

河南不同产地商陆药材质量分析

裴莉昕, 纪宝玉, 陈随清*, 孙利平

(河南中医药大学药学院, 郑州 450046)

[摘要] **目的:**对河南不同产地商陆药材化学成分、酸不溶性灰分及指纹图谱进行分析,为商陆药材的开发利用、质量标准的制定提供参考依据。**方法:**采用薄层色谱法进行定性鉴定;HPLC-ELSD测定商陆皂苷甲含量,流动相甲醇-0.4%冰乙酸(30:70),流速1.0 mL·min⁻¹,柱温30℃,蒸发光散射检测器检测,气体流速2.0 L·min⁻¹,漂移管温度90℃,记录时间20 min,进样量20 μL。指纹图谱采用HPLC-ELSD法,梯度洗脱,气体流速2.0 L·min⁻¹,漂移管温度105℃。**结果:**不同产地商陆中商陆皂苷甲含量存在差异,其中济源、西峡、鲁山产商陆中商陆皂苷甲的含量较高,在1.29%~3.52%。酸不溶性灰分均合格。指纹图谱标出9个共有峰,以峰7(商陆皂苷甲)为参照峰。**结论:**该研究结果可作为制定商陆质量标准的参考依据。

[关键词] 商陆药材;商陆皂苷甲;反相高效液相色谱-蒸发光散射检测法;河南产

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)02-0048-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2017020048

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160928.1613.008.html>

[网络出版时间] 2016-09-28 16:13

Quality of Phytolaccae Radix from Different Sources in Henan

PEI Li-xin, JI Bao-yu, CHEN Sui-qing*, SUN Li-ping

(School of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To provide a basis for the development, utilization and quality control of Phytolacca Radix through quality and fingerprint analysis of Phytolacca Radix from different sources in Henan. **Method:** Thin-layer chromatography was used for qualitative identification; HPLC-ELSD method was used for the determination of esculentoside A content with mobile phase of methanol-4% acetic acid (30:70); the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and column temperature was 30℃, evaporative light scattering detector (ELSD) was used for detection; gas flow rate of 2.0 L·min⁻¹, drift tube temperature of 90℃, record time of 20 min and the sample size of 20 μL. Fingerprint analysis was conducted by using HPLC-ELSD and gradient elution, with a gas flow rate of 2.0 L·min⁻¹, drift tube temperature of 105℃. **Result:** There was difference in content of esculentoside A of the samples from different areas, and the content was higher between 1.29%-3.52% in samples from Jiyuan, Xixia and Lushan; acid-insoluble ash content was qualified in all samples. There were 9 common peaks in the fingerprint, and peak 7 was the reference peak. **Conclusion:** The results of this study can be used as the reference for the formulation of Phytolaccae Radix quality standard.

[Key words] Phytolaccae Radix; esculentoside A; HPLC-ELSD; Henan

商陆为商陆科植物商陆或垂序商陆的干燥根, 又名花商陆、见肿消、土冬瓜、地萝卜、山萝卜^[1]。

[收稿日期] 20151029(008)

[基金项目] 中医药公共卫生专项资助项目(财社[2011]76号);中医药行业科研专项资助项目(201207002);河南省中医药科学研究专项(2014ZY02049);河南省高等学校重点科研项目(15A360008)

[第一作者] 裴莉昕, 硕士, 讲师, 从事中药质量标准与中药资源方面研究, Tel:13607669844, E-mail:xlpxlp@aliyun.com

[通讯作者] *陈随清, 博士, 教授, 从事中药质量标准与中药资源方面研究, Tel:0371-65676686, E-mail:suiqingchen@sohu.com

始载于《神农本草经》，列为下品^[2]，是一种应用历史悠久的传统中药。本品具有逐水消肿、通利二便、解毒散结等功效^[3]，可治疗乳腺增生、神经纤维瘤^[4-6]。商陆中主要含有商陆皂苷活性成分，其中以商陆皂苷甲含量最高^[7-8]。皂苷类成分具有祛痰、镇咳、平喘、抗炎、抗菌及抗病毒等多种药理作用^[9]。垂序商陆原产北美洲，自 1935 年在杭州被发现以来，迅速入侵到全国大部分地区。目前河南省各地区垂序商陆资源非常丰富，国内外学者已对垂序商陆化感作用^[10]、重金属富集量^[11-14]、有效化学成分^[15-19]、药用价值^[20]、结实量及灵活的扩散方式^[21-23]等方面开展了相关研究。本研究对河南省以垂序商陆为基源的商陆药材质量进行了研究，为商陆药材的开发利用、质量标准的制定提供参考依据。

