

地参反相高效液相色谱分析方法的建立*

□ 聂波 刘勇 (北京中医药大学中药学院 北京 100102)

徐青** 梁鑫森** (中国科学院大连化学物理研究所 大连 116023)

肖培根 (中国医学科学院 药用植物研究所 北京 100094)
中国协和医科大学

摘要:目的:用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)对地参70%(V/V)乙醇提取物进行分析方法的研究。方法:考察了不同波长、酸抑制剂浓度、流动相梯度以及进样量对其分离效果的影响。结果:确定了分析方法:Hypersil ODS2 色谱柱(5 μ m,4.6mm i.d. \times 250mm);流动相乙腈-水-甲酸(0.5%,V/V);洗脱梯度0~5min(10% B),5~70min(10%~60% B);流速1.0 mL/min;检测波长280nm;进样量3 μ L;柱温30 $^{\circ}$ C。结论:该方法获得的色谱图分离度较高,基线较平稳,能有效地对地参进行化学成分分析与质量控制。

关键词:地参 反相高效液相色谱法 分析方法

地参(*Rhezoma Lycopi*)为唇形科植物地瓜儿苗(*Lycopus lucidus* Turcz.)的地下根茎。其味甘,性辛、温。具有活血、益气、消水的功能。用于治疗吐血,衄血,产后腹痛带下等症^[1]。文献报道其含有熊果酸、齐墩果酸、白桦脂酸等有机酸类成分及其丰富的氨基酸、粗蛋白、微量元素及糖类^[2-3]。现代药理学研究表明地参具有抗炎、抗应激能力、改变红细胞压积作用以及抗心脑血管疾病等活性^[4]。国内外的研究,主要集中在化学成分和药理活性两个方面,但这些研究尚处于初级阶段。到目前为止,尚未见有关其化学成分分析方法方面研究的报道,而分析方法的建立是其化学成分的分析分离、质量评价等研

究的基础。

本文以地参为研究对象,考察了不同波长、酸抑制剂浓度、流动相梯度以及进样量对其化学成分分离效果的影响,建立了一种稳定有效的RP-HPLC分析方法,为其化学成分的深入研究奠定基础,为其质量控制提供有效的分析方法。

一、材料与方法

1. 主要仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪,包括四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、光电二极管阵列检测器、自动脱气机;1/100000(0.01mg)分析天平(Mettler Toledo),pH计(奥力龙,美国);JPSD-100 粉碎机(上海嘉

收稿日期:2005-10-20

修回日期:2006-01-06

* 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KGCX2-SW-213):基于现代理论和技术的复方中药系统研究,负责人:梁鑫森;国家自然科学基金重大项目(3053886):中国重要药用植物类群的亲缘学的研究,负责人:肖培根。

** 联系人:梁鑫森,本刊编委,博士,研究员,主要从事组方中药的研究;徐青,副研究员,主要从事分析化学研究,Tel: 0411-84379521,E-mail: xuqing@dicp.ac.cn.

定粮油检测仪器厂)。

2. 主要试剂

乙腈(色谱纯, Merck 公司), 甲酸(色谱纯, 百灵威公司), 实验用水为 Milli-Q 超纯水 (Millipore 公司, 美国), 其它试剂均为分析纯。

3. 药材

地参产于陕西, 由中国医学科学院中国协和医科大学药用植物研究所肖培根院士鉴定为毛叶地瓜儿苗 *Lycopus lucidus Turcz. var. hirtus Regel.* 的地下根茎。

4. 实验方法

(1) 样品的制备。将地参药材于 40℃ 干燥至恒重, 粉碎过 60 目筛, 精密称定 2g, 用 70% (V/V) 乙醇浸泡 1h, 回流提取 2h, 过滤, 减压浓缩定容至 5mL, 生药浓度为 0.04g/mL, 过 0.45μm 滤膜后备用。

(2) 色谱条件。Hypersil ODS2 色谱柱 (250mm×4.6mm i.d., 5μm, 大连依利特公司)。流动相组成、酸抑制剂浓度 (V/V) 及梯度条件详见表 1。柱温为 30℃, 流速为 1.0mL/min, 进样体积为 10μL。

