

# 五倍子的HPLC指纹图谱研究<sup>△</sup>

郭小瑞<sup>1\*</sup>,李 里<sup>2#</sup>,孙 哲<sup>3</sup>,徐美玲<sup>1</sup>,马福敏<sup>1</sup>,郭乃菲<sup>1</sup>(1.辽宁中医药大学,辽宁大连 116600;2.沈阳军区总医院,沈阳 110016;3.北京中医药大学,北京 100029)

中图分类号 R284.1;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)27-2546-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.27.18

**摘要** 目的:建立五倍子药材的高效液相色谱指纹图谱。方法:色谱柱为Kromasil C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为1%冰醋酸水溶液-甲醇(梯度洗脱),柱温为25℃,检测波长为280 nm,流速为1.0 ml/min。应用相似度评价软件和SPSS13.0软件对不同来源的14批药材进行相似度评价和系统聚类分析。结果:以没食子酸峰为内参比峰,共标定了五倍子药材指纹图谱中14个共有峰。14批样品中有12批的相似度在0.900以上,为推荐品;有2批小于0.900,为非推荐品。聚类分析结果与此相同。结论:该方法灵敏度高、重复性好、专属性强,可用于五倍子药材的质量评价。

**关键词** 五倍子;指纹图谱;高效液相色谱法;系统聚类分析

## Study on HPLC Fingerprint of *Galla Chinensis*

GUO Xiao-rui<sup>1</sup>, LI Li<sup>2</sup>, SUN Zhe<sup>3</sup>, XU Mei-ling<sup>1</sup>, MA Fu-min<sup>1</sup>, GUO Nai-fei<sup>1</sup>(1.Liaoning University of TCM, Liaoning Dalian 116600, China; 2.General Hospital of Shenyang Military Command, Shenyang 110016, China; 3. Beijing University of TCM, Beijing 100029, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the HPLC fingerprint of *Galla Chinensis*. METHODS: The separation was performed on Kromasil C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column, with mobile phase consisted of 1% glacial acetic acid-methanol (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set 280 nm, and column temperature was 25 °C. The systematic cluster analysis of 14 batches of samples was conducted with SPSS13.0 software; the similarity of them was evaluated using fingerprint similarity evaluation system. RESULTS: 14 common peaks were identified using gallic acid as internal reference peak; among 14 batches, the similarity of 12 batches were more than 0.900 as recommended products; other 2 batches were lower than 0.900 as non-recommended products. It was same to the results of cluster analysis. CONCLUSIONS: Established method is sensitive, reproducible and specific, and can be used for the quality evaluation for *Galla Chinensis*.

**KEY WORDS** *Galla Chinensis*; Fingerprint; HPLC; Systematic cluster analysis

五倍子(*Galla Chinensis*)为漆树科植物盐肤木 *Rhus chinensis* Mill.、青麸杨 *Rhus potaninii* Maxim. 或红麸杨 *Rhus punjabensis* Stew. var. *sinica* (Diels) Rehd. et Wils. 叶上的虫瘿,主要由五倍子蚜 *Melaphis chinensis* (Bell) Baker 寄生而形成。其味酸、涩,性寒,归肺、大肠、肾经,具有敛肺降火、涩肠止泻、敛汗止血、收湿敛疮之功效<sup>[1]</sup>。目前,关于五倍子质量控制方面的研究主要集中于药材中没食子酸的定量测定或某些特征成分的定性鉴别上<sup>[2-5]</sup>;也曾有学者对五倍子的指纹图谱进行研究,但谱图中色谱峰分离度有待提高<sup>[6]</sup>,不能有效控制药材质量。因此,本课题组以五倍子的主要有效成分之一没食子酸为内参比物,建立了五倍子药材高效液相色谱(HPLC)指纹图谱分析方法,并对不同来源的药材进行质量评价,不仅可以更好地反映五倍子中所含化学组分的情况,更能为全面控制五倍子药材的质量提供依据。

