

肿节风药材的HPLC指纹图谱研究及其异嗪皮啉与迷迭香酸的含量测定^Δ

邓伟麟*, 吴莹莹, 毕丹, 段然, 詹华强, 董婷霞[#](香港科技大学生命科学部暨中药研发中心, 香港)

中图分类号 B284.1;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)47-4472-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.47.19

摘要 目的:研究肿节风药材的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并测定药材中异嗪皮啉与迷迭香酸的含量,以建立药材有效的质量评价方法。方法:色谱柱为Inertsil ODS-4(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为0.1%磷酸溶液-乙腈(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为342 nm。结果:所得肿节风药材的HPLC指纹图谱分离度、精密度、重复性和稳定性均良好;10批肿节风药材指纹图谱的平均相似度为0.853,不同产地样品的指纹图谱差异不大,但4个代表性色谱峰的峰面积有所区别。异嗪皮啉与迷迭香酸的质量浓度均在5~500 mg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系(r 分别为0.999 5、0.998 9);平均加样回收率分别为105.20%、99.52%,RSD分别为1.39%、1.56%(n 均为6);10批肿节风药材中异嗪皮啉与迷迭香酸的含量存在明显差异,尤以迷迭香酸含量差异较大。结论:该方法简便、准确、重复性好,可以作为肿节风药材的质量控制方法。

关键词 肿节风;指纹图谱;异嗪皮啉;迷迭香酸;高效液相色谱法;质量控制

Analysis of HPLC Fingerprints and Content Determination of Isofraxidin and Rosmarinic Acid in *Sarcandra glabra*

TANG Wai-lun Roy, WU Ying-ying, BI Dan, DUAN Ran, TSIM Wah-keung Karl, DONG Ting-xia(Life Science Division & Center for Chinese Medicine R&D, Hong Kong University of Science and Technology, Hong Kong, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study HPLC fingerprints of *Sarcandra glabra*, and to determine the contents of isofraxidin and rosmarinic acid and establish the method for quality evaluation. METHODS: The samples were separated by Inertsil ODS-4 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of 0.1% phosphoric acid-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 342 nm. RESULTS: HPLC fingerprint of *S. glabra* was established with good separation, precision, repeatability and stability; average similarity of 10 batches of *S. glabra* was 0.853; there was no significant difference in fingerprint of samples from different producing areas, but the contents of 4 representative peaks were different from one another. The linear ranges of isofraxidin were 5-500 mg/ml ($r=0.999 5$) and rosmarinic acid were 5-500 mg/ml ($r=0.998 9$). Average recoveries were 105.20% (RSD=1.39%, $n=6$) and 99.52% (RSD=1.56%, $n=6$). The contents of isofraxidin and rosmarinic acid from 10 batches were obviously different from one another, especially rosmarinic acid. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and repeatable, which can be used for the quality control of *S. glabra*.

KEY WORDS *Sarcandra glabra*; Fingerprint; Isofraxidin; Rosmarinic acid; HPLC; Quality control

肿节风为金粟兰科植物草珊瑚 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai 的干燥全草,性平,味苦、辛,归心、肺经,具有清热凉血、活血消斑、祛风通络等功效,用于治疗血热发斑发疹、风湿痹痛、跌打损伤^[1]。肿节风含挥发油、黄酮苷、甾苷、香豆素、内酯等多种化学成分^[2-3]。现代药理学研究发现,肿节风中的香豆素成分异嗪皮啉具有抗肿瘤的活性,能有效抑制人类肝癌细胞侵犯^[4];其多酚类成分迷迭香酸则具有抗菌、抗病毒、抗炎、抗氧化等多项生物活性^[5-6]。因此,肿节风是多种治疗癌症的中成药的主要组成药味。肿节风分布于我国华东、中南、西南等地^[7],但由于各个产地的地理环境、气候、土壤等生长条件以及采收时间的不同,使其化学成分组成及含量差异很大,从而

直接影响到药材的质量。因此,建立其质量评价体系,控制其质量,对肿节风药材及其制剂的安全、有效应用具有重大意义。本课题组利用高效液相色谱(HPLC)法对10个不同产地的肿节风药材进行系统研究,建立了其HPLC指纹图谱,并对药材中异嗪皮啉与迷迭香酸的含量进行了测定,可为肿节风药材的全面质量控制提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

1200型HPLC仪(美国Agilent公司);SB5200型超声波清洗机[必能信超声(上海)有限公司];LE225D型电子分析天平(德国Sartorius公司)。

