

桂南地区苦玄参药材 RP-HPLC 指纹图谱研究

梁小燕, 方宏, 宁德生, 陈海珊, 黄永林

(广西壮族自治区广西植物研究所, 广西桂林 541006)
中国科学院

摘要: 采用反相 HPLC 法测定了广西梧州、龙州、苍梧、越南等多产地 12 批苦玄参药材指纹图谱, 并对不同产地的苦玄参指纹图谱进行比较。色谱条件为: Luna C18(4.6×250 mm, 5 μm) 色谱柱, 乙腈-水梯度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 254 nm, 柱温 25℃。结果 12 批苦玄参样品指纹图谱共标定了 16 个分离度良好的共有峰, 方法的精密度、稳定性、重复性均符合国家相关规定, 可作为控制苦玄参药材质量的定性标准。

关键词: 苦玄参; HPLC; 指纹图谱; 质量控制

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2007)06-0948-04

RP-HPLC fingerprint of *Picria fel-terrae* from South Guangxi

LIANG Xiao-Yan, FANG Hong, NING De-Sheng,
CHEN Hai-Shan, HUANG Yong-Lin

(Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuangzu Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China)

Abstract: The RP-HPLC assay was used to establish the fingerprint of *Picria fel-terrae* from South Guangxi, and the HPLC chromatogram of different origins of *Picria fel-terrae* were compared. The chromatography conditions were as follows: Luna C18 column(4.6×250 mm, 5 μm), a mixture of acetonitrile and water as mobile phase in gradient mode, flow rate was 1.0 mL/min, detective wavelength at 254 nm, column temperature 25℃. The fingerprints of *P. fel-terrae* with 16 common peaks were determined. The RSD of precision and reproducibility lay within 5%. According to this method, the established fingerprint can be used for the identification and quality control of *P. fel-terrae*.

Key words: *Picria fel-terrae*; HPLC; fingerprint; quality control

苦玄参(*Picria fel-terrae*)为玄参科苦玄参属唯一的一种植物(中国科学院中国植物志编辑委员会, 1979), 主要分布于我国广西、广东和云南等地, 其作为民间用药已有悠久的历史, 尤其是在广西东南部, 是治疗蛇伤、高热、喉痛、疮疖肿毒的民间秘传良药。苦玄参被《广西中药材标准》1990年版收载, 以苦玄参为主要原料的数个中成药已面市(陈勇, 2000)。对苦玄参的研究表明, 苦玄参化学成分主要有四环三萜苷类(成桂仁等, 1982,

1985)及苯乙醇苷类(王力生等, 2004)化合物, 并且发现含三萜类成分的苦玄参提取物具有抗肿瘤、抗菌消炎的作用(广西植物研究所资源化学室等, 1978; 陈仲良等, 1986)。有文献报道以苦玄参苷 I A、I B 的含量检测来进行苦玄参药材的质量控制(郑成远等, 2006; 邹节明等, 2005b)。本实验采用 RP-HPLC 法, 主要对广西东南部地区产苦玄参药材进行了指纹图谱的研究, 为苦玄参药材更全面的质量控制提供参考。

收稿日期: 2006-12-11 修回日期: 2007-06-19

基金项目: 广西自然科学基金(0339079)[Supported by Natural Science Foundation of Guangxi(0339079)]

作者简介: 梁小燕(1962-), 女, 广西桂林人, 副研究员, 从事天然产物化学成分利用的应用基础研究。

1 仪器与试药

仪器: Agilent-1100 分析型高效液相色谱仪(含四元低压梯度泵, 二极管阵列检测器, 在线真空脱气机, 柱温箱, 7725i 手动进样器, HP 化学工作站); 超纯水仪(Millipore 公司)。试剂: 乙腈(色谱纯), 甲醇(分析纯), 水(超纯水, 自制)。对照品: 苦玄参苷 I A、苦玄参苷 I B(自制, 纯度分别为 98.2%, 97.1%)。药材: 各药材样品来源见表 1, 经鉴定为玄参科植物苦玄参(*P. fel-terrae*)的干燥全草。

