

金莲花茎叶的 HPLC 指纹图谱研究

张水利¹, 苏连杰^{2*}

1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

2. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要:目的 建立金莲花茎叶 HPLC 指纹图谱分析方法。方法 以荭草苷为对照品, 采用 Welch Materials Ultimate TMXB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈 (A) -0.35% 磷酸 (B) 梯度洗脱, 0~25 min, 15% A; 25~60 min, 15%~25% A; 60~90 min, 25%~30% A; 90~110 min, 30%~100% A; 110~120 min, 100% A; 检测波长 340 nm, 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温 30 ℃; 采用 SPSS 19.0 进行系统聚类分析。结果 建立金莲花茎叶的 HPLC 指纹图谱, 标定 22 个共有峰, 方法学考察结果符合指纹图谱技术要求; 相似度和聚类分析结果表明, 药材质量主要与其产地有关, 同时与采集时间也有一定关系。结论 此研究方法稳定、可靠、重现性好, 可用来控制金莲花茎叶的质量。

关键词: 金莲花茎叶; HPLC 指纹图谱; 荭草苷; 相似度; 聚类分析

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)06-1199-04

HPLC fingerprint of stems and leaves of *Trollius chinensis*ZHANG Shui-li¹, SU Lian-jie²

1. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

2. Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Key words: stems and leaves of *Trollius chinensis* Bunge; HPLC fingerprint; orientin; similarity; cluster analysis

毛茛科植物金莲花 *Trollius chinensis* Bunge 主要分布于我国的华北、内蒙古、东北一带, 其花具有清热解毒、抑菌、抗病毒等作用, 用于治疗上呼吸道感染等疾病, 其有效成分是总黄酮, 尤以荭草苷和牡荆苷量甚高^[1-3]。随着其药用价值不断提升, 金莲花药材日益紧缺。为了扩大药源, 本实验对金莲花茎叶进行初步研究, 其所含的有效成分与花相似, 只是总黄酮量稍低^[4], 对金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、致贺氏杆菌及大肠杆菌等多种细菌均有明显的抑制作用^[5], 肯定了茎叶的疗效, 金莲花的综合应用具有广阔的前景。为控制金莲花茎叶的质量, 本实验采用 HPLC 法确定了金莲花茎叶的指纹图谱, 为金莲花茎叶入药的可行性提供了理论基础。

1 仪器与试药

美国戴安 Dionex Ultimate 3000 高效液相色谱仪 (VWD 3000 紫外检测器, LPG—3x00 低压四元梯度泵, WPS—3000 自动进样器); 250DE 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); Mettler

Toledo AB204—L 电子分析天平。乙腈和甲醇均为色谱纯 (美国天地公司), 水为纯净水经 0.45 μm 微孔滤膜滤过。

荭草苷实验室自制, 质量分数为 98.98%; 不同产地金莲花样品来源见表 1, 由浙江中医药大学张水利副教授鉴定为金莲花 *Trollius chinensis* Bunge。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Welch Materials Ultimate TMXB-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈 (A) -0.35%

表 1 样品来源

Table 1 Samples sources of *T. chinensis*

编号	来源	采收时间	编号	来源	采收时间
S1	黑龙江塔河	2010-06-20	S6	黑龙江北安	2010-06-27
S2	黑龙江盘古	2010-06-30	S7	河北沽源	2010-07-05
S3	五大连池	2010-06-15	S8	河北涿鹿	2010-07-07
S4	黑龙江伊春	2010-06-24	S9	内蒙古蓝旗	2010-05-30
S5	内蒙古锡林郭勒	2010-07-01	S10	黑龙江朗乡	2010-06-08

收稿日期: 2012-03-02

基金项目: 黑龙江省科学技术厅攻关项目“金莲花地上部分的新药研究”(GC08C325)

作者简介: 张水利 (1969—), 男, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药资源的开发、利用与中药品种的本草学研究。

Tel: (0571)86613576 Fax: (0571)86613606 E-mail: zhang_shuili@163.com

*通讯作者 苏连杰 Tel: 15804611048 E-mail: sulianjie1981@163.com

磷酸 (B) 为流动相, 梯度洗脱程序为 0~25 min, 15% A; 25~60 min, 15%~25% A; 60~90 min, 25%~30% A; 90~110 min, 30%~100% A; 110~120 min, 100% A; 检测波长为 340 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 °C, 进样量为 10 μ L。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取苣荬草 0.5 mg, 置 10 mL 量瓶中, 甲醇定容, 过 0.45 μ m 滤膜, 即得。

