

茯苓皮药材的HPLC指纹图谱研究[△]

宋 潇^{1,2*}, 谢昭明^{2#}, 黄 丹¹, 刘塔斯¹, 邓富民¹, 舒志芬¹, 刘金香¹, 冉玲菊¹, 李如意¹ (1. 湖南中医药大学/湖南省中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地, 长沙 410208; 2. 湖南省中医药研究院中药研究所, 长沙 410013)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)15-2109-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.15.34

摘要 目的: 建立茯苓皮的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱。方法: 采用HPLC法。色谱柱为Hypersil ODS C₁₈, 流动相为乙腈-0.1%磷酸水(梯度洗脱), 检测波长为210 nm, 柱温为35 ℃, 流速为1.0 ml/min, 进样量为20 μl。以茯苓酸A为参照峰, 分析18批不同产地的茯苓皮样品; 采用SPSS 17.0软件对其进行聚类分析, 并采用《计算机辅助相似性评价系统》进行相似度评价。结果: 18批茯苓皮药材共有16个共有峰, 相似度均>0.9。结论: 所建立的指纹图谱可用于茯苓皮药材的鉴别和质量控制。

关键词 茯苓皮; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 相似度; 聚类分析

Study on HPLC Fingerprint of *Poria cocos*

SONG Xiao^{1,2}, XIE Zhao-ming², HUANG Dan¹, LIU Ta-si¹, DENG Fu-min¹, SHU Zhi-fen¹, LIU Jin-xiang¹, RAN Ling-ju¹, LI Ru-yi¹ (1. Hunan University of Chinese Medicine, State Key Laboratory Breeding Base of Chinese Medicine Powder and Medicine Innovation in Hunan, Changsha 410208, China; 2. Institute of Traditional Chinese Medicine, Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410013, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the HPLC fingerprint of *poria cocos*. METHODS: HPLC was conducted with the column of Hypersil ODS C₁₈. The water phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min; the detection wavelength was 210 nm; the temperature was 35 ℃ and the volume was 20 μl. A total of 18 batches of *poria cocos* produced in different places were analyzed with the reference peak of poria acid A. It was cluster analyzed by SPSS 17.0 software and evaluated similarity by Computer Aided Similarity Evaluation System. RESULTS: The 18 batches of *poria cocos* had 16 common peaks in total, the similarity was more than 0.9. CONCLUSIONS: The HPLC fingerprint can be used for identification and quality evaluation of *poria cocos*.

KEYWORDS *Poria cocos*; HPLC; Fingerprint; Similarity; Cluster analysis

茯苓皮为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 干燥菌核的黑色外皮, 性平, 味甘、淡^[1]。其具有利水消肿的作用, 主要用于治疗小便不利、水肿^[2]。茯苓野生资源很少、不易发现和采挖, 全国虽有近20个省栽培茯苓, 但茯苓主要产于安徽、湖北、湖南、云南、贵州等地^[3]。随着《中药材生产质量管理规范(试行)》(GAP)的推广, 茯苓皮药材质量与产地相关性的研究意义逐渐突出。中药指纹图谱为新兴的中药质量研究可行性手段之一^[4]。本文对全国茯苓栽培产地的18批茯苓皮药材进行了高效液相色谱(HPLC)指纹图谱方法学研究, 以期通过建立茯苓皮药材HPLC指纹图谱的质量评价方法, 为茯苓皮药材质量标准建立和GAP种植提供科学依据。

1 材料

1260型HPLC仪, 包括二极管阵列(DAD)检测器、在线真空脱气机、四元梯度泵、柱温箱(美国Agilent公司); 色谱数据的采集与处理由Agilent化学工作站完成; KQ2200B型超声波

清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。

茯苓酸A对照品(成都克洛玛有限公司, 批号: 140213); 甲醇、磷酸、乙腈(色谱纯, 国药集团化学试剂有限公司), 水为超纯水。

本试验所用茯苓皮药材经湖南省中医药研究院中药研究所谢昭明研究员鉴定为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 干燥菌核的黑色外皮, 共18批。18批茯苓皮药材来源见表1。

