

DOI:CNKI:11-3495/R.20110314.0942.008

地耳草 HPCE 指纹图谱的研究

韩乐¹, 宋建平², 刘训红^{1*}, 李俊松¹, 蔡宝昌¹, 傅兴圣¹, 陆爱萍¹

(1. 南京中医药大学, 南京 210046; 2. 盐城卫生职业技术学院, 江苏 盐城 224006)

[摘要] 目的:建立地耳草毛细管电泳(HPCE)指纹图谱分析方法,评价地耳草药材的质量。方法:用 HPCE 技术对地耳草进行分析,测定其指纹图谱,并作模糊聚类法分析和相似度评价。结果:初步建立了以 6 个共有峰为特征指纹信息的 HPCE 指纹图谱;发现少数样品地耳草 HPCE 指纹图谱有一定差异。结论:方法准确可靠,重现性好,可作为地耳草内在质量评价的依据。

[关键词] 地耳草;指纹图谱;毛细管电泳

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)10-0104-04

Studies on HPCE Fingerprint of Herba Hyperici Japonici

HAN Le¹, SONG Jian-ping², LIU Xun-hong^{1*}, LI Jun-song¹, CAI Bao-chang¹, FU Xing-sheng¹, LU Ai-ping¹

(1. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

2. Yancheng Health Vocational & Technical College, Yancheng 224006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the analytical method for the fingerprint of Herba Hyperici Japonici by HPCE and estimate the quality of Herba Hyperici Japonici. **Method:** Herba Hyperici Japonici were analyzed and the chromatographic fingerprints were determined by HPCE. The data were analyzed by Fuzzy Cluster and Fingerprint Similarity Evaluation Software to compare the similarity of samples. **Result:** HPCE fingerprint of 6 main peaks was established preliminarily. It was discovered that a small number of samples differed from others. **Conclusion:** The method is reliable, accurate and can be used for quality control of Herba Hyperici Japonici.

[Key words] Herba Hyperici Japonici; fingerprint; HPCE

地耳草为较常用中药,系藤黄科植物地耳草 *Hypericum japonicum* Thunb. 干燥全草,具清热利湿、解毒消肿之功效,主治湿热黄疸、泄泻、痢疾、疮痍痈肿、急性肾炎、血吸虫病等症,其注射液已广泛用于临床,治疗急、慢性肝炎,效果均显著^[1]。现代药理研究表明,地耳草具有增强免疫和抗肿瘤的作用^[2]。其主要活性成分为黄酮类化合物。目前对地耳草的

质量控制,多以槲皮素等作为考察指标^[3],这种对单一成分的检测不足以全面反映药材的质量,也缺乏专属性。中药色谱指纹图谱用于中药质量控制,比目前沿用的方法提供的信息要丰富。本文在对地耳草品质鉴定研究^[4]的基础上,采用高效毛细管电泳法对地耳草药材指纹图谱的构建进行了探讨,以期规范地耳草药材市场及确保药材内在质量的均一性和稳定性提供较全面的质量控制手段。

1 仪器与试剂

Agilent G1600 AX 型高效毛细管电泳仪(包括惠普化学工作站, DAD 检测器,自动进样器); Rotavapor R-3 旋转蒸发仪(型号:BUCHI); AG285 电子天平; PHS-3C 型 pH 计(上海康仪仪器有限公司); KQ-500E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

[收稿日期] 20100821001

[基金项目] 江苏省中药炮制重点实验室开放式课题(ZYPZ007)

[第一作者] 韩乐,在读硕士,从事中药品质评价研究

[通讯作者] *刘训红,教授, Tel: 025-85811511, E-mail: liuxunh1959@sohu.com

[网络出版时间] 2011-03-14 09:42

山奈酚对照品(中国药品生物制品检定所提供,批号 110861-200303);槲皮素对照品(中国药品生物制品检定所提供,批号 10081-9905);异槲皮苷对照品(上海博蕴生物科技有限公司,批号 21637-25-2);槲皮苷对照品(中国药品生物制品检定所提供,批号 111538-200302)。

