

过路黄和广金钱草的 HPLC 指纹图谱比较研究

王俊文¹, 熊颖^{1#}, 陈晓虎², 赵德³, 邓君^{1*}

1. 西南大学, 重庆 400715

2. 重庆市食品药品检验所, 重庆 401121

3. 重庆桑禾动物药业有限公司, 重庆 401122

摘要: 目的 比较过路黄 *Lysimachia christinae* 和广金钱草 *Desmodium styracifolium* 的化学成分异同, 为阐明二者药效异同提供参考。方法 采用 RP-HPLC 建立过路黄和广金钱草的 HPLC-UV 指纹图谱和 HPLC-ELSD 指纹图谱, 比较二者 2 种指纹图谱的差异。结果 过路黄的 HPLC-UV 指纹图谱和其 HPLC-ELSD 指纹图谱的差异很大, UV 检测到的强峰并非 ELSD 检测到的强峰, 广金钱草亦然; 过路黄的 HPLC-UV 指纹图谱有 14 个共有峰, HPLC-ELSD 指纹图谱有 5 个共有峰; 而广金钱草的 HPLC-UV 指纹图谱有 28 个共有峰, HPLC-ELSD 指纹图谱有 18 个共有峰; 13 批过路黄的指纹图谱相似度较 13 批广金钱草的相似度差; 过路黄和广金钱草的 HPLC-UV 指纹图谱有 4 个共有峰, 二者的 HPLC-ELSD 指纹图谱有 2 个共有峰。结论 HPLC-ELSD 指纹图谱能更好地反映过路黄和广金钱草中量较高的非挥发性成分组成的全貌; 市售过路黄的质量差异大, 而市售广金钱草的质量稳定; 过路黄和广金钱草可能含有 2 种量较高的相同成分, 作为二者治疗相同病症的物质基础, 但该 2 种药材应该各具偏性, 各有独特的治疗功用, 应明确区分。

关键词: 过路黄; 广金钱草; 指纹图谱; HPLC-UV; HPLC-ELSD

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)05-0827-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.05.024

Comparison on HPLC fingerprints of *Lysimachia christinae* and *Desmodium styracifolium*

WANG Jun-wen¹, XIONG Ying¹, CHEN Xiao-hu², ZHAO De³, DENG Jun¹

1. Southwest University, Chongqing 400715, China

2. Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing 401121, China

3. Chongqing Honoroad Animal Health Co., Ltd., Chongqing 401122, China

Abstract: Objective The differences in the compounds between *Lysimachia christinae* and *Desmodium styracifolium* were compared in order to provide the references for pharmacodynamic differences of them. **Methods** The RP-HPLC-UV and RP-HPLC-ELSD fingerprints of *L. christinae* and *D. styracifolium* were established, and the common peaks of two kinds of fingerprints were compared. **Results** The HPLC-UV fingerprints of *L. christinae* were obviously different from the HPLC-ELSD fingerprints, and the strong peaks detected in UV were not the same as what detected in ELSD, so were those of *D. styracifolium*. There were 14 and 5 common peaks, respectively in the HPLC-UV and HPLC-ELSD fingerprints of *L. christinae*, while 28 and 18 common peaks, respectively in the HPLC-UV and HPLC-ELSD fingerprints of *D. styracifolium*. The similarities of chromatograms of *D. styracifolium* were better than those of *L. christinae*. Four common peaks were identified in the HPLC-UV fingerprints of *L. christinae* and *D. styracifolium*, and two common peaks in their HPLC-ELSD fingerprints. **Conclusion** It is better using HPLC-ESLD to establish the fingerprints of *L. christinae* and *D. styracifolium*. The chemical constituents of *L. christinae* were significantly different between the different batches. However, little variation was found in the chromatograms between the different batches of *D. styracifolium*. The two plants may contain two same compounds with high content, which may have the function as the substantial bases of their treatments for the same indication. However, they may have their special efficacies.

