

地锦草药材 HPLC 指纹图谱及模式识别研究

黄琪^{1,2}, 黄彩虹^{1,2}, 雷鹏^{1,2*}, 尹桃^{1,2}, 刘海涛^{1,2}, 刘英慧^{1,2}

(1. 中南大学湘雅医院药剂科, 长沙 410008; 2. 中南大学药学院, 长沙 410013)

[摘要] 目的: 建立地锦草药材的高效液相指纹图谱, 用于评价地锦草药材的质量。方法: 采用 Promosil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 甲醇-0.1% 磷酸水为流动相梯度洗脱, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 检测波长 280 nm, 柱温 32 °C, 分析时间 85 min。结果: 10 批地锦草样品得到的高效液相指纹图谱有 24 个共有峰, 各共有峰之间的分离度较好, 各批次指纹图谱相似度 ≥ 0.90。结论: 地锦草药材的指纹图谱特征性及专属性强, 可用于地锦草药材的鉴别及质量控制。

[关键词] 地锦草; 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(2013)12-0095-04

[doi] 10.11653/syjf2013120095

Study on HPLC Fingerprint of Herba Euphorbia Humifusae

HUANG Qi^{1,2}, HUANG Cai-hong^{1,2}, LEI Peng^{1,2*}, YIN Tao^{1,2}, LIU Hai-tao^{1,2}, LIU Yin-hui^{1,2}

(1. Pharmacy of Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008 China;

2. School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410013 China)

[Abstract] **Objective:** To establish HPLC fingerprint of Herba Euphorbia Humifusae for quality control of the herbal medicine. **Method:** A Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) analytical column was used. The mobile phase was methanol-0.1% H₃PO₄ water. The elution was in gradient mode and detection wavelength was set at 280 nm. The column temperature was maintained at 32 °C and the flow rate was 0.8 mL·min⁻¹. The analytical time was 60 min. **Result:** There were 24 common peaks in the fingerprint of 10 batches of Herba Euphorbia Humifusae samples, and each peak in the fingerprint was well separated under the chromatographic condition above. The similarity of the 10 batches of Herba Euphorbia Humifusae was not lower than 0.90. **Conclusion:** This method is available for the identification and quality control of Herba Euphorbia Humifusae.

[Key words] Herba Euphorbia Humifusae; HPLC; fingerprints

地锦草为大戟科植物地锦 *Euphorbia humifusa* Willd. 或斑地锦 *Euphorbia maculata* L. 的干燥全草, 具有清热解毒、凉血止血等功效, 主要用于治疗各种皮肤病、瘙痒、痢疾、肠炎、咳血、吐血、便血、崩漏、外

伤出血、湿热黄疸、乳汁不通、痈肿疔疮及跌打肿痛等疾病^[1-4]。地锦草主要含黄酮及其苷类^[5-6]、有机酸及鞣质等具有较强生理活性成分^[7-9]。目前, 文献报道只对地锦草中槲皮素、山柰素、没食子酸等成分进行含量测定^[10-11], 但尚未见有关其指纹图谱研究的文献报道。本研究采用 HPLC-DAD 法对 10 批地锦草药材进行指纹图谱研究, 为全面控制其药材质量提供科学依据。

1 材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(包括 G1311 A 四元梯度泵、G1313 A 自动进样器、G1316 A 柱温箱、G1315 二极管阵列检测器, 美国 Agilent 公司), AG285 型分析天平(瑞士梅特勒公司), KS-600D 型超声清洗

[收稿日期] 20121113(019)

[基金项目] 湖南省中医药科技基金重点项目(2009008); 长沙市科技局重点项目(K0802115-31)

[第一作者] 黄琪, 硕士, 从事中药质量标准研究, Tel: 0731-84327114, E-mail: huangqi20021986@163.com

[通讯作者] * 雷鹏, 副教授, 硕士生导师, 从事中药质量标准及新药研发, Tel: 0731-84327584, E-mail: lp7222003@163.com

机(宁波科生仪器厂)。地锦草药材分别收集于湖南、山东,共 10 批,经中南大学湘雅医院徐平声副主任药师鉴定,为大戟科植物地锦 *E. humifusa* Willd. 和斑地锦 *E. maculata* L. 的干燥全草,药材信息见表

1,标本存放于中南大学湘雅医院药剂科。没食子酸对照品(批号 110831-200302),购自中国药品生物制品检定所。甲醇为色谱纯,其他试剂为分析纯,流动相用水为重蒸馏水。

