

金线莲 HPLC 指纹图谱研究

吴萍萍, 黄丽英*

福建医科大学药学院, 福建 福州 350004

摘要: 目的 研究金线莲 *Anoectochilus candidus* 的 HPLC 指纹图谱。方法 以 Agilent TC-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱, 甲醇-水为流动相进行梯度洗脱, 检测波长为 260 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 ℃。结果 在色谱指纹图谱中, 确定了 22 个共有峰, 建立了金线莲的共有模式, 并利用高分辨 LC-MS/MS 方法对 22 个共有峰中的 7 个色谱峰进行了定性鉴别。采用该方法测定 10 批不同产地的金线莲药材, 其相似度均在 0.9 以上。同时也对该指纹图谱检测方法进行了验证。结论 该方法结果准确、重复性好, 为全面评价金线莲药材的质量提供了依据。

关键词: 金线莲; HPLC; 指纹图谱; LC-MS/MS; 质量评价

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)13-1975-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.13.020

Fingerprint analysis of *Anoectochili Roxburghii Gemma Terminalis* by HPLC

WU Ping-ping, HUANG Li-ying

College of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China

Abstract: Objective To establish the chromatographic fingerprint analysis for the quality of *Anoectochili Roxburghii Gemma Terminalis*. **Methods** The separation was performed on an Agilent TC-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with a gradient elution composed of methanol and water. The detective wavelength was at 260 nm. The flow rate was 1.0 mL/min and the column temperature was set at 30 ℃. **Results** Twenty-two characteristic peaks were established in the fingerprint. The mutual model of *Anoectochili Roxburghii Gemma Terminalis* was established and the similarities were calculated. Seven chromatographic peaks among twenty-two common peaks were identified by LC-MS/MS. Ten batches of *Anoectochili Roxburghii Gemma Terminalis* were determined and the similarities were above 0.9. **Conclusion** The method is accurate with good reproducibility. It can be used for the quality control of *Anoectochili Roxburghii Gemma Terminalis*.

Key words: *Anoectochili Roxburghii Gemma Terminalis*; HPLC; fingerprint; LC-MS/MS; quality evaluation

金线莲 *Anoectochilus candidus* (T. P. Lin et C. C. Hsu) K. Y. Lang 来源于开唇兰属 *Anoectochilus* Bl. 植物花叶开唇兰 *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl., 是我国传统的名贵药材, 在民间享有“药王”“金草”等盛誉。金线莲全草皆可入药, 其味甘, 性平微寒, 有清热解毒、凉血平胆等功效, 广泛用于治疗肝炎、肾炎、肺炎、小儿惊风高热、糖尿病、高血压、肿瘤、风湿病等症^[1-7]。金线莲中所含化学成分主要为生物碱、氨基酸、有机酸、甾醇、三萜类、黄酮类、苷类、微量元素等^[8]。近年来, HPLC 指纹图谱凭借分离效率高、分析速度快、稳定性和重现性好等特点已成为评价药材质量的有效方法之一^[9-12]。目前, 关于金线

莲药材的 HPLC 指纹图谱研究鲜见报道, 因此本研究旨在建立不同产地的金线莲 HPLC 指纹图谱, 并利用金线莲指纹图谱对市场上常掺入金线莲的伪品兰科 (Orchidaceae) 斑叶兰属 *Goodyera* R. Br. 植物银线莲 *Goodyera matsumurana* (Katon) Schltr. 的指纹图谱进行评判, 以其通过图谱的分析对金线莲质量标准的建立及其不同来源的药材鉴别起到一定的作用。

1 仪器与材料

1.1 仪器

6410 型串联三重四级杆质谱 (美国 Agilent 公司), 配 Agilent1200 液相色谱仪; Agilent TC-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱 (美国 Agilent

收稿日期: 2015-01-13

基金项目: 国家卫生和计划生育委员会科研基金 (wkj-FJ-33)

作者简介: 吴萍萍 (1988—), 女, 硕士, 助理实验师, 研究方向为中药成分及质量控制研究。Tel: 15980271679 E-mail: happyhavy@126.com