硼砂(南京化学试剂一厂,分析纯),氢氧化钠(上海化学试剂有限公司,分析纯),甲醇(上海化学试剂有限公司,分析纯),配制缓冲溶液和供试品溶液所用的水均为纯净水。

地耳草各产地样品实地采集或由当地药材公司提供,不同商品由南京各医院门诊部中药房提供,编号为 S1-河北,S2-江苏,S3-安徽,S4-广西,S5-福建,S6-湖南,S7-江西,S8-南京市中医院,S9-南中医大国医堂,S10-南中医大百草堂,S11-南京市传统中医门诊部。均经作者鉴定为藤黄科植物地耳草 *H. japonicum* 的干燥全草。细叶金丝桃由江苏省中医院中药药房提供,来源于新疆,经鉴定为藤黄科植物细叶金丝桃 *H. gramineum* G. Forster 的干燥全草。留样凭证存放于南京中医药大学中药鉴定实验室。

2 方法与结果

2.1 电泳条件 未涂渍标准熔融石英毛细管(75 $\mu\text{m} \times 64.5 \text{ cm}$,有效长度 56 cm);检测波长 206 nm;压力进样 50 mbar,8 s;分离电压 25 kV;毛细管温度 25 $^{\circ}\text{C}$;运行缓冲液 40 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼砂(pH 8.6)。毛细管使用前以 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液,重蒸馏水和运行缓冲液依次通过压力冲洗 5,10,10 min。上述试剂使用前均经 0.22 μm 滤膜滤过,并超声脱气。

2.2 对照品溶液制备 精密称取槲皮素对照品 8.84 mg 和山奈酚对照品 5.86 mg,分别置于 50 mL 量瓶中,用 80% 甲醇溶解并定容。精密称取异槲皮苷对照品 7.29 mg、槲皮苷对照品 8.70 mg,分别置于 10 mL 量瓶中,用 80% 甲醇溶解并定容。精密吸取上述槲皮素、山奈酚储备液 6 mL,异槲皮苷储备液 5 mL,槲皮苷储备液 8 mL,置 50 mL 量瓶中,用 80% 甲醇定容,即得异槲皮苷为 0.072 9 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、槲皮苷为 0.139 2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、槲皮素为 0.021 2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、山奈酚为 0.013 6 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备 精密称取样品粉末(过 3 号筛)1.0 g,加入 80% 甲醇 50 mL,回流 90 min,然后补足质量,继续回流 90 min,补足质量,再回流 90 min,过滤,滤液用 80% 甲醇定容至 100 mL 量瓶中,

过 0.22 μm 微孔滤膜,作为供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一批次供试品(S9)溶液,连续进样 5 次,测定指纹图谱,用“中药指纹图谱相似度评价系统(2004A)”软件计算,结果相似度均大于 0.99,表明供试品进样精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取同一批次供试品(S9)溶液,分别在 1,2,4,8,16,24 h 进样 6 次,测定指纹图谱,用“中药指纹图谱相似度评价系统(2004A)”软件计算,结果相似度均大于 0.91,说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.3 重复性试验 取同一批次样品(S9)粉末 6 份,平行操作,制备供试品溶液,测定指纹图谱,用“中药指纹图谱相似度评价系统(2004A)”软件计算,结果相似度均大于 0.82,表明本法测定的重复性好。

以上结果表明指纹图谱中各色谱峰的相对迁移时间和峰面积基本一致,相似度较高,符合指纹图谱研究的技术要求。

2.5 指纹图谱的建立 将供试品溶液分别放入自动进样的样品管中,按选定的测试条件进行检测。同一上述实验条件下,测定所有供试品 HPCE 色谱图。根据不同批次供试品测定结果所给出的峰数、峰值(积分值)和峰位(相对迁移时间)等相关参数,进行分析、比较,制定优化的指纹图谱。(图 1,2)

