

HPLC 技术在民族医药 植物信息规范化中的应用

谭睿¹ 茆灿泉¹ 李迪强²

(1. 西南交通大学生命科学与工程学院, 四川成都 610031

2. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 北京 100015)

摘要: HPLC 指纹技术是利用高效液相色谱仪, 宏观分析研究对象复杂的化学特征信息, 以整体性和模糊性原则定性定量反映医药植物遗传物种差异性和后天个体差异性的技术。应用于自然保护区民族医药植物信息规范化研究中, 建立自然保护区内民族医药植物化学指纹图谱, 为保护区生物标本标准化整理、整合及共享试点提供基础数据参考有积极意义。

关键词: HPLC; 化学指纹; 自然保护区; 民族医药植物; 规范化

中图分类号: R284 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3772/j.issn.1674-1544.2008.05.012

Application of HPLC Fingerprints in the Information Standardization of Folk Medicinal Plants in Nature Reserve

Tan Rui¹, Mao Canquan¹, Li Diqiang²

(1. School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031

2. Institute of Forest Ecological Environment and Protection,
Chinese Academy of Forest Sciences, Beijing 100015)

Abstract: HPLC fingerprint is a kind of technology using high-performance liquid chromatography, with the macro-analysis of the complex chemical characteristics of the object information, reflecting the genetic species diversity and the individual acquired difference in the qualitative and quantitative way with the principles of integrity and ambiguity. It is used in the study of HPLC fingerprint technology on national medicine plant information standardization in nature reserve, establishing chemical fingerprint of pharmaceutical plant and has positive influence on standardization collation, integration and sharing of biological samples, which provides basic reference data.

Keywords: HPLC, chemical fingerprint, nature reserve, folk medicinal plant, standardization

第一作者简介: 谭睿(1969-), 女, 教授, 研究方向是中药材、藏药材、中成药质量标准规范化; 中药复方及藏药材物质基础。
基金项目: 国家科技部自然科技资源平台子项目“自然保护区生物标本整理、整合与共享试点”(2005DKA21404)。
收稿日期: 2008年9月1日。

1 引言

药用植物化学指纹技术中“指纹”一词借用法医学指纹鉴定的概念,表明图谱具备不同种之间的绝对唯一性和同种不同个体之间的相似可比性。这种具有物种唯一性和个体相似性的图像即具有了指纹意义,可以鉴定辨别药用植物的真伪优劣,而且从整体和实际出发反映在一定条件下其内部的完整特征化学信息,强调同一群体的相似性,即物种群体内的相似性。

化学指纹图谱技术可分为光谱(波谱)和色谱指纹图谱技术,其中色谱指纹图谱技术具有分离和鉴别的双重功能,真实、有效地从整体角度反映样品内部化学特征信息,集系统性、概率统计性和多元性互补于一身^[1]。近年来,越来越多地从化学计量学、系统生物学、药效学等多学科的研究角度,为药用植物化学成分和质量鉴定研究、药用植物化学成分和药效功能研究之间搭建了重要的桥梁。其中应用最为广泛的是HPLC(高效液相色谱指纹图谱技术)。以其为基础,将来源控制、标准色谱指纹图谱系统、药效信息和药动信息研究结果综合整理归纳,形成现代药用植物标准色谱指纹图谱综合数据信息系统,是药用植物信息规范化研究的方向。

目前,全国各自然保护区内部分道地药材和民族医药药材的原植物HPLC化学指纹图谱多有测定研究,但大多是分析考察药材本身,少见从资源整合角度出发考虑合理开发利用的综合研究,而对于道地药材、民族医药药材基础数据信息的整理整合、标准化,许多省市自然保护区多是提出了概念设想,对于系统化各种关键技术,综合化多种信息数据形成综合数据库共享和实施应用则鲜有报道^[2-3]。全面开展自然保护区重要药用植物,尤其是民族药用植物和道地药用植物的化学指纹并结合基因指纹的分析测定,不仅可为自然保护区民族医药植物标本物种分类、种质资源鉴定和多样性分析提供化学指纹信息描述,为民族医药植物标本的完整性描述提供关键信息补充,同时也为自然保护区民族医药植物的保护利用和标本的可持续采集、整理和共享工作

