

马鞭草 HPLC-CAD 指纹图谱及主要成分的测定

陈学松

广西壮族自治区梧州食品药品检验所, 广西 梧州 543002

摘要: 目的 建立马鞭草 *Verbena officinalis* 的指纹图谱及同时测定马鞭草中同分异构体齐墩果酸和熊果酸的方法。方法 分析柱为 ThermoFisher Acclaim™ C₃₀ (150 mm×2.1 mm, 3 μm) 色谱柱; 流动相为乙腈-0.2%醋酸水溶液, 梯度洗脱; 体积流量为 0.3 mL/min; 进样量为 5 μL; 柱温 20 ℃; 电雾式检测器检测, 雾化器温度为 40 ℃。结果 5 批不同产地的马鞭草指纹图谱有 17 个共有峰, 共有峰相对保留时间 RSD 值小于 0.35%, 相对峰面积 RSD 值在 3.3%~4.40%。5 批马鞭草药材中齐墩果酸的量在 0.097%~0.136%, 熊果酸的量在 0.257%~0.478%, 总量在 0.354%~0.478%。结论 首次用高效液相色谱-电雾式检测 (HPLC-CAD) 方法建立了马鞭草的指纹图谱并同时测定了马鞭草药材中的齐墩果酸和熊果酸的量。该方法简便快捷、重复性好, 可用于马鞭草的质量控制。

关键词: 马鞭草; 指纹图谱; 高效液相色谱-电雾式检测器; 齐墩果酸; 熊果酸

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)10-2007-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.10.013

Chromatographic fingerprint and multi-components quantitative analysis of *Verbena officinalis* by HPLC-CAD

CHEN Xue-song

Wuzhou Institute for Food and Drug Control, Wuzhou 543002, China

Abstract: Objective To establish a high performance liquid chromatography-charged aerosol detector (HPLC-CAD) method in order to obtain fingerprint profile and achieve the amount of isomer, oleanolic acid, and ursolic acid from *Verbena officinalis*.

Methods The method was developed by a C₃₀ (150 mm × 2.1 mm, 3 μm) column and a linear gradient elution. Acenitrile-0.2% acetic acid was used as mobile phase. The flow rate was 0.3 mL/min; The injection volume was 10 μL and the column temperature was maintained at 20 ℃. Detector was Corona Ultra CAD with 40 ℃ of nebulization temperature. **Results** Seventeen common peaks were observed from the fingerprint profiles of five different area samples. The relative standard divisions (RSDs) of retention time were less than 0.35%. The relative peak areas of the common peaks were in the range of 3.3%—44.0%. The contents of oleanolic acid were ranging from 0.097% to 0.136%, the contents of ursolic acid were ranging from 0.257% to 0.478%, the total contents were ranging from 0.354% to 0.478%. **Conclusion** The fingerprint and simultaneous determination of oleanolic acid and ursolic acid in *V. officinalis* is firstly studied by HPLC-CAD. This method is simple and with good repeatability, which can be used for the quality control of *V. officinalis*.

Key words: *Verbena officinalis* L.; fingerprint; HPLC-CAD; oleanolic acid; ursolic acid

马鞭草为马鞭草科植物马鞭草 *Verbena officinalis* L. 的干燥地上部分。其性凉、味苦、无毒, 具有活血散瘀、解毒、利水、退黄、截疟的功效^[1]。齐墩果酸和熊果酸是马鞭草的主要有效成分, 也是评价马鞭草质量的重要指标, 《中国药典》2015 年版对马鞭草中齐墩果酸和熊果酸的总量进行了规定。此外, 有文献报道^[2-4]马鞭草苷、戟叶马鞭草苷、

毛蕊花糖苷、马鞭草苷等为马鞭草活性成分。指纹图谱具有系统性、特征性和重现性的特点, 能较全面地反映中药的品质, 现已成为控制中药质量的有效途径之一^[5]。曾有研究^[6-7]以紫外检测器 (UV) 为检测手段, 采集马鞭草药材的指纹图谱, 并结合相似度分析, 用于 12 批马鞭草药材的评价。紫外检测器有灵敏度高、稳定性好、可兼容多种模式的色

