

墨旱莲药材的高效液相指纹图谱及聚类分析

吴红霞, 高晓霞, 赵云丽, 刘 涛, 于治国

(沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 建立墨旱莲药材的指纹图谱研究方法并进行聚类分析。方法 色谱柱: Betasil C₁₈柱 (250 mm@4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 体积分数为 1% 的磷酸水溶液和体积分数为 1% 的磷酸乙腈溶液, 采用梯度洗脱; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 330 nm; 柱温: 30 $^{\circ}$ C。结果 精密度与重复性试验中各共有峰的相对峰面积 RSD 小于 5.0%, 根据聚类分析结果, 可将墨旱莲药材分为合格品和非合格品 2 类, 合格品产地为浙江、江西、广东、武汉、江苏(苏州)、江苏(南京)、湖南、辽宁、河北、山西、北京、上海、安徽、海南, 非合格品产地为河南、吉林、福建、山东、陕西(西安)。结论 该指纹图谱研究及聚类分析方法可用于控制墨旱莲药材质量。

关键词: 墨旱莲; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 聚类分析; 质量控制

中图分类号: R 917; R 931.5 文献标识码: A

中药墨旱莲又称旱莲草, 系菊科鳢肠属植物鳢肠(*Eclipta prostrata* L.) 的地上干燥部分, 是二至丸、天麻首乌片等的原料之一。我国各省区均有分布, 主产于江苏、江西、浙江、广东等地。具有滋补肝肾、凉血止血之功效。在我国, 墨旱莲主要用于治疗牙齿松动、须发早白、眩晕耳鸣、腰膝酸软、阴虚血热、吐血、咳血、尿血、血痢、崩漏下血、外伤出血^[1]。在印度等国家, 墨旱莲已被广泛用作治疗肝硬化、肝炎及胆囊疾病^[2]。墨旱莲中的化学成分包括三萜皂苷类、噻吩类、香草醚类及黄酮类等^[3]。由于受产地、气候和生态环境的影响, 不同产地墨旱莲药材的所含主要指标成分的差异较大, 为了更全面的控制药材的质量, 作者对 19 个产地的墨旱莲药材进行了指纹图谱研究及聚类分析。

1 仪器与材料

LC-10AD 高效液相色谱仪(配有 LC-10ATvp 输液泵、SPD-10Avp 可变波长紫外检测器、TA-130 柱温箱、Anastar 色谱数据处理系统, 日本岛津公司)。

蟛蜞菊内酯(自制, 纯度质量分数> 98%, 甲醇(色谱纯, 康科德有限公司), 水(重蒸水, 自制)。

墨旱莲药材, 购于江苏、湖北、安徽、吉林、辽宁等 19 个产地, 经沈阳药科大学孙启时教授鉴定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件选择

色谱柱: Betasil C₁₈柱 (250 mm @4.6 mm, 5 μ m); 流动相 A: 体积分数为 1% 磷酸水溶液; 流动相 B: 体积分数为 1% 的磷酸乙腈溶液(梯度洗脱时间及流动相比例: 0 min: A 与 B 体积比为 90B10; 21 min: A 与 B 体积比为 80B20; 45 min: A 与 B 体积比为 70B30; 60 min: A 与 B 体积比为 60B40); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 330 nm; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样量: 15 μ L。理论塔板数以蟛蜞菊内酯计算不低于 10 000。

2.2 墨旱莲指纹图谱的绘制

对照品溶液的制备: 以蟛蜞菊内酯作为参照物。取蟛蜞菊内酯对照品适量, 用甲醇稀释, 制成质量浓度 30 mg·L⁻¹ 的对照品溶液。

供试品溶液的制备: 精密称取过 900 μ m 筛的墨旱莲药材的粉末 215 g, 置 250 mL 锥形瓶中, 加水 100 mL 煎煮 2 次, 每次 2 h, 冷却, 过滤, 合并滤液, 减压浓缩至 20 mL, 加乙醇 60 mL, 静置 48 h, 减压浓缩, 回收乙醇, 加水定容至 50 mL, 微孔滤膜过滤, 即得。分别取对照品和供试品溶液 15 μ L, 进样, 蟛蜞菊内酯的色谱峰及广东、安徽、湖南三地的指纹图谱见图 1~ 4。

收稿日期: 2005-03-01

作者简介: 吴红霞(1976-), 女(汉族), 湖北武汉人, 硕士, 主要从事药物分析工作, Tel. 024-23986295, E-mail evahisun@163.com。

