

DOI:CNKI:11-3495/R.20110314.0941.007

藕节、藕节炭 HPLC 特征图谱研究

单玲玲¹, 刘善新^{2*}, 靳光乾², 梁瑞雪²

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东省中医药研究院, 济南 250014)

[摘要] 目的:建立藕节、藕节炭 HPLC 特征图谱。方法:以 3-表白桦脂酸为参照物,采用 Lichrospher C₁₈ 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),乙腈-0.2% 磷酸为流动相梯度洗脱,柱温 30 ℃,流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 203 nm,分析时间 70 min。结果:藕节、藕节炭分别获得 5,4 个共有特征峰,同时标定了 3-表白桦脂酸的位置。结论:该方法操作简便,重复性好,特征性强,为藕节、藕节炭的质量控制提供了新参考。

[关键词] 藕节;藕节炭;高效液相色谱法;特征图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)09-0067-05

HPLC Specific Chromatograms of Nelumbinis Rhizomatis Nodus and Nelumbinis Rhizomatis Nodus Charcoal

SHAN Ling-ling¹, LIU Shan-xin^{2*}, JIN Guang-qian², LIANG Rui-xue²

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China;

2. Shandong Academy of Chinese Medicine, Jinan 250014, China)

[Abstract] **Objective:** To set up the HPLC specific chromatograms of Nelumbinis Rhizomatis Nodus and

[收稿日期] 20100903(002)

[基金项目] 国家十一五科技支撑项目(2006BAI09B006-02)

[第一作者] 单玲玲, 硕士, 研究方向: 中药质量控制, E-mail: shanling ling2009@163.com

[通讯作者] * 刘善新, 副研究员, Tel: 0531-82949812, E-mail: liushanxin66@163.com

[网络出版时间] 2011-03-14 09:41

为供试品溶液制备方法。

研究中发现,流动相采用 HPLC 等度洗脱时,当流动相洗脱能力较强时,一些峰不能得到良好分离;但当流动相洗脱能力减弱时,虽然改善了峰的分,但一些成分出峰时间较长,中药成分复杂,利用等度洗脱时很难将极性不同的组分全部洗脱下来,有些组分会残留在色谱柱内,时间长了可能会堵塞色谱柱,采用梯度洗脱可以克服以上缺点。

研究了 10 批芍冰鼻腔喷雾剂的指纹图谱,并制定了该制剂的对照指纹图谱(图 7)。根据以上 10 批指纹图谱的分析结果可以看出,指纹图谱相似度较高,都大于 0.9,说明不同批次的制剂稳定性较好,可作为该制剂的质量控制。

目前,指纹图谱已成为国内外公认的鉴别中药品种和评价中药质量的最有效手段^[3]。它是一种综合的、量化的色谱鉴定手段,借以鉴别真伪,评价

原料药材,半成品和成品质量的均一性和稳定性,其基本属性是整体性和模糊性^[4]。

[参考文献]

- [1] 国家食品药品监督管理局. 中药指纹图谱研究的技术要求(暂行)[S]. 国药管注[2000]384号(附件). 北京:2000.
- [2] 宋金春,胡传芹,刘红,等. 川芎高效液相指纹图谱的建立[J]. 中国药房,2005,16(9):716.
- [3] Han F M, Cai M, chen M. Development of fingerprinting research on traditional Chinese medicines[J] J Anal Sci, 2004,20:647.
- [4] 谢培山. 色谱指纹图谱分析是中草药质量控制的可行策略[J]. 中药新药与临床药理. 2001,12(3):141.

[责任编辑 蔡仲德]

Nelumbinis Rhizomatis Nodus charcoal. **Method:** The analysis was performed on Lichrospher C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) with a mobile phase consisting of acetonitrile-0.2% phosphoric acid by gradient elution at a column temperature of 30 °C; the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the detection wavelength was at 203 nm and the analytic time was 70 min. **Result:** Five specific peaks were identified in chromatograms of Nelumbinis Rhizomatis Nodus and four specific peaks were identified in chromatograms of Nelumbinis Rhizomatis Nodus charcoal by 3-epibetulinic acid as reference substance. **Conclusion:** The method is simple and reliable with a good reproducibility and can be used for the quality control of Nelumbinis Rhizomatis Nodus and Nelumbinis Rhizomatis Nodus Charcoal.