*通信作者 黄丽英, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事中药成分分析及质量控制研究。E-mail: fjmuhy88@sina.com

公司); LC-20Atp 高效液相色谱仪 (日本岛津); CW-2000 超声-微波协同萃取仪 (新拓微波溶样测试技术有限公司)。

1.2 试药

胞苷(批号 C100358)、次黄嘌呤(批号 H108384)、鸟嘌呤(批号 G104274)、3-吡啶甲醇(批号 P106580)、鸟苷(批号 G103965)、腺苷(批号 A108806)、腺嘌呤(批号 A108805)对照品购于中国食品药品检定研究院,色谱甲醇、乙腈(国药集团化学试剂有限公司),双蒸水(自制)。

金线莲 *Anoetochilus candidus* (T. P. Lin et C. C. Hsu) K. Y. Lang 样品 1~10 分别采自福建南靖、德化、武平、永春、邵武、华安和江西、四川、广西、云南,银线莲 *Goodyera matsumurana* (Katon) Schltr. 药材购于福建省泉州市天草堂参茸有限公司;以上药材经福建医科大学药学院天然药物化学教研室张永红教授鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精密称取对照品胞苷、次黄嘌呤、鸟嘌呤、3-吡啶甲醇、鸟苷、腺苷、腺嘌呤,混合并用 60% 甲醇溶解,定容至 10 mL 量瓶中,摇匀,制成 10 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

精密称取经 80 目筛的金线莲药材粉末 1 g,置 50 mL 具塞锥形瓶中,加入 60% 乙醇 20 mL,超声提取 30 min,提取 3 次,滤过,合并滤液,减压旋转蒸发至干,用 60% 甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中,作为供试品溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱: Agilent TC-C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相为水(A)-甲醇(B),线性梯度洗脱: 0~10 min, 1% B; 10~20 min, 1%~6% B; 20~45 min, 6%~10% B; 45~70 min, 10%~25% B; 70~95 min, 25%~40% B; 95~120 min, 40%~65% B; 检测波长 260 nm, 体积流量 1 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 20 μL 。

2.4 质谱条件

ESI 离子源,检测模式正离子(+);扫描范围: m/z 100~800;干燥气体积流量(N_2): 7 L/min;电晕电流 4.0 μA ;干燥气温度 350 $^{\circ}\text{C}$;毛细管电压 3 500 V;喷雾器压力 0.28 MPa。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 取 S1 样品粉末 1 份,按照“2.2”

项下方法制备供试品溶液,连续进样 6 次,检测指纹图谱,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD,运用相似度评价系统,将 6 次金线莲的 HPLC 图谱数据导入并计算相似度,结果相对保留时间的 RSD<1.2%和相对峰面积的 RSD<3.0%,相似度均达到 0.98 以上,表明该方法精密度良好。

2.5.2 稳定性试验 取 S1 样品粉末 1 份,精密称定,按照“2.2”项下方法制备供试品溶液,分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 检测,采集其色谱图,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD,运用相似度评价系统,将 7 次金线莲的 HPLC 图谱数据导入并计算相似度,结果相对保留时间的 RSD<0.9%和相对峰面积的 RSD<3.4%,相似度均达到 0.98 以上,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5.3 重复性试验 取同 S1 样品粉末 6 份,精密称定,按照“2.2”项下方法制备,分别制成供试品溶液进行分析,检测指纹图谱,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD,运用相似度评价系统,将 6 次金线莲的 HPLC 图谱数据导入并计算相似度,结果相对保留时间的 RSD<1.2%和相对峰面积的 RSD<2.7%,相似度均达到 0.95 以上,表明该分析方法重现性良好。

2.6 指纹图谱的建立与共有指纹峰的确认

2.6.1 指纹图谱的建立 取“2.2”项制备的 10 批供试品溶液各 20 μL ,按“2.3”项条件下进行测定得到 10 批不同产地的金线莲药材 HPLC 指纹图谱(图 1),根据色谱峰中各色谱峰的相对保留时间,确定共有峰,并选取其中 22 个共有峰作为特征指纹峰,建立了金线莲的对照指纹图谱,见图 2。