开展提供参考和依据,可为药用植物的真伪性、优劣性、稳定性和一致性的评价和质量控制、资源的合理开发利用以及民族医药知识有效传承打下重要基础,具有现实的意义和价值。

2 确立分析方法

(1)对照和供试品的制备

选取药用植物已知化学成分作为对照品进行参照,供试品溶液的制备则根据该药用植物的具体理化性质选择适宜的前处理方法。常采用的前处理方法有:加热回流提取法、超声提取法、索氏提取法。吸取处理好的供试品溶液10 μ l,注入高效液相色谱仪,记录色谱图,从色谱峰的保留时间、峰面积、峰数量等数据分析提取时间、提取溶剂因素对分离效果的影响,确定最佳前处理条件。

(2)色谱条件的优化^[4-5]

流动相的选择:常用的有乙腈、甲醇、乙醇、四氢呋喃、氯仿、二氯甲烷、正己烷等。反相高效液相,以乙腈-水系统较适合梯度洗脱。在流动相中可加入磷酸、乙酸、三乙胺、二乙胺、正丁基溴化胺、十二烷基磺酸钠等各种改性剂,或采用磷酸-磷酸氢二钠/磷酸二氢钠、乙酸-乙酸钠缓冲溶液,以达到改善色谱峰分离程度及改善峰形的目的。样品中如有部分成分的极性较小,在流动相中可加入少量异丙醇、四氢呋喃、氯仿、环糊精等。对黄酮类、酚酸类成分可参考选择乙腈-水-酸系统的流动相;对皂苷类成分可参考选择乙腈-水系统的流动相,生物碱类成分可参考选择乙腈-水-三乙胺等系统的流动相。

检测波长的选择:参照样品的全波长紫外线吸收图,选择吸收峰值;参照对照品的全波长紫外线吸收图,选择吸收峰值。若一个检测波长下的色谱图不能达到控制质量的目的,可建立多个检测波长下的指纹图谱。

柱温的选择:柱温的选择与恒定是影响指纹图谱技术稳定的主要因素之一。当色谱图某个色谱峰因溶解度差而峰形较“钝”时,可适当提高柱温(30 $^{\circ}$ C~50 $^{\circ}$ C);如样品中组成成分在常温或高温下不稳定,易发生水解、分解等变化时,可降低

柱温。

色谱柱的选择^[6]：不同厂家的色谱柱由于采用的填料不同，柱效相差较大。即使流动相条件一致，用不同填料的色谱柱重复测试时，不仅分离效果大不相同，而且保留时间的迁移程度也比较明显。由于药用植物样品的复杂性，一方面所含成分极性高低不等，另一方面部分成分结构相似，极性相差不大，分离比较困难，因此选择色谱柱时应以主要成分得到分离为目的，柱效不宜过高。同时要考虑填料的稳定性和载样量。指纹图谱一般选用 5~10 μ mC18 填料柱，以 4.6mm \times 250mm 较适宜，其他特殊的色谱柱，如氨基柱、腈基柱、酸性柱、碱性柱等，可视研究对象的不同而采用。

进样量的选择：对指纹图谱的结果影响不大，加大进样量，可以减弱梯度洗脱时基线漂移的程度。色谱柱的载样量有一定的限度。进样量应控制最高色谱峰的吸收值在 1000mAU 以下适合。当等度洗脱时，基线平稳，进样量较平稳，进样量应尽量减少，一般控制最高色谱峰的吸收值在 100mAU 左右，不宜超过 500mAU。

(3) 方法学验证

通过精密度实验、稳定性实验和重复性实验等实验，来保证所建立的实验方法稳定、可靠。按规定，精密度实验、稳定性实验和重现性实验中各共有峰的相对保留时间、保留面积的 RSD 均应小于 3%。

3 指纹图谱的定性定量分析

归纳出各批合格样品所共有峰面积相对稳定的色谱峰作为指纹峰。保证样品的代表性，确保所建立的指纹图谱的药效性。

共有指纹峰的标定：根据 10 次以上的检测结果，标定共有峰。色谱法采用相对保留时间标定指纹峰，色谱峰的相对保留时间根据参照物的保留时间计算，并允许有一定的幅度范围。通过比较、分析，找出各品种之间指纹图谱的共性和特性。

