

马鞭草 HPLC-PDA 指纹图谱研究

段坤峰,袁志芳,郑旭光,崔 洋,张兰桐*

(河北医科大学药学院 药物分析教研室,河北 石家庄 050017)

摘 要:目的 研究并建立不同产地马鞭草药材的指纹图谱,为科学评价与有效控制马鞭草药材质量提供新的方法。方法 色谱柱为 Diamonsil™ C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.05% 磷酸水进行梯度洗脱,柱温为 30 ℃;检测波长为 265 nm,体积流量 1.0 mL/min。结果 建立了不同产地马鞭草药材 HPLC-PDA 指纹图谱共有模式,标定 20 个共有峰。并对 12 批不同产地马鞭草药材进行了相似度比较,8 批马鞭草药材的相似度均在 0.9 以上,4 批马鞭草药材相似度在 0.8~0.9。结论 本方法操作简便、快速、准确,可作为马鞭草药材的鉴别和质量控制方法。

关键词:马鞭草;高效液相色谱法;指纹图谱

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)12-1984-05

马鞭草 *Verbena officinalis* L. 系马鞭草科 (Verbenaceae) 植物,为《中国药典》(2005 年版)收载的中药材,以马鞭草的干燥地上部分入药,具有抗早孕、活血散瘀、截疟、解毒、利水消肿等功效;主治流感、经闭痛经、疟疾、喉痹、痈肿、水肿、热淋、牙周炎、牙龈炎、白喉等症^[1]。化学成分包括环烯醚萜糖苷类、寡糖、苯丙素糖苷类、三萜类、黄酮类、甾体类和挥发油类^[2],主要含有马鞭草苷、戟叶马鞭草苷、毛蕊花苷、3,4-二氢马鞭草苷、桃叶珊瑚苷、龙胆苦苷等。马鞭草广泛分布于我国中南、西南及湖南、湖北、广西、山西、甘肃、新疆、江苏和浙江等地,河北、河南、江西也是主要的产区,广西、湖北为最佳。为保证临床用药的稳定性和有效性,建立不同产地马鞭草的指纹图谱,以此来反映其药材的整体性和特征性。本实验采用 HPLC-PDA 法,首次建立了不同产地马鞭草药材的指纹图谱,并进行了相似度比较,为该药材全面质量控制提供了参考依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器与试剂:美国 Agilent-1200 高效液相色谱仪(在线脱气机,四元泵,自动进样器,PDA 检测器);Agilent chem office 色谱工作站;SCQ2200 超声波清洗器(上海声谱超声波设备厂);SZ293 自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。甲醇、乙腈为色谱纯(美国迪马公司);水为二次重蒸水;其他试剂均为分析纯。

1.2 对照品与样品:马鞭草对照药材(批号 121002-200607)由中国药品生物制品检定所提供;马鞭草苷对照品(自制,质量分数 98% 以上),戟叶

马鞭草苷对照品(自制,质量分数 98% 以上)。本试验收集了 12 种不同产地的马鞭草药材,其来源见表 1(经河北医科大学药学院生药学教研室聂凤褪教授鉴定)。将药材用粉碎机粉碎,过 60 目筛,置广口瓶中密塞,备用。

表 1 马鞭草药材样品来源

Table 1 Sources of *V. officinalis* samples

样品号	样品来源	样品号	样品来源
1	中国药品生物制品检定所	7	河南洛阳
2	河北安国	8	河南禹州
3	河北承德	9	山东济南
4	河北承德	10	山西太原
5	湖北房山	11	广西柳州
6	河南洛阳	12	江西上饶

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备:取马鞭草苷、戟叶马鞭草苷对照品适量,精密称定,加甲醇溶解并稀释制成 1 mL 中分别各 0.22 和 0.19 mg 的混合溶液,即得。

2.2 供试品溶液的制备:取马鞭草药材,粉碎,过 60 目筛,取约 1.0 g,精密称定,加入 80% 甲醇 20 mL,称质量,超声处理 45 min,放冷至室温,再称定质量,用 80% 甲醇补足减失的质量,摇匀,用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过,即得。

2.3 色谱条件及系统适用性试验

2.3.1 色谱条件:色谱柱为 Diamonsil™ C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) (迪马公司);乙腈-0.05% 磷酸水溶液为流动相,梯度洗脱,0~30 min:乙腈 8%;30~60 min:乙腈 16%;60~90

