

地榆药材的TLC鉴别和HPLC指纹图谱研究

郑夏生^{1*}, 黄颖², 徐晖^{1#}, 詹若挺¹, 陈蔚文¹(1.广州中医药大学中药资源科学与工程研究中心/岭南中药资源教育部重点实验室, 广州 510006; 2.广州中医药大学中药学院, 广州 510006)

中图分类号 R284.1; R282.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)27-2547-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.27.17

摘要 目的: 为全面评价和有效控制地榆药材质量提供依据。方法: 参照2010年版《中国药典》(一部)方法对地榆药材进行薄层色谱(TLC)鉴别, 以甲苯-乙酸乙酯-甲酸(6:3:2, V/V/V)为展开剂, 于254 nm紫外光灯下检视。建立地榆药材的高效液相色谱指纹图谱: 色谱柱为Phenomenex Synergi Fusion C₁₈(250 mm×4.6 mm, 4 μm), 柱温为25 ℃, 流动相为甲醇-0.05%磷酸溶液(梯度洗脱), 流速为1 ml/min, 检测波长为277 nm。利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 A版)软件对14批药材进行相似度评价。结果: TLC图中存在品种差异特征斑点, HPLC指纹图谱相似度为0.54~0.98; 两种方法的试验结果均表明14批样品的来源较为复杂, 包括了2个以上不同品种。结论: 所建方法可用于全面评价地榆药材的质量。

关键词 地榆; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 指纹图谱

Study on TLC Identification and HPLC Fingerprint of *Sanguisorbae Radix*

ZHENG Xia-sheng¹, HUANG Ying², XU Hui¹, ZHAN Ruo-ting¹, CHEN Wei-wen¹(1. Research Center of Chinese Herbal Resource Science and Engineering, Guangzhou University of TCM/Key Lab of Chinese Medicinal Resource from Lingnan, Ministry of Education, Guangzhou 510006, China; 2. School of TCM, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To provide the basis for a comprehensive evaluation and effective control for quality evaluation of *Sanguisorbae Radix*. METHODS: According to the method for first part of *Chinese Pharmacopoeia* (2010 edition), TLC was adopted to identify *Sanguisorbae Radix* under UV lamp at 254 nm, using methylbenzene-ethyl acetate-formic acid (6:3:2, V/V/V) as developing solvent. HPLC method was adopted for the determination of *Sanguisorbae Radix*: Phenomenex Synergi Fusion C₁₈(250 mm×4.6 mm, 4 μm) column was used with mobile phase consisted of methanol-0.05% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 1 ml/min. The detection wavelength was set at 277 nm. The similarity of 14 batches of samples was evaluated by using *Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM* (version 2004 A). RESULTS: TLC spots of type difference characteristics were found. The similarity of HPLC chromatograms were 0.54-0.98. Results of two methods indicated complex sources of 14 batches of samples, including 2 types or above. CONCLUSIONS: Established method can be used for comprehensive quality evaluation of *Sanguisorbae Radix*.

KEYWORDS *Sanguisorbae Radix*; TLC; HPLC; Fingerprint

地榆为临床常用中药材, 具有凉血止血、解毒敛疮之功效。2010年版《中国药典》(一部) 记载本品为蔷薇科植物地榆 *Sanguisorba officinalis* L. 或长叶地榆 *S. officinalis* L. var. *longifolia* (Bert.) Yü et Li 的干燥根^[1]。但是, 民间地榆的来源非常复杂, 不同地区有使用或误用不同地榆变种的情况^[2]。因此, 针对市售地榆药材内在质量的比较研究是非常必要的。2010年版《中国药典》“地榆”项下规定了鞣质的总含量和没食子酸的含量, 文献报道也多以没食子酸的含量测定来评价地榆的质量^[3-4]。但是, 除了鞣质, 地榆尚含有多种药用化学成分, 如皂苷类和黄酮类化合物等^[5-7], 故单纯以鞣质及其水解产物没食子酸的含量不足以全面反映地榆的内在质量。本试验建立了地榆药材的薄层色谱(TLC)鉴别法和高效液相色谱(HPLC)指纹图谱, 分析了13批不同产地的样品, 旨在为全面评价和有效控制地榆药材的质量提供更多的科学数据。

