

研究报告

肿节风 HPLC 指纹图谱研究

吴永江, 侯晓蓉, 程翼宇*

(浙江大学 药学院 中药科学与工程学系, 浙江 杭州 310027)

肿节风为金粟兰科植物草珊瑚 *Sarcandra glabra* Thunb. 的全草, 又名九节茶、接骨木等, 生于山坡林间阴湿处, 分布于华东、中南以及西南各省区, 习惯以全株入药, 具有消炎、清热、解毒和疏筋活血等作用^[1]。其制剂化学成分定性定量分析已有报道^[2]。《中国药典》2000年版一部对肿节风的质量控制是采用 HPLC 测定其中异嗪皮啶的含量^[3]。众所周知, 单一指标性成分的含量测定往往难以反映中药整体质量, 而指纹图谱具有整体性特点, 能较全面反映中药品质, 现已成为中药质量评价和控制研究的热点之一^[4-7]。本研究采用 HPLC 方法, 建立了肿节风药材的指纹图谱, 并比较了不同来源肿节风 HPLC 指纹图谱的差异, 为从整体上控制肿节风药材质量提供了实验依据。

1 仪器与试剂

Agilent1100 型高效液相色谱仪, 配置四元梯度泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱、DAD 检测器、ChemStation 控制系统。Waters2695 高效液相色谱仪, 配 Waters2996PAD 检测器。

药材共 14 批, 从产地采集, 见表 1。异嗪皮啶对照品(中国药品生物制品检定所, 纯度 >98%)。甲醇、乙腈(色谱纯, MERCK 公司), 其他试剂为分析纯, 水为纯净水。

2 实验方法

2.1 供试品溶液的制备

精密称取粉碎后的肿节风样品 2.0g, 用水回流提取 2 次, 每次 2h, 第 1 次加水 20mL, 第 2 次加水 16mL, 过滤后合并滤液, 浓缩后定容至 25mL, 用微

孔滤膜过滤后供 HPLC 分析。每份药材样品平行制备 3 份供试品溶液。

表 1 药材来源

样品号	产地	采收季节	种植方式
1	江西安远	秋季	野生
2	江西安远	春季	栽培
3	江西安远	春季	栽培
4	广东帽峰山	秋季	野生
5	广东龙潭水库	夏季	野生
6	广东龙潭水库	秋季	野生
7	广东韶关	秋季	野生
8	广东韶关	秋季	野生
9	广东肇庆	秋季	野生
10	广东韶关	秋季	野生
11	广东蒙山	秋季	野生
12	广东连州	秋季	野生
13	广东韶关	秋季	野生
14	广东韶关	秋季	野生

2.2 参照物溶液的配制

精密称取异嗪皮啶对照品适量, 配成浓度为 2.5mg L⁻¹ 的水溶液, 避光保存, 作为参照物溶液。

2.3 色谱条件的优化

2.3.1 流动相的确定 尝试了多种流动相体系, 如甲醇-水体系, 甲醇-水-磷酸体系, 甲醇-水-醋酸体系, 结果表明, 甲醇-醋酸-水体系分离效果较好。分析时采用梯度洗脱, A 相为甲醇 +0.1% 醋酸, B 相为 0.1% 醋酸水溶液, 经比较多种梯度条件, 最后确定梯度程序为: 0~5min, 保持 18%A; 5~10min, 线性梯度至 23%A; 10~62min, 线性梯度至 54.5%A, 洗脱时间为 62min。每次运行结束后以初始流动相平衡色谱柱 20min, 以保证出峰情况稳定。在此条件下, 各色谱峰分离度好, 保留时间适中。

2.3.2 不同仪器以及色谱柱的比较 比较了 Agilent1100 和 Waters26952 台仪器, AgilentHypersil ODS (4.0mm ×250mm, 5 μm), 汉邦 C₁₈ (4.0mm ×250mm, 5 μm), AgilentZorbaxSB-C₁₈ (4.0mm ×250mm, 5 μm), AgilentZorbaxSB-C₁₈ (4.0mm ×150mm, 5 μm) 4

[收稿日期] 2003-08-05

[基金项目] 国家重点基础研究发展规划(973 计划)项目 (G1999054405)

[通讯作者] *程翼宇, Tel: (0571) 87952509, E-mail: chengyy@zju.edu.cn

种色谱柱。在2台仪器上均分离良好,最后选用Agilent1100。短柱的分离情况不如长柱,长柱中又以AgilentHypersilODS (4.0mm ×250mm,5 μm)的分离效果最好,故选用此柱。

2.3.3 检测波长、柱温和流速的确定 采用二极管阵列检测器,得到190~800nm各波长下的色谱图,最后选定340nm作为检测波长。此波长下,色谱峰分离情况良好,各组分均有较大吸收,可以尽可能多地反映样品化学成分信息。