[**Key words**] Nelumbinis Rhizomatis Nodus; Nelumbinis Rhizomatis Nodus charcoal; HPLC; specific chromatograms

藕节为睡莲科植物莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 的干燥根茎节部,具有止血、消瘀的作用,用于治疗吐血、咯血、尿血、衄血、崩漏^[1]等症。《中国药典》2005 版一部及《全国中药炮制规范》中藕节炮制均为炒制成炭^[1-2]。临床有生用或炒炭用,认为生用凉血止血,兼能化瘀。炒炭增强收敛之性,故止血作用增强^[3]。文献记载藕节中含有鞣质、天冬酰胺、3-表白桦脂酸^[4-5],其止血的有效成分尚不明确。本文对全国不同地区市售藕节及藕节炭进行了 HPLC 特征图谱研究,为藕节、藕节炭的质量控制提供新参考。

1 材料

1.1 仪器与试剂 waters 高效液相色谱仪(美国),waters 2695 泵,waters 2996 二极管阵列检测器,

数据处理器为 waters empower 工作站。超纯水(Millipore 公司纯水器)。BP211D sartorius 电子天平。乙腈(山东禹王实业有限公司化工分公司,色谱纯,批号 2008081204);甲醇(天津广成化学试剂有限公司,分析纯,批号 2008 年 7 月 30 日);磷酸(天津化学试剂一厂,分析纯)。3-表白桦脂酸对照品由本课题组从藕节炭中分离制得,高效液相归一化法测定纯度为 98.57%。

1.2 样品来源 藕节及藕节炭样品为从全国不同地区收集的市售药材,经山东省中医药研究院钟方晓研究员鉴定为睡莲科植物莲 *N. nucifera* 的干燥根茎节部,见表 1。

表 1 藕节及藕节炭来源及编号

No. (藕节)	收集地	No. (藕节炭)	收集地
S1	济南建联中药有限公司	S1	山东省中医院
S2	北京同仁堂药店	S2	北京同仁堂药店
S3	潍坊市远东平民大药房	S3	潍坊市远东平民大药房
S4	安徽亳州药材市场	S4	上海市中医院
S5	上海市中医院	S5	济南建联中药有限公司
S6	珠海万宝中药饮片有限公司	S6	黑龙江中医药大学附属第一医院
S7	黑龙江中医药大学附属第一医院	S7	南昌市开心仁大药房
S8	南昌市自由市场	S8	云南省中医院
S9	太原康维药店	S9	武汉市神草中药饮片有限公司
S10	云南省中医院	S10	济南市平民漱玉大药房
S11	湖南省中医院	S11	湖南省中医院
S12	南京金陵大药房	S12	济南宏济堂药店
S13	杭州九洲大药房	S13	广州市宝芝林大药房
S14	安国药材市场	S14	中山市
		S15	杭州九洲大药房
		S16	南京金陵大药房

2 方法和结果

2.1 色谱条件 Lichrospher C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm, 江苏汉邦科技有限公司); 流动相 A 为乙腈, B 为 0.2% 磷酸, 梯度洗脱条件 0 ~ 25 min, 50% ~ 70% A; 25 ~ 40 min, 70% ~ 90% A; 40 ~ 70 min, 90% A, 流速 1 mL·min⁻¹; 检测波长 203 nm, 进样量 20 μL, 柱温 30 °C。理论塔板数按 3-表白桦脂酸计算不低于 10 000。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取 3-表白桦脂酸对照品加甲醇制成浓度为 0.286 g·L⁻¹ 的溶液即得。

