

大孔树脂处理对芫花药材 HPLC 指纹图谱的影响

李尧尧^{1*}, 王彩芳^{1,2}, 黄兰岚^{1,3}, 钟利群⁴, 原思通¹

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 郑州大学药学院, 河南 郑州 450052;
3. 江西中医学院, 江西 南昌 330008; 4. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700)

[摘要] 目的: 考察以大孔树脂法制备供试品溶液, 对芫花药材高效液相指纹图谱的影响。方法: 对 17 批药材进行 HPLC 指纹图谱分析。供试品溶液制备方法为甲醇提取, 提取液回收试剂至干, 残渣水溶解后经大孔树脂柱层析, 收集 20%、50% 和 95% 乙醇洗脱物。以高效液相色谱法对各批药材的甲醇提取液及各洗脱物进行指纹图谱分析。色谱条件: Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水两相梯度洗脱, 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 35 ℃, 检测波长 332 nm, 记录时间 40 min。结果 甲醇直接提取所得到的共有峰为 7 个, 而经大孔树脂柱层析后 50% 乙醇洗脱物得到共有峰 11 个。结论 大孔树脂能够富集成分, 在指纹图谱中显示更多的色谱峰, 使对照图谱的指纹性增加, 采用该方法来制备供试品溶液有较为广阔的应用前景。

[关键词] 芫花药材; 大孔树脂法; 高效液相; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)06-0004-03

The Effect on HPLC Fingerprints of Flos Genkwa Prepared by Macroporous Resin

LI Rao-rao^{1*}, WANG Cai-fang^{1,2}, HUANG Lan-lan^{1,3}, ZHONG Li-qun⁴, YUAN Si-tong¹

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. College of Pharmacy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China;
3. Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China;
4. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the effect on HPLC fingerprint of Flos Genkwa which samples prepared by macroporous resin. **Method:** The fingerprints of 17 batches of Flos Genkwa were determined. The samples were extracted with methanol, then solvent were distilled off under reduced pressure. The residue were solved by water. Macroporous resin column chromatography was used for separating the water solution. Three parts of eluates, 20%, 50% and 95% ethanol eluate were obtained, separately. Then they were analyzed by high performance liquid chromatography. Chromatographic conditions: chromatographic column was Diamonsil[®] C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), mobile phase was methanol-water in gradient elute, flow rate was 1 mL·min⁻¹, column temperature was 35 ℃, detective wavelength was set at 332 nm, record time was 40 min. **Results:** 7 common peaks were obtained in methanol extract, while 11 common peaks were displayed after prepared by macroporous resin. **Conclusion:** It can show more information in HPLC fingerprint which samples prepared by macroporous resin. This is a useful method in sample preparation.

[Key words] Flos Genkwa; macroporous resin preparation method; HPLC; fingerprint

[收稿日期] 2008-05-06

[基金项目] 国家科技基础条件平台工作(2003DIATJ031)

[通讯作者] * 李尧尧, Tel: (010) 64014411-2975; E-mail: leeraoao@163.com

芫花为中医临床传统的泻下逐水药,具有泻水逐饮,解毒杀虫的功效,治疗哮喘和水肿等疾病,有毒^[1]。芫花素为芫花镇咳祛痰、杀虫的有效成分,芫花酯甲为其泻下、杀虫的有效成分,也是毒性成分^[2]。芫花药材含有多种成分,仅对这 2 个成分进行定性定量分析^[3,4]难以全面反映其药材质量。指纹图谱在整体分析药材的成分群方面具有显著的优越性。

本文采用大孔树脂处理来制备供试品溶液,以 HPLC 进行指纹图谱分析,与甲醇提取液所测得的指纹图谱^[5]比较后发现,前者能够得到更多的成分信息,表明大孔树脂在样品制备方面具有较为广阔的应用前景。

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪(600 Pump; Waters 600 Controller; Waters 996 PDA Detector) Millennium³² 色谱管理软件(美国 Waters 公司)。SEPABEADS 型大孔吸附树脂(Tokyo 100-0005, Japan)。

芫花素、羟基芫花素对照品均为自制,紫外、红外、¹H NMR、¹³C NMR 鉴定结构, HPLC 检测纯度大于 98%,符合含量测定的要求。甲醇为色谱纯,水为自制高纯水,其余试剂均为分析纯。