收稿日期:2009-02-08

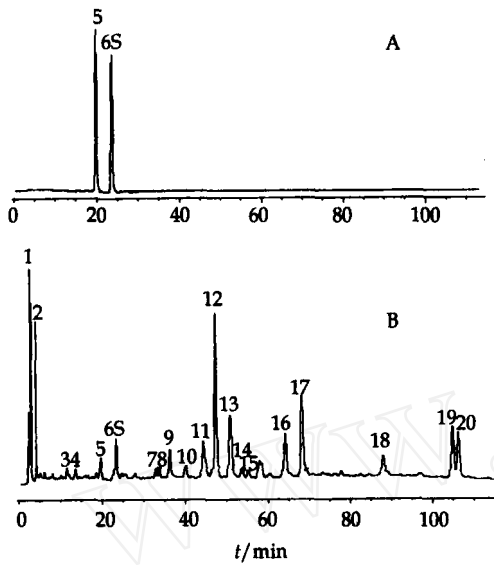
作者简介:段坤峰(1983—),男,河北徐水人,河北医科大学药学院 2007 级硕士研究生,从事中药色谱指纹图谱与药物代谢研究。

* 通讯作者 张兰桐 Tel: (0311) 86266419 Fax: (0311) 86266419 E-mail: zhanglantong@263.net

min;乙腈 21%;90~115 min:乙腈 27%;115~120 min:乙腈 36%;120 min 以后 乙腈 100%。检验波长 265 nm,体积流量 1.0 mL/min,柱温 30 ℃,进样量 20 μL,所有组分均在 120 min 内被检测完。

2.3.2 系统适用性试验:取上述供试液 20 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图,按马鞭草苷峰计算理论板数约为 6 000,与其他色谱峰分离度均大于 1.5。经对所用品进行考察,确定峰 1~20 为共有峰(见图 1)。

2.4 方法学考察



5-戟叶马鞭草苷 6S-马鞭草苷
5-hastatoside 6S-verbenalin

图 1 对照品(A)和 3 号样品(B)的色谱图
Fig.1 HPLC Chromatograms of reference substance (A) and sample 3 (B)

2.4.1 对照试验:分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 20 μL,注入液相色谱仪,记录 120 min 内的色谱峰,色谱图见图 1。

2.4.2 精密度试验:取 3 号供试品溶液,连续进样 6 次,分别对共有峰的相对保留时间和相对峰面积进行考察。结果表明,各共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 0.27%,相对峰面积 RSD 均小于 1.86%,表明精密度良好,符合指纹图谱技术要求^[3]。

2.4.3 重现性试验:取 3 号供试品药材粉末 6 份,制备供试品溶液,依次检测,分别对共有峰的相对保留时间和相对峰面积进行考察。结果表明,各共有峰相对保留时间 RSD 均小于 0.21%,相对峰面积 RSD 均小于 1.83%,表明重现性良好,符合指纹图谱技术要求。

2.4.4 稳定性试验:取 3 号供试品溶液,分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样检测,考察共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明,各共有峰相对保留时间 RSD 均小于 0.53%,峰面积比值 RSD 均小于 1.98%,表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.5 不同产地马鞭草药材指纹图谱的建立^[4]

取 1~12 号马鞭草样品的供试品溶液各 20 μL 分别进样,得到 12 批不同产地马鞭草药材的指纹图谱。以 6 号峰(S 峰)即马鞭草苷峰为内参比峰,计算其他色谱峰与内参比峰的相对保留时间^[5,6],见表 2,得到 20 个共有峰,见图 1,计算各共有峰相当于内参比峰的相对峰面积,见表 3。将指纹图谱信号数据导入 2004A 版相似度计算软件,生成共有