<sup>△</sup> 基金项目:辽宁省科学技术计划(博士启动基金计划)项目(No.20111130)

\* 讲师,博士。研究方向:中药现代化。电话:0411-87586495。E-mail: guoxiaoruiqq@163.com

# 通信作者:主治医师,硕士。研究方向:口腔医学。电话:024-28851333。E-mail: reddwht@163.com

## 1 材料

### 1.1 仪器

1100型HPLC仪,含二元泵、二级管阵列检测器、ChemStation 色谱工作站(美国Agilent公司);电子天平(瑞士Mettler Toledo公司);金利牌超声波清洗器(浙江象山县石浦海天电子仪器厂,功率:100 W,频率:50 kHz)。

### 1.2 试剂

没食子酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:0831-9501);甲醇(色谱纯,天津市凯信化学工业有限公司);冰醋酸(色谱纯,丹东市胜利化工厂);水为超纯水。

### 1.3 药材

五倍子药材样品共14批[来源及编号:贵州(1),湖南(2),辽宁(3),湖南(4),辽宁(5),辽宁(6),辽宁(7),四川(8),四川(9),湖南(10),湖南(11),四川(12),贵州(13),四川(14)],经辽宁中医药大学中药鉴定教研室王添敏副教授鉴定均为真品。

## 2 方法

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:1%冰醋酸水溶液-甲醇,梯度洗脱(洗脱程序见表1);柱温:

25 ℃;流速:1.0 ml/min;检测波长:280 nm;进样量:5 μl。

表1 流动相梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient program of mobile phase

时间,min	1%冰醋酸水溶液,%	甲醇,%
0~<15	98	2
15	97	3
>15~<40	88	12
40	87	13
>40~<60	80	20
60	80	20
>60~<120	78	22
120	73	27

## 2.2 供试品溶液的制备

取五倍子药材粉末约1.0 g,精密称定,用80 ml甲醇超声处理0.5 h,放至室温,滤过,滤液置100 ml量瓶中,用甲醇稀释并定容,使成每1 ml含10 mg(生药)的溶液,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

## 2.3 对照品溶液的制备

取没食子酸对照品适量,精密称定,用甲醇溶解并稀释,滤过,使成每1 ml含0.1 mg的溶液,即得。

## 2.4 精密度试验

取同一供试品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样5次,记录色谱图。结果表明,各色谱峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均<5.0%;按国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A版)”进行相似度计算得其相似度均>0.95,符合指纹图谱技术要求。

## 2.5 重复性试验

取同一来源的药材粉末适量,共6份,分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液,照“2.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。结果表明,各色谱峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均<5.0%;按国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A版)”进行相似度计算得其相似度均>0.95,符合指纹图谱技术要求。

## 2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件分别于0、2、8、12、24、48 h进样分析,记录色谱图。结果表明,各色谱峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均<5.0%;按国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A版)”进行相似度计算得其相似度均>0.95,表明供试品溶液在48 h内稳定。

## 3 结果

### 3.1 共有峰的确定

取14批不同来源的五倍子药材,分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液,照“2.1”项下色谱条件进样测定,得各样品药材的HPLC指纹图谱。再以没食子酸峰为内参比峰,标示出五倍子药材指纹图谱中的14个共有峰。五倍子药材的典型色谱图见图1(其中2号峰为没食子酸峰);没食子酸对照品的HPLC图见图2。

### 3.2 HPLC指纹图谱质量评价方法的建立

本研究首先根据14批五倍子药材HPLC指纹图谱的特征对其进行聚类分析,然后应用国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A、B版)”建立共有模式,并对各来源药材进行质量评价。