芫花药材共 17 批,包括市售品 15 批(河北安国 3 批,安徽亳州 2 批,广西 4 批,河南登封 3 批,河南郑州 2 批,广州清平 1 批)和采集品 2 批(均采自河南信阳),经本所原思通研究员鉴定均来源于瑞香科植物芫花 *Daphne genkwa* Sieb. et Zucc. 的干燥花蕾。

2 实验方法

2.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相 A(甲醇)-B(水)梯度洗脱, 0 min (45% A), 10 min (55% A), 20 min (65% A), 40 min (80% A), 50 min (100% A) 冲柱 30 min, 然后用 45% A 平衡柱子 30 min; 流速 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长 332 nm; 柱温 35 °C; 记录时间 40 min。

2.2 对照品溶液的制备 取芫花素对照品约 0.5 mg、羟基芫花素约 0.6 mg, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 每 1 mL 中含芫花素 0.021 6 μg · μL⁻¹、羟基芫花素 0.071 6 μg · μL⁻¹。

2.3 供试品溶液的制备 取样品约 0.5 g(过 60 目筛), 精密称重, 加入甲醇 25 mL, 超声 10 min, 滤过, 用少量甲醇洗涤残渣, 洗液并入滤液中, 回收溶剂至干, 残渣加 5 mL 水溶解, 经大孔树脂层析(= 16

mm × 400 mm), 依次以 20%、50% 和 95% 乙醇各 500 mL 洗脱, 各洗脱液回收溶剂至干, 其中 20% 和 50% 部位的残渣加 50% 乙醇溶液 10 mL 定容, 95% 部位的残渣加甲醇 5 mL 定容, 取各部位溶液过 0.45 μm 的微孔滤膜, 即得。

2.4 精密度试验 取样品(购自安徽亳州) 0.5 g 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 精密吸取 10 μL 50% 乙醇洗脱部位, 照 2.1 项下的色谱条件连续进样 5 次, 测定指纹图谱, 计算 11 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%, 表明仪器性能良好。

2.5 重复性试验 取同一样品 5 份, 按照 2.3 项下方法分别制备供试品溶液, 分别精密吸取 10 μL 50% 乙醇洗脱部位, 照 2.1 项下的色谱条件分别进样, 测定指纹图谱, 计算 11 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%, 表明该制备方法稳定。

2.6 稳定性试验 取同一样品, 照 2.1 项下的色谱条件, 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样, 测定指纹图谱, 11 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%, 表明样品溶液在 12 h 内稳定性较好。

2.7 样品测定 取 17 个样品按照 2.3 项下的方法制备, 得到各样品的甲醇提取液, 20%、50% 和 95% 乙醇洗脱部位; 按照 2.1 项下的色谱条件进样, 对照品和各样品的色谱图见图 1 和图 2。

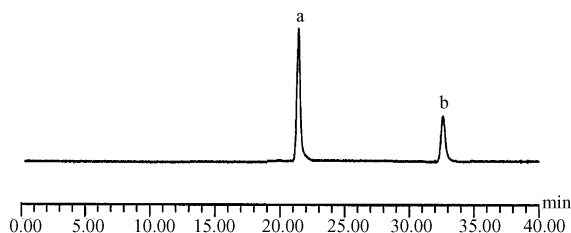


图 1 对照品图谱
a 羟基芫花素; b 芫花素

2.8 相似度评价及指纹图谱的分析 参照有关指纹图谱的技术要求^[6], 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》对 17 批样品色谱图的原始数据文件(输出格式为 aia)进行分析, 自动匹配, 并以 17 批样品 50% 乙醇洗脱部位图谱生成的对照谱图(中位数法)作为对照模板, 得到芫花药材的对照指纹图谱, 见图 3。根据匹配结果确定了 11 个共有峰, 经计算各色谱图中共有峰总面积占有所有色谱峰面积比在 90% ~

