

火绒草HPLC指纹图谱初步研究

姜 鸿,王光函,邸子真,邹桂欣,尤献民

(辽宁省中医药研究院,辽宁 沈阳 110034)

摘 要:目的:采用高效液相色谱法(HPLC)建立火绒草的指纹图谱,为火绒草的质量控制提供标准。方法:选用Ultimate XB-C18(5 μm 4.6mm×200mm)色谱柱;流动相:A.甲醇-乙腈-四氢呋喃(3:2:1),B.0.5%冰醋酸溶液;柱温:20 ;流速:1mL/min;记录时间60min;二级管阵列检测器,检测波长为325nm;采用药典委员会的色谱指纹图谱相似度计算软件(2004A版)进行分析。结果:确定了火绒草有15个共有峰,图谱中主要色谱峰分离较好,达到指纹图谱要求,可有效地分析和评价药材的质量。结论:所建立的指纹图谱特征性及专属性强,方法稳定可靠,简便快捷,适用于火绒草药材的质量控制。

关键词:火绒草;HPLC;指纹图谱

中图分类号:R284.1 文献标识码:B 文章编号:1673-842X(2008)06-0196-02

Study on Fingerprint of Leontopodium by HPLC

JIANG Hong, WANG Guang-han, DI Zi-zhen, ZOU Gui-xin, YOU Xian-min

(Liaoning Academy of TCM, Shenyang 110034, Liaoning, China)

Abstract: *Objective:* To establish Fingerprint of Leontopodium by HPLC, to provide a method of quality control for Leontopodium. *Methods:* The column of Ultimate XB-C18 (5 μm 4.6mm×200mm) was selected. The mobile phase consisted of A: methanol-acetonitrile-tetrahydrofuran (3:2:1), B: 0.5% glacial acetic acid. The column temperature was 20 , and the flow rate was 1 mL·min⁻¹, and recording time was 60 min. The DAD detection wavelength was at 325nm. The data calculation was performed with similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of TCM (Version 2004A). *Results:* The result showed that 15 peaks were common. The constituents distribution information provided quality information for accessing medicinal materials, a good fingerprint of Leontopodium were obtained. *Conclusion:* This method with good characteristics and specificity can be used in the quality control of Leontopodium.

Key Words: Leontopodium; HPLC; Fingerprint

火绒草, *Leontopodium leontopodioides* (Willd.) Beauv 是菊科火绒草属植物的一种。我国主要分布于东北、西北、华北及西南地区,青藏高原,多生于典型草原、山地草原及草原砂质地,野生资源极为丰富^[1]。有研究报道火绒草中含有酚酸类、甾类、黄酮类化合物。火绒草味微苦,性寒。入肾、膀胱二经。具有疏风解表、清热解毒、凉血止血、益肾利水、消炎利尿之功效。主治急(慢)性肾炎、尿道炎、蛋白尿、血尿等多种肾脏疾病,以及风热感冒、创伤出血等;蒙医用于肺热咳嗽、支气管炎的治疗;藏医用于治疗流行性感、瘟病时疫、矿物药中毒、砒霜中毒、肉瘤、疮疖疔毒、出血,亦可作艾灸用。另有研究报道火绒草具有降血糖的作用^[2]。

火绒草为民间常用中药材,我们实验室早在九几年就开始对火绒草药材进行研究,尤献民等从火绒草中分离出火绒草多糖,并测定其含量为4.57%~8.39%^[4]。目前,指纹图谱已成为国际公认的控制中药与天然药物质量的有效手段,但火绒草药材的指纹图谱研究未见报道,本文采用反相HPLC法,初步建立火绒草药材的HPLC指纹图谱,为火绒草药材的质量控制提供一定的科学依据,作为今后对火绒草进一步研究的基础。

1 仪器与试药

Agilent 1100 高效液相色谱仪;四元泵、在线脱

气机、柱温箱、DAD 检测器(美国 Agilent 公司)

