

中药陆英 HPLC 指纹图谱研究

邹盛勤^a 黄宏伟^b 刘名权^a 陈武^{a,b}

^a(宜春学院生物工程研究所 江西省天然药物活性成分研究重点实验室 江西省宜春市府路 576 号 336000)

^b(宜春学院化学与生物工程学院 江西省宜春市 336000)

摘 要 建立了中药陆英高效液相色谱指纹图谱, 为科学评价及有效控制其质量提供可靠方法。色谱柱为 Kromasil C₁₈ (250mm × 4.6mm, 5μm) 柱, 流动相为乙腈-0.2% 磷酸水溶液 (80:20), 光电二极管阵列检测器, 检测波长 215nm, 流速 0.8mL/min, 柱温 30℃。建立的陆英指纹图谱中共确定了 10 个共有峰, 各陆英样品指纹图谱与对照指纹图谱相似度均在 0.9 以上, 可用于陆英药材的定性鉴别。HPLC 指纹图谱具有良好的精密度、重现性和稳定性, 可以作为陆英质量评价的主要依据之一, 同时为深入研究中药陆英的质量标准提供了实验基础。

关键词 陆英, 高效液相色谱, 指纹图谱, 熊果酸。

中图分类号: O 657.7⁺2

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2009)01-0100-04

1 前言

陆英 (*Samolus chinensis* Lindl.) 为忍冬科接骨木属植物, 又称接骨木、八棱麻、七叶金等。产于全国各地, 资源丰富, 全草入药, 为民间常用草药, 具有活血散瘀、消炎止痛、利尿消肿、祛风活络之功效, 常用于治疗跌打损伤, 风湿疼痛, 肾炎水肿, 急性菌痢及肺炎等^[1,2]。陈武等^[3]从陆英的脂溶部分分离出 α-香树脂醇、β-香树脂醇、β-谷甾醇、齐墩果酸及熊果酸 5 种成分, 其煎剂、糖浆、冲剂治疗甲、乙型急性病毒性肝炎具有显著疗效。经药理和临床试验证实, 陆英所含的熊果酸、齐墩果酸、β-谷甾醇是其抗肝炎的有效成分, 其中熊果酸是主要有效成分^[4,5]。目前已有文献报道陆英药材的质量控制方法^[5-8], 但未见以熊果酸和齐墩果酸为指标性成分的 HPLC 指纹图谱的研究。为了制订中药陆英的质量标准, 以提高药材质量的可控性及其植物资源的开发利用程度, 本研究首次采用反相高效液相色谱法建立了中药陆英的指纹图谱分析方法, 以期对中药陆英的质量控制和合理开发利用提供科学依据。

2 实验部分

2.1 仪器

Waters 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司) (515 泵, 2996 光电二极管矩阵检测器 (PAD), 7725i 手动进样器, 柱温箱, Empower 中文色谱工作站); SK-2510HP 超声提取仪器 (上海汉克科学仪器有限公司); Sartorius CP225D 电子分析天平 (北京赛多利斯仪器有限公司); UPW S-1-10T

江西省教育厅科技项目 (赣教技字 [2006]267 号), 国家“863”计划资助项目 (2002AA2Z3217)

联系人, 手机: (0)13507058127; E-mail: zsqyxy@163.com

作者简介: 邹盛勤 (1970—), 男, 江西省奉新县人, 副教授, 主要从事天然药物成分提取与分析研究。

收稿日期: 2008-07-07; 接受日期: 2008-08-11

高纯水机(杭州永洁达膜分离设备厂); 指纹图谱计算机辅助相似性评价系统软件(国家药典委员会推荐使用软件)。

2.2 试药

陆英药材于 2007 年 5—7 月^[9]分别采自湖南、湖北、广东、江西(见表 1), 经鉴定为忍冬科植物陆英的全草; 熊果酸和齐墩果酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110709-200304, 110742-200314, 供含量测定用); 乙腈(色谱纯, 天津市大茂化学试剂厂); 实验用水为超纯水; 其余试剂均为分析纯。

表 1 陆英(*Sambucus chinensis* L. ndl.) 药材样品来源

样品编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13
产地	广东 清远	江西 南昌	湖北 荆门	湖北 武汉	江西 九江	江西 新余	江西 宜丰	江西 萍乡	江西 万载	湖南 岳阳	江西 奉新	江西 宜春	江西 宜春

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液的制备

精密称取干燥至恒重的熊果酸对照品 4.43 mg、齐墩果酸对照品 2.47 mg 置 10 mL 容量瓶中, 加入适量甲醇超声溶解, 定容, 得含熊果酸 0.443 mg/mL 和齐墩果酸 0.247 mg/mL 的对照品混合溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备