收稿日期: 2016-12-25

作者简介: 陈学松 (1973—), 男, 本科, 研究方向为食品、药品质量控制与监管。E-mail: 85371400@qq.com

谱分离等优点,但只适用于具有紫外特征吸收基团化合物的分析,无法检测弱紫外吸收和无紫外吸收化合物。齐墩果酸和熊果酸在紫外区只有末端吸收,响应值较低且存在背景干扰,不易采用紫外检测器进行定量分析^[8]。通用型检测器不仅可以为强紫外吸收化合物提供较好的响应,还可以为弱紫外吸收和无紫外吸收化合物提供良好的响应。因此,采用蒸发光散射(ELSD)、示差折光检测器(RID)等通用型检测器得到指纹图谱被越来越多地用于中药材的评价中^[9-11]。电雾式检测器(CAD)是近年来发展起来的一种新型通用型检测器,与RID相比,CAD具有可兼容梯度洗脱、对环境温度的变化不敏感、灵敏度高和重复性好等优点,与ELSD相比,CAD具有线性范围宽、灵敏度高、重复性好和具有结构响应一致性等优点^[12-13]。

本实验以CAD为检测器,建立了一种HPLC-CAD分离检测方法,用于马鞭草的指纹图谱分析和弱紫外吸收活性成分(齐墩果酸和熊果酸)的定量分析,考察了该方法用于齐墩果酸和熊果酸定量分析的线性和重复性。并将建立的方法用于5批马鞭草中这2种活性成分的测定和马鞭草的指纹图谱分析,从而实现马鞭草的系统性质量控制研究,以期马鞭草药材的质量控制与品质评价提供一种新的方法。

1 仪器与试药

1.1 仪器

ThermoFisher Scientific Ultimate 3000 高效液相色谱仪,配置电雾式检测器 Corona Ultra、二元泵、自动进样器、柱温箱和二极阵列检测器(赛默飞世尔科技公司);ASE350 快速溶剂萃取仪(赛默飞世尔科技公司);XA205DU 电子分析天平(梅特勒仪器有限公司);超纯水机(默克密理博公司);Thermo Acclaim C₃₀ 分析柱(150 mm×2.1 mm, 3 μm)购自赛默飞世尔科技公司。

1.2 试药

对照品齐墩果酸(批号 110709-201206)质量分数为 100%,熊果酸(批号 110742-201421)质量分数 93.8%,均由中国食品药品检定研究院提供;乙腈(色谱纯, Sigma 公司);超纯水自制,其他试剂均为分析纯。

5 批马鞭草药材(批号 1507103、20150801、15062801 产于广西,编号 S1~S3;批号 160205 产

于湖南,编号 S4;批号 20151009 产于贵州,编号 S5)均购于梧州或玉林药材市场,经广西梧州食品药品检验所黄衡副主任中药师鉴定为马鞭草科植物马鞭草 *Verbena officinalis* L. 的干燥地上部分。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Thermo AcclaimTM C₃₀ (150 mm×2.1 mm, 3 μm), 0.2%醋酸水溶液(A)-乙腈(B),线性洗脱梯度:0~2 min, 20%~30% B; 2~10 min, 30%~90% B; 10~15 min, 90%~95% B; 15~22.1 min, 95%~20% B。柱温 20 ℃;柱体积流量 0.3 mL/min;二极管阵列检测器(DAD)串联电雾式检测器(CAD)进行检测,CAD 雾化器温度为 40 ℃;进样量 5 μL,理论塔板数以熊果酸计算不低于 5 000,峰的分离度均符合要求,所有组分在 25 min 内检测完毕。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取齐墩果酸对照品 8.02 mg 至 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,制成质量浓度为 0.802 0 mg/mL 对照品储备液;精密称取熊果酸对照品 20.40 mg 至 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,制成质量浓度为 0.765 4 mg/mL 对照品储备液。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取样品粉末(过 3 号筛)0.25 g,与约 1 g 硅藻土混合均匀,置预先铺上纤维滤膜的 10 mL 萃取池中,加入硅藻土以填满萃取池为宜,拧紧萃取池上盖,放入快速萃取仪中进行萃取。萃取条件:使用甲醇为萃取溶剂,萃取温度 100 ℃,静态萃取时间 6 min,萃取循环次数为 1 次,冲洗体积 60%,氮气吹扫时间为 60 s。萃取结束后,把萃取液转移至 25 mL 量瓶中,用少量甲醇清洗萃取瓶 3 次合并至量瓶中,使用甲醇定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 分别精密吸取上述 2 个对照品储备液各 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 mL,置于 5 个 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,即得一系列混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析。以质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,结果齐墩果酸在 8.020~160.400 μg/mL,熊果酸在 7.654~153.100 μg/mL 呈良好的线性关系, r 均大于 0.999。

