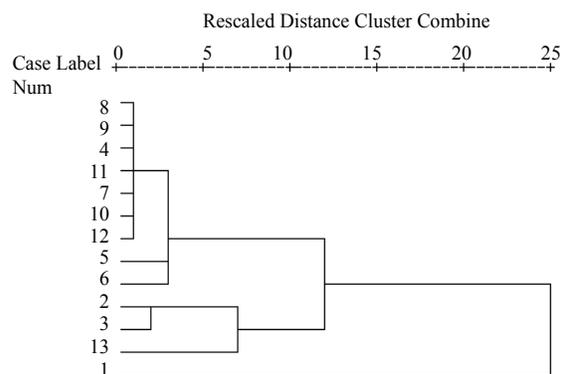


图3 聚类分析结果

Fig. 3 Dendrogram of cluster analysis

得的结果基本吻合,且不同产地和批次的穿山龙相似程度存在一定差异。本实验重点考察了穿山龙药材适生区样品,初步试验结果表明吉林产地药材质量较佳。

3 讨论

3.1 流动相的选择

实验考察了不同比例的甲醇-磷酸水溶液、乙腈-磷酸水溶液、甲醇-水溶液、乙腈-水溶液 4 个流动相系统,结果显示以乙腈-水溶液作为流动相系统时,各峰分离度及峰型良好。因此,最终采用其作为流动相系统。

3.2 测定波长的选择

由于皂苷类成分的最大吸收波长为 203 nm 末端吸收,因此参考《中国药典》方法中以 203 nm 为检测波长。实验使用 Agilent DAD 检测器进行紫外全波长扫描(200~400 nm),分别对 203、210、230、265、270、280、300nm 等多个波长进行考察,结果显示在 203 nm 波长下薯蓣皂苷的响应值最高,且色谱峰个数较多,综合比较基线噪音、共有峰响应值、色谱峰个数后,选择 203 nm 作为本实验的检测波长。

3.3 柱温的选择

实验将柱温分别控制在 25、30、35 °C 进行实验,发现在 UPLC 条件下随温度的升高,各色谱峰的分离度变差,分析时间缩短。在 25 °C 条件下进行 UPLC 指纹图谱考察各峰分离度和峰型最好。

3.4 UPLC 法进行穿山龙药材指纹图谱方法建立的合理性

UPLC 采用 1.8~2.7 μm 的超细色谱柱填料,从而大大提高柱效,本实验结果显示,UPLC 法可标示出 14 个共有峰,且 UPLC 色谱方法的分离效果

更好、灵敏度更高,使穿山龙药材中的物质在 10 min 内分离成为可能,为快速评价穿山龙药材的质量,建立穿山龙药材的 UPLC 特征指纹图谱分析方法,完善穿山龙的质量控制方法提供依据。

本实验结果表明应用 UPLC 建立穿山龙指纹图谱作为质量研究和控制方法,具有高效、快速、灵敏的特点,提高分析效率,同时减少流动相消耗,色谱峰易于匹配,是今后中药及中药复方质量研究和控制的重要手段。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 2010: 250-251.
- [2] 王宝庆,李学彬,田志发,等.穿山龙现代研究概况 [J]. 中国林副特产, 2010, 108(5): 96-98.
- [3] 刘克建,张天,邓冬莉.穿山龙化学成分与分离纯化技术研究进展 [J]. 广州化工, 2013, 41(10): 21-22.
- [4] 都晓伟,牟晋超,孟凡佳,等.内生真菌固体发酵提高穿山龙中薯蓣皂苷元的研究 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(2): 179-181.
- [5] 任为之,王现昌,于丽云,等.HPLC-ELSD法测定龙加通络胶囊中的薯蓣皂苷 [J]. 药物评价研究, 2014, 37(6): 529-530.
- [6] 邵建强.中药指纹图谱的研究进展 [J].中草药, 2009, 40(6): 994-998.
- [7] 潘海峰,李艳荣.承德产穿山龙的HPLC指纹图谱研究 [J]. 华西药学杂志, 2011, 26(3): 277-279.
- [8] 赵璐,王铁杰,程磊,等.穿山龙指纹图谱及其抑制人肝癌 HePG2 细胞增殖活性相关性研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2013, 30(5): 366-373.
- [9] 石俊敏,管佳,张庆文,等.超高效液相色谱在药物分析中的应用 [J]. 药物分析杂志, 2008, 10(9): 1583-1588.
- [10] 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行) [S]. 2000.