2.3 供试品溶液的制备 取不同地区市售藕节及藕节炭样品 1.5 g, 精密称定, 精密加入甲醇 25 mL, 称定质量, 回流提取 0.5 h, 放冷, 再称定质量, 以甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液以 0.45 μm 的滤膜滤过, 作为供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 空白试验 分别精密吸取建联藕节供试品溶液 20 μL、3-表白桦脂酸对照液 20 μL、甲醇 20 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 结果发现峰 a, b, c 为甲醇溶剂峰。见图 1。

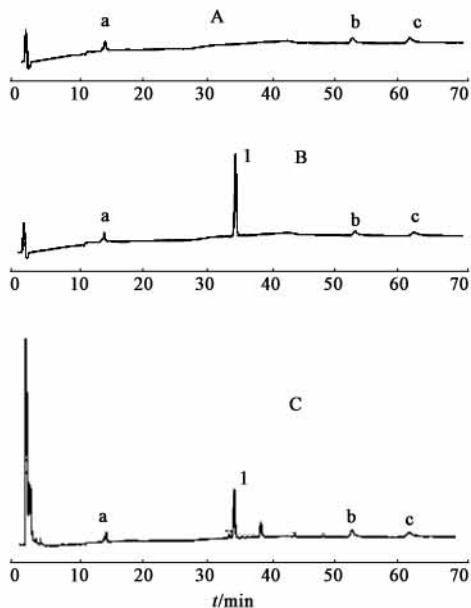


图 1 建联藕节色谱图

A. 空白; B. 对照品; C. 供试品; 1. 3-表白桦脂酸
a, b, c. 空白溶剂峰

2.4.2 精密度试验 精密吸取建联藕节供试品溶液 20 μL, 连续进样 5 次, 记录色谱图, 结果各主要色谱峰的相对保留时间 RSD 0 ~ 0.035 0%, 相对峰面积比值 RSD 0.545% ~ 2.82%。

2.4.3 稳定性试验 精密吸取建联藕节供试品溶液 20 μL, 分别在 0, 3, 6, 12, 24 h 进样测定, 记录色谱图, 结果各主要色谱峰的相对保留时间 RSD 0 ~ 0.055 3%, 相对峰面积比值 RSD 1.00% ~ 4.57%。

2.4.4 重复性试验 取同一批建联藕节 1.5 g, 共取 5 份, 精密称定, 分别按供试品溶液的制备方法项下进行制备并测定, 记录色谱图, 结果各主要色谱峰的相对保留时间 RSD 0.038 9% ~ 0.055 3%, 相对峰面积比值 RSD 2.61% ~ 3.62%。

2.4.5 延长测试时间测试滞后峰 延长测试时间至 2 h, 70 min 后未出现滞后峰。

2.5 藕节、藕节炭特征图谱的建立 按上述检测方法, 将 14 个藕节样品、16 个藕节炭样品, 分别进样检测, 经分析对比总结藕节有 5 个特征色谱峰, 藕节炭有 4 个特征色谱峰, 用对照品对照, 指认 2 号峰为 3-表白桦脂酸。以中国药典委员会中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A), 采用中位数法, 时间窗为 0.10, 自动匹配, 分别形成藕节、藕节炭 HPLC 特征图谱共有模式, 结果见图 2 ~ 5。以 2 号峰作为参比, 计算特征色谱峰的相对保留时间及相对峰面积, 结果见表 2 ~ 5。

