

五灵脂药材的 HPLC 指纹图谱分析

焦玉^{1*}, 刘晓秋²

- (1. 襄阳市中医医院药学部, 湖北 襄阳 441000;
2. 沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110016)

[摘要] 目的:建立五灵脂药材的 HPLC 指纹图谱。方法:采用 HPLC 法,色谱柱 Diamonsil ODS C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相乙腈(A)-0.5%冰醋酸水溶液(B);梯度洗脱(0~15 min, 85%~65% B, 15~35 min, 65%~40% B, 35~40 min, 40%~25% B, 40~60 min, 25%~10% B, 60~65 min, 10%~0% B;检测波长 265 nm;流速 0.8 mL·min⁻¹;柱温室温。结果:建立了五灵脂药材的 HPLC 指纹图谱,标定了 14 个共有峰,并用对照品指认了其中 3 个峰,10 批样品的相似度均大于 0.90。方法的精密度、稳定性和重复性良好。结论:建立的五灵脂药材指纹图谱特征性及专属性强,可为其质量控制和药效物质基础研究提供参考。

[关键词] 五灵脂;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(2012)05-0098-03

Analysis of HPLC Fingerprint of Faeces Trogopteroni

JIAO Yu^{1*}, LIU Xiao-qiu²

- (1. Department of Pharmacy, Chinese Medicine Hospital of Xiangyang City, Xiangyang 441000, China;
2. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the HPLC fingerprint of Faeces Trogopteroni (FT). **Method:** The separation was performed on a Diamonsil ODS C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) and the mobile phase consisted of acetonitrile (A) -0.5% aqueous acetic acid (B), with an optimized gradient program of 0~15 min, 85%-65% B, 15-35 min, 65%-40% B, 35-40 min, 40%-25% B, 40-60 min, 25%-10% B, 60-65 min, 10%-0% B. The flow rate was 0.8 mL·min⁻¹ and the wavelength was set at 265 nm. The experiment was performed under room temperature. **Result:** The HPLC fingerprint of FT was established, in which 14 co-peaks were searched out and 3 peaks were identified with reference substances. All of the similarities were greater than 0.90. The precision, stability and repetition were good. **Conclusion:** The characteristic and specialization of the fingerprint were good, which can provide the basis for its quality control and effective substance.

[Key words] Faeces Trogopteroni; HPLC-DAD; fingerprint

五灵脂为鼯鼠科动物复齿鼯鼠的干燥粪便^[1],其性温,味咸、甘,归肝经。主产于山西太行山、五台山地区及陕西河北等地。其化学成分报道较多,主要有三萜类^[2-3]、酚酸类^[4]、挥发油^[5]、含氮类化合物^[6]、鞣质类^[7],另外文献报道五灵脂中含有黄酮类成分^[8]。临床上五灵脂主要用于妇科疾病,治疗

痛经、子宫出血、血瘀经闭、产后瘀血腹痛;外用治疗跌打损伤、蛇虫咬伤。现代药理研究表明,五灵脂具有抑制血小板聚集、防止动脉粥样硬化、抗血栓、抗溃疡、抗肿瘤、抗自由基等作用^[9-12]。五灵脂临床用途广泛,目前尚未有一种方法较全面的反应其物质基础全貌。

指纹图谱技术已被广泛应用于中药材及复方物质基础研究,其优点在于可比较全面地反映其复杂的化学成分及其相对比例。本文采用 HPLC-DAD 法对不同来源五灵脂药材进行指纹图谱分析,为进一步研究其药效物质基础提供科学依据。

[收稿日期] 20111018(010)

[通讯作者] *焦玉,硕士,药师,从事中药质量控制及药效物质基础研究, Tel: 13797739563, E-mail: jiaoyu1216@163.com

1 材料

HPLC 仪((LC-10Atpv 泵、DAD 检测器、Class-
vp 工作站,日本 Shimadzu 公司),Diamondsil⁰DS C₁₈
分析柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm,北京迪马科技有
限公司);RE52CS 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪
器厂);乙腈(色谱纯,江苏汉邦科技有限公司),纯
净水(杭州娃哈哈集团有限公司),其他试剂均为分
析纯。

原儿茶酸对照品(纯度 > 98%,中国药品生物
制品检定所,批号 809-200102),穗花杉双黄酮和扁
柏双黄酮对照品(纯度 > 98%,自制)^[13]。

10 批五灵脂药材于 2008 年收集,由辽宁省食
品药品检验所王维宁副主任药师鉴定为鼯鼠科动
物复齿鼯鼠 *Trogopterus xanthipes* Milne-Edwards 的干燥
粪便。药材来源见表 1。