表 1 各批次药材信息

No.	药材来源	产地	品种	采集日期
1	自采药材(湖南长沙)	湖南	斑地锦	2008-11
2	自采药材(湖南长沙)	湖南	斑地锦	2010-08
3	神农国药饮片加工有限公司(湖南邵阳)	湖南	地锦	2008-09
4	建湘药店(湖南长沙)	湖南	地锦	2008-11
5	老百姓大药房湘雅路店(湖南长沙)	山东	地锦	2008-11
6	湖南振兴中药饮片实业有限公司(湖南长沙)	湖南	地锦	2009-05
7	中南大学湘雅医院中药房(湖南长沙)	湖南	地锦	2008-09
8	中南大学湘雅医院中药房(湖南长沙)	湖南	地锦	2010-05
9	金泰联医药有限公司(山东泰安)	山东	地锦	2009-06
10	湘雅药店(湖南长沙)	湖南	地锦	2009-05

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Promosil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.1% 磷酸水(梯度洗脱), 柱温 32 °C, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 检测波长 280 nm。理论塔板数按没食子酸计算不低于 4 000, 进样量 10 μL, 检测时间 85 min。梯度洗脱条件见表 2。在上述色谱条件下, 色谱图见图 1。

表 2 流动相梯度洗脱程序表

t/min	甲醇/%	0.1% 磷酸水溶液/%	水/%
0	5	10	85
15	10	10	80
20	17	10	73
45	27	10	63
70	50	10	40
80	90	10	0

精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇 20 mL, 超声提取 60 min, 冷却至室温, 加 70% 甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 续滤液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.4 精密度试验 取同一供试品溶液, 在 2.1 条件下, 连续进样 5 次, 记录色图谱, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 各共有峰的相对保留时间的 RSD 均 < 2%, 相对峰面积的 RSD 均 < 3%, 表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验 取同一供试品溶液, 在 2.1 条件下, 分别于 0, 3, 6, 15, 24 h 进样 10 μL, 记录色图谱, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 各共有峰的相对保留时间的 RSD 均 < 2%, 相对峰面积的 RSD 均 < 3%, 表明供试溶液在 24 h 稳定。

2.6 重复性试验 取同一批地锦草粉末 5 份, 精密称定, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 并在 2.1 条件下测定, 记录色图谱, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 各共有峰的相对保留时间的 RSD 均 < 2%, 相对峰面积的 RSD 均 < 3%, 重复性良好, 符合指纹图谱分析要求。

2.7 地锦草药材指纹图谱的建立 按上述方法检测 10 批地锦草药材的指纹图谱见图 1。采用国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 A 版》(科研版) 软件进行分析, 生成地锦草药材共有模式的对照指纹图谱, 得到 24 个共有峰, 以中位数生成对照谱图, 经过 1 点校正后自动匹配, 结果见图 2。通过与对照品图谱对照, 指认其中的 2 号峰为没食子酸。以共有峰中的 9 号峰为参照峰,

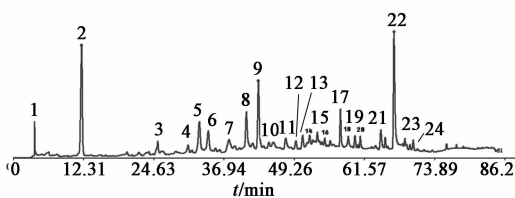


图 1 地锦草药材 HPLC 特征指纹图谱

2.2 对照品溶液的制备 精密称取没食子酸对照品 10.36 mg, 置 100 mL 量瓶, 加 70% 甲醇溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 得到浓度为 103.6 mg·L⁻¹ 的没食子酸对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取地锦草细粉约 0.5 g,

求出所有共有峰的相对保留时间和相对峰面积,各共有峰的相对保留时间 RSD < 3.0%。

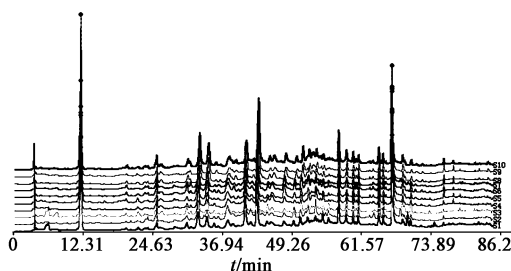


图2 10批地锦草药材 HPLC 指纹图谱

2.8 地锦草药材指纹图谱相似度分析 10个不同批次地锦草药材与共有模式对照指纹图谱的相似度分别为 0.977, 0.917, 0.959, 0.963, 0.912, 0.962, 0.942, 0.957, 0.915, 0.945。10个批次的药材与共有模式之间相似度 > 0.90。

