

# 苗药朱砂根的HPLC指纹图谱研究<sup>Δ</sup>

孙 绪<sup>1,2\*</sup>,姚成芬<sup>1,3</sup>,付思红<sup>1,3</sup>,巩仔鹏<sup>1</sup>,刘 亭<sup>1</sup>,杨 畅<sup>1</sup>,查 俊<sup>3</sup>,李勇军<sup>3#</sup>(1.贵州省药物制剂重点实验室,贵阳 550004;2.贵州医科大学药学院,贵阳 550004;3.民族药与中药开发应用教育部工程研究中心/国家苗药工程技术研究中心,贵阳 550004)

中图分类号 R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)30-4285-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.30.29

**摘要** 目的:建立苗药朱砂根的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱。方法:采用HPLC法。色谱柱为Diamonsil C<sub>18</sub>,流动相为甲醇-水(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为220 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μL。以11-O-(3',4',5'-三羟基没食子酰基)-岩白菜素为参照,测定16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,并就指纹图谱进行聚类分析。结果:16批朱砂根药材的HPLC图谱有6个共有峰,其中8批药材样品的相似度均>0.9;16批朱砂根药材可聚为4类。结论:该研究所建指纹图谱可为朱砂根药材的鉴别和质量评价提供参考。

**关键词** 朱砂根;高效液相色谱法;指纹图谱;聚类分析

## Study on HPLC Fingerprint of Miao Medicine *Ardisia crenata*

SUN Xu<sup>1,2</sup>, YAO Chengfen<sup>1,3</sup>, FU Sihong<sup>1,3</sup>, GONG Zaipeng<sup>1</sup>, LIU Ting<sup>1</sup>, YANG Chang<sup>1</sup>, ZHA Jun<sup>3</sup>, LI Yongjun<sup>3</sup>(1. Guizhou Provincial Key Lab of Pharmaceutic Preparation, Guiyang 550004, China; 2. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 3. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM, Ministry of Education/National Engineering Research Center of Miao Medicines, Guiyang 550004, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish HPLC fingerprints of Miao medicine *Ardisia crenata*. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Diamonsil C<sub>18</sub> column with mobile phase consists of methanol-water (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was 220 nm, and column temperature was maintained at 30 ℃. The sample size was 10 μL. Using 11-O-(3',4',5'-three-o-galloylhyperin)-bergenin as reference, HPLC fingerprints of 16 batches of samples were determined. Common identification and similarity evaluation were performed by using TCM Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation Software (2012 edition). Cluster analysis of fingerprints was conducted. RESULTS: There were 6 common peaks in HPLC fingerprints of 16 batches of samples. The similarity among 8 batches was more than 0.9. The 16 batches of samples could be clustered into 4 categories. CONCLUSIONS: Established fingerprints can provide reference for identification and quality evaluation of *A. crenata*.

**KEYWORDS** *Ardisia crenata*; HPLC; Fingerprint; Cluster analysis

朱砂根又名八爪金龙,为紫金牛科植物朱砂根 *Ardisia crenata* Sims.的干燥根及根茎,主要成分为三萜

皂苷、鞣质、糖类等<sup>[1]</sup>,具清热解毒、散瘀止痛、祛风除湿之功效,临床多用于咽喉肿痛、扁桃体炎、风湿骨痛等症

- [J].中国药物与临床,2015,15(9):1353-1354.
- [5] 李继睿,郭君,刘松长.HPLC法测定中成药中黄芩苷的含量[J].浙江化工,2007,38(11):26-28.
- [6] 詹雪艳,林兆洲,段天璇,等.色谱指纹图谱相似度方法的

- 适用性研究[J].中国中医药信息杂志,2012,19(5):61-63.
- [7] 刘智,王爱民,许祖超,等.全天麻胶囊特征指纹图谱研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(15):86-88.
- [8] 崔小敏,石会丽,雷琨,等.愈银片的HPLC指纹图谱研究[J].中国药房,2017,28(3):397-400.
- [9] 邱宏聪,马军花,陈露,等.复方金钱草颗粒的指纹图谱[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(1):36-39.
- [10] 牛小花,陈洪源.清喉利咽颗粒的UPLC指纹图谱建立及主成分分析[J].中国药房,2017,28(6):826-830.