2.3 供试品溶液的制备^[6]

取金莲花茎叶粉碎, 过 20 目筛, 于 60 °C 恒温干燥箱中干燥 2 h, 放凉, 精密称取 3 g, 置索氏提取器中, 石油醚回流至无色。取出, 挥去溶剂, 置 100 mL 锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称定质量, 静置 24 h, 超声提取 40 min, 冷却, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 静置 0.5 h, 滤过, 取滤液, 甲醇定容于 50 mL 量瓶中, 过 0.45 μ m 滤膜, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取供试品溶液 (第 6 号样品), 连续进样 6 次, 测定, 计算得各共有峰的相对保留时间 RSD 小于 0.5%, 相对峰面积 RSD 小于 2.0%, 符合指纹图谱分析要求。

2.4.2 重复性试验 精密称取第 6 号样品 6 份, 制备供试品溶液, 分别进样测定, 计算得各共有峰的相对保留时间 RSD 小于 1.0%, 相对峰面积 RSD 小于 3%。

2.4.3 稳定性试验 取第 6 号样品供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样, 测定, 计算得各共有峰相对保留时间的 RSD 小于 1%, 相对峰面积 RSD 小于 2.0%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定, 符合指纹图谱的要求。

2.5 测定方法

分别精密量取各批次供试品溶液 10 μ L, 注入液相色谱仪, 记录色谱图。见图 1。

2.6 不同产地金莲花茎叶指纹图谱的比较

在上述条件下测定 10 个产地金莲花茎叶 HPLC 图谱, 结果见图 1, 生成对照指纹图谱见图 2。在 5 号样品色谱指纹图谱中选取量较高的 22 个峰为金莲花茎叶的共有峰, 在共有峰中, 5 号峰为苣荬草, 是金莲花中最主要的活性成分, 量较高且比较稳定, 将其作为参照峰 (保留时间和峰面积为 1), 分别求出各峰与其相对保留时间和峰面积比值, 结果见表 2、3。

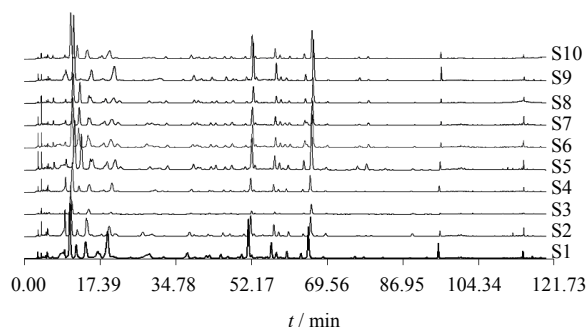


图 1 不同产地金莲花茎叶药材的指纹图谱

Fig. 1 Fingerprint of stems and leaves of *T. chinensis* from various habitats

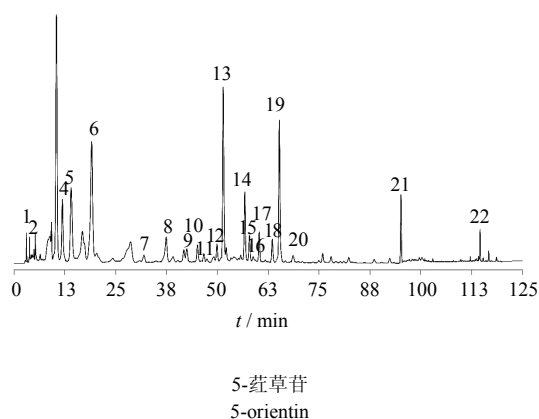


图 2 金莲花茎叶色谱图

Fig. 2 Chromatogram of stems and leaves of *T. chinensis*

2.7 相似度计算

将所得 10 个产地的金莲花茎叶的指纹图谱 cdf 格式依次导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版》计算相似度。通过设置 S1 为参照谱, 进行图谱匹配生成对照峰, 整体相似度以各样品与软件所生成对照峰计算见表 4。结果 S1、S2、S3、S6、S10 较相似; S4、S5、S7、S8、S9 较相似, 表明产地为相同省份的样品相似度较高。