峰, 从其变化趋势很明显看出为很多吸收峰重叠形成的, 峰展很宽, 峰形不好。由于地参中含有如齐墩果酸、熊果酸等酚酸类成分, 溶液 pH 值显酸性, 在溶液中容易解离, 在洗脱时往往较早或同时流出, 形成钝峰或重叠峰。

甲酸为常用的酸抑制剂, 且抑制酸电离的效果较好。因此, 在流动相中添加甲酸, 为保证酸浓度的平衡, 在两相中加相同浓度的甲酸。以表 1 中 2 号条件为流动相进样分析(如图 2), 从图谱可看出, 甲酸的加入使吸收峰出峰时间得到调整, 主要分布在 10~30min 内, 钝峰基本上被打开, 分成若干个吸收峰。验证了酸抑制剂的加入确实可以抑制中药中的酸性成分电离。因此, 采用乙腈-甲酸-水系统对地参进行分析方法的研究。

3. 酸抑制剂浓度的考察

由于中药地参所含有的化学成分较为复杂, 其类型不同, 结构不同, 酸抑制剂的浓度对其有一定的影响, 因此, 我们以乙腈-甲酸-水为流动相, 系统考

表 1 流动相组成、梯度、添加剂浓度及洗脱梯度 (V/V)

序号	水相(A)	有机相(B)	pH 值	梯度条件(B 相)
1	H ₂ O	CH ₃ CN	-	10% $\xrightarrow{70\text{min}}$ 100%
2	0.3% HCOOH- H ₂ O	0.3% HCOOH- CH ₃ CN	2.60	10% $\xrightarrow{70\text{min}}$ 100%
3	0.1% HCOOH- H ₂ O	0.1% HCOOH- CH ₃ CN	2.80	10% $\xrightarrow{5\text{min}}$ 10% $\xrightarrow{70\text{min}}$ 60%
4	0.3% HCOOH- H ₂ O	0.3% HCOOH- CH ₃ CN	同 2	同 3
5	0.5% HCOOH- H ₂ O	0.5% HCOOH- CH ₃ CN	2.40	同 3
6	0.7% HCOOH- H ₂ O	0.7% HCOOH- CH ₃ CN	2.20	同 3
7	0.5% HCOOH- H ₂ O	0.5% HCOOH- CH ₃ CN	同 2	5% $\xrightarrow{5\text{min}}$ 5% $\xrightarrow{125\text{min}}$ 60%
8	0.5% HCOOH- H ₂ O	0.5% HCOOH- CH ₃ CN	同 2	6% $\xrightarrow{5\text{min}}$ 6% $\xrightarrow{105\text{min}}$ 60%
9	0.5% HCOOH- H ₂ O	0.5% HCOOH- CH ₃ CN	同 2	7% $\xrightarrow{5\text{min}}$ 7% $\xrightarrow{85\text{min}}$ 60%
10	0.5% HCOOH- H ₂ O	0.5% HCOOH- CH ₃ CN	同 2	8% $\xrightarrow{5\text{min}}$ 8% $\xrightarrow{65\text{min}}$ 60%
11	0.5% HCOOH- H ₂ O	0.5% HCOOH- CH ₃ CN	同 2	9% $\xrightarrow{5\text{min}}$ 9% $\xrightarrow{50\text{min}}$ 60%

二、结果与讨论

1. 检测波长的考察

采用光电二极管阵列检测器 (PAD) 于 190nm~400nm 波长下进行扫描, 比较不同波长下吸收峰的数量、强弱及分离情况, 同时考虑酸抑制剂甲酸的吸收, 确定 280nm 为其检测波长。

2. 流动相组成的考察

以表 1 中 1 号条件为流动相进样分析(如图 1), 由图谱可看出, 5min 内吸收峰较强, 但重叠严重; 5~20min 出现一钝

察了分别添加 0.1%、0.3%、0.5% 和 0.7% 的甲酸（体积百分比，V/V%）（如图 3、4、5、6）对地参化学成分的分析分离情况。

观察以上试验图谱发现：随着甲酸浓度的升高（0.1%~0.5%），各吸收峰逐渐被抑制，基线也较稳定、平直，且峰形也较好。但当甲酸浓度升高到 0.7% 时各吸收峰的分度及峰形明显不如加入 0.5% 甲酸的图。这是由于地参中含有有机酸成分，加入酸抑制，可以抑制电离。但酸浓度不同，对其电离的抑制程度和选择性是不同的。当酸浓度过低时，抑制能力弱，分离不理想；当浓度过高时，抑制能力强，但由于酸抑制剂的选择性，使分离的效果更差，达不到理想的分离效果。因此，流动相中加入的酸抑制浓度应适量为好。