表1 18批茯苓皮样品来源

Tab 1 Origins of 18 batches of Cortex Poriae samples

编号	来源	编号	来源
1	湖南省怀化市01	10	湖北省英山县石头嘴镇01
2	湖南省怀化市02	11	湖北省英山县石头嘴镇02
3	湖南省怀化市03	12	江西省宁都县
4	湖南省长沙市铜关镇	13	云南省普洱市思茅区
5	安徽省金寨县	14	云南省昆明市(野生)
6	安徽省岳西县	15	广西省蒙山县
7	湖北省罗田县九资河镇01	16	广西省百色市
8	湖北省罗田县九资河镇02	17	贵州省都匀市
9	湖北省英山县	18	广东省韶关市翁源县

2 方法与结果

△ 基金项目: 国家科技支撑计划课题(No.2011BAI01B09)

* 硕士研究生。研究方向: 中药资源及药用植物栽培。E-mail: 524205729@qq.com

通信作者: 研究员, 硕士生导师。研究方向: 中药资源及药用植物栽培。E-mail: xzm1962@126.com

2.1 色谱条件

色谱柱: Hypersil ODS C₁₈ (200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.1%磷酸水(B), 梯度洗脱(0~25 min, 40%~48% A; 25~40 min, 48% A; 40~50 min, 48%~75% A; 50~76 min, 75%~90% A; 76~80 min, 90%~100% A); 检测波长: 210 nm; 柱温: 35 ℃; 流速: 1.0 ml/min; 进样量: 20 μl; 记录时间: 85 min。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取茯苓酸A对照品6.7 mg, 置于50 mg量瓶中, 加流动相[乙腈-0.1%磷酸水(70:30, V/V)]溶解并稀释至刻度。

2.3 供试品溶液的制备

取茯苓皮药材粉末(过80目筛)约1 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 加入50 ml甲醇, 称定质量, 超声(功率: 100 W, 频率: 40 kHz)处理20 min, 冷却, 补足损失的甲醇量, 过滤, 取续滤液, 用微孔滤膜(0.45 μm)滤过, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样6次, 记录色谱图。结果, 各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均<3.0%, 表明方法精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别于放置0、2、4、6、8、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果, 各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均<3.0%, 表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 取同一批茯苓皮药材粉末(过80目筛)6份, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 记录色谱图。结果, 各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均<3.0%, 表明本方法重复性较好。

2.5 茯苓皮HPLC指纹图谱的建立

2.5.1 指纹图谱的建立及共有峰的标定 根据18个产地茯苓皮药材供试品溶液HPLC图提供的相关参数, 建立茯苓皮药材三萜类成分的HPLC指纹图谱(图1)。比较18批茯苓皮样品的色谱图, 确定了16个共有峰。其中7号峰峰面积较大, 经对照品比对归属为茯苓酸A, 且在不同批次样品中均稳定存在, 故选其为参照峰, 其他各共有峰的相对保留时间和相对峰面积均通过7号峰比对获得。结果显示, 各个共有峰的相对保留时间的RSD均<3.0%, 但各个共有峰的相对峰面积的RSD有很大差异, 以峰1、5、8、15、16所代表成分最为明显, 说明这5个色谱峰所代表的成分在各药材样品中的量存在很大差异(图2)。

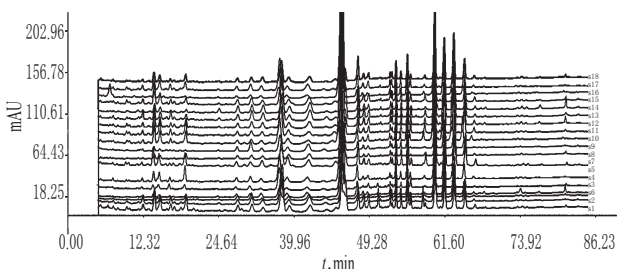


图1 18批茯苓皮药材的HPLC指纹图谱

Fig 1 HPLC fingerprint of 18 batches of Cortex Poriae

2.5.2 相似度评价 首先对18批茯苓皮样品进行系统聚类分析, 应用SPSS 17.0统计软件, 采用组间均联法(Between group linkage), 以夹角余弦(Cosine)作为样品的分类依据。18批样品可分为两类, 样品3、6、9、14批为一类; 样品1、2、4、5、7、8、10、11、12、13、15、16、17、18批为另一类, 聚类分析结果见图3。