2.8 聚类分析

将样品所有出峰的相对保留值导入 SPSS 软件, 以平均 Euclidean 距离为度量标准, 建立样品间相似性聚类, 结果见图 3。由聚类结果也可以看出, 10 个样品大致可分为 3 大类, 主要与药材的产地密切相关: 第 1 类样品 (S1、S2、S3、S4、S6、S10) 均为黑龙江所产; 第 2 类样品 (S5、S7、S8), 产于内蒙古与河北; 第 3 类样品 (S9), 产于内蒙古蓝旗。聚类结果同时也提示与药材采集时间有关。

3 讨论

本实验采用 50%、70%、100% 甲醇回流提取;

表 2 10 个产地金莲花茎叶样品的相对保留时间

Table 2 Relative retention time of samples in stems and leaves of *T. chinensis* from ten different habitats

样品	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
S1	0.215 4	0.272 7	0.741 3	0.844 5	1.000 0	1.355 7	2.268 0	2.656 6	3.016 4	3.202 9	3.315 1	3.543 8	3.652 1	4.028 0	4.110 4	4.173 8	4.280 3	4.509 5	4.632 0	4.872 0	6.755 7	8.137 0
S2	0.212 9	0.268 4	0.740 4	0.845 4	1.000 0	1.360 9	2.247 4	2.653 6	2.952 9	3.190 5	3.301 6	3.528 0	3.636 8	4.010 7	4.088 2	4.149 4	4.245 6	4.480 4	4.600 8	4.844 0	6.684 9	8.034 1
S3	0.207 5	0.259 4	0.736 1	0.838 6	1.000 0	1.347 8	2.230 4	2.602 2	2.888 9	3.117 5	3.226 7	3.444 4	3.547 8	3.909 3	3.981 8	4.044 4	4.149 2	4.364 2	4.482 1	4.718 4	6.497 5	7.813 4
S4	0.207 6	0.261 3	0.745 0	0.850 0	1.000 0	1.366 8	2.239 0	2.613 1	2.942 7	3.119 0	3.224 9	3.441 3	3.541 3	3.900 8	3.977 6	4.038 5	4.100 4	4.356 7	4.474 0	4.709 9	6.496 7	7.823 5
S5	0.206 2	0.261 2	0.774 5	0.879 8	1.000 0	1.391 8	2.219 8	2.621 9	2.892 9	3.110 9	3.215 4	3.423 4	3.525 1	3.879 7	3.953 3	4.010 5	4.089 4	4.333 9	4.450 9	4.681 4	6.451 0	7.746 0
S6	0.210 0	0.266 1	0.748 1	0.854 3	1.000 0	1.364 0	2.175 0	2.663 1	2.948 9	3.179 2	3.289 0	3.503 6	3.610 7	3.975 5	4.050 9	4.127 7	4.205 3	4.437 9	4.559 7	4.797 2	6.595 0	7.904 3
S7	0.208 4	0.262 9	0.752 2	0.857 0	1.000 0	1.368 1	2.231 9	2.640 1	2.922 2	3.148 2	3.257 9	3.469 4	3.575 0	3.937 2	4.012 4	4.088 9	4.157 7	4.399 2	4.519 4	4.753 2	6.540 0	7.841 7
S8	0.206 7	0.257 7	0.752 3	0.857 4	1.000 0	1.385 8	2.200 8	2.639 1	2.917 0	3.138 6	3.246 5	3.454 1	3.557 4	3.914 8	3.987 9	4.045 2	4.113 8	4.367 0	4.485 7	4.718 1	6.478 5	7.775 5
S9	0.206 4	0.259 9	0.762 0	0.836 0	1.000 0	1.395 0	2.204 5	2.632 6	2.913 7	3.137 0	3.242 6	3.452 0	3.556 2	3.913 9	3.986 7	4.071 9	4.148 1	4.371 1	4.491 9	4.720 3	6.482 1	7.776 6
S10	0.211 2	0.271 6	0.734 4	0.838 5	1.000 0	1.355 8	2.252 2	2.658 4	2.953 2	3.188 2	3.297 0	3.519 1	3.628 3	3.995 3	4.072 5	4.133 2	4.231 3	4.461 2	4.584 4	4.820 8	6.639 8	7.960 0
平均值	0.209 2	0.264 1	0.748 6	0.850 2	1.000 0	1.369 2	2.226 9	2.638 1	2.934 9	3.153 2	3.261 7	3.477 9	3.583 1	3.946 5	4.022 2	4.088 4	4.172 1	4.408 1	4.528 1	4.763 5	6.562 1	7.881 2
RSD/%	1.47	1.99	1.65	1.53	0.00	1.19	1.24	0.78	1.26	1.08	1.11	1.21	1.26	1.31	1.35	1.34	1.57	1.36	1.37	1.37	1.56	1.61