2.9 地锦草药材指纹图谱系统聚类分析 本文应用 SPSS 13.0 统计学软件对其进行系统聚类分析,采用欧几里德平方和距离作为样品的测度,按组间分析法对样品进行聚类分析。图3为系统聚类分析的树形图,它直观地显示了整个聚类过程,将10批不同产地的地锦草药材划分为两大类。1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10号样品为第I类;其他批次分为第II类。通过相似度软件分别对两类药材样品进行相似度计算,与各自共有模式之间相似度均 > 0.90。两类药材共有模式及对照品指纹图谱的比较如图4。

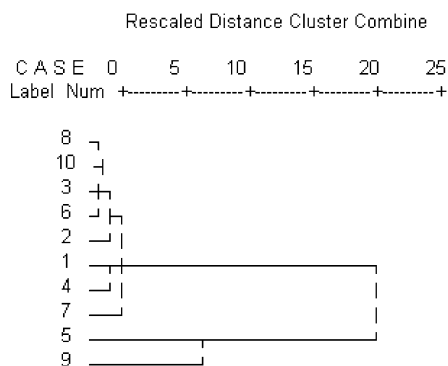
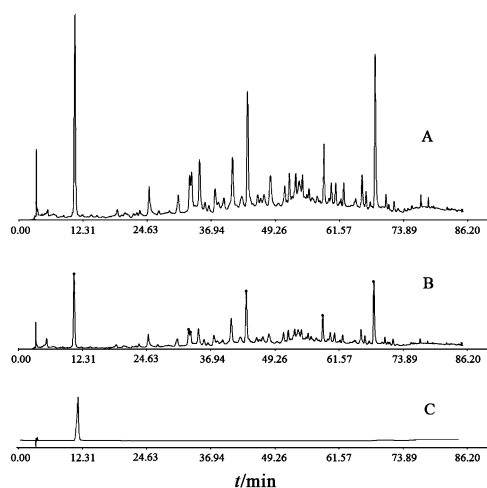


图3 地锦草指纹图谱的聚类分析树状示意

3 讨论

比较了不同体积分数的甲醇溶剂和乙醇溶液(从无水甲醇到50%甲醇水溶液、无水乙醇到50%乙醇水溶液)的提取效果,发现70%甲醇水溶液的条件下,色谱图中所有成分峰面积较大;对超声和回流法进行比较,由于超声法操作简单,提取时间短,效果好,故选用该法;将样品超声30, 40, 50, 60, 90 min后制样,发现超声60 min效果最好,故确定



A. 第I类药材; B. 第II类药材; C. 对照品

图4 各类别药材共有模式指纹图谱及对照指纹图谱

70% 甲醇为溶剂超声提取 60 min 制备供试品溶液。考察了甲醇-水, 乙腈-水, 甲醇-磷酸溶液, 甲醇-冰醋酸溶液, 乙腈-磷酸溶液及乙腈-冰醋酸溶液等洗脱体系, 结果以甲醇-0.1% 磷酸水体系洗脱得到的色谱峰形最佳。经多次摸索, 以梯度洗脱程序运行 85 min, 可使全部色谱峰流出, 并且主要色谱峰的分离度较好。

经二极管阵列检测器 190 ~ 400 nm 扫描, 并且比较 254, 270, 280, 320, 360 nm 不同检测波长, 综合考虑地锦草提取物中各个成分的吸收光谱, 以及光谱吸收背景的干扰, 结果表明 280 nm 下色谱峰的表现丰度较高, 并能充分反映样品组分全貌。

参照峰的选择, 在一般情况下应选择样品中容易获得且含量较高的一个主要活性成分或指标成分作为参照物(S)。本实验在参照峰的选择上考虑到已知活性成分 2 号峰没食子酸为极性较强化合物, 稳定性相对较低, 故本实验选用中等极性、含量较高且相对稳定的 9 号峰作为参照峰。

中药色谱指纹图谱相似度评价 (Chromatography Fingerprint Similarity) 是一种综合的、量化的色谱鉴定手段, 可以鉴别药材真伪和评价原料药材、半成品和成品质量的均一性和稳定性^[12]。模式识别 (Pattern recognition) 又是基于化学测量数据, 从复杂的数据中最大限度的提取信息, 进一步揭示物质的隐含性质^[13]。本研究首次基于以上方法建立了地锦草 HPLC 指纹图谱。结果表明其指纹图谱相互间较为吻合, 但由于样品的个体差异, 特征峰的表现丰度存在一定的差异, 但整体轮廓均符合共有特征。从药材整体色谱图入手, 选取了 24 个特征峰构成了地锦草的指纹图谱, 以共有模式作为地锦草的鉴别