乙腈为色谱纯;水为娃哈哈纯净水;其他试剂均为分析纯;样品编号火绒草为(S1~S10),来源分别为S1、S2、S3、S4、S5、S6来源于沈阳东陵地区,S7、S8来源于辽宁千山,S9、S10来源于沈阳新城子地区;

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Ultimate XB-C₁₈ 5 μm, 4.6mm×200mm(美国月旭公司);流动相A:0.5%冰醋酸,流动相B:甲醇:乙腈:四氢呋喃(3:2:1),梯度洗脱条件见表1;流速:1mL/min;DAD检测器,检测波长:325nm;柱温:20 ;进样量:10 μl,谱图记录60min。

表1 梯度洗脱条件

时间(min)	A (%)	B (%)
0	85	15
15	70	30
35	68	32
42	64	36
60	45	55

2.2 供试品溶液的制备 各取干燥的火绒草药材1g,剪碎,精密称定,置索氏提取器中,加石油醚(30~60)提取1h,药渣挥干溶剂,置50mL锥形瓶中,加50%乙醇25mL,称定重量,回流提取2h,用50%乙醇补足重量,经0.45 μm滤膜滤过,作为供试

收稿日期:2008-03-11

作者简介:姜鸿(1975-)男,辽宁铁岭人,助理研究员,学士,研究方向:中药质量标准。

品溶液。

2.3 方法学考察 (1)精密性试验:取同一供试品溶液,在上述色谱条件下重复进样6次,记录指纹图谱。结果表明,各共有峰相对保留时间的RSD不大于0.2%,相对峰面积的RSD不大于0.2%。

(2)重复性试验:精密称取干燥的同一火绒草药材6份,每份1.0g,按“2”项下制备供试品溶液,在上述色谱条件下进行HPLC分析,记录指纹图谱。结果表明,各共有峰相对保留时间的RSD不大于0.5%,相对峰面积的RSD不大于1.0%。

(3)稳定性试验:取同一供试品溶液分别在0, 2, 4, 8, 12, 24 h进样分析,记录指纹图谱。结果表明,各共有峰相对保留时间的RSD不大于1.0%,相对峰面积的RSD不大于1.0%,说明供试品溶液在24h内稳定。

2.4 指纹图谱的建立 (1)不同批次火绒草指纹图谱比较:按“2”项下制备供试液^[5-6],记录色谱图,共考察了120min,发现在60min后没有峰出现。10批次火绒草药材测定结果见图1。根据结果,比较各批样品色谱图,确定了15个共有峰,见图2,其中7号峰为参比峰。共有峰中,峰面积占共有峰总面积的5~10%有5个,分别是2、9、10、11和14号峰,峰面积占共有峰总面积的10%以上的有3个,分别是1、7和13号峰。

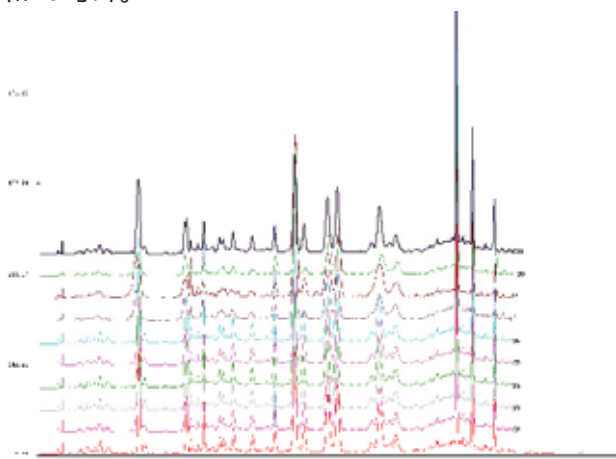


图1 10批火绒草药材HPLC图

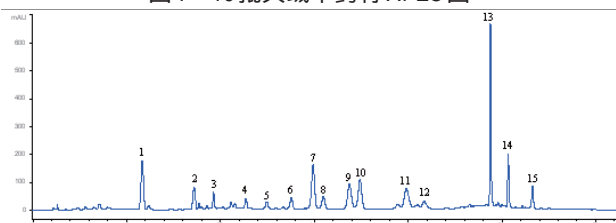


图2 火绒草药材HPLC图

(2)指纹图谱的相似度计算:采用药典委员会的色谱指纹图谱相似度计算软件(2004A版),依据10批不同批次及来源火绒草药材的色谱指纹图谱建立共有模式,计算样品与共有模式之间的相似度,相似度计算结果见表2。