表 3 10 个产地金莲花茎叶样品共有峰的相对峰面积值

Table 3 Relative peak areas of samples in stems and leaves of *T. chinensis* from ten different habitats

样品	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
S1	0.068 3	0.050 2	2.340 0	0.626 1	1.000 0	1.847 9	0.088 7	0.393 9	0.157 3	0.177 3	0.033 2	0.029 2	1.566 5	0.586 5	0.225 9	0.013 7	0.245 1	0.195 9	1.245 7	0.091 9	0.398 0	0.099 4
S2	0.065 1	0.095 5	1.812 6	0.256 3	1.000 0	0.597 4	0.038 9	0.218 6	0.079 9	0.141 2	0.029 4	0.080 3	0.697 9	0.374 5	0.154 0	0.030 2	0.150 9	0.081 0	0.682 2	0.137 4	0.102 8	0.107 4
S3	0.017 4	0.182 9	1.590 8	0.217 8	1.000 0	0.436 1	0.209 2	0.188 8	0.151 1	0.149 9	0.139 4	0.050 7	2.073 4	0.565 5	0.112 0	0.042 2	0.225 9	0.147 5	1.190 0	0.156 5	0.083 6	0.041 8
S4	0.162 3	0.203 5	2.374 3	0.490 8	1.000 0	1.194 3	0.163 1	0.330 3	0.135 2	0.150 8	0.075 6	0.116 8	1.072 1	0.499 6	0.179 4	0.048 2	0.190 9	0.183 0	1.221 1	0.134 9	0.264 1	0.114 9
S5	0.317 0	0.286 0	4.894 7	3.366 6	1.000 0	1.737 4	0.488 5	0.653 6	0.322 9	0.231 0	0.467 3	0.238 6	2.933 9	1.018 9	0.503 0	0.093 1	0.343 8	0.663 8	4.140 0	0.310 0	0.337 7	0.228 6
S6	0.129 4	0.096 8	1.753 0	0.898 4	1.000 0	0.824 4	0.168 6	0.203 2	0.183 8	0.130 8	0.258 8	0.118 3	1.115 5	0.453 5	0.312 3	0.217 7	0.193 7	0.461 3	1.421 7	0.154 5	0.106 7	0.135 3
S7	0.266 8	0.522 9	4.154 4	2.475 1	1.000 0	1.928 2	0.420 8	0.468 5	0.370 3	0.267 8	0.469 1	0.221 9	2.357 3	1.043 6	0.453 0	0.408 4	0.408 7	0.634 6	3.207 9	0.263 3	0.251 1	0.481 9
S8	0.017 0	0.189 8	4.402 5	2.812 6	1.000 0	1.531 2	0.434 7	0.539 5	0.214 1	0.240 1	0.476 4	0.197 9	2.281 3	0.823 2	0.441 9	0.086 5	0.261 1	0.596 8	3.324 3	0.179 6	0.271 7	0.345 8
S9	0.178 7	0.095 9	6.908 8	0.005 5	1.000 0	2.874 1	0.212 1	0.780 3	0.468 2	0.402 3	0.199 9	0.282 0	3.330 0	1.507 1	0.293 0	0.283 9	0.030 2	0.522 5	3.694 4	0.132 8	0.590 9	0.129 0
S10	0.035 2	0.006 8	2.988 2	0.822 2	1.000 0	1.189 7	0.187 8	0.327 9	0.161 9	0.155 1	0.155 6	0.135 6	1.468 9	0.548 3	0.198 4	0.029 4	0.141 8	0.297 3	1.806 3	0.119 7	0.207 1	0.073 5
平均值	0.125 7	0.173 0	3.321 9	1.197 2	1.000 0	1.416 1	0.241 2	0.410 5	0.224 5	0.204 6	0.230 5	0.147 1	1.889 7	0.742 1	0.287 3	0.125 3	0.219 2	0.378 4	2.193 4	0.168 0	0.261 4	0.175 8
RSD/%	83.57	85.50	52.05	101.42	0.00	51.42	63.49	48.61	54.52	41.08	78.23	57.43	45.11	47.74	47.89	106.36	48.50	58.59	57.33	40.18	59.40	78.62

