

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2011.06.003

山东肿足蕨高效液相色谱指纹图谱初步研究*

张华丽 朱 军 高桂花

(济宁医学院药学院, 山东 日照 276826)

摘 要 **目的** 建立山东肿足蕨药材的高效液相色谱指纹图谱,为其质量控制提供参考。**方法** 采用高效液相色谱(HPLC)法,色谱柱 VP-ODS,流速 1 ml/min,检测波长 215nm,柱温 25℃,用乙腈和水作为流动相,梯度洗脱,测定了 10 批山东肿足蕨样品。**结果** 得到了山东肿足蕨 HPLC 指纹图谱。**结论** 用文中的最佳条件可较全面地反映山东肿足蕨中的成分,为山东肿足蕨药材的质量控制提供参考。

关键词 山东肿足蕨;高效液相色谱法;指纹图谱

中图分类号:R917 **文献标志码**:A **文章编号**:1000-9760(2011)12-389-03

HPLC Fingerprint Spectrum of Hypodematium sinense Iwatsuki

ZHANG Hua-li, ZHU Jun, GAO Gui-hua

(Pharmaceutical college, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

Abstract: Objective HPLC fingerprint spectrum of Hypodematium Sinense Iwatsuri was established in order to provide reference for its quality control. **Methods** RP-HPLC (DAD) was used in the determination of Hypodematium Sinense Iwatsuri by gradient elution under the following condition: column of VP-ODS, flow rate of 1mL/min, detection wavelength of 215 nm, temperature of 25℃ and acetonitrile and water as mobile phase. 10 batches of Hypodematium Sinense Iwatsuri were determined. **Results** A preferable method for HPLC fingerprint determination of the Hypodematium Sinense Iwatsuri was established. **Conclusion** A general acquaintance of the Hypodematium Sinense Iwatsuri can be obtained by using the preferable HPLC fingerprint determination method, which is useful for quality valuation of the Hypodematium Sinense Iwatsuri.

Key words: Hypodematium Sinense Iwatsuri, HPLC, Fingerprint Spectrum

山东肿足蕨(Hypodematium sinense Iwatsuri),为金星蕨科肿足蕨属植物,生长于鲁西南的山坡石缝中,民间俗称“治晕草”,仅此一味药(全药)水煎服,能治疗头晕、恶心、呕吐等症,为济宁医学院于 20 世纪 70 年代发现的新药用植物。经实验证明,该药具有抑制肠平滑肌收缩,降低血压,抑制中枢神经和抗乙酰胆碱等作用^[1]。进一步研究发现,山东肿足蕨有明显的抗生育作用,对豚鼠离体妊娠子宫肌有明显的兴奋作用,对妊娠豚鼠终止妊娠率为 94%^[2]。经初步临床实验,口服该药的水煎剂,对 S 梅尼埃综合征有效率为 95.11%,对胃神经官能症也有较高的疗效。经实验验证^[3],山东肿足蕨含有黄酮甙、三萜成分、酚性成分以及糖类、鞣质、生物碱等化学成分。由于人们对此药物药用用途认识的较晚,所以其有效成分的研究,尚有待进行。

目前国家药典采用定性或定量测定中药材中活性成分或有效成分来评价其质量,但研究证明,中药的疗效是来自其多种“活性成分”之间的协同作用,甚至是“非活性成分”之间的协同作用或“生克作用”。中药及其制剂均为多组分复杂体系,因此评价其质量应采用与之相适应的,能提供丰富鉴别信息的检测方法,建立中药指纹图谱将能较为全面地反映中药及其制剂中所含化学成分的种类与数量,进而对药品质量进行整体描述和评价。本实验拟建立山东肿足蕨的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,为山东肿足蕨的质量标准提供参考。为民医用药,道地药材的开发应用提供科学的依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

山东肿足蕨药材样品共 10 批(见表 1),济宁医学院中药学教研室鉴定为山东肿足蕨(Hypodematium sinense Iwatsuri),去泥后干燥,将全

* [基金项目]济宁医学院 2008 年青年科研基金项目

草、分离的根、茎、叶、分别粉碎,粗粉过筛后备用;乙腈(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);甲醇(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);乙醇(分析纯,烟台三和化学试剂有限公司);自制重蒸水。

表1 山东肿足蕨药材样品来源

样品号	样品来源	样品号	样品来源
1	山东嘉祥虎头山	6	山东曲阜尼山
2	山东嘉祥鹰山	7	山东曲阜尼山书院桥
3	山东嘉祥磨山	8	山东曲阜曼山
4	山东嘉祥青山	9	山东曲阜尼山头
5	山东嘉祥固山	10	山东邹城五里山

