

醋制前后京大戟饮片石油醚部位的HPLC指纹图谱比较[△]

葛秀允*, 孙立立#, 张乐林(山东省中医药研究院, 济南 250014)

中图分类号 R284.1;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)39-3691-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.39.14

摘要 目的:建立京大戟饮片石油醚部位的指纹图谱,比较京大戟醋制前后石油醚部位化学成分的变化。方法:以大戟二烯醇为对照品,采用高效液相色谱法。色谱柱为汉邦 Benetnach C₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为0.3%磷酸溶液-乙腈(梯度洗脱),检测波长为203 nm。结果:10批京大戟和醋京大戟分别有11个共有色谱峰;京大戟和醋京大戟有8个共有峰。相似度均>0.90。结论:醋制对京大戟化学成分有一定的影响。该方法稳定、准确、可靠,能明显区分京大戟和醋京大戟饮片的内在质量,可为京大戟饮片的质量控制提供依据。

关键词 京大戟;醋京大戟;指纹图谱;高效液相色谱法;大戟二烯醇

Comparison of HPLC Fingerprint of Petroleum Ether Extract of *Euphorbia pekinensis* and *E. pekinensis* Stir-baked with Vinegar

GE Xiu-yun, SUN Li-li, ZHANG Le-lin(Shandong Provincial Academy of TCM, Jinan 250014, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish an HPLC fingerprint of petroleum ether extract of *Euphorbia pekinensis* and *E. pekinensis* stir-baked with vinegar, and to compare the changes of the chemical composition in petroleum ether extracts of *E. pekinensis* and *E. pekinensis* stir-baked with vinegar. METHODS: Using euphadienol as control, HPLC method was adopted. The determination was performed on Benetnach C₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of 0.3% phosphoric acid-acetonitrile (gradient elution). The detection wavelength was set at 203 nm. RESULTS: From 10 batches of petroleum ether extracts of *E. pekinensis* and *E. pekinensis* stir-baked with vinegar, there were 11 peaks, and 8 peaks were common respectively with similarity >0.90. CONCLUSIONS: The method of stir-baked with vinegar influences the chemical components of *E. pekinensis*. The method is stable, accurate and reliable, and it obviously distinguishes internal quality of *E. pekinensis* and *E. pekinensis* stir-baked with vinegar, which provides reference standard for the quality control of *E. pekinensis* decoction pieces.

KEY WORDS *Euphorbia pekinensis*; *Euphorbia pekinensis* stir-baked with vinegar; Fingerprint; HPLC; Euphadienol

京大戟为大戟科植物大戟 *Euphorbia pekinensis* Rupr. 的干燥根,是临床常用的有毒中药,具有泻水逐饮、消肿散结的作用。历版《中国药典》对其均有收载,收载的饮片规格有京大戟和醋京大戟。临床常用的是京大戟醋制品,因其醋制后毒性降低、药性缓和,提高了用药安全性。本课题组前期研究表明,京大戟石油醚部位是其毒效部位之一^[1],但醋制后该部位化学成分是否有变化尚不明确。因此,笔者采用高效液相色谱(HPLC)法建立了京大戟饮片石油醚部位的指纹图谱,以期能从整体上追踪京大戟炮制前后化学成分的变化,为醋制减毒机制提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

2695型HPLC仪、2996型二极管阵列检测器(DAD)(美国Waters公司);R200D型十万分之一电子天平(德国Sartorius公司)。

1.2 试剂

乙腈为色谱纯,水为超纯水,甲醇、乙醇、乙酸乙酯、醋酸均为分析纯;大戟二烯醇对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111866-201001)。

1.3 药材

京大戟饮片:京大戟1(湖北)、京大戟2(河南)、京大戟3(河南)、京大戟4(河南)购自安徽亳州药材市场,京大戟5(南京)采自南京老山,京大戟6(河北,批号:20100912)、京大戟7(河南,批号:20110215)、京大戟8(河南,批号:20101214)、京大戟9(河南,批号:20101108)、京大戟10(河南,批号:20110103)购自龙口新世纪药业有限公司;醋京大戟饮片分别为上述京大戟饮片的醋制品[按照《全国中药炮制规范》(1988年版)醋京大戟项下炮制方法进行炮制]。

