

广西地不容药材的HPLC指纹图谱研究[△]

黄秋洁^{1,2*}, 叶勇^{3#}, 王捷⁴, 王志萍^{1,2}, 韦炜³, 李丹³, 朱滴新³(1.广西中医药大学药学院, 南宁 530001; 2.广西高校中药制剂共性技术研发重点实验室, 南宁 530001; 3.广西医科大学药学院, 南宁 530021; 4.广西医科大学制药厂, 南宁 530021)

中图分类号 R282 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)27-3856-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.27.31

摘要 目的:建立广西地不容药材的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱。方法:采用HPLC法。色谱柱为Hypersil ODS2,流动相为乙腈-0.5%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为282 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μL。以延胡索乙素为参照,测定10批药材样品的HPLC图谱,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版)进行共有峰指认和相似度评价。结果:10批广西地不容的HPLC图谱有17个共有峰,10批药材样品中有8个产地药材指纹图谱与对照图谱比较相似度>0.900,2个产地药材相似度<0.900。结论:该研究所建HPLC指纹图谱可为广西地不容的鉴别和质量评价提供参考;广西区内多数产地的地不容药材所含生物碱类成分相似,少数存在差异。

关键词 广西地不容;高效液相色谱法;指纹图谱;相似度

Study on HPLC Fingerprints of *Stephania kwangsiensis* in Guangxi

HUANG Qiujie^{1,2}, YE Yong³, WANG Jie⁴, WANG Zhiping^{1,2}, WEI Wei³, LI Dan³, ZHU Dixin³(1.School of Pharmacy, Guangxi University of TCM, Nanning 530001, China; 2.Key Lab of Generic Technology R&D for TCM Preparations in Guangxi Universities, Nanning 530001, China; 3.School of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 4.Pharmaceutical Factory of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish HPLC fingerprints of *Stephania kwangsiensis*. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Hypersil ODS2 with mobile phase consisted of acetonitrile-0.5% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 282 nm, and column temperature was 30 ℃. The sample size was 10 μL. Using tetrahydropalmatine as reference, HPLC fingerprints of 10 batches of medicinal materials were determined. Common peak identification and similarity evaluation were conducted by using *Similarity Evaluation System of TCM Chromatographic Fingerprint* (2012 edition). RESULTS: A total of 17 common peaks were identified in HPLC fingerprints of 10 batches of *S. kwangsiensis*. Among 10 batches of samples, fingerprint of samples from 8 producing areas were compared with control chromatogram. The similarity was higher than 0.900. The similarity of samples from 2 producing areas were lower than 0.900. CONCLUSIONS: Established HPLC fingerprint can provide reference for the identification and quality evaluation of *S. kwangsiensis*; *S. kwangsiensis* in Guangxi from most producing areas include similar alkaloid components, but samples from other producing areas are different from them.

KEYWORDS *Stephania kwangsiensis* in Guangxi; HPLC; Fingerprint; Similarity

广西地不容 *Stephania kwangsiensis* H. S. Lo 为防己科千金藤属草质藤本植物,别名又称地不容、金不换,主产于广西,是广西壮族等少数民族民间常用草药,在《广西中药材标准》^[1]中记载为金不换的植物来源品种之一,其块根是生产中药镇痛定痛的重要原料,其功能为清热解毒、散瘀消肿、健胃止痛,临床多用于胃/十二指肠溃疡疼痛、上呼吸道感染、急性胃肠炎、菌痢、牙痛、神经痛、痛

疮肿毒、跌打肿痛等症的治疗。研究发现,广西地不容块根中总生物碱含量较高,可达3%~4%,其具有较好的抗炎镇痛作用^[2]。本课题组曾建立了广西地不容块根药材和常见混伪品雪胆块根的鉴别方法^[3],目前已从地不容块根中分离出9个异喹啉生物碱^[4-7],在保健食品和新药研发上具有良好的应用前景。采用高效液相色谱法(HPLC)对中药指纹图谱进行研究可为中药材的种属差异、质量评价和真伪鉴别提供依据,从而达到控制中药质量的目的^[8-10]。为进一步评价广西地不容药材质量,本研究建立了广西地不容生物碱类成分HPLC指纹图谱,并对10批广西地不容生物碱类成分HPLC指纹图谱进行评价分析,对其已知成分延胡索乙素定位,以便能更加全面地反映广西地不容药材的质量差异,为评价和控制广西地不容药材综合质量提供科学依据。