取陆英样品于 70 °C 干燥至恒重后粉碎, 过 20 目筛。准确称取样品粉末约 3 g, 置于具塞三角烧瓶中, 加入 95% 乙醇 40 mL, 称定重量, 超声提取 30 min, 放冷, 用 95% 乙醇补足减失重量, 摇匀后用微孔滤膜(0.45 μm) 滤过, 取续滤液为样品溶液。

2.4 色谱条件

色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 乙腈-0.2% 磷酸水溶液(80:20); 检测波长为 215 nm; 流速为 0.8 mL/min; 柱温为 30 °C。对照品的 HPLC 色谱图见图 1。

3 结果与讨论

3.1 精密度试验

准确吸取 S8 药材样品的供试品溶液 10 μL 进样分析, 重复进样 6 次, 比较各主要色谱峰的保留时间和峰面积。结果 6 次进样的色谱图中各共有峰保留时间和峰面积的 RSD 分别为 0.20%—1.12% 和 0.32%—1.09%, 表明仪器精密度良好。

3.2 稳定性试验

取同一供试品溶液, 在样品制备完成后第 0, 1, 2, 4, 8, 24 h 分别进样 10 μL, 结果 6 次进样的色谱图中各共有峰保留时间和峰面积的 RSD 分别为 1.15%—2.14% 和 1.27%—2.08%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

3.3 重现性试验

取同一批次陆英药材样品 5 份制备供试品溶液, 分别准确吸取 10 μL 进样分析, 结果 5 次进样

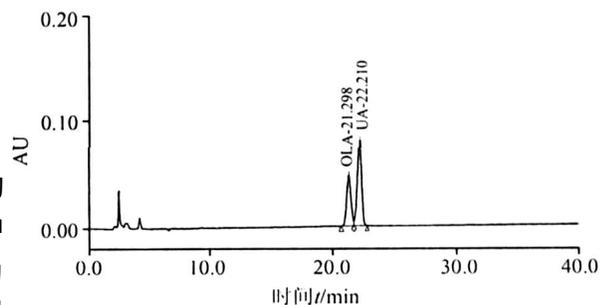


图 1 对照品 HPLC 图谱
OLA——齐墩果酸; UA——熊果酸。

的色谱图中各共有峰保留时间和峰面积的RSD 分别为 0.53%—2.06% 和 1.04%—2.12% ,表明该测定方法的重复性良好。

3.4 陆英指纹图谱的建立及相似度分析

3.4.1 检测结果

按 2.3.2 项下方法制备 13 批次陆英药材的供试品溶液,在 2.4 项下的色谱条件下,依次进样检测,获得 13 批次陆英高效液相色谱叠加图。

3.4.2 共有特征峰的标定

根据 13 批次供试品测定结果所给出的峰数、峰值(积分值)和峰位(相对保留时间)等相关参数进行分析、比较,陆英高效液相色谱可分离出 10 多个色谱峰,通过对照品(熊果酸)保留时间和紫外光谱检测结果的对照,并比较所有测定和记录的色谱图,选取 10 个共有峰作为指纹图谱的特征峰,其中 8 号峰为齐墩果酸色谱峰,9 号峰为熊果酸色谱峰(见图 2)。

3.4.3 共有图谱模式的建立

将各批次样品的测试数据导入计算机辅助相似性评价系统软件,经选峰,设定匹配模板,将谱峰自动匹配,建立其共有图谱标准模板,然后进行各样品的相似度评价。

3.4.4 图谱相似度分析

采用计算机辅助相似性评价系统软件分析

各批次样品指纹图谱的相似度,结果见表 2。经分析,13 批次不同产地的陆英样本中 10 个共有峰保留时间的RSD 均小于 1.95% ,HPLC 色谱图相似度值均大于 0.9。

表 2 陆英高效液相色谱指纹图谱相似度

样品编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	对照指纹图谱
相似度	0.986	0.984	0.979	0.917	0.905	0.913	0.969	0.948	0.973	0.987	0.988	0.962	0.943	1.000

4 结论

(1) 本实验比较了不同提取溶剂如乙醚、甲醇、乙醇的冷浸提取、索氏提取、回流提取、超声提取等不同提取方法的提取效果,以 95% 乙醇超声提取 30min 的总体效果为佳,采用该方法陆英中主要成分的提取率高,所得图谱峰较多且分离良好。

(2) 在流动相体系的选择中,本实验曾试用甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.2% 磷酸水溶液、乙腈-0.2% 磷酸水溶液以不同体积分数、不同比例分别进行等度和梯度洗脱试验,根据所得图谱表明,采用乙腈-0.2% 磷酸水溶液(80:20)流动相体系等度洗脱时各个色谱峰的峰形和分离度较好,保留时间适中,且基线平稳,不易漂移,有利于指纹图谱的分析;实验中记录了 120min 色谱图,发现 40min 后无色谱峰出现,故确定采集时间为 40min。

