

蒲黄的 HPLC 指纹图谱研究

马红飞, 刘 斌*, 周军挺

(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

摘要:目的 建立蒲黄药材的指纹图谱分析方法, 为蒲黄的质量控制提供新方法。方法 采用反相高效液相色谱法, YWG-C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.05% 磷酸水溶液-乙腈系统, 线性梯度洗脱, 检测波长 254 nm, 进样量为 5 μL。结果 建立了蒲黄药材的 HPLC 指纹图谱, 以香蒲新苷峰为参照峰, 确立了蒲黄药材指纹图谱中的 12 个共有峰, 测定了 8 批蒲黄 HPLC 指纹图谱与对照图谱的相似度。结论 所建立的 HPLC 指纹图谱有很好的精密性、重现性和稳定性, 适用于蒲黄药材的质量控制。

关键词: 蒲黄; HPLC; 指纹图谱; 相似度

中图分类号: R282.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2006)03-0433-03

HPLC Fingerprint of *Pollen Typhae*

MA Hong-fei, LIU Bin, ZHOU Jun-ting

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract: Objective To establish the HPLC Fingerprint of *Pollen Typhae* and give a new method for quality control of *Pollen Typhae*. **Methods** RP-HPLC was used on a YWG-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with the gradient elution solvent system composed of acetonitrile-0.05% H₃PO₄ water solution, the detection wavelength was 254 nm, sample injection was 5 μL. **Results** HPLC Fingerprint of *Pollen Typhae* was established. Taking typhaneoside as the reference peak, 12 common peaks were selected as the fingerprint peaks of *Pollen Typhae*, the similarity between the fingerprint of eight batches of *Pollen Typhae* samples and reference fingerprint was determined. **Conclusion** The established HPLC fingerprint has desirable precision, reproducibility, and stability, and can be applied to the quality control of *Pollen Typhae*.

Key words: *Pollen Typhae*; HPLC; fingerprint; similarity

蒲黄始载于《神农本草经》,列为上品,为香蒲科植物水烛香蒲 *Typha angustifolia* L.、东方香蒲 *T. orientalis* Presl 或同属植物的干燥花粉,是一味常用中药,性味甘平,归肝、心包经,具有止血、化瘀、通淋的功效,用于吐血、咯血、衄血、崩漏、外伤出血、经