

金莲花药材高效液相色谱指纹图谱研究*

谭安菊¹, 周雯¹, 陈慧¹, 沈国华², 许祖超², 李勇军¹, 兰燕宇¹, 王爱民^{1**}

(1. 贵阳医学院药学院, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州益康制药有限公司, 贵州 贵阳 550025)

[摘要] 目的: 建立金莲花药材高效液相色谱(HPLC)指纹特征图谱的方法。方法: 采用 Phenomenex Gemini C₁₈柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)、乙腈-0.1%磷酸为流动相梯度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 柱温 35 °C, 检测波长 230 nm, 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)进行相似度评价。结果: 建立金莲花药材指纹图谱, 确定 31 个共有峰, 指认了 5 个色谱峰, 金莲花各药材指纹图谱与共有模式相似度均在 0.85 以上。结论: HPLC 指纹图谱为金莲花药材质量的更有效控制提供了依据。

[关键词] 金莲花; 色谱法, 高压液相; 指纹图谱; 相似度

[中图分类号] R931.71; R932 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2013)05-0489-04

HPLC Fingerprint Analysis of *Trollius chinensis*

TAN Anju¹, ZHOU Wen¹, CHEN Hui¹, SHEN Guohua², XU Zuchao², LI Yongjun¹, LAN Yanyu¹, WANG Aimin¹

(1. School of pharmacology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Guizhou Yikang Pharmaceutical Limited Company, Guiyang 550025, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To establish HPLC fingerprint analysis method of *Trollius chinensis*. **Methods:** The HPLC method was carried out on Phenomenex Gemini C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) using acetonitrile-0.1% phosphoric acid as mobile phase. The flow rate was 1.0 mL/min. The column temperature was 35 °C. Detection wavelength was 230 nm. The similarity was evaluated with similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of tradition Chinese medicine (2004A) issued by state pharmacopoeia committee. **Results:** HPLC fingerprint of *Trollius chinensis* was established. 31 common peaks were identified in the fingerprint and 5 chromatographic peaks were obtained. The similarity between the mutual mode and each *Trollius chinensis* fingerprint was more than 0.85. **Conclusions:** The HPLC fingerprint provides basis for the effective quality control of *Trollius chinensis*.

[Key words] *Trollius chinensis*; chromatography, high pressure liquid; fingerprint; similarity

金莲花为毛茛科植物金莲花(*Trollius chinensis* Bge)的干燥的花, 多年生草本植物, 分布在山西、河北、内蒙古、陕西及四川等省区, 以山西、河北、内蒙古产量最大, 为民间常用中药, 有清热解毒、消肿明目的功效, 并被制成多种单味或复方制剂应用于泌尿系感染、肠炎、扁桃体炎等^[1-2]。金莲花种植范围较小, 市场反映金莲花与槐花由于性状相似而容易混用, 从而影响其制剂的质量及临床用药的疗效, 建立其指纹图谱有利于鉴别及整体控制药材的质量, 虽有金莲花指纹图谱相关的报道, 但其分离

效果不理想, 并且指认的色谱峰较少, 《中国药典》(2010 年版)也并未收载金莲花的质量标准^[3]。本研究在金莲花药材多指标含量测定的基础上, 采用高效液相色谱法测定不同产地金莲花药材的指纹图谱, 现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱

* [基金项目] 贵阳市云岩区科技局[2010]第 14 号, 贵州省科技厅中药现代化[2011]5081 号。

** 通信作者 E-mail: 1076707902@qq.com; E-mail: gywam100@163.com

联用仪 (Acquity™ UPLC-TQD 系统, MassLynx V4.1 工作站, 包括二元高压梯度泵、自动进样器、电喷雾电离源等), 岛津 Prominence UFLC 液相色谱仪 (SPD-20A 紫外检测器), 电子天平 AE240 十万分之一 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司) 及超纯水机 (四川沃特尔科技发展有限公司)。

1.2 试剂

色氨酸、对羟基苯甲苹果酸、荜草素-2-O''-β-L-半乳糖、荜草素、牡荆素 (民族药与中药开发应用教育部工程研究中心从金莲花药材中提取分离制备所得, 均经¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS, UV, IR 波谱进行结构鉴定, 采用 UPLC-PDA 在多个波长测定, 峰面积归一化含量均大于 98.0%), 乙腈 (色谱纯, 美国 TEDIA 有限公司), 甲醇 (色谱纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司), 乙腈 (色谱纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司), 磷酸 (分析纯, 天津市富宇精细化工有限公司), 纯净水 (广州屈臣氏食品饮料有限公司)。试验用 11 批金莲花药材由贵阳医学院药学院龙庆德副教授鉴定为毛茛科植物金莲花的干燥花。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备