Δ 基金项目:贵州省科技计划项目(No.黔科合平台人才[2016]5613、5677);贵州省教育厅项目(No.黔教合协同创新字[2013]04、黔科合KY字[2013]122、黔教研合ZYRC字[2014]012);贵州省优秀青年科技人才培养对象专项(No.黔科合人字[2015]11号)

\* 硕士研究生。研究方向:中药药效物质基础及质量控制。电话:0851-86908468。E-mail: 928763710@qq.com

# 通信作者:教授。研究方向:天然产物活性。电话:0851-86908468。E-mail: liyongjun026@126.com

(收稿日期:2017-03-17 修回日期:2017-06-13)  
(编辑:张 静)

的治疗<sup>[2]</sup>, 收载于2015年版《中国药典》(一部)<sup>[3]</sup>和2003年版《贵州省中药材、民族药材质量标准》<sup>[4]</sup>。2015年版《中国药典》(一部)仅收载了朱砂根药材中岩白菜素含量的测定方法, 为进一步完善其质量标准, 本课题组在前期研究<sup>[5]</sup>的基础上收集了具有代表性的贵州省不同产地朱砂根药材, 采用分析效能高、速度快且应用较广的高效液相色谱法(HPLC)建立了指纹图谱<sup>[6-9]</sup>, 并就结果进行了聚类分析。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1100型HPLC仪, 包含二极管阵列检测器、四元梯度泵、脱气机、自动进样器、柱温箱、ChemStation色谱工作站(美国Agilent公司); Me AE240型电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

### 1.2 试剂

岩白菜素、11-*O*-(3', 4', 5'-三羟基没食子酰基)-岩白菜素对照品均为贵州省药物制剂重点实验室自制, 经核磁共振、红外光谱检测, 质谱分析确证其结构, 经HPLC法检测纯度均>98%; 试验所用试剂均为分析纯, 水为纯化水。

### 1.3 药材

16批朱砂根药材采自贵州省不同产地(见表1), 由贵州医科大学药学教研室龙庆德副教授鉴定为真品。

表1 朱砂根药材来源

Tab 1 The sources of *A. crenata*

编号	批号	药材来源
S1	20080403	贵阳
S2	20080805	六盘水
S3	20080816	铜仁
S4	20080825	凯里
S5	20080929	龙里
S6	20090510	遵义
S7	20090516	安顺
S8	20090911	毕节
S9	20090915	水城
S10	20091121	贵阳
S11	20091121	安顺
S12	20091122	清镇
S13	20091124	六枝
S14	20080805	六盘水
S15	20090713	龙里
S16	20080607	平坝

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇(A)-水(B), 梯度洗脱(0~5 min, 5%→15% A; 5~10 min, 15%→20% A; 10~30 min, 20%→40% A; 30~45 min, 40%→60% A); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 220 nm; 柱温: 30 ℃; 进样量: 10 μL。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别称取待测成分对照品适

量, 加甲醇制成岩白菜素、11-*O*-(3', 4', 5'-三羟基没食子酰基)-岩白菜素质量浓度分别为0.496 4、1.061 0 mg/mL的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取药材样品粉末(过40目筛)1 g, 精密称定, 精密加甲醇25 mL, 称定质量, 加热回流提取2 h, 放冷至室温, 再次称定质量, 用甲醇补足缺失的质量, 摇匀, 经0.45 μm微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

### 2.3 方法学考察

2.3.1 精密密度试验 取“2.2.2”项下供试品溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次, 以11-*O*-(3', 4', 5'-三羟基没食子酰基)-岩白菜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, 6个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD<3.0% (n=6), 表明方法精密密度良好。

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、1、2、4、8、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定, 以11-*O*-(3', 4', 5'-三羟基没食子酰基)-岩白菜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, 6个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD<3.0% (n=7), 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 精密称取同一批药材样品(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11-*O*-(3', 4', 5'-三羟基没食子酰基)-岩白菜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, 6个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD<3.0% (n=6), 表明本方法重复性良好。

### 2.4 HPLC指纹图谱的生成及相似度、共有峰相关分析

2.4.1 HPLC指纹图谱的生成 取16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16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。