* 博士研究生。研究方向: 创新中药研发。E-mail: zheng.x.s.1987@163.com

通信作者: 研究员, 博士研究生导师。研究方向: 中药质量评价新技术。E-mail: zyfxsherry@gzucm.edu.cn

1 材料

1.1 仪器

TLC 成像仪(瑞士 CAMAG 公司); Ultimate3000 型 HPLC 系统(美国 Dionex 公司); KQ-700DE 型超声仪(昆山市超声仪器有限公司); HWS26 型电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司); Milli-Q 型超纯水仪(德国 Merck 公司)。

1.2 试剂

地榆对照药材(批号: 121286-200402)和没食子酸对照品(纯度: 98%, 批号: 110831-201204)均购自广东省食品药品检验所; 硅胶 GF₂₅₄ 预制薄层板(德国 Merck 公司, 规格: 10 cm×20 cm); 乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

1.3 药材

13 批地榆药材分别收集自不同产地的药材供应商、药材公司、医院药房等, 经广州中医药大学中药学院中药鉴定教研室童家贇讲师鉴定为真品。13 批样品药材的来源见表 1。

2 方法与结果

2.1 TLC 鉴别

称取没食子酸对照品适量, 精密称定, 用甲醇溶解配制成

表1 13批样品药材的来源

Tab 1 Sources of 13 batches of Sanguisorbae Radix

编号	收集时间	产地	编号	收集时间	产地
1	2012-09-18	对照药材	8	2012-08-23	江苏
2	2012-08-10	江西	9	2012-08-10	江苏
3	2012-08-10	四川	10	2012-09-02	安徽
4	2012-08-11	黑龙江	11	2012-08-10	江苏
5	2012-08-22	广东	12	2012-08-10	江苏
6	2012-08-10	陕西	13	2012-08-20	河北
7	2012-08-21	黑龙江	14	2012-08-06	甘肃

质量浓度为5.09 mg/ml的对照品溶液(使用前过0.22 μm微孔滤膜)。取1~14号地榆药材,经60 °C干燥过夜,粉碎,过二号筛,取粉末1.0 g,置具塞锥形瓶中,加含10%盐酸的50%甲醇溶液,加热回流2 h,放冷,滤过,滤液用以盐酸饱和的乙醚萃取2次,每次25 ml,合并乙醚液,挥干,残渣加甲醇溶解使成2 ml,作为供试品溶液。吸取上述溶液各5 μl,条状点样于同一块GF₂₅₄薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯-甲酸(6:3:2, V/V/V)为展开剂,展开(展距8 cm),取出,挥干,于254 nm紫外光灯下检视,获得地榆的TLC图(见图1)。结果可得,没食子酸对照品的R_f值为0.35,各样品在相应的位置均可见相同的斑点。在R_f值0.44以上,各样品有较大的区别。样品2~10号的斑点信息与1号(对照药材)相比基本一致,而11~14号则与1号(对照药材)有一定的差异,主要体现在R_f值0.56、0.60、0.63、0.69处有明显差异的斑点。由此直观判断14批地榆药材应来源于2个以上的不同品种。

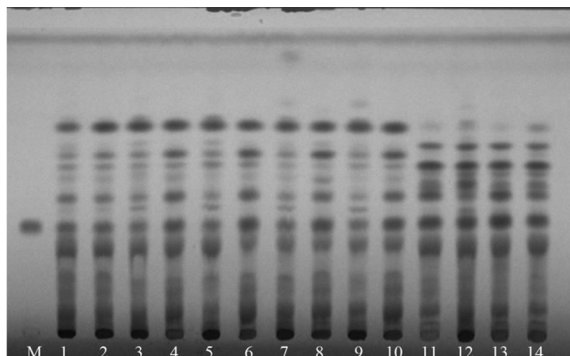


图1 地榆药材的TLC图

M. 没食子酸对照品; 1~14. 地榆药材

Fig 1 TLC of Sanguisorbae Radix

M. gallic acid control; 1-14. Sanguisorbae Radix

2.2 HPLC 指纹图谱研究

2.2.1 供试品溶液的制备 取样品粉末0.2 g,精密称定,置100 ml锥形瓶中,加入25 ml 50%甲醇,称定质量,超声提取(功率:280 W,频率:40 kHz)30 min,取出,放冷,再次称定质量,用50%甲醇补足损失的质量,滤过,滤液于60 °C水浴锅中蒸干,残渣用甲醇溶解并定容至2 ml量瓶中,过0.22 μm微孔滤膜,即得。