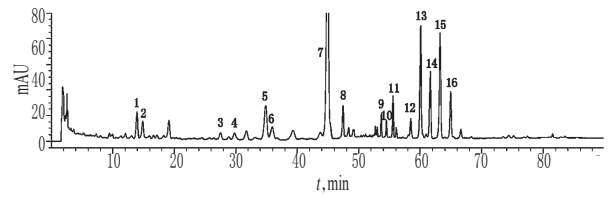


图2 18批茯苓皮药材共有峰的HPLC指纹图谱

Fig 2 HPLC chromatogram of 18 batches of Cortex Poriae common peak

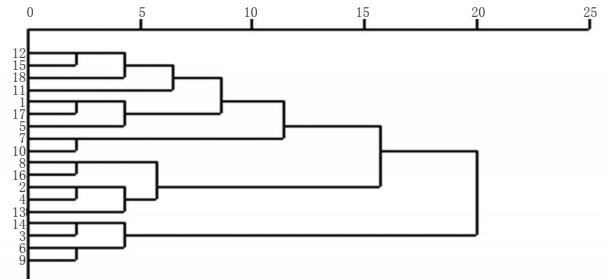


图3 18批茯苓皮药材的聚类分析图

Fig 3 Cluster analysis of 18 batches of Cortex Poriae

采用国家药典委员会颁布的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004版)对所得的色谱数据进行处理, 通过多点校正的方法对色谱峰进行自动匹配生成样品的色谱指纹图谱共有模式, 以第7批药材图谱作为参照图谱, 进行相似度计算, 结果见表2。结果, 3、6、9、14批样品相似度小于0.95, 其余样品相似度均在0.95以上。此结果与系统聚类分析结果一致, 2种方法得到了相互验证, 因此可以认为相似度在0.95以上的为推荐品, 0.95以下的为非推荐品。

表2 18批茯苓药材的相似度评价结果

Tab 2 Results of similarity evaluation of 18 batches of Cortex Poriae

编号	相似度	编号	相似度
1	0.994	10	0.967
2	0.981	11	0.983
3	0.917	12	0.995
4	0.957	13	0.979
5	0.994	14	0.910
6	0.916	15	0.995
7	0.968	16	0.968
8	0.978	17	0.994
9	0.925	18	0.992

3 讨论

3.1 提取溶剂和方法的考察

对提取溶剂甲醇、无水乙醇、乙酸乙酯进行考察, 以甲醇提取的样品色谱峰个数较多、峰面积较大, 故提取溶剂选择甲醇。笔者对超声提取法和加热回流提取法进行比较, 2种提取方法提取效率相当, 考虑到超声提取法操作较简便, 故提取方法选择超声提取法; 同时又对不同的提取时间(10、20、30、40 min)进行考察, 20 min及以后的提取效率基本一致, 故选择超声时间为20 min。故确定提取方法为甲醇超声20 min。

3.2 色谱条件的考察

笔者分别考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-水-磷酸、乙腈-水-磷酸4个流动相系统, 结果表明采用乙腈-水-磷酸流动相系统时, 各峰的分离度较好, 且基线平稳, 有利于指纹图谱的分

紫外可见分光光度法测定无花果叶提取物中总黄酮的含量^Δ

罗晓梅*, 张 吟#, 黄丹丹, 张淑芬, 许秋霞(福建医科大学附属第二医院药学部临床药理学室, 福建泉州 362000)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)15-2111-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.15.35