2 方法与结果

[△] 基金项目:国家中医药管理局中医药行业科研专项项目立项计划(No.200807039);国家中医药管理局全国名老中医药专家传承工作室建设项目;山东省中医药科技发展计划项目(No.2011-172)

* 副研究员,博士。研究方向:中药炮制机制与工艺。电话:0531-82949829。E-mail:xiuyunge@163.com

通信作者:研究员。研究方向:中药炮制原理与中药新药。电话:0531-82949829。E-mail:xingerx@163.com

本栏目协办

江阴天江药业有限公司

地址:江苏省江阴市经济开发区秦望山路8号 电话:400 066 9211
传真:0510-86409611 网址: <http://www.tianjiang.com>

2.1 色谱条件

色谱柱:汉邦 Benetnach C₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:0.3%磷酸溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1 ml/min;柱温:30 ℃;检测波长:203 nm^[2];进样量:10 μl。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution process

时间, min	流动相A, %	流动相B, %
0	60	40
30	40	60
40	20	80
70	3	97
110	0	100

2.2 供试品溶液的制备

取京大戟和醋京大戟饮片粉末各10 g(过40目筛),置索氏提取器内,加石油醚200 ml,水浴提取至无色,回收溶剂,残渣加甲醇溶解并转移至25 ml量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即分别得到京大戟和醋京大戟的供试品溶液。

2.3 对照品溶液的制备

取大戟二烯醇对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 ml含20 μg的溶液,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 测定 取对照品溶液10 μl,注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定,记录色谱图。大戟二烯醇对照品的HPLC图见图1。

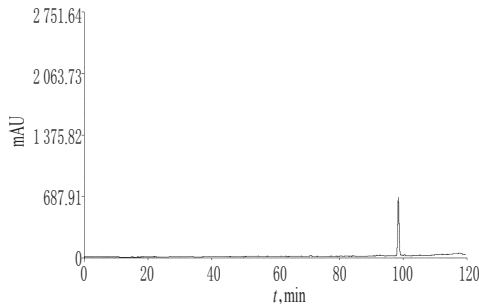


图1 大戟二烯醇对照品的HPLC图

Fig 1 HPLC chromatogram of euphadienol control

2.4.2 精密度试验 取醋京大戟1号供试品溶液10 μl,连续进样6次,以大戟二烯醇的保留时间和峰面积为参照,分别对各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积进行统计。结果表明,各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致, RSD < 3.0%,符合指纹图谱技术要求。

2.4.3 稳定性试验 取醋京大戟1号供试品溶液适量,室温下贮藏,分别于0、3、6、9、12 h按上述色谱条件进样测定,以大戟二烯醇的保留时间和峰面积为参照,分别对各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积进行统计。结果表明,各色谱峰的相对峰面积和相对保留时间基本一致, RSD < 3.0%,符合指纹图谱技术要求。

2.4.4 重复性试验 取醋京大戟1号饮片粗粉适量,共6份,分别按“2.2”项下方法制成供试品溶液,照上述色谱条件进样测定,以大戟二烯醇的保留时间和峰面积为参照,分别对各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积进行统计。结果表明,各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致, RSD < 3.0%,符合指纹图谱技术要求^[3]。

2.5 京大戟饮片的指纹图谱

2.5.1 京大戟饮片指纹图谱的建立 取京大戟饮片各供试品溶液适量,照上述色谱条件进样测定,记录色谱图。以大戟二

烯醇为参照,对各主要色谱峰的相对峰面积进行统计,结果见表2。

表2 10批京大戟饮片指纹图谱的相对峰面积

Tab 2 Relative peak areas of HPLC fingerprints of 10 batches of *E. pekinensis* decoction piece