表 1 苦玄参样品来源

Table 1 The collected *Picria fel-terrae* samples

| 编号 No. | 采集地点 Collecting site | 采集时间 Collecting date |
|--------|----------------------|----------------------|
| 1 | 广西梧州 | 2005.9.4 |
| 2 | 广西苍梧 | 2005.9.5 |
| 3 | 广西苍梧 | 2005.9.6 |
| 4 | 广西苍梧 | 2005.5.3 |
| 5 | 广西梧州 | 2005.10.7 |
| 6 | 广西梧州 | 2005.10.8 |
| 7 | 广西南宁 | 2004.9 |
| 8 | 广西横县 | 2004.10 |
| 9 | 广西梧州 | 2005.11.9 |
| 10 | 广西龙州 | 2004.9 |
| 11 | 越南 | 2004.12 |
| 12 | 广西南宁 | 2004.10 |

2 实验方法和结果

2.1 色谱条件

色谱柱: phenomenex Luna C18 (4.6 × 250 mm, 5 μm); 柱温: 25 °C; 检测波长: 254 nm; 流动相: A: 乙腈, B: 水, 梯度洗脱, 洗脱梯度如表 2; 分析时间: 76 min; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取苦玄参苷 I A 和 I B 适量, 加甲醇制成每 1 mL 含苦玄参苷 I A 1.0 mg 和苦玄参苷 I B 0.56 mg 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

称取苦玄参全草粉末(过 40 目筛)1 g, 加甲醇 20 mL, 超声提取 30 min, 滤过, 用少许甲醇洗涤残渣并定容至 25 mL。取滤液 2 mL 过 0.45 μm 滤膜, 作为供试品溶液。

2.4 检测方法

分别精密吸取对照品溶液和样品溶液各 10

μL, 注入液相色谱仪, 记录 76 min 的色谱图即得。根据参照峰的保留时间和峰面积计算其他共有峰的相对保留时间和相对峰面积值。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 取同一份供试品溶液, 连续进样 5 次, 按 2.1 项下色谱条件检测, 考察共有峰的相对保留时间和相对峰面积比值的一致性。各共有峰相对保留时间的 RSD 值为 0.01%~0.05%, 相对峰面积的 RSD 值为 0.36%~3.40%。结果说明仪器性能良好, 符合指纹图谱的技术要求(RSD<5%)。

表 2 梯度洗脱条件

Table 2 Conditions of gradient elution

| t/min | A (%) | B (%) |
|-------|-------|-------|
| 0 | 12 | 88 |
| 4 | 20 | 80 |
| 26 | 33 | 67 |
| 45 | 36 | 64 |
| 55 | 49 | 51 |
| 68 | 80 | 20 |
| 76 | 80 | 20 |

2.5.2 稳定性试验 取同一份供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24、36 h 进样, 按“2.1 色谱条件”检测, 各色谱峰相对保留时间的 RSD 值为 0.02%~0.22%, 相对峰面积的 RSD 值为 1.17%~4.53%。表明样品溶液在 36 小时内稳定, 符合指纹图谱的技术要求(RSD<5%)。

2.5.3 重复性试验 取同一批供试样品 6 份, 分别进样, 按 2.1 项下色谱条件检测, 各色谱峰相对保留时间的 RSD 值为 0.01%~0.11%, 相对峰面积的 RSD 值为 0.81%~4.09%。结果表明, 样品制备方法重现性良好, 符合指纹图谱的技术要求(RSD<5%)。

2.6 样品测定与结果

2.6.1 指纹图谱的建立 分别精密吸取对照品溶液和 12 批供试品溶液各 10 μL 注入液相色谱仪, 分别按“2.1 色谱条件”测定, 记录 76 min 的色谱图, 结果如图 1。

2.6.2 共有峰的确定 根据 12 批供试品溶液 HPLC 谱给出的相关参数, 比较各供试品色谱图, 其中 16 个峰是各批供试品所共有的, 因此确定这 16 个峰为共有指纹峰。根据对照品的相对保留时间和紫外光谱, 确定指纹图谱中的 3 号峰为苦玄参苷 I B, 10 号峰为苦玄参苷 I A。在共有峰中, 以 10 号峰的色谱峰为参照物峰(相对保留时间为 1), 各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的比值见表 3 和表 4。

