

杏香兔耳风高效液相色谱指纹图谱研究^①

吴正平 冷桂华^a 邹盛勤^{②a}

(宜春学院美容医学院 江西省宜春市 336000)

^a(宜春学院化学与生物工程学院 江西省天然药物活性成分研究重点实验室 江西省宜春市学府路 576 号 336000)

摘要 建立了杏香兔耳风高效液相色谱指纹图谱,为科学评价及有效控制其质量提供可靠方法。采用 Kromasil C₁₈柱(4.6mm×250mm, 5μm),以甲醇-0.5%磷酸的水溶液为流动相,梯度洗脱程序为 0min(30:70)-15min(30:70)-20min(50:50)-40min(50:50);流速 0.8mL·min⁻¹;检测波长 350nm;柱温 25℃。建立的杏香兔耳风指纹图谱中共确定了 10 个共有峰,各样品指纹图谱与对照指纹图谱相似度均在 0.9 以上,建立的 HPLC 指纹图谱具有良好的精密度、重现性和稳定性,可以作为杏香兔耳风质量评价的主要依据,也为深入研究中药杏香兔耳风的质量标准提供了实验基础。

关键词 杏香兔耳风; 高效液相色谱; 指纹图谱; 绿原酸; 芦丁

中图分类号: O657.7²

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2011)04-2031-04

1 引言

杏香兔耳风(*Ainsliaea fragrans* Champ.) 是菊科兔耳风属植物,别名白走马胎、金边兔耳草、一枝香等,自然分布于长江以南各省区,《江西省中药材标准》和《卫生部药品标准》均有收载,具有清热补虚、凉血止血、利湿解毒等功效,民间全草入药,用于治疗肺结核咳血、跌打损伤、无名肿毒、慢性宫颈炎等^[1]。主要含有倍半萜内酯、倍半萜苷、甾体、黄酮、三萜类等化学成分^[2]。药理实验证明对金黄色葡萄球菌、乙型链球菌等有抑制作用,其药用价值较高,属抗广谱菌中草药^[3]。目前杏香兔耳风的 HPLC 指纹图谱的研究未见文献报道。为了制订杏香兔耳风的质量标准,以提高药材质量的可控性及其植物资源的开发利用程度,本研究首次采用反相高效液相色谱法建立了杏香兔耳风指纹图谱的分析方法,旨在为杏香兔耳风的质量控制和合理开发利用提供科学依据。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪[515 泵, 2996 光电二极管矩阵检测器(PAD), 7725i 手动进样器, 柱温箱, Empower 中文色谱工作站, 美国 Waters 公司]; SK-2510HP 超声提取仪(上海汉克科学仪器有限公司); 指纹图谱计算机辅助相似性评价系统软件(国家药典委员会)。

杏香兔耳风药材分别采自江西宜春、上饶、九江、新余、萍乡(见表 1),经宜春市林业科学研究所徐光辉研究员鉴定为杏香兔耳风(*Ainsliaea fragrans* Champ.) 的全草; 绿原酸和芦丁对照品(中

① 江西省天然药物活性成分研究重点实验室开放基金资助项目(2009-05)

② 联系人, 手机: (0) 13507058127; E-mail: zsqcxy@163.com

作者简介: 吴正平(1971—), 男, 江西省奉新县人, 副教授, 主要从事药物分析及药理研究工作。

收稿日期: 2010-10-31; 接受日期: 2010-12-04

国药生物制品检定所,批号:110753-200212、100081-200406);甲醇(色谱纯,上海陆忠试剂厂);其他试剂均为分析纯。实验用水为超纯水。

表 1 杏香兔耳风药材样品产地与来源

样品编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14
产地	宜春	宜春	宜春	宜春	宜春	宜春	上饶	上饶	上饶	九江	新余	新余	萍乡	萍乡
来源	野生	野生	野生	种植	种植	种植	野生	种植	种植	野生	野生	野生	野生	野生

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备

准确称取减压干燥至恒重的绿原酸对照品 3.27mg 和芦丁对照品 1.09mg,用甲醇溶解后定容于 10mL 容量瓶中,配制成含芦丁 $0.109\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和含绿原酸 $0.327\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品混合溶液,用 $0.45\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备

杏香兔耳风干燥后粉碎,过 20 目筛,准确称取约 2g,置具塞三角烧瓶中,加 90% 乙醇 40mL,超声提取 30min,过滤,滤渣用乙醇洗涤 2 次,合并滤液,转移至 50mL 容量瓶中,用乙醇稀释至刻度,摇匀, $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤,即得。

2.3 色谱条件

流动相为甲醇-0.5%磷酸的水溶液,梯度洗脱程序为 0min(30:70)-15min(30:70)-20min(50:50)-40min(50:50);流速 $0.8\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;检测波长 350nm;柱温 25°C ;光电二极管阵列检测器。对照品的 HPLC 色谱图见图 1。

