

广西产毛果算盘子的 HPLC 指纹图谱

黄红泓¹, 甄汉深², 柳贤福^{1*}

(1. 广西中医药大学 赛恩斯新医药学院, 南宁 530001; 2. 广西中医药大学, 南宁 530001)

[摘要] 目的:采用 HPLC 研究广西不同产地毛果算盘子的指纹图谱。方法:采用 Hypersil C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇(A)-0.2% 磷酸(B)梯度洗脱(0~7 min, 10% A; 7~15 min, 10%~22% A; 15~20 min, 22%~30% A; 20~30 min, 30%~40% A; 30~45 min, 40% A), 检测波长 270 nm, 柱温 20 ℃, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 分析时间 45 min。分析了 10 批毛果算盘子药材的 HPLC 指纹图谱。应用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)计算相似度。结果:建立了广西产毛果算盘子的指纹图谱,且相似度较好,根据相似度分析确定了 9 个构成毛果算盘子药材指纹图谱的特征峰。结论:该方法简单、稳定、重复性好,可用于毛果算盘子药材的质量控制。

[关键词] 毛果算盘子; 高效液相色谱; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)23-0060-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014230060

HPLC Fingerprints of *Glochidion eriocarpum* in Guangxi

HUANG Hong-hong¹, ZHEN Han-shen², LIU Xian-fu^{1*}

(1. Faculty of Chinese Medical Science, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China;

2. Faculty of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** The study aimed to establish the chromatographic fingerprint of *Glochidion eriocarpum* by HPLC. **Method:** The fingerprint was investigated using Hypersil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column. The mobile phase was consisted of methanol (A) and 0.2% phosphoric acid (B), in gradient elution for 0-7 min, 10% A; 7-15 min, 10%-22% A; 15-20 min, 22%-30% A; 20-30 min, 30%-40% A; 30-45 min, 40% A. The detection wavelength was set at 270 nm, and column temperature was set at 30 ℃, The flow rate was 1 mL·min⁻¹. The fingerprints of 10 batches of *G. eriocarpum* were analyzed in 45 min. The similarity was analyzed by similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of TCM (version 2004 A). **Result:** The HPLC fingerprint of Guangxi *G. eriocarpum* was obtained with good similarity. **Conclusion:** The method was simple, reproducible and can be used in quality control for *G. eriocarpum*.

[Key words] *Glochidion eriocarpum*; HPLC; fingerprint

毛果算盘子别名毛七公、漆大伯、两面毛、漆大姑。具有驱风利湿、散瘀、止血、消肿的功效,用于治急性胃肠炎、痢疾、风湿关节痛、跌打损伤、创伤出血、湿疹、漆疮、皮炎^[1]。其含有酚类、鞣质类^[1-3]、三萜类化合物以及微量元素^[1-3]。近年来随着研究工作的不断深入,在生药学、有效成分等方面已获得了新的研究成果。韦松基等^[4]对毛果算盘子和算盘子的显微特征进行了深入的研究和比较。刘布鸣

等^[5]对广西漆大姑进行薄层色谱研究,表明漆大姑药材样品色谱中在与没食子酸对照品色谱相应的位置上显相同颜色斑点。刘布鸣等^[6]从漆大姑中分离出没食子酸类化合物,亦有学者从中分离得三萜类化合物和挥发油类。目前尚未发现有文献报道毛果算盘子指纹图谱研究,本课题参照《中药注射剂图谱研究的技术要求》,研究并建立毛果算盘子药材指纹图谱的测定条件及方法,得到对照图谱。本

[收稿日期] 20140117(010)

[基金项目] 广西高校科学技术资助项目(LX2014668)

[第一作者] 黄红泓, 硕士, 讲师, 从事药学和中药学的教学和科研工作, Tel:0771-4736399, E-mail:929762704@qq.com

[通讯作者] * 柳贤福, 硕士, 助教, 从事药学和中药学的教学和科研工作, Tel:0771-4736066, E-mail:176336350@qq.com

实验采用 HPLC 研究广西产毛果算盘子药材的指纹图谱,可为该药材的质量评价和控制提供科学依据。

1 仪器与试剂

1200 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), LG16-W 型高速微量离心机(北京医用离心机厂), Millipore Simplicity-185 型超纯水仪(美国密里博公司), BP211D 型电子分析天平(德国赛多利斯)。没食子酸(中国食品药品检定研究院,批号 110831-200803)。甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂为分析纯。毛果算盘子药材于 2012 年春季采自广西 10 个地区,采集药材地上部分 3~5 kg,晒干,分别经广西中医药大学宁小清副教授及广西中医药大学赛恩斯新医药学院生药教研室苑敏副教授鉴定均为大戟科植物毛果算盘子 *Glochidion eriocarpum* 的干燥地上部分,见表 1。

