

新疆一枝蒿药材双波长 HPLC 指纹图谱的研究

张逸凡¹, 鲍凤霞¹, 夏振江^{2*}, 尚 靖^{1**}

(¹中国药科大学中药学院,南京 211198; ²南京大学环境学院,污染控制与资源化研究国家重点实验室,南京 210023)

摘要 建立新疆一枝蒿药材双波长 HPLC 指纹图谱的测定方法,为药材质量标准提升提供科学依据。采用 HPLC 法, Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温32 °C;流动相:甲醇-0.2% 甲酸水梯度洗脱;流速1.0 mL/min;检测器:DAD 检测波长245 和 325 nm;进样量20 μL。建立了新疆一枝蒿的 HPLC 指纹图谱,分别在245 和 325 nm 处确定了7 个和 8 个共有峰,并确证了槲皮素、绿原酸、木犀草素、芹菜素、蔓荆子素5 个色谱峰,9 批次新疆一枝蒿药材与生成对照指纹图谱的相似度大于0.9。首次建立了新疆一枝蒿药材双波长 HPLC 指纹图谱,所建立的指纹图谱测定方法精密度、稳定性和重复性良好,可用于新疆一枝蒿药材的鉴别和质量控制。

关键词 新疆一枝蒿;HPLC;双波长;指纹图谱;质量控制

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2020)02-0175-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20200207

引用本文 张逸凡, 鲍凤霞, 夏振江, 等. 新疆一枝蒿药材双波长 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中国药科大学学报, 2020, 51(2): 175–179.
Cite this article as: ZHANG Yifan, BAO Fengxia, XIA Zhenjiang, et al. HPLC dual-wavelength fingerprint of *Artemisia rupestris* L. [J]. *J China Pharm Univ*, 2020, 51(2): 175–179.

HPLC dual-wavelength fingerprint of *Artemisia rupestris* L.

ZHANG Yifan¹, BAO Fengxia¹, XIA Zhenjiang^{2*}, SHANG Jing^{1**}

¹School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198;

²State Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210023, China

Abstract To establish HPLC dual-wavelength fingerprint of *Artemisia rupestris* L., and provide a scientific basis for the improvement of its quality specifications. The separation was performed on an Agilent Zorbax SB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column maintained at 32 °C, with methanol-0.2% formic acid-water gradient elution at flow rate of 1.0 mL/min and the UV detection wavelength at both 245 and 325 nm. The sample injection volume was 20 μL. The fingerprint of *Artemisia rupestris* L. was established. 7 and 8 common peaks were found, respectively, of which 5 common peaks were identified, and the similarity among 9 batches of *Artemisia rupestris* L. and the fingerprints of control was over 0.9. The HPLC dual-wavelength fingerprint of *Artemisia rupestris* L. was established for the first time, providing a new scientific basis for its identification and quality control.

Key words *Artemisia rupestris* L.; HPLC; dual-wavelength; fingerprint; quality control

This study was supported by the Youth Program of National Natural Science Foundation of China (No. 41907365) and the Open Project Program of Qinghai Key Laboratory of Tibetan Medicine Pharmacology and Safety Evaluation (No. 2019-ZY-02)

新疆一枝蒿是菊科蒿属植物岩蒿 *Artemisia rupestris* L. 的全草,是新疆特有的一到多年生药用

草本植物,主要分布于新疆天山、阿尔泰山等地区,具有清热解毒、抗过敏^[1]、抗病毒^[2]、以及抗肿瘤

收稿日期 2019-12-05 通信作者 * Tel: 15261895299 E-mail: 15261895299@126.com

** Tel: 13813881587 E-mail: shangjing21cn@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金青年科学基金项目(No. 41907365);青海省藏药药理学和安全性评价研究重点实验室开放课题基金(No. 2019-ZY-02)

多方面药理作用,用于治疗感冒发烧、腹胃胀痛、肝炎、荨麻疹、过敏性疾病等^[3],是新疆维吾尔族医学传统用药。我国清代赵学敏《本草纲目拾遗》中早有记载^[4],并收载于《药品标准》维吾尔药分册和《维吾尔药志(上册)》^[5],而目前新疆一枝蒿在中国药典中并无收录。在卫生部药品标准中药材第一册(1992)中仅规定其来源、性状、鉴别等,存在质量控制标准缺失的问题。

