

# 叶下珠高效液相色谱指纹图谱研究

闫小玉<sup>1</sup>, 赵瑛博<sup>1,2</sup>, 梁可<sup>1</sup>, 周艳<sup>1</sup>, 毕开顺<sup>1</sup>, 陈晓辉<sup>1\*</sup>

(1. 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016; 2. 沈阳农业大学分析测试中心, 沈阳 110866)

**[摘要]** 目的: 建立叶下珠药材的高效液相色谱指纹图谱。方法: 采用反相高效液相色谱法, 以柯里拉京为内参比峰。色谱条件为 Kromasil C<sub>18</sub> 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-体积分数为 0.1% 的磷酸水, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C, 检测波长 280 nm。采用 SPSS 16.0 软件进行系统聚类分析; 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 (2009 版) 进行相似度评价。结果: 在色谱指纹图谱中, 确立了 21 个共有峰, 指认了其中 6 个色谱峰, 系统聚类分析将 14 批叶下珠药材分为两类, 建立了叶下珠药材的共有模式, 在 14 批叶下珠药材中有 12 批样品的指纹图谱相似度在 0.90 以上。结论: 该方法简便、准确、重复性好, 为评价叶下珠药材的质量提供了依据。

**[关键词]** 叶下珠; 指纹图谱; 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(2012)12-0108-04

## Fingerprint Analysis of *Phyllanthus urinaria* by HPLC

YAN Xiao-yu<sup>1</sup>, ZHAO Ying-bo<sup>1,2</sup>, LIANG Ke<sup>1</sup>, ZHOU Yan<sup>1</sup>, BI Kai-shun<sup>1</sup>, CHEN Xiao-hui<sup>1\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

2. Analysis and Testing Center, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

**[收稿日期]** 20110626(001)

**[第一作者]** 闫小玉, 硕士研究生, 从事中药质量控制方法研究, Tel: 024-23986296, E-mail: qq813yanxiaoyu@126.com

**[通讯作者]** \* 陈晓辉, 教授, 博士, 从事药物质量控制分析方法的研究, Tel: 024-23986259, E-mail: cxh\_syphu@yahoo.com.cn

丰富, 特别是 Fe, Zn, Mn, Sr 含量较一般植物高。Fe, Zn 的含量较高, 能增强人体造血功能, 提高多种酶的活力和防止细胞老化。Mn 是人体中多种酶的激活剂, Mn 缺乏时会使内分泌功能紊乱。特别是对人体有益的 Sr 含量高达 25.710 mg·kg<sup>-1</sup>, 远高于其他植物, Sr 是人体骨骼和牙齿的正常组成部分, 它可强壮骨骼、防治心血管病, 促进新陈代谢<sup>[6]</sup>。

由表 2 可知, 与参考值相比较, 各元素 RSD 均在 6% 以内, 回收率在 80.98% ~ 108.39%。可以看出测定值与标准值吻合很好, 说明该方法准确可靠。

综上所述, 采用 ICP-MS 法测定江香薷不同部位 25 种矿质元素含量的精密度和准确度都很高, 测定结果准确可靠。从测定结果可知, 江香薷含有丰富的矿质元素, 尤其是 K, Ca, Fe, Zn, Mn, Sr 含量较高, 提示江香薷作为富含矿质营养的种质资源, 是值得深入研究和开发的。而且江香薷丰富的矿质元素与其表现出的独特的解表药效之间的关系也有待进

一步研究。

### [参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2005: 182.
- [2] 刘华, 张东明, 罗永明. 江西道地药材江香薷化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(3): 56.
- [3] 刘华, 沈娟娟, 张东明, 等. 江香薷的极性成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(8): 84.
- [4] 沈娟娟, 刘华, 张东明, 等. 江香薷的极性成分研究 II [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(13): 1779.
- [5] 刘华, 李桂生, 罗永明, 等. 江香薷醇提物石油醚部位化学成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(14): 68.
- [6] 杨肖娥. 微量元素与人类健康[J]. 国际学术动态, 2005(3): 30.

[责任编辑 顾雪竹]

**[ Abstract ] Objective:** To establish the HPLC chromatographic fingerprint analysis for the quality control of *Phyllanthus urinaria*. **Method:** RP-HPLC Method was applied to establish the chromatographic fingerprint. Corilagin was used as the internal reference peak. The separation was performed on a Kromasil C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with a gradient elution composed of acetonitrile and 0.1% phosphate acid (0.1:100). The column temperature was set at 30 °C and the flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The detective wavelength was at 280 nm. Hierarchical clustering analysis was performed with SPSS 16.0. similarity of HPLC fingerprint was performed on the Similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine (2009). **Result:** Twenty-one characteristic peaks were established in the fingerprint, and six peaks were identified. 14 batches s of *P. urinaria*. could be divided into two grades through the results of hierarchical clustering analysis. The mutual model was established and the similarities were calculated. The similarity of 12 samples in all the 14 samples was more than 0.90. **Conclusion:** The method is simple and accurate with good reproducibility. It can be used for the quality control of *P. urinaria*.