2.4.2 精密度试验 取 S1 样品的供试品溶液, 连续进样 6 次, 记录色谱指纹图谱, 测得其各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 0.8%, 表明仪器精密度良好, 符合指纹图谱要求。

2.4.3 稳定性试验 取 S1 样品供试液, 在相同的色谱条件下分别在 0、2、4、8、12 和 24 h 记录色谱指纹图谱, 测得其各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 0.6%, 符合指纹图谱要求。

2.4.4 重复性试验 取 S1 样品各 6 份, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 其共有峰的相对保留时间 RSD 小于 0.5%, 相对峰面积 RSD 小于 1.0%。

2.4.5 加样回收率试验 取已测定的马鞭草样品(批号 15062801) 9 份, 每份 0.25 g, 精密称定, 分别精密加入齐墩果酸、熊果酸对照品储备液适量, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 齐墩果酸加样回收率为 96.0%~100.2%, RSD 为 0.5%~1.7%; 熊果酸加样回收率为 96.1%~102.7%, RSD 为 0.4%~1.5%。

2.5 样品测定

取 5 批供试品, 每 1 批平行制备 3 份, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行定量测定, 结果见表 1。实验结果表明 3 批产地为广西的马鞭草样品之间齐墩果酸、熊果酸的质量分数接近, 不同产地质量分数有较大差异。

表 1 不同产地马鞭草中齐墩果酸和熊果酸含量

Table 1 Contents of oleanolic acid and ursolic acid in *Verbena officinalis* from different origins

编号	齐墩果酸/%	熊果酸/%	总量/%
S1	0.105	0.259	0.364
S2	0.114	0.271	0.385
S3	0.097	0.257	0.354
S4	0.136	0.342	0.478
S5	0.121	0.307	0.428

2.6 指纹图谱的建立及相似度评价

2.6.1 指纹图谱的建立 对 5 批马鞭草药材按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 指纹图谱见图 1。从指纹图谱上共指认了 17 个共有峰, 确定其中 2 个共有峰分别为齐墩果酸(10 号峰)、熊果酸(11 号峰), 见图 2。由于熊果酸在 5 个批次的供试品中的峰面积较大, 且峰位居中, 因此选择熊果酸作为参照峰(11 号

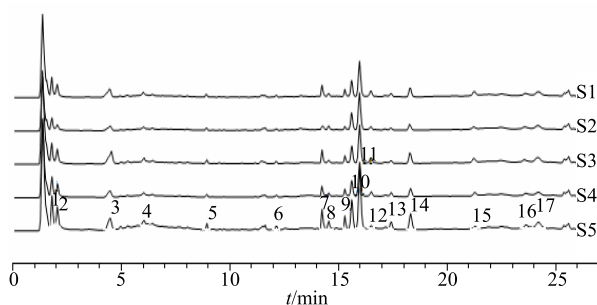


图 1 5 批马鞭草药材样品指纹图谱

Fig. 1 Fingerprint of five *Verbena officinalis* samples

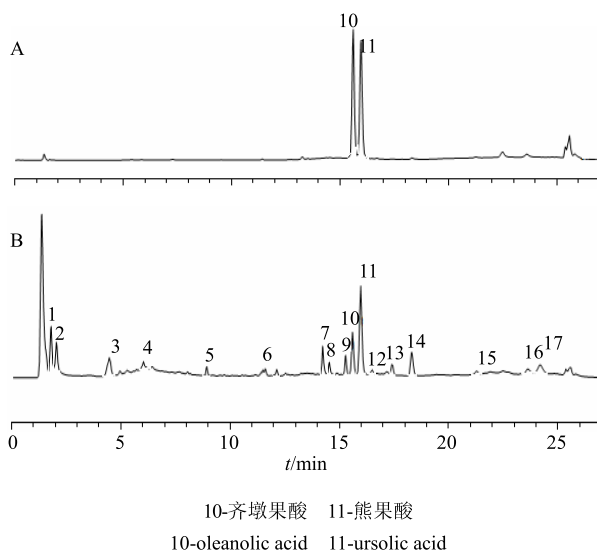


图 2 混合对照品 (A) 和样品 (S1, B) CAD 色谱图

Fig. 2 CAD of reference substances (A) and sample (S1, B)