3 讨论

本实验通过一系列筛选,建立了较好的色谱洗脱条件,各色谱峰之间分离度良好,达到指纹图谱的要求,所得到的火绒草的HPLC指纹图谱重现性、

精密度和稳定性均良好。运用DAD二极管阵列检测器,采集190~400nm的三维HPLC UV联用图,发现火绒草药材供试品溶液在325nm下有最大吸收波长,无色谱峰丢失现象,综合考虑,选择325nm波长作为火绒草药材指纹图谱检测波长。不同批号火绒草药材所含各有效成分基本相同,但是各成分含量略有差异,如果要保证药品的一致性,应注意药材产地和采收时间。7号峰是稳定存在于火绒草药材中的一个活性成分,重现性较好,分离度较好,含量较高,因此选择7号峰为指纹图谱的参照物。根据此方法确定了其中15个共有峰,并利用相似度软件对火绒草指纹图谱进行匹配,结果表明10批火绒草在整体上相似,因此以这10批样品的相对峰面积和相对保留时间的均值建立了模式图谱,可初步用于火绒草的真伪鉴别和质量评价。实验中比较了水、50%乙醇、70%乙醇、甲醇等不同提取溶液及回流、超声等不同提取方法和不同提取时间,结果表明50%乙醇回流提取2h,效果最佳。而且实验中发现,对于叶绿素较高的样品,先用石油醚(30~60)提取不影响共有峰,但柱压会降低一些,对色谱柱可起到保护作用。实验中试用了Eclipse XDB-C18(Agilent)等C18色谱柱,各共有峰的出峰顺序没有变化。为了得到较理想的分离效果,发现流动相B用甲醇和四氢呋喃较好,但当A与B不同比例混合时,柱压上升较快,原因是甲醇与水混合后黏性较大,尤其是比例接近1:1时,黏性最大。为了保护色谱仪和色谱柱,在B相中加入一定比例乙腈,柱压降低很多,且分离效果更好。实验中对柱温也作了考查,发现柱温对峰的分离和各共有峰的出峰顺序都有很大影响,综合考虑,最后决定柱温采用20。

表2 不同批次火绒草指纹图谱相似度计算结果

样品号	相似度	样品号	相似度
S1	0.987	S6	0.979
S2	0.985	S7	0.951
S3	0.971	S8	0.969
S4	0.975	S9	0.972
S5	0.996	S10	0.961

本次实验还存在一些不足之处,在后续研究中我们会积极完善。首先,是我们以7号峰为参照物,但7号峰的成分确认还未完成,随着我们对火绒草药材的进一步研究,会在指纹图谱的指导下对火绒草各有效成分进行提取分离,并进行结构鉴定,确定各共有峰的成分;其次,目前我们对火绒草药材的收集不够完善,产地、批次不全,在后续的研究中,我们要尽量收集各地不同季节的火绒草药材,建立一个较为完善的指纹图谱。

参考文献

- [1] 温彩红,陈其秀,陈冉,等.火绒草的研究进展[J].内蒙古医学院学报,2005,27(5):90-92.
- [2] 黄利权,伍义行.火绒草及火绒草属植物研究进展[J].中兽医医药杂志,2004,3:24-26.
- [3] 武彦文,高文远,苏艳芳,等.火绒草属植物的化学成分和药理活性研究进展[J].中国中药杂志,30(4):245-247.
- [4] 尤献民,金薇,邹桂欣,等.老头草中多糖的含量测定[J].时珍国医国药,1997(6):30-32.
- [5] 张峻颖,黄罗生.苦碟子药材HPLC指纹图谱研究[J].广东药学院学报,2006,22(6):598-601.
- [6] 马英丽,胡冰,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.