

川续断 HPLC 指纹图谱研究

刘二伟*, 吴 帅, 王家龙

天津中医药大学中医药研究院, 天津市中药化学与分析重点实验室, 天津 300193

摘 要 目的: 建立川续断的 HPLC 指纹图谱分析方法。方法: 采用高效液相色谱技术, Hypersil-C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 212 nm; 进样量 30 μL; 柱温 30 °C。结果: 建立了以 15 个共有峰为特征指纹信息的 HPLC 指纹图谱, 发现各产地和来源的川续断的指纹图谱有一定的差异。结论: 该指纹图谱方法准确可靠, 重现性好, 可作为川续断内在质量评价的依据。

关键词 川续断; HPLC; 指纹图谱

中图分类号: R282.710.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2010) 06-0432-04

Fingerprints of *Dipsacus asperoides* by HPLC

LIU Er-wei, WU Shuai, WANG Jia-long

Key Laboratory of Chemistry and Analysis of Chinese Materia Medica, Institute of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract **Objective:** To establish the HPLC fingerprints of *Dipsacus asperoides* processed with methanol. **Methods:** HPLC analysis was performed on a Hypersil-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with mobile phase: acetonitrile-water under isocratic and gradient elutions and detection wavelength was 212 nm; The flow rate was 1.0 mL/min and column temperature was 30 °C. **Results:** HPLC fingerprint by taking 15 common peaks as characteristic information was established. It was found that the preparative HPLC of *D. asperoides* from different habitats and sources has some differences. **Conclusion:** The method is reliable and accurate, and can be used for the quality control of *D. asperoides*.

Key words *Dipsacus asperoides* C. Y. Cheng et T. M. Ai; HPLC; fingerprint

川续断 *Dipsacus asperoides* C. Y. Cheng et T. M. Ai 为川续断科川续断属植物, 为传统中药, 其根具有补肝肾、强筋骨、续折伤、退崩溃等功效^[1]。从上个世纪 80 年代开始, 中国、日本和韩国等国家的研究人员对川续断植物进行了化学成分和药理作用的研究, 分离得到了三萜皂苷^[2]、环烯醚萜和生物碱类等化合物。川续断在临床上已经广泛用于先兆性流产和早产、习惯性流产、腰椎骨质增生、崩漏等疾病^[3], 显示了其在骨质疏松、生殖系统疾病等方面的开发利用前景。川续断在我国主要分布在湖北、湖南、江西、广西、云南、贵州、四川、西藏等地, 市场流通产地众多, 但是质量控制方法依然较为单一, 《中国药典》单纯以川续断皂苷Ⅳ的量作为药材质量控制标准显然并不全面。中药指纹图谱能够比较全面的反映中药所含化学成分

的种类与数量, 进而用于药材的鉴别和质量控制^[4-7]。为此笔者建立川续断高效液相指纹图谱, 并对其进行分析 and 比较, 作为评价川续断内在质量的依据。

1 仪器与试剂

Waters 2695 高效液相色谱仪, Empower personal 色谱工作站; 紫外检测器 2487 (VWD); KB-300B 超声波清洗器 (昆山市仪器有限公司); Hypersil-C₁₈ 色谱柱; 中药色谱图分析和数据管理系统软件 (中国药品生物制品检定所); SZ-93 自动双重纯水蒸馏器 (上海亚荣生化仪器厂); 乙腈为色谱纯 (美国迪马公司); 水为二次蒸馏水; 其他试剂均为分析纯; 10 批川续断药材分别收集或采集于河南、四川、贵州、内蒙古和云南等省, 经本院生药学李天祥老师鉴定为川续断科植物川续断 *Dipsacus asperoides* C.Y.Cheng et Z.T.Yin 的根。

收稿日期: 2010-05-08

基金项目: 科技部国际合作项目(2008DFB30070); 天津市重点项目(06TJJC600)

* 通讯作者 刘二伟, (1976—), 男, 硕士, 联系电话: 022-2314-5617 Email: liuweier628@souhu.com

2 方法

2.1 色谱条件

Hypersil-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱条件见表 1; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 212 nm; 进样量 30 μL; 柱温 30 ℃。

表 1 流动相梯度洗脱

Table 1 Gradient elution of mobile phase

时间/min	水/%	乙腈/%
0	90	10
6	87	13
12	76	24
24	74	26
45	54	46
48	10	90
58	10	90

2.2 川续断的制备

取川续断药材 200 g, 在 60 ℃烘箱里烘干, 2 h 后经粉碎机粉碎, 过 80 目筛。

2.3 供试品溶液的制备

取不同产地和来源的川续断药材粉末 0.5 g, 精密称定, 置 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 100 % 甲醇 50 mL, 密塞, 称质量, 超声 30 min, 放冷至室温, 称定质量, 用 100%甲醇补足减失质量, 摇匀, 用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 作为供试样品溶