2.2.2 色谱条件 色谱柱:Phenomenex Synergi Fusion C₁₈ (250 mm×4.6 mm,4 μm);柱温:25 °C;流动相:甲醇(A)-0.05%磷酸溶液(B),梯度洗脱(洗脱程序见表2);流速:1 ml/min;检测波长:277 nm;进样量:10 μl。

表2 流动相梯度洗脱程序

Tab 2 Gradient procedure of mobile phase

时间,min	A, %	B, %
0	5	95
15	30	70
30	45	55
40	60	40
50	85	15
55	85	15

2.2.3 参照峰的确立 取没食子酸对照品溶液和各供试品溶液适量,按上述色谱条件进样分析,记录色谱图(见图2),选择出峰稳定、分离度较好的11个峰为共有指纹峰。通过与对照品比对,确定其中第3号峰为没食子酸(见图3)。

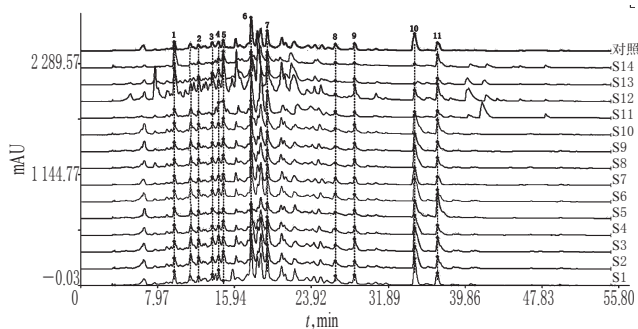


图2 HPLC 指纹图谱

Fig 2 HPLC fingerprints

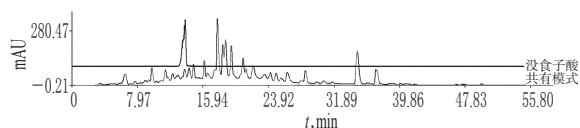


图3 没食子酸对照品和地榆药材的HPLC 指纹图谱共有模式

Fig 3 Common mode of HPLC fingerprints of gallic acid control and Sanguisorbae Radix

2.2.4 方法学考察 (1)精密度试验:取供试品溶液(7号)适量,按上述色谱条件连续进样测定6次,得各共有峰相对保留时间的RSD为0.02%~0.32%,相对峰面积的RSD为0.07%~2.69%,表明本方法精密度良好,符合HPLC指纹图谱技术要求。(2)重复性试验:取同一批样品(6号)粉末适量,共6份,分别按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,得各共有峰相对保留时间的RSD为0.21%~0.66%,相对峰面积的RSD为0.31%~1.91%,表明本方法重复性良好,符合HPLC指纹图谱技术要求。(3)稳定性试验:取同一供试品(6号)溶液适量,分别于0、4、8、12、18、24 h按上述色谱条件进样测定,得各共有峰相对保留时间的RSD为0.11%~0.34%,相对峰面积的RSD为0.25%~0.81%,表明供试品溶液在24 h内稳定,符合HPLC指纹图谱技术要求。

2.2.5 地榆药材HPLC指纹图谱的建立与分析 将14批地榆药材的HPLC数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 A版)进行分析,以1号药材为参照,经过多点校正,生成指纹图谱共有模式(见图3),并计算14批地榆药材与共有模式的相似度(见表3)。由表3可知,11~14号样品药材的相似度

均 ≤ 0.60 ,显著低于其他样品,可与其他样品区分开来。再以保留时间居中的6号峰为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,详见表4、表5。

表3 14批地榆药材的相似度

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
1	0.83	6	0.77	11	0.54
2	0.77	7	0.94	12	0.57
3	0.95	8	0.98	13	0.60
4	0.98	9	0.98	14	0.56
5	0.88	10	0.96		

