

泰山四叶参 HPLC 指纹图谱研究

赵燕燕¹, 苏美英², 王 莉², 谷红霞², 周茂金^{2*}

(1 烟台大学药学院, 山东 烟台 264003; 2 山东省泰安市中心医院, 山东 泰安 271000)

摘要:目的 建立泰山四叶参药材的指纹图谱分析方法, 为泰山地区四叶参药材质量评价和合理应用提供参考依据。方法 采用 HPLC-ELSD 检测法, 对泰山四叶参药材进行测定, 色谱柱为 Ultimate AQ-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇 0.2% 冰醋酸水梯度洗脱, 柱温 30 ℃, 漂移管温度 102 ℃, 载气流量为 2.5 L/min。结果 确立 7 个共有峰为特征峰的泰山四叶参 HPLC-ELSD 指纹图谱, 相似度评价结果表明, 除 2 批药材外, 其余药材的相似度在 0.84 以上。结论 泰山地区的四叶参药材具有很好的相似度。本方法操作简便、快速、准确, 为泰山四叶参的质量控制提供了依据。

关键词:泰山四叶参; 指纹图谱; HPLC-ELSD; 质量评价

中图分类号: R286.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)12-2083-03

泰山四叶参是桔梗科党参属植物四叶参 *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. f. 的干燥根, 与泰山何首乌、黄精、紫草共称为“泰山四大名药”, 具有补血通乳、养阴润肺和健身补气等功效^[1-2]。四叶参根的化学成分主要包括甾醇、三萜、糖和氨基酸类化合物^[3]。近年来, HPLC 法以其高效、快速、准确等优点, 已被广泛应用于药材的研究中^[4-6]。泰山四叶参采收年限一般为 3~4 年, 为了更好地控制四叶参药材的质量, 本实验首次应用 HPLC 法对其进行指纹图谱研究; 采用 ELSD 检测器进行分析, 以 β-谷甾醇为对照品, 建立了泰山地区 10 批四叶参药材的指纹图谱, 为泰山道地药材四叶参的质量控制提供科学依据。

1 材料

1.1 药材: 10 批泰山地区不同产地的四叶参药材, 经烟台大学药学院生药学教研室徐本明副教授鉴定, 均为桔梗科党参属四叶参 *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. f. 的根, 来源见表 1。药材晾干, 切片, 60 ℃ 烘 8 h, 取出, 粉碎, 过 100 目筛, 置干燥器中, 备用。

表 1 四叶参药材来源

Table 1 Sources of *Codonopsis Radix* samples

编号	样品来源	编号	样品来源
1	泰安市祝阳乡 1	6	泰安市陶镇 1
2	泰安市祝阳乡 2	7	泰安市陶镇 2
3	泰安市山口镇 1	8	泰安市良庄镇
4	泰安市山口镇 2	9	泰安市杨集镇 1
5	泰安市羊里镇	10	泰安市杨集镇 2

1.2 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, 美国 Agilent 公司); Agilent ECM 色谱工作站 (美国 Agilent 公司); Alltech 2000ES 蒸发光散射检测器 (ELSD); 乙腈 (色谱纯) 购于默克公司, 冰醋酸 (色谱纯) 购于天津科密欧公司。乙醇 (分析纯) 购于天津化学试剂一厂。超纯水 (自制)、超声波清洗器 (100 W, 25 kHz, 上海声谱超声波设备厂), β-谷甾醇对照品 (批号 110851-200504) 购自中国药品生物制品检定所。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备: 取 β-谷甾醇对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解并稀释成质量浓度为 1.545 mg/mL 的溶液, 即得。

2.2 供试品溶液的制备: 取药材粉末 (过 100 目筛) 1 g, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加 70% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 称定质量, 超声提取 2 次, 每次 30 min, 取出, 放冷, 用 70% 乙醇补足质量, 摇匀, 微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 即得。

2.3 色谱条件: 色谱柱为 Ultimate AQ-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇 (A)-0.2% 冰醋酸溶液 (B), 梯度洗脱: 0~5 min, 5% A; 5~10 min, 70% A; 17~30 min, 100% A; 30~35 min, 5% A。进样量为 10 μL, 体积流量为 1 mL/min; 柱温为 30 ℃。ELSD 参数: 漂移管温度为 102 ℃, 载气的体积流量为 2.5 mL/min。

2.4 专属性试验: 精密吸取供试品溶液 10 μL 注

收稿日期: 2010-05-12

基金项目: 泰安市中药现代化科技攻关项目

作者简介: 赵燕燕 (1972—), 女, 博士, 副教授。Tel: (0535) 6717618 8529 E-mail: zhaoyanyan612@hotmail.com

* 通讯作者 周茂金 Tel: (0538) 2138623 E-mail: mjzhou@tj@sina.com

入高效液相色谱仪,记录 65 min 色谱图,发现 35 min 后无色谱峰,没有影响指纹图谱共有峰的色谱峰,因此分析时间定为 40 min。

2.5 方法学考察

2.5.1 系统适用性试验:以 β -谷甾醇计算,理论塔板数为 346 020,分离度为 8.7,对称因子为 1.0,所有峰的分离度均大于 1.0,所有峰都在 35 min 内完成检测,色谱图见图 1。

