

• 鉴别 •

## 续断 HPLC 指纹图谱研究

刘永<sup>1</sup>, 卫莹芳<sup>1\*</sup>, 朱俊平<sup>2</sup>, 龙飞<sup>1</sup>, 郭山山<sup>1</sup>, 闫婕<sup>1</sup>, 王化东<sup>1</sup>

(1. 成都中医药大学药学院 / 中药材标准化教育部重点实验室, 四川 成都 610075; 2. 四川省乐山市人民医院, 四川 乐山 614000)

**摘要** 目的: 建立续断药材 HPLC 指纹图谱分析方法。方法: 采用 HPLC 法测定了全国不同产地 20 批续断样品。色谱条件: 色谱柱 Welchrom-C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 乙腈-水为流动相进行梯度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 212 nm, 柱温 35℃。结果: 建立了续断皂苷类成分的 HPLC 指纹图谱共有模式, 并对全国不同产地续断药材进行了相似度比较。结论: 该分析方法稳定可靠, 信息量大, 为续断药材的鉴别和质量评价与控制提供了依据。

**关键词** 续断; HPLC; 指纹图谱

中图分类号: R282.5 文献标识码: A 文章编号: 1001-4454(2010)03-0359-03

### Fingerprint Analysis of *Dipsacus asperoides* by HPLC

LIU Yong<sup>1</sup>, WEI Ying-fang<sup>1</sup>, ZHU Jun-ping<sup>2</sup>, LONG Fei<sup>1</sup>, GUO Shan-shan<sup>1</sup>, YAN Jie<sup>1</sup>, WANG Hua-dong<sup>1</sup>

(1. Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China; 2. People's Hospital of Leshan City Sichuan Province, Leshan 614000, China)

**Abstract** Objective To establish the HPLC fingerprints of *Dipsacus asperoides* for reflecting the internal information evaluating its internal quality. Methods 20 batches of *D. asperoides* were collected from different place with the HPLC fingerprints method. Chromatographic column Welchrom-C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), mobile phase acetonitrile and water (gradient elution), flow rate 1.0 mL/min, detection wavelength 212 nm, column temperature 35℃. Results The common mode of HPLC fingerprint was established and similar degrees to *D. asperoides* from different areas were compared. Conclusion The method is stable, reliable, and with full information which can be used for quality evaluation, quality control item and crude drug identification of *D. asperoides*.

**Key words** *Dipsacus asperoides*; HPLC; Fingerprint

中国药典 2005 年版一部收载续断的来源为川续断科植物川续断 *Dipsacus asperoides* C.Y. Cheng et T.M. Ai 的干燥根<sup>[1]</sup>。其化学成分复杂, 主要有皂苷类、生物碱类、环烯醚萜类、挥发油类化合物。具有补肝肾、行血、止血、安胎、续筋骨、续折伤、止崩漏的功效, 用于治疗腰膝酸软、风湿痹痛、崩漏、胎漏、跌扑损伤等症<sup>[1,2]</sup>。本实验采用高效液相色谱法, 以二元梯度洗脱模式, 对全国不同产地的 20 批续断药材进行分析对比, 确定了续断药材 HPLC 指纹图谱中的 14 个峰为共有特征峰, 运用卫生部药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)软件进行评价, 并对不同产地药材进行初步研究, 取得了较好结果, 可作为其内在质量控制和评价标准, 并确保相关产品内在质量的均一性和稳定性提供依据。

#### 1 仪器与材料

VARIAN(分析型)高效液相色谱仪。川续断皂苷 VI 对照品(批号: 111685-200401)由中国药品生

物制品检定所提供。乙腈为色谱纯, 水为重蒸水, 其余试剂均为分析纯。实验所用 20 批样品为自采或购买(来源见表 1), 经成都中医药大学卫莹芳教授鉴定均为川续断科植物川续断 *D. asperoides* C.Y. Cheng et T.M. Ai 的干燥根。

表 1 续断药材样品来源

编号	产地来源	编号	产地来源
1	四川攀枝花市大黑山	11	重庆铜梁县土桥镇
2	四川会理县关河乡	12	重庆巫溪县尖山镇
3	四川越西县普雄镇	13	云南昆明菊花村药市
4	四川宝兴县陇东乡	14	云南鹤庆县黄坪镇
5	湖北鹤峰县走马镇(栽培)	15	贵州遵义市
6	湖北鹤峰县走马镇(野生)	16	贵州安顺市紫云县
7	湖北咸丰县二仙岩	17	湖南张家界市
8	湖北长阳县贺家坪镇	18	河南南阳市
9	湖北五峰县湾潭镇	19	山东德州市
10	湖北利川县白果湾	20	甘肃兰州黄河药材市场

收稿日期: 2009-06-15

基金项目: 国家环境保护总局项目 (YSZ-428-07)

作者简介: 刘永 (1983-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药质量分析; Tel 15220824258 E-mail lys372@163.com.