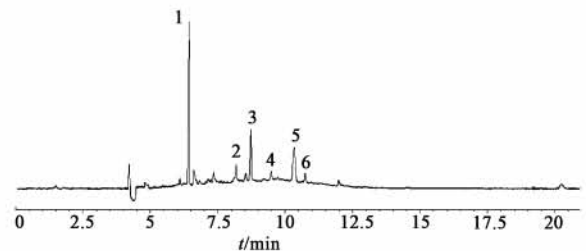


图 1 地耳草的 HPCE 指纹图谱

2. 异槲皮苷; 3. 槲皮苷; 4. 山奈酚; 6. 槲皮素

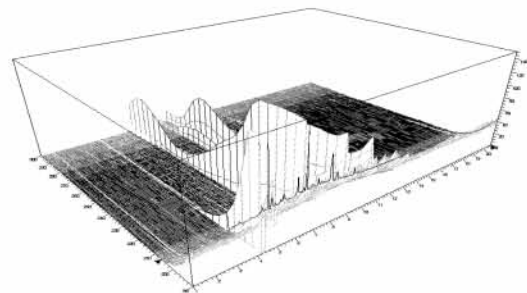


图 2 地耳草的三维 HPCE 指纹图谱

2.6 指纹图谱分析

2.6.1 共有指纹峰标定 经对供试品 HPCE 色谱图的分析、比较,地耳草标定 6 个共有峰作为指纹图谱的特征峰,2,3,4,6 号峰与对照品对照分别鉴定为异槲皮苷、槲皮苷、山奈酚、槲皮素。以 3 号峰槲皮苷为参照峰,分别求出各共有峰与之相比的 α 值(调整迁移时间之比)和各共有峰的相对峰面积(表 1)。

表 1 地耳草 HPCE 指纹图谱中共有峰的相对迁移时间 α 值和相对峰面积

峰号	1	2	3	4	5	6
α	0.736 8	0.938 0	1	1.086 4	1.184 5	1.231 1
S ₁	1.862 9	0.400 9	1	0.187 5	2.116 4	0.241 7
S ₂	2.944 7	0.659 9	1	0.073 7	2.965 8	0.228 6
S ₃	2.611 5	0.266 0	1	0.470 8	1.602 9	0.178 9
S ₄	2.824 5	0.461 1	1	0.352 9	1.919 7	0.165 0
S ₅	1.720 8	0.253 3	1	0.258 8	1.336 7	0.079 1
S ₆	2.776 7	0.468 9	1	0.236 3	1.388 1	0.110 7
S ₇	2.214 5	0.267 5	1	0.520 9	1.948 6	0.269 7
S ₈	2.246 1	0.554 4	1	0.806 5	1.872 2	0.483 9
S ₉	2.800 9	0.478 9	1	0.180 0	1.340 0	0.245 9
S ₁₀	2.104 0	0.389 8	1	0.317 5	2.190 8	0.226 6
S ₁₁	3.168 6	0.364 6	1	0.549 6	2.599 5	0.489 5

2.6.2 指纹图谱的聚类分析 选择地耳草 HPCE 指纹图谱中 6 个比较明显的共有峰,根据表 1 中的数据,用 SPSS 软件中的 hierarchical cluster analysis 对 11 个地耳草样品进行聚类分析,所用聚类方法为 average linkage (between groups),距离公式为 square euclidean distance,得不同样品地耳草的聚类分析图(图 3)。

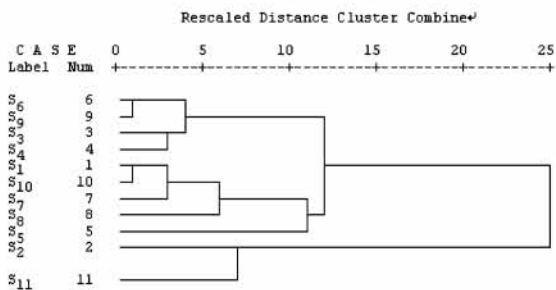


图 3 地耳草 HPCE 指纹图谱的聚类分析

结果显示,当距离标尺在 1 时,样品 S₆, S₉, 样品 S₁, S₁₀ 各归为一类;在 3 时,样品 S₃, S₄ 归为一类,样品 S₇, S₁₁ 与 S₁ 归为一类;在 4 时,样品 S₆, S₉ 与 S₃, S₄ 归为一类;在 6 时,样品 S₁, S₇, S₁₀ 与 S₈ 归为一类;在 7 时,样品 S₂, S₁₁ 归为一类;在 11 时,样品 S₁, S₇, S₈, S₁₀ 与 S₅ 归为一类;在 12 时,样品 S₃, S₄, S₆, S₉ 与 S₁, S₅, S₇, S₈, S₁₀ 归为一类;当距离标尺在 25 时,