1 材料

ALC-210.4 型 1/10 万分析天平(德国艾科勒), Alltech 型自动高效液相色谱仪(包括 ELSD2000ES 型蒸发光散射检测器, AG-10B 低噪音空气泵, SIL-20A 自动进样器, CTO-20A 柱温箱, 日本岛津); 对照品商陆皂苷甲(中国食品药品检定研究院, 批号 1119222-201001); 冰乙酸、硫酸、甲醇、无水乙醇均为分析纯, 三氯甲烷、甲醇均为色谱纯; 薄层色谱用硅胶 G 板, 硅胶 GF₂₅₄。样品为 2013 年采自河南各地的商陆药材, 经河南中医药大学陈随清教授鉴定为商陆科植物垂序商陆 *Phytolacca americara* 的干燥根。9 批样品分别采自河南省内的汝阳、西峡、罗山、尉氏、襄城、鲁山、洛宁、济源、方城 9 个县市。

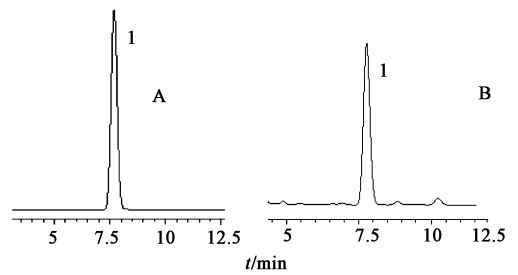
2 方法与结果

2.1 商陆皂苷甲的含量测定^[3]

2.1.1 色谱条件 InertSustain C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温 30 ℃, 流动相甲醇-0.4% 冰乙酸(30:70), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃; 蒸发光散射检测器检测条件: 气体流速 2.0 L·min⁻¹, 漂移管温度 90 ℃, 记录时间 20 min, 进样量 20 μL。见图 1。

2.1.2 对照品溶液的制备 取商陆皂苷甲对照品 2.52 mg, 精密称定, 置于 5 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 制得质量浓度为 0.504 g·L⁻¹ 对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取本品粉末(过三号筛)约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入稀乙醇 25 mL, 称定质量, 超声处理(功率 500 W, 频率 40 kHz)30 min, 放冷, 再称定质量, 用稀乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。



A. 对照品; B. 样品; 1. 商陆皂苷甲

图 1 商陆 HPLC

Fig. 1 HPLC of *Phytolacca Radix*

2.1.4 线性关系 分别精密吸取系列质量浓度 0.252, 0.504, 0.756, 1.008, 1.260 g·L⁻¹ 对照品溶液 10 μL, 进行测定, 以商陆皂苷甲质量浓度为横坐标, 以峰面积对数值为纵坐标进行线性回归, 回归方程 $Y = 1.3352X + 9.6823$ ($r = 0.9992$), 线性范围 2.52 ~ 12.6 μg。

2.1.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μL, 重复进样 6 次, 以峰面积值计算商陆皂苷甲 RSD 0.6%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 分别于 0, 4, 8, 12, 24, 48 h 精密吸取供试品溶液 10 μL, 各进样 1 次, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 结果商陆皂苷甲 RSD 2.5%, 说明样品在 48 h 内稳定性良好。

2.1.7 重复性试验 精密称取同一样品粉末 6 份, 各 1 g, 按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 每份精密吸取 10 μL 注入高效液相色谱仪, 按 2.1.1 项下色谱条件测定并计算, 商陆皂苷甲平均质量分数为 2.41 mg·g⁻¹, RSD 1.9%, 表明本法重复性较好。

2.1.8 加样回收率试验 取已知含量的商陆药材粉末约 0.5 g, 共 6 份, 精密称定, 分别精密加入商陆皂苷甲对照品溶液, 按 2.1.3 项下方法制得供试品溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 结果该方法的回收率良好, 见表 1。

表 1 商陆样品中加样回收率试验

Table 1 Results of addition recoveries of *Phytolacca Radix*

称样量	样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1.001	1.231	2.455	99.76		
1.001	1.242	2.520	101.94		
1.004	1.261	2.461	98.79	98.94	1.8
1.000	1.123	2.283	97.03		
1.002	1.212	2.411	98.73		
1.004	1.243	2.409	97.41		

注: 加入量均为 1.230 mg。

2.1.9 样品测定 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液各 20 μL , 注入高效液相色谱仪, 测定, 以外标两点法计算样品中商陆皂苷甲的含量, 测定结果见表 2。