Key words: *Lysimachia christinae* Hance.; *Desmodium styracifolium* (Osbeck) Merr.; fingerprint; HPLC-UV; HPLC-ELSD

收稿日期: 2015-07-26

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划项目 (201410635062)

作者简介: 王俊文, 本科生。E-mail: junwen@swu.edu.cn

熊颖, 本科生。E-mail: xiong603@swu.edu.cn

*通信作者 邓君, 副教授。Tel: 18623347156 E-mail: dengjqc@163.com

#并列第一作者

金钱草 *Lysimachiae Herba* 是中医治疗结石症最常用的中药。金钱草存在严重的同名异物现象,在全国范围内,至少有 7 个科 14 种植物在不同地方被用作金钱草^[1],其中应用最为广泛的是报春花科 (Primulaceae) 珍珠菜属 *Lysimachia* L. 植物过路黄 *Lysimachia christinae* Hance. 的全草和豆科 (Leguminosae sp.) 山蚂蝗属 *Desmodium* Desv. 植物广金钱草 *Desmodium styracifolium* (Osbeck) Merr. 的地上部分。尽管《中国药典》自 1977 年版就已确定正品金钱草的基原植物是过路黄,但目前国内很多中药店仍将广金钱草作为金钱草销售。

过路黄和广金钱草都具有利湿退黄、利尿通淋等作用,都被用于治疗热淋、砂淋、小便涩痛、黄疸尿赤、尿路结石、肝胆结石等^[2]。在临床治疗结石症上,过路黄和广金钱草常相互替代。但也有医家认为,过路黄偏向于肝胆疾病而广金钱草偏向于泌尿系统疾病^[3]。要判断过路黄和广金钱草的药用价值的异同,比较二者的化学成分就很有必要,尤其在二者的作用机制尚不明确的情况下。

曹进等^[4]已比较过路黄和广金钱草的 HPLC 指纹图谱,但它们的图谱是采用 340 nm 波长检测的,检测到的成分多为黄酮类和酚酸类。文献报道过路黄和广金钱草都含有丰富的三萜类成分^[5-10],该类成分在近紫外区没有明显吸收。为更全面地比较过路黄和广金钱草的化学组成,本实验采用紫外 (UV) 和蒸发光散射 (ELSD) 2 种检测器,在相同色谱条件下分别建立过路黄和广金钱草的 RP-HPLC 指纹图谱,并对二者的相应指纹图谱进行比较。

1 材料

1.1 仪器

岛津 LC-20AD 型液相色谱仪,包括自动进样器、LC-20AD 输液泵、SPD-20A 检测器、岛津 LCsolution 色谱工作站,日本岛津公司;TXB-622L 电子天平、AUW220D 电子天平,岛津仪器有限公司;KQ5200E 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;SHB-IIIS 循环水式真空泵,郑州长城科工贸有限公司;Heidolph Laborota 4001 Efficient 旋转蒸发仪,北京莱比信科技发展有限公司。

1.2 试剂

甲醇、乙腈为色谱纯,美国 Tedia 公司;冰醋酸为分析纯,成都市科龙化工试剂厂;水为超纯水;黄芪苷对照品 (批号 141022,质量分数 ≥ 98%) 购自南京狄尔格医药科技有限公司。

1.3 药材

过路黄 *Lysimachia christinae* Hance. 和广金钱草 *Desmodium styracifolium* (Osbeck) Merr. 样品各 13 批,均经西南大学药学院邓君博士鉴定,分别为过路黄的干燥全草和广金钱草的地上部分。来源见表 1。

表 1 样品编号及来源

Table 1 Numbers and sources of samples

品种	编号	产地	品种	编号	产地
过路黄	J1	重庆北碚	广金钱草	G1	湖北随州
过路黄	J2	重庆云阳	广金钱草	G2	广东茂名
过路黄	J3	四川宜宾	广金钱草	G3	广东清远
过路黄	J4	四川巴中	广金钱草	G4	广东湛江
过路黄	J5	四川资阳	广金钱草	G5	湖北武汉
过路黄	J6	四川南充	广金钱草	G6	广东江门
过路黄	J7	四川自贡	广金钱草	G7	广东揭阳
过路黄	J8	四川泸州	广金钱草	G8	广东广州
过路黄	J9	贵州贵阳	广金钱草	G9	广西南宁
过路黄	J10	云南昆明	广金钱草	G10	广东云浮
过路黄	J11	江西南昌	广金钱草	G11	广西贺州
过路黄	J12	四川成都	广金钱草	G12	广西桂林
过路黄	J13	江西九江	广金钱草	G13	广西玉林