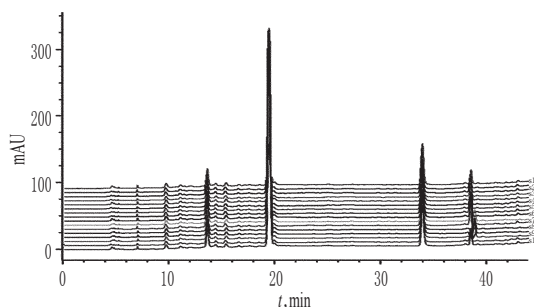


图1 16批药材样品HPLC叠加指纹图谱

Fig 1 HPLC superposed chromatograms of 16 batches of medicinal materials

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16批药材样品的HPLC图谱进行比较分析, 详见表2。结果, 16批药材样品中有8批差异较

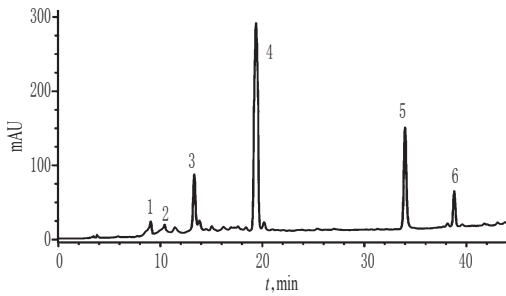


图2 药材样品 HPLC 对照指纹图谱

Fig 2 Control HPLC Fingerprint of samples

小,相似度均 $>0.9$ ;另外4批药材样品相似度在 $0.7\sim 0.9$ 之间;还有4批药材样品相似度在 $0.2\sim 0.4$ 之间。表明不同产地朱砂根药材化学成分差异较大。

2.4.3 共有峰相关数据分析 采用《中药色谱指纹图谱相似性评价系统》(2012版)对16批药材样品的HPLC图

表2 16批药材样品相似性评价结果

Tab 2 Similarity evaluation of 16 batches of samples

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.780	S9	0.957
S2	0.929	S10	0.968
S3	0.250	S11	0.928
S4	0.244	S12	0.950
S5	0.235	S13	0.768
S6	0.895	S14	0.940
S7	0.318	S15	0.967
S8	0.868	S16	0.966

谱进行比较分析。结果,16批药材样品有6个共有峰,通过对照品HPLC图谱确定4号峰为岩白菜素,5号峰为11-O-(3',4',5'-三羟基没食子酰基)-岩白菜素。以5号峰为参照峰,计算其他共有峰与5号峰的相对保留时间和相对峰面积,详见表3、表4。

表3 16批药材样品 HPLC 图谱共有峰的相对保留时间

Tab 3 Relative retention time of common peaks in HPLC fingerprints of 16 batches of samples

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16
1	0.172 8	0.172 4	0.173 0	0.172 9	0.172 5	0.173 1	0.173 1	0.172 9	1.727 0	0.172 5	0.173 1	0.172 8	0.172 9	0.172 7	0.173 0	0.172 5
2	0.219 1	0.218 9	0.219 3	0.219 5	0.219 0	0.219 4	0.219 2	0.219 3	0.218 8	0.219 0	0.219 4	0.219 0	0.219 3	0.219 0	0.219 4	0.218 7
3	0.305 6	0.305 4	0.305 9	0.305 7	0.305 3	0.305 8	0.305 7	0.305 8	0.305 3	0.305 5	0.305 8	0.305 4	0.305 8	0.305 6	0.305 7	0.305 4
4	0.515 4	0.515 1	0.515 6	0.515 8	0.515 3	0.525 6	0.515 5	0.515 8	0.515 2	0.525 1	0.515 5	0.515 3	0.515 6	0.515 1	0.515 6	0.515 2
5(S)	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0
6	1.123 5	1.123 2	1.123 9	1.123 7	0.123 4	1.123 6	1.124 0	1.123 9	1.123 2	1.123 3	1.123 6	1.123 3	1.123 7	1.123 3	1.123 7	1.123 1

表4 16批药材样品 HPLC 图谱共有峰的相对峰面积

Tab 4 Relative peak areas of common peaks in n HPLC fingerprints of 16 batches of samples