表 2 河南产商陆药材中商陆皂苷甲及酸不溶性灰分质量分数
Table 2 Contents of esculentoside A and acid insoluble ash in *Phytolaccae Radix* from Henan %

产地	商陆皂苷甲	酸不溶性灰分
汝阳	0.22	0.48
西峡	3.52	0.59
罗山	0.98	1.16
尉氏	0.32	0.30
襄城	0.52	1.23
鲁山	1.29	0.88
洛宁	0.76	0.56
济源	1.94	0.48
方城	0.94	2.08

2.2 酸不溶性灰分的测定 参照 2015 年版《中国药典》酸不溶性灰分的测定方法, 结果见表 2。

2.3 指纹图谱

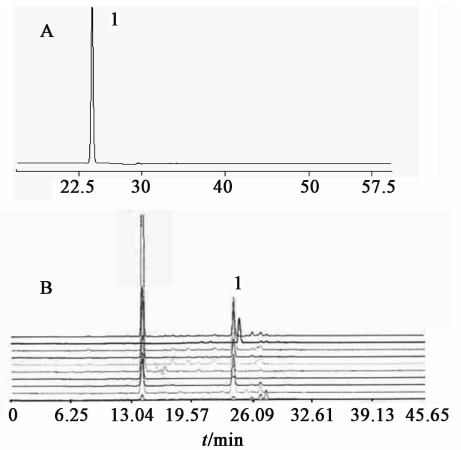
2.3.1 色谱条件 InertSustain C_{18} 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 流动相 0.4% 冰乙酸 (A)-甲醇 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 15 min, 35% ~ 60% B; 15 ~ 25 min, 60% ~ 70% B; 25 ~ 35 min, 70% ~ 80% B; 35 ~ 60 min, 80% B); 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 流速 0.5 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。蒸发光散射检测器检测条件: 气体流速 2.0 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, 漂移管温度 105 $^{\circ}\text{C}$, 记录时间 60 min。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密称定商陆药材粉末 1 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 75% 乙醇, 称定质量, 超声处理 60 min, 放冷, 补足减失的质量, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液 10 μL 进样。

2.3.3 对照品溶液的制备 取商陆皂苷甲对照品 2.52 mg, 精密称定, 至 5 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 制得质量浓度为 0.504 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.3.4 各色谱峰相对保留时间和面积计算 选定 7 号峰 (商陆皂苷甲) 为参照峰, 令其保留时间和峰面积分别为 1, 其他各峰的保留时间和峰面积分别与参照峰保留时间和峰面积比较, 比值作为各峰的相对保留时间和相对峰面积。见图 2。

2.3.5 精密度试验 精密称取 1 号样品, 制备供试品溶液并进行检测, 连续进样 6 次, 以商陆皂苷甲的保留时间和峰面积作为参照, 记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, RSD 均 < 3.0%, 符合色谱



A. 对照品; B. 9 批样品; 1. 商陆皂苷甲

图 2 商陆药材 HPLC 指纹谱

Fig. 2 HPLC fingerprint of *Phytolaccae Radix*

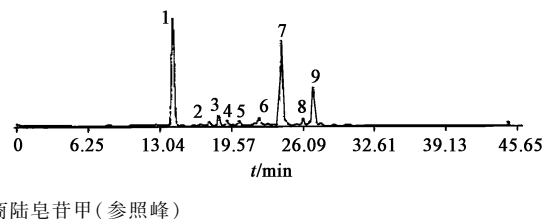
指纹图谱要求, 提示精密度良好。

2.3.6 重复性试验 分别精密称取 1 号样品 1 g, 共 6 份。制备供试品溶液并进行检测, 6 份样品各进样 1 次, 以商陆皂苷甲的保留时间和峰面积作为参照, 记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, RSD 均 < 3.0%, 符合指纹图谱要求, 提示重复性良好。

2.3.7 稳定性试验 精密称取 1 号样品, 制备供试品溶液并进行检测, 分别在 0, 4, 8, 12, 24, 48 h 各进样 20 μL , 以商陆皂苷甲的保留时间和峰面积作为参照, 记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, RSD 均 < 3.0%, 符合指纹图谱要求, 提示 48 h 内供试品溶液稳定性良好。

2.3.8 样品测定 取 9 批河南不同产地商陆药材样品, 按 2.3.2 项下方法制备供试品溶液, 分别进样, 在上述色谱条件下进行分析。

2.3.9 指纹图谱的建立 取 9 批商陆药材样品分析结果, 标出 9 个共有峰。以 7 号峰 (商陆皂苷甲) 为参照峰, 参照《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求》(暂行), 生成了商陆药材指纹图谱共有模式, 见图 3。