1.2 仪器设备

BS110S 电子天平(北京塞多利斯天平有限公司,Max 为 110g,d=0.1mg);FW135 型中药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);电动吸引器(上海医疗器械工业集团公司医用吸引器厂);KQ-500DB 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);电热恒温水浴锅(北京市长风仪器仪表公司);TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津制造所)。

2 实验方法

2.1 色谱条件

色谱柱:VP-ODS,流动相:乙腈(B),水。梯度洗脱:0~60min 10%~15%B,检测波长:215nm。流速:1 ml/min;柱温:25℃。

2.2 供试品溶液的制备

山东肿足蕨药材均匀粉碎,取药材粉末 5g,精密称定,置圆底烧瓶中,加 70%甲醇 60ml,88℃下回流 1.5h,滤过,定容在 100 ml 容量瓶中,用微孔滤膜(0.45μm)滤过,即得。

2.3 重复性实验

取编号为 1 的样品 5 份作为供试品溶液,依法检测,考察共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的一致性。结果见表 2,表 3,其相对保留时间的 RSD 小于 3%,主要共有峰面积的 RSD 不超过 5%,表明其重复性良好。

表2 重复性试验结果(保留时间)

峰号	第1次	第2次	第3次	第4次	第5次	平均值	RSD/%
1	13.259	13.168	13.649	13.144	13.048	13.254	1.8
2	27.439	25.743	26.315	27.115	27.697	26.862	3.0
3	38.138	38.896	38.661	38.858	39.439	38.798	1.2
4	57.576	58.514	57.739	56.382	57.046	57.451	1.4

表3 重复性试验结果(峰面积)

峰号	第1次	第2次	第3次	第4次	第5次	平均值	RSD/%
1	1179794	1127197	1106952	1169074	1197117	1156027	3.3
2	1321574	1331647	1354679	1364891	1389478	1352454	2.0
3	769560	747307	755049	767951	759601	759893.6	1.2
4	1246368	1192723	1262451	1231574	1277688	1242161	2.6

2.4 稳定性实验

取编号为 1 的样品作为供试品溶液,每间隔 2 h 检测 1 次,考察共有色谱峰的相对保留时间及相对峰面积的一致性。结果见表 4,表 5,其共有色谱峰的相对保留时间的 RSD 均小于 5%,相对峰面积的 RSD 均小于 5%,初步判断供试品溶液在 10 h 内基本稳定。

表4 稳定性试验结果(保留时间)

峰号	第1次	第2次	第3次	第4次	第5次	平均值	RSD/%
1	13.269	13.154	13.628	13.121	13.448	13.324	1.6
2	27.237	25.523	25.453	27.215	27.689	26.6234	3.9
3	38.238	38.764	38.612	38.864	39.954	38.8864	1.7
4	57.448	58.525	57.238	56.394	57.125	57.346	1.3

表5 稳定性试验结果(峰面积)

峰号	第1次	第2次	第3次	第4次	第5次	平均值	RSD/%
1	1169569	1137684	1107562	1234155	1205694	1170933	4.3
2	1322361	1296515	1258910	1326984	1389478	1318850	3.2
3	762598	757307	765892	767951	726891	756128	2.2
4	1205889	1103269	1226894	1123659	1207603	1173463	4.8

2.5 山东肿足蕨药材样品的测定及指纹图谱的确立

按 2.1 所示液相色谱条件测定 10 批山东肿足蕨药材,根据各样品图谱中色谱峰相对保留时间、相对峰面积标定共有峰,建立山东肿足蕨药材的标准指纹图谱,如图 1 所示。

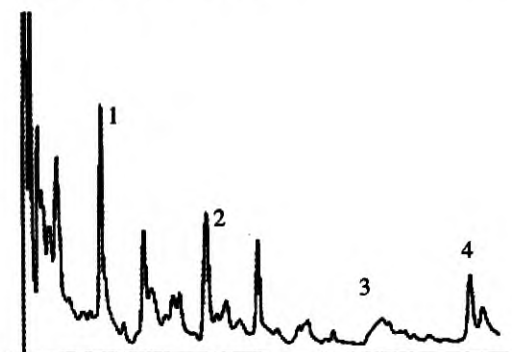


图1 山东肿足蕨的 HP LC 图谱

3 结果与讨论

3.1 山东肿足蕨药材指纹图谱分析

参照峰的选择^[4]:根据 10 批供试品 HPLC 图谱所给出的相关参数,山东肿足蕨药材各类成分的色谱峰在 60min 之内基本全部出现。共标出 4 个共有峰,从指纹图谱中可以得出 1 号峰(保留时间)≈13min,相对峰面积比较大,比较稳定,故选择 1 号峰为参照峰。

共有峰的分析:不同产地肿足蕨药材指纹图谱较为相似,但其中个别峰为某产地品种特有峰,对于其特有峰无法进行较为准确的考察。对 10 批肿足蕨药材进行分析,结果如表 6,表 7 所示,以 1 号峰作为参照峰,各指纹峰的峰面积及相对峰面积、保留时间及相对保留时间均具有较好的重现性。但指纹峰的峰面积相差较大,可能是不同产地的药材成分含量不同所致。