直观分析：图 3 的 1~3 号吸收峰未能较好分离，基线处有凸起；而图 6 中 1~3 号吸收峰分离效果不理想，6 号和 7 号峰没有分开，且多数吸收峰的峰形较差。图 4 和图 5 的分离效果较好，但二者存在细微的差别；图 5 中吸收峰 6 与 7 的分度度 ($R_s=1.21$) 好于图 4 中相应吸收峰的分度度 ($R_s=1.00$)，且图 5 中 2 号峰的峰形好于图 4 中相应的吸收峰。综合考虑吸收峰的总体分离效果、吸收峰的分度度、峰形及酸抑制剂的选择性，确定采用乙腈-水-甲酸 (0.5%，V/V) 为流动相。

4. 流动相梯度的考察

流动相的洗脱梯度对吸收峰的分度度及峰形也有一定的影响，因此，尝试调整流动相的梯度来改善分离效果。以乙腈-水-甲酸 (0.5%，V/V) 为流动相分别比较了表 1 中 NO. 3、NO. 7~NO. 11 六个梯度下的分离效果，综合考虑吸收峰的分度度、峰形、基线及分析时间，选定 NO. 3 为地参液相分析的流动相梯度。

5. 进样量的考察

以流动相乙腈-水-甲酸 (0.5%，V/V)，3 号梯度比较了进样量分别为 1 μ L、3 μ L、10 μ L 的分离效果，保证吸收较弱峰的检测灵敏度，确定 3 μ L 为合适进样量，如图 7。

三、结论

1. 流动相的 pH 值

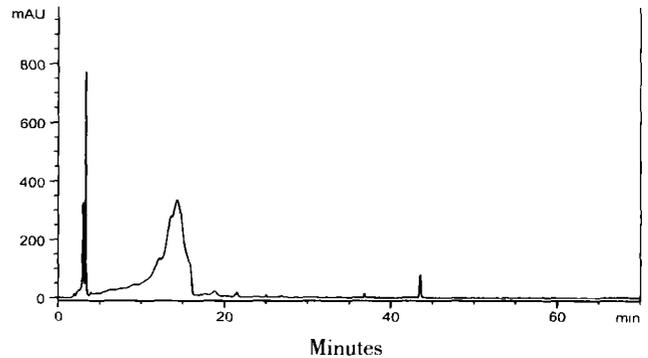


图 1 地参 70%乙醇提取物的 RP-HPLC 色谱图(流动相:NO. 1)

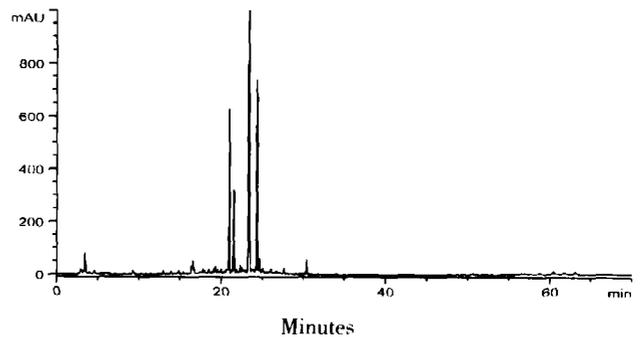


图 2 地参 70%乙醇提取物的 RP-HPLC 色谱图(流动相:NO. 2)

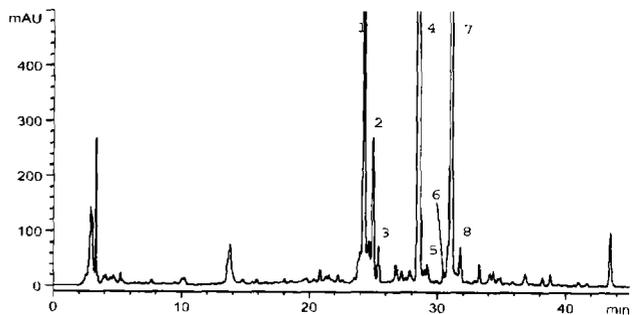


图 3 地参 70%乙醇提取物 RP-HPLC 色谱图(流动相:NO. 3)