7. 商陆皂苷甲 (参照峰)

图 3 商陆药材 HPLC 指纹谱共有模式

Fig. 3 HPLC fingerprint comparison of *Phytolaccae Radix*

2.3.10 相似度分析 取 9 批商陆药材样品, 按

2.3.2 项下方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下分别进样分析,记录 45 min 的色谱图。得到河南不同产地商陆药材高效液相指纹图谱。采用由国家药典委员会提供的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件,计算相对共有峰保留时间、相对峰面积,见表 3,4。以商陆药材样品指纹图谱生成的共有模式为对照,分别计算商陆药材样品的相似度,其相似度相差比较大。汝阳、西峡、罗山、尉氏、襄城、鲁山、洛宁、济源、方城相似度分别为 0.728,0.914,0.908,0.981,0.788,0.610,0.860,0.937,0.313。

表 3 商陆药材 HPLC 指纹图谱中共有峰的相对保留时间
Table 3 Relative migrating time of common peak in HPLC fingerprint of Phytolaccae Radix

样品	1	2	3	4	5	6	8	9
S1	0.731	0.751	0.892	0.910	0.946	0.969	1.132	1.299
S2	0.733	0.743	0.911	0.954	0.964	0.970	1.131	1.298
S3	0.714	0.746	0.882	0.899	0.926	0.972	1.145	1.243
S4	0.728	0.778	0.885	0.912	0.947	0.979	1.151	1.272
S5	0.748	0.728	0.891	0.898	0.937	0.957	1.109	1.209
S6	0.787	0.749	0.926	0.934	0.951	0.986	1.147	1.238
S7	0.732	0.754	0.921	0.941	0.964	0.981	1.114	1.245
S8	0.734	0.716	0.892	0.921	0.932	0.961	1.168	1.250
S9	0.717	0.724	0.891	0.943	0.954	0.978	1.138	1.236

注:7 号峰均为 1.000。表 4 同。

表 4 商陆药材 HPLC 指纹图谱中共有峰的相对峰面积
Table 4 Common model of HPLC fingerprint of Phytolaccae Radix

样品	1	2	3	4	5	6	8	9
S1	0.914	0.010	0.011	0.012	0.006	0.013	0.027	0.067
S2	0.910	0.012	0.016	0.017	0.007	0.014	0.028	0.065
S3	0.900	0.011	0.015	0.010	0.005	0.012	0.026	0.061
S4	0.917	0.010	0.014	0.012	0.002	0.014	0.028	0.066
S5	0.907	0.013	0.009	0.011	0.006	0.016	0.029	0.068
S6	0.906	0.015	0.012	0.014	0.004	0.018	0.026	0.062
S7	0.912	0.012	0.011	0.012	0.002	0.014	0.031	0.061
S8	0.913	0.014	0.010	0.013	0.008	0.017	0.030	0.069
S9	0.911	0.016	0.013	0.015	0.003	0.013	0.024	0.070

3 讨论

本实验选择用蒸发光散射检测器是因为蒸发光散射检测器属于低温型,蒸发温度室温 - 70 ℃,低温设计能够同时满足高灵敏度和低噪音要求,而且在基线、噪声方面比较稳定,对所有化合物都能测定,不论化合物是否存在生色团或电活性基团,适用

性非常广泛^[24-25]。直接与被洗脱化合物的质量有关,对未知物可以得到准确的定量。能用梯度洗脱来优化分离样品。可用在很宽的范围内,分离比较复杂的化合物需对流动相添加改性剂。

本实验含量测定结果表明,不同产区商陆药材中商陆皂苷甲的含量均存在一定差异,其中济源、西峡、鲁山产商陆的含量较高,在 1.29% ~ 3.52%。其他几个产地均为 0.20% 以下,符合 2015 年版《中国药典》规定的商陆皂苷甲含量标准。说明河南整体环境适合商陆药材生长。采用 HPLC 技术对 9 批不同产地商陆药材进行初步分析,不同产地商陆药材具有相对稳定的相似度,本实验结果为制定合适的商陆药材质量评价标准提供了参考依据,丰富了商陆药材质量分析的参考数据。

中药材中含有化学成分众多,不同的化学性质使得极性变化幅度较大,等度洗脱基本无法达到理想的分离效果,而采用梯度洗脱可以使样品中各成分在设定的分析时段内充分分离,从而达到分析的要求。这样可以在保证色谱方法的稳定和重复的基础上,使色谱标准反应已分离化合物的信息,从而有利于指纹图谱的研究工作。

本实验根据《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》规定,借助《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版》软件能对指纹图谱相关参数进行自动匹配,标定 9 批次商陆药材的共有指纹峰,避免人工判断的盲目性,保证共有峰的公正和客观。

[参考文献]

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第 2 卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:737.