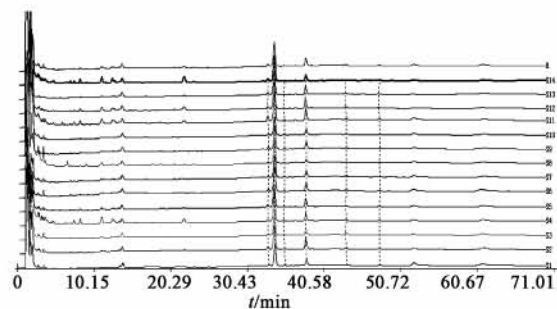


图 2 14 个不同地区市售藕节 HPLC 特征图谱

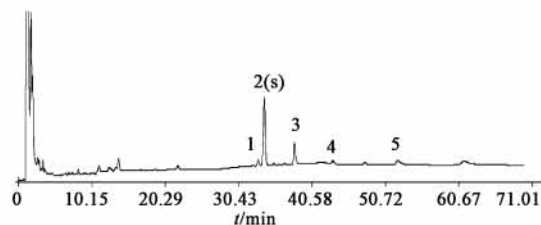


图 3 藕节 HPLC 特征图谱

2. 3-表白桦脂酸

由图 2 ~ 5 可见, 藕节有 5 个特征峰, 藕节炭有 4 个特征峰, 其中峰 2 与 3-表白桦脂酸保留时间相同。由表 2, 3 可见, 以 3-表白桦脂酸峰为 S 峰, 计算藕节特征峰的相对保留时间分别为 0.975 (峰 1)、1.122

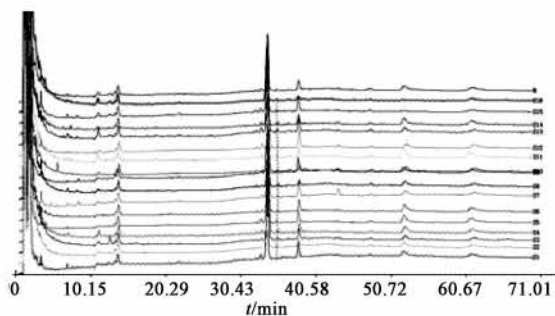


图 4 16 个不同地区市售藕节炭 HPLC 特征图谱

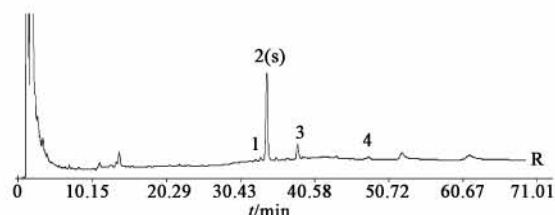


图 5 藕节炭 HPLC 特征图谱表 2 藕节特征图谱相对保留时间
2,3-表白桦脂酸

(峰 3)、1.279 (峰 4)、1.409 (峰 5), 14 地区市售样品相对保留时间的 RSD 0.033 3% ~ 0.071 7%, 其

相对峰面积差距较大, RSD 11.8% ~ 50.8%。由表 4, 5 可见, 以 3-表白桦脂酸峰为 S 峰, 计算藕节炭特征峰的相对保留时间分别为 0.976 (峰 1)、1.123 (峰 3)、1.409 (峰 4), 16 地区市售样品相对保留时间的 RSD 0.071% ~ 0.105%, 其相对峰面积差距较大, RSD 23.7% ± 43.0%。

3 讨论

试验中对提取溶剂醋酸乙酯、甲醇、无水乙醇、95% 乙醇、85% 乙醇、75% 乙醇、65% 乙醇进行了选择, 结果以甲醇效果较好, 因此选择甲醇提取。对提取的时间 0.5, 1, 1.5 h 进行比较, 其色谱图无明显差异, 故选择回流 0.5 h。对流动相进行了考察: 乙腈-0.2% 冰醋酸多种比例的等度洗脱效果不佳, 后改为梯度洗脱, 随着 0.2% 冰醋酸比例的增加色谱图基线向下飘移, 效果不理想。以乙腈-0.2% 磷酸多种比例的梯度洗脱选择, 以流动相 A 乙腈, 流动相 B 0.2% 磷酸水溶液, 梯度洗脱程序 0 ~ 25 min, 50% ~ 70% A; 25 ~ 40 min, 70% ~ 90% A; 40 ~ 70min,

表 2 藕节特征图谱相对保留时间

峰号	1	2(S)	3	4	5
S1	0.976	1	1.123	1.278	1.408
S2	0.974	1	1.122	1.279	1.409
S3	0.975	1	1.123	1.278	1.409
S4	0.974	1	1.122	1.279	1.409
S4	0.975	1	1.123	1.279	1.409
S6	0.975	1	1.122	1.278	1.409
S7	0.975	1	1.123	1.279	1.409
S8	0.975	1	1.123	1.279	1.409
S9	0.975	1	1.122	1.278	1.409
S10	0.976	1	1.123	1.279	1.409
S11	0.974	1	1.122	1.28	1.409
S12	0.974	1	1.122	1.278	1.408
S13	0.975	1	1.122	1.278	1.408
S14	0.974	1	1.122	1.278	1.408