共有指纹峰面积的比值：以对照品作为参照物的指纹图谱，以参照物峰面积作为 1，计算各共

有指纹峰面积与参照物峰面积的比值；以内标物作为参照物的指纹图谱，则以共有指纹峰中一个峰(要求峰面积相对较大、较稳定的共有峰)的峰面积作为 1，计算其他各共有峰面积的比值。各共有指纹峰的面积比值必须相对固定，并允许有一定的幅度范围。色谱法必须标定相对保留时间，未达基线分离的共有峰，应计算该组分峰的总面积积作为峰面积，同时标定该组各峰的相对保留时间。

非共有峰面积：供试品图谱与指纹图谱比较，计算 10 批次以上供试品图谱中非共有峰总面积及占总峰面积的百分比，列出各批供试品的检测资料。非共有峰总面积一般不得大于总峰面积的 10%。

4 应用实例

以下为部分民族医药植物指纹图谱实例，采自四川省峨眉山保护区。由西南交通大学药学院宋良科副教授鉴定。

(1) 藜菜不同部位 HPLC 指纹图谱 色谱条件

表 1 藜菜色谱条件

供试品	S1 叶部供试品溶液;S2 茎部供试品溶液								
色谱 条件	流动相	乙腈(B) - 水(A)							
	色谱柱	Dimonsil C18(5 μ , 250mm \times 4.6mm)							
	检测波长	250nm	进样量		30 μ l				
	流速	0.8ml/min	柱温		20 $^{\circ}$ C				
	梯度洗脱	Time (time)	0	10	20	40	50	60	65
	程序	B. Content (%)	10	15	17	40	50	60	Stop

(2) 地锦草不同部位 HPLC 指纹图谱 色谱条件

表 2 地锦草色谱条件

供试品	S1 叶部供试品溶液;S2 茎部供试品溶液								
色谱 条件	流动相	乙腈(B) - 0.5% 磷酸水溶液(A)							
	色谱柱	Dimonsil C18(5 μ , 250mm \times 4.6mm)							
	检测波长	250nm	进样量		20 μ l				
	流速	1.0ml/min	柱温		25 $^{\circ}$ C				
	梯度洗脱	Time (time)	0	10	20	45	65	75	80
	程序	B. Content (%)	15	20	25	35	45	55	Stop