**[ Key words ]** *Phyllanthus urinaria*; fingerprint; RP-HPLC

叶下珠为大戟科植物叶下珠的全草,味淡、微涩,性凉,功能清热利湿、清肝明目、用于湿热黄疸、泄泻、痢疾、热淋、石淋、水肿尿少、小儿疳积等,此外,鲜草外敷可治毒蛇咬伤<sup>[1]</sup>。目前含有叶下珠药材的制剂主要有叶下珠胶囊、叶下珠片及乙肝舒康片等,其中前两者为叶下珠的单味药制剂,后者由叶下珠、白花蛇舌草、虎杖、丹参、黄芪、何首乌等组成的复方制剂;经有关实验证明,叶下珠及其制剂具有抗 HBV、抗肝纤维化作用,对肝损害也具有保护作用,还可以预防原发性肝癌,临床上治疗乙型病毒肝炎,具有疗效好、毒副作用小等特点<sup>[2-3]</sup>。不同产地叶下珠药材的质量存在较大差异,从而会影响临床用药的疗效,建立其指纹图谱有利于从整体上控制其质量,目前虽有叶下珠药材指纹图谱的相关报道,但是文献中的分离效果较差,并且指认的色谱峰较少<sup>[4-7]</sup>,《中国药典》2010 年版也并未载叶下珠的质量标准。本研究采用 RP-HPLC 建立了叶下珠药材的色谱指纹图谱。该方法简便、准确、重复性好,为更好的控制叶下珠药材的质量提供方法。

## 1 材料

**1.1 仪器** Hitachi L-2300 型高效液相色谱仪, Hitachi L-2130 紫外检测器, D-2000 Elite 色谱工作站(日本日立公司), Sartorius 公司 BP210S 型电子天平。

**1.2 试药** 对照品 6-O-没食子酰基-β-D-吡喃葡萄糖、没食子酸、柯里拉京、短叶苏木酚、鞣花酸和山奈酚-3-O-芸香糖苷均为自制(经核磁和质谱确证结构,采用 HPLC 峰面积归一化法计算含量,纯度质量分数均大于 98.5%)。甲醇为色谱纯,山东禹王实业有限公司;乙腈为色谱纯,百灵威科技有限公司;

磷酸为色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;水为娃哈哈纯净水。从不同产地收集的 14 批叶下珠药材均经沈阳药科大学中药学院贾英副教授鉴定为大戟科植物叶下珠 *Phyllanthus urinaria* L. 的干燥全草,样品来源见表 1。

表 1 叶下珠样品的来源

No.	产地	采收时间	No.	产地	采收时间
1	陕西咸阳	2010-08	8	云南西双版纳 3	2010-07
2	重庆	2009-12	9	云南西双版纳 1	2010-07
3	广西 2	2009-09	10	云南西双版纳 2	2009-08
4	河北	2010-08	11	广西 1	不详
5	湖南长沙	2010-09	12	浙江 2	2010-08
6	广东广州 2	2010-07	13	浙江 1	不详
7	广东广州 1	不详	14	四川成都	2009-07

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 大连中汇达公司);流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0 min, 5% A; 10 min, 11% A; 35 min, 13% A; 45 min, 16% A; 55 min, 16% A; 65 min, 22% A; 80 min, 30% A),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 280 nm,柱温 30 °C,进样量 10 μL。

**2.2 对照品溶液的制备** 分别精密称取 6-O-没食子酰基-β-D-吡喃葡萄糖、没食子酸、柯里拉京、短叶苏木酚、鞣花酸和山奈酚-3-O-芸香糖苷对照品适量于 10 mL 量瓶中,加体积分数为 50% 的甲醇溶解,并稀释至刻度,摇匀,制成 6-O-没食子酰基-β-D-吡喃葡萄糖、没食子酸、柯里拉京、短叶苏木酚、鞣花酸和山奈酚-3-O-芸香糖苷质量浓度分别为 12.32,