液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度实验

以河南川续断供试品连续进样 5 次, 测得各共有峰面积的 RSD<4%, 说明仪器的精密度良好。

2.4.2 重复性实验

取同一批河南信阳川续断 5 份, 按照 2.2 项下方法进行制备, 分别进样测得各共有峰面积 RSD<3%, 表明方法重复性良好。

2.4.3 稳定性实验

取河南川续断供试品溶液, 分别在 0、2、6、8、12 h 进样, 测得各共有峰相对峰面积 RSD<3%, 说明样品在 12 h 内稳定。

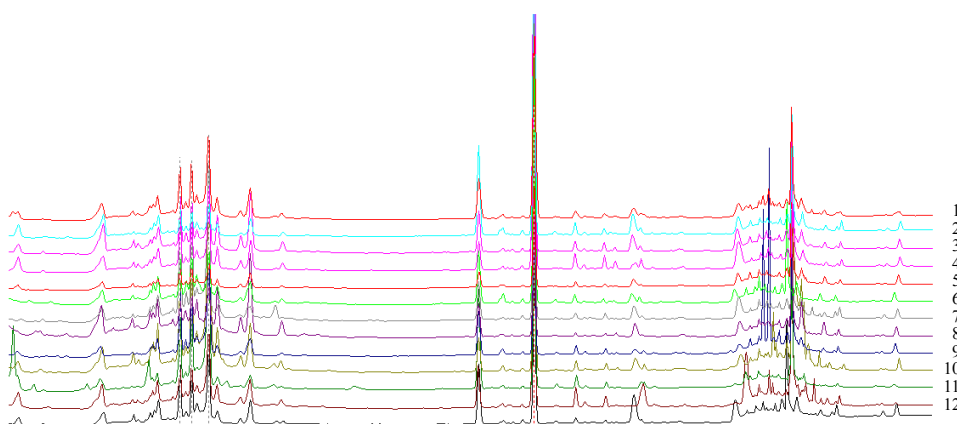
3 结果

3.1 指纹图谱的测定

精密吸取各供试品溶液, 依次进样, 在上述色谱条件下分别测定, 记录色谱图, 见图 1。结果 12 批川续断有 15 个共有峰。通过对指纹图谱色谱峰的比较, 考察 60 min 内的色谱图, 其中 9 号峰面积占 20%以上, 因此选其作为参照峰, 保留时间和峰面积为 1, 计算其它各峰的相对保留时间和相对峰面积值, 结果见表 2 和表 3。

3.2 川续断 HPLC 指纹图谱共有模式的建立

选取所有川续断样本, 以中位数法筛选指纹特征峰及色谱峰面积值, 共确认特征峰 15 个, 川续断 HPLC 指纹图谱共有模式中各特征峰近似保留时间



1-川鄂交界, 2-贵州, 3-四川 涪陵, 4-四川 成都, 5-河南 信阳, 6-云南, 7-河南 开封, 8-湖北, 9-重庆, 10-湖南, 11-四川 绵阳, 12-四川 绵竹

1-Junction of Sichuan and Hubei; 2-Guizhou; 3-Fuling; Sichuan; 4-Chengdu, Sichuan; 5-Xinyang, Henan; 6-Yunnan; 7-Kaifeng; Henan; 8-Hubei; 9-Chongqing; 10-Hunan; 11-Mianyang, Sichuan; 12-Mianzhu, Sichuan

图 1 12 批川续断的 HPLC 指纹图谱纵向叠加图

Fig. 1 HPLC fingerprint vertical overlay chart of twelve batches of *D. asperoides*