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Inertsil ODS-3 C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 3 μm); 流动相为 0.5% 乙酸乙腈溶液 (A) - 0.5% 乙酸水溶液 (B), 梯度洗脱程序: 0~5 min, 5% A; 5~25 min, 5%~15% A; 25~45 min, 15%~18% A; 45~65 min, 18%~25% A; 65~95 min, 25%~100% A; 95~105 min, 100% A; 105~105.5 min, 100%~5% A; 105.5~120 min, 5% A。体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 °C, 进样量 20 μL。UV 检测波长 255 nm; ELSD 检测条件: 漂移管温度 60 °C, 雾化气体 (空气) 压力 275.8 kPa (40 psi)。

2.2 溶液制备

2.2.1 内标溶液的制备 取黄芪苷对照品适量,用甲醇配制成约 100 μg/mL 的溶液,贮于棕色瓶中 4 °C 保存,备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 取过路黄或广金钱草干燥药材适量,粉碎,精密称定粉末 5.0 g,置于 100 mL 锥形瓶内,加入甲醇 50 mL,称质量。超声提取 30 min,冷至室温,用甲醇补至原质量,摇匀,滤过。弃初滤液,取续滤液 15 mL,精密加入内标溶液 1 mL,减压浓缩至干。残留物用 1 mL 甲醇溶解,0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 按“2.2.2”项下方法制备过路黄供试品溶液,用“2.1”项下色谱条件分析,连续进样 6 次,考察各色谱峰相对于内标峰的相对保留时间和相对峰面积的一致性。各主要色谱峰相对保留时间的 RSD 为 0.04%~1.36%,相对峰面积的 RSD 为 2.46%~4.32%。同法考察该色谱条件分析广金钱草供试品溶液的精密性,相对保留时间的 RSD 为 0.03%~1.27%,相对峰面积的 RSD 为 2.16%~3.62%,表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验 取同一批次过路黄(J1)样品,按“2.2.2”项下方法平行制备供试品溶液 6 份,用“2.1”项下色谱条件分析,考察各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的一致性。各主要色谱峰的相对保留时间的 RSD 为 0.06%~1.82%,相对峰面积的 RSD 为 3.18%~4.65%。同法考察该条件分析广金钱草的重复性,各色谱峰相对保留时间的 RSD 为

0.04%~1.28%,相对峰面积的 RSD 为 2.74%~3.68%,表明该分析方法重复性较好。

2.3.3 稳定性试验 按“2.2.2”项下方法制备过路黄(J1)供试品溶液,用“2.1”项下色谱条件分析,分别在制样后 0、4、8、12、24、36、48 h 进样,考察各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的一致性。各主要色谱峰相对保留时间的 RSD 为 0.06%~0.24%,相对峰面积的 RSD 为 1.52%~4.83%。同法考察广金钱草供试品溶液的稳定性,相对保留时间的 RSD 为 0.05%~0.22%,相对峰面积的 RSD 为 1.35%~4.39%,表明过路黄和广金钱草供试品溶液在常温下 48 h 内均较稳定。

2.4 样品测定

取表 1 中样品,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,记录色谱图,结果见图 1~2。

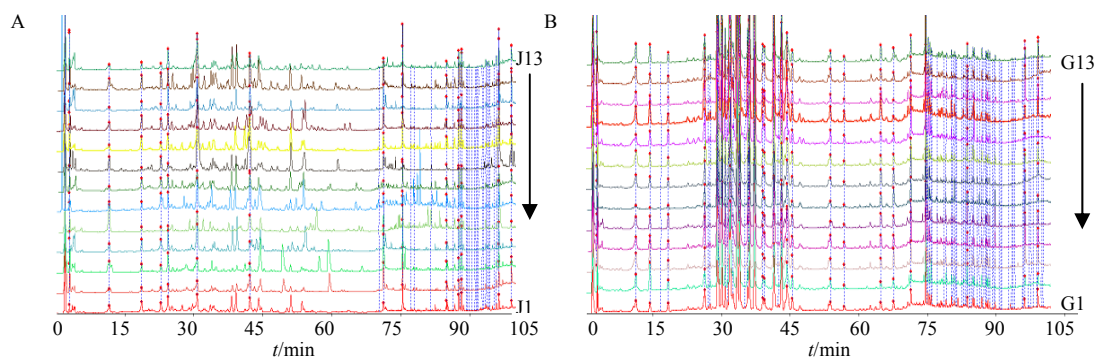


图 1 过路黄 (A) 和广金钱草 (B) 的 HPLC-UV 图谱

Fig. 1 HPLC-UV fingerprints of *L. christinae* (A) and *D. styracifolium* (B)

