

不同产地丁公藤药材的HPLC特征图谱对比研究^Δ

文婧*,孙洪章,卢静华*(辽宁医学院研究生学院,辽宁锦州 121000)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)24-3417-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.24.36

摘要 目的:建立并比较不同产地丁公藤药材的高效液相色谱特征图谱。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Hypersil ODS C₁₈,流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液,流速为1.0 ml/min,检测波长为347 nm,柱温为30 ℃,进样量为20 μl。收集不同批次的12批样品进行测定,建立12批药材的特征图谱,并利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004版)》对12批样品的相似度进行评价。结果:从丁公藤药材的特征图谱中分析得出10个共有峰,其中3号峰为东莨菪苷,4号峰为绿原酸,6号峰为东莨菪内酯。经分析,其中10批药材的相似度在0.90以上,2批药材的相似度在0.90以下。结论:该方法简便、准确、重复性好,可为有效地控制丁公藤药材的内在质量标准提供科学依据。

关键词 丁公藤;特征图谱;高效液相色谱法

Comparative Study on HPLC Characteristic Spectrum of *Erycibe obtusifolia* from Different Habitats by HPLC

WEN Jing, SUN Hong-zhang, LU Jing-hua (Graduate School, Liaoning Medical University, Liaoning Jinzhou 121000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish and compare the HPLC characteristic Spectrum *Erycibe obtusifolia* from different habitats. METHODS: HPLC was performed on the column of Hypersil ODS C₁₈ with the mobile phase of acetonitrile -0.1% phosphoric acid at flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 347 nm, the column temperature was 30 ℃ and the sample size was 20 μl. 12 different batches of samples were determined and the characteristic spectrums of those were established. TCM fingerprint evaluation software (2004 edition) was used to evaluate the similarity of 12 batches of samples. RESULTS: 10 characteristic peaks were identified in the characteristic spectrum of *E. obtusifolia*. Peak 3 was scopolamine glycosides, peak 4 was chlorogenic acid and peak 6 was scopoletin. The similarities of 10 batches of samples were proved to be higher than 0.90 and 2 batches were proved to be less than 0.90. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, and can provide scientific evidence for effectively controlling the internal quality standards.

KEYWORDS *Erycibe obtusifolia*; Characteristic spectrum; HPLC

中药丁公藤^[1]为旋花科植物丁公藤 *Erycibe obtusifolia* Benth.或光叶丁公藤^[2]*Erycibe schmidtii* Craib的干燥藤茎^[3],为广东、广西民间用于抗风湿的传统药,是广西壮族民间传统用药,有祛风除湿、消肿止痛^[4]的作用,可用于风湿性关节炎、类风湿性关节炎、坐骨神经痛、半身不遂和跌打肿痛。目前所检测到关于丁公藤药材的文献大多是对其进行含量测定,暂时没有利用指纹图谱^[5]技术进行质量控制的研究。为控制和保证产品质量的稳定性,依据国家食品药品监督管理局颁布的《中药注射剂色谱指纹图谱实验研究技术指南(试行)》,本课题组对12批不同地区的丁公藤药材进行了特征图谱分析和相似度的计算,该方法能够从整体上控制丁公藤药材的质量,达到鉴别真伪^[6-7]、评定药材优劣的目的,可为药材的质量控制提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

L-2000型高效液相色谱(HPLC)仪,包括G1311A型四元梯度泵、WLJYQ型进样器、G1315A型二极管阵列检测器(日

本日立公司);KQ-100A型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司);GM-0.33A型无油真空泵(天津市津腾实验设备有限公司);1810-B型石英自动双重纯水蒸馏器(江苏宏华仪器厂);BSA224S型电子天平(德国赛多利斯集团)。

1.2 试剂

绿原酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110753-200413,纯度≥99%);东莨菪苷对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号:20120910,纯度≥99%);东莨菪内酯对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110768-200504,纯度≥99%);甲醇、乙腈均为色谱纯,磷酸为分析纯,水为超纯水。