表 2 各样品峰的相对保留时间
Table 2 Retention time of every sample peak

峰号	相对保留时间												RSD/%
	川鄂交界	贵州	四川涪陵	四川成都	河南信阳	云南	河南开封	湖北	重庆	湖南	四川绵阳	四川绵竹	
1	0.290 4	0.287 0	0.289 0	0.288 0	0.2894	0.2912	0.2913	0.2916	0.2924	0.2930	0.2933	0.2938	0.74
2	0.418 4	0.417 9	0.417 9	0.418 2	0.4186	0.4189	0.4189	0.4193	0.4192	0.4198	0.4192	0.4195	0.15
3	0.427 6	0.427 1	0.427 2	0.427 7	0.4275	0.4287	0.4297	0.4290	0.4289	0.4295	0.4290	0.4293	0.22
4	0.437 4	0.437 0	0.437 0	0.437 5	0.437 7	0.438 0	0.438 1	0.438 4	0.438 4	0.439 0	0.438 4	0.438 7	0.15
5	0.445 5	0.445 2	0.445 1	0.445 6	0.445 9	0.446 3	0.446 3	0.446 9	0.446 9	0.447 6	0.447 0	0.447 4	0.19
6	0.464 6	0.463 6	0.464 3	0.464 8	0.465 4	0.465 7	0.465 8	0.466 2	0.466 4	0.467 0	0.466 5	0.467 0	0.24
7	0.478 3	0.477 9	0.478 0	0.478 4	0.478 9	0.482 8	0.479 4	0.479 7	0.480 2	0.480 9	0.480 2	0.480 8	0.30
8	0.907 9	0.908 5	0.908 1	0.908 6	0.908 9	0.908 8	0.908 7	0.909 1	0.908 6	0.908 9	0.908 8	0.909 2	0.04
9	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0
10	1.067 2	1.068 2	1.067 7	1.068 4	1.068 2	1.067 9	1.067 7	1.068 5	1.066 4	1.067 5	1.067 3	1.068 1	0.06
11	1.343 0	1.342 6	1.333 8	1.335 5	1.337 4	1.335 5	1.335 9	1.337 4	1.333 5	1.335 5	1.335 8	1.337 0	0.23
12	1.363 7	1.349 6	1.349 8	1.352 8	1.354 2	1.354 7	1.355 2	1.357 3	1.355 2	1.356 5	1.355 9	1.357 1	0.27
13	1.472 7	1.471 7	1.468 4	1.472 6	1.475 7	1.476 1	1.477 4	1.480 3	1.477 8	1.479 6	1.479 5	1.479 8	0.26
14	1.487 0	1.486 0	1.486 0	1.490 7	1.493 4	1.494 4	1.495 7	1.498 8	1.496 5	1.498 4	1.498 5	1.498 7	0.34
15	1.493 0	1.492 0	1.492 3	1.497 1	1.499 9	1.501 1	1.502 6	1.505 6	1.503 5	1.505 5	1.505 6	1.505 7	0.36

表 3 各样品峰的相对峰面积
Table 3 AUC of every sample peak

峰号	相对峰面积												RSD/%
	川鄂交界	贵州	四川涪陵	四川成都	河南信阳	云南	河南开封	湖北	重庆	湖南	四川绵阳	四川绵竹	
1	0.119 2	0.184 8	0.187 0	0.156 8	0.502 7	0.127 9	0.122 4	0.160 2	0.069 0	0.214 9	0.161 6	0.170 3	59.66
2	0.063 7	0.399 0	0.276 0	0.365 0	0.125 1	0.487 6	0.125 4	0.134 6	0.083 6	0.124 1	0.053 0	0.302 9	69.67
3	0.007 5	0.028 5	0.021 7	0.048 0	0.062 2	0.052 3	0.032 8	0.021 3	0.007 1	0.023 0	0.009 6	0.024 7	63.22
4	0.059 4	0.342 1	0.244 7	0.302 1	0.143 3	0.422 2	0.121 3	0.126 0	0.072 8	0.119 1	0.049 9	0.240 4	64.81
5	0.012 9	0.014 6	0.030 0	0.026 5	0.091 2	0.022 2	0.027 4	0.022 2	0.012 3	0.023 2	0.016 9	0.042 7	75.38
6	0.205 9	1.146 3	0.925 1	0.761 9	0.372 7	0.917 8	0.201 6	0.231 1	0.151 1	0.237 2	0.088 3	0.478 6	76.45
7	0.043 3	0.062 8	0.118 9	0.057 2	0.304 1	0.076 6	0.042 4	0.060 4	0.039 6	0.102 0	0.026 8	0.060 2	89.82
8	0.124 2	0.782 4	0.139 4	0.362 8	0.279 6	0.213 3	0.246 6	0.178 4	0.066 7	0.164 8	0.325 4	0.423 1	69.22
9	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.00
10	0.048 9	0.082 1	0.034 4	0.059 6	0.021 8	0.029 2	0.030 9	0.046 8	0.034 8	0.033 4	0.035 5	0.030 1	40.85
11	0.201 9	0.064 2	0.065 6	0.067 8	0.148 6	0.157 3	0.057 5	0.146 3	0.102 5	0.121 0	0.072 9	0.218 9	47.23
12	0.012 0	0.016 4	0.012 0	0.032 6	0.020 4	0.009 3	0.019 2	0.040 3	0.004 0	0.015 0	0.009 9	0.012 3	60.48
13	0.011 0	0.008 6	0.017 5	0.024 5	0.095 8	0.019 7	0.024 4	0.062 6	0.005 8	0.016 3	0.012 2	0.029 7	95.81
14	0.004 4	0.003 0	0.003 5	0.009 1	0.008 6	0.016 8	0.004 7	0.009 6	0.002 7	0.005 1	0.006 7	0.016 1	63.55
15	0.015 4	0.014 2	0.012 8	0.029 9	0.028 1	0.034 5	0.015 3	0.030 8	0.010 1	0.015 5	0.024 0	0.046 4	47.77
总峰数	27	22	31	28	27	31	31	27	33	35	29	33	—
共有峰面积/%	83.64	92.83	82.99	68.38	65.79	85.02	79.46	74.35	84.46	74.78	82.87	74.43	—