所有样品才归为一类。

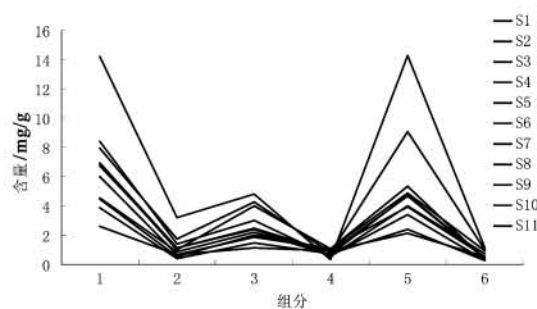


图 4 地耳草 HPCE 指纹图谱中共有峰组分含量

2.6.3 色谱峰的重叠率 以地耳草对照谱图(R)为基准,按以下公式计算[待测样品与对照谱图共有的峰数 $\times 2 /$ (待测样品与对照谱图峰数和)] $\times 100\%$, 1 ~ 11 号样品色谱峰的重叠率依次为 83.35%, 83.35%, 87.30%, 87.30%, 83.35%, 93.43%, 87.30%, 77.78%, 77.88%, 87.30%, 77.88%。

2.6.4 相似度评价 将测试数据导入国家药典委员会“中药指纹图谱相似度评价系统(2004A)”软件,经校正选峰,设定匹配模式,将色谱峰自动匹配,生成对照图谱(图 4),进行色谱峰差异性评价和整体相似性评价。各相似度值如下 S₁-0.822, S₂-0.818, S₃-0.785, S₄-0.960, S₅-0.977, S₆-0.846, S₇-0.908, S₈-0.817, S₉-0.717, S₁₀-0.823, S₁₁-0.766。结果表明,除安徽(S₃)、南中医大国医堂(S₉)、南京市传统中医门诊部(S₁₁)外,其余地耳草样品指纹谱相似度较好(>0.8)。细叶金丝桃的相似度为 0.726。

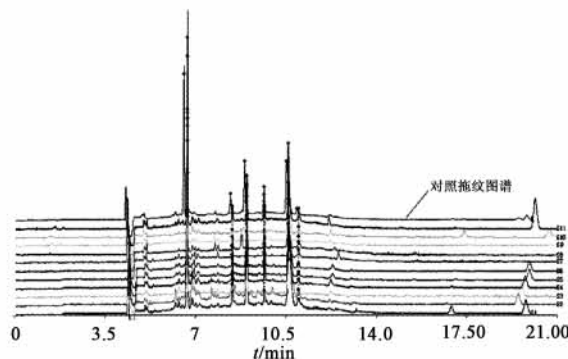


图 5 地耳草样品 HPCE 指纹图谱共有模式

3 讨论

3.1 电泳条件的优化 缓冲液体系的选择:考察了硼砂-水和硼砂-甲醇体系的缓冲溶液,在缓冲溶液中加入有机溶剂可以增加样品溶液中非水物质的溶解度,但有机溶剂的加入会降低运行电流,从而影响组分的迁移时间和分离度。本实验中有有机溶剂的加

入使得运行电流降低,使得组分峰高降低,噪音变大,故选择硼砂水溶液缓冲体系。

缓冲液浓度的选择:缓冲液浓度决定了溶液的粘度系数、溶质的扩散系数以及毛细管内壁的 ξ 电位,是影响被测物迁移时间和分离度的一个重要因素。考察了 $10 \sim 50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硼砂缓冲液,发现迁移时间和分离度随着缓冲液浓度的升高而增大。然而缓冲液浓度较高时会增加它的导电性,从而产生较高的焦耳热,使组分峰变宽,导致峰电流降低及分离度和重现性变差。当缓冲液浓度到 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对照品已经达到基线分离,但是样品中很多的峰不能达到基线分离,当浓度到 $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时样品峰形改善,综合考虑上述各种因素,选择缓冲液的浓度为 $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