新疆一枝蒿化学成分的研究始于20世纪80年代,其生物活性成分极其复杂,且用不同方法提取得到的主成分和含量均有较大的差异,目前已报道的从新疆一枝蒿中提取的化学成分主要包括萜类、黄酮及酮酸类、多糖、挥发油、氨基酸等^[6-7]。一枝蒿酮酸是从新疆一枝蒿中分离得到的一种结构独特的倍半萜,是其特征化合物之一,在新疆一枝蒿中占约1%的含量^[8]。但由于地理条件、气候和生态环境的不同,新疆一枝蒿中有效成分存在差异,仅用性状、理化鉴别以及个别有效成分含量的测定并不能准确评价药材质量^[9]。

贺飞等^[10]在不同波长下对新疆一枝蒿的指纹图谱进行了研究比较,发现在245 nm波长条件下其分离效果较好。但由于其有效成分等最大吸收波长不一致,建立单一波长下的HPLC指纹图谱难以对新疆一枝蒿成分进行整体表达和全面评价。

本研究收集了9批新疆一枝蒿药材,同时运用HPLC-DAD技术建立了2种波长条件下的HPLC指纹图谱,完善了新疆一枝蒿药材的鉴别和质量控制,可为建立更加规范的药材质量标准提供参考。

1 材料

1.1 对照品与试剂

对照品槲皮素(批号:100081-201610,含量以99.1%计)、绿原酸(批号:110753-201716,含量以99.3%计)、木犀草素(批号:111520-201605,含量以99.6%计)、芹菜素(批号:111901-201603,含量以99.2%计)、紫花牡荆素(批号:111554-201705,含量以98.3%计)均购于中国食品药品检定研究院;甲醇、乙醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为市售分析纯。

1.2 药材

新疆一枝蒿药材购自新疆,由新疆维吾尔自治区药物研究所何江副研究员鉴定为新疆一枝蒿

Artemisia rupestris L. 的干燥全草,共9批,分别编号为样品S1、S2、S3、S4、S5、S6、S7、S8、S9。产地和采购时间见表1。

Table 1 Sources of *Artemisia rupestris* L.

Number	Batch	Origin	Purchasing time
S1	20151006	Xinjiang	2015.09
S2	20151107	Xinjiang	2015.09
S3	20151208	Xinjiang	2015.09
S4	20160110	Xinjiang	2015.09
S5	20160305	Xinjiang	2015.09
S6	20160315	Xinjiang	2015.09
S7	20160402	Xinjiang	2015.09
S8	20160408	Xinjiang	2015.09
S9	20160425	Xinjiang	2015.09

1.3 仪器

1260 Infinity 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司);RE-2000A 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);BSA1245 电子天平(北京赛多利斯有限公司);TU-1810 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);KH-500DB 超声波清洗器(昆山禾创超声仪器公司)。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 供试品溶液的制备 取新疆一枝蒿药材于50℃下干燥4 h,粉碎、过筛60目。取粉末25 g,精密称量。加入甲醇100 mL,于70℃下沸回流提取1 h。过滤,残渣用少量甲醇洗涤2次。置于旋转蒸发仪上挥干溶剂,加入甲醇溶液并定容至50 mL。摇匀,经0.45 μm微孔滤膜过滤,滤液即为新疆一枝蒿检测用供试品溶液。

2.1.2 对照品溶液的制备 分别取槲皮素、绿原酸、木犀草素、芹菜素、紫花牡荆素对照品适量,精密称量,加甲醇溶解并定容,配制成质量浓度分别为0.89, 0.55, 0.60, 0.62, 0.44 mg/mL的对照品溶液,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜过滤,取续滤液备用。

2.2 色谱条件

Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);甲醇流动相A,0.2%甲酸水流动相B,线性梯度洗脱(A:B),0 min(30:70)~40 min(70:30)~55 min(80:20)~65 min(100:0);流速1.0 mL/min;柱温:32℃;进样量:20 μL;检测波长:245和325 nm。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度 取新疆一枝蒿药材,按“2.1.1”项下方法配制试品溶液,按“2.2”项下色谱条件连续进样 5 次,记录色谱图。在 245 nm 处,识别各共有峰,并计算与参照峰(槲皮素)的相对保留时间和相对峰面积,结果 RSD 分别为 0.02% ~ 0.10% 和 0.10% ~ 1.53%。在 325 nm 处,识别各共有峰,并计算与参照峰(绿原酸)的相对保留时间和相对峰面积,结果 RSD 分别为 0.03% ~ 0.07% 和 3.00% ~ 4.05%。结果表明本方法具有较好的精密度。