对柱温30,35,40和流速1,0.8,0.5mL·min⁻¹进行了考察,最后选定40和0.5mL·min⁻¹。此条件下柱压相对较低,分离情况良好。

在上述优化确定的色谱条件下,进样10 μL,记录62min的色谱图。典型的肿节风HPLC色谱指纹图谱和参照物的色谱图见图1和图2。

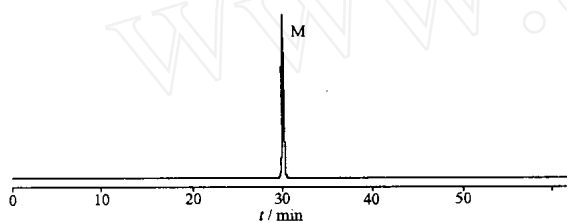


图1 异嗪皮啶参照物色谱图
M. 异嗪皮啶

2.4 方法学研究

在以下方法学研究中,均将供试品色谱图中与参照物对应的色谱峰峰面积设为1,计算其余各色谱峰的峰面积比值。

2.4.1 精密度试验 取同一批供试品溶液,连续进样5次,检测指纹图谱,计算各主要色谱峰面积比值的RSD,结果表明各色谱峰的峰面积比值较稳定,RSD均在2%以内,符合指纹图谱分析要求。

2.4.2 稳定性试验 取同一供试品溶液,每间隔24h进样1次。结果表明,各色谱峰的峰面积比值变异较小,RSD均在1.4%以内,表明供试品溶液在1周内稳定。

2.4.3 重现性试验 取同一批供试品5份,按供试品溶液的制备方法,分别制成供试品溶液进行分析。结果表明,各色谱峰的峰面积比值较稳定,RSD均在2.2%以内,指纹图谱分析重现性良好。

3 结果与讨论

3.1 指纹图谱及共有峰的标记

在上述条件下分析7批肿节风药材,从得到的色谱图看,不同来源的肿节风HPLC指纹图谱总体

上相似,其中有7个色谱峰为不同产地、不同采收季节肿节风药材所共有,可以作为肿节风药材的共有指纹峰(见图2)。

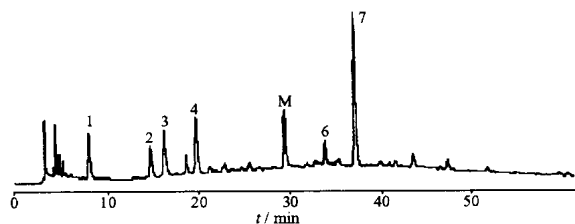


图2 肿节风药材指纹图谱

3.2 不同来源药材指纹图谱比较

使用本实验室自编的“中药指纹图谱计算机辅助相似度计算软件”评价不同样品指纹图谱相似性,比较时以M峰作为Marker峰,其他峰与之相比得到相对峰面积,然后用夹角余弦法评价相似度。同批药材平行测定3份,得到的指纹图谱相似性良好,绝大多数接近1,少数在0.98~1,显示了提取工艺和分析方法的稳定性和可靠性。不同产地,不同采收季节,人工栽培和野生品种之间,指纹图谱的相似度在0.75和1之间,表明各样本之间存在一定差异。

直观比较液相色谱指纹图谱,可以看出,不同产地的肿节风出峰情况(图3)比较相似,峰号为1,2,3的3个峰的峰比例接近,但是M峰和6,7号峰的峰比例差异比较大。广东产与江西产肿节风指纹图谱之间的相似度为0.83,显示了不同产地肿节风之间的内在差异。

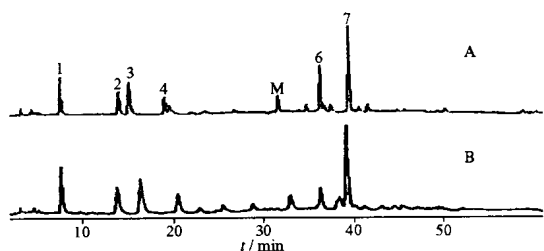


图3 不同产地肿节风HPLC指纹图谱比较
A. 广东; B. 江西

同样,从相同产地不同季节的肿节风色谱指纹图谱(图4)中可以看出,春季产肿节风的M峰所占峰比例明显较大,而秋季产肿节风的7号峰含量较高,峰号为2,3,4的3个峰的峰比例也有差异,而M峰、6号峰和7号峰的峰比例差异更大。春季与秋季药材指纹图谱之间的相似度为0.72。可见,即使是相同的产地,由于采收季节的不同,肿节风的化学成分含量也是不同的。