表 2 马鞭草 12 批药材共有峰的相对保留时间

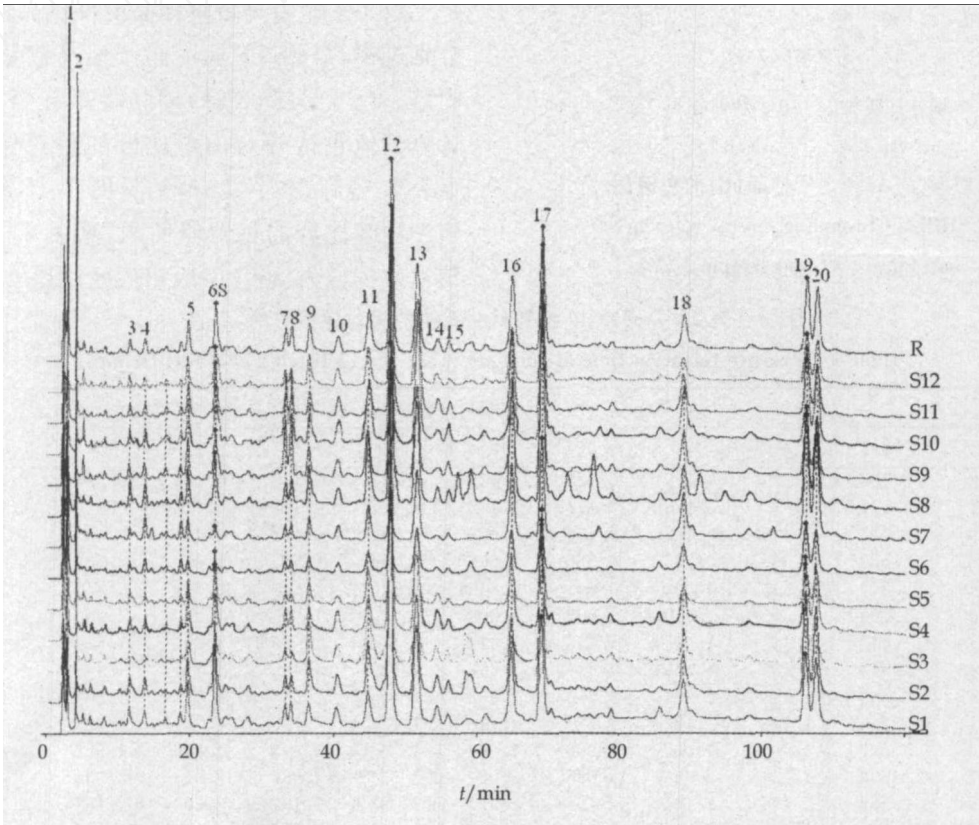
Table 2 Relative retention time of common peaks for 12 batches of *V. officinalis*

峰序号	相对保留时间											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0.125	0.126	0.129	0.125	0.125	0.126	0.125	0.125	0.125	0.124	0.126	0.126
2	0.177	0.177	0.177	0.178	0.177	0.177	0.177	0.177	0.178	0.179	0.179	0.178
3	0.494	0.495	0.496	0.496	0.496	0.496	0.496	0.495	0.494	0.495	0.495	0.494
4	0.586	0.585	0.585	0.587	0.586	0.586	0.586	0.585	0.583	0.587	0.584	0.583
5	0.840	0.841	0.841	0.841	0.841	0.840	0.840	0.840	0.840	0.840	0.841	0.838
6	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
7	1.414	1.413	1.415	1.415	1.415	1.414	1.413	1.415	1.415	1.414	1.415	1.414
8	1.448	1.448	1.450	1.449	1.449	1.448	1.447	1.449	1.450	1.449	1.450	1.448
9	1.551	1.553	1.553	1.554	1.553	1.553	1.553	1.554	1.555	1.554	1.556	1.554
11	1.715	1.720	1.720	1.722	1.721	1.728	1.727	1.726	1.731	1.727	1.729	1.723
12	1.903	1.902	1.903	1.905	1.903	1.903	1.903	1.904	1.906	1.904	1.910	1.905
13	2.035	2.033	2.034	2.036	2.036	2.034	2.034	2.037	2.043	2.034	2.040	2.039
14	2.191	2.189	2.186	2.194	2.191	2.193	2.193	2.192	2.200	2.193	2.205	2.194
15	2.315	2.312	2.311	2.318	2.316	2.312	2.310	2.315	2.329	2.312	2.326	2.317
16	2.382	2.379	2.379	2.385	2.382	2.380	2.381	2.383	2.388	2.378	2.398	2.393
17	2.761	2.758	2.761	2.763	2.760	2.759	2.761	2.762	2.768	2.758	2.775	2.768
18	2.941	2.937	2.939	2.943	2.938	2.939	2.940	2.941	2.949	2.937	2.962	2.952
19	3.792	3.788	3.790	3.792	3.790	3.791	3.788	3.790	3.803	3.784	3.812	3.804
20	4.519	4.512	4.515	4.518	4.534	4.518	4.515	4.513	4.534	4.509	4.550	4.538