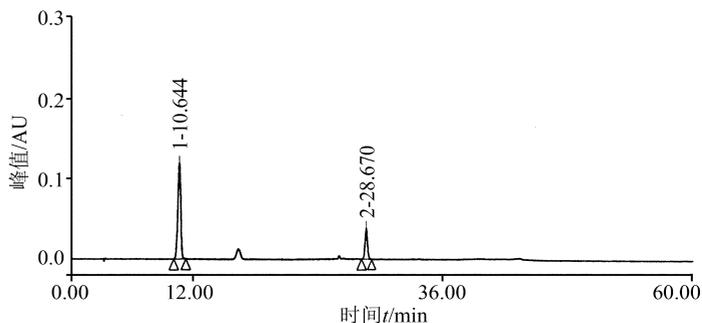


图 1 对照品 HPLC 图谱

1——绿原酸;2——芦丁。

3 结果与讨论

3.1 精密度实验

准确吸取对照品溶液 $10\mu\text{L}$ 进样分析,重复进样 5 次,绿原酸和芦丁保留时间、峰面积的 RSD 分别为 0.26%、0.31% 和 0.21%、0.17%,表明仪器精密度良好。

3.2 溶剂及提取方法考察

比较了以乙醇为溶剂的冷浸、索氏、回流、超声提取等不同方法的提取效果,以 90% 乙醇超声提取 30min 的总体效果为佳,杏香兔耳风中酚酸类和黄酮类成分等主要成分的提取率高,所得图谱峰较多且分离良好。

3.3 稳定性实验

取同一供试品溶液,在样品制备完成后第 0, 1, 2, 4, 8, 24h 分别进样 $10\mu\text{L}$,结果色谱图中各共有峰保留时间和峰面积的 RSD 分别为 1.32%—2.30% 和 0.87%—2.32%,表明供试品溶液在 24h 内稳定。

3.4 重现性实验

取同一批次杏香兔耳风药材样品 5 份制备供试品溶液,分别准确吸取 $10\mu\text{L}$ 进样分析,各共有

峰保留时间和峰面积的 RSD 分别为 0.63%—1.35% 和 1.54%—2.33%, 表明该测定方法的重复性良好。

3.5 杏香兔耳风指纹图谱的建立及相似度分析

3.5.1 检测结果

按 2.2.2 项下方法制备 14 批次杏香兔耳风药材的供试品溶液, 在 2.3 项的色谱条件下, 依次进样检测, 获得 14 批次杏香兔耳风高效液相色谱叠加图。

3.5.2 共有特征峰的标定

根据 14 批次供试品测定结果所给出的峰数、峰值(积分值)和峰位(相对保留时间)等相关参数进行分析、比较, 杏香兔耳风高效液相色谱可分离出 10 多个色谱峰, 通过对照品(绿原酸和芦丁)保留时间和紫外光谱检测结果的对照, 并比较所测定和记录的色谱图, 选取 10 个共有峰作为指纹图谱的特征峰, 其中 2 号峰为绿原酸色谱峰, 9 号峰为芦丁色谱峰(见图 2)。

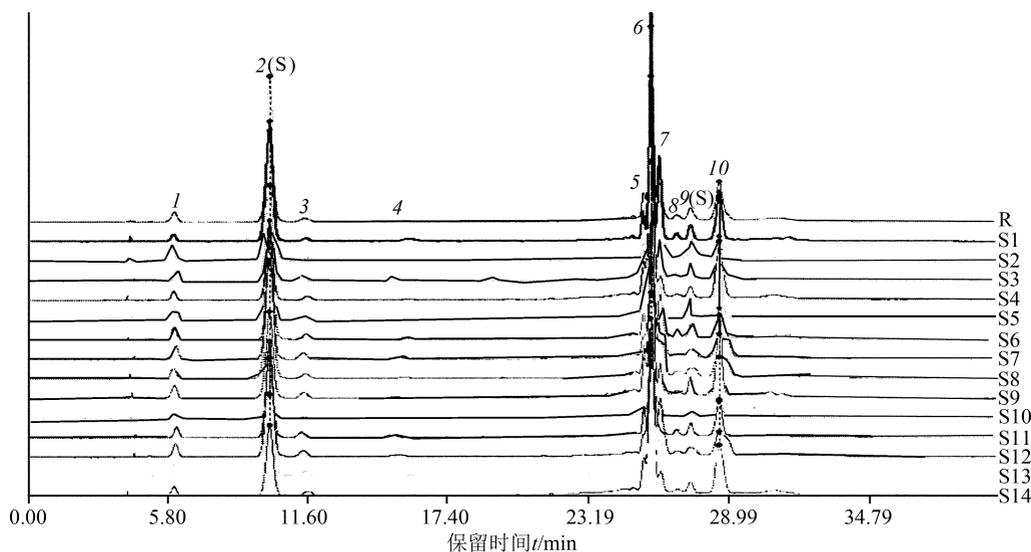


图 2 杏香兔耳风样品 HPLC 指纹图谱

R——对照指纹图谱(平均值); S1—S14——杏香兔耳风样品; 2——绿原酸; 9——芦丁; S——对照品峰。

3.5.3 共有图谱模式的建立

将各批次样品的测试数据导入计算机辅助相似性评价系统软件(2004 年版 A), 经选峰, 设定匹配模板, 将谱峰自动匹配, 建立其共有图谱标准模板, 然后进行各样品的相似度评价^[4]。