2.6.2 共有峰的标定 金线莲 HPLC 指纹图谱中共有 22 个指纹峰,选择保留时间适中且与相邻色谱峰

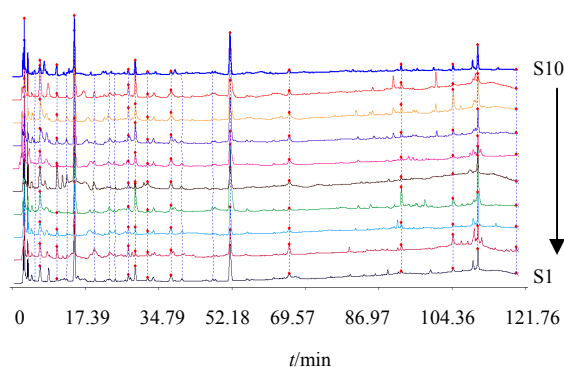


图1 金线莲 10 批样品的指纹图谱

Fig. 1 Fingerprint of 10 batches of *Anoetochilus Roxburghii Gemma Terminalis*

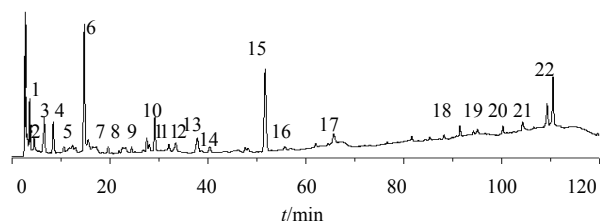


图 2 样品对照指纹图谱

Fig. 2 Reference fingerprint of *Anoectochili Roxburghii* *Gemma Terminalis*

分离良好, 峰面积比较稳定的 15 号峰作为参照峰, 计算各指纹峰保留时间和峰面积与同一图谱中参照峰的保留时间和峰面积比值, 得到相对保留时间和相对峰面积, 结果见表 1 及表 2。

2.6.3 共有指纹峰的指认 为进一步阐述金线莲的化学成分组成, 通过 HPLC-MS-ESI 正离子扫描获得了金线莲指纹图谱的一些结构信息, 对指纹图谱中的部分色谱峰进行了结构归属的初步判断, 并采用对照品进行指认, 结合相关文献报道^[13-15], 初

表 1 金线莲药材指纹图谱共有峰相对保留时间

Table 1 Relative retention time of common peaks in fingerprint of *Anoectochili Roxburghii* *Gemma Terminalis*

样品	相对保留时间																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
S1	0.088	0.129	0.161	0.211	0.282	0.371	0.463	0.530	0.568	0.615	0.648	0.731	0.778	0.830	1.000	1.075	1.276	1.746	1.856	1.992	2.099	2.141
S2	0.088	0.128	0.160	0.211	0.282	0.376	0.469	0.530	0.564	0.619	0.647	0.731	0.776	0.829	1.000	1.076	1.263	1.752	1.855	1.999	2.097	2.148
S3	0.089	0.129	0.162	0.210	0.280	0.371	0.467	0.529	0.567	0.617	0.646	0.729	0.777	0.822	1.000	1.080	1.263	1.756	1.859	1.995	2.093	2.153
S4	0.090	0.130	0.160	0.210	0.279	0.373	0.467	0.528	0.561	0.616	0.644	0.729	0.779	0.832	1.000	1.079	1.275	1.757	1.852	1.998	2.095	2.133
S5	0.089	0.132	0.159	0.214	0.278	0.377	0.468	0.529	0.560	0.613	0.646	0.732	0.778	0.830	1.000	1.084	1.265	1.752	1.859	1.994	2.090	2.149
S6	0.088	0.131	0.158	0.209	0.283	0.376	0.468	0.530	0.560	0.616	0.643	0.729	0.778	0.828	1.000	1.082	1.274	1.748	1.860	1.991	2.102	2.143
S7	0.090	0.128	0.160	0.212	0.281	0.377	0.468	0.528	0.560	0.613	0.645	0.729	0.775	0.827	1.000	1.081	1.265	1.742	1.858	2.001	2.101	2.134
S8	0.090	0.130	0.161	0.214	0.282	0.375	0.467	0.530	0.569	0.615	0.645	0.730	0.780	0.832	1.000	1.084	1.271	1.739	1.854	2.003	2.093	2.134
S9	0.088	0.129	0.161	0.211	0.284	0.374	0.468	0.530	0.564	0.619	0.648	0.731	0.777	0.829	1.000	1.077	1.267	1.749	1.855	2.002	2.092	2.145
S10	0.088	0.129	0.160	0.210	0.281	0.371	0.468	0.525	0.564	0.616	0.643	0.730	0.775	0.826	1.000	1.080	1.278	1.747	1.852	1.995	2.099	2.142
RSD/%	1.03	0.98	0.71	0.78	0.65	0.66	0.35	0.30	0.61	0.34	0.29	0.15	0.21	0.36	0.00	0.30	0.45	0.33	0.09	0.21	0.20	0.32