峰)。设定熊果酸峰的保留时间和峰面积为 1, 并据此计算其他共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果见表 2 和表 3。分析结果表明, 不同样品 17 个共有峰相对保留时间的 RSD 值均小于 0.8%, 说明各共有峰的保留时间稳定, 可以确定共有峰的存在。除齐墩果酸和熊果酸其余共有峰相对峰面积的 RSD 值相差较大, 说明各共有峰的相对量差异较大, 这一现象可能与样品的差异有关。

2.6.2 相似度评价 利用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2.0 版)”计算软件, 对不同产地马鞭草指纹图谱进行相似度评价, 以 S1 号样品(批号 1507103)马鞭草药材色谱图作为参照图谱, 利用中位数法进行多点校正生成对照图谱。S1~S5 号样品相似度分别为 1.000、0.990、0.977、0.965、0.986, 与对照图谱的相似度均 ≥ 0.95 , 结果见表 4, 说明不同产地马鞭草药材质量相对稳定。

表 2 不同产地马鞭草样品指纹图谱共有峰的相对保留时间

Table 2 Relative retention time of common peak in fingerprint of *V. officinalis* samples from different origins

样品编号	相对保留时间																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
S1	0.113	0.128	0.331	0.377	0.559	0.759	0.891	0.910	0.957	0.976	1.000	1.033	1.090	1.146	1.332	1.479	1.515
S2	0.113	0.129	0.331	0.377	0.559	0.760	0.891	0.910	0.957	0.977	1.000	1.033	1.090	1.146	1.330	1.479	1.515
S3	0.112	0.128	0.331	0.378	0.559	0.760	0.891	0.910	0.957	0.977	1.000	1.033	1.090	1.145	1.329	1.475	1.514
S4	0.113	0.129	0.330	0.378	0.559	0.760	0.892	0.910	0.958	0.977	1.000	1.033	1.090	1.144	1.329	1.476	1.513
S5	0.112	0.128	0.330	0.377	0.558	0.760	0.892	0.911	0.958	0.978	1.000	1.033	1.091	1.146	1.330	1.478	1.516
平均相对保留时间	0.113	0.129	0.331	0.377	0.559	0.760	0.891	0.910	0.957	0.977	1.000	1.033	1.090	1.145	1.330	1.477	1.514
RSD/%	0.348	0.350	0.190	0.156	0.050	0.040	0.066	0.035	0.041	0.051	0.002	0.012	0.046	0.061	0.082	0.127	0.057

表 3 不同产地马鞭草样品指纹图谱共有峰的相对峰面积

Table 3 Relative areas of common peak in fingerprint of *V. officinalis* samples from different origins

样品编号	相对峰面积																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
S1	0.405	0.274	0.291	0.094	0.059	0.053	0.224	0.104	0.144	0.412	1.000	0.04	0.1	0.286	0.041	0.068	0.185
S2	0.400	0.251	0.281	0.071	0.057	0.052	0.213	0.064	0.116	0.392	1.000	0.119	0.088	0.248	0.119	0.066	0.121
S3	0.353	0.256	0.568	0.029	0.064	0.041	0.226	0.055	0.117	0.387	1.000	0.138	0.063	0.321	0.134	0.094	0.215
S4	0.238	0.091	0.202	0.045	0.046	0.038	0.095	0.077	0.051	0.391	1.000	0.079	0.045	0.167	0.071	0.091	0.188
S5	0.338	0.247	0.411	0.076	0.058	0.045	0.212	0.071	0.123	0.377	1.000	0.155	0.078	0.278	0.15	0.089	0.202
平均相对峰面积	0.347	0.224	0.351	0.063	0.057	0.046	0.194	0.074	0.110	0.392	1.000	0.106	0.075	0.260	0.103	0.082	0.182
RSD/%	19.470	33.510	40.680	40.800	11.970	14.300	28.630	25.260	31.740	3.290	0	43.660	28.760	22.330	43.970	16.360	19.730

表 4 5 批马鞭草样品 CAD 指纹图谱的相似度评价

Table 4 CAD fingerprint similarity evaluation of five batches of *V. officinalis* samples

样品编号	S1	S2	S3	S4	S5	对照指纹图谱
S1	1.000	0.990	0.997	0.965	0.986	0.995
S2	0.990	1.000	0.963	0.980	0.980	0.994
S3	0.977	0.963	1.000	0.945	0.994	0.984
S4	0.965	0.980	0.945	1.000	0.967	0.980
S5	0.986	0.980	0.994	0.967	1.000	0.995
对照指纹图谱	0.995	0.994	0.984	0.980	0.995	1.000