摘要 目的:建立测定无花果叶提取物中总黄酮含量的方法。方法:采用紫外可见分光光度法,以芦丁为对照品,采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠显色法,在510 nm波长处对无花果叶提取物的总黄酮含量进行测定。结果:芦丁质量浓度在0.05~0.50 mg/ml范围内与吸光度呈良好的线性关系($r=0.999\ 9$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD均 $<2\%$;平均加样回收率为98.68%,RSD=1.50%($n=9$)。无花果叶黄酮提取物的总黄酮含量均值为9.47%。结论:该方法操作简便、准确,稳定性和重复性良好,适用于无花果叶提取物中总黄酮的含量测定。

关键词 无花果叶;总黄酮;紫外可见分光光度法

Content Determination of Total Flavonoids in Extracts from *Ficus Carica* Leaves by UV-visible Spectrophotometry

LUO Xiao-mei, ZHANG Yin, HUANG Dan-dan, ZHANG Shu-fen, XU Qiu-xia (Clinical Pharmaceutics Room, Dept. of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fujian Quanzhou 362000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of total flavonoids in extracts from *ficus carica* leaves. METHODS: The content of total flavonoids in extract from *ficus carica* was determined by UV-visible spectrophotometry with Al (NO₃)₃-NaNO₂-NaOH color-test at the wavelength of 510 nm with the reference of rutin. RESULTS: There was a good linear relationship between the quality concentration of rutin and the absorbance in the range of 0.05-0.50 mg/ml ($r=0.999\ 9$). The RSDs of precision, stability and reputability test were less than 2% and the average recovery was 98.68% (RSD=1.50%, $n=9$). The average content of total flavonoids in extract from *ficus carica* leaves was 9.47%. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, reproducible and stable, and can be used for the content determination of total flavonoids in extract from *ficus carica* leaves.

KEYWORDS *Ficus carica* leaves; Total flavonoids; UV-visible spectrophotometry

析,因此确定乙腈-水-磷酸作为本研究的流动相^⑤。随后又分别考察了25、30、35℃3个检测柱温,结果表明色谱柱检测温度在35℃时,分离度最好、峰形较好。故选择柱温为35℃条件下进行茯苓皮药材HPLC指纹图谱检测。

3.3 检测波长的选择

使用DAD检测器进行紫外区全波长扫描,在210 nm波长下,色谱图基线噪音较低,特征峰响应较高,色谱峰信息较完全。综合比较后,选择210 nm作为本研究的检测波长。

综上所述,本试验建立了茯苓皮药材的HPLC指纹图谱,并采用不同分析方式将18批茯苓皮药材分为两大类^⑥。虽然上述两大类茯苓皮HPLC指纹图谱十分相似,但3、6、9、14批茯苓皮样品的各成分质量分数低于其他批号茯苓皮样品,表明3、6、9、14批茯苓皮样品质量次于其他批号的茯苓皮样品。

^Δ 基金项目:福建省科技计划资助项目(No.2012Y0025);国家卫生计生委共建科学研究基金(No.WKJ-FJ-13);福建省教育厅科技计划项目(No.JA12160)

* 药师。研究方向:临床药理学。电话:0595-22792100。E-mail: 237389379@qq.com

通信作者:副主任药师,博士。研究方向:临床药理学。E-mail: zyin1973@163.com

由此提示茯苓皮药材的质量与土壤类型、盖土厚度、海拔、纬度、气候条件、菌种、种植方法等密切相关,其具体原因有待进一步研究。

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,2010:224.
- [2] 张怡莎,陈华国,周欣,等.不同产地茯苓及茯苓皮中多糖成分的研究[J].贵州师范大学学报:自然科学版,2010,28(3):101.
- [3] 於小波,管俊峰,王金波,等.我国茯苓药材主要产区资源调查[J].时珍国医国药,2011,22(3):714.
- [4] 张琦,王振中,萧伟,等.茯苓UPLC特征指纹图谱[J].中国中药杂志,2012,37(7):966.
- [5] 曾超,陆东,段伟昌,等.肉桂配方颗粒的HPLC指纹图谱研究[J].中国药房,2014,25(7):635.
- [6] 陈蓉,沈蓓,吴启南.基于主成分分析和聚类判别模式对不同产地芡实HPLC指纹图谱研究[J].中成药,2012,34(5):781.

(收稿日期:2014-08-19 修回日期:2014-11-09)

(编辑:余庆华)