[2] 李忠芳,田耀平. 中药商陆的研究进展[J]. 安徽农学通报,2013,19(5):108.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:324.

[4] 黄泰康. 常用中药成分与药理手册[M]. 北京:中国医药科技出版社,1994:1612.

[5] 李一飞,姚广涛. 商陆药理作用及毒性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(13):248-251.

[6] 陈琳,吴皓. 商陆醋炙前后化学成分和药效比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(21):5-9.

[7] 李林,殷放宙,关洪月,等. 不同炮制方法对商陆中商陆皂苷甲含量的影响[J]. 南京中医药大学学报,2011,27(1):63-65.

[8] 江苏新医学院. 中药大辞典. 下册[M]. 上海:上海人民出版社,1977:2246.

[9] 王鹏程,王秋红,赵珊,等. 商陆化学成分及药理作用和临床应用研究进展[J]. 中草药,2014,45(18):

- 2722-2731.
- [10] 闫小红,张蓓玲,周兵,等.外来入侵植物美洲商陆提取物的化感活性[J].生态与农村环境学报,2012,28(2):139-145.
- [11] PENG K J, LUO C L, YOU W X, et al. Manganese uptake and interactions with cadmium in the hyperaccumulator-*Phytolacca americana* [J]. J Hazard Mater, 2008, 154(1/3):674.
- [12] 向言词,冯涛,彭秀花,等.利用美洲商陆修复镉尾渣污染土壤对后茬植物的影响[J].生态与农村环境学报,2009,25(3):63-68.
- [13] FU X P, DOU C M, CHEN Y X, et al. Subcellular distribution and chemical forms of cadmium in *Phytolacca americana* L. [J]. J Hazard Mater, 2011, 186(1):103-106.
- [14] 豆长明,陈新才,施积炎,等.超积累植物美洲商陆根中锰的累积与解毒[J].土壤学报,2010,47(1):168-171.
- [15] Schliemann W, Jour W I V, Komamine A, et al. Betacyanins from plants and cell cultures of *Phytolacca americana* [J]. Phytochemistry, 1996, 42(4):1039-1042.
- [16] Jerz G, Skotfzki T, Fiege K, et al. Separation of betalains from berries of *Phytolacca americana* by ion-pair high-speed counter-current chromatography [J]. J Chromatography A, 2008, 1190(1/2):63-67.
- [17] SHAO F, HU Z, XIONG Y M, et al. A New antifungal peptide from the seeds of *Phytolacca americana*: characterization, amino acid sequence and cDNA cloning [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1999, 1430(2):262-265.
- [18] Uchikoba T, Arima K, Yonezaea H, et al. Amino acid sequence and some properties of phytolaccain G, a cysteine protease from growing fruit of pokeweed, *Phytolacca americana* [J]. Bioch Biophys Acta, 2000, 1523(2/3):254-258.
- [19] Shmoda K, Harada T, Hamada H, et al. Biotransformation of raspberry ketone and zingerone by cultured cells of *Phytolacca americana* [J]. Phytochemistry, 2007, 68(4):487-491.
- [20] Jeong S I, Kim S J, Choo Y K, et al. *Phytolacca americana* inhibits the high glucose-induced mesangial proliferation via suppressing extracellular matrix accumulation and TGF- β production [J]. Phytomedicine, 2004, 11(2/3):175-179.
- [21] Armesto J J, Cheolick G P, Mcdonnell M J. Observations on the reproductive biology of *Phytolacca americana* (Phytolaccaceae) [J]. Bull Torrey Bot Club, 1983, 110(3):380-384.
- [22] 翟树强,李传荣,许景伟,等.灵山湾国家森林公园刺槐林下垂序商陆种子雨时空动态[J].植物生态学报,2010,34(10):1236-1242.
- [23] 李新华,王聪,陈研,等.浙江天目山自然保护区鸟类对美洲商陆种子的传播[J].四川动物,2011,30(3):421-428.
- [24] 纪祥娟,王军,杨新光,等.蒸发光散射检测器的应用概况及检定方法研究进展[J].计量与测试技术,2014(5):50-53.
- [25] 王巧娥,丁明玉.蒸发光散射检测技术研究进展[J].分析测试学报,2006,25(6):126-132.

[责任编辑 顾雪竹]