模式,即为对照指纹图谱,见图 2。同时以相对峰面 (0.495), 4 (0.585), 5 (0.840), 6 (1.000), 7 积为变量,按中位数法计算对照指纹图谱 20 个共有 (1.414), 8 (1.449), 9 (1.554), 10 (1.721), 11 峰相对保留时间为: 1 (0.125), 2 (0.178), 3 (1.904), 12(2.036), 13(2.195), 14(2.316), 15

表 3 马鞭草 12 批药材共有峰的相对峰面积
Table 3 Relative areas of common peaks for 12 batches of *V. officinalis*

峰序号	相对峰面积											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0.831	1.029	0.809	0.678	1.873	10.429	7.832	2.087	0.911	1.100	0.959	0.577
2	0.540	0.725	0.691	0.474	1.396	7.182	6.472	1.484	0.607	0.589	0.738	0.477
3	0.212	0.422	0.416	0.172	0.676	0.804	0.886	0.357	0.195	0.266	0.228	0.178
4	0.159	0.295	0.278	0.209	0.402	1.555	1.761	0.393	0.257	0.303	0.278	0.184
5	0.470	0.470	0.462	0.469	0.591	1.373	1.393	0.640	0.588	0.594	0.549	0.455
6S	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
7	0.239	0.223	0.209	0.233	0.237	1.196	0.639	0.372	0.874	0.900	0.336	0.226
8	0.230	0.210	0.209	0.224	0.218	1.222	0.716	0.428	0.914	0.849	0.279	0.258
9	0.266	0.538	0.698	0.287	0.564	1.894	1.614	0.816	0.834	0.542	0.396	0.707
11	0.313	0.331	0.336	0.332	0.333	1.453	0.993	0.436	0.420	0.422	0.413	0.402
12	0.661	1.168	1.394	0.685	1.384	2.872	2.549	1.756	0.413	1.420	0.831	0.999
13	3.962	4.645	4.087	3.979	4.119	8.131	2.775	5.663	2.443	2.443	4.462	3.092
14	2.022	2.154	2.129	2.074	2.252	8.412	6.386	2.973	2.322	2.301	4.285	2.532
15	0.292	0.305	0.282	0.312	0.428	0.891	0.432	0.337	0.299	0.215	0.354	0.272
16	0.151	0.200	0.208	0.153	0.164	0.609	0.485	0.277	0.273	0.284	0.251	0.130
17	1.254	1.504	1.460	1.448	1.854	7.119	6.394	3.442	2.041	2.086	2.240	1.504
18	1.711	2.695	2.546	1.682	2.886	8.037	7.358	4.646	3.033	3.226	2.966	1.837
19	0.775	0.848	0.798	0.227	0.647	4.998	4.649	1.111	1.043	1.084	1.117	0.544
20	1.220	1.804	1.528	1.210	1.568	8.204	10.514	2.540	1.394	1.463	1.716	1.308



S1~S12-样品 1~12 R-共有模式(由 12 批药材指纹图谱产生) 6S-马鞭草苷
S1—S12-samples S 1—12 R-plot of mutual mode of fingerprint chromatogram for 12 batches of samples 6S-verbenalin
图 2 不同产地马鞭草指纹图谱

Fig. 2 Fingerprints of 12 batches of *V. officinalis* samples from different habitats

(2.384), 16 (2.763), 17 (2.943), 18 (3.793), 19 (4.521), 20 (4.582); 相对峰面积为: 1 (1.356), 2 (0.940), 3 (0.316), 4 (0.318), 5 (0.553), 6 (1.000), 7 (0.408), 8 (0.409), 9 (0.590), 10 (0.201), 11 (1.186), 12 (3.875), 13 (1.253), 14 (0.262), 15 (0.213), 16 (2.000), 17 (2.832), 18 (1.033), 19 (1.843), 20 (1.704)。

2.6 相似度分析

2.6.1 运用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”软件进行分析,将不同产地马鞭草药材的指纹图谱进行数据处理,生成指纹图谱的共有模式即为对照图谱,计算各样品图谱与对照图谱的相似度。1~12 号样品相似度结果见表 4。

表 4 12 批马鞭草样品的相似度结果
Table 4 Similarity for 12 batches of samples

样品号	相似度	样品号	相似度
1	0.918	7	0.830
2	0.914	8	0.906
3	0.911	9	0.885
4	0.914	10	0.916
5	0.922	11	0.915
6	0.882	12	0.839

