

火炭母药材 HPLC 指纹图谱研究

王金香

(广东食品药品职业学院, 广州 510520)

[摘要] 目的:建立火炭母药材的 HPLC 指纹图谱分析方法,为火炭母药材质量评价提供参考依据。方法:色谱柱 Platisil ODS C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.05% 磷酸溶液, 梯度洗脱进行色谱分离; 洗脱时间 60 min, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 360 nm。结果:确定 17 个共有色谱峰为特征峰构成火炭母药材 HPLC 指纹图谱, 相似度评价结果表明, 各产地火炭母药材相似度均在 0.90 以上。结论:所用方法准确可靠, 所得指纹图谱共有模式可作为火炭母药材质量控制的依据。

[关键词] 火炭母; 高效液相色谱; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)15-0096-03

Study on HPLC-Fingerprint of *Polygonum chinense* L.

WANG Jin-xiang

(Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the HPLC fingerprint analysis methods for *Polygonum chinense* L and to provide the reference for quality evaluation of *Polygonum chinense* L. **Method:** Chromatographic separation was performed on a Platisil ODS C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.05% phosphoric acid as a mobile phase in gradient elution for 60min. The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹, detected at wavelength of 360 nm. **Result:** Seventeen chromatographic peaks were determined for characteristic peak constituted a HPLC fingerprint of *P. chinense*. Similarity evaluation results showed that all *P. chinense* were above 0.90 in similarity. **Conclusion:** The method is accurate and reliable; the fingerprints can be used for *P. chinense* quality control.

[Key words] *Polygonum chinense* L.; HPLC, fingerprint

中药火炭母为蓼科植物火炭母草 (*Polygonum chinense* L.) 的地上部分, 在广东地区应用广泛, 本品性酸、甘、寒, 归肝、脾经, 具有清热利湿、凉血解毒、平肝明目、活血舒筋等功效, 用于痢疾, 泄泻, 咽喉肿痛, 肺热咳嗽, 肝炎等, 是常用的民间药。现代药理研究表明, 火炭母具有抗菌、抗病毒、降压及抑制中枢神经的作用, 治疗肠炎有较好的疗效^[1]。火炭母主要化学成分槲皮素、木犀草素和丁香酸等^[2]。有文献报道对其槲皮素含量进行测定^[3], 但未有对

其指纹图谱研究的报道, 本实验通过采用高效液相色谱法, 以槲皮素为对照品, 建立了广东地区 12 批火炭母药材的指纹图谱, 为火炭母药材的质量控制提供依据。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪 (美国 Agilent 1100, 配有 DAD), Sartorius BP211D 型电子天平 (0.01 mg), 色谱柱 Platisil ODS C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。乙腈 (色谱纯), 超纯水 (自制); 其他试剂均为分析纯。槲皮素对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 100081-200406)。12 批火炭母药材产地见表 1。

药材经广东省中药研究所汪小根教授鉴定为火炭母草 *P. chinense*。

[收稿日期] 20110128(001)
[第一作者] 王金香, 硕士, 副教授, 研究方向: 药学质量标准与药学专业教学、药学研究与管理, Tel: 020-28854915, E-mail: wangjx@gdzy. edu. cn

表 1 火炭母药材来源

No.	样品来源	采集时间	No.	样品来源	采集时间
S ₁	广州龙洞	2010-07	S ₇	广东德庆	2010-07
S ₂	广州从化	2010-07	S ₈	广东肇庆	2010-07
S ₃	广东佛冈	2010-05	S ₉	广东阳春	2010-06
S ₄	广东清远	2010-05	S ₁₀	广东普宁	2010-06
S ₅	广东博罗	2010-06	S ₁₁	广东曲江	市售
S ₆	广东连州	2010-07	S ₁₂	广东翁源	市售

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Platisil ODS C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。流动相乙腈(A)-0.05% 磷酸溶液(B)梯度洗脱:0 ~ 10 min 15% A, 10 ~ 20 min 15% ~ 25% A, 20 ~ 30 min 25% ~ 40% A, 30 ~ 40 min 40% ~ 50% A, 40 ~ 50 min 50% ~ 5% A, 50 ~ 60 min 5% A。记录时间 60 min。体积流量 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25 ℃;检测波长 360 nm;进样体积 10 μL。

2.2 溶液的制备 精密称取槲皮素对照品 2.8 mg,加甲醇溶解定容于 10 mL 量瓶中,制成每 1 mL 中含槲皮素 0.28 mg 溶液作为对照品溶液。称取火炭母药材粉末 5 g (粗粉),加 60% 乙醇 40 mL 回流 1.5 h 共 2 次,放冷,滤过,合并滤液蒸干,残渣用甲醇溶解并定容于 10 mL 量瓶中。临用前过 0.45 μm 微孔滤膜滤过,作为供试品溶液。

2.3 专性试验 精密吸取供试品溶液 10 μL 注入高效液相色谱仪,记录 70 min 色谱图,发现 50 min 后无色谱峰,故把分析时间定为 60 min。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取 S₁ 供试品溶液,连续进样 6 次,分别对共有峰的相对保留时间和相对峰面积进行考察。结果表明,各共有峰的相对保留时间 RSD < 0.4%;相对峰面积 RSD < 2.0%,符合指纹图谱分析要求。

2.4.2 稳定性试验 取 S₁ 供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 12 h 进样分析,考察共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明,各共有峰相对保留时间 RSD < 0.4%,相对峰面积 RSD < 2.0%,表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.4.3 重复性试验 取 S₁ 供试品药材粉末 5 份,按已确定指纹图谱方法制备供试品溶液,分别对共有峰的相对保留时间和相对峰面积进行考察。结果表明,各共有峰相对保留时间 RSD < 0.4%,相对峰