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16
1	0.128 3	0.120 1	0.088 7	0.089 2	0.081 1	0.247 3	0.057 7	0.117 6	0.025 9	0.137 1	0.106 4	0.632 1	0.092 1	0.093 1	0.119 7	0.141 1
2	0.091 0	0.089 6	0.048 6	0.018 7	0.043 7	0.105 4	0.028 2	0.095 4	0.006 5	0.060 2	0.062 5	0.256 7	0.052 8	0.053 6	0.091 8	0.066 1
3	0.652 1	0.403 8	0.346 3	0.393 8	0.543 9	0.367 6	0.344 5	0.473 2	0.403 9	0.851 4	0.454 6	2.604 0	0.418 2	0.399 8	0.509 8	0.514 1
4	4.473 8	5.679 2	5.761 7	5.676 4	5.939 4	5.593 4	5.181 9	6.314 9	6.229 2	6.468 6	4.124 1	25.550 8	4.864 3	6.418 1	8.476 8	5.762 1
5(S)	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0
6	0.288 3	0.386 7	0.599 7	0.253 7	0.266 1	0.550 8	0.244 8	0.266 4	0.274 5	0.271 7	0.284 3	1.331 3	0.267 6	0.239 4	0.311 1	0.284 5

### 2.5 聚类分析

就HPLC指纹图谱中各共有峰峰面积进行标准化处理,采用SPSS 18.0统计软件中系统聚类法(Hierarchical cluster)的Ward法中欧氏距离平方方法(Squared euclidean distance)对16批药材样品进行系统聚类分析,绘制树状图,详见图3。

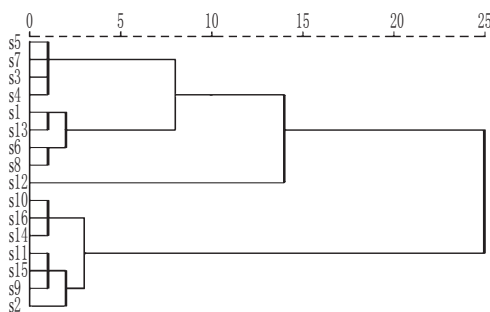


图3 16批药材样品的聚类分析树状图

Fig 3 Cluster analysis of 16 batch of medicinal materials samples

由图3可知,16批不同产地药材样品在距离为5的

条件下可以分为4类:第1类药材样品7批(S2、S9、S10、S11、S14、S15、S16),其相似性均 $>0.9$ ,此类药材样品中岩白菜素含量都普遍较高;第2类药材样品4批(S3、S4、S5、S7),相似性在 $0.2\sim 0.4$ 之间,此类药材样品中岩白菜素含量很低;第3类药材样品4批(S1、S6、S8、S13),相似性在 $0.7\sim 0.9$ 之间,此类药材样品中岩白菜素含量介于前2类之间;第4类药材样品1批(S12),虽然其相似性在 $0.9$ 以上,但其2号共有峰含量明显高于其他批药材样品,化学成分信息量也较为全面,因此聚为一类。

### 3 讨论

本课题组采用HPLC法建立了苗药朱砂根的指纹图谱分析方法。试验中对流动相、洗脱梯度、流速、柱温等色谱条件进行了优化,在优化后的色谱条件下,各待测成分峰达到较好分离且基线平稳;并考察了提取方法、提取溶剂、提取时间等供试品溶液制备方法,得到了最适合的条件。方法学验证结果表明,所建立的朱砂根药材指纹图谱分析方法准确、可靠。

相似性评价法是以两者中若干共有的、具有特征的

# 离子抑制色谱法测定伊班膦酸钠原料药中的有关物质

李欣\*,陈红#,张亿(成都市食品药品检验研究院,成都 610045)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)30-4288-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.30.30

**摘要** 目的:采用离子抑制色谱法测定伊班膦酸钠原料药中的有关物质。方法:色谱柱为Dionex IonPac AS11-HC,流动相为氢氧化钾溶液(梯度洗脱),流速为1.1 mL/min,柱温为45 ℃,进样量为20 μL,检测器为抑制型电导检测器,检测器温度为35 ℃。结果:亚磷酸盐、杂质I、磷酸盐检测质量浓度线性范围分别为3.08~30.83 μg/mL( $r=0.999\ 9$ )、2.84~28.43 μg/mL( $r=0.999\ 1$ )、2.95~29.52 μg/mL( $r=0.999\ 9$ );定量限分别为2.47、56.7、3.31 ng,检测限分别为0.75、17.2、1.0 ng;精密性、稳定性、重复性试验的RSD<4.0%;加样回收率分别为101.49%~103.57%(RSD=0.7%, $n=9$ )、100.00%~104.85%(RSD=1.8%, $n=9$ )、101.35%~104.08%(RSD=0.9%, $n=9$ )。结论:该方法简便、准确、灵敏,适用于测定伊班膦酸钠原料药中的有关物质。