分别为：1（0.287~0.294），2（0.418~0.420），3（0.427~0.430），4（0.437~0.439），5（0.445~0.448），6（0.464~0.467），7（0.478~0.483），8（0.908~0.909），9（1.000），10（1.066~1.069），11（1.333~1.343），12（1.350~1.364），13（1.468~1.480），14（1.486~1.499），15（1.492~1.506）。

3.3 指纹图谱相似度分析

将 12 批川续断实验数据导入中药色谱图分析和数据管理系统软件,经选峰,采用相关系数法、夹角余弦法对 12 批次川续断的色谱图相对于川续断的 HPLC 指纹图谱共有模式进行相似度分析,结果见表 4。

表 4 川续断样品的相似度
Table 4 Similarity of *D. asperoides* samples

样品产地	相似度	
	相关系数	夹角余弦
川鄂交界	0.927	0.918
贵州	0.908	0.944
四川涪陵	0.910	0.935
四川成都	0.808	0.880
河南信阳	0.896	0.937
云南	0.920	0.949
河南开封	0.894	0.933
湖北	0.902	0.940
重庆	0.893	0.897
湖南	0.958	0.973
四川绵阳	0.897	0.923
四川绵竹	0.869	0.915

从表 4 可以看出,利用相关系数法与夹角余弦法将 12 个产地的川续断与河南信阳产的川续断进行相似度计算,其相似度在 0.90 左右,说明不同产地的川续断的指纹图谱在成分的比例上还是有一定的差异。

4 讨论

4.1 流动相的确定

杨明利等^[8]利用乙腈-水梯度洗脱对川续断进行样品分析,然而本研究利用其色谱条件不能重现结果,因此本实验在其基础上对其色谱条件进行优化。先用 90%水和 10%乙腈作为起始浓度,在 1 h 内换成 100%的乙腈。对河南信阳川续断供试样品进行梯度洗脱,经分析,显示色谱峰主要集中 15~

35 min 内,但分离效果不太理想。选用等度与梯度交替,可以实现色谱峰的分离,并且基线漂移小,绝大多数色谱峰分布在 3~55 min,分离较理想。

4.2 波长的选择^[8-9]

川续断提取液在 212 nm 和 254 nm 处有最大吸收峰。环烯醚萜类化合物的吸收波长为 254 nm,但在该波长 HPLC 指纹图谱所获得的信息较少;实测同时还对 212 nm 波长进行检测,且该波长下可以获得大量的色谱信息,故本研究选用波长 212 nm。

4.3 指纹图谱相似度评价

通过对 12 批样品的指纹图谱分析表明,产地不同的川续断 HPLC 指纹图谱有一定的差异,但均具有相同的色谱特征峰。经相似度计算表明,12 个产地川续断相似性一般,相关系数和夹角余弦都在 0.90 左右,说明各产地川续断药材有一定的差异。本实验建立的 HPLC 指纹图谱分析方法,能使川续断中的主要成分在色谱图中很好的体现,所建立的指纹图谱具有较好的稳定性和可控性,可用于川续断的质量监控。

参考文献

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005..
- [2] 马新飞, 陆兔林, 毛春芹, 等. HPLC 法测定不同续断炮制品中川续断皂苷 VI[J]. 中草药, 2007, 38 (5), 707-708.
- [3] 王 岩, 周丽玲, 李 锐, 等. 川续断的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2002, 13 (4), 233-234.
- [4] 罗 文, 刘 斌, 王 伟, 等. 山楂药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 现代药物与临床, 2009, 24 (1), 39-42.
- [5] Shen Z, Zhang W T, Hua Y F *et al.* Fingerprinting analysis of Four Variants of *Chrysanthemi Morifoli Flos* by RP-HPLC [J] *Chin Herb Med*, 2010, 2(2): 153-156.
- [6] 马 璞, 刘 芳, 柴士伟. 化瘀通脉汤的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药, 2010, 41(3): 398-400.
- [7] 逢楠楠, 毕开顺, 闫宝庆, 等. 芫花高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中草药, 2010, 41(5):818-821.
- [8] 杨明利, 王秀军, 陈秋实. 续断的指纹图谱研究[J]. 武汉生物工程院学报, 2009, 5(3): 181-184.
- [9] 胥秀英, 郑一敏, 傅善权, 等. 道地药材川续断指纹图谱模糊模式识别研究 [J] 药物研究, 2008, 17(5): 8-9.