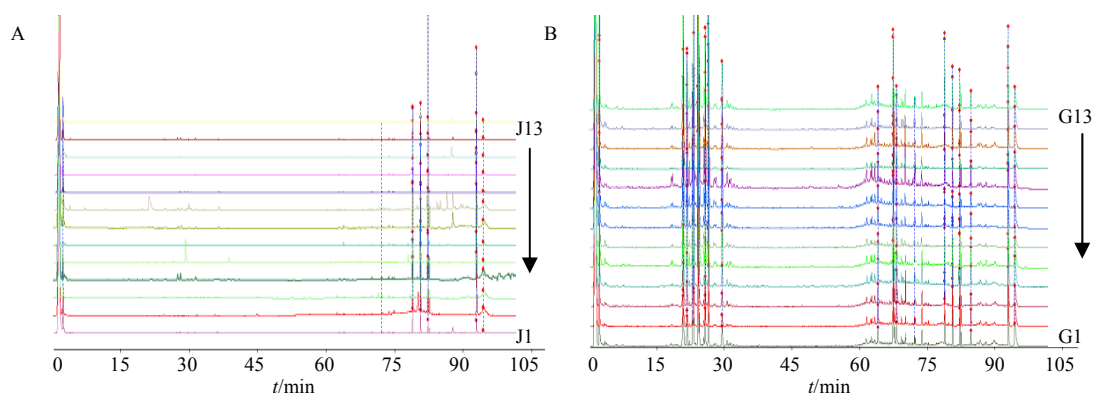


图 2 过路黄 (A) 和广金钱草 (B) 的 HPLC-ELSD 图谱

Fig. 2 HPLC-ELSD fingerprints of *L. christinae* (A) and *D. styracifolium* (B)

2.5 对照指纹图谱的建立及共有峰的标定

将“2.4”项下测定的指纹图谱采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”进行分析,生

成 13 批过路黄的 HPLC-UV 对照指纹图谱,并对共有峰进行标定。同法生成 13 批广金钱草的 HPLC-ELSD 对照指纹图谱,并对共有峰进行标定。

结果见图 3、4。

2.6 内标物的选择

对过路黄和广金钱草的化学成分研究结果显示, 它们都含有黄芪苷、新西兰牡荆苷、大豆皂苷^[6,9,11-13], 故本实验拟选其中之一作为内标物。采用加样法确认该 3 个化合物在过路黄和广金钱草的 HPLC 图谱中的位置, 结果显示, 13 批过路黄样品的共有峰中没有黄芪苷和大豆皂苷 I, 而在广金钱草中都没有检测到这 2 个成分; 广金钱草的 HPLC-UV 对照图谱中, 第 17 号峰是新西兰牡荆苷, 但其 HPLC-ELSD 图谱中却没检测到该成分, 而在过路黄中都没有检测到新西兰牡荆苷。比较 3 个对照品的保留时间以及加样样品中该 3 个化合物的峰与相邻峰的分度, 黄芪苷的保留时间为 58.71 min, 峰位居中, 且与相邻峰基本无干扰, 故本实验选择黄芪苷为内标物, 定量添加至样品溶液中。

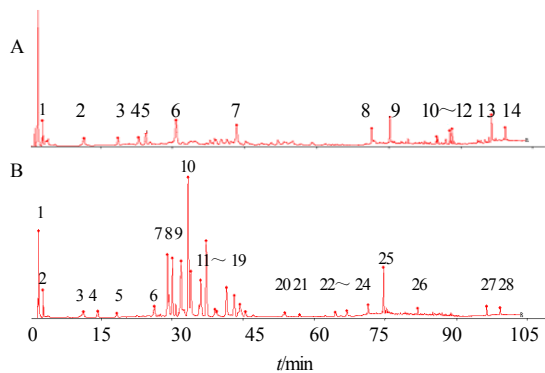


图 3 过路黄 (A) 和广金钱草 (B) HPLC-UV 对照图谱
Fig. 3 HPLC-UV fingerprints of *L. christinae* (A) and *D. styracifolium* (B)