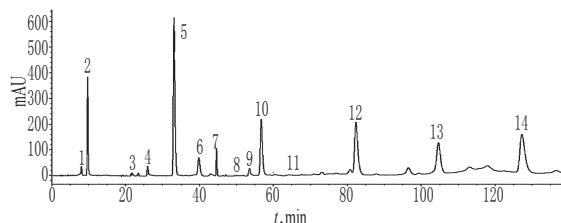


图1 五倍子药材的典型色谱图

2.没食子酸

Fig 1 Typical chromatogram of Galla Chinensis

2. gallic acid

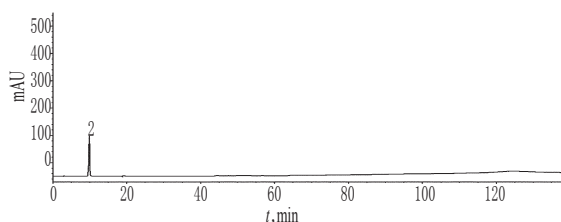


图2 没食子酸对照品的HPLC图

Fig 2 HPLC chromatogram of gallic acid control

3.2.1 系统聚类分析 由14批不同来源药材的指纹图谱中各共有峰与内参比峰之间的相对峰面积得到数据矩阵,应用SPSS13.0软件进行系统聚类分析,采用类内平均链锁法(Within-groups linkage),并利用欧式距离平方(Squared Euclidean distance)作为样品测度。结果,聚类分析将14批五倍子药材分为两类,详见图3、表2。

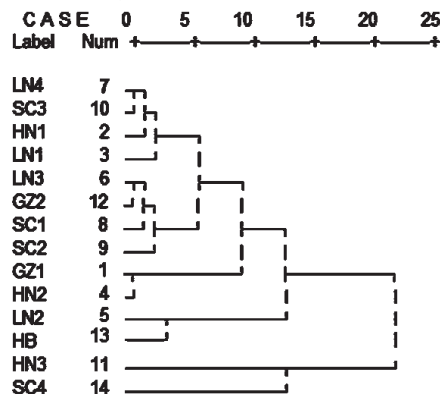


图3 不同来源五倍子药材的聚类谱系图

Fig 3 Hierarchical cluster analysis figure of Galla Chinensis from different sources

表2 不同来源五倍子药材的聚类分析结果

Tab 2 Results of systematic cluster analysis of Galla Chinensis from different sources

类别	样品序号
I	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,12,13
II	11,14

3.2.2 指纹图谱相似度评价 结合聚类分析和形态学鉴定结果,选取第I类12批五倍子药材建立共有模式。将此12批样品色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A版)”,选取“时间窗”宽度为0.5 min,经校准后,软件即生成“对照图谱”。

将生成的对照图谱和14批样品色谱图全谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 B版)”,即可计算出样品与

对照图谱的相似度数据,详见表3;14批不同来源五倍子药材的HPLC指纹图谱与对照图谱(R)见图4。若相似度在0.900以上,则判定为推荐品;若相似度在0.900以下,则判定为非推荐品。本研究相似度分析结果显示,14批五倍子药材中,来自湖南和四川的2批药材与对照图谱之间的相似度<0.900,判定为非推荐品;其余12批药材与对照图谱的相似度在0.900以上,判定为推荐品。此结果与聚类分析结果相同。

表3 不同来源五倍子药材的相似度

Tab 3 Similarity of *Galla Chinensis* from different sources

序号	相似度	序号	相似度
1	0.932	8	0.917
2	0.986	9	0.959
3	0.968	10	0.941
4	0.905	11	0.788
5	0.966	12	0.982
6	0.987	13	0.986
7	0.970	14	0.754

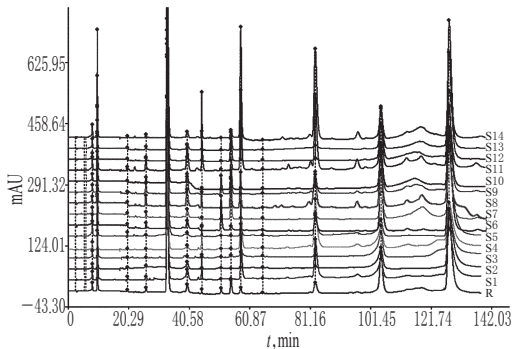


图4 14批不同来源五倍子药材的HPLC指纹图谱与对照图谱(R)