表 2 金线莲药材指纹图谱共有峰相对峰面积

Table 2 Relative peak areas of common peaks in fingerprint of *Anoectochili Roxburghii* *Gemma Terminalis*

样品	相对峰面积																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
S1	0.246	0.471	0.304	0.109	1.144	0.300	0.163	0.221	0.226	0.078	0.089	0.399	0.170	0.105	1.000	0.139	0.164	0.122	0.107	0.154	0.184	0.467
S2	0.161	0.294	0.313	0.104	1.202	0.154	0.145	0.256	0.363	0.088	0.179	0.387	0.167	0.090	1.000	0.117	0.201	0.091	0.139	0.191	0.171	0.429
S3	0.200	0.605	0.299	0.108	1.228	0.318	0.199	0.210	0.287	0.117	0.100	0.331	0.257	0.108	1.000	0.114	0.160	0.080	0.141	0.224	0.172	0.229
S4	0.200	0.695	0.370	0.113	1.766	0.270	0.216	0.268	0.300	0.125	0.224	0.480	0.277	0.177	1.000	0.094	0.241	0.136	0.167	0.284	0.178	0.370
S5	0.226	0.843	0.497	0.109	1.431	0.466	0.191	0.247	0.311	0.178	0.312	0.407	0.176	0.219	1.000	0.113	0.354	0.104	0.126	0.220	0.168	0.498
S6	0.262	0.543	0.421	0.103	0.944	0.316	0.222	0.220	0.350	0.093	0.157	0.369	0.172	0.112	1.000	0.122	0.218	0.118	0.100	0.183	0.175	0.589
S7	0.193	0.443	0.368	0.154	1.056	0.208	0.176	0.244	0.536	0.092	0.153	0.310	0.195	0.099	1.000	0.098	0.190	0.085	0.105	0.185	0.173	0.472
S8	0.124	0.641	0.386	0.141	1.428	0.104	0.143	0.256	0.613	0.107	0.162	0.393	0.179	0.161	1.000	0.089	0.160	0.113	0.140	0.284	0.174	0.609
S9	0.160	0.998	0.490	0.141	1.294	0.157	0.150	0.218	0.533	0.085	0.153	0.344	0.147	0.093	1.000	0.122	0.202	0.112	0.119	0.302	0.168	0.717
S10	0.190	0.745	0.321	0.144	1.178	0.144	0.156	0.260	0.353	0.103	0.213	0.385	0.178	0.092	1.000	0.161	0.213	0.114	0.135	0.301	0.175	0.528
RSD/%	21.12	30.52	19.37	16.15	17.58	45.43	16.68	8.68	31.36	27.24	36.86	12.40	21.72	35.31	0.00	18.41	27.19	18.22	16.16	23.78	2.74	24.31

步鉴定了 7 个指纹成分的化学结构, 1、2、3、6、7、8、15 号峰分别为胞苷、次黄嘌呤、鸟嘌呤、3-吡啶甲醇、鸟苷、腺嘌呤、腺苷。

2.7 10 批不同产地的金线莲指纹图谱相似度评价

运用国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱

相似度评价系统 2004A 版”, 将 10 批不同产地金线莲的 HPLC 图谱数据导入, 产生对照图谱, 经多点校正及色谱峰匹配, 得出 10 批金线莲的相似度, 见表 3。由相似度结果可知, 以上样品与对照谱相比较, 其相似度均达到 0.9 以上, 表明药材质量稳定, 差异较小。