16.00, 50.75, 10.84, 50.90, 5.525 mg·L<sup>-1</sup> 的混合对照品储备液。

**2.3 供试品溶液的制备** 取叶下珠药材粉末(过 20 目筛)约 0.4 g,精密称定,置 50 mL 锥形瓶中,精密加入体积分数为 50% 的甲醇 20 mL,称定质量,超声(200 W, 40 kHz)提取 30 min,放冷,再称定质量,加体积分数为 50% 的甲醇补足缺失的质量,取适量经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

**2.4 指纹图谱方法学考察**

**2.4.1 精密度试验** 取同一供试品溶液,在上述色谱条件下重复进样 6 次,计算各共有峰与内参比峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3.7%,表明仪器精密度良好,符合指纹图谱要求。

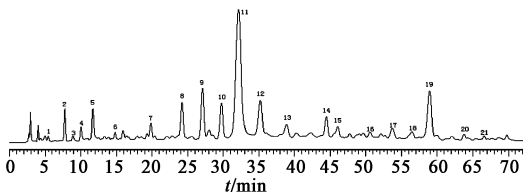
**2.4.2 重复性试验** 取同一批叶下珠药材粉末(No. 1)6 份,按 2.3 项下制备供试品溶液,在上述色谱条件下进样分析,计算各共有峰与内参比峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 4.0%,表明该方法重复性良好,符合指纹图谱要求。

**2.4.3 稳定性试验** 取同一供试品溶液(No. 1),在室温下放置,分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 在上述色谱条件下进样分析,计算各共有峰与内参比峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3.7%,表明该供试品在 24 h 内稳定。

**2.5 样品测定** 取所收集的叶下珠药材粉末约 0.4 g,精密称定,按 2.3 项下方法制备 14 批供试品溶液,在上述色谱条件下进样分析,记录色谱图。

**2.6 结果**

**2.6.1 叶下珠色谱指纹图谱** 以柯里拉京为内参比峰,确定了 21 个共有峰,指认了其中 6 个色谱峰,分别为 6-*O*-没食子酰基-β-*D*-吡喃葡萄糖(1 号)、没食子酸(2 号)、柯里拉京(10 号)、短叶苏木酚(13 号)、鞣花酸(18 号)、和山奈酚-3-*O*-芸香糖苷(21 号),HPLC 见图 1(No. 1)。



1. 6-*O*-没食子酰基-β-*D*-吡喃葡萄糖; 2. 没食子酸; 10. 柯里拉京; 13. 短叶苏木酚; 18. 鞣花酸; 21. 山奈酚-3-*O*-芸香糖苷。

图 1 叶下珠样品(No. 1) HPLC

**2.6.2 叶下珠样品系统聚类分析** 将各色谱峰面积相对于称样量量化,应用“SPSS 16.0”软件对其进

行系统聚类分析,采用组间均联法(between-group linkage),以夹角余弦(cosin)作为样品相似度的测定<sup>[8]</sup>。聚类分析将 14 批叶下珠药材分为两类(样品 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14 为第 I 类;样品 11, 13 为第 II 类),聚类谱系图见图 2。

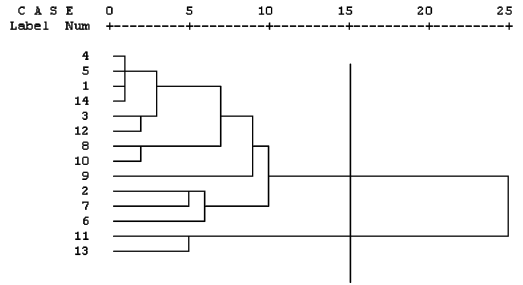


图 2 叶下珠样品聚类分析结果

**2.6.3 叶下珠样品共有模式的建立** 结合聚类分析结果,从 14 批叶下珠药材中选取第 I 类的 12 个样品(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14 号样品),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(2009 版),通过色谱峰多点校正的方法对色谱峰进行自动匹配生成药材的色谱指纹图谱共有模式,色谱图见图 3。

**2.6.4 各产地药材指纹图谱相似度评价** 采用国家药典委员会的中药色谱指纹图谱相似度评价系统对上述 14 批药材的指纹图谱进行相似度的分析,相似度结果见表 2。相似度分析结果与系统聚类结果一致,2 种方法得到了相互验证。由相似度计算结果结合聚类分析和形态鉴定结果,相似度在 0.90 以上的可以认为该药材为推荐品,0.90 以下(11, 13 号)的为该药材的非推荐品。