表 1 10 批五灵脂药材来源

No.	来源	收集时间	No.	来源	收集时间
1	山西太行山	2008-02	6	山西太原	2008-08
2	山西介休(1)	2008-02	7	辽宁沈阳(1)	2008-03
3	山西介休(2)	2008-02	8	辽宁沈阳(2)	2008-06
4	山西介休(3)	2008-07	9	陕西西安	2008-08
5	山西临汾	2008-08	10	北京	2008-11

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Diamonsil ODS C₁₈ 柱(4.6 mm ×
250 mm,5 μm);流动相乙腈(A)-0.5% 冰醋酸(B)
水溶液;梯度洗脱 0~15 min,85%~65% B,15~35
min,65%~40% B,35~40 min,40%~25% B,40~
60 min,25%~10% B,60~65 min,10%~0% B;流
速 0.8 mL·min⁻¹,检测波长 265 nm,柱温室温,对照
品溶液进样 10 μL,供试品溶液进样 20 μL。

2.2 溶液的配制

2.2.1 供试品溶液的制备 取药材粉末 2 g,精密
称定,加 80% 乙醇 100 mL,密塞,称定质量,加热回
流 1 h,放冷,再称定质量,用 80% 乙醇补足缺失的
质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 25 mL,蒸干,残
渣加甲醇溶解转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,
摇匀,滤过,即得。

2.2.2 混合对照品溶液的制备 取原儿茶酸对照
品适量,精密称定,置 25 mL 量瓶中,加甲醇使溶解
并定容至刻度,摇匀,制成质量浓度为 165 mg·L⁻¹
的溶液,作为原儿茶酸对照品储备液。

取穗花杉双黄酮对照品适量,精密称定,置
50 mL 量瓶中,加甲醇使溶解并定容至刻度,摇匀,

制成质量浓度为 210 mg·L⁻¹ 的溶液,作为穗花杉双
黄酮对照品储备液。

取扁柏双黄酮对照品适量,精密称定,置 25 mL
量瓶中,加甲醇超声 10 min 使溶解,并用甲醇定容
至刻度,摇匀,制成质量浓度为 197 mg·L⁻¹ 的溶液,
作为扁柏双黄酮对照品储备液。

分别精密吸取原儿茶酸、穗花杉双黄酮和扁柏
双黄酮对照品储备液 2,3,3 mL,置 10 mL 量瓶中,
加甲醇定容至刻度,摇匀,作为混合对照品溶液(原
儿茶酸、穗花杉双黄酮和扁柏双黄酮的质量浓度分
别为 33.00,63.00,59.10 mg·L⁻¹)。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取同批五灵脂药材(No. 1) 1
份,按 2.2.1 项下制备供试品溶液,并按 2.1 项下色
谱条件重复进样 5 次,以 12 号峰(穗花杉双黄酮)
为参照峰,计算各峰相对保留时间和相对峰面积的
RSD 分别为 0.2%~1.0% 和 0.6%~2.0%,表明仪
器精密度良好。

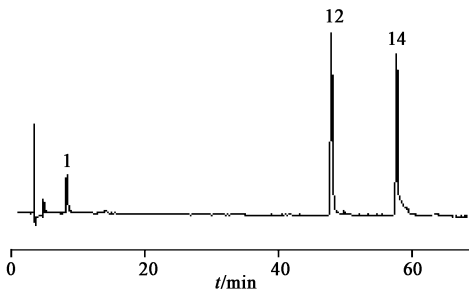
2.3.2 重复性试验 取同批五灵脂药材(No. 1) 5
份,按 2.2.1 项下制备供试品溶液,并按 2.1 项下色
谱条件分别测定,≥5% 总峰面积的各共有峰相对保
留时间和相对峰面积 RSD 分别为 0.6%~2.0%,
0.7%~2.2%。表明方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 取同批五灵脂药材(No. 1) 1
份,按 2.2.1 项下制备供试品溶液,并按 2.1 项下色
谱条件于 0,4,8,16,24 h 测定,≥5% 总峰面积的各
色谱峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 分别为
0.5%~1.2%,0.9%~2.2%。表明样品在 24 h 内
稳定。

2.4 五灵脂药材指纹图谱的建立

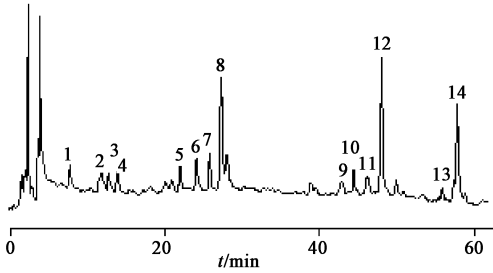
2.4.1 对照用指纹图谱的建立 按 2.1 项下色谱
条件,将混合对照品溶液注入液相色谱仪,记录混合
对照品色谱图,见图 1。并按上述方法记录 10 批不
同来源五灵脂药材色谱图,见图 2。通过与对照品
图谱比较,指认其中的 1 号峰为原儿茶酸,12 号峰
为穗花杉双黄酮,14 号峰为扁柏双黄酮。采用“中
药色谱指纹图谱相似度软件”生成五灵脂药材指纹
图谱共有模式,见图 3。以样品(No. 1) 色谱图 S₁ 为
参照图谱,中位数生成法,选取“时间窗宽度”为
0.1 min,得到对照用指纹图谱。