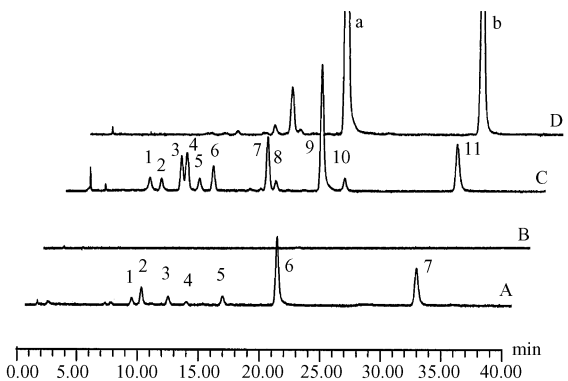


图 2 芫花药材样品指纹图谱

A 甲醇提取液; B 20% 乙醇; C 50% 乙醇; D 95% 乙醇
a 羟基芫花素; b 芫花素

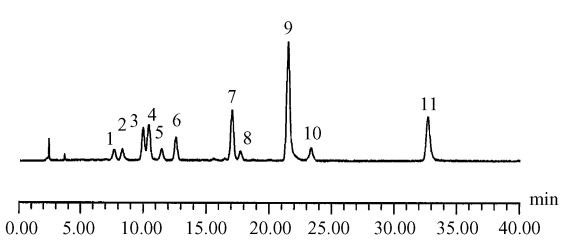


图 3 芫花药材对照指纹图谱

95%。各地样品的 50% 乙醇洗脱部位的相似度结果见表 1。

表 1 17 批芫花药材 50% 乙醇指纹图谱相似度结果

编号	相似度	编号	相似度
1	0.964	10	0.924
2	0.952	11	0.941
3	0.910	12	0.947
4	0.952	13	0.956
5	0.963	14	0.945
6	0.957	15	0.963
7	0.922	16	0.912
8	0.937	17	0.942
9	0.954	—	—

3 讨论

3.1 溶剂的选择 由于黄酮苷和黄酮苷元均易溶解于甲醇, 因此选择甲醇为提取溶剂; 由于乙醇比甲醇毒性低, 因此本实验选择不同浓度的乙醇为洗脱

溶剂。

3.2 大孔吸附树脂的选择及残留物的考察 分别考察了 SEPABEADS SP-850 型和 SEPABEADS SP-825 型, 结果显示 SP-850 型大孔树脂的富集效果优于 SP-825 型。本实验对 3 个部位的空白试验进行了 HPLC 分析, 结果显示均无样品中的色谱峰。

3.3 图 2 所给出的 3 个洗脱部位为各地样品的特征性图谱。图中可以看出甲醇提取液直接进样所测得的指纹图谱中仅标定了 7 个共有峰; 甲醇提取物经大孔树脂柱层析后, 20% 乙醇洗脱部位几无色谱峰, 50% 乙醇洗脱部位标定了 11 个色谱峰, 95% 乙醇洗脱部位标定了 3 个色谱峰, 表明了 50% 乙醇洗脱部位能够富集芫花药材的成分, 因此确定该部位为有效部位。表 1 结果显示 17 批样品 50% 乙醇洗脱部位的色谱图与对照指纹图谱相似度均大于 0.9, 表明相似度良好。

3.4 前文报道^[5] 以甲醇提取的方法建立了芫花药材的 HPLC 指纹图谱, 标定了 7 个共有峰; 本实验显示, 样品经大孔树脂处理后, 50% 乙醇洗脱部位的共有峰数目增至 11 个, 表明大孔树脂对本品的化学成分有较好的富集能力, 可以提高药材鉴别的专属性。

3.5 本供试品溶液制备方法稳定, 具有较好的重现性。在本实验中仅指认了芫花素和羟基芫花素的色谱峰, 如果能够对其他色谱峰进行指认并确定多个成分的相对含量比, 对芫花药材的质量控制将具有更加积极的意义。

[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: 109.
[2] 张保献, 原思通, 张静修, 等. 芫花的现代研究概况[J]. 中国中医药信息杂志, 1995, 2(10): 21-23.
[3] 雷沛霖, 李姚姚, 原思通. 芫花药材质量标准研究[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(5): 91-94.
[4] 黄兰岚, 李姚姚, 原思通, 等. 不同产地芫花药材中芫花酯甲含量比较[J]. 中成药, 2008, 30(10): 附 10-12.
[5] 田元子, 李姚姚, 雷沛霖, 等. 高效液相色谱——二极管阵列检测法测定芫花药材指纹图谱[J]. 时珍国医国药杂志, 2009, 20(4): 863-864.
[6] 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)[S]. 中成药, 2000, 22(10): 671-675.