1.3 药材

所有药材样品均经过辽宁医学院药学院生药科承伟教授鉴定,为旋花科植物丁公藤 *E. obtusifolia* Benth或光叶丁公藤 *E. schmidtii* Craib的干燥藤茎。样品来源详见表1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Hypersil ODS C₁₈(200 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B),采用梯度洗脱,梯度洗脱程序详见表2;流速:1.0 ml/min;检测波长:347 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μl。在上述色谱条件下,理论板数以绿原酸峰计,不低于3 000,分离度大于1.5。

2.2 溶液的制备

Δ基金项目:辽宁省教育厅科研项目(No.L2010332)

* 硕士研究生。研究方向:药物分析。E-mail:wenjing549@163.com

通信作者:副教授,硕士生导师。研究方向:药物分析。电话:0416-4673939。E-mail:jinghua1888@163.com

表1 样品来源

Tab 1 Samples' origins

编号	药材来源	批号
S1	广西玉林	110501
S2	广东茂名	120801
S3	云南玉溪	120421
S4	海南定安	121118
S5	河南洛阳	110613
S6	河北保定	130217
S7	四川成都	120801
S8	安徽亳州	130416
S9	贵州贵阳	111204
S10	陕西西安	120421
S11	浙江磐安	120718
S12	湖南株洲	130416

表2 梯度洗脱程序

Tab 2 Gradient elution programs

时间, min	流动相A, %	流动相B, %
0	5	95
10	10	90
20	15	85
40	16	84
60	17	83
80	19	81
90	21	79
100	35	65

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取东莨菪苷^[8]、东莨菪内酯^[9-10]、绿原酸^[11]对照品 3.60、3.99、4.12 mg, 分别配制成每 1 ml 含 0.360、0.399、0.412 mg 的对照品溶液。再分别精密量取上述 3 种溶液各 2.5 ml, 置于 25 ml 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 配成东莨菪苷、东莨菪内酯和绿原酸质量浓度分别为 0.036 0、0.039 9、0.041 2 mg/ml 的混合对照品贮备液。

2.2.2 供试品溶液 称取丁公藤药材细粉(过四号筛)约 2.5 g, 置于具塞锥形瓶中, 放置过夜, 称定质量, 超声(功率: 100 W, 频率: 40 kHz)提取 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 以半径为 3 cm、3 500 r/min 离心 10 min, 定容于 25 ml 量瓶中, 经 0.45 μm 的微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.3 参照峰的选择

精密量取“2.2”项下供试品溶液(批号: 110501)和混合对照品溶液各 20 μl, 注入 HPLC 仪, 按“2.1”项下色谱条件测定, 记录色谱图, 详见图 1。丁公藤药材经 HPLC 分析出现多个色谱峰, 以绿原酸色谱峰(S)作为参照峰。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 20 μl, 按“2.1”项下色谱条件连续测定 6 次, 记录各共有色谱峰的保留时间和峰面积。结果, 东莨菪苷、东莨菪内酯和绿原酸的峰面积的 RSD 分别为 1.33%、0.96%、1.85%, 表明仪器精密度良好, 符合指纹图谱的技术要求。

2.4.2 稳定性试验 取同一批次丁公藤药材(批号: 110501)适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件, 分别于配制 0、2、4、8、16、24 h 时进行测定。结果, 东莨菪苷、东莨菪内酯和绿原酸的峰面积的 RSD 分别为 2.12%、1.35%、1.41%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好, 符合指

纹图谱的技术要求。

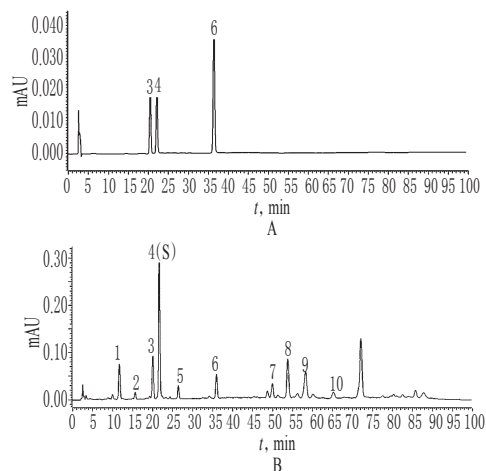


图1 高效液相色谱图

A. 混合对照品; B. 供试品(批号: 110501); 3. 东莨菪苷; 4. 绿原酸; 6. 东莨菪内酯

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixed reference substance; B. test sample (lot No. 110501); 3. scopolamine glycosides; 4. chlorogenic acid; 6. scopoletin