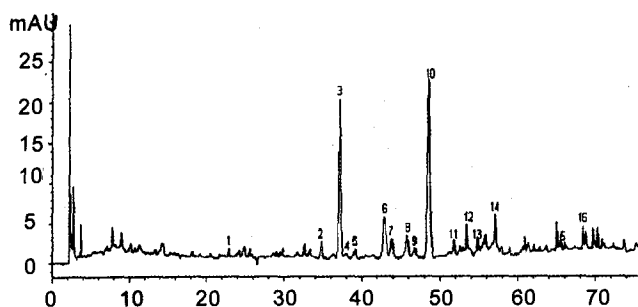


图1 苦玄参 RP-HPLC 指纹图谱
Fig.1 RP-HPLC fingerprint of *Picria fel-terrae*

2.6.3 指纹图谱的相似度计算 应用指纹图谱相似度评价软件对各产地苦玄参药材指纹图谱进行相似度计算。以 12 批样品共有的指纹图谱为对照谱图, 计算 12 批样品与对照谱图的相似度。12 批样品的与对照谱图的相似度均在 90% 以上, 结果见表 5。

3 讨论

(1) 至今的药理研究表明(广西植物研究所资源化学室等, 1978; 陈仲良等, 1986), 苦玄参有效成分集中于苦玄参四环三萜苷部分。本实验主要考察有

表 3 12 批次苦玄参共有峰的相对保留时间

Table 3 Relative retention time of common peaks for twelve batches of *Picria fel-terrae*

| 峰号 Peak No. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | Average | RSD (%) |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|---------|
| 1 | 0.470 | 0.471 | 0.471 | 0.470 | 0.470 | 0.471 | 0.472 | 0.471 | 0.471 | 0.470 | 0.471 | 0.471 | 0.471 | 0.13 |
| 2 | 0.717 | 0.717 | 0.717 | 0.717 | 0.717 | 0.717 | 0.719 | 0.718 | 0.717 | 0.717 | 0.718 | 0.717 | 0.718 | 0.08 |
| 3 | 0.766 | 0.766 | 0.766 | 0.766 | 0.766 | 0.766 | 0.767 | 0.766 | 0.766 | 0.766 | 0.766 | 0.766 | 0.766 | 0.05 |
| 4 | 0.777 | 0.777 | 0.779 | 0.777 | 0.783 | 0.780 | 0.783 | 0.783 | 0.783 | 0.783 | 0.784 | 0.784 | 0.781 | 0.36 |
| 5 | 0.807 | 0.807 | 0.808 | 0.808 | 0.807 | 0.807 | 0.808 | 0.807 | 0.807 | 0.807 | 0.807 | 0.807 | 0.807 | 0.03 |
| 6 | 0.884 | 0.885 | 0.886 | 0.885 | 0.884 | 0.886 | 0.885 | 0.884 | 0.884 | 0.883 | 0.884 | 0.884 | 0.884 | 0.10 |
| 7 | 0.903 | 0.903 | 0.903 | 0.904 | 0.903 | 0.903 | 0.903 | 0.903 | 0.903 | 0.903 | 0.903 | 0.903 | 0.903 | 0.02 |
| 8 | 0.943 | 0.942 | 0.943 | 0.943 | 0.943 | 0.943 | 0.943 | 0.943 | 0.943 | 0.943 | 0.943 | 0.943 | 0.943 | 0.01 |
| 9 | 0.964 | 0.964 | 0.965 | 0.963 | 0.964 | 0.964 | 0.970 | 0.964 | 0.963 | 0.963 | 0.964 | 0.964 | 0.964 | 0.19 |
| 10 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 11 | 1.068 | 1.068 | 1.069 | 1.069 | 1.068 | 1.068 | 1.071 | 1.069 | 1.067 | 1.067 | 1.067 | 1.068 | 1.068 | 0.12 |
| 12 | 1.103 | 1.103 | 1.103 | 1.103 | 1.103 | 1.103 | 1.107 | 1.104 | 1.101 | 1.100 | 1.101 | 1.102 | 1.103 | 0.14 |
| 13 | 1.132 | 1.132 | 1.132 | 1.132 | 1.132 | 1.132 | 1.137 | 1.133 | 1.130 | 1.129 | 1.131 | 1.131 | 1.132 | 0.16 |
| 14 | 1.195 | 1.195 | 1.196 | 1.196 | 1.195 | 1.195 | 1.200 | 1.196 | 1.193 | 1.176 | 1.194 | 1.194 | 1.194 | 0.50 |
| 15 | 1.363 | 1.363 | 1.363 | 1.363 | 1.363 | 1.363 | 1.360 | 1.362 | 1.358 | 1.357 | 1.359 | 1.360 | 1.361 | 0.16 |
| 16 | 1.412 | 1.413 | 1.414 | 1.413 | 1.413 | 1.413 | 1.420 | 1.413 | 1.409 | 1.408 | 1.410 | 1.411 | 1.413 | 0.22 |