3.5.4 图谱相似度分析

采用计算机辅助相似性评价系统软件分析各批次样品指纹图谱的相似度, 结果见表 2。经分析, 14 批次不同产地的杏香兔耳风样本中 10 个共有峰保留时间的 RSD 均小于 1.66%, HPLC 色谱图相似度值均大于 0.9。

表 2 杏香兔耳风高效液相色谱指纹图谱相似度

样品编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14
相似度	0.96	0.94	0.98	0.94	0.91	0.95	0.96	0.98	0.94	0.95	0.96	0.94	0.97	0.95

4 结论

(1) 实验比较了等度洗脱和梯度洗脱对杏香兔耳风指纹图谱的影响, 结果发现等度洗脱时, 改变流动相的组成或比例只能得到较少的色谱峰。改用梯度洗脱, 样品中不同极性组分均获得了合适的保留值。实验证明, 该方法梯度简单, 可操作性强, 重现性好, 分离度和柱效均令人满意。实验记录了 60min 色谱图, 发现 40min 后无色谱峰出现, 故确定采集时间为 40min。

(2) 综合杏香兔耳风药材 HPLC 指纹图谱的相对保留时间、相对峰面积以及相似度可以看出, 不同来源杏香兔耳风药材样品的指纹图谱整体面貌基本一致, 反映了不同批次杏香兔耳风药材的同源性及其群体化学组分的相似性, 揭示出杏香兔耳风指纹图谱具有自身化学条码特征, 是其内在化学成分种类的反映。但同时其共有成分的含量存在较大差异, 说明不同来源的杏香兔耳风药材内在质量与产地等因素密切相关。通过对 14 批不同来源杏香兔耳风药材样品的高效液相色谱检测, 初步构建了杏香兔耳风 HPLC 指纹图谱分析方法, 杏香兔耳风中有效活性成分能在色谱图中得到宏观、综合地体现, 能充分反映杏香兔耳风各化学成分特征。

参考文献

- [1] 《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海: 科学技术出版社, 1999. 6682.
- [2] 张锐, 曾宪仪, 张正行. 杏香兔耳风的化学成分研究[J]. 中草药, 2006, 37(3): 347—348.
- [3] 胡昌奇, 王朴, 姚辉农. 杏香兔耳风的化学成分研究(Ⅰ)[J]. 中草药, 1983, 14(11): 6—7.
- [4] 蒋轶伦, 韩超, 邱招钗等. 液相色谱指纹图谱在泽泻动态研究中的应用[J]. 分析试验室, 2006, 25(3): 70—74.

Chromatographic Fingerprint of *Ainsliaea Fragrans* Champ. by HPLC

WU Zheng-Ping LENG Gui-Hua^a ZOU Sheng-Qin^a

(Beauty Medical College, Yichun University, Yichun, Jiangxi 336000, P. R. China)

^aKey Laboratory of Jiangxi Province for Research on Active Ingredients in Natural Medicines,
College of Chemistry and Bioengineering of Yichun University, Yichun, Jiangxi 336000, P. R. China

Abstract The chromatographic fingerprint of *Ainsliaea fragrans* Champ. was established by HPLC, which can be applied for science assessment and control of quality of *Ainsliaea fragrans* Champ. . A Kromasil C₁₈ column (4. 6mm × 250mm, 5μm) was used with methanol-0. 5 % phosphoric acid water solution as the mobile phase in gradient elution 0min (30 : 70) -15min (30 : 70) -20min (50 : 50) -40min (50 : 50) with flow rate of 0. 8mL · min⁻¹, and the detection wavelength was at 350nm with the column temperature of 25°C. The 10 common peaks were found in the established chromatographic fingerprint of *Ainsliaea fragrans* Champ., and good similarities of the chromatographic fingerprint between the various samples and standard fingerprint was over 0. 9. The established HPLC chromatographic fingerprint has good precision, repeatability and stability, that can be used for the main quality control of *Ainsliaea fragrans* Champ., meanwhile, provides an experimental basis for further investigation of quality control of *Ainsliaea fragrans* Champ. .

Key words *Ainsliaea Fragrans* Champ.; HPLC; Chromatographic Fingerprint; Chlorogenic Acid; Rutin