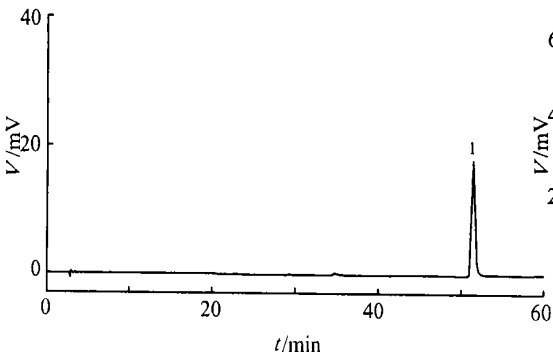


Fig.1 The chromatography of wedelolactone

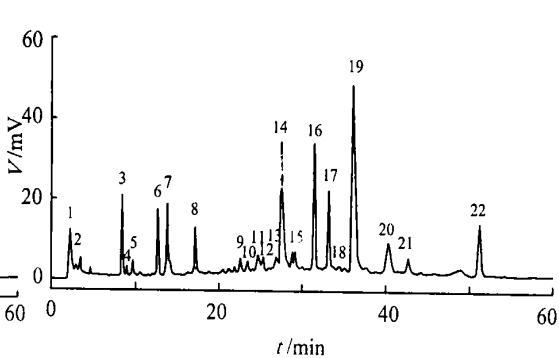


Fig.2 The fingerprint of *Eclipta prostrata* L. (guangdong)

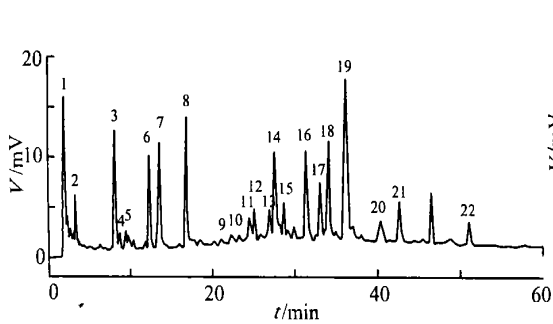


Fig.3 The fingerprint of *Eclipta prostrata* L. (Anhui)

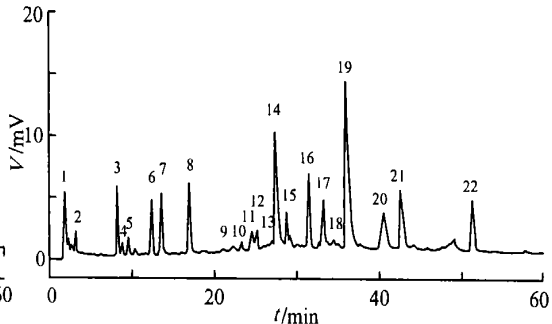


Fig.4 The fingerprint of *Eclipta prostrata* L. (Hunan)

21.3 共有峰的确定

根据 19 批供试品溶液 HPLC 图谱给出的参数, 比较供试品图谱, 其中 22 个峰是各批供试品所共有的, 因此, 确定这 22 个峰为 19 个产地墨旱莲药材的共有峰。共有峰的峰号(相对保留时间): 1 (01046~ 01048)、2 (01069~ 01072)、3 (01165~ 01173)、4 (01176~ 01183)、5 (01189~ 01198)、6 (01247~ 01254)、7 (01268~ 01277)、8 (01334~ 01341)、9 (01441~ 01444)、10 (01458~ 01461)、11 (01480~ 01486)、12 (01494~ 01499)、13 (01529~ 01535)、14 (01537~ 01545)、15 (01562~ 01574)、16 (01614~ 01618)、17 (01648~ 01652)、18 (01666~ 01682)、19 (01704~ 01711)、20 (01789~ 01794)、21 (01830~ 01837)、22 (1)。相对峰面积统计结果见表 1。

21.4 指纹图谱重复性试验

取供试品(辽宁)5 份, 精密称定, 按 2120 条方法测得, 各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值分别为 011%~ 111%、113%~ 417%。

21.5 指纹图谱精密度试验

取供试品溶液(江苏南京), 连续进样 5 次, 测得各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的

RSD 值分别为 013%~ 112%、016%~ 311%。

21.6 指纹图谱稳定性试验

取供试品溶液(广东), 分别在 0、2、4、6、8、12 h 进样, 测得各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均小于 510%。

21.7 各产地药材指纹图谱的聚类分析

对 19 个产地的墨旱莲作指纹图谱分析, 获得包括蟛蜞菊内酯(22 号峰)的 22 个色谱峰, 将各色谱峰相对于内参比峰的峰面积量化, 得到 19@22 阶原始数据矩阵, 由软件 SPSS 作聚类分析, 采用离差平方和法(Ward. s method), 利用欧氏距离(Euclidean)作为样品的测度。聚类谱系图见图 5。聚类分析将 19 个产地的墨旱莲药材分为两类, 其中, 浙江、江西、广东、武汉、江苏(苏州)、江苏(南京)、湖南、辽宁、河北、山西、北京、上海、安徽、海南的药材为合格品, 列为 ñ 类; 而河南、吉林、福建、山东、陕西(西安)为墨旱莲的非主产地, 出自这些产地的药材为非合格品, 列为 ò 类。