1.2 试剂

异嗪皮啉对照品(四川维克奇生物技术有限公司,纯度>98%);迷迭香酸对照品(上海中药标准化研究中心,纯度>98%);乙腈、甲醇(色谱纯,美国Merck公司);磷酸(色谱纯,天津科密欧化学试剂有限公司);水为Mill-Q超纯水,其他试剂均为分析纯。

^Δ 香港特别行政区卫生署《香港中药材标准》项目(No.DH/TCMD/HKCMMS/5-80/196C)

* 助理研究员。研究方向:中药质量控制。电话:00852-23587338。E-mail: roytwl@ust.hk

[#] 通信作者:研究员,博士。研究方向:中药质量控制和中药复方作用机制。电话:00852-23587318。E-mail: botina@ust.hk

1.3 药材

10批肿节风药材中,4批购自香港药材市场,6批分别采自浙江、江苏、安徽等不同产地,均经香港科技大学生命科学部中药研发中心实验室徐红教授鉴定为金粟兰科植物草珊瑚的干燥全草(样品来源见表1),所有样品均保存于香港科技大学生命科学部。

表1 10批肿节风药材样品来源

Tab 1 Sources of 10 batches of *S. glabra*

序号	样品编号	购买地和/或产地	植物来源
1	ZHJFC-001	香港黄泽记药材公司(产自广东)	<i>S. glabra</i> (Thunb.)Nakai
2	ZHJFC-002	香港永利行药材公司(产地广东)	<i>S. glabra</i> (Thunb.)Nakai
3	ZHJFC-003	香港新利行药材公司(产自广东)	<i>S. glabra</i> (Thunb.)Nakai
4	ZHJFC-004	香港恒峰行药材公司(产自广东)	<i>S. glabra</i> (Thunb.)Nakai
5	ZHJFS-001	浙江台州	<i>S. glabra</i> (Thunb.)Nakai
6	ZHJFS-002	浙江湖州	<i>S. glabra</i> (Thunb.)Nakai
7	ZHJFS-003	江苏南京	<i>S. glabra</i> (Thunb.)Nakai
8	ZHJFS-004	江苏镇江	<i>S. glabra</i> (Thunb.)Nakai
9	ZHJFS-005	安徽黄山	<i>S. glabra</i> (Thunb.)Nakai
10	ZHJFS-006	安徽蚌埠	<i>S. glabra</i> (Thunb.)Nakai

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Inertsil ODS-4(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:0.1%磷酸溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~25 min, 17% B; >25~40 min, 17% B→30% B; >40~50 min, 30% B);流速:1.0 ml/min;检测波长:342 nm;进样量:10 μl。在此条件下,各色谱峰均能得到良好分离。

2.2 对照品贮备液的制备

取异嗪皮啶与迷迭香酸对照品各5 mg,精密称定,分别用甲醇溶解并定容至5 ml,摇匀,即得质量浓度为1.0 mg/ml的两种对照品贮备液。

2.3 供试品溶液的制备

取肿节风药材细粉约0.4 g,精密称定,置250 ml圆底烧瓶中,加甲醇25 ml,加热回流1 h,滤过,蒸干,再用甲醇定容至10 ml,摇匀,过0.45 μm微孔滤膜,取续滤液,作为供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度的试验 取同一肿节风供试品溶液(ZHJFC-003)适量,按上述色谱条件连续进样测定5次,记录峰面积。结果显示,各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD<2%,表明本方法精密度良好,符合指纹图谱的技术要求。

2.4.2 稳定性试验 取同一肿节风供试品溶液(ZHJFC-003)适量,分别于0、4、8、12、16、20、24 h按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD<2%,表明供试品溶液稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 取同一肿节风样品(ZHJFC-003)适量,共6份,分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,各共有峰相对保留时间的RSD<2%,相对峰面积的RSD<5%,表明本方法重复性良好,符合指纹图谱的技术要求。

2.4.4 线性关系考察 精密吸取上述2种对照品贮备液各适量,用甲醇稀释成6个不同质量浓度的对照品溶液,按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。以峰面积积分值(y)为纵坐标,相应的质量浓度(x)为横坐标,绘制标准曲线,得异嗪皮啶的回归方程为 $y=31.756x-24.892$ ($r=0.9995$, $n=6$);迷迭香酸的回归方程为 $y=23.706x-27.096$ ($r=0.9989$, $n=6$)。结果表明,异嗪皮啶与迷迭香酸的质量浓度均在5~500 mg/L范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系。

2.4.5 加样回收率试验 取已知含量的同一样品(ZHJFC-003)适量,共6份,精密称定,分别加入适量异嗪皮啶与迷迭香酸对照品溶液,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,测定异嗪皮啶与迷迭香酸的含量,并计算加样回收率。结果显示,异嗪皮啶的平均加样回收率为105.20%,RSD=1.39%($n=6$);迷迭香酸的平均加样回收率为99.52%,RSD=1.56%($n=6$)。

