

研究简报

文章编号:1008-9926(2005)03-0217-03 中图分类号:R917 文献标识码:A

桂枝 HPLC 指纹图谱的研究

杨松,鲁曼华,毕开顺

(中国人民解放军沈阳军区联勤部药品仪器检验所 辽宁 沈阳 110026; 中国人民解放军沈阳军区总医院 辽宁 沈阳 110016; 沈阳药科大学 辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 建立桂枝的 HPLC 指纹图谱,为控制药材质量提供科学方法。方法 以 Luna C₁₈ (4.6mm ×250mm,5μm) 为色谱柱,乙腈-0.1%磷酸(28/72)为流动相,检测波长 285nm,流速 1ml/min,柱温 30℃。结果 本研究测定了 43 个不同产地、不同采收季节的桂枝样品,其中共有峰的面积为 10 个,且方法学考察符合标准规定,采用系统聚类分析,将 43 个样品分为优质品、一般品和劣品。结论 方法简便准确,可作为控制桂枝质量的有效依据。

关键词:桂枝;HPLC;指纹图谱Study on Fingerprints of *Ramulus Cinnamomi* by HPLC

YANG Song, LU Man-Hua, BI Kai-Shun

(Institute for Drug and Instrument Control of Shenyang Military Commend of PLA, Shenyang 110026, Liaoning China)

(The General Hospital of Shenyang Military Region, Shenyang 110016, Liaoning China)

(Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, Liaoning China)

ABSTRACT: **Aim** To study the HPLC fingerprints and establish a specific method to control the quality of *Ramulus cinnamomi*. **Method** The Luna C₁₈ column (4.6mm ×250mm, 5μm) was used, mobile phase was composed of acetonitrile-0.1% phosphoric acid (28/72). The flow rate was 1.0ml/min, and the detection wavelength was set at 285nm. **Results** 43 samples were divided into three grades the superior, the ordinary and the fake by hierarchical clustering analysis. **Conclusion** The method is simple and accurate and can be used as a quality control method for this herb.

KEY WORDS: *Ramulus cinnamomi*; HPLC; Fingerprints

桂枝主产于广东、广西,为樟科植物肉桂的干燥嫩枝,始载于《神农本草经》,属辛温解表药,具有发汗解肌、温通经脉、助阳化气、平冲降气之功效。用于风寒感冒、脘腹冷痛、血寒经闭、关节痹痛、痰饮、水肿、心悸等症。桂枝的主要有效成分为桂皮醛、桂皮酸、桂皮醇、香豆素及原儿茶酸等,药理研究表明:桂皮酸具有抗菌、消炎作用,桂皮醛有明显的镇静、镇痛作用^[1]。目前,药典以显微鉴别和桂皮醛的薄层鉴别来控制桂枝的质量^[2],但这样无法反映桂枝中其他成分的情况及活性成分的含量。本实验采用 HPLC 法建立了 43 个桂枝样品甲醇提取液的指纹图谱,并用系统聚类法将其分类,并考察了桂枝品质与产地及采收季节之间的关系,为全面控制桂枝的质量提供了依据。

1 仪器与试剂

LC-4A 高效液相色谱仪;SPD-2AS 紫外检测器;C-R3A 色谱数据处理机(均为日本岛津制作所);对照品桂皮醛(纯度 98.6%)、桂皮酸(纯度 99.2%) (均购自中国药品生物制品检定所);对照品桂皮醇(纯度 98.5%)、香豆素(纯度 99.3%)、苯甲酸钠(纯度 99.0%,美国 Chemservice 公司);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。桂枝药材由广东、广西、云南等地采集,经九江森林植物研究所谭策铭老师鉴定。桂枝药材来源及采收季节,见表 1。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Luna C₁₈ (250mm ×4.6mm, 5μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸(28/72);流速:1.

0ml/min; 检测波长: 285nm; 柱温: 室温; 进样量: 20μl。

表1 桂枝样品的来源

Tab 1 Origin, collecting season and place of *Ramulus cinnamomi* samples

样品编号	产地	采收季节	样品编号	产地	采收季节
1	广西荔蒲	秋	23	广西博白	秋
2	广西玉林	秋	24	广西大直	夏
3	广西金秀	秋	25	广西岑溪	秋
4	广西六巷	春	26	广西岑溪	春
5	广西那当	秋	27	广东罗定	秋
6	广西六巷	冬	28	广东博罗	夏
7	广西柳州	夏	29	广东新乐	冬
8	广西蒲北	夏	30	广东大南	春
9	广西紫荆	夏	31	广东郁南	夏
10	广西东乡	春	32	广东云浮	夏
11	广西扶隆	秋	33	广东高要	夏
12	广西防城	秋	34	广东高要	秋
13	广西防城	春	35	广东封开	秋
14	广西东兴	春	36	广东肇庆	冬
15	广西东乡	夏	37	广东高要	冬
16	广西桂平	秋	38	广东肇庆	春
17	广西六陈	秋	39	广东杨柳	春
18	广西六陈	春	40	云南河口	夏
19	广西屏南	秋	41	广东	不详
20	广西石和	秋	42	广东	不详
21	广西北流	秋	43	越南	不详
22	广西北流	春			