HPLC 测定花蛇解痒胶囊中蛇床子素的含量

陆春宁¹, 梁艺坚¹, 曹耘¹, 潘彬¹, 陆玮¹, 廖伟成¹, 刘雪梅^{2*}

(1. 广西梧州三鹤药业有限公司, 广西 梧州 543002; 2. 广西中医药大学药学院, 南宁 530001)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 测定花蛇解痒胶囊中蛇床子素的含量方法。方法: 采用高效液相色谱法, Phenomenex Synergi C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 4 μm), 乙腈-水(62:38)为流动相, 检测波长 322 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温室温。结果: 蛇床子素在 0.077 ~ 0.772 μg 线性关系良好($r=0.9999$), 平均加样回收率为 105.0%, RSD 1.5% ($n=6$)。结论: 该方法操作简便, 结果准确可靠, 可作为花蛇解痒胶囊中蛇床子素的含量测定方法。

[关键词] 花蛇解痒胶囊; 蛇床子素; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0098-03

[doi] 10.11653/syjf2013120098

Determination of Osthole in Huashe Jieyang Capsule by HPLC

LU Chun-ning¹, LIANG Yi-jian¹, CAO Yun¹, PAN Bin¹, LU Wei¹, LIAO Wei-cheng¹, LIU Xue-mei^{2*}

[收稿日期] 20120710(017)

[基金项目] 广西财政厅“自治区中小企业发展专项资金”项目(桂财企[2012]60号)

[第一作者] 陆春宁, 执业药师, 助理工程师, 从事民族药、优势中成药新药开发研究, Tel: 0774-3905607, E-mail: len1996@163.com

[通讯作者] * 刘雪梅, 硕士, 副教授, 从事民族药、优势中成药新药开发研究, Tel: 0771-3137585, E-mail: lenarecome@yahoo.com.cn

标准, 能提供更全面的质量控制信息。另外根据聚类分析结果, 可将所有药材分为 II 类, 主要化学成分种类差异不大, 而峰面积则存在较大差异, 与地锦草的样品品种无关, 但与产地存在一定相关性, 其质量存在着地域性的差异, 怀疑不同的地域环境、土壤环境和气候差异是导致地锦草品质之间的差异的主要原因, 环境与品质的相关性有待于进一步研究分析。本实验证明该方法稳定、可靠, 重复性好, 为地锦草的质量评价及控制提供了参考依据, 同时也可作为地锦草主成分制剂指纹图谱研究的基础。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 118.
[2] 国家中医药管理局. 中华本草. 第 4 册 [M]. 上海: 上海出版社, 1999: 3576.
[3] 安惠霞, 李治建, 古丽娜·达吾提, 等. 地锦草的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(12): 2866.
[4] 杜艳, 丁红, 韩奋. 地锦草滴丸的制备工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(20): 33.
[5] Fei D, Na T, Jun X, et al. New dpyrrolidinonoids and glycosides from *Euphorbia humifusa* [J]. J Asi Nat Prod Res, 2008, 10(6): 531.

[6] Yoshiaki A, Keita K, Tsutoma H, et al. Four new hydrolyzable tannins and an acylated flavonol glycoside from *Euphorbia maiculata* [J]. Canadian J Chem, 1997, 75(6): 727.
[7] 柳润辉, 孔令义. 地锦草脂溶性成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(4): 437.
[8] 张伟, 卢引, 顾雪竹, 等. 地锦草挥发性成分的 HS-SPME-GC-MS 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(21): 66.
[9] 张国庆, 冯文茹, 米沙. 地锦草乙醇提取物对白色念珠菌性阴道炎大鼠模型的治疗作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(19): 191.
[10] 雷鹏, 刘韶, 李新中, 等. HPLC 测定地锦草中槲皮素、山柰素的含量 [J]. 中药材, 2005, 28(8): 666.
[11] 李慧, 许亮, 徐保利, 等. HPLC 测定地锦草中没食子酸、槲皮素及山柰素含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 100.
[12] 詹雪艳, 史新元, 段天璇. 色谱指纹图谱相似度方法的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(2): 248.
[13] 刘万仓, 孙磊, 于孟琦, 等. 中药指纹图谱模式识别研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2010, 37(6): 446.

[责任编辑 顾雪竹]