表 3 不同批次金线莲药材样品相似度

Table 3 Similarity of different batches of *Anoetochili Roxburghii Gemma Terminalis*

样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照图谱
S1	1.000	0.913	0.883	0.888	0.906	0.893	0.891	0.904	0.911	0.884	0.946
S2	0.913	1.000	0.904	0.901	0.902	0.915	0.892	0.882	0.885	0.904	0.930
S3	0.883	0.904	1.000	0.889	0.904	0.928	0.941	0.922	0.910	0.901	0.938
S4	0.888	0.901	0.889	1.000	0.907	0.892	0.906	0.883	0.898	0.906	0.908
S5	0.906	0.902	0.904	0.907	1.000	0.907	0.894	0.900	0.904	0.913	0.909
S6	0.893	0.915	0.928	0.892	0.907	1.000	0.899	0.907	0.906	0.928	0.911
S7	0.891	0.892	0.941	0.906	0.894	0.899	1.000	0.954	0.899	0.917	0.960
S8	0.904	0.882	0.922	0.883	0.900	0.907	0.954	1.000	0.940	0.911	0.944
S9	0.911	0.885	0.910	0.898	0.904	0.906	0.899	0.940	1.000	0.921	0.931
S10	0.884	0.904	0.901	0.906	0.913	0.928	0.917	0.911	0.921	1.000	0.914
对照图谱	0.946	0.930	0.938	0.908	0.909	0.911	0.960	0.944	0.931	0.914	1.000

2.8 指纹图谱对伪品银线莲的鉴别

取银线莲药材粉末,按照“2.2”下项方法制备 6 份供试品溶液,“2.3”项色谱条件进行分析,所得的指纹图谱与金线莲对照指纹图谱比较并计算相似度,相似度为 0.516,色谱图见图 3。从结果来看,本实验建立的金线莲指纹图谱能够将金线莲与其伪品很好地区分开来。

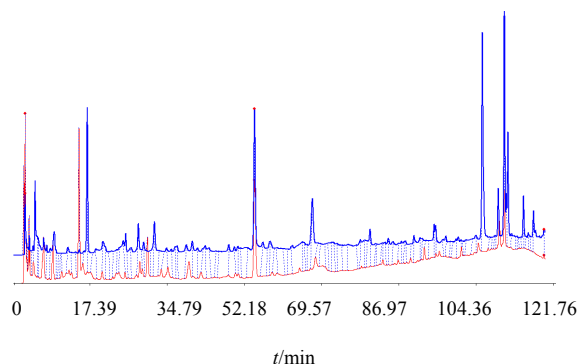


图 3 金线莲与银线莲的 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC of *Goodyera matsumurana* and *Anoetochili Roxburghii Gemma Terminalis*

3 讨论

3.1 提取条件的优化

分别比较甲醇、80%甲醇、60%甲醇、40%甲醇、20%甲醇、水、60%乙醇、石油醚、醋酸乙酯作为提取溶剂,超声提取、加热回流提取、超声-微波协同作为提取方法,30、45、60、90 min 作为提取时间的各种提取条件,经过 HPLC 检测,考察了色谱峰数、峰面积、分离度、基线等因素,最终选择以 60%乙醇为提取溶剂,30 min 为提取时间,超声法进行提取为最佳。

3.2 波长的选择

将同一份供试品溶液在 210、230、260、280、310、345 nm 不同波长下扫描,比较各波长下的色谱图,结果显示从各色谱图的出峰个数来看,310 nm 和 345 nm 处所得峰较少,从峰的响应程度及各阶段出峰情况来看,210、230 nm 处总体峰分离效果较差,260、280 nm 处各时间段峰分布较均匀,但是大多数成分在波长 260 nm 处有较大吸收,整体图谱较为匀称,主要色谱峰分离较好,且基线平稳,经综合比较,选择 260 nm 作为检测波长。