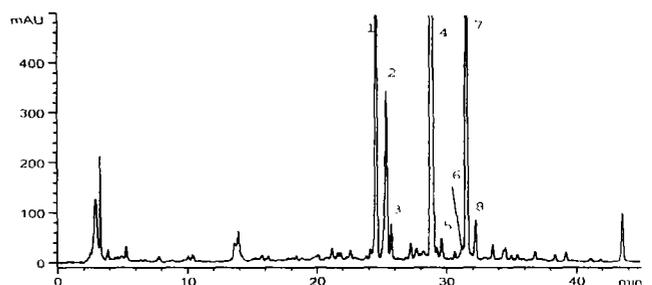


图 4 地参 70%乙醇提取物的 RP-HPLC 色谱图(流动相:NO. 4)

通常 ODS 色谱柱要求分析样品及流动相的 pH 值应在 2~8 范围内,因此,在加入酸抑制剂及调整其浓度时均测定了各流动相体系的 pH 值,保证不低于

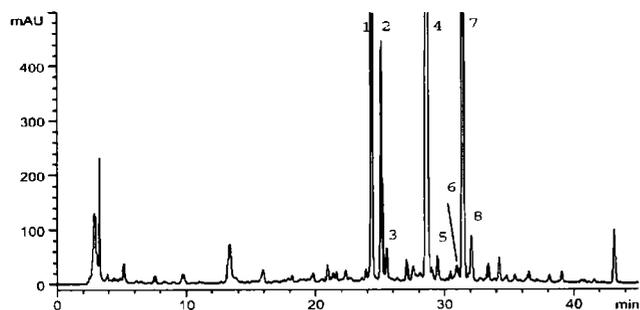


图 5 地参 70%乙醇提取物的 RP-HPLC 色谱图(流动相:NO. 5)

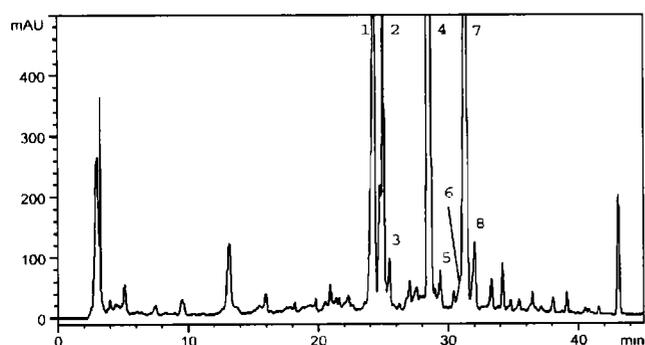


图 6 地参 70%乙醇提取物的 RP-HPLC 色谱图(流动相:NO.6)

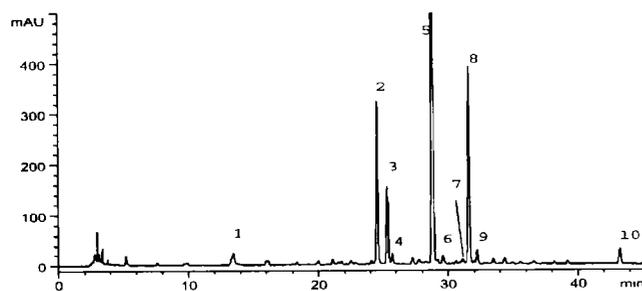


图 7 地参 70%乙醇提取物的 RP-HPLC 色谱图(流动相:NO. 5)

2。试验比较看出,对地参进行分析时 pH 值控制在 2.4 左右分析分离效果较好。

2. 分析条件的确定

地参的分析方法方面的研究尚未见报道。本文采用 RP-HPLC 方法,比较了不同波长、流动相组成、酸抑制剂浓度、流动相梯度以及进样量对地参样品分离效果的影响。综合考虑酸抑制剂对地参样品的分析分离效果、柱子 pH 值的适用范围等因素,确定地参 HPLC 分析方法为:Hypersil ODS2 色谱柱,流动相为乙腈-水-甲酸(0.5%, V/V),洗脱梯度为 0~5min (10%~10% B),5~70min (10%~55% B);检测波长 280nm,流速 1.0 mL/min,柱温 30℃,进样量 3 μ L。