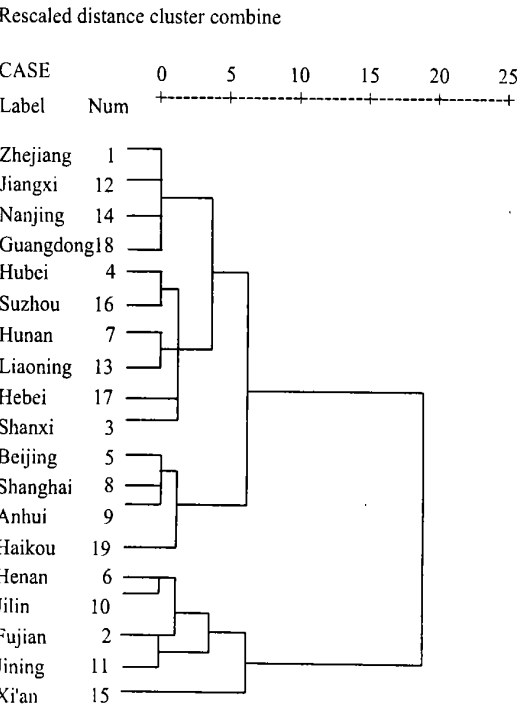
3 讨论

al 色谱条件。采用等度洗脱, 色谱峰分离度达不到要求, 且出峰时间太长。因此, 选择梯度洗

Table 1 The relative area of the communal fingerprint peak

Area	Communal fingerprint peak										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Zhejiang	11 297	01 241	11 100	01 233	01 189	01 963	01 916	01809	01129	01191	01403
Fujian	21 751	11 194	61 030	01 732	01 376	51 780	51 552	31555	01512	01367	11318
Shanxi	21 177	11 038	21 556	01 406	01 174	21 377	31 308	11683	01262	01307	01784
Hubei	01 535	01 362	11 646	01 299	01 445	11 932	11 770	21441	01212	01165	01595
Beijing	21 529	01 219	21 659	01 361	01 290	21 303	21 224	21087	01312	01170	01919
Henan	11 774	01 663	11 560	01 331	01 186	11 469	11 295	11764	01135	01191	01513
Hunan	01 640	01 081	01 764	01 126	01 176	01 686	01 797	01965	01136	01112	01240
Shanghai	11 104	01 526	11 494	01 257	01 185	11 372	11 317	21041	01133	01187	01508
Anhui	21 861	01 510	21 964	01 422	01 421	21 578	31 378	31880	01453	01261	11408
Jilin	341 780	101 607	181 796	31 414	11 383	171 034	181 706	111296	01982	11310	11152
Shandong	231 771	51 018	71 865	11 257	01 587	61 880	71 250	71639	0	0	11965
Jiangxi	51 324	21 232	61 904	01 590	01 952	61 377	61 328	41216	0	01489	11290
Liaoning	01 508	01 123	01 520	01 050	01 030	01 512	01 485	11327	01229	01054	01101
Nanjing	01 510	01 077	01 539	01 106	01 052	01 520	01 542	01565	01048	01136	01295
Xi'an	241 243	21 912	121 538	21 327	01 916	111 498	111 515	111139	0	0	21305
Suzhou	11 217	01 589	11 493	01 189	01 338	11 441	11 324	11411	01292	01186	01485
Hebei	21 802	01 495	31 454	01 463	01 353	31 275	31 768	21108	01377	01354	01603
Guangdong	01 471	01 104	01 883	01 087	01 181	01 795	01 923	01639	01220	01173	01230
Hainan	11 102	01 628	11 719	01 133	01 536	11 614	11 469	11507	01424	01232	01095