分别精密称取色氨酸、对羟基苯甲苹果酸、荜草素-2-O''-β-L-半乳糖、荜草素、牡荆素适量, 用甲醇溶解, 配置成 2.0 mg/L 的混合对照品溶液, 备用。

2.2 供试品溶液制备

金莲花药材经粉碎, 过 40 目筛, 取粉末 0.5 g, 加入 70% 甲醇 25 mL 回流提取 2 h, 冷却后补足减失的重量, 滤过, 离心 10 min (10 000 r/min), 取上清液, 备用。

2.3 色谱条件

色谱柱为 Phenomenex Gemini C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 (A) - 0.1% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 17 min, 7% ~ 19% A; 17 ~ 35 min, 19% ~ 22% A; 35 ~ 55 min, 22% ~ 50% A), 流速 1.0 mL/min, 检测波长为 230 nm, 柱温 35 °C; 进样 10 μL, 记录 55 min。

2.4 质谱条件

电喷雾离子源, 正负离子模式检测, 毛细管电

压 3.0 kV, 离子源温度 120 °C, 去溶剂气和反吹气为氮气, 流速分别为 650 L/h 和 50 L/h; 去溶剂气温度 350 °C, 一级质谱采用全扫描 (Ms Scan) 模式, 扫描质量范围为 m/z 100 ~ 1 000。

2.5 方法学考察^[4-5]

2.5.1 精密度试验 取同一供试品溶液, 连续进样 6 次, 以 18 号峰荜草素为参照峰, 各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 为 1.05%, 同时用相似度评价软件计算各色谱指纹图谱的相似度均大于 0.995, 表明仪器精密度良好。

2.5.2 重复性试验 取同一批号的样品 6 份, 分别按“2.2”项下方法制备成供试品溶液, 以 18 号峰荜草素为参照峰, 各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 为 1.50%, 同时用相似度评价软件计算各色谱指纹图谱的相似度均大于 0.994, 表明方法重复性较好。

2.5.3 稳定性试验 取同一供试品溶液, 于室温下 0、2、4、6、8、12、16、20、24 h 分别进样, 检测指纹图谱。以 18 号峰荜草素为参照峰, 各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 为 2.01%, 同时用相似度评价软件计算各色谱指纹图谱的相似度均大于 0.993, 表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.6 金莲花药材指纹图谱测定与分析

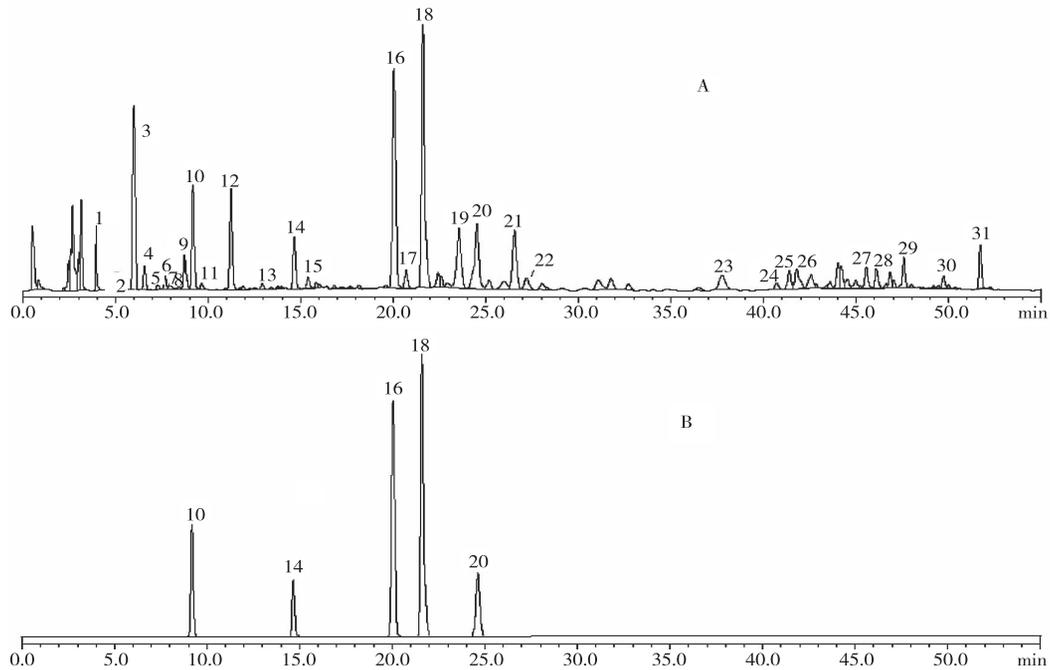
2.6.1 特征指纹图谱的建立 取 11 批金莲花药材粉末, 按“2.2”制备成供试品溶液, 测定。经比较 11 批次金莲花药材的色谱图, 从中选择了 31 个共有峰作为构成指纹图谱的特征峰, 归属其中 5 个色谱峰, 5 个化合物的混合对照溶液和金莲花药材的代表性指纹图谱见图 1, 5 个化合物的 ESI-MS 一级质谱表征见表 1。