2.3.2 重复性 取同一批次药材样品,按“2.1.1”项下方法配制试品溶液,平行制备 5 份,按“2.2”项下色谱条件连续进样,记录各共有色谱峰保留时间和积分面积,以及与相应回归色谱峰的相对保留时间和相对峰面积为指标计算 RSD。在 245 nm 处,各共有峰与参照峰(槲皮素)的相对保留时间 RSD 的范围是 0.09% ~ 0.50%, 相对峰面积 RSD 的范围是 0.43% ~ 2.46%。在 325 nm 处,各共有峰与参照峰(绿原酸)的相对保留时间 RSD 的范围是 0.10% ~ 0.43%, 相对峰面积 RSD 的范围是 1.43% ~ 2.71%。结果表明, RSD 均小于 3.00%, 重复性良好。

2.3.3 稳定性 取同一批次样品,按“2.1.1”项下方法配制试品溶液,分别在 0, 2, 4, 8, 16, 24 h 按“2.2”项下色谱条件连续进样,记录各共有色谱峰保留时间和积分面积,以色谱峰相对保留时间和相对峰面积为指标计算 RSD。在 245 nm 处,各共有峰与参照峰(槲皮素)的相对保留时间 RSD 的范围是 0.01% ~ 0.4%, 相对峰面积 RSD 的范围是 1% ~ 3%。在 325 nm 处,各共有峰与参照峰(绿原酸)的相对保留时间 RSD 的范围是 0.09% ~ 0.90%, 相对峰面积 RSD 的范围是 1.95% ~ 2.87%。结果表明,制备样品稳定性较好,常温下 24 h 内能保持较好的稳定性。

2.4 新疆一枝蒿双波长指纹图谱建立

2.4.1 指纹图谱的建立及相似度评价 取 9 批次新疆一枝蒿药材按“2.1.1”项下方法配制试品溶液,按“2.2”项下色谱条件测定,得到 9 批新疆一枝蒿药材高效液相色谱图。将 9 批次新疆一枝蒿药材的高效液相色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2.0 版》(国家药典委员会),以 S1

为参照指纹图谱,经多点校正,采用中位数的方法,得到新疆一枝蒿色谱对照指纹图谱(图 1),以对照图谱为参照,在峰位匹配的基础上,采用夹角余弦法对待测样品图谱之间以及与对照指纹图谱间进行相似度计算,9 批新疆一枝蒿样品指纹图谱的相似度大于 0.9,相似性良好。

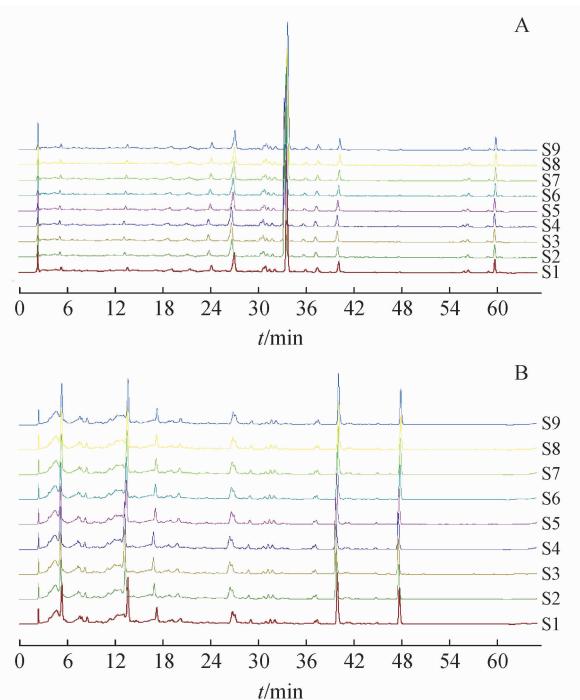


Figure 1 HPLC fingerprints of 9 batches of *Artemisia rupestris* L. at (A) 245 and (B) 325 nm