表 4 10 个产地金莲花茎叶指纹谱相似度

Table 4 Similarity between samples from ten different habitats

批次	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
S1	1.000	0.939	0.869	0.531	0.506	0.928	0.506	0.495	0.450	0.949
S2	0.939	1.000	0.941	0.438	0.382	0.920	0.367	0.373	0.311	0.948
S3	0.869	0.941	1.000	0.431	0.444	0.934	0.410	0.426	0.346	0.945
S4	0.531	0.438	0.431	1.000	0.875	0.509	0.899	0.898	0.923	0.454
S5	0.506	0.382	0.444	0.875	1.000	0.603	0.986	0.996	0.880	0.525
S6	0.928	0.920	0.934	0.509	0.603	1.000	0.577	0.583	0.431	0.976
S7	0.506	0.367	0.410	0.899	0.986	0.577	1.000	0.992	0.913	0.503
S8	0.495	0.373	0.426	0.898	0.996	0.583	0.992	1.000	0.896	0.506
S9	0.450	0.311	0.346	0.923	0.880	0.431	0.913	0.896	1.000	0.417
S10	0.949	0.948	0.945	0.454	0.525	0.976	0.503	0.506	0.417	1.000

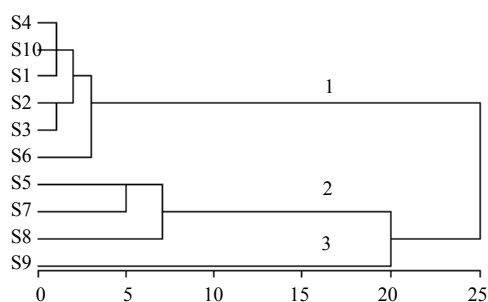


图 3 10 个不同产地样品聚类分析树状图

Fig. 3 Dendrogram of hierarchical cluster analysis for samples from ten different habitats

70%、100%甲醇超声提取。结果表明,以 100%甲醇超声提取,得到的峰数较多、峰形较好。

本实验分别考察了甲醇-水、甲醇-乙腈-水、乙腈-水、甲醇-0.35%磷酸及乙腈-0.35%磷酸体系进行洗脱,选择测定波长 202、254、265、340 nm,对柱温 25、30、40 °C 进行考察,结果以乙腈-0.35%磷酸、340 nm、30 °C,出峰最多、峰分离度最好。本实验建立了金莲花茎叶的 HPLC 指纹图谱,确立 22 个共有峰,用软件生成对照谱图法计算指纹图谱的相似度。

相似度和聚类分析均表明,金莲花茎叶质量,主要与药材的产地有关,同时与采集时间也有一定关系。

比较 10 个不同产地金莲花茎叶的指纹图谱,其

共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 2%,相对峰面积的 RSD 均大于 5%,表明各产地药材成分相似,各共有成分的相对质量分数差异较大,可能受到药材产地、采集时间等因素影响。因此,尚需采集更多产地的样本,进行归类、比较,使其质量控制更具科学性,并进一步研究其化学成分与药理、药效来衡量其道地性,为大规模金莲花中成药生产提供优质原药材。

本实验以荭草苷做标准内参物,是因其有抗菌、抗病毒活性,而且相对质量分数较高。通过建立金莲花茎叶 HPLC 指纹图谱的分析方法,为控制金莲花茎叶质量提供参考依据。

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典 (上册) [M]. 上海: 上海科技出版社, 1977.
- [2] 苏连杰, 田 鹤, 马英丽. 金莲花醇提物体内抗病毒作用的实验研究 [J]. 中草药, 2007, 38(7): 1062-1064.
- [3] 温瑞卿, 张贵君, 杨 洋. 金莲花中药效成分荭草苷和牡荆苷的色谱鉴定 [J]. 现代药物与临床, 2008, 23(5): 214-216.
- [4] 苏连杰, 杨书彬, 苏志伟, 等. 金莲花茎叶不同生长期总黄酮的测定 [J]. 中草药, 2005, 36(5): 767-768.
- [5] 刘丽娟, 王秀坤. 金莲花茎叶的抑菌作用研究 [J]. 中医药学报, 1992(3): 33-34.
- [6] 马英丽, 胡 兵, 田振坤, 等. 金莲花药材 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2006, 37(12): 1873-1875.