表 1 毛果算盘子药材的来源

No. 产地(采集时间)	No. 产地(采集时间)
1 广西藤县太平镇(2012 年 4 月)	6 广西蒙山县(2012 年 4 月)
2 广西横县(2012 年 4 月)	7 广西藤县濠江镇(2012 年 4 月)
3 广西南宁市(2012 年 4 月)	8 广西梧州市(2012 年 4 月)
4 广西钦州市(2012 年 4 月)	9 广西柳州市(2012 年 4 月)
5 广西桂林市(2012 年 4 月)	10 广西河池市(2012 年 4 月)

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Hypersil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇(A)-0.2% 磷酸(B)梯度洗脱(0~7 min, 10% A; 7~15 min, 10%~22% A; 15~20 min, 22%~30% A; 20~30 min, 30%~40% A; 30~45 min, 40% A), 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 270 nm, 柱温 20 ℃, 进样量 5 μL。

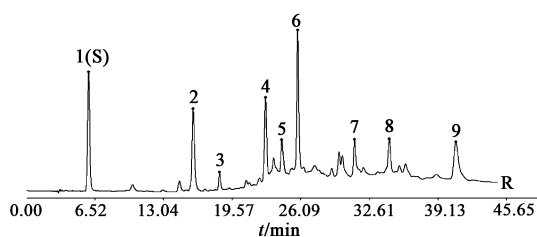
2.2 溶液的制备 取没食子酸对照品 1 mg, 精密称定, 置 25 mL 量瓶, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液。取毛果算盘子 1 g, 精密称定, 准确加入甲醇 40 mL, 称重, 静置 12 h, 超声提取 40 min, 放冷, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 滤液用乙酸乙酯萃取 2 次, 每次 20 mL, 合并乙酸乙酯萃取液, 挥干, 用甲醇 20 mL 溶解, 滤过, 取续滤液于离心管, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 即得供试品溶液。

2.3 精密度试验 取 S1 供试品溶液, 按 2.1 项条件连续进样 6 次, 记录色谱图, 分别对共有峰的相对保留时间和相对峰面积进行考察。结果表明, 各共有峰的相对保留时间 RSD 0.2%~0.5%, 相对峰面积 RSD 1.5%~2.0%。符合指纹图谱分析要求。

2.4 重复性试验 取 S1 供试品, 分别制备 6 份供试品溶液, 记录色谱图, 对共有峰的相对保留时间和相对峰面积进行考察。结果表明, 各共有峰相对保留时间 RSD 0.5%~0.8%, 相对峰面积 RSD 1.1%~2.7%, 符合指纹图谱分析要求。

2.5 稳定性试验 取 S1 供试品制备供试品溶液, 按 2.1 项色谱条件分别于 0, 2, 4, 6, 12, 24 h 时进样, 记录色谱图, 考察其共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明, 各共有峰相对保留时间 RSD 0.6%~0.9%, 相对峰面积 RSD 1.4%~1.9%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6 指纹图谱与共有峰的确定 采用国家药典委员会颁布的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004A 版对指纹图谱的相关参数进行自动匹配, 标定药材的共有指纹峰 9 个, 生成毛果算盘子药材的对照指纹图谱(图 1)。经与对照品比对, 指认其中的 1 号峰为没食子酸。结果表明, 其中有 9 个主要色谱峰(占总峰面积 90% 以上)是 10 批毛果算盘子药材所共有的。没食子酸是毛果算盘子的活性成分, 指纹图谱中 1 号为没食子酸吸收峰, 在各个不同来源的毛果算盘子药材样品中均含有此峰且较稳定, 故选择为参照峰 S, 各共有指纹峰的 t_R 和相对峰面积统计结果见表 2, 3。10 批样品的 HPLC 指纹图谱叠加图(图 2), S1~S9 相似度分别为 0.912, 0.906, 0.948, 0.925, 0.903, 0.970, 0.970, 0.921, 0.950, 均 > 0.9, 表明相似度良好。