2.4.2 特征指纹峰的标定及确认 以对照图谱为参照,按照峰面积大小,在 245 nm 处取前 7 列峰,在 325 nm 处取前 8 列峰标定为共有峰。计算各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积。在 245 nm 时,相对保留时间 RSD 的范围是 0.1% ~ 1.3%, 相对峰面积 RSD 的范围是 1.9% ~ 3.4%。在 325 nm 时,相对保留时间 RSD 的范围是 0.6% ~ 1.6%, 相对峰面积 RSD 的范围是 2.5% ~ 3.8%。各共有峰稳定,具有指纹图谱的特征性。取对照品按将“2.1.2”项下方法配制对照品溶液,按“2.2”项下色谱条件进行检测,得到对照品高效液相色谱图(图 2),与对照图谱相比,指出槲皮素、绿原酸、木犀草素、芹菜素、蔓荆子素 5 个峰。

3 讨 论

3.1 检测波长的选择

本研究对新疆一枝蒿在紫外可见范围内进行

全波长扫描并进行考察,药材样品在325 nm处有最大吸收,并根据此前文献报道,新疆一枝蒿指纹图谱常用波长为245 nm,因此本实验最终确定波长为245和325 nm,在这两个波长下对新疆一枝蒿进行综合的质量评价。

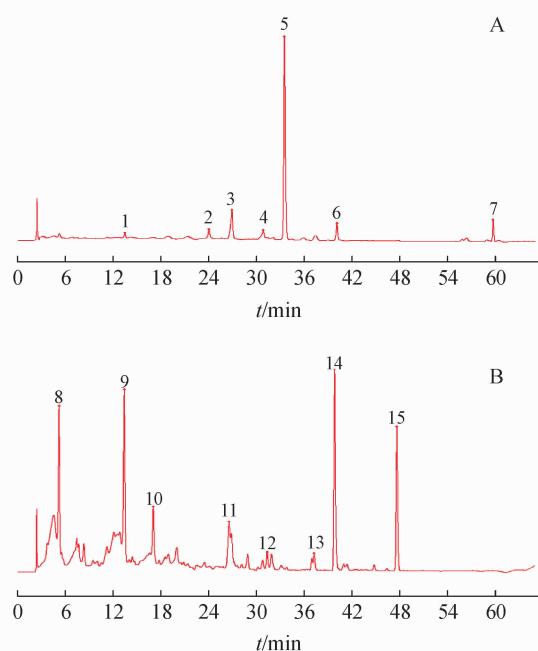


Figure 2 Comparison fingerprint of *Artemisia rupestris* L. at (A) 245 nm and (B) 325 nm
2:Quercetin;8:Chlorogenic acid;11:Luteolin;12:Apigenin;13:Casticin

3.2 流动相的选择

本实验在245和325 nm波长下,分别对3种流动相系统进行考察,结果见图3,甲醇-0.2%甲酸水的分离效果最好,基线平稳,出峰较多,故选用该流动相为洗脱条件。

3.3 色谱柱选择

不同品牌规格的色谱柱因柱料填充、键合条件等因素会在性能上存在不同,导致指纹图谱存在差异,本实验中,考察Agilent C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm)和Diamonsil C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm)两个不同厂家色谱柱,比较指纹图谱的差异。采用同一供试品溶液,依次使用不同的色谱柱,进样,记录保留时间和峰面积,在245和325 nm波长条件下,Agilent C₁₈的柱效均大于Diamonsil C₁₈,并结合目标成分峰的拖尾因子等多因素进行评价,最终选定Agilent C₁₈色谱柱。

4 结论

中药指纹图谱是目前符合中药特色的评价中

药真实性和一致性的质量控制手段之一。本实验通过在245和325 nm双波长条件下对9批药材进行指纹图谱的研究,弥补了单一波长下对质量控制不全面的弊端。在色谱条件的优化中,对流动相、色谱柱等洗脱条件进行不同的考察,最终确定稳定的系统条件,为指纹图谱的建立奠定基础。新疆一枝蒿内主要药效成分以黄酮及酮酸类化合物为主,在对照品选择上,本实验分别在245和325 nm下以槲皮素和绿原酸为对照,廉价且易于获得,符合一测多评的选择原则。以相似度评价系统对9批药材的指纹图谱进行计算模拟,得到新疆一枝蒿对照图谱并进行相似度评价,进一步对所建立的指纹图谱进行特征峰的标定,分别在245和325 nm得到7个和8个共有峰,并确认了槲皮素、绿原酸^[11]、木犀草素、芹菜素、紫花牡荆素5个峰,且共有峰稳定,所建立指纹图谱能够作为新疆一枝蒿质量控制的评价标准。