2.6.2 相似度计算 将所得到的色谱数据导入国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004 年 A 版)”, 采用中位数法得出金莲花药材的共有模式。以共有模式为对照计算各批药材的相似度。见表 2 和图 2。

3 讨论

3.1 样品溶液制备方法的考察

金莲花药材中主要成分为黄酮类、有机酸类等化合物, 根据该类物质的理化性质, 分别以甲醇



注:A 为供试品,B 为混合对照品;10 为色氨酸,14 为对羟基苯甲苹果酸,
16 为荛草素-2-O''-β-L-半乳糖,18 为荛草素,20 为牡荆素。

图 1 金莲花药材及混合对照品色谱

Fig. 1 Chromatogram of *Trollius chinensis* and control

表 1 5 个化合物的 ESI-MS 一级质谱表征

Tab. 1 ESI-MS first order mass spectrum characterization of five compounds

峰号	化合物	ESI +	ESI -	分子 量 M
		[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	
10	色氨酸	205.1	203.3	204
14	对羟基苯甲苹果酸	241.0	239.0	240
16	荛草素-2-O''-β-L-半乳糖	611.2	609.3	610
18	荛草素	449.1	447.1	448
20	牡荆素	433.1	431.2	432

表 2 11 批金莲花药材相似度

Tab. 2 Similarity of 11 batches of *Trollius chinensis*

批号	样品来源	与共有模式的相似度
20100601	河北	0.876
20100801	内蒙古	0.910
20101002	河北	0.877
20110301	河北	0.974
20110409	山西	0.857
20091010	内蒙古	0.992
20091115	内蒙古	0.894
20100127	内蒙古	0.895
20110106	内蒙古	0.943
20110223	内蒙古	0.896
20110312	内蒙古	0.921

(100%、70%、50%、30%)及乙醇为溶剂,用索氏提取法、回流提取法和超声提取法进行提取,以色谱中峰的信息量最大化、药材中各色谱峰的单位质量峰面积最大化原则,选择 70% 甲醇回流提取 2 h^[6]。

3.2 色谱条件的选择

流动相的选择:分别以乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸、乙腈-0.2% 磷酸为流动相梯度洗脱,结果乙腈-0.1% 磷酸梯度洗脱,各色谱峰分离效果较好。检测波长的选择:采用 PDA 检测器对检测波长进行了考察,记录并比较了不同检测波长的指纹图谱,按照信息最大化的原则,选择 230 nm 为检测波长。

3.3 结果分析

11 批药材的指纹图谱主要峰群的整体图貌基本一致,相似度在 0.85 以上,表明 11 批药材的质量具有一定的稳定性,可作为金莲花药材的特征指纹图谱,经比较后确定了金莲花药材的 31 个共有峰作为构成指纹图谱的稳定的特征峰,这些峰在各个样品中均有出现,且在不同样品中峰的大小也各有差异,说明不同产地的金莲花药材成分含量存在一定的差异,其原因可能是受气候或土壤等因素的影响,有必要对金莲花的生长环境进行考察,建立金莲花的 GAP 基地,从源头上保证金莲花药材的质量。