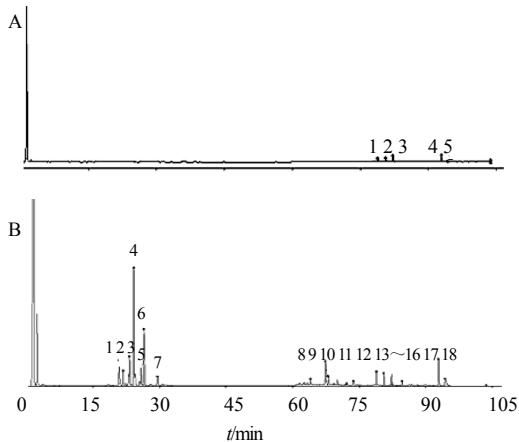


图 4 过路黄 (A) 和广金钱草 (B) HPLC-ELSD 对照图谱
Fig. 4 HPLC-ELSD fingerprints of *L. christinae* (A) and *D. styracifolium* (B)

2.7 相似度评价

以“2.5”项下生成的对照指纹图谱为参照, 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”计算 13 批药材指纹图谱的相似度, 结果见表 2。

表 2 13 批药材的指纹图谱相似度分析结果

Table 2 Similarity analysis of fingerprints of 13 batches of CMM

编号	相似度		编号	相似度	
	HPLC-UV	HPLC-ELSD		HPLC-ELSD	HPLC-UV
J1	0.834	0.999	G1	0.998	0.986
J2	0.830	0.996	G2	0.999	0.972
J3	0.711	0.997	G3	0.999	0.979
J4	0.852	0.998	G4	0.999	0.994
J5	0.710	0.998	G5	1.000	0.979
J6	0.519	0.999	G6	0.997	0.986
J7	0.774	0.996	G7	1.000	0.994
J8	0.802	0.969	G8	0.997	0.993
J9	0.771	0.997	G9	0.990	0.992
J10	0.740	0.999	G10	0.999	0.993
J11	0.786	0.987	G11	0.999	0.991
J12	0.809	0.999	G12	0.999	0.995
J13	0.873	0.996	G13	0.999	0.989

3 讨论

3.1 色谱条件的考察

实验中考察了甲醇-水、甲醇-0.1%磷酸水溶液、甲醇-0.5%乙酸水溶液、0.5%乙酸乙腈-0.5%乙酸水溶液等多种流动相系统, 结果表明, 以 0.5%乙酸乙腈溶液-0.5%乙酸水溶液进行梯度洗脱, 色谱峰的数目较多且各色谱峰分离度较好, 因此选择 0.5%乙酸乙腈溶液-0.5%乙酸水溶液作为流动相。将供试品溶液进行紫外全波长扫描, 在 255、360 nm 有最大吸收。实验结果证明在 255 nm 进行检测时, 基线平稳, 各色谱峰吸收较强, 因此选择 255 nm 作为过路黄和广金钱草 HPLC-UV 指纹图谱的检测波长。

3.2 过路黄和广金钱草的指纹图谱的色谱峰分析

13 批过路黄的 HPLC-UV 指纹图谱中, 色谱峰大致分散在整个洗脱时间段内; 而 HPLC-ELSD 指纹图谱中, 75 min 前色谱峰很少 (图 1、2), 且在该保留时间段内没有共有峰 (图 4)。表明过路黄的甲醇提取物中, 高极性和中等极性的成分量很低。而 13 批广金钱草的 HPLC-UV 指纹图谱和 HPLC-ELSD 指纹图谱中, 色谱峰均分散在整个洗脱时间段内 (图 1、2), 且广金钱草的 HPLC-ELSD 指纹图谱中, 20~35 min 时间段内洗脱的组分量较多 (图 2), 表明广金钱草的甲醇提取物中, 中等极性的成分量较高。

在进样等量药材的提取物时, 过路黄的 HPLC-UV 色谱峰普遍低于广金钱草, 尤其是 30~40 min 内的洗脱组分(图 1), 提示过路黄所含对 255 nm 光波有较强吸收的化合物少于广金钱草, 如黄酮类及酚酸类, 该结果与 Sun 等^[14]的研究结果一致。

过路黄的 HPLC-UV 对照图谱和 HPLC-ELSD 对照图谱中, 共有峰并不相对应(图 3、4); 对于广金钱草, 只有 HPLC-UV 对照图谱的 15 号峰和 HPLC-ELSD 对照图谱的 8 号峰相对应(图 3、4)。可见, 用 UV 检测到的强峰, 所对应的成分(黄酮和酚酸类)量并不高; 而量高的成分几乎都没有强的紫外吸收。因此, 仅用 HPLC-UV 建立过路黄和广金钱草的指纹图谱, 并不能真实反映它们的化学组成, 而用 ELSD 检测能反映药材中量较高的非挥发性成分的全貌。