缓冲液 pH 的选择:缓冲液的 pH 直接影响毛细管表面的 ξ 电势,从而影响电渗流的方向和速度,同时溶液的 pH 也决定样品中各组分分子的表面电荷数,从而影响组分的迁移时间和分离度。考察了 pH 8.3~9.5 的缓冲液,发现随着 pH 的增大,各组分的分离度增加而迁移时间延长,当 pH 为 8.6 时标准品各组分已经可以达到基线分离,样品各组分分离很好,再增大 pH,分离度没有明显的改变而迁移时间延长。故选择缓冲液的 pH 8.6。

运行电压的选择:在毛细管长度一定的前提下,分离电压决定电场的强度,而电场强度影响电渗流速度和带电物质的迁移速率,继而决定了分析物的迁移时间。在分离电压 $16 \sim 25 \text{ kV}$ 的条件下,考察了对各组分迁移时间的影响。结果表明分离电压越高,组分的迁移时间越短,当分离电压为 25 kV 时样品及对照品各待测组分仍然可以达到基线分离且节省时间,但当分离电压超过 25 kV 时基线噪音增大。故选择 25 kV 为分离电压。

运行温度的选择:运行温度也影响电场的强度,从而影响电渗流速度和带电物质的迁移速率,影响分析物的迁移时间。考察了运行温度 $20 \sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$ 的条件下对各组分迁移时间的影响。实验结果表明运行温度越高,组分的迁移时间越短,当运行温为 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 时样品的各组分分离效果好,且分析时间缩短。故选择 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 为运行温度。

检测波长的选择:采用二极管阵列检测器对检

测波长进行考察,记录并比较不同波长的色谱图(图 2),结果在 206 nm 检测波长下,色谱图中色谱峰较多,信息丰富,故选择 206 nm 为检测波长。

3.2 供试品制备的优化 实验中首先对提取方法(回流法和超声提取法)、提取溶剂甲醇浓度(60%, 70%, 80%, 95%)进行比较,选择回流提取法,甲醇浓度为 80%。再以提取溶剂用量、提取时间、提取次数 3 个因素,每个因素选择 3 个水平,作正交试验优选,制定了上述供试品的制备方法。

指纹谱分析结果表明,各地样品之间既有相关性,又有区别。相应共有指纹峰均已在色谱图上体现,但各峰面积有所不同,说明各地药材其成分含量有一定差异。通过与对照品对照分析,异槲皮苷、槲皮苷、山奈酚、槲皮素可列为地耳草指纹谱的共有特征峰,其配比关系为(0.266~0.938):1:(0.074~0.550):(0.079~0.490),尤其是异槲皮苷、槲皮苷为地耳草药材的主要活性成分,作为 n 强峰,其峰面积比值具一定评判意义。因而进一步探讨地耳草中异槲皮苷和槲皮苷比例关系,对评价药材质量具有一定价值。

相似度分析结果表明,广西(S_4)、福建(S_5)地耳草样品指纹谱相似度较好(>0.960),其他地耳草样品除安徽(S_3)、南中医大国医堂(S_9)、南京市传统中医门诊部(S_{11})外,相似度均在 0.8 以上。细叶金丝桃的相似度为 0.726,说明细叶金丝桃黄酮类成分与地耳草类似,具有一定的开发利用价值。

本实验初步建立了地耳草药材 HPCE 指纹图谱分析方法,为地耳草药材的品质评价提供了依据。

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社. 1999:2208.
- [2] 肖培根. 新编中药志. 第 3 卷[M]. 北京:化学工业出版社,2002:90.
- [3] 田刚,彭国平. 高效液相色谱法测定地耳草中槲皮素的含量[J]. 中国中药杂志,2004,29(5):476.
- [4] 宋建平,刘训红,朱育凤,等. 地耳草及其混伪品的鉴定研究[J]. 中药材,2008,31(5):663.

[责任编辑 蔡仲德]