2.5 肿节风HPLC指纹图谱的测定与分析

2.5.1 样品指纹图谱测定 对来自10个不同产地的肿节风样品进行指纹图谱测定,发现样品中所有成分均能在60 min内被洗脱出来(色谱见图1)。比较10批肿节风样品的色谱图发现,虽然10批肿节风药材都含有异嗪皮啶与迷迭香酸等4个特征峰,但它们的峰面积大小有所区别(见图2),4个特征峰的

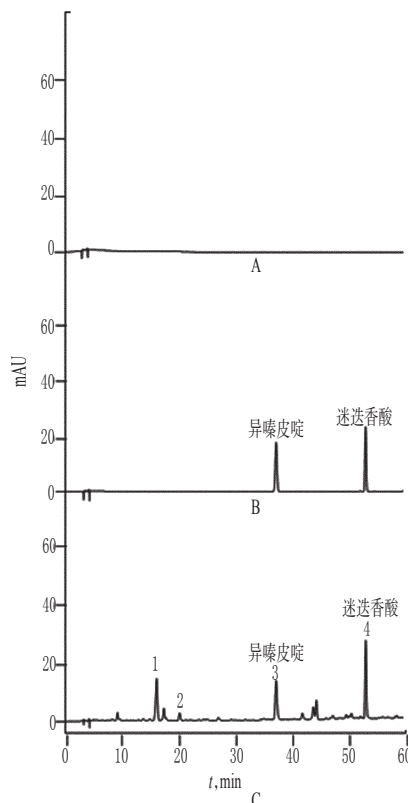


图1 高效液相色谱图

A.空白对照;B.混合对照品;C.肿节风药材(ZHJFC-003)

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank control; B. mixed control; C. *S. glabra*(ZHJFC-003)

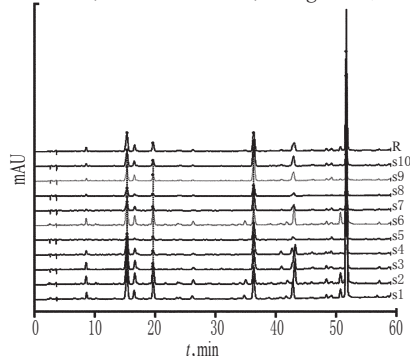


图2 10批肿节风样品的叠加指纹图谱

Fig 2 Superposition chromatograms of 10 batches of *S. glabra*

相对峰面积见表2。

表2 10批肿节风样品指纹图谱的相对峰面积

Tab 2 Relative peak area of the fingerprint of 10 batches of

S. glabra

序号	样品编号	峰1	峰2	峰3	峰4
1	ZHJFC-001	1.859 9	1.138 3	1.000 0	13.392 8
2	ZHJFC-002	1.488 3	0.136 5	1.000 0	2.213 8
3	ZHJFC-003	0.984 5	0.163 8	1.000 0	1.396 4
4	ZHJFC-004	0.186 4	0.144 6	1.000 0	0.484 7
5	ZHJFS-001	1.802 5	1.115 5	1.000 0	13.682 2
6	ZHJFS-002	0.458 9	0.162 7	1.000 0	0.668 9
7	ZHJFS-003	0.714 9	0.130 2	1.000 0	1.214 2
8	ZHJFS-004	0.562 5	0.194 6	1.000 0	0.756 5
9	ZHJFS-005	0.615 4	0.188 2	1.000 0	0.720 6
10	ZHJFS-006	1.370 8	0.766 4	1.000 0	8.036 5
	平均值	1.004 4	0.414 1	1.000 0	4.256 7
	标准差	0.590 2	0.421 1	0	5.375 5
	相对标准差,%	58.758 3	101.700 0	0	126.283 8

2.5.2 指纹图谱的相似度评价 本研究采用国家药典委员会推荐的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A版)对10批肿节风样品的指纹图谱进行相似度评价。先将各批样品的测试数据导入相似度评价系统软件中,选定上述4个特征峰进行谱峰匹配,通过中位数向量计算得出其共有图谱标准模板,然后进行各样品的相似度评价。10批肿节风样品的相似度评价结果见表3。

表3 10批肿节风样品的相似度评价结果

Tab 3 Similarity of the fingerprints of 10 batches of *S. glabra*

序号	样品编号	相似度
1	ZHJFC-001	0.978
2	ZHJFC-002	0.896
3	ZHJFC-003	0.891
4	ZHJFC-004	0.623
5	ZHJFS-001	0.976
6	ZHJFS-002	0.752
7	ZHJFS-003	0.898
8	ZHJFS-004	0.776
9	ZHJFS-005	0.759
10	ZHJFS-006	0.984
\bar{x}		0.853