[△] 基金项目:广西高校科学技术研究项目(No.LX2014062);广西中医药大学中药制剂共性技术研发重点实验室系统性研究课题(No.ZJGX201402003);广西医科大学大学生创新创业计划项目(No.201510598063)

* 副教授。研究方向:中药新剂型与新技术。E-mail:hqj8@163.com

通信作者:副教授。研究方向:药物新剂型与新技术。E-mail:yong-ye@163.com

1 材料

1.1 仪器

LC-20A 型 HPLC 仪,包括 LC-20A 输液泵、SPD-M20A 二极管阵列检测器、SIL-20A 自动进样器、CTO-20A 柱温箱、LC solution 工作站(日本 Shimadzu 公司);XS205DU 型电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司);KQ-500DB 型数控超声波清洗器(昆明市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

延胡索乙素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110726-200610,纯度: $>98\%$);乙腈为色谱纯,甲醇、乙醇、磷酸均为分析纯,水为去离子水。

1.3 药材

广西地不容药材购于广西各地中药材市场(见表1),并经广西中医药大学傅鹏副教授鉴定为真品。

表1 地不容药材来源

Tab 1 Sources of *S. kwangsiensis*

编号	产地	收集时间	批号
S1	广西靖西县	201309	20140115
S2	广西德保县	201308	20140119
S3	广西都安县	201311	20140216
S4	广西邕宁县	201307	20131105
S5	广西隆安县	201307	20131118
S6	广西东兴县	201309	20140107
S7	广西合浦县	201307	20131028
S8	广西那坡县	201310	20140202
S9	广西博白县	201309	20140121
S10	广西陆川县	201308	20131210

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Hypersil ODS2(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈(A)-0.5%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~8 min, 0 \rightarrow 20% A; 8~40 min, 20% \rightarrow 30% A; 40~60 min, 30% \rightarrow 45% A);流速:1.0 mL/min;检测波长:282 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取延胡索乙素对照品适量,置于50 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,制成延胡索乙素质量浓度为2.250 mg/mL的对照品贮备液;精密量取上述对照品贮备液3.00 mL,置于10 mL量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液 取药材样品粉末约2 g(过60目筛),精密称定,置于250 mL锥形瓶中,精密加60%乙醇溶液100 mL,称定质量,超声(功率:250 W,频率:50 kHz)处理15 min,加热回流提取60 min,放冷,再次称定质量,用60%乙醇溶液补足减失的质量,摇匀,经0.45 μ m微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按

“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,以延胡索乙素的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果,17个共有峰相对保留时间、相对峰面积的RSD $<3.0\%$ ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取“2.2.2”项下供试品溶液(编号:S1)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,以延胡索乙素的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果,17个共有峰相对保留时间、相对峰面积的RSD $<3.0\%$ ($n=6$),表明供试品溶液室温放置24 h内基本稳定。

2.3.3 重复性试验 精密称取同一批样品(编号:S1)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,以延胡索乙素的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果,17个共有峰相对保留时间、相对峰面积的RSD $<3.0\%$ ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.4 HPLC 指纹图谱的生成及共有峰相关分析

2.4.1 HPLC 指纹图谱的生成 取10批药材样品各适量,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,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版)对10批药材样品的HPLC图谱进行分析,得HPLC指纹图谱,详见图1、图2。