2.4.3 重复性试验 取同一批次丁公藤药材(批号: 110501)适量, 按“2.2.2”方法制备供试品溶液 6 份, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果, 东莨菪苷、东莨菪内酯和绿原酸峰面积的 RSD 分别为 0.21%、1.35%、1.87%, 表明本方法重复性良好, 符合指纹图谱的技术要求。

2.4.4 特征图谱的建立及评价 取 12 批不同产地的丁公藤药材各适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱。根据 12 批样品特征图谱的特点, 可以确定 10 个峰作为共有特征峰, 并标定了其中的 3 个色谱峰, 其中 3 号峰为东莨菪苷峰, 4 号峰为绿原酸峰, 6 号峰为东莨菪内酯峰, 这 3 个峰分离度较好, 保留时间适宜, 因此可以作为参照峰(东莨菪苷峰、绿原酸峰、东莨菪内酯峰是丁公藤药材的有效成分, 后来含量测定测的就是东莨菪苷、绿原酸和东莨菪内酯的含量。“2.3”项中“以绿原酸色谱峰(S)作为参照峰”, 这是选择峰面积最大的绿原酸峰作为参考来标定 10 个峰的), 色谱见图 1(B)。将各批丁公藤药材的特征图谱信号导入国家药典委员会主持开发的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 版)》, 计算生成对照特征图谱, 12 批药材特征图谱的共有模式详见图 2, 共有峰的相对保留时间和相对峰面积值详见表 3, 并计算对照图谱和 12 批样品图谱之间的相似度数据, 相似度计算结果详见表 4。相似度在 0.90 以上认为符合要求, 为推荐品; 0.90 以下的为非推荐品。结果发现, 第 7 批和第 11 批样品相似度小于 0.90, 不推荐使用。

3 讨论

3.1 提取方法的选择

试验中考察了 100%、50% 甲醇超声提取法和 100%、50% 乙醇超声提取法^[12]及 100% 乙醇的加热回流提取方法。结果表明, 100% 甲醇超声提取法中大部分峰能在色谱图中真实体现, 故选此法。

3.2 检测波长的选择

对丁公藤的甲醇超声提取液进行全波长扫描, 结果最大吸收波长在 299、347 nm 处。分别以 254、299、326、347 nm 为

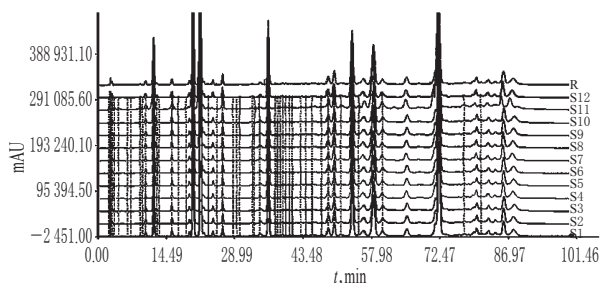


图2 12批丁公藤药材的特征图谱

Fig 2 Fingerprint of 12 batches of *E. obtusifolia*

表3 12批样品特征图谱共有峰的相对保留时间和相对峰面积值

Tab 3 Relative retention time and relative peak area of common peaks of characteristic spectrum of 12 batches of samples

编号	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5	峰6	峰7	峰8	峰9	峰10
保留时间,min	11.724	15.668	20.095	21.657	26.469	36.005	50.033	53.867	58.354	65.425
S1	803.685	144.376	930.859	2.959.189	278.225	547.870	421.091	1.225.125	1.162.668	270.023
S2	789.237	140.891	950.726	2.987.215	275.124	560.033	428.959	1.274.281	1.185.396	282.018
S3	792.797	141.652	934.529	2.938.378	274.537	564.330	440.319	1.294.380	1.171.333	266.957
S4	827.774	146.327	965.208	3.030.545	286.995	607.252	440.408	1.308.573	1.224.020	283.347
S5	773.298	140.016	940.712	2.918.599	269.337	545.580	422.098	1.203.673	1.175.337	272.909
S6	805.068	142.942	940.284	2.912.578	276.140	562.245	421.395	1.271.088	1.193.278	282.399
S7	793.596	135.513	925.439	3.106.007	263.127	543.048	418.436	1.159.233	1.298.250	310.521
S8	827.747	141.834	975.185	3.100.570	285.679	607.184	482.374	1.299.578	1.224.020	287.258
S9	817.685	141.253	952.167	2.934.812	274.781	561.391	427.940	1.280.375	1.186.926	279.904
S10	811.594	146.125	987.310	2.935.438	274.536	543.049	471.298	1.199.582	1.276.853	276.989
S11	972.146	220.071	1.199.623	3.734.333	417.287	703.054	539.679	1.827.268	1.403.046	353.995
S12	812.037	143.746	956.210	3.037.117	278.225	564.330	440.319	1.287.549	1.202.226	279.365
对照特征图谱	818.833	148.614	973.968	3.064.290	288.658	575.679	438.922	1.289.846	1.289.723	261.668
峰面积RSD,%	6.21	15.23	10.45	7.42	14.33	7.99	8.12	13.19	5.69	8.27