3.3 流动相的考察

由于药材所含成分复杂且极性范围跨度较大,必须确定一个有效的色谱分离方法,等度洗脱无法把不同极性组分同时分离,故采用梯度洗脱方式。比较乙腈-水、甲醇-水、甲醇-0.1%甲酸水溶液、甲醇-0.1%乙酸水溶液、甲醇-0.02 mol/L 乙酸铵缓冲盐水溶液时,发现以甲醇水溶液为流动相得到的总体图谱提供的信息量多,出峰数量多,响应值高,基线平稳,而且各色谱峰的分离度良好,故最终确定流动相为甲醇-水溶液。

金线莲中含有多种化学成分,简单的测定一个或几个有效成分的量为主的传统的质量分析方法不能全面地反映药材的质量,因此建立全面、系统而又特征地反映其化学成分的指纹图谱,可以为其质量评价和控制提供一个有效的参考方法。银线莲为金线莲中常混入的伪品,在外观性状上与金线莲十分相似,较难区分。采用指纹图谱进行研究发现,两者指纹图谱有明显的区别,故可利用指纹图谱对金线莲与银线莲进行鉴别。

参考文献

- [1] Shih C C, Wu Y W, Lin W C, *et al.* Aqueous extract of *Anoectochilus formosanus* attenuate hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats [J]. *Phytomedicine*, 2005, 12(6): 453-460.
- [2] Chang C J, Wu S M, Yang P W, *et al.* High-pressure carbon dioxide and co-solvent extractions of crude oils from plant materials [J]. *Innov Food Sci Emer Tech*, 2000, 3(1): 187-191.
- [3] Zhang Y H, Cai J Y, Ruan H L, *et al.* Antihyperglycemic activity of kinsenoside, a high yielding constituent from *Anoectochilus roxburghii* in streptozotocin diabetic rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2007, 114(2): 141-145.
- [4] Roja R, Shekoufeh N, Bagher L, *et al.* A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications [J]. *Biom Pharm*, 2005, 59(7): 365-373.
- [5] Tseng C C, Shang H F, Wang L F, *et al.* Antitumor and immunostimulating effects of *Anoectochilus formosanus* Hayata [J]. *Phytomedicine*, 2006, 13(5): 366-370.
- [6] Du X M, Sun N Y, Nobuto I, *et al.* Glycosidic Constituents from *in vitro* *Anectochilus formosanus* Hayata [J]. *Chem Pharm Bull*, 2000, 48(11): 1803-1087.
- [7] 黄颖桢, 陈菁瑛, 赵云青, 等. 金线莲遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2014, 45(15): 2230-2234.
- [8] 刘知远, 沈廷明, 吴仲玉. RP-HPLC 法同时测定福建产金线莲中槲皮素、山柰素、异鼠李素的量 [J]. 中草药, 2015, 46(3): 432-434.
- [9] 苗琦, 罗光明, 罗扬婧, 等. 梔子多波长 HPLC 指纹图谱及化学模式识别研究 [J]. 中草药, 2014, 45(21): 3159-3164.
- [10] 罗文, 王伟, 石任兵, 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.
- [11] 徐今宁, 龙卿, 秦秀丽. 中药指纹图谱技术的研究现状及应用 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(11): 2311-2313.
- [12] 马丽娜, 张岩, 陶遵威. 色谱分析技术在中药指纹图谱研究中的应用 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(1): 58-62.
- [13] 刘俊栋, 刘海霞, 李建基, 等. 中药板蓝根抗菌、抗病毒及对免疫系统作用的研究 [J]. 中兽医医药杂志, 2005, 20(2): 22-23.
- [14] 闫峻, 刘舒, 皮子凤, 等. 复方板蓝根颗粒抗病毒成分 HPLC-UV 指纹图 LC-ESI-MSⁿ 研究 [J]. 化学学报, 2011, 69(2): 204-208.
- [15] 李华雨, 刘宏民, 卜闪闪, 等. HPLC / ESI-Q-TOF MS 鉴定淋巴瘤患者尿液中的修饰核苷 [J]. 高等学校化学学报, 2009, 30(4): 661-669.