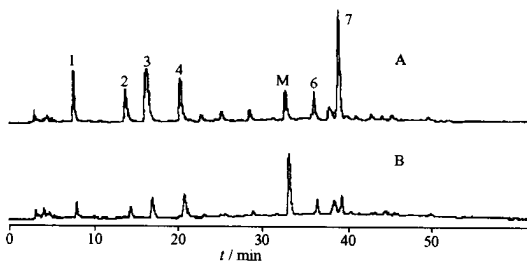


图4 相同产地不同季节肿节风 HPLC指纹图谱比较
A. 秋季; B. 春季

野生品和人工栽培品的指纹图谱(图5)相比, 2,3,4 号峰基本接近,但是 M 峰和 7 号峰之间仍有较大的差异,两者的相似度为 0.88。

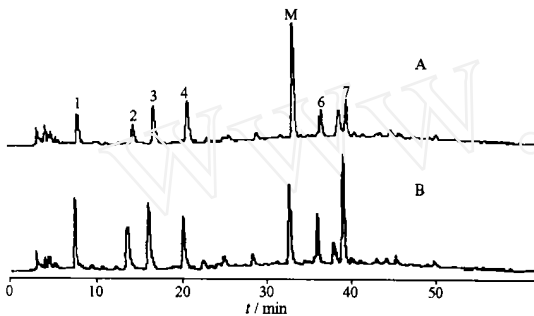


图5 人工栽培和野生肿节风 HPLC指纹图谱比较
A. 野生; B. 人工栽培

通过上面相似度计算的比较和色谱指纹图谱的直观比较,可以看出,不同产地、不同季节、野生与人工栽培之间存在一定的差异。直观比较和用相似度计算比较的结果基本一致,但是直观比较只有一个感性认识,没有定量意义,而用相似度计算的方法评价药材的差异,能够相对确切地了解差异的程度。为了解决指纹图谱是否真正反映质量这一重要问题,在进行指纹图谱评价的同时,最好同时进行药效学试验,揭示指纹图谱与药效之间的相关性,这就能为选择最佳的生产原料提供指导,并且为今后利用指纹图谱分析技术控制药材的质量提供依据。

3.3 肿节风药材不同部位的 HPLC指纹图谱比较

药材不同部位因其成分的差异和含量的不同而有不尽相同的药效,所以,研究肿节风不同部位的 HPLC指纹图谱有重要意义。作者将肿节风药材分为根、茎、叶、全草、地上部分 5 个部位进行了指纹图谱分析,结果见图 6,由图中可以看出,根的指纹图谱中 7 个共有峰的含量均比较低,参照峰 M 所占的

比例却很高;叶的指纹图谱中 7 号色谱峰明显比较高,而且其他几个峰也比其他部位相应组分色谱峰的含量高,而 M 峰则显得相对较小;全草和地上部分指纹图谱的差异较小,和茎基本相似。用相似度计算软件比较各个部位指纹图谱,以地上部分指纹图谱为对照,结果全草的相似度为 0.99,茎为 0.98,叶为 0.97,根为 0.76。

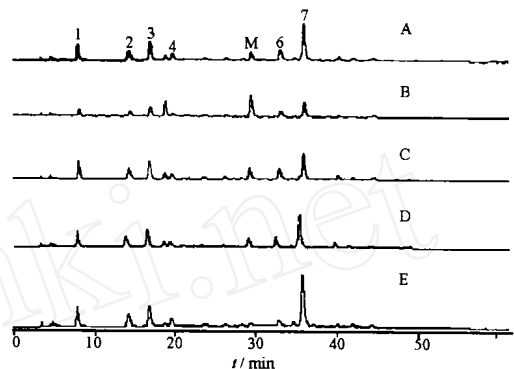


图6 不同部位的肿节风 HPLC指纹图谱比较
A. 地上部分; B. 根; C. 茎; D. 全草; E. 叶

4 结论

本研究采用 HPLC 色谱法,建立了肿节风的指纹图谱分析方法,该方法稳定、可靠,重现性好。采用所建立的分析方法研究不同来源的肿节风以及肿节风各部位的指纹图谱,结果显示不同来源的药材指纹图谱存在较大差异,肿节风各部位的指纹图谱也明显不同,该方法为从整体上控制肿节风药材质量提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] 徐志杰. 草珊瑚的研究概况. 江西中医学院学报, 1994, 1 (6): 36.
- [2] 周国平, 刘红宇, 王汉章, 等. 肿节风中异嗪皮定含量的高效液相色谱法研究. 药物分析杂志, 2000, 20 (1): 15.
- [3] 中国药典. 一部. 2000. 179.
- [4] 任德权. 中药指纹图谱质控技术的意义与作用. 中药材, 2001, 24 (4): 235.
- [5] 谢培山. 中药质量控制模式的发展趋势. 中药新药与临床药理, 2001, 12 (3): 188.
- [6] 陈闽军, 吴永江, 范晓辉, 等. 色谱指纹图谱分析技术用于鉴别中药川芎产地. 中国中药杂志, 2003, 28 (7): 606.
- [7] Katalinic V. High performance liquid chromatographic determination of flavan fingerprints in plant extracts. J Chromatogr A, 1997, 775: 359.

[责任编辑 李 禾]