Area	Communal fingerprint peak										
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Zhejiang	01 367	01 213	21 011	01 518	11 070	01 611	01 090	51149	11609	01712	11000
Fujian	11 520	11 039	41 718	21 505	61 762	31 686	01 954	111995	01954	31480	11000
Shanxi	01 637	01 240	41 391	11 267	31 151	21 347	01 328	81148	01969	21944	11000
Hubei	01 775	01 568	31 712	01 905	31 745	21 311	01 188	31339	01423	11029	11000
Beijing	01 515	01 213	21 249	01 627	21 849	11 831	0	91512	11365	11516	11000
Henan	01 394	01 148	21 039	01 848	21 341	11 386	0	41702	11680	21453	11000
Hunan	01 201	01 056	21 136	01 401	11 043	01 611	01 103	41487	11226	11327	11000
Shanghai	01 466	01 283	21 159	01 784	21 017	11 353	0	71488	11294	21127	11000
Anhui	01 902	01 971	21 453	01 883	21 438	11 654	21 983	71582	11485	11690	11000
Jilin	41111	31 953	181 421	71 860	191 328	121 419	0	321963	41516	161240	11000
Shandong	11 569	41 065	0	11 791	41 676	21 755	0	241143	0	51619	11000
Jiangxi	11 126	01 523	51 187	21 002	81 537	51 525	01 570	81997	01833	21444	11000
Liaoning	01 037	01 028	11 067	01 02	11 437	01 998	01 215	11145	01524	01428	11000
Nanjing	01 048	01 036	01 711	01 560	01 760	01 467	01 794	41389	11412	11950	11000
Xi'an	11 969	11 631	51 535	21 861	91 051	51 363	01 489	171592	0	71070	11000
Suzhou	01 548	01 230	31 465	01 625	21 804	11 588	0	21502	01810	01446	11000
Hebei	01 832	01 728	31 846	11 161	41 326	21 599	01 264	71577	11040	11427	11000
Guangdong	01 099	01 244	21 794	01 226	11 634	11 151	01 089	31675	01925	01260	11000
Hainan	01 376	01 217	81 483	01 438	31 543	21 277	01 327	61917	11157	01389	11000



Figl 5 Hierarchical cluster analysis figure of Eclipta pros2trata L.

脱。由于墨旱莲水溶性成分中多为酚性物质,加入一定比例的磷酸调节 pH 值来改善峰形及调整各峰的保留时间。曾经考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-乙腈-水等洗脱系统,结果乙腈-水梯度洗脱能满足要求,最终选择该洗脱系统。经二极管阵列检测器检测,在上述色谱条件下绘出三维图谱。从三维图谱中可以看出,在330 nm处检测,色谱

响应较大,且基线平稳。因此选用 330 nm 作为检测波长。

b1 供试品溶液制备。分别考察了用甲醇、体积分数为 50%、75%、95% 的乙醇提取及水提醇沉等方法,结果水提醇沉法色谱峰峰形好,基线平稳,因此选用水提醇沉法。

cl 参比峰。蟛蜞菊内酯是墨旱莲药材特征性成分,且是主要的有效成分,在指纹图谱中与其他峰的分离度在 210 以上,因此被选作参比峰。

dl 指纹图谱。从聚类谱系图可以看出,各产地的墨旱莲药材可分为 2 类。由相似度软件计算得出,Ⅱ类药材的相似度都在 0180~ 1100 之间,而Ⅰ类药材的相似度在 0180 以下,由此得到了两种不同测度间的相互认证。用该法分析未知样品时,只需测得该样品的指纹图谱,计算未知样品与共有模式间的相似度,即可对样品进行分类鉴定和评价。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部 [Z]. 北京: 化学工业出版社, 2000. 306.

[2] Singh B, Saxena A K, Chandan B K, et al. Hepatoprotective effect of ethanolic extract of Eclipta alba on experimental Liver damage in rats and mice [J]. Phytotherapy Research, 1993, 7: 154- 156.

[3] 汤海峰, 赵越平, 蒋永培. 墨旱莲的研究概况 [J]. 西北药学杂志, 1999, 14, (1): 32- 33.

HPLC fingerprint of Eclipta prostrata L. and its hierarchical cluster analysis

WU Hongxia, GAO Xiaoxia, ZHAO Yunli, LIU Tao, YU Zhiguo
(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Objective To establish fingerprint of Eclipta prostrata L. extract from 19 different producing areas by RP2HPLC, and to get the result of grading by hierarchical cluster analysis, to establish the method for the quality control of Eclipta Prostrata L. Methods The chromatographic conditions used are as follows: C18 column(250 mm @416 mm, 5 Lm); mobile phase: 1% phosphate acid2water and 1% phosphate acid2acetonitrile, gradient elute; flow rate: 110 mL#min⁻¹; wavelength: 330 nm and column temperature: 30 e. Results The RSD of precision and reproducibility were lower than 510%. The Eclipta prostrata L. from 19 different areas could be divided into two grades through the results of hierarchical cluster analysis. Conclusions The fingerprint study and hierarchical cluster analysis method can be used for quality control of Eclipta prostrata L.

Key words: Eclipta prostrata L. ; HPLC; fingerprint; hierarchical cluster analysis; quality control