HPLC 图谱

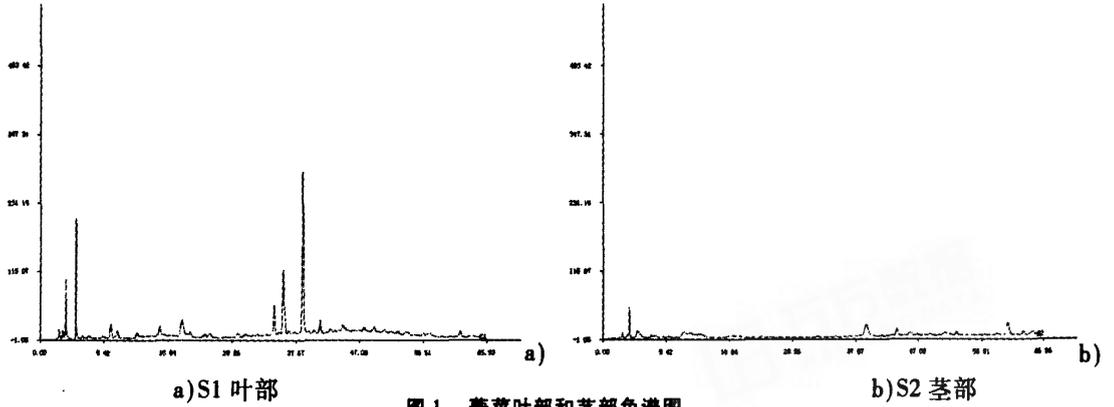


图 1 蕤菜叶部和茎部色谱图

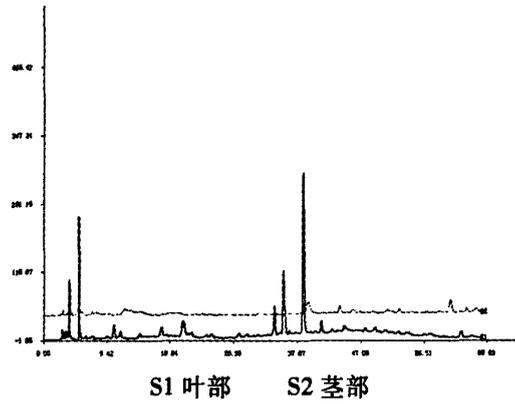


图 2 蕤菜叶部和茎部
色谱图叠加对比

HPLC 图谱

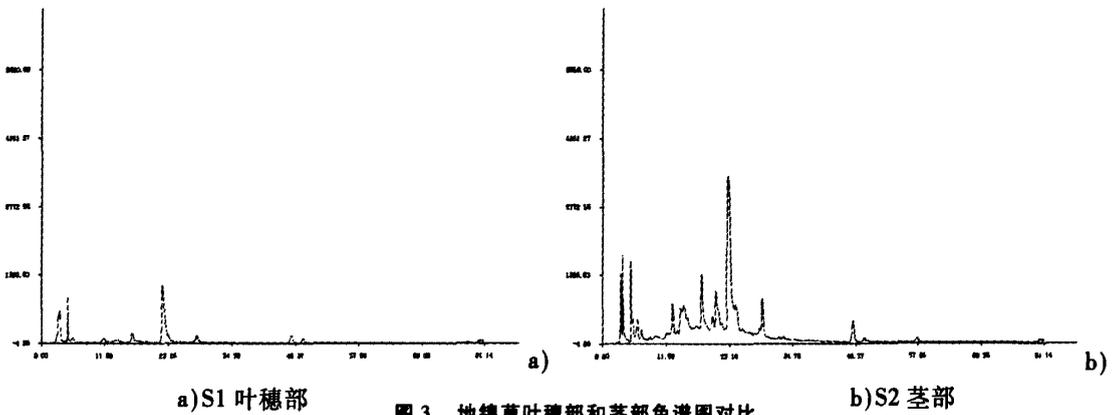


图 3 地锦草叶穗部和茎部色谱图对比

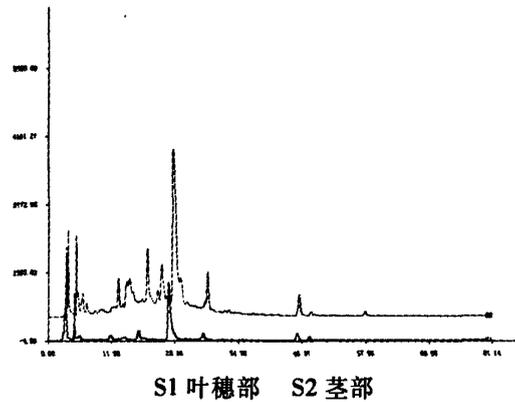


图 4 地锦草不同部位
供试品色谱图叠加对比

5 讨论

对于同一植物不同部位供试品,各部位间其化学成分组种类和含量有较大差异,蕺菜叶部化学成分组数量明显多于茎部,地锦草茎部化学成分组数量明显多于叶穗部。同时在对药材不同部位进行考察中,需要综合考虑色谱条件优化和不用部位样品适宜性,以分析目的为原则确定适宜的部位优化色谱分离条件,尤其是梯度洗脱程序,确定最佳色谱条件对同一药材不同部位进行质量控制,使该条件下色谱图在足够反映不同部位间差异基础上充分反映药材成分全貌,并对其匹配计算和相似度计算,确定匹配色谱峰数目,保留时间 RSD,匹配峰峰面积 RSD,相似度和不同部位样品成分相对趋势等,以获得对其化学成分组成和含量的较全面认识。

通过应用实例,我们试图通过常用高效液相色谱技术,用色谱指纹特征和量化参数表征其相对化学组成和结构等化学特征,快速对原植物内

化学成分物质群分类辨识,并进行定性定量分析,依据整体性和模糊性原则对药用植物质量真伪性、优劣性、稳定性和一致性进行评价。

参考文献

- [1] 谢培山. 中药色谱指纹图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.
- [2] 屈景辉, 廖琪梅, 张星. 指纹图谱数据库建立技术[J]. 医学信息, 2006, 19(2): 190 - 191.
- [3] 王青, 曹进, 叶光波, 车镇涛. 中药复方初级指纹图谱库的建立和应用[J]. 中医药学刊, 2006, 24(4): 659 - 662.
- [4] 李发美. 医药高效液相色谱技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999.
- [5] 周五新. 中药指纹图谱研究技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [6] Natalie Lazarowych. Use of Fingerprinting and Marker Compunds for Identification and Standardization of Botanical Drugs: Strategies for Applying Pharmaceutical HPLC Analysis to Herbal Products[J]. Drug Information Journal, 1998(32): 497 - 512.