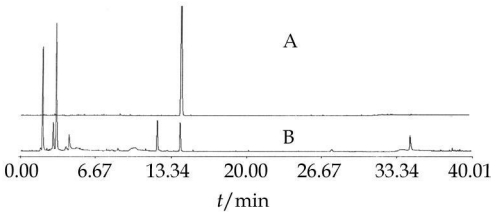


图 1 β -谷甾醇对照品 (A) 与四叶参药材 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatogram of β -sitosterol reference substance (A) and *Codonopsis Radix* (B)

2.5.2 精密度试验:取 1 号样品粉末适量,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,重复进样 6 次,记录指纹图谱,利用中药指纹图谱相似度评价系统 A 版软件计算相似度,结果均大于 0.9,各主要色谱峰相对保留时间 RSD 均小于 0.23%,相对峰面积比值的 RSD 均小于 1.6%。

2.5.3 重现性试验:取 1 号样品粉末,按 2.2 项下方法制备供试品溶液 6 份,分别进样,记录指纹图谱,相似度计算结果均大于 0.9,各主要色谱峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.25%,相对峰面积比值的 RSD 均小于 2.0%。

2.5.4 稳定性试验:取 2.6.2 项下的供试品溶液分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样,按 2.3 项下色谱条件检测。相似度计算结果均大于 0.9,各主要色谱峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.5%,相对峰面积比值的 RSD 均小于 2.0%,说明样品在 24 h 内稳定。

2.5.5 共有峰的标定:取 10 份泰山不同区域的四叶参药材,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,分别进样,按 2.3 项下色谱条件检测,记录指纹图谱,并对图谱进行分析与比较,结果 7 个峰为共有指纹峰 (图 2)。

2.5.6 相似度评价:将数据导入国家药典委员会“中药指纹图谱相似度评价系统 (2004 A) 软件”,经过自动匹配,生成对照图谱 (R),结果见图 3,并计算其相似度,结果见表 2。

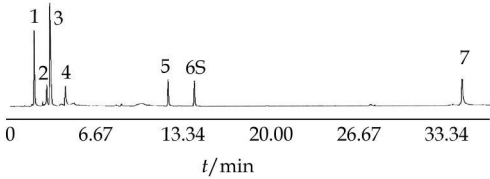
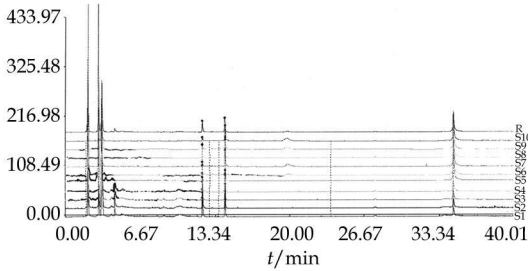


图 2 四叶参药材指纹图谱

Fig. 2 Fingerprints of *Codonopsis Radix*



S1~S10 样品 1~10 R 对照指纹图谱

S1—S10 samples 1—10 R reference fingerprint

图 3 10 批不同产地药材的指纹图谱及生成的共有模式

Fig. 3 Fingerprints of 12 batches of *Codonopsis Radix* and their plots of mutual modes

表 2 不同批次四叶参药材与共有模式的相似度

Table 2 Similarities among ten batches of *Codonopsis Radix* samples compared with reference fingerprints

批号	相似度	批号	相似度
1	0.844	6	0.980
2	0.852	7	0.933
3	0.844	8	0.759
4	0.879	9	0.957
5	0.383	10	0.878

3 讨论

3.1 本实验通过蒸发光散射检测器联用紫外检测器对四叶参药材的 70% 乙醇提取物进行指纹图谱分析,结果表明,在吸收波长 200 nm 的条件下,紫外检测器只有一两个很弱的信号,因此确定用蒸发光散射检测器进行指纹图谱分析。

3.2 色谱条件的确定:先后选择了甲醇-水、乙腈-水 (醋酸调节不同 pH 值) 作为流动相系统,结果表明,甲醇-0.2% 冰醋酸溶液系统分离度较好,保留时间适中。

蒸发光散射检测器的漂移管温度和载气的体积流量是影响实验的 2 个关键参数,不同的样品需采用不同的条件,本实验的条件是通过逐渐改变漂移管温度和载气体积流量,记录峰面积和信噪比的变化情况,选定最佳测定参数为:漂移管温度为 102 $^{\circ}\text{C}$,载气体积流量为 2.5 L/min。

3.3 提取条件的确定:本实验选用 30%、70%、90% 乙醇和 30%、70%、90% 甲醇为溶剂,采用超

声和回流两种方法进行提取,结果表明 70% 乙醇和 70% 甲醇超声提取的样品峰数和组分的量较多,且杂质峰较少。对提取时间做了进一步的筛选,最终确定为提取 2 次,每次 0.5 h。