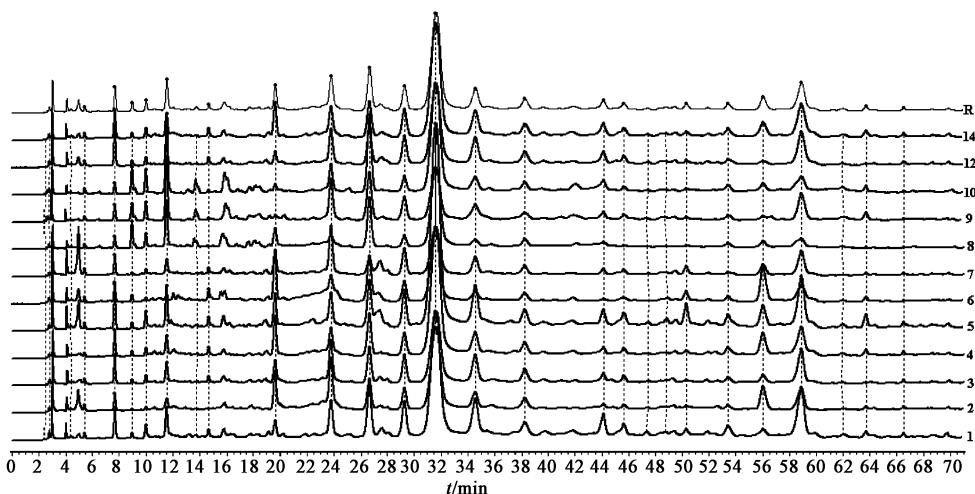
表 2 相似度计算

No.	相似度	No.	相似度
1	0.987	8	0.965
2	0.966	9	0.941
3	0.971	10	0.962
4	0.990	11	0.853
5	0.981	12	0.987
6	0.931	13	0.804
7	0.935	14	0.989

**3 讨论**

**3.1 流动相的选择** 考察了甲醇-0.1% 的磷酸水、乙腈-0.1% 的磷酸水和乙腈-0.2% 的甲酸水 3 种流动相系统,结果表明乙腈-0.1% 的磷酸水系统所得的色谱图基线平稳分离效果较好,并且 140 min 图谱显示在 70 min 后无其他色谱峰出现。

**3.2 检测波长的选择** 考察了 210, 230, 250, 280,



R. 对照谱

图3 12批叶下珠样品共有模式色谱

310 nm 的谱图特征,发现在 280 nm 处色谱图的信息比较丰富,并且基线平稳,故选择 280 nm 作为检测波长。

**3.3 提取条件的选择** 对提取方法(加热回流、超声)、提取时间(20,30,40 min)和提取溶剂(水、体积分数分别为 30%,40%,50%,60%的甲醇水、甲醇)进行了考察,结果表明 50% 甲醇超声提取 30 min 作为提取条件时,色谱峰的个数较多且峰面积较大。

**3.4 聚类分析和相似度评价结果分析** 叶下珠药材中化学成分复杂,显然仅以单一成分控制其质量不够全面,因此有必要建立其特征图谱。本研究通过建立叶下珠药材的指纹图谱,确立了 21 个共有峰,并且指认了其中 6 个色谱峰,分别为没食子酸、柯里拉京、短叶苏木酚和鞣花酸,以上均为叶下珠中的特征性成分。不同产地的叶下珠药材特征图谱有明显差别,21 个共有峰的相对保留时间符合程度很好,但相对峰面积差别较大,说明不同产地药材质量差别较大,应用本研究建立的方法控制叶下珠药材的质量更为可靠。

[参考文献]

[1] 宋立人,洪恂,丁绪亮,等. 现代中药学大辞典. 上册 [M]. 北京:人民卫生出版社,2001:614.

[2] 玉顺子. 叶下珠及其制剂药理作用及临床应用研究进展[J]. 中国药业,2010,19(7):87.

[3] 彭立生,贺劲松,童光东,等. 叶下珠提取物抗乙肝病毒及乙肝病毒 X 基因的研究[J]. 中西医结合肝病杂志,2006,16(6):340.

[4] 王琳,祝炜玮,朱纓. 叶下珠药材的高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中国药业,2009,18(20):15.

[5] 刘慧,盛卫国,彭松. 叶下珠药材 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中药材,2007,30(2):150.

[6] 范适,左家哺,易诚,等. 叶下珠胶囊的 HPLC 法指纹图谱研究[J]. 湖南中医药大学学报,2008,28(1):35.

[7] 范适. 叶下珠保肝护肝有效成分的分离及 HPLC 指纹图谱研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2007:43.

[8] 逢楠楠,毕开顺,闫宝庆,等. 芫花高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中草药,2010,41(5):818.

[责任编辑 顾雪竹]