表4 14批地榆药材的相对保留时间

Tab 4 Relative reserve time of 14 batches of Sanguisorbae Radix

编号	P1	P2	P3	P4	P5	P6(S)	P7	P8	P9	P10	P11
1	0.50	0.63	0.74	0.76	0.91	1.00	0.71	1.36	1.46	1.78	1.92
2	0.50	0.63	0.74	0.76	0.91	1.00	0.71	1.36	1.46	1.78	1.90
3	0.50	0.63	0.74	0.76	0.91	1.00	0.71	1.33	1.47	1.79	1.91
4	0.50	0.63	0.74	0.76	0.91	1.00	0.71	1.37	1.47	1.78	1.91
5	0.50	0.63	0.73	0.76	0.91	1.00	0.71	1.38	1.47	1.80	1.92
6	0.50	0.63	0.74	0.76	0.91	1.00	0.71	1.36	1.47	1.78	1.91
7	0.50	0.63	0.74	0.76	0.91	1.00	0.71	1.35	1.47	1.79	1.91
8	0.50	0.63	0.74	0.76	0.91	1.00	0.71	1.38	1.47	1.78	1.91
9	0.50	0.63	0.74	0.76	0.91	1.00	0.71	1.31	1.47	1.79	1.92
10	0.50	0.63	0.74	0.76	0.91	1.00	0.71	1.37	1.47	1.79	1.92
11	0.50	0.63	0.74	0.76	0.91	1.00	0.71	1.35	1.47	1.79	1.91
12	0.50	0.63	0.73	0.76	0.91	1.00	0.71	1.36	1.47	1.79	1.91
13	0.50	0.63	0.74	0.76	0.91	1.00	0.71	1.30	1.47	1.80	1.92
14	0.50	0.63	0.74	0.76	0.91	1.00	0.71	1.35	1.47	1.79	1.91
\bar{x}	0.50	0.63	0.74	0.76	0.91	1.00	0.71	1.35	1.47	1.79	1.91
RSD, %	0.09	0.19	0.46	0.04	0.05	0	0.22	1.76	0.25	0.31	0.27

表5 14批地榆药材的相对峰面积

Tab 5 Relative peak areas of 14 batches of Sanguisorbae Radix

编号	P1	P2	P3	P4	P5	P6(S)	P7	P8	P9	P10	P11
1	1.01	0.30	0.39	0.66	1.30	1.00	0.23	0.48	0.30	2.21	0.89
2	0.65	0.24	0.38	0.50	1.08	1.00	0.24	0.31	0.43	1.55	0.73
3	0.63	0.20	0.45	0.29	1.69	1.00	0.31	0.27	0.43	0.97	0.74
4	0.55	0.30	0.39	0.73	1.64	1.00	0.27	0.38	0.59	2.00	1.06
5	0.80	0.25	0.25	0.68	0.52	1.00	0.36	0.43	0.38	2.45	3.00
6	1.01	0.30	0.39	0.66	1.30	1.00	0.22	0.47	0.29	2.21	0.89
7	0.70	0.17	0.30	0.51	1.88	1.00	0.20	0.40	0.47	1.38	0.65
8	0.88	0.29	0.36	0.71	1.71	1.00	0.27	0.41	0.40	2.08	1.11
9	0.70	0.20	0.26	0.54	1.75	1.00	0.29	0.41	0.41	1.69	0.74
10	0.56	0.20	0.46	0.77	1.59	1.00	0.38	0.55	0.41	2.46	1.47
11	0.40	0.20	0.25	0.80	1.39	1.00	0.20	0.15	0.31	0.08	0.43
12	0.53	0.34	0.28	1.26	1.47	1.00	0.63	0.10	0.55	0.40	0.73
13	0.71	0.20	0.25	0.73	0.75	1.00	0.34	0.49	0.25	0.50	1.55
14	0.45	0.18	0.46	0.71	1.52	1.00	0.29	0.13	0.25	0.23	0.67
\bar{x}	0.68	0.24	0.35	0.68	1.40	1.00	0.30	0.36	0.39	1.44	1.05
RSD, %	27.49	23.25	22.95	31.33	27.86	0	36.97	40.27	26.30	59.26	61.33