\* 通讯作者: 卫莹芳, Tel 13880367509, E-mail wyfang6@163.com.

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Welchrom -C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 (A)-水 (B) 溶液梯度洗脱, 洗脱程序见表 2; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 212 nm; 柱温: 35°C; 进样量: 10 μL。

表 2 梯度洗脱程序

时间 /min	A %	B %
0	2	98
10	20	80
25	20	80
45	35	65
70	93	7
80	100	0

2.2 对照品溶液的制备 取川续断皂苷 VI 对照品适量, 精密称定, 用甲醇溶解并定容, 制成每 1 mL 含 0.374 mg 的对照品溶液, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

2.3 供试品溶液的制备 取续断粉末 (过三号筛) 1.0 g 精密称定, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 密塞, 称定重量, 超声提取 30 min 放冷, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 滤液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

## 2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验: 取同一供试品溶液, 连续进样 6 次, 考察色谱峰保留时间的一致性, 各主要色谱峰保留时间的 RSD 均小于 1%, 计算各色谱峰相似度大于 0.990 (中位数)。表明仪器精密度良好。

2.4.2 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, 考察色谱峰保留时间的一致性, 各主要色谱峰保留时间的 RSD 均小于 1%, 计算各色谱峰相似度大于 0.980 (中位数), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.3 重复性试验: 取同一编号续断药材, 照“2.3”项下方法制备供试品溶液, 平行 6 份, 依法检测, 考察各色谱峰保留时间的一致性, 结果得到的图谱能够很好的重合, 各主要色谱峰保留时间的 RSD 均小于 1%, 计算各色谱峰相似度大于 0.990 (中位数), 表明重复性良好。

2.5 样品指纹图谱测定 取续断药材 20 批, 照“2.3”项下方法制备供试品溶液, 分别取对照品溶液和供试品溶液 10 μL, 注入液相色谱仪依法检测。记录 20 批续断的 HPLC 指纹图谱, 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004A 版进行全谱的相似度评价及共有图谱拟合。20 批续断药材 HPLC 指纹图谱色谱叠加图见图 1。

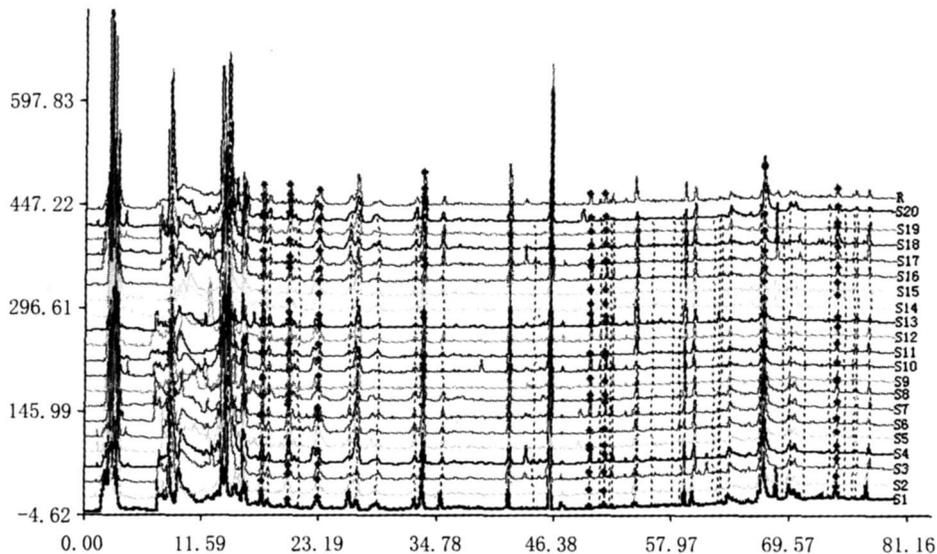


图 1 20 批续断药材 HPLC 色谱图

S1-S20. 1~20 批续断药材 R. 共有模式图

2.6 续断药材特征峰标定 根据 20 批药材的 HPLC 指纹图谱检测结果, 得到续断药材共有模式的对照 HPLC 指纹图谱 (见图 2), 共标定 14 个共有峰作为指纹图谱的特征峰, 其中 9 号峰为川续断皂苷 VI。