2.2 溶液的制备 内标液的制备:精密称定苯甲酸钠 300mg,置 100ml 量瓶中,加入甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成内标液。

供试品溶液的制备 精密称定桂枝样品 1.0g,置于具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50ml,称重,超声提取 40min,取出,待冷却后称重,用甲醇补足减失重量。精密加入内标溶液 1.0ml,混匀后用微孔滤膜滤过,取续滤液备用。

对照品溶液的制备 精密称取桂皮酸对照品 5mg、桂皮醛对照品 10mg、香豆素对照品 3mg、桂皮醇对照品 10mg,置于 25ml 棕色量瓶中,精密移取内标溶液 1.0ml,加入甲醇稀释至刻度,摇匀,微孔滤膜滤过,取续滤液备用。

2.3 系统适用性试验 取对照品溶液进样分析,在 2.1 项色谱条件下得到良好分离,理论板数以桂皮酸峰计不低于 15 000,各峰间分离度均大于 1.5,拖尾因子介于 0.95 ~ 1.05。在此色谱条件下对照品及样品的 HPLC 图谱见图 1。

2.4 精密度试验 精密称取 39 号样品,按供试品溶液制备方法操作,连续进样 5 次,记录图谱。结果表明,各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积比值

基本一致(RSD 为 0.72% ~ 1.8%),符合指纹图谱要求。

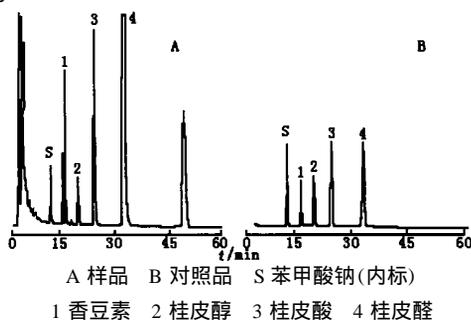


图1 桂枝 HPLC 图谱

Fig 1 HPLC Chromatograms of *Ramulus cinnamomi*

2.5 重现性试验 精密称取 39 号样品 5 份,按供试品溶液制备方法操作,进样,记录图谱。结果表明,各色谱峰的相对保留时间和其相对峰面积比值基本一致(RSD 为 1.1% ~ 2.5%),符合指纹图谱要求。

2.6 稳定性试验 精密称取桂枝对照药材,按供试品溶液制备方法操作,分别在 0, 1, 2, 4, 8h 测定,记录图谱。结果表明,各色谱峰的相对保留时间和其相对峰面积比值基本一致(RSD 为 1.6% ~ 2.8%),符合指纹图谱要求。

2.7 样品的指纹图谱测定 取不同产地、不同采收季节的桂枝样品测定,记录色谱峰。用各色谱峰对内标峰的相对保留时间定性,按下式计算各色谱峰相对于内标物的含量。

$$X_j = \frac{\frac{W_{is}}{A_{is}} \times A_{ij}}{W_i} \times 100\%$$

注: A_{ij} : 第 i 个样品、第 j 个组份的峰面积; A_{is} : 内标物峰面积; W_i : 样品的重量; W_{is} : 内标物的重量

2.8 桂枝的质量评价 (1) 系统聚类分析 聚类分析是体现“物以类聚”的一种多元统计方法,是属于多元统计分析范畴,可用于以连续型变量表征的样本分类^[3]。可依据所测样品的数据,对样品进行分类。本研究共收集了 43 个桂枝样品,用 HPLC 法对每个样品的甲醇提取物进行了分析,得到其指纹图谱,获得包括桂皮醛、桂皮酸、桂皮醇、香豆素、甲氧基桂皮醛在内的 10 个色谱峰。将这 10 个色谱峰的峰面积对内标峰的峰面积按 2.7 项下公式进行量化,得到一个 10 × 43 阶的数据矩阵,该矩阵代表了在 10 维特征空间中分布着 43 个样品,同类样品相聚集,异类样品相分离,选用欧氏距离作为样品间的相似性测度,采用可变类平均法进行聚类。聚类结果见图 2。