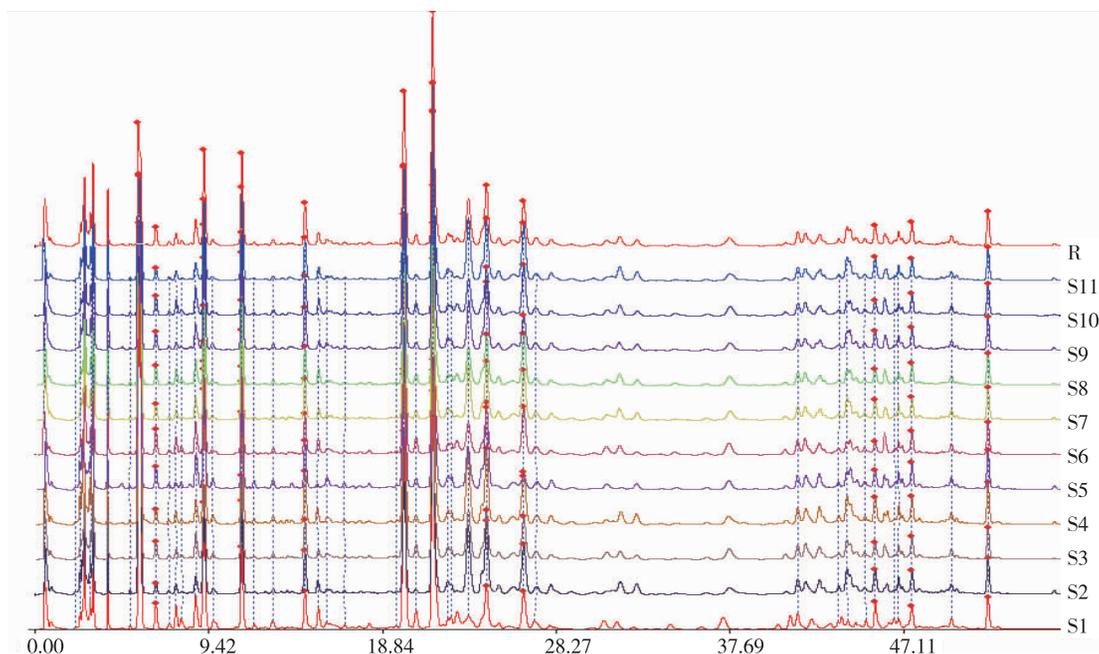


图2 11批药材指纹图谱(R为共有模式)

Fig.2 Fingerprint of 11 batches of *Trollius chinensis*

4 参考文献

- [1] 蒋伟,屈海琪,袁丹华,等. 金莲花中菝葜苷和牡荆苷对D-半乳糖致衰老小鼠脑损伤的保护作用[J]. 中草药, 2012(7):1376-1380.
- [2] 吴一飞,袁东亚,巩江,等. 金莲花药学研究概况[J]. 山东中医药大学学报, 2010(6):544-545.
- [3] 王巧,许磊,冯超,等. 金莲花药材高效液相色谱法指纹图谱分析[J]. 时珍国医国药, 2010(2):331-332.
- [4] 李喜凤,胡春月,胡利欣,等. 不同产地禹州漏芦 HPLC 指纹图谱鉴别研究 [J]. 中国实验方剂学, 2012(15): 96-98.
- [5] 孙冬梅,谭志灿,罗文汇,等. 布渣叶药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学, 2012(12):84-87.
- [6] 叶云峰,彭勇,付岗,等. 药用金莲花研究新进展 [J]. 中国现代中药, 2007(3):29-32.

(2013-05-26 收稿, 2013-07-17 修回)

编辑:周凌

· 文摘 ·

燃煤型氟中毒大鼠海马区组织病理学分析

桂传枝¹,冉龙艳¹,官志忠^{1,2}

(1. 贵阳医学院附院 病理科, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵阳医学院 分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004)

目的:复制燃煤型氟中毒大鼠模型并观察其对海马 CA1 区形态学影响。**方法:**24 只 SD 大鼠随机分为 3 组,对照组、低、高氟组;染氟组以地氟病区燃煤烘烤玉米为主要饲料,复制中毒动物模型,6 个月后用氟离子选择电极法检测动物尿、骨及脑氟含量,观察大鼠海马 CA1 区神经元病理变化,用 Boimias 2000 图像分析系统测试大鼠海马 CA1 区神经元胞体平均面积、周长及平均灰度值。**结果:**低、高氟组大鼠尿氟为(2.81 ± 0.12)、(5.27 ± 0.15) mg/L,骨氟(2 912 ± 140)、(4 624 ± 20) mg/kg,脑氟(1.14 ± 0.04)、(1.79 ± 0.04) mg/kg;与对照组尿氟(1.68 ± 0.02) mg/L、骨氟(1 479 ± 127) mg/kg,脑氟(0.25 ± 0.05) mg/kg 比较,差异有统计学意义(P < 0.05 或 P < 0.01);尼氏染色显示,与对照组大鼠神经元平均灰度值(115 ± 4)比较,染氟组大鼠均明显增加[低氟(157 ± 7),高氟(164 ± 8)]。**结论:**长期食用燃煤型氟中毒病区燃煤烘烤的粮食可以引起氟中毒;并导致动物尿、骨、脑氟含量增高,使大鼠海马 CA1 区神经元蛋白合成功能下降。