从表3可以看出,10批肿节风样品的平均相似度为0.853,说明不同产地的肿节风样品色谱模式大致相似,其化学成分大致相同。但是,编号为ZHJFC-004的药材的相似度比较低,说明各批次肿节风药材之间还是存在一定差异。

2.6 肿节风中异嗪皮啶与迷迭香酸的含量测定

取10批肿节风药材样品细粉各适量,分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,代入线性回归方程计算异嗪皮啶与迷迭香酸的含量,结果见表4。

从表4可以看出,不同产地的肿节风药材中异嗪皮啶的含量介于199.98~635.19 mg/kg之间,迷迭香酸的含量介于204.77~6 367.86 mg/kg之间。不同产地两种成分的含量存在明显差异,尤以迷迭香酸的含量差异更为显著。

3 讨论

肿节风在现今治疗癌症的中成药中被广泛应用,其质量

表4 10批肿节风样品中异嗪皮啶与迷迭香酸的含量(mg/kg)

Tab 4 Contents of isofraxidin and rosmarinic acid in 10 batches of *S. glabra*(mg/kg)

序号	样品编号	购买地和(或)产地	异嗪皮啶含量	迷迭香酸含量
1	ZHJFC-001	黄泽记药材公司(产自广东)	289.35	5 188.99
2	ZHJFC-002	永利行药材公司(产自广东)	345.53	1 082.58
3	ZHJFC-003	新利行药材公司(产自广东)	372.54	691.28
4	ZHJFC-004	恒峰行药材公司(产自广东)	302.25	204.77
5	ZHJFS-001	浙江台州	368.21	6 367.86
6	ZHJFS-002	浙江湖州	435.63	338.43
7	ZHJFS-003	江苏南京	199.98	319.91
8	ZHJFS-004	江苏镇江	600.47	549.80
9	ZHJFS-005	安徽黄山	635.19	517.65
10	ZHJFS-006	安徽蚌埠	441.93	4 729.25

好坏直接影响到该中成药的安全性和疗效。本研究选择了异嗪皮啶与迷迭香酸两种有明确生物活性的成分作为含量测定指标,采用HPLC法对其进行定量分析,可用于评价肿节风药材的品质。

从表4可以看出,异嗪皮啶与迷迭香酸在不同产地肿节风药材中的含量差异十分明显,前者含量范围为199.98~635.19 mg/kg,相差约3倍;而后者含量范围为204.77~6 367.86 mg/kg,相差超过30倍。由此可见,产地对肿节风药材的质量影响极大。

为了更加全面地评价肿节风药材的质量,本课题组还将异嗪皮啶与迷迭香酸作为指标,对肿节风药材进行了指纹图谱研究。在供试品溶液的制备中,笔者采用平行试验考察了以不同方法(超声法、加热回流法)、时间(30 min、1 h、2 h)、溶剂(甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯)提取样品的结果,发现用甲醇加热回流1 h提取的供试品溶液的色谱峰信息及分离度均优于其他供试品溶液。在选择检测波长时,发现供试品溶液在342 nm波长处具有较多的色谱峰,故选其作为检测波长。

综上,本研究所建方法专属性强、简便、准确、重复性好,可以作为肿节风药材的质量控制方法。

参考文献

- [1] 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,2010:207.
- [2] 周斌,刘可越,常军,等. 中药肿节风的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国现代应用药学杂志,2009,26(12):982.
- [3] 杨荣平,王宾豪,励娜,等. GC-MS法分析肿节风茎和叶中挥发油化学成分[J]. 中国药房,2008,19(30):2 368.
- [4] Yamazaki T, Tokiwa T. Isofraxidin, a coumarin component from *Acanthopanax senticosus*, inhibits matrix metalloproteinase-7 expression and cell invasion of human hepatoma cells[J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(10): 1 716.
- [5] Triantaphyllou K, Blekas G, Boskou D. Antioxidative properties of water extracts obtained from herbs of the species Lamiaceae[J]. *Int J Food Sci Nutr*, 2001, 52(4): 313.
- [6] 苏平,王根女,吴丹,等. 迷迭香酸的生理活性功能及其来源研究进展[J]. 食物与发酵工业,2008,34(12):135.
- [7] 潘心禾,刘日林,斯金平,等. 肿节风药材资源现状及其可持续利用的研究[J]. 中草药,2007,38(3): 474.

(收稿日期:2013-01-11 修回日期:2013-08-27)