3 讨论

3.1 检测器的选择

熊果酸和齐墩果酸均为五环三萜类化合物,在紫外区只有末端吸收,通过比较马鞭草的 CAD 与 DAD 检测色谱图,发现 CAD 获得的色谱峰比 DAD 的多,指纹特征性更强,且基线更平稳,因此本研究选用 CAD 检测器建立马鞭草指纹图谱。

3.2 色谱条件的优化

熊果酸和齐墩果酸互为同分异构体,除 1 个甲基的取代位置略有不同外,化学结构完全相同,因此很难分离。指纹图谱由于其可全面反映药物中化学成分的种类和数量而作为重要的质量评价方法得

到广泛的应用,但其研究的侧重点在于短时间内反映大量成分的信息,因此即使指纹图谱分析时间相对较长,结构相近的同分异构体同样很难得到理想的分离效果。实验曾使用 Synchronis C₁₈、Zorbax Extend C₁₈、Kinetex XB C₁₈、Excel 2 C₁₈ 等十八烷基键合相进行分离,结果齐墩果酸和熊果酸均未能达到基线分离。使用 Acclaim C₃₀ 色谱柱后二者能实现分离,且出峰时间与分离度均达到满意效果,故采用 Thermo Acclaim C₃₀ 作为分析柱。为确保目标成分处于游离分子态有利于分离,流动相中需要加入少量酸,分别考察加入 0.1%、0.2%及 0.5%醋酸对洗脱强度的影响,结果乙腈-0.2%醋酸系统显示的

图谱峰形好、基线平稳、分离度好,因此选定该系统为马鞭草药材指纹图谱检测的流动相。实验中发现柱温对齐墩果酸和熊果酸的分离度影响较大,因此考察了不同温度下二者的分离情况,发现降低柱温对分离有利,结果表明 20 ℃ 条件下,二者能达到基线分离。

本研究采用 HPLC-CAD 建立马鞭草的指纹图谱,共标定了 17 个共有峰,确认 10 号峰为齐墩果酸、11 号峰为熊果酸,5 批马鞭草药材的相似度均在 0.95 以上,说明不同产地的马鞭草药材相似度较高。除齐墩果酸与熊果酸,其余共有峰相对峰面积的 RSD 值相差较大,说明不同产地药材所含化学成分的相对量差异较大,因此可采用指纹图谱方法,全面评价药材的质量。

志谢:赛默飞世尔科技(中国)有限公司应用工程师龙珍在本研究工作中的帮助。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 袁志芳,段坤峰,张兰桐,等. HPLC 法同时测定马鞭草中马鞭草苷和戟叶马鞭草苷 [J]. 中草药, 2009, 40(5): 818-820.
- [3] 陈改敏. HPLC 测定不同地区马鞭草中毛蕊花苷的含量 [J]. 光明中医, 2015, 30(11): 2498-2499.
- [4] 徐 剑,张永萍,杨芳芳. 马鞭草药材中马鞭草苷含量测定方法的研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(9): 2179-2180.
- [5] 刘军红,廖国玲. 中药指纹图谱的研究综述 [J]. 农业科学研究, 2009, 30(2): 32-34.
- [6] 段坤峰,袁志芳,郑旭光,等. 马鞭草 HPLC-PDA 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2009, 40(12): 1984-1988.
- [7] 刘素香,白雪,刘 毅,等. 马鞭草 HPLC 指纹图谱建立及指标性成分的测定 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2069-2073.
- [8] 盛晓静,杨 群,祝兴勇,等. HPLC-ELSD 同时测定柿叶中齐墩果酸及熊果酸含量 [J]. 中国现代中药, 2014, 16(10): 800-802.
- [9] 王 珏,金一宝,王铁杰,等. 不同产地龙葵药材的高效液相色谱-蒸发光散射检测指纹图谱 [J]. 色谱, 2015, 33(8): 809-815.
- [10] 白长财,柴兴云,王海龙,等. 利用电雾式检测器建立三七药材液相色谱指纹图谱 [J]. 中国药科大学学报, 2009, 40(1): 54-58.
- [11] 李 洁,杨玉兰,任爱农,等. 凌霄花 HPLC-ELSD 指纹图谱的研究 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(4): 632-638.
- [12] 刘立洋,刘 肖. 一种新型的通用型检测器-电喷雾检测器 [J]. 现代科学仪器, 2011(5): 141-145.
- [13] 刘 路,高 旋,杨永健. HPLC-电雾式检测器的应用 [J]. 中国医药工业杂志, 2012, 43(3): 227-231.