3.4 样品差异性分析:通过对指纹图谱分析可以看出,除泰山羊里镇和良庄镇的两批样品外,泰山周边地区的四叶参药材的指纹图谱相似性都在 0.84 以上,其差异性可能是由生态环境、采收时期等因素引起的。

参考文献:

- [1] 王德才,李同德,康颂建.泰山四大名药之一四叶参[J].食品与药品,2006,8(9):73-75
- [2] 谷红霞,周茂金,苏美英.四叶参化学成分和药理作用研究进展[J].中草药,2009,40(8):1338-1340
- [3] 付成国,文连奎,董然.轮叶党参化学成分与药理研究进展[J].中药材,2007,30(4):497-499
- [4] 王欣杨,于治国,高晓霞,等.高效液相色谱法同时测定槲寄生中 4 种黄酮[J].中草药,2010,41(9):135-137
- [5] 崔洋,王巧,张兰桐,等.河北道地药材连翘的高效液相色谱指纹图谱研究[J].中草药,2010,41(2):297-301
- [6] 龚全炎,吴晓琴,夏道宇,等.RP-HPLC 测定竹叶提取的中黄酮类和酚酸类成分[J].中草药,2010,41(1):63-65

HPLC 法同时测定土荆芥挥发油中驱蛔素、对伞花烃、 α -蒎品烯

林万里¹,王振月¹,张兰兰^{2*},黄芝娟²,李瑞明²,宋兆辉²

(1 黑龙江中医药大学,黑龙江 哈尔滨 150040; 2 天津天士力集团研究院,天津 300410)

摘要:目的 建立 HPLC 法同时测定土荆芥挥发油中驱蛔素、对伞花烃和 α -蒎品烯的方法。方法 采用 Agilent SB-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-水 (60:40); 体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长为 224 nm; 柱温为 30 $^{\circ}$ C。结果 驱蛔素、对伞花烃、 α -蒎品烯的线性范围分别为 2.02~40.4 mg/mL ($r=0.9994$)、0.525~10.5 mg/mL ($r=0.9998$)、0.376~7.52 mg/mL ($r=0.9997$); 加样回收率分别为 98.60% (RSD=2.06%)、102.51% (RSD=2.70%)、96.92% (RSD=2.32%)。结论 本方法简单、快速、灵敏、准确、重现性好,适用于同时测定土荆芥挥发油中驱蛔素、对伞花烃、 α -蒎品烯的量。

关键词:驱蛔素; 对伞花烃; α -蒎品烯; 土荆芥; 高效液相色谱

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)12-2085-03

土荆芥为藜科植物土荆芥 *Chenopodium ambrosioides* L. 带有果穗的全草,具有祛风、杀虫、通经止痛的功效,用于皮肤风湿痹痛、痛经、闭经、皮肤湿疹和蛇虫咬伤^[1]。据文献报道,驱蛔素、对伞花烃和 α -蒎品烯是土荆芥挥发油的主要成分,且具有一定的代表性,但是对这 3 种成分同时进行定量测定的方法一直未见报道。挥发油类成分一般选用气相色谱法进行分析,但气相色谱采用毛细管柱,由于分流等因素影响其测定的稳定性^[2-4],本实验建立了用 HPLC 法同时测定土荆芥挥发油中驱蛔素、对伞花烃、 α -蒎品烯的方法,为土荆芥挥发油质量标准的制定打下基础。

1 仪器与材料

美国 Agilent 1100 高效液相色谱仪 (配有紫外检测器、二元泵、自动进样器、柱温箱)。

驱蛔素对照品 (自制,质量分数为 90.0%), 对伞花烃对照品 (St. Louis, USA, 质量分数为

99.0%), α -蒎品烯对照品 (自制,质量分数为 92.37%), 二纯水 (自制), 乙腈 (Merck 公司) 为色谱纯,其他试剂为分析纯。

土荆芥经黑龙江中医药大学药学院中药资源与开发教研室王振月教授鉴定为土荆芥 *Chenopodium ambrosioides* L., 其挥发油由陕西天士力植物药业有限责任公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱 Agilent SB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-水 (60:40); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长为 224 nm; 柱温为 30 $^{\circ}$ C。色谱图见图 1。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备: 精密称取驱蛔素对照品、对伞花烃对照品、 α -蒎品烯对照品适量,用无水乙醇溶解,制成含驱蛔素 40 mg/mL、对伞花烃 10 mg/mL、 α -蒎品烯 7 mg/mL 的溶液,即得。

收稿日期: 2010-03-20

作者简介: 林万里 (1982—), 男, 黑龙江省鸡西市人, 黑龙江中医药大学中药学在读硕士, 现于天津天士力集团研究院现代中药研究所做实习研究员。Tel: (022) 86342546 E-mail: lin_wanli@163.com

* 通讯作者 张兰兰 Tel: (022) 86342608 E-mail: zhangll2@tasly.com