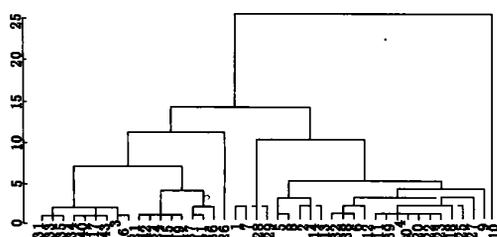


图2 桂枝样品聚类分析图

Fig 2 Figure of hierarchical cluster analysis

31、33、35、34、40、17、43、3、16、21、42、24、15、19、37、41、36、26号样品被聚为一类,为质量一般的桂枝;1、7、28、29、5、8、2、14、13、32、38、6、12、11、39、4、30、20、22、23、18、25、27、9号被聚为一类,为质量较好的一类;10号为质量较差的一类。对未知样品进行鉴别时,只需将反映其化学成分信息的数据输入,即可对其优劣进行判别。(2)相似度分析 指纹图谱反映的是样品整体的特征,进行指纹图谱比较,可以反映样品之间的亲疏程度,但是单纯的直观比较指纹图谱峰的多少和峰的大小,只是定性比较,而且又带有个人的主观性。相似度可以定量的描述指纹图谱,本试验用相似度分析对样品进行了比较,可以定量的、客观的对样品进行评价。选取聚类分析和生药学鉴定中质量均较好的1、4、7、11、12、14、18、22、23、28、29、39号样品为模板,计算出其空间向量中心,以欧氏距离为相似度测度,计算43个桂枝样品图谱的相似度。其计算结果见表2。

表2 样品的相似度结果

Tab 2 Results of similarity of *Ramulus cinnamomi*

样品号	相似度	样品号	相似度	样品号	相似度
1	0.935	16	0.773	31	0.740
2	0.946	17	0.863	32	0.921
3	0.748	18	0.918	33	0.766
4	0.948	19	0.882	34	0.749
5	0.907	20	0.945	35	0.828
6	0.913	21	0.813	36	0.863
7	0.985	22	0.931	37	0.759
8	0.934	23	0.981	38	0.911
9	0.924	24	0.889	39	0.989
10	0.625	25	0.930	40	0.759
11	0.954	26	0.737	41	0.865
12	1.00	27	0.933	42	0.890
13	0.965	28	0.991	43	0.776
14	0.938	29	0.966		
15	0.794	30	0.926		

注:相似度计算的结果与聚类分析的结果相一致。

3 结果与讨论

3.1 本研究用 HPLC 法分析了不同产地、不同采收季节的 43 个桂枝样品的甲醇提取物,使每个样品中

包括桂皮醛、桂皮酸、桂皮醇、香豆素、甲氧基桂皮醛在内的 10 个色谱峰得到了较好的分离。将各色谱峰面积对内标峰峰面积进行量化,获得了 10×43 阶的数据矩阵。用系统聚类分析进行了数据处理,并结合生药学鉴定将桂枝样品分为三类:优质品、一般品和劣品。根据聚类分析结果及生药学鉴定,选取 12 个质量较好的桂枝样品为模板,计算其空间向量中心,以欧氏距离为相似度测度,计算了 43 个桂枝样品的相似度,结果与聚类分析结果相一致,即相似度越高的样品其质量也越好。桂枝的主产地为广东和广西,云南也有少量出产。由质量分级的结果看,7、11、12、13、23 这些优质品主要集中于广西十万大山一带的县乡,由于我国的桂树均由越南引种,十万大山一带的海拔较高,气候和地理条件与越南相似,比较适合于桂树生长。聚类分析的结果与传统的经验评判相一致。

3.2 一般商品桂枝,规范的采收季节应为秋季,秋季砍树剥皮,枝条晾晒加工成桂枝。但目前,一年四季均可采摘。聚类分析的结果表明,春季产桂枝 4、13、14、18、20、22、23、25、28、30、32 号,秋季产桂枝 1、2、5、11、12、27、38 号品质均较好,春季产桂枝的结论与传统经验有些出入,尚需用能够反映临床疗效的药理实验来验证。

3.3 本研究在中医药理论和实践的指导下,将生药学、分析化学、统计学和计算机科学相结合,建立了桂枝质量评价的化学模式识别方法,对只用化学数据判断中药材质量的方法进行了有益的尝试,对其它中药材的质量评价具有一定的参考价值。

3.4 本研究进行了梯度洗脱法和等度洗脱法的比较试验,结果表明,采用梯度洗脱法得到的色谱峰与等度洗脱得到的色谱峰比较,数目并未见明显增加,而且采用等度洗脱各活性成分均能得出峰且分离度良好,因此本文采用等度洗脱。具有重现性好,节省分析时间的优点。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2001. 1771 ~ 1773
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:化学工业出版社, 2000. 224 ~ 225
- [3] 洪楠. SPSS for Windows 统计分析教程[M]. 北京:电子工业出版社, 2000. 184 ~ 192; 203 ~ 232

(收稿日期:2004-04-26;修回日期:2004-12-13)

(本文编辑 魏萍)