2.3 聚类分析

将14批地榆药材的相对峰面积导入SPSS 16.0统计软件中作R型聚类分析,采用最短距离法(Nearest neighbor),以欧氏距离(Euclidean distance)为测度,对14批药材进行聚类分析(见图4)。结果表明,14批药材可大致分为4类,而11~14号

药材聚为一类,与其他样品相区别,这与上述试验结果相符。

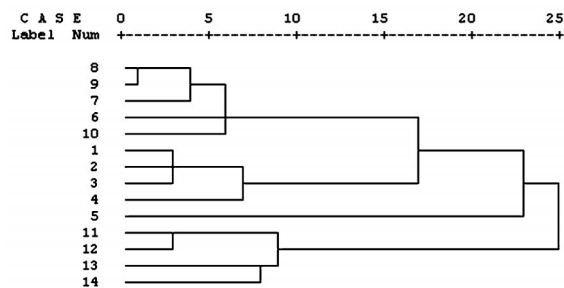


图4 14批地榆药材的聚类分析图

Fig 4 Cluster analysis diagram of 14 batches of Sanguisorbae Radix

3 讨论

地榆是一种常用中药材,而我国不同地区用作地榆的品种却存在一定的差异。有学者从全国15个地榆药材主产区采回22批样品,经鉴定发现其中除了《中国药典》规定入药的2个品种外,还有6个其他地榆属植物和2个近缘混淆品种^[9]。本试验采用的样品虽然经传统方法鉴定为真品,然而无法明确品种;TLC和HPLC试验结果表明14批药材应来源于2个以上的不同物种,具体的物种鉴定尚需利用DNA条形码等分子鉴定技术。

复杂的基原不利于药材的质量管理与控制,中药指纹图谱技术可以从化学成分的角度较好地反映药材的内在质量,在中药材的品种鉴定和质量控制方面体现出很好的实用性^[9]。有学者比较了不同品种地榆中皂苷类成分和黄酮类成分的HPLC指纹图谱,发现利用黄酮类成分的HPLC指纹图谱可以反映种属间的差别^[10]。本试验利用对鞣质、皂苷和黄酮苷等溶解度均较好的50%甲醇作为提取溶剂,选择出峰较多的277 nm为检测波长,可以较为全面地反映药材的化学成分信息。

本试验考察了90 min内5%~100%乙腈作为流动相的洗脱结果,发现供试品溶液中多为极性较大的化合物,故在保证各色谱峰得到较好分离度的前提下,将洗脱时间压缩为55 min,大大节省了样品检测时间。TLC鉴别在《中国药典》提取方法^[1]的基础上,调整了展开剂比例,删除了FeCl₃显色的步骤,简化了操作。

综上所述,本试验建立的TLC鉴别和HPLC指纹图谱方法可用于全面评价地榆药材的质量。

(致谢:本试验中部分批次的地榆样品由河北省安国市新东方药业有限公司肖耀伟经理和江苏省句容市天王镇金五鑫中药材种植专业合作社汪兵经理赠予,在此表示衷心感谢!)

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, 2010:117.
- [2] 彭诚. 地榆总鞣质提取、纯化及活性研究[D]. 长春:吉林大学, 2012.
- [3] 康雨彤, 贺金华, 毛艳, 等. 正交试验优选芩榆烧伤凝胶中黄芩、关黄柏、地榆的提取工艺[J]. 中国药房, 2013, 24

桑不同药用部位中黄酮类成分的定量检测

杨晶*,刘嘉琪,王宝昌,史丽颖,唐玲,王永奇[#](大连大学药物研究所,辽宁大连 116622)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)27-2550-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.27.18

摘要 目的:测定桑叶、桑椹、桑枝、桑白皮中总黄酮的含量。方法:以桑辛素为对照品,采用分光光度法测定桑叶、桑椹、桑枝、桑白皮95%乙醇提取物及乙醇提取后水提取物中总黄酮的含量。结果:桑辛素的质量浓度在0.025~0.050 mg/ml范围内与吸光度呈良好的线性关系($r=0.9998$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<1%。桑叶、桑椹、桑枝、桑白皮95%乙醇提取物中总黄酮的质量分数分别为13.60%、7.19%、10.53%、18.38%,乙醇提取后水提取物中总黄酮的质量分数分别为0.26%、0.60%、0.40%、0.01%。结论:桑白皮中黄酮类成分质量分数最高,有效部分为乙醇提取物。