**关键词** 离子抑制色谱法;伊班膦酸钠;有关物质;亚磷酸盐;杂质I;磷酸盐

## Determination of Related Substances in Ibandronate Sodium Raw Materials by Ion Suppression Chromatography

LI Xin, CHEN Hong, ZHANG Yi (Chengdu Institute for Food and Drug Control, Chengdu 610045, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To adopt ion suppression chromatography to determine related substance in ibandronate sodium raw materials. METHODS: The separation was performed on a Dionex IonPac AS11-HC column with mobile phase consisted of potassium hydroxide (gradient elution) at the flow rate of 1.1 mL/min. The column temperature was set at 45 ℃, and sample size was

指标作为统一尺度,运用适当的判定原则来描述两者之间匹配程度的方法<sup>[10-12]</sup>;聚类分析法是根据相似程度大小将样品归类,在中药的真伪鉴别、质量评价及品种分类等方面均有应用<sup>[13-16]</sup>。本研究就所鉴定的16批朱砂根药材样品的指纹图谱进行了相似度评价及聚类分析,由相似度评价结果可见,其中有4批药材样品相似度较低,差异较大,而造成该差异的主要因素是各共有峰含量的差异;聚类分析结果准确地将各批药材归类,达到了质量评价及品种分类的目的。

综上所述,本研究所建指纹图谱可为朱砂根药材的鉴别和质量评价提供参考。

### 参考文献

- [1] 陈尚研,胡文杰,黄艳丽,等.朱砂根化学成分的初步分析[J].江西林业科技,2007,21(6):15-17.
- [2] 贵州省中药普查办公室.贵州中药资源[S].北京:中国医药科技出版社,1992:785.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:138.
- [4] 贵州省药品监督管理局.贵州省中药材、民族药材质量标准[S].贵阳:贵州科技出版社,2003:164.
- [5] 李勇军,夏彬,龙庆德,等.朱砂根主要活性成分的含量测定研究[J].时珍国医国药,2011,22(8):1929-1931.
- [6] 贾成友,赵凤平,李微,等.HPLC指纹图谱结合共有模式

识别评价重庆市售青蒿饮片质量的一致性[J].中国药房,2015,26(27):3828-3831.

- [7] 涂兴明,吴涵,吴康郁.中药指纹图谱的研究与应用[J].海峡药学,2016,28(5):1-4.
- [8] 姜涛涛,陀扬凌,金玲,等.黑果枸杞及其伪品白刺果的HPLC指纹图谱研究[J].中国药房,2016,27(9):1245-1248.
- [9] 罗文汇,刘布鸣,彭丽诗,等.石柑子药材的HPLC指纹图谱研究[J].中国药房,2016,27(33):4701-4704.
- [10] 孙国祥,闫波,侯志飞,等.中药色谱指纹图谱评价方法研究进展[J].中南药学,2015,13(7):673-681.
- [11] 关洪月,李林,刘晓,等.中药指纹图谱相似度计算方法解析[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(18):282.
- [12] 孙国祥,张玉静,孙万阳,等.中药一致性评价关键问题:中药标准制剂制模式和定量指纹图谱检查项[J].中南药学,2015,13(10):1026-1032.
- [13] 朱晓勤,尹莲.化学模式识别在中药分类和质量评价中的应用[J].中华中医药学刊,2007,25(10):2111.
- [14] 黄琪,黄彩虹,雷鹏,等.地锦草药材HPLC指纹图谱及模式识别研究[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(12):95-97.
- [15] 潘伟东,杜义龙,赵胜男,等.韩信草的高效液相色谱指纹图谱及化学模式识别[J].药物分析杂志,2015,35(2):250-252.
- [16] 吴玲芳,林琛,袁永兵,等.叶下珠指纹图谱及模式识别研究[J].中草药,2015,46(4):572-575.

\* 主管药师。研究方向:药物分析及质量控制。电话:028-85362213。E-mail:474519950@qq.com

# 通信作者:主任药师,硕士。研究方向:药物分析及质量控制。E-mail:redchen333@sohu.com

(收稿日期:2017-01-10 修回日期:2017-02-18)

(编辑:张静)