表 6 10 批山东肿足蕨药材主要特征峰相对保留时间

峰号	样品										平均值	RSD/%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.0
2	2.063	2.048	2.066	2.039	2.038	2.051	2.054	2.059	2.053	2.031	2.050	0.55
3	2.551	2.569	2.478	2.234	2.236	2.484	2.485	2.483	2.452	2.444	2.442	4.7
4	4.639	4.004	4.453	4.209	4.027	4.491	4.233	4.325	4.188	4.176	4.275	4.5

表 7 10 批山东肿足蕨药材主要特征峰相对保留面积

峰号	样品										平均值
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
2	0.391	0.306	0.144	0.517	0.520	0.423	0.160	0.272	0.419	0.778	0.393
3	0.309	0.555	0.305	0.607	0.614	0.346	0.156	0.222	0.337	0.231	0.368
4	0.227	0.501	0.037	0.699	0.703	0.567	0.309	0.356	0.562	1.793	0.575

3.2 讨论

3.2.1 提取方法的比较 对于山东肿足蕨的提取方法,试验比较了水浴回流、超声和冷浸 3 种提取方法对山东肿足蕨的提取效果^[5],根据高效液相色谱图最终确定水浴回流的效果最佳。提取溶剂对甲醇和乙醇的提取效果进行了考察,得到的色谱峰并无较大差异,鉴于甲醇的毒性较大,最终选用乙醇作为提取溶剂。

3.2.2 检测波长的选择 本实验采用 215nm 作为检测波长,是为了兼顾各个峰的吸收及峰形及分离效果。文献报道^[6]采用 230nm、300 nm 或 330nm 等进行测定。为了反应药材化学成分的全

貌,可使用不同的检测波长,突出各个特征峰,相互参照辨认,并可避免图谱中仅有一种成分偏高的现象。且在 215nm 波长下各峰的分离效果较好,因此实验选用 215nm 作为检测波长。

3.2.3 流动相的选择 依据文献^[7],实验中考察了甲醇—水、乙腈—水、乙腈—磷酸水、甲醇—磷酸—水等多种流动相系统,实验结果表明,流动相中加入磷酸分离效果无明显差异,在乙腈—水条件下各色谱峰的分离度较好,且加入磷酸时基线漂移程度较大,故选用乙腈—水作为流动相。曾尝试过等度洗脱的可行性,对 30%、50%、70% 的甲醇,50%、70% 的乙腈进行过考察,结果分离度、峰形等均不如梯度洗脱理想,因此选用梯度洗脱。本文的流动相先后考察了多个不同梯度洗脱,如 0~60min 10%~90% 乙醇、0~60min 10%~20% 乙腈、0~60min 10%~15% 乙腈,结果本文所用的梯度最佳。

3.2.4 进样量的选择 分别进样 5μl,10μl,20μl,结果表明进样量 10μl,即可满足要求。柱流速选择:结合文献考察了流速 0.8ml/min 和 1ml/min 发现流速 1ml/min 为佳。

4 结论

本课题初步研究了山东肿足蕨的指纹图谱,要满足对山东肿足蕨的全面质量管理,需要建立能够反映山东肿足蕨内在质量的、全面的色谱指纹谱,仍需进行进一步的实验探索和研究。

参考文献:

[1] 凌秀珍,张鸿祺,刘善庭,等. 山东肿足蕨药理作用初步研究[J]. 济宁医专学报,1978,1(1):31.
[2] 王家英,张其楨. 山东肿足蕨对梅尼埃综合征与胃神经官能症的治疗研究[J]. 济宁医专学报, 1978. 1(1):24.
[3] 山东肿足蕨抗生育作用研究协作组. 山东肿足蕨抗生育作用实验研究[J]. 济宁医专学报,1981,4(1):1.
[4] 王少军,段启,曹君,等. 茯苓皮中三萜酸类成分 HPLC 指纹图谱的方法学研究[J]. 中药新药与临床药理,2005,16(1): 53-55.
[5] 栗晓黎,林瑞超,王兆基,等. 中药鬼臼毒性成分 HPLC/ UV 指纹图谱分析方法研究及与威灵仙、龙胆 HPLC 图谱比较[J]. 中成药,2000,12(22):819-824.
[6] 王爱民,王永林,兰燕宇,等. 荭草药材指纹图谱的研究[J]. 中成药,2006,28(1):5-7.
[7] 田兰,程海燕,陈晓辉. 黄芩药材的 HPLC 指纹图谱[J]. 沈阳药科大学学报,2008,25(12):979-982.

(收稿日期 2011-11-15)