## 2.7 不同产地续断药材的指纹图谱相似度评价

采用相似度评价软件对 20 批不同产地续断药材进行相似度评价, 中位数相关系数依次为: 0.902, 0.907, 0.924, 0.823, 0.929, 0.966, 0.838, 0.911, 0.910, 0.867, 0.913, 0.843, 0.938, 0.952, 0.901, 0.812, 0.947, 0.916, 0.905, 0.863。结果表明, 不同产地续断药材有较好的相似度, 但也存在一定差异,

其中 4、7、10、12、16、20 号药材的相关系数小于 0.90。与其他产地药材相比, 色谱概貌有一定差别, 这是否与产地、生长年限、采收时间等因素有关, 有

待在下一步工作中继续研究。其余续断药材指纹图谱, 中位数相关系数在 0.901~0.966 之间, 说明样品之间有较好的相似度。

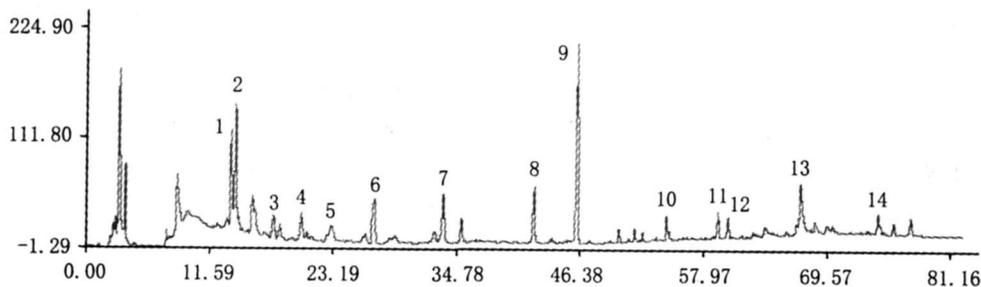


图 2 续断药材指纹图谱共有模式

9. 川续断皂苷 VI

### 3 讨论

3.1 本文初步建立了全国不同产地续断药材 HPLC 指纹图谱, 并采用 HPLC 指纹图谱对不同产地的续断药材进行了相似度评价, 不同产地续断药材有较好的相似度, 相关系数均大于 0.80。由于样品个体差异, 不同图谱特征峰的相对含量存在一定差异。初步建立了皂苷类成分的共有模式, 确定了 14 个共有峰为特征峰。该方法操作性强, 重复性好, 可作为续断药材内在质量的评价方法和控制标准。

3.2 对相关色谱条件进行了优化, 考察柱温 25℃、30℃、35℃时对分离情况的影响, 结果柱温 35℃时分离效果较好; 考察了不同波长下色谱峰的峰形、数量, 结果在 212 nm 检测波长下, 色谱图中色谱峰较多、峰形较好、信息较丰富, 故选择 212 nm 为检测波

长; 因本实验检测波长定为 212 nm, 甲醇在紫外末端吸收会影响基线的稳定性, 故采用乙腈-水体系比较合适; 本实验对各因素进行分析调整, 最终确定分离效果相对较好的梯度程序, 在该梯度下, 基线较平稳, 适合于皂苷类成分的分析。

3.3 实验中对提取溶剂 (甲醇、乙醇及不同比例的醇和水)、提取方法 (超声、回流)、提取时间等进行了考察, 确定了以上供试品溶液的制备方法。

### 参 考 文 献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 231.  
[2] 肖培根主编. 新编中药志 [M]. 第一卷. 北京: 化学工业出版社, 2001: 935.

## 《中药材》杂志征稿内容

- 1 药用植物栽培, 包括野生药材变家种, 引种药材和异地药材的引种驯化, 道地药材的研究, 培育优良品种, 防治病虫害, 改革耕作制度, 提高产量、质量, 组织培养, 药用真菌的栽培及 GAP 基地的建设等。
- 2 动物药研究, 包括药用动物的饲养和管理, 资源、生态、习性的调查与观察; 野生变家养与异地引种品种的驯化; 用新技术、新方法提高动物药的产量与质量; 动物药的药理、药化和临床实验等。
- 3 中药材鉴别, 加工炮制和商品养护。
- 4 中药资源的合理开发和利用。
- 5 中药化学, 药理与临床试验。
- 6 国外药材的生产研究成果和动向。
- 7 新技术、新方法在中药材上的应用。
- 8 基础理论讲座, 文献综述, 专论, 考证, 译文, 中药剂型改革, 制剂, 用药, 药膳, 经验以及报道中药店 (房) 的文章等。