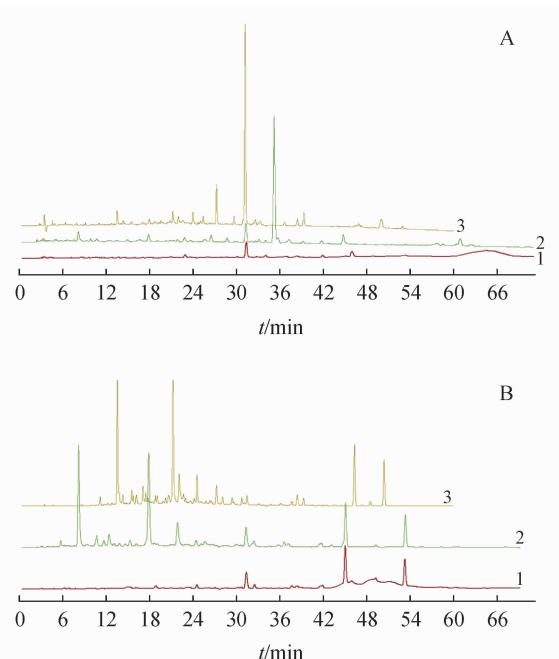


Figure 3 HPLC of *Artemisia rupestris* L. with different mobile phase at (A) 245 nm and (B) 325 nm
1:Methanol-water;2:Methanol-0.2% formic acid-water;3:Acetonitrile-water

参考文献

- [1] Wang YX, Xu JG, Li HL, et al. Pharmacodynamics and mechanism of *Artemisia rupestris* L. against type I anaphylaxis [J]. *Xinjiang J Tradit Chin Med*(新疆中医药), 2013, 31(5):124-126.

- [2] Qin ZR, He JH, Gu ZY, et al. Study on the spectrum-effect relationship of anti-virus effect of *Artemisia rupestris* extracts from different solvents [J]. *J China Pharm* (中国药房), 2015, **26** (7): 889–893.
- [3] Dong HJ, Jiang YT, Yu ky, et al. Advances in *Artemisia rupestris* [J]. *Chin Med J Res Prac* (现代中药研究与实践), 2013, **27** (4): 73–77.
- [4] Wang Y. Fundamental Study of Constituents From *Artemisia rupestris* L in Xinjiang (新疆一枝蒿化学成分的基础研究) [D]. Xinjiang: Xinjiang Medical University, 2004.
- [5] A LY, Gulmire. Introduction and application of *Artemisia rupestris* [J]. *J Med Pharm Chin Minorit* (中国民族医药杂志), 2004, **10** (4): 19.
- [6] Wan YJ, Xia JX, Tang L. Chemical constituents, biological activities and clinical applications of *Artemisia rupestris* [J]. *China J Chin Materi Med* (中国中药杂志), 2017, **42** (23): 4565–4573.
- [7] Liu YM, Yu DQ. Studies on chemical constituents of *Artemisia rupestris* L. [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1985, **39** (7): 310–313.
- [8] Yong JP, Zhao JY, Hajiakber A. Synthesis of 3-deoxyrupestronic acid and its activity against flu virus *in vitro* [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2011, **22** (1): 19–21.
- [9] Xia XH, Jin C, Yan D, et al. Proposition and practice on “integrative quality” in quality control for Chinese materia medica [J]. *China Tradit Herb Drugs* (中草药), 2010, **41** (4): 505–508.
- [10] He F, Hou GP, Zhong J, et al. Fingerprints of *Artemisia rupestris* L. from Xinjiang by HPLC [J]. *Med Leader* (医药导报), 2010, **29** (7): 854–857.
- [11] Zhang SW, Yang L, Gu ZY. Studies on chemical constituents of *Artemisia rupestris* L. [J]. *J Xinjiang Med Univ* (新疆医科大学学报), 2016, **39** (4): 408–410.



中國藥科大學 學報

中国精品科技期刊 中国高校精品科技期刊
 中国中文核心期刊 中国科学引文数据库核心期刊

传播医药科技创新研究成果的优秀媒体

药学前沿
 提供药学领域的前沿信息 反映最新的药学研究进展

创新成果
 展示医药科技最新成果 构建学术交流的平台

研究论文
 科学研究原创论文 国家重大药学研究基金产出论文

邮发代号: 28-115, 欢迎订阅, 欢迎投稿!