1. 没食子酸

图 1 毛果算盘子药材的共有模式

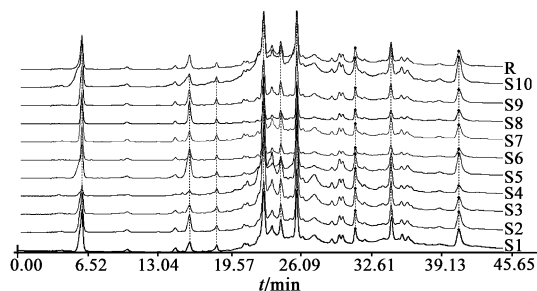


图 2 10 批毛果算盘子样品 HPLC 指纹谱

表 2 10 批毛果算盘子药材指纹图谱共有峰的相对保留时间

峰号	药材批号										平均值	RSD/%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.0
2	2.68	2.65	2.64	2.67	2.65	2.68	2.66	2.68	2.65	2.69	2.66	0.6
3	3.04	3.02	3.02	3.03	3.02	3.04	3.03	3.06	3.02	3.05	3.03	0.5
4	3.83	3.80	3.78	3.82	3.80	3.83	3.80	3.82	3.78	3.85	3.81	0.6
5	4.09	4.06	4.04	4.08	4.05	4.09	4.08	4.10	4.04	4.08	4.07	0.5
6	4.35	4.32	4.30	4.33	4.29	4.35	4.31	4.35	4.30	4.35	4.32	0.6
7	5.26	5.21	5.19	5.23	5.20	5.26	5.23	5.32	5.19	5.28	5.24	0.8
8	5.81	5.77	5.73	5.79	5.75	5.81	5.79	5.80	5.74	5.82	5.78	0.6
9	6.87	6.82	6.79	6.85	6.81	6.88	6.84	6.88	6.79	6.89	6.84	0.5

表 3 10 批毛果算盘子药材指纹图谱共有峰的相对峰面积

峰号	药材批号										平均值	RSD/%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.0
2	0.50	0.52	0.55	0.62	0.51	0.52	0.43	0.61	0.54	0.50	0.53	11.5
3	0.25	0.26	0.22	0.45	0.31	0.29	0.29	0.37	0.30	0.28	0.30	10.2
4	1.28	1.31	1.30	2.03	1.31	1.37	1.24	1.24	1.57	1.33	1.40	9.2
5	0.69	0.67	0.68	1.33	0.67	0.79	0.57	0.91	0.74	0.59	0.77	17.8
6	1.35	1.34	1.37	2.36	1.16	1.47	1.44	1.94	1.23	1.63	1.53	19.1
7	0.42	0.38	0.40	0.64	4.30	2.74	3.88	6.26	5.71	3.80	2.85	29.4
8	0.58	0.58	0.58	0.99	0.58	0.63	0.59	0.79	0.62	0.64	0.66	12.0
9	0.64	0.66	0.60	1.13	0.71	0.48	0.57	0.64	0.56	0.91	0.69	23.5

3 讨论

本文用二极管阵列检测器获得了三维全波长指纹图谱。对比 230, 254, 270, 320 nm 等波长下的指纹图谱, 结果在 270 nm 处各色谱峰均有较好的紫外吸收, 色谱信息丰富, 基线较平, 且没食子酸峰面积较大, 故选择 270 nm 作为测定波长。本文还曾考察了甲醇-水, 乙腈-水, 甲醇-水-磷酸, 乙腈-水-磷酸等不同溶剂, 采用等度洗脱的方法进行检测, 结果表明等度洗脱时图谱中色谱峰较少, 各色谱峰严重重叠且不开, 分离效果差。甲醇-水系统, 甲醇-0.2% 磷酸系统梯度洗脱色谱图谱峰形较好, 出峰信号较多, 分离较好, 基线较平稳。但考虑到甲醇-水系统色谱峰出现拖尾现象, 故采用甲醇-0.2% 磷酸系统进行梯度洗脱。比较 20, 25, 30 °C, 不同的柱温条件, 在其他色谱条件相同情况下, 20 °C 柱温下, 各峰分离效果最好, 考察 0.8, 1.0, 1.2 mL·min⁻¹ 不同流速, 结果表明采用 1.0 mL·min⁻¹ 为好。综上所述, 10 批毛果算盘子的 HPLC 指纹图谱相似度大于

0.9, 找到 9 个特征峰, 表明所建立的毛果算盘子指纹图谱具有专属性, 可为毛果算盘子药材的质量控制提供可靠的科学依据。

[参考文献]

[1] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 257.
 [2] 广州市药品检验所. 农村中草药制剂技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1971: 233.
 [3] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准. 第 2 册[S]. 1996: 281.
 [4] 韦松基, 陈建霞, 韩剑. 毛果算盘子与算盘子的显微鉴别[J]. 广西中医药, 2007, 30(1): 59.
 [5] 刘布鸣, 陈荣光, 韦汝武, 等. 漆大姑中没食子酸的分离鉴定与薄层色谱鉴别[J]. 广西科学, 1999, 6(3): 203.
 [6] 刘布鸣, 陈荣光, 蔡全玲. 漆大姑化学成分初步研究[J]. 广西中医药, 2000, 23(1): 52.

[责任编辑 顾雪竹]