面积 RSD < 2.0%,符合指纹图谱分析要求。

2.4.4 指纹图谱建立及相似度分析 取不同产地的火炭母药材,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,各取 10 μL 分别进样,按 2.1 的色谱条件进行 HPLC 分析,建立指纹图谱。以峰 12 为内参比峰标示出火炭母的 HPLC 指纹图谱中 17 个共有峰作为构成指纹图谱稳定的特征峰,同时将所得到的色谱图数据导入指纹图谱评价系统,进行色谱峰匹配,建立火炭母指纹图谱共有模式,并计算相似度。按上述色谱条件分别将 12 批供试品进样分析,记录色谱图(图 1)。经统计共有峰面积占总峰面积百分比为 90% ~ 95%,非共有峰面积与总峰面积的百分比为 < 10%。符合指纹图谱研究的非共有峰占总峰面积百分比 < 10% 的技术要求。

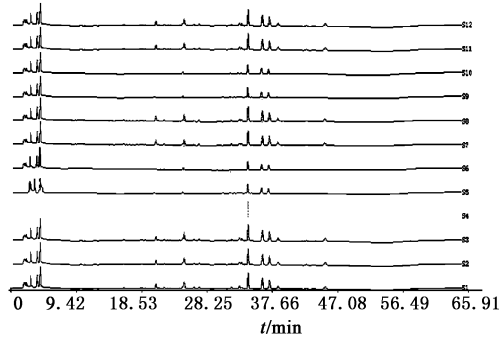


图 1 12 批火炭母药材指纹图谱

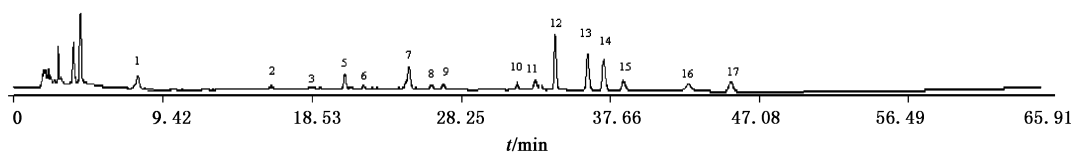
将 12 批药材图谱数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件,自动匹配后生成对照图谱,以此作为火炭母药材的对照指纹图谱,进行相似度评价,其计算结果见表 2,生成的共有模式对照指纹图谱见图 2。12 批样品的相似度计算结果均 > 0.9,说明各产地的药材有较好的一致性。

表 2 相似度分析

No.	相似度	No.	相似度
S ₁	0.964	S ₇	0.973
S ₂	0.951	S ₈	0.954
S ₃	0.992	S ₉	0.995
S ₄	0.927	S ₁₀	0.915
S ₅	0.916	S ₁₁	0.982
S ₆	0.922	S ₁₂	0.921

3 讨论

3.1 波长的选择 采用 DAD 全波长扫描,并采集其三维色谱图,通过综合考虑该三维色谱图在所有波长下出峰的多少,和各成分的分离情况以及各色



12. 槲皮素

图 2 火炭母药材共有模式

谱峰的丰度,最后选定检测波长为 360 nm。

3.2 流动相的确定 选择了 3 种流动相系统及其不同流动相比比例进行比较,包括甲醇-水、乙腈-水以及乙腈-0.05% 磷酸。结果表明,各种流动相中以乙腈-0.05% 磷酸系统为最佳,其图谱上各个色谱峰的分度度较好,保留时间适中,因此选此流动相系统作为火炭母 HPLC 指纹图谱检测的流动相。

3.3 色谱柱的考察 选择了 3 种不同填料、规格及厂家的色谱柱进行比较,包括 Platisil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Shim-pack VP ODS (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 以及 Agilent Zorbax SB (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。结果表明,各种色谱柱中以 Platisil C₁₈ 为最佳,所得色谱图峰数目较多,峰面积较大,分离度良好,因此选此色谱柱作为火炭母 HPLC 指纹图谱检测的色谱柱。

3.4 提取方法的考察 选择了超声提取和回流提取进行比较,结果表明回流提取色谱峰较多。对提取溶剂和提取时间进行考察,结果表明以 80% 乙醇提取 2 次色谱峰较多,干扰较少,基线稳定。

3.5 与对照药材的比对 根据所得的共有模式,将火炭母对照药材色谱图与共有模式进行相似度计算,以检查共有模式是否正确。经过同样的谱图处

理后,计算了其与共有模式的相似度。结果显示,各产地火炭母药材之间相似度均在 0.90 以上,说明该共有模式可用于火炭母药材的检测。

4 结论

对不同产地火炭母的 HPLC 指纹图谱进行比较分析,各产地火炭母的 HPLC 图谱中均有此 17 个共有峰,各峰的相对保留时间比较一致,并且这 17 个峰占总峰面积的 90% 以上,故规定不同产地的火炭母均应检出这 17 个共有峰。经中药色谱指纹图谱相似度评价软件处理结果表明,12 批火炭母的相似度为 0.90 以上。同时,所获得的指纹图谱共有模式与火炭母对照药材相似度为 0.90。因此,此方法所得指纹图谱可用于火炭母药材的检测。

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草:第 2 册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:648.
- [2] 林焕泽,吴秀荣. 高效液相色谱法测定火炭母中槲皮苷的含量[J]. 中国医院药学杂志,2006,26(8):1032.
- [3] 谢贤强,吴萍,林立东,等. 火炭母化学成分的研究[J]. 热带亚热带植物学报,2007,15(5):450.

[责任编辑 蔡仲德]