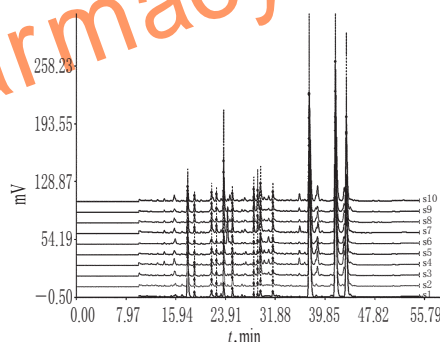


图1 10批药材样品HPLC叠加指纹图谱

Fig 1 HPLC superposed fingerprints of 10 batches of samples

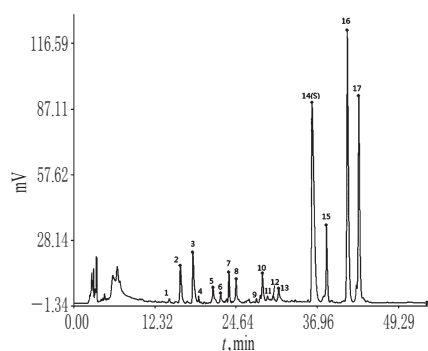


图2 药材样品HPLC对照指纹图谱

Fig 2 HPLC control fingerprints of samples

2.4.2 相似度分析 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版)对10批药材样品的HPLC图谱进行比

较分析。结果,10批药材样品(S1~S10)相似度分别为0.984、0.980、0.953、0.962、0.988、0.973、0.966、0.869、0.891、0.921,表明10批药材样品中有8个产地药材指纹图谱与对照图谱比较相似度>0.900,2个产地药材相似度<0.900,说明广西省内多数产地的地不容药材所含成分相似,少数存在差异。

2.4.3 共有峰相关数据分析 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版)对10批药材样品的共有HPLC图谱进行比较分析。10批药材样品共有17个特征指纹峰,共有峰的峰面积总和大于总峰面积的90%,通过对照品HPLC色谱确定14号峰为延胡索乙素。以14号峰为参照峰,计算其他共有峰相对于14号峰的相对保留时间和相对峰面积,详见表2、表3。

表2 10批药材样品HPLC图谱共有峰的相对保留时间
Tab 2 Relative retention time of common peaks for HPLC fingerprints of 10 batches of samples

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.426	0.425	0.421	0.421	0.422	0.424	0.422	0.420	0.421	0.421
2	0.477	0.478	0.478	0.479	0.479	0.478	0.479	0.478	0.477	0.478
3	0.508	0.508	0.507	0.508	0.508	0.507	0.509	0.507	0.506	0.507
4	0.581	0.581	0.580	0.581	0.581	0.580	0.582	0.580	0.579	0.580
5	0.603	0.602	0.601	0.602	0.602	0.601	0.603	0.601	0.601	0.601
6	0.634	0.633	0.632	0.633	0.633	0.632	0.634	0.632	0.631	0.633
7	0.652	0.652	0.650	0.654	0.658	0.649	0.652	0.650	0.650	0.651
8	0.675	0.674	0.672	0.674	0.674	0.672	0.675	0.672	0.672	0.673
9	0.763	0.763	0.761	0.762	0.762	0.761	0.763	0.762	0.761	0.762
10	0.781	0.781	0.779	0.779	0.779	0.778	0.781	0.779	0.776	0.780
11	0.791	0.791	0.790	0.790	0.790	0.789	0.792	0.790	0.790	0.791
12	0.844	0.845	0.843	0.844	0.844	0.843	0.845	0.844	0.843	0.844
13	0.961	0.959	0.957	0.957	0.958	0.956	0.959	0.958	0.956	0.958
14	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
15	1.031	1.030	1.035	1.035	1.036	1.035	1.038	1.036	1.035	1.035
16	1.112	1.113	1.112	1.112	1.112	1.111	1.113	1.112	1.111	1.111
17	1.160	1.160	1.158	1.172	1.160	1.158	1.161	1.159	1.157	1.159

表3 10批药材样品HPLC图谱共有峰的相对峰面积
Tab 3 Relative peak areas of common peaks for HPLC fingerprints of 10 batches of samples