90% ~ 90% A, 此洗脱程序为佳。检测波长采用 DAD 检测器对 200 ~ 400 nm 的各波长进行了检测, 以 203 nm 波长峰较多、信号强度较大。对柱温 30,

35, 40 °C 进行了考察, 以 30 °C 分离效果最好。

该方法操作简便, 重复性好, 特征性强, 为藕节、藕节炭的质量控制提供了新参考。

表3 藕节特征图谱相对峰面积

峰号	1	2(S)	3	4	5
S1	0.080 8	1	0.292	0.028 1	0.031 8
S2	0.111	1	0.376	0.049 3	0.035 4
S3	0.063 3	1	0.283	0.113	0.033 3
S4	0.072	1	0.238	0.039 3	0.033 8
S4	0.089 9	1	0.316	0.038 1	0.033 5
S6	0.085 1	1	0.305	0.039 9	0.034 8
S7	0.063 8	1	0.228	0.056	0.030 5
S8	0.056 7	1	0.136	0.024 1	0.045 1
S9	0.078 7	1	0.274	0.037 4	0.035 1
S10	0.057 9	1	0.26	0.068 2	0.036 2
S11	0.15	1	0.359	0.038 4	0.041 6
S12	0.081 5	1	0.302	0.050 1	0.038 4
S13	0.081 5	1	0.334	0.048 1	0.040 5
S14	0.104	1	0.208	0.015 3	0.042 1

表4 藕节炭特征图谱相对保留时间

峰号	1	2(S)	3	4
S1	0.975	1	1.123	1.409
S2	0.976	1	1.124	1.409
S3	0.975	1	1.123	1.409
S4	0.977	1	1.124	1.409
S4	0.975	1	1.123	1.411
S6	0.976	1	1.122	1.408
S7	0.976	1	1.122	1.409
S8	0.975	1	1.123	1.408
S9	0.976	1	1.123	1.41
S10	0.978	1	1.124	1.41
S11	0.976	1	1.123	1.408
S12	0.975	1	1.121	1.408
S13	0.974	1	1.122	1.408
S14	0.976	1	1.123	1.409
S15	0.974	1	1.122	1.407
S16	0.976	1	1.124	1.408

表5 藕节炭特征图谱相对峰面积

峰号	1	2(S)	3	4
S1	0.064 4	1	0.225	0.028 3
S2	0.016 9	1	0.105	0.022 7
S3	0.022 1	1	0.144	0.030 7
S4	0.058 2	1	0.192	0.044 8
S4	0.068 5	1	0.194	0.054 2
S6	0.041 4	1	0.223	0.029 0
S7	0.049 3	1	0.211	0.029 6
S8	0.043 1	1	0.084 3	0.031 3
S9	0.043 1	1	0.253	0.031 6
S10	0.018	1	0.082 4	0.023 4
S11	0.031 9	1	0.110	0.029 7
S12	0.078 4	1	0.272	0.031 1
S13	0.058 9	1	0.168	0.036 1
S14	0.045 5	1	0.169	0.037 0
S15	0.051 0	1	0.189	0.038 8
S16	0.017 8	1	0.061 8	0.030 9

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2005:264.
 [2] 中华人民共和国药政管理局.全国中药炮制规范[M].北京:人民卫生出版社,1988:108.
 [3] 徐楚江,叶定江.中药炮制学[M].上海:上海科学技术

出版社,1985:65.

- [4] 江苏新医学院.中药大辞典.第1册[M].上海:上海科技出版社,1977:2691.
 [5] 周军平,王爱兰,潘仁满.藕节中3-表白桦脂酸的分离与鉴定[J].同济医科大学学报,1995,24(1):52.

[责任编辑 蔡仲德]