(3) 综合陆英药材 HPLC 指纹图谱的相对保留时间、相对峰面积以及相似度可以看出,不同来

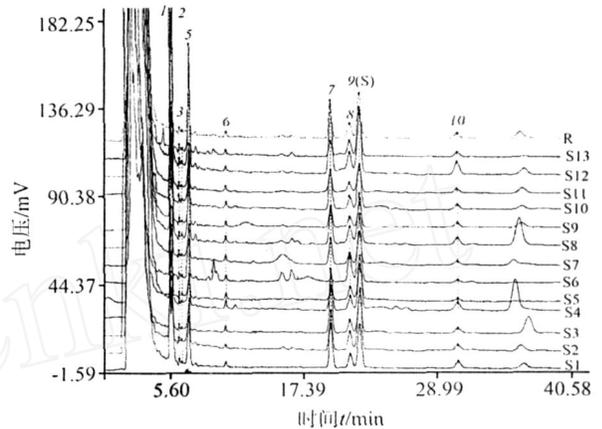


图 2 陆英样品 HPLC 指纹图谱

R——对照指纹图谱(平均值); S1—S13——陆英样品;
8——齐墩果酸; 9——熊果酸。

源陆英药材样品的指纹图谱整体面貌基本一致,反映了不同批次陆英药材的同源性及其群体化学组分的相似性,揭示出陆英指纹图谱具有自身化学条码特征,是其内在化学成分种类的反映。但同时也反映出其共有成分的含量存在较大差异,说明不同来源的陆英药材内在质量与产地因素密切相关。通过对 13 批不同来源陆英药材样品的高效液相色谱检测,初步构建了陆英 HPLC 指纹图谱分析方法,陆英中有效活性成分能在色谱图中得到宏观、综合地体现,能充分反映陆英各化学成分特征,为制订中药陆英质量评价标准提供了科学依据。

参考文献

- [1] 江苏新医学院 中药大辞典(下册)[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977. 2456
- [2] 徐国钧, 徐珞珊, 金蓉鸾等 中国药材学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1996. 1601.
- [3] 陈武, 李开泉, 熊筱娟等 陆英抗肝炎活性成分的研究[J]. 南昌大学学报(理科版), 2001, 25(2): 165—167.
- [4] 熊筱娟, 陈武, 李开泉等 乌索酸防治大鼠实验性肝损伤作用的研究[J]. 宜春医学学报, 2001, 13(2): 126—127.
- [5] 陈武, 熊筱娟, 李开泉等 乌索酸治疗急性病毒性肝炎的临床研究[J]. 宜春医学学报, 2001, 13(1): 1—3.
- [6] 田晓玲, 毕开顺 陆英的 GC 指纹图谱研究[J]. 中药研究与信息, 2005, 7(6): 14—16.
- [7] 田晓玲 陆英与陆英制剂质量控制方法研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2005.
- [8] 董立莎, 舒建麟, 杨桂华 陆英的质量标准研究[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(9): 588—591.
- [9] 邹盛勤, 陈武 陆英中乌索酸和齐墩果酸动态含量的研究[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(4): 642—643, 666.

Study on Fingerprint Chromatograms of *Samucus Chinensis* Lindl by HPLC

ZOU Sheng-Qin^a HUANG Hong-Wei^b LU Ming-Quan^a CHEN Wu^{a,b}

a(Biotechnology Research Institute of Yichun University, Key Laboratory of Jiangxi Province for Research on Active Ingredients in Natural Medicines, Yichun, Jiangxi 336000, P. R. China)

b(College of Chemistry and Biotechnology of Yichun University, Yichun, Jiangxi 336000, P. R. China)

Abstract The fingerprint chromatograms of *Samucus chinensis* Lindl by HPLC was established, which can be applied for quality assessment and control of medicinal materials of *Samucus chinensis* lindl. The HPLC analysis was performed on Kromasil C18 column (250mm × 4.6mm, 5 μ m) using ethanenitrile-0.2% aqueous solution of phosphoric acid (80:20) as mobile phase at flow rate of 0.8mL/min, and UV photodiode array detector at 215nm and the column temperature of 30 $^{\circ}$ C. The fingerprint chromatograms of *Samucus chinensis* lindl, 10 common peaks were found in the fingerprint chromatograms of *Samucus chinensis* lindl and good similarities with correlation coefficients over 0.9 were found in the fingerprint chromatograms between the herbs from different sources and standard fingerprint, which can be utilized for the identification of *Samucus chinensis* lindl. The established HPLC fingerprint chromatograms have desirable accuracy, repeatability and stability, and can be used for one of the quality control of *Samucus chinensis* lindl, meanwhile, provide an experimental basis for further quality control of *Samucus chinensis* lindl.

Key words *Samucus Chinensis* Lindl, HPLC, Fingerprint Chromatograms, Ursolic Acid