表 4 12 批次苦玄参共有峰的相对峰面积

Table 4 Relative areas of common peaks for twelve batches of *Picria fel-terrae*

| 峰号 Peak No. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 0.013 | 0.027 | 0.008 | 0.014 | 0.007 | 0.007 | 0.007 | 0.005 | 0.004 | 0.079 | 0.023 | 0.015 |
| 2 | 0.055 | 0.072 | 0.048 | 0.074 | 0.047 | 0.050 | 0.045 | 0.039 | 0.032 | 0.214 | 0.069 | 0.048 |
| 3 | 0.561 | 0.637 | 0.535 | 0.667 | 0.556 | 0.567 | 0.553 | 0.529 | 0.554 | 0.557 | 0.620 | 0.612 |
| 4 | 0.015 | 0.022 | 0.019 | 0.018 | 0.019 | 0.017 | 0.014 | 0.016 | 0.023 | 0.012 | 0.022 | 0.036 |
| 5 | 0.028 | 0.042 | 0.031 | 0.030 | 0.037 | 0.032 | 0.025 | 0.025 | 0.046 | 0.084 | 0.045 | 0.036 |
| 6 | 0.122 | 0.129 | 0.172 | 0.185 | 0.149 | 0.150 | 0.049 | 0.049 | 0.111 | 0.090 | 0.071 | 0.242 |
| 7 | 0.120 | 0.130 | 0.115 | 0.119 | 0.144 | 0.117 | 0.095 | 0.085 | 0.119 | 0.126 | 0.114 | 0.096 |
| 8 | 0.180 | 0.212 | 0.175 | 0.167 | 0.194 | 0.156 | 0.141 | 0.106 | 0.214 | 0.376 | 0.184 | 0.128 |
| 9 | 0.059 | 0.068 | 0.100 | 0.072 | 0.065 | 0.055 | 0.021 | 0.017 | 0.045 | 0.055 | 0.040 | 0.073 |
| 10 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 11 | 0.054 | 0.056 | 0.073 | 0.057 | 0.049 | 0.054 | 0.064 | 0.068 | 0.064 | 0.058 | 0.058 | 0.060 |
| 12-14 | 0.892 | 1.108 | 0.893 | 0.844 | 0.869 | 0.828 | 0.559 | 0.478 | 0.857 | 0.825 | 0.747 | 0.754 |
| 15 | 0.022 | 0.029 | 0.030 | 0.029 | 0.021 | 0.027 | 0.016 | 0.016 | 0.015 | 0.042 | 0.014 | 0.014 |
| 16 | 0.036 | 0.044 | 0.036 | 0.06 | 0.031 | 0.034 | 0.030 | 0.026 | 0.023 | 0.049 | 0.035 | 0.049 |

效部分苦玄参苷的指纹图谱, 这对于目前以苦玄参苷 I A 为质量控制标准的苦玄参生产企业, 具

有更切合实际的指导意义。采用甲醇超声提取制备供试品, 能较好地反映该部分的各化学成分。(2) 针

对广西东南部地区产苦玄参进行指纹图谱研究, 共标定 16 个共有指纹峰, 较前人(邹节明等, 2005a) 确立了更多的指纹峰, 能更全面显示苦玄参药材的特性。其中, 确定了 3 号峰、10 号峰分别为苦玄参苷 I B、I A。通过对不同批次、产地苦玄参指纹图谱

的比较(图 2), 可以看出广西产苦玄参药材基本上都有相应的色谱峰。从相似度的计算结果也可看出, 其苦玄参药材之间整体差异及与对照指纹图谱的差异均很小, 因此, 均可在考察其有效成分含量高低后作为苦玄参药材取用。(3) 苦玄参中主要成分

表 5 12 批次苦玄参的指纹图谱相似度计算结果

Table 5 Fingerprint similarity for twelve batches of *Picria fel-tarreae*

| 样品 Sample | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 对照指纹图谱 Comparison fingerprint |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------------------------------|
| 1 | 0.977 | 0.985 | 0.981 | 0.984 | 0.982 | 0.97 | 0.963 | 0.953 | 0.942 | 0.974 | 0.967 | 0.985 | |