表4 12批药材HPLC特征图谱相似度分析结果

Tab 4 Result of similarity analysis of fingerprints of 12 batches of samples

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.946	S7	0.889
S2	0.960	S8	0.947
S3	0.943	S9	0.925
S4	0.957	S10	0.932
S5	0.931	S11	0.843
S6	0.938	S12	0.933

液作为流动相,在347 nm处进行检测,能获得很好的分离效果。

本试验对不同产地的12批丁公藤药材进行了特征图谱研究^[13],用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004版)》进行分析,得到了丁公藤药材的对照用特征图谱,以及12批药材相对于对照特征图谱的相似度。结果表明,本方法简便、准确、重复性好,可为有效地控制丁公藤药材的内在质量标准提供科学依据。

参考文献

[1] 刘卉,杨锦芬,詹若挺.丁公藤研究概况与展望[J].广东农业科学,2012,39(1):36.
 [2] 宋蔚,金蓉鸾,刘继华.光叶丁公藤化学成分的研究[J].中国中药杂志,1997,22(6):359.
 [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:3-4.
 [4] 周名璐,许少伟,程新敏.复方丁公藤胶囊的消炎镇痛作

用[J].中成药,1993,15(7):29.

3.3 流动相的选择

试验分别以甲醇-0.1%磷酸水溶液和乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相系统进行梯度洗脱,记录色谱图。结果显示,以甲醇-0.1%磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱,特征峰出现时间较晚,且峰形稍有拖尾;为使避免峰型拖尾,在有机相乙腈中加入0.1%的磷酸,可以看出谱图特征峰出现时间适宜,且峰形明显较好、分离度好、基线漂移小,因此以乙腈-0.1%磷酸水溶

[5] 谢培山,盛龙生,梁逸曾,等.中药色谱指纹图谱[M].北京:人民卫生出版社,2005:128-129.
 [6] 卢静华,彭纓,董自艳,等.不同产地连翘药材的高效液相色谱特征图谱研究[J].中国医院药学杂志,2010,30(19):1625.
 [7] 吴立宏,朱恩圆,张紫佳,等.广西产丁公藤原植物的调查及商品丁公藤主流品种的鉴定[J].中草药,2005,36(9):1398.
 [8] 徐飞,王晓中,张雷,等.HPLC测定宁夏枸杞中东茛菪素和东茛菪苷含量[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(13):67.
 [9] 黄宝美,姚程炜,王志国,等.丁公藤中东茛菪内酯含量的高效毛细管电泳电导法检测[J].中山大学学报:自然科学版,2008,47(5):71.
 [10] 谭建宁,张赧赧.RP-HPLC测定丁公藤中东茛菪内酯的含量[J].中国现代中药,2008,10(6):35.
 [11] 邓良,袁华,喻宗沅.绿原酸的研究进展[J].化学与生物工程,2005,22(7):4.
 [12] 刘明珠,李玲.用乙醇回流法从丁公藤中提取东茛菪素[J].第二军医大学学报,1995,16(5):483.
 [13] 宋蔚,刘锁兰,李秀青,等.HPLC测定4种丁公藤类生药中东茛菪素及东茛菪苷的含量[J].中国中药杂志,2004,29(2):185.

(收稿日期:2015-04-17 修回日期:2015-06-12)

(编辑:余庆华)