峰号	保留时间, min	样品号									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	6.20	3.82	3.82	3.84	3.72	3.78	3.78	3.31	2.12	1.07	2.03
2	30.17	0.21	0.24	0.22	0.21	0.21	0.21	0.22	0.16	0.06	1.13
3	41.11	0.32	0.33	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.10	0.06	0.09
4	45.45	2.81	2.48	2.48	2.46	2.47	2.50	2.37	0.29	0.40	0.54
5	55.10	0.38	0.38	0.36	0.37	0.37	0.37	0.37	0.19	0.13	0.27
6	60.61	0.65	0.65	0.65	0.64	0.64	0.64	0.64	0.15	0.02	0.14
7	66.59	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.39	0.37	0.08	0.08	0.12
8	71.07	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12		0.12			
9	83.94	0.09	0.11	0.09	0.10	0.11		0.09		0.03	
10	95.54	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.21	0.06	0.05	0.08
11	97.36	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
12	98.50	2.07	2.07	2.07	2.05	2.06	2.07	2.04	1.89	1.52	1.80
13	101.74	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.13	0.05	0.15
14	105.39	0.21	0.25			0.20	0.20	0.18		0.07	0.05

2.5.2 京大戟指纹图谱共有峰的确定及指纹图谱共有模式的建立 运用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A版)”对10批京大戟指纹图谱进行相似度分析,以S1为参照图谱,经过多点校正、自动匹配,以中位数法生成对照图谱R,由匹配数据的输出结果得到共有峰共11个,分别为6.20、30.17、41.11、45.45、55.10、60.61、66.59、95.54、97.36、98.50、101.74 min处色谱峰,其中97.36 min处峰为大戟二烯醇。除上述色谱峰外,在71.07 min处,京大戟1~5、7号样品有1个共有峰;在83.94 min左右,除京大戟6、8、10号样品外,其他样品有1个共有峰;105.39 min处,除京大戟3、4和8号样品外,其他样品有1个共有峰。10批京大戟饮片的HPLC图见图2。

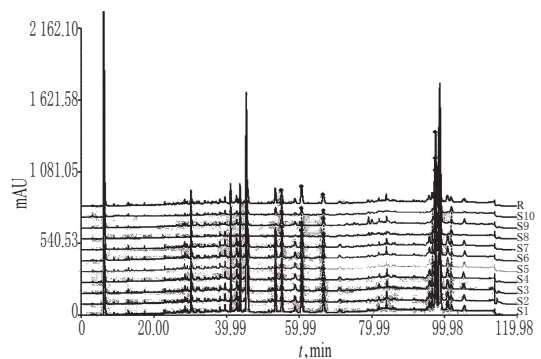


图2 10批京大戟饮片的HPLC图

R.对照图谱

Fig 2 HPLC fingerprints of 10 batches of *E. pekinensis* decoction piece

R. control chromatogram

2.5.3 指纹图谱的相似度评价 使用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A版)”进行相似度分析,结果见表3。经分析,10批京大戟饮片与相应对照图谱的相似度均>0.90,符合要求。

2.6 醋京大戟饮片的指纹图谱

2.6.1 醋京大戟饮片指纹图谱的建立 取醋京大戟饮片各供试品溶液适量,照上述色谱条件进样测定,记录色谱图。以大

戟二烯醇为参照,对各主要色谱峰的相对峰面积进行统计,结果见表4。

表3 与共有模式比较的京大戟饮片的相似度

Tab 3 Similarity degree of *E. pekinensis* decoction pieces vs. common model

相似度	样品号										对照指纹图谱
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
	0.984	0.990	0.989	0.990	0.990	0.989	0.991	0.910	0.932	0.989	1.000

表4 10批醋京大戟饮片指纹图谱的相对峰面积

Tab 4 Relative peak areas of HPLC fingerprints of 10 batches of *E. pekinensis* stir-baked with vinegar decoction piece