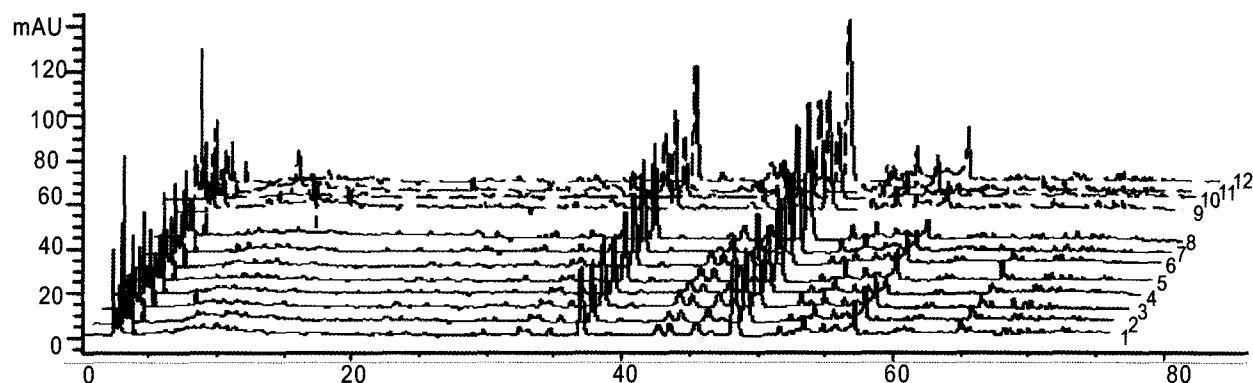


图 2 12 批次苦玄参 RP-HPLC 指纹图谱

Fig. 2 RP-HPLC fingerprint for twelve batches of *Picria fel-tarreae*

均有紫外吸收, 本实验供试品于 190~400 nm 处扫描, 结果表明在 254 nm 波长及 286 nm 波长处均有较好的分离度。比较之下, 在 254 nm 处色谱峰较多且分离度更好, 因此我们选择检测波长为 254 nm。

(4) 使用等度洗脱, 达不到理想的分离效果, 出峰少。采用梯度洗脱可得到较多的峰信息, 分离出大部分的色谱峰。因此本实验采用梯度洗脱。

致谢 感谢本所刘演副研究员鉴定部分药材。

参考文献:

广西植物研究所资源化学室, 广西医学院药理学教研组. 1978. 苦草抗肿瘤有效成分的化学和药理研究[J]. 植物研究通讯, (4): 14-17

中国科学院中国植物志编辑委员会. 1979. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 67(2): 115, 图 41

陈勇. 2000. 几种含苦玄参的中成药定性定量研究[J]. 中国现代应用药学, 17(2): 106

陈仲良, 赵佩珍. 1986. 民间药苦草(炎见宁)的研究概况[J]. 中成药研究, (6): 33

Cheng GR(成桂仁), Jin JL(金静兰), Wen YX(文永新), et al. 1982. Studies on the constituents of *Picria fel-tarreae* I. The

structure of picfeltarraegenin I[苦玄参化学成分的研究 I. 苦玄参苷元 I 的结构][J]. *Acta Chim Sin*(化学学报), 40(8): 737-746

Cheng GR(成桂仁), Jin JL(金静兰), Wen YX(文永新), et al. 1985. Studies on the constituents of *Picria fel-tarreae* VII. The structure of picfeltarraenin IA and IB[苦玄参化学成分的研究 VII. 苦玄参苷 IA 和 IB 的结构][J]. *Acta Chim Sin*(化学学报), 43(6): 374-379

Wang LS(王力生), Ma XM(马学敏), Guo YJ(郭亚健), et al. 2004. Study on the chemical constituents from *Picria fel-tarreae* (苦玄参的化学成分研究)[J]. *China J Chin Mat Med*(中国中药杂志), 29(2): 149-152

Zheng CY(郑成远), Zhong H(钟宏). 2006. Determination of picfeltarraenin IA in *Picria-fel-tarreae* by HPLC(高效液相色谱法测定不同产地苦玄参中苦玄参苷 IA 含量)[J]. *Chemical Engineer*(化学工程师), 125(2): 37-39

Zou JM(邹节明), Wu MJ(吴敏菊), Wang LS(王力生). 2005a. HPLC fingerprint of *Picria fel-tarreae*(苦玄参 HPLC 指纹图谱研究)[J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 40(9): 664-666

Zou JM(邹节明), Wang LS(王力生), Yan H(严海), et al. 2005b. Determination of picfeltarraenin IA and IB in *Picria fel-tarreae* with TLCS(TLCS 法测定苦玄参中苦玄参苷 IA 和 IB 的含量)[J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 25(6): 654-656