2.4.2 相似度分析 对照用指纹图谱和 10 批样品
图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度软件”,根据 10
批样品相对保留时间及指纹图谱的整体谱峰特点,
以相关系数法对样品的相似度进行评价,各样品相



1. 原儿茶酸;12. 穗花杉双黄酮;14. 扁柏双黄酮

图 1 混合对照品 HPLC 图谱



1. 原儿茶酸;12. 穗花杉双黄酮;14. 扁柏双黄酮

图 2 五灵脂药材 HPLC 图谱 (No. 1)

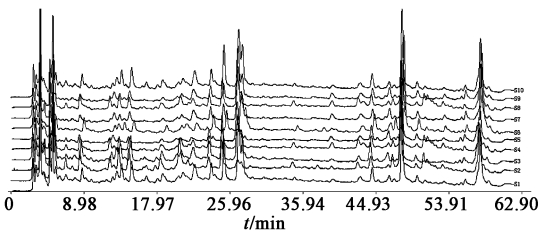


图 3 10 批五灵脂药材 HPLC 图谱共有模式

似度分别为 0.950, 0.933, 0.938, 0.936, 0.945, 0.926, 0.932, 0.935, 0.934, 0.919。相似度均 > 0.9, 表明相似度良好。

3 讨论

分别考察了溶剂 30%、50%、70%、80%、90% 乙醇, 结果以 80% 乙醇提取时各色谱峰峰面积大, 出峰多, 故选择 80% 乙醇为提取溶剂。

比较了甲醇-水和乙腈-水洗脱系统, 结果乙腈-水系统对色谱峰分离效果好。流动相中加入酸对分离效果和拖尾现象有很大改善, 并且加入 0.5% 冰醋酸或磷酸溶液时峰形和分离度较好。考虑到对色谱仪器的保护, 因此采用乙腈-0.5% 冰醋酸溶液洗脱。

采用 DAD 检测器变换不同检测波长, 以出峰数多为原则确定检测波长为 265 nm。

用 DAD 检测器对各峰的紫外吸收图谱进行分析, 发现有黄酮类化合物特征紫外吸收, 结合前期的化学成分研究工作, 进一步证实五灵脂中黄酮类成分的存在, 这与五灵脂药材活血化瘀止血的功效一致, 为其之后的药效物质基础研究提供科学依据。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S]. 2010:附录 22.

[2] Atsushi Numata, Chika Takahashi, Tamie Miyamoto, et al. New triterpenes from a Chinese medicine, Goreishi [J]. Chem Pharm Bull, 1990, 8(4): 942.

[3] Atsushi Numata, Peiming Yang, Hika Takahashi, et al. Cytotoxic triterpenes from a Chinese medicine, Goreishi [J]. Chem Pharm Bull, 1989, 7(3): 648.

[4] 仲崇林,李焕荣,邓明鲁,等. 五灵脂化学成分的研究[J]. 中草药,1990,21(1):11.

[5] 朱翔宇,杨连菊,李春. 五灵脂石油醚部分化学成分的气相色谱-质谱联用分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(4):18.

[6] 杨东明,苏世文,李锐,等. 五灵脂活性成分的研究[J]. 药学学报,1987,22(10):765.

[7] 程明,杨连菊,冯学锋,等. 养殖五灵脂和野生五灵脂等鞣质含量比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(7):90.

[8] 陈月开,陈少松,王美素,等. 五灵脂中黄酮类成分研究[J]. 山西大学学报:自然科学版,2005,28(1):98.

[9] 王世久,刘玉兰,宋艳丽,等. 五灵脂抗血小板聚集作用的药理研究[J]. 沈阳药学院学报,1994,11(4):246.

[10] 唐绪刚,黄文权,姜利鲲. 中药五灵脂对动脉粥样硬化大鼠细胞间黏附分子-1 的影响[J]. 中国老年学杂志,2008,28(23):2318.

[11] 卜淑敏,贾卯花,曲运波. 五灵脂对小鼠和大鼠脑缺血的保护作用[J]. 山西大学学报:自然科学版,2000,23(3):257.

[12] 王雄文,刘文姿,黎成科,等. 五灵脂 B₁ 对大鼠胃壁结合黏液量及胃黏膜 PGE₂ 的影响[J]. 广东药学院学报,2004,20(5):515.

[13] 焦玉,李丹艺,刘晓秋,等. 五灵脂中两个黄酮类成分的提取分离与薄层色谱鉴别[J]. 中药材,2009,32(7):1039.

[责任编辑 蔡仲德]