Fig 4 HPLC fingerprint of 14 batches of *Galla Chinensis* from different sources and control plot (R)

## 4 讨论

### 4.1 提取工艺的考察

4.1.1 提取溶剂的选择 笔者考察了不同溶剂(甲醇、乙醇、水、丙酮)与该溶剂不同体积分数对五倍子药材HPLC指纹图谱研究的影响,综合色谱峰面积、个数及分布情况,选择甲醇为提取溶剂。

4.1.2 提取方法的选择 笔者分别采用超声、回流、冷浸、温浸等方法提取样品,所得供试品溶液进样分析,综合色谱峰面积、个数、分布情况及提取效率等因素,选择超声提取0.5 h为本研究提取方法。

### 4.2 色谱条件的优化

4.2.1 色谱柱的确定 笔者分别考察了Kromasil C<sub>18</sub>(大连中汇达公司,250 mm×4.6 mm,5 μm)、Agilent C<sub>18</sub>(美国Agilent公司,250 mm×4.6 mm,5 μm)与Hypersil ODS2 C<sub>18</sub>(大连依利

特公司,250 mm×4.6 mm,5 μm)3种不同填料、不同厂家的色谱柱。结果表明,采用Kromasil C<sub>18</sub>色谱柱洗脱所得色谱峰基线平稳、分离度好、保留时间适中,故选用Kromasil C<sub>18</sub>柱(250 mm×4.6 mm,5 μm)进行分离。

4.2.2 检测波长的考察 五倍子药材按“2.2”项下方法处理后,照“2.1”项下色谱条件用二极管阵列检测器分析检测,绘出三维图谱。结果表明,在280 nm波长下的色谱峰信息完整、分离度好、基线平稳、干扰较少,故选择280 nm为检测波长。

4.2.3 流动相的选择 笔者曾选用甲醇-水、乙腈-水、甲醇-1%冰醋酸水溶液、乙腈-1%冰醋酸水溶液、甲醇-0.3%磷酸水溶液、乙腈-0.3%磷酸水溶液等不同的流动相系统进行HPLC指纹图谱研究。结果发现,采用甲醇-1%冰醋酸水溶液作为流动相时,所得图谱的峰形尖锐、分离度好,故选其作为本研究的流动相系统。

### 4.3 小结

本研究建立了五倍子药材HPLC指纹图谱分析方法,各色谱峰大部分都得到了基线分离;标定了14个共有峰,且共有峰面积占总峰面积的90%以上,较好地表达了五倍子药材的指纹特征。研究结果表明,14批不同来源的五倍子药材被分为两类,分别判定为推荐品和非推荐品。

中药指纹图谱是运用现代分析技术对中药化学信息以图形的方式进行表征并加以描述的一种综合分析多种成分的有效手段<sup>[7]</sup>,具有特征性和稳定性。HPLC指纹图谱运用于五倍子药材的鉴定与质量评价,能够比较全面地反映五倍子药材所含化学成分的种类与数量,更加有效地评价药材化学成分的多样性与复杂性,为其质量控制提供准确、有效的方法。

### 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,2010:62.
- [2] 侯惠婵,梁前,卢迅聪.五倍子、没食子中没食子酸的含量测定[J].中国药品标准,2005,6(3):38.
- [3] 宋巧,张耀春,胡秋颖,等.不同产地五倍子有效成分的研究[J].畜牧市场,2007(7):56.
- [4] 宋光志,刘静,谢道刚.五倍子鞣酸的质量标准[J].华西药学杂志,2004,19(4):279.
- [5] 刘起中,张可可.HPLC法测定五倍子中没食子酸的含量[J].中草药,2002,33(5):427.
- [6] 陈红,龙远德,张丹.五倍子的指纹图谱研究[J].华西药学杂志,2010,25(3):373.
- [7] 岳清洪,唐策,杨永东,等.黄连的3D-HPLC特征指纹图谱研究[J].中国药房,2013,24(7):624.

(收稿日期:2013-01-10 修回日期:2013-04-27)