2.6.2 利用 Excel 软件与公式计算^[7],分别采用欧氏距离、相关系数和夹角余弦作为测度,以 1 号样品为对照样品,以其中位数矢量作为共有模式,计算所有样品的相似度,结果见表 5。

表 5 相似度分析结果
Table 5 Results of similarity analyses

样品号	相似度		
	欧氏距离	相关系数	夹角余弦
1	0.867	0.922	0.975
2	0.841	0.943	0.980
3	0.870	0.932	0.979
4	0.878	0.934	0.979
5	0.873	0.946	0.984
6	0.225	0.669	0.901
7	0.140	0.161	0.743
8	0.743	0.952	0.985
9	0.678	0.742	0.927
10	0.779	0.746	0.928
11	0.715	0.711	0.912
12	0.804	0.801	0.943

3 讨论

3.1 本实验首次建立了不同产地马鞭草的 HPLC-PDA 指纹图谱分析方法,为马鞭草药材的质量控制与评价提供新方法。

3.2 实验标定了 20 个共有峰,指认了 2 个色谱峰,5 号峰为戟叶马鞭草苷,6 号峰为马鞭草苷(图 1)。用中药色谱指纹图谱相似度评价系统得出的结果表

明,多数样品的相似度均在 0.9 以上,各样品间相似度差异较小。用 Excel 表按公式计算的结果也趋于一致,以欧氏距离为测度,6 号、7 号和 9 号样品相似度分别为 0.225、0.140 和 0.678,其余均大于 0.70;以相关系数为测度,6 号和 7 号样品相似度为 0.669 和 0.161,其余均大于 0.7;以夹角余弦为测度,7 号样品相似度为 0.743,其余均大于 0.9。由此可见,用不同的评价方法其结果的表达方式及其具体数值可能会有所不同,但其结论均趋于一致,说明药材品质有较好的一致性,同时也说明不同产地的同植物药材之间存在差异。除 1 号对照药材外,其中湖北、山西和广西相似度均高于 0.9,说明这 3 个产区的药材质量较高。

3.3 6 和 7 号样品(购于河南洛阳)通过相似度分析,与其他样品相差较大,同时通过 3 种公式计算其相似度均为最小,可能与药材的品质有关,其他 10 批样品相似度相差较小,说明所含化学成分相似。从重叠图谱上可以明显看出,马鞭草苷和戟叶马鞭草苷的量普遍较高,环烯醚萜苷类成分为其主要成分,应结合药效学进行综合性研究,尽可能多地确定共有峰的化学结构,使中药材的质量评价指标真正能反映其药效物质基础。

3.4 采用 PDA 检测器对检测波长进行选择,经 HPLC-PDA 在 200~400 nm 下进行全波长扫描,在 265 nm 处出峰最多且整体信号明显,故选择 265 nm 为检测波长。

3.5 提取方法比较了回流提取法,超声提取法两种不同提取方法,经比较两者提取效果接近,故选用超声提取法。本试验还对不同提取时间(20、30、45、60、90 min),不同醇质量浓度(20%、40%、60%、80%、100% 甲醇),不同提取溶剂体积(5、10、20、30 倍量)提取效果进行比较,最后确定 20 倍量 80% 甲醇超声 45 min 作为供试品溶液的制备方法。

3.6 流动相的选择考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-乙腈-水溶液、乙腈-酸水溶液等不同的系统,在流动相中分别加入 0.1% 磷酸、0.05% 磷酸、0.1% 冰醋酸和 0.05% 冰醋酸。确定以乙腈-0.05% 磷酸水为流动相进行梯度洗脱。

参考文献:

[1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
[2] 张 涛,阮金兰,吕子敏. 马鞭草环烯醚萜苷类成分的研究[J]. 中草药, 2000, 31(10): 721-723.
[3] 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)[S]. 2000.
[4] Li W, Deng Y L, Dai R J, et al. Chromatographic fingerprint analysis of *Cephalotaxus sinensis* from various sources

- by high-performance liquid chromatography-diodearray detection-electrospray ionization-tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 45: 38-46.
- [5] Jin X F, Lu Y H, Wei D Z, *et al.* Chemical fingerprint and quantitative analysis of *Salvia plebeia* R. Br. by high-performance liquid chromatography [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 48: 100-104.
- [6] 黎琼红, 马兴田, 谢 晨, 等. 白术药材的指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2007, 38(6): 929-931.
- [7] 王 玺, 王文字, 张克荣, 等. 中药 HPLC 指纹图谱相似性研究的探讨 [J]. 沈阳药科大学学报, 2003, 20(5): 360-362.