3.3 过路黄和广金钱草的指纹图谱比较

以黄芪苷为内标, 计算各色谱峰的相对保留时间, 初步确定: 过路黄的 HPLC-UV 对照图谱中的 6、7、13、14 号峰分别与广金钱草的 HPLC-UV 对照图谱中的 7、14、27、28 号峰相对应; 过路黄的 HPLC-ELSD 对照图谱中的 1、5 号峰分别与广金钱草的 HPLC-ELSD 对照图谱中的 13、17 号峰相对应。ELSD 检测到的 2 个量较高的共有成分, 可能是该 2 种药材相同疗效的物质基础。

3.4 不同批次过路黄和广金钱草分析

13 批过路黄药材的 HPLC-UV 指纹图谱的相似度在 0.519~0.873, 整体相似度较低, 提示不同产地过路黄药材的化学组成差异较大; 而 13 批广金钱草药材的 HPLC-UV 指纹图谱的相似度均高于 0.97, 且有 28 个共有峰, 远多于过路黄的 HPLC-UV 指纹图谱的共有峰(14 个), 表明不同产地广金钱草的质量稳定。尽管过路黄的 HPLC-ELSD 指纹图谱的相似度几乎均高于 0.97, 但过路黄的 HPLC-ELSD 指纹图谱只有 5 个共有峰, 不能说明过路黄的质量稳定; 而广金钱草的 HPLC-ELSD 指纹图谱有 18 个共有峰, 且相似度在 0.99~1.00, 再次证明不同产地广金钱草的质量稳定。

Sun 等^[14]的研究结果也表明, 不同批次广金钱草的黄酮类和酚酸类成分组成相似, 而过路黄的该类成分组成差异很大。过路黄化学组成不稳定正好

能解释过路黄的临床疗效不稳定的现象, 这也提示了对过路黄实施 GAP 生产和规范加工、贮藏方法的必要性和迫切性, 以及建立更科学的金钱草质量控制方法的迫切性。本研究表明过路黄和广金钱草的组分中, 相同者很少, 绝大多数不同, 提示它们的临床功用应有所不同, 即使对于同种疾病有效, 作用机制也可能不同, 应明确区分二者。

参考文献

- [1] 蒋苏国, 陈爱萍. 金钱草的原植物考察 [J]. 中草药, 2004, 35(7): 828-829.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编 (上册) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1975.
- [4] 曹进, 叶兆波, 车镇涛. 广金钱草与金钱草指纹图谱比较 [J]. 药物分析杂志, 2006, 26(9): 1248-1250.
- [5] 王植柔, 白先忠, 刘锋, 等. 广金钱草化学成分的研究 [J]. 广西医科大学学报, 1998, 15(3): 10-14.
- [6] 怡悦. 金钱草中的三萜糖苷 [J]. 国际中医中药杂志, 2006, 28(6): 353.
- [7] Tian L J, Yang N Y, Chen W Q. Triterpene saponins from *Lysimachia christinae* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2008, 10(3): 265-269.
- [8] 杨峻山, 苏亚伦, 王玉兰. 广金钱草化学成分的研究 [J]. 药学学报, 1993, 28(3): 197-201.
- [9] Kubo T, Hamada S, Nohara T, et al. Study on the constituents of *Desmodium styracifolium* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1989, 37(8): 2229-2231.
- [10] 杨全, 程轩轩, 郭楚楚, 等. 广金钱草种子的化学成分和 DPPH 自由基清除活性研究 [J]. 中草药, 2015, 46(17): 2517-2521.
- [11] 杨念云, 段金璇, 李萍, 等. 金钱草中黄酮类化合物的分离与结构鉴定 [J]. 中国药理学杂志, 2006, 41(21): 1621-1624.
- [12] Minh G P, Tong S P, Katsuyoshi M, et al. Flavonoid compounds from *Desmodium styracifolium* of Vietnamese origin [J]. *Chem Nat Compd*, 2010, 46(5): 797-798.
- [13] 苏亚伦, 王玉兰. 广金钱草黄酮类化学成分的研究 [J]. 中草药, 1993, 24(7): 343-344.
- [14] Sun D X, Dong L H, Guo P P, et al. Simultaneous detection of flavonoids and phenolic acids in *Herba Lysimachiae* and *Herba Desmodii Styracifolii* using liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2013, 138(1): 139-147.