关键词 桑;不同部位;总黄酮;含量测定;桑辛素;桑白皮

Quantitative Analysis of Flavonoids in Different Medicinal Parts of *Morus alba*

YANG Jing, LIU Jia-qi, WANG Bao-chang, SHI Li-ying, TANG Ling, WANG Yong-qi (Institute of Materia Medica, Dalian University, Liaoning Dalian 116622, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To determine the contents of total flavonoids in leaves, fruit, branch and root bark of *Morus alba*. METHODS: With moracin as substance control, the contents of total flavonoids in 95% ethanol extract, water extract after ethanol extraction from the leaves, fruit, branch and root bark of *M. alba* were measured by spectrophotometry. RESULTS: The linear range of moracin were 0.025-0.050 mg/ml ($r=0.9998$). RSD of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 1%. The mass fraction of total flavonoids in 95% ethanol extract from the leaves, fruit, branch and root bark of *M. alba* were 13.60%, 7.19%, 10.53% and 18.38%. The mass fraction of total flavonoids in water extract after ethanol extraction from the leaves, fruit, branch and root bark of *M. alba* were 0.26%, 0.60%, 0.40% and 0.01%. CONCLUSIONS: The content of total flavonoids in root bark of *M. alba* is the highest, ethanol extract of it is effective.

KEYWORDS *Morus alba*; Different parts; Total flavonoids; Content determination; Moracin; Root bark of *M. alba*

桑 *Morus alba* L.系桑科植物,其药用可追溯到《神农本草经》,为历代本草及历版《中国药典》所收载^[1-3]。桑的药用部位为叶、果实、枝条和根皮,分别称为桑叶、桑椹、桑枝、桑白皮。近年来,对桑药理及应用的报道渐多^[4]。桑的药用部位及提取物有降血糖、降血脂、降血压、抗肿瘤、抗炎、抗病毒、抑菌及抑制心脑血管疾病等作用,其主要有效成分为黄酮、生物碱、味噌及香豆素。其中,黄酮类成分具有显著的降血压作用^[4]。到目前为止,尚未见有关黄酮类成分在这四大药用部位中分布

的报道。本研究以桑辛素(桑根素, Morusin)为对照品,采用分光光度法测定桑叶、桑椹、桑枝、桑白皮95%乙醇提取物及乙醇提取后水提取物中总黄酮的含量,以期为更好地开发利用桑的不同药用部位提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

Unico7200可见分光光度计、UV-2102C型紫外-可见分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司];Laborata 4000型旋转蒸

(27):2532.

- [4] 陈新玉,李健和,黎银波,等.地榆、地榆片、地榆炭的质量标准研究[J].中国医药导报,2011,8(17):64.
- [5] 曹爱民,张东方,沙明,等.地榆中皂苷类化合物分离、鉴定及其含量测定[J].中草药,2003,34(5):397.
- [6] 程东亮,曹小平,邹佩秀,等.中药地榆黄酮等成分的分离与鉴定[J].中草药,1995,26(11):570.

- [7] 于蓓蓓,钟方晓,董学.地榆化学成分研究进展[J].中国中医药信息杂志,2009,16(S1):103.
- [8] 竺叶青,施大文,李自力,等.中药地榆的药源调查及商品鉴定[J].上海医科大学学报,1995,22(1):62.
- [9] 谢培山.中药色谱指纹图谱鉴别的概念、属性、技术与应用[J].中国中药杂志,2001,26(10):653.
- [10] 沙明,张东方,孟宪生,等.DNA指纹谱与HPLC指纹谱对中药地榆质量评价研究[J].中国药学杂志,2002,37(11):15.

* 硕士研究生。研究方向:天然活性物质。电话:0411-87403834。E-mail: dldxyjing@126.com

[#]通信作者:教授,博士。研究方向:天然活性物质。电话:0411-87403834。E-mail: dalianwyq@163.com

(收稿日期:2013-07-25 修回日期:2013-09-22)