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.045	0.008	0.073	0.068	0.033	0.084	0.030	0.035	0.082	0.052
2	0.348	0.283	0.162	0.076	0.102	0.124	0.139	0.099	0.231	0.098
3	0.023	0.027	0.073	0.018	0.011	0.018	0.022	0.047	0.064	0.028
4	0.052	0.055	0.121	0.051	0.028	0.047	0.059	0.065	0.118	0.066
5	0.011	0.008	0.013	0.020	0.020	0.009	0.036	0.010	0.049	0.055
6	0.073	0.122	0.119	0.099	0.069	0.122	0.181	0.166	0.500	0.182
7	0.005	0.004	0.007	0.018	0.011	0.323	0.009	0.009	0.034	0.008
8	0.047	0.046	0.127	0.007	0.008	0.079	0.061	0.087	0.096	0.053
9	0.009	0.008	0.019	0.008	0.005	0.013	0.047	0.088	0.134	0.072
10	0.008	0.007	0.038	0.011	0.009	0.014	0.047	0.024	0.269	0.032
11	0.043	0.042	0.212	0.143	0.119	0.170	0.121	0.114	0.144	0.149
12	0.045	0.047	0.092	0.075	0.088	0.108	0.078	0.099	0.149	0.101
13	0.046	0.004	0.014	0.062	0.019	0.016	0.034	0.015	0.033	0.053
14	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
15	0.046	0.004	0.097	0.128	0.098	0.084	0.058	0.088	0.083	0.119
16	0.997	0.860	0.925	1.045	1.046	1.352	0.889	0.916	1.202	1.268
17	0.679	0.715	0.466	0.454	0.335	0.495	0.432	0.388	0.613	0.713

3 讨论

本试验所建HPLC指纹图谱分析方法灵敏度高、重复性好、精密度好、操作简便。在样品前期处理时,笔者比较了超声和加热回流两种提取方法,结果两种方法差异不大,为简化操作,笔者选择程序简单的超声提取法。

本试验采用紫外检测器检测发现,广西地不容生物碱成分在282 nm波长处所检测到的共有峰较多,多数生物碱成分在此处出峰,且峰强度较高、背景噪音小、基线平稳,经过考察最终选择282 nm波长作为HPLC图谱的检测波长。笔者又分别考察了以甲醇-水、甲醇-0.5%磷酸溶液、乙腈-水、乙腈-0.5%磷酸溶液为流动相,进行等度或梯度洗脱。结果表明,采用乙腈-0.5%磷酸溶液为流动相(梯度洗脱),所得HPLC指纹图谱各成分特征峰分布均匀、分离度高、峰形尖锐,故最终选择乙腈-0.5%磷酸溶液作为流动相。

对广西区内10个不同产地地不容药材的HPLC指纹图谱进行比较发现,其差异并不显著,其中有8个产地药材指纹图谱与对照图谱比较,相似度>0.900,2个产地药材相似度<0.900,说明产地对药材所含成分有一定的影响。但由于10批药材均采集于广西区内,其所在区域的气候及生长环境较为相似,推测除与多数产地药材HPLC指纹图谱相似度较高有关外,还与药材加工方法、贮存条件、采集季节、运输方式有关,其内在质量也会因这些影响因素而存在一定差异。

参考文献

- [1] 广西壮族自治区卫生厅.广西中药材标准:第二册[S].南宁:广西科技出版社,1996:153-157.
- [2] 罗昱澜,李江,毛柳璐,等.广西地不容总碱的镇痛抗炎作用及其急性毒性研究[J].海峡药学,2015,27(12):25-27.
- [3] 王捷,黎渊弘,何成章,等.广西地不容块根与雪胆块根的鉴别[J].中药材,2013,36(2):216-219.
- [4] 闵知大,钟守明.广西地不容生物碱的研究[J].药学学报,1980,15(9):532-537.
- [5] 董红敬.广西地不容生物碱高速逆流色谱制备技术及提取工艺研究[D].济南:山东中医药大学,2012.
- [6] 成桂仁,王桂青,文永新.广西地不容生物碱的研究非酚性碱部分[J].药学通报,1981,16(2):49-50.
- [7] 邓业成,徐汉虹.广西地不容块根生物碱成分研究[J].广西师范大学学报(自然科学版),2004,22(12):73-77.
- [8] 刘玉梅.指纹图谱在中药质量控制中的应用简析[J].亚太传统医药,2015,11(13):55-57.
- [9] 宋小妹,杨新杰,王薇,等.珠子参的HPLC指纹图谱及模式识别[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(11):59-62.
- [10] 张彦飞,李智萌,赵利利,等.两头尖的HPLC指纹图谱研究[J].中国药房,2016,27(3):399-401.

(收稿日期:2016-09-07 修回日期:2016-11-24)

(编辑:张 静)