3. 方法的稳定性和可靠性

对该方法进行了精密度及重复性的考察,计算了主要吸收峰(图 7 中 1~10 号峰)的保留时间和峰面积的 RSD 分别为 0.03%~1.40%、0.83%~2.69%,RSD 均小于 3%,表明该方法稳定可靠,可用于地参的质量控制,为其化学成分的研究奠定基础。

致谢:地参样品由西安德施普生物制品有限责任公司提供,在此表示衷心感谢。

参考文献

- 1 江苏新医学院. 中药大辞典. 上册. 上海:上海科学技术出版社, 1977:803.
- 2 周宁娜,赵荣华,罗天浩.等.地参中化学成分的研究.中草药, 1999,增刊:64.
- 3 张荣平,周宁娜,罗天浩,等.地参中氨基酸、粗蛋白和元素分析.中医药研究,1998,14(5):52-53.
- 4 周宁娜,杨秀英,淤泽溥,等.地参的急性毒性和部分药效学实验.云南中医学院学报,1998,21(1):6-11.
- 5 于世林.高效液相色谱方法及应用.北京:化学工业出版社,2000: 195-244.

Establishment of Analytical Method for Components of *Rhizoma lycopi* by means of RP-HPLC

Nie Bo and Liu Yong

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of traditional Chinese medicine, Beijing 100102)

Xu Qing and Liang Xinmiao

(Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023)

Xiao Peigen

(Institute of Medicinal Plants, Chinese Academy of Medical Sciences/Peking Union Medical College, Beijing 100094)

This article presents the study on the method for analyzing 70% (v/v) ethanolic extract of *Rhezoma lycopi* by means of reversephase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) and the impact of different wavelengths, the concentration of inhibitors, the gradients of mobile phase and the injection volumes on the effect of the separation of the components of the said medicinal plant. In the study the following methods have been used: Hypersil ODS2 chromatographic column (5 μ m, 4.6mm, i.d. \times 250mm), mobile phase acetomitrile-water-formic acid (0.5%,v%), 0-5min (10%B) and 5-70 min (10%-60%B) of elution gradient, 1.0ml/min of flow velocity, detection wavelength 280nm, injection volume 3 μ L and the temperature of chromatographic column 30 $^{\circ}$ C. The chromatogram obtained by the said method appears with rather high separative degree and stable base line so that the analysis of chemical components and the quality control of *Rhezoma lycopi* can be effectively conducted on by it.

Key words: *Rhezoma lycopi*, RP-HPLC, analytical method

(责任编辑:周立东,英文译审:秦光道)

(上接第 71 页)

Advances in Studies on Chemical Constituents of Propolis

Nan Yao, Guo Jia, Zheng Lian-Xiang, Zhou Li-Dong

(Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of

Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100094, PRC)

The advances in propolis studies in recent years since 1996, including chemical constituents, bioactivities and plant sources is reviewed (with 50 references). It's indicated by the first time that natural propolis can be distinguished from extraction of propolis source plants by analysis of glucosides.

Key word: Propolis; glycoside; chemical constituents; bioactivity; plant source.

(责任编辑:王 瑀,英文译审:熊艳艳)

(上接第 83 页)

Ideas and practice in improvement of production output and quality of Chinese Medicinal Materials

Gao Shanlin (School of Traditional Chinese Medicine, China University of Materia Medica, Nanjing 210038)

By summarizing the gradational results achieved in the breeding of medicinal plants and the improved varieties of Chinese medicinal materials in China in Recent 20 years and in combination with the research results made by the authors in the breeding of 10 quality varieties of Chinese medicinal crops, the author of this article hold that it is a feasible way of rapidly increasing the production output and improving the quality of Chinese medicinal plants to breed good varieties of Chinese medicinal materials by the application of bio-technology, and put forward their proposals in the breeding of improved varieties of Chinese medicinal materials and technical training concerned in the future in China.

Key words: Chinese medicinal materials, improved variety, bio-technology, breeding

(责任编辑:刘维杰 张志华,英文译审:秦光道)