峰号	保留时间,min	样品号									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	6.22	2.15	2.48	1.94	2.02	1.15	2.10	2.15	2.17	0.89	1.12
2	30.18	0.04	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.08	0.06	0.08	0.08
3	42.79	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.14			0.12
4	43.77	0.10	0.10	0.07	0.10	0.10	0.10	0.35	0.09	0.08	0.41
5	45.51	0.10	0.97	0.97	0.10	1.02	0.97	2.98	0.98	0.43	2.13
6	55.08	0.20	0.21	0.21	0.21	0.21	0.20	0.32	0.18	0.14	0.29
7	58.92	0.05	0.09	0.11	0.11	0.11	0.11	0.25	0.06	0.06	0.18
8	66.69	0.10	0.11	0.09	0.11	0.11	0.09	0.38	0.10	0.09	0.31
9	81.56	0.02	0.03	0.02	0.03	0.03	0.03				
10	96.51	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.22	0.08	0.07	0.27
11	97.32	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
12	98.46	1.90	1.88	1.89	1.90	1.88	1.89	1.93	1.87	1.86	1.90
13	101.64	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.12	0.13	0.11	0.11
14	113.41					0.06	0.11				

2.6.2 醋京大戟指纹图谱共有峰的确定及指纹图谱共有模式的建立 运用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A版)”对10批醋京大戟指纹图谱进行相似度分析,以S1为参照图谱,经过多点校正、自动匹配,以中位数法生成对照图谱R,由匹配数据的输出结果得到共有峰共11个,分别为6.22、30.18、43.77、45.51、55.08、58.92、66.69、96.51、97.32、98.46、101.64 min处色谱峰,其中97.32 min处峰为大戟二烯醇。除上述色谱峰外,在42.79 min处,醋京大戟1~7、10号样品有1个共有峰;在81.56 min左右,醋京大戟1~6号样品有1个共有峰;在113.41 min处,醋京大戟5、6号样品有1个共有峰。10批醋京大戟饮片的HPLC图见图3。

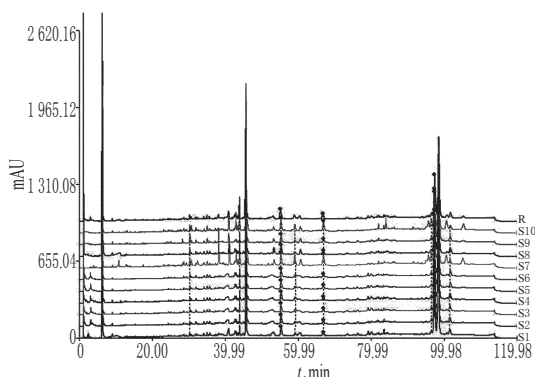


图3 10批醋京大戟饮片的HPLC图
R.对照图谱

Fig 3 HPLC fingerprints of 10 batches of *E. pekinensis* stir-baked with vinegar decoction piece
R. control chromatogram

2.6.3 指纹图谱的相似度评价 使用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A版)”进行相似度分析,结果见表5。经比较,10批醋京大戟饮片与相应对照图谱的相似度均>0.90,符合要求。

表5 与共有模式比较的醋京大戟饮片的相似度

Tab 5 Similarity degree of *E. pekinensis* stir-baked with vinegar decoction piece vs. common model

相似度	样品号										对照指纹图谱
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
	0.981	0.985	0.995	0.991	0.987	0.990	0.920	0.991	0.930	0.918	1.000