我国不同产地当归药材质量的分析与评价

严 辉¹, 段金殿^{1*}, 钱大玮¹, 宿树兰¹, 宋秉生², 何子清²

(1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210046; 2. 甘肃岷归中药材科技有限公司, 甘肃 兰州 730010)

摘 要:目的 对我国当归不同产地的药材质量进行分析与综合评价。方法 采集 2008 年我国各主产区传统采收期的 25 批次当归药材样品, 采用 HPLC 法、UV 法测定当归药材中总挥发油、藁本内酯、正丁烯基酞内酯、阿魏酸、总多糖的量; 运用主成分分析法对当归多指标进行综合评价。结果 岷归、云归、川归、窑归的多指标成分比较分析与综合评价, 以甘肃产岷归质量为优; 主成分分析中藁本内酯的因子载荷量最大, 说明其对当归质量的影响较为显著。结论 基于我国不同产地当归药材质量的分析评价, 建立了较为系统、客观的多成分类型多指标现代分析评价体系, 为药材地道性科学内涵的揭示提供了依据和方法学参考。

关键词:当归; 不同产地; 质量评价; 主成分分析

中图分类号:R282.6 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2009)12-1988-05

当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 为常用大宗中药, 其栽培历史迄今已有两千余年, 现今当归商品完全依靠栽培生产提供。当归产地历经变迁, 目前主要产地集中在甘肃定西、陇南地区; 云南丽江、大理、曲靖地区; 四川的雅安、阿坝地区; 湖北恩施等地。甘肃产者谓之“岷归”, 云南、四川、湖北产者分别称之为“云归”、“川归”、“窑归”等。“岷归”药材世为地道。近年来统计显示^[1], 我国商品当归药材的 80% 以上来自于甘肃定西地区, 表明定西已成为我国当归主要生产区和商品集散地。现代研究表明, 当归传统功效的物质基础主要是挥发性成分、有机酸类、多糖类等^[2-4]。建立能客观反映当归质量的多类型多指标成分评价体系, 并探讨目前我国当归药材的生产及其质量状况。

1 仪器与材料

1.1 仪器: Waters 高效液相系统 (2995 Separations Module, 2996 Photodiode Array Detector, Empower 色谱工作站); UV-2000 紫外可见分光光度计 (北京莱伯泰科仪器有限公司); Sartorius

BT125D 电子分析天平 (1/100 000); Anke LXJ-II B 离心机 (上海安亭科学仪器厂); WH-1 微型漩涡混合仪 (上海沪西分析仪器厂有限公司) 等。

1.2 试药: 阿魏酸、葡萄糖、葡萄糖醛酸对照品 (中国药品生物制品检定所, 供定量测定用, 批号 110773-200611、0833-9501、648-200001); 藁本内酯对照品 (自制, 质量分数 98%); 正丁烯基酞内酯对照品 (购于 Alfa Aesar 公司, 质量分数 98%)。甲醇 (色谱纯), 乙酸 (色谱纯), 唑啉 (CP 级, 中国远航试剂厂), 重蒸水。其余试剂为分析纯。

1.3 药材: 25 批次当归样品分别采自甘肃、云南、四川、湖北等地。采集时间为 2008 年 10 月, 遵从不同产地当归传统采收期。经南京中医药大学段金殿教授鉴定为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的新鲜根, 样品信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 挥发油的测定方法: 称取 100 g 药材, 精确至 0.01 g, 加 500 mL 水, 参照《中国药典》2005 年版一部附录 XD 挥发油测定法甲法测定, 结果见表 2。

收稿日期: 2009-04-15

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目 (No. 2006BA109B05-1; No. 2007BA137B02); 2008 年度中医药行业科研专项 (No. 200807020)

作者简介: 严 辉 (1980—), 男, 江苏扬中人, 讲师, 南京中医药大学 2007 级博士研究生, 主要从事中药资源学相关教学与科研。

Tel: (025) 85811514 E-mail: glory-yan@163.com

* 通讯作者 段金殿 E-mail: dja@njutcm.edu.cn