2.7 京大戟和醋京大戟指纹图谱的峰面积比较

对京大戟和相应醋制品的峰面积进行了统计,比较京大戟炮制前后峰面积的变化情况,结果见表6、表7。

表6 京大戟饮片主要色谱峰峰面积积分值

Tab 6 Main chromatographic peaks area of *E. pekinensis* decoction piece

保留时间,min	峰面积积分值									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
6.20	27 349	26 537	26 739	26 827	27 156	27 114	23 478	18 854	22 556	20 497
30.17	1 472	1 681	1 535	1 498	1 488	1 480	1 527	1 443	1 385	11 391
41.11	2 326	2 273	2 257	2 323	2 329	2 323	2 290	925	1 214	939
45.45	20 105	17 232	17 257	17 726	17 790	17 915	16 813	2 597	8 546	5 495
55.10	2 696	2 621	2 530	2 656	2 674	2 684	2 636	1 734	2 771	2 709
60.61	4 635	4 529	4 504	4 604	4 617	4 629	4 555	1 368	508	1 408
66.59	2 735	2 656	2 680	2 717	2 730	2 826	2 606	704	1 793	1 187
71.07	872	842	846	875	862		881			
83.94	642	733	628	694	771		613		658	
95.54	1 462	1 410	1 418	1 482	1 473	1 475	1 499	586	997	784
97.36	7 157	6 955	6 953	7 201	7 188	7 187	7 083	8 907	21 091	10 100
98.50	14 823	14 425	14 406	14 787	14 786	14 840	14 420	16 878	32 089	18 227
101.74	990	954	973	1 000	975	978	1 008	1 169	972	1 508
105.39	1 530	1 753			1 468	1 457	1 279		1 441	504

表7 醋京大戟饮片主要色谱峰峰面积积分值

Tab 7 Main chromatographic peaks area of *E. pekinensis* stir-baked with vinegar

保留时间,min	峰面积积分值									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
6.22	20 627	24 868	18 858	19 894	10 688	19 863	18 488	23 207	11 012	10 356
30.18	376	280	356	380	374	372	738	612	1 030	709
42.79	423	386	386	394	379	370	1 182			1 068
43.77	972	996	673	986	955	932	3 014	1 012	1 004	3 809
45.51	9 497	9 724	9 454	9 726	9 513	9 205	25 610	10 499	5 359	19 655
55.08	1 960	2 067	2 008	2 064	1 965	1 922	2 719	1 938	1 779	2 684
58.92	524	947	1 054	1 067	1 038	1 002	2 188	628	687	1 674
66.69	983	1 081	840	1 074	1 035	818	3 264	1 106	1 086	2 862
81.56	216	268	217	289	276	252				
96.51	758	793	780	792	744	754	1 936	837	897	2 524
97.32	9 599	10 016	9 715	9 843	9 309	9 452	8 608	10 701	12 413	9 212
98.46	18 218	18 799	18 367	18 600	17 546	17 866	16 652	20 051	23 137	17 492
101.64	1 348	1 357	1 370	1 373	1 276	1 317	1 017	1 404	1 361	1 055
113.41					582	1 003				

由表6、表7可以看出,京大戟和醋京大戟在6.22、30.182、45.508、55.08、66.693、97.32、98.46和101.64 min处有8个共有色谱峰,其中在6.22、30.182、45.508、55.08和66.693 min处色谱峰峰面积醋制后下降,说明极性相对较大的成分醋制后含量会下降。另外,在97.32、98.46和101.64 min处的色谱峰峰

HPLC法测定注射用黄芩苷原料中黄芩苷及其有关物质的含量^Δ

沈 蒙*,段天璇#,林宏英,孙毅坤,于继平(北京中医药大学,北京 100102)

中图分类号 R283;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)39-3694-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.39.15

摘要 目的:建立测定注射用黄芩苷原料中黄芩苷及其有关物质含量的方法。方法:以高效液相色谱法测定注射用黄芩苷原料中黄芩苷及其有关物质千层纸素A-7-O-葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷的含量,并以不加校正因子的主成分自身对照法计算总杂质的含量。色谱柱为Agilent ZORBAX SB-C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,柱温为30 ℃,检测波长为274 nm。结果:黄芩苷、千层纸素A-7-O-葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷的质量浓度分别在50.00~300.00、0.21~6.57、0.16~0.80 μg/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 9、0.999 3、0.999 3);平均加样回收率分别为99.16%、100.69%、99.18%,RSD分别为1.2%、2.4%、4.6%(*n*均为9)。黄芩苷与有关物质分离良好,千层纸素A-7-O-葡萄糖醛酸苷与汉黄芩苷的检出限分别为0.43、0.64 ng。结论:该方法专属性强,结果准确、可靠,可用于注射用黄芩苷原料中黄芩苷及其有关物质的含量测定。

关键词 高效液相色谱法;注射用黄芩苷原料;有关物质;含量测定

Content Determination of Baicalin and Its Related Substances in Baicalin for Injection by HPLC

SHEN Meng, DUAN Tian-xuan, LIN Hong-ying, SUN Yi-kun, YU Ji-ping (Beijing University of TCM, Beijing 100102, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of baicalin and related substances in Baicalin for injection. METHODS: The contents of baicalin and related substance, such as oroxylin A 7-O-glucuronide, wogonoside, were determined by HPLC. The contents of the total impurities were computed by main constituent self-control method without calibration factor. The separation was performed on Agilent ZORBAX SB-C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm) column with mobile phase consisted of methanol-0.1% phosphoric acid solution (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was 30 ℃ and the detection wavelength was set at 274 nm. RESULTS: The linear ranges of baicalin, oroxylin A 7-O-glucuronide and wogonoside were 50.00-300.00 μg/ml(*r*=0.999 9), 0.21-6.57 μg/ml(*r*=0.999 3) and 0.16-0.80 μg/ml(*r*=0.999 3). Average recovery rates were 99.16% (RSD=1.2%, *n*=9), 100.69% (RSD=2.4%, *n*=9) and 99.18% (RSD=4.6%, *n*=9). Baicalin was separated from related substance well. The detection limits of oroxylin A 7-O-glucuronide and wogonoside were 0.43, 0.64 ng. CONCLUSIONS: The method is specific, accurate and reliable, and it can be used for the content determination of baicalin and related substance in baicalin for injection.

KEY WORDS HPLC; Baicalin for injection; Related substance; Content determination

面积醋制后增加。

3 讨论

本试验采用的是10批不同产地的京大戟和醋京大戟样品,可得两种样品中分别有11个共有峰,并且京大戟和醋京大戟之间有8个共有峰;京大戟炮制前后色谱图基本一致,说明京大戟和醋京大戟中群体成分较一致,醋制对京大戟化学成分有一定的影响,但影响不大。

本试验以京大戟所含成分大戟二烯醇作为参照物,建立了京大戟和醋京大戟HPLC指纹图谱检测标准。该方法操作简便、重复性好,为有效地控制京大戟和醋京大戟的内在质量提供了科学依据,并且可比较京大戟醋制前后化学成分的变化,为京大戟醋制解毒机制研究奠定了基础。

京大戟醋制后极性相对较大的成分含量有所降低,极性

相对较小的成分如三萜类的大戟二烯醇峰面积增加,说明京大戟醋制过程中,在酸性和加热条件下,大戟二烯醇立体结构发生了变化,极性改变,易于溶出。文献报道大戟二烯醇为京大戟的药效成分^[4],醋制后大戟二烯醇的含量增加,推断与京大戟醋制后毒性药效作用的变化相关。

参考文献

- [1] 张乐林.京大戟炮制原理初步研究[D].济南:山东中医药大学,2011.
- [2] 苏本正,周倩,孙立立.甘草饮片乙酸乙酯提取部位HPLC指纹图谱研究[J].中成药,2011,33(2):203.
- [3] 傅勇,肖武,李达,等.远志与厚朴不同配比水煎液的HPLC指纹图谱比较研究[J].中国药房,2012,23(43):4 072.
- [4] Akihisa T, Kithsiri WEM, Tokuda H, et al. Eupha- 7, 9 (11), 24-trien-3β-ol. ("AntiquolC") and other triterpenes from euphorbia antiquorum latex and their inhibitory effects on epstein-barr virus activation[J]. *J Nat Prod*, 2002, 65(2), 158.

(收稿日期:2012-10-16 修回日期:2013-01-18)

^Δ 基金项目:国家“重大新药创制”科技重大专项课题(No. 2010ZX09102)

* 硕士研究生。研究方向:中药分析。E-mail:shme44@sohu.com

通信作者:副教授,硕士研究生导师,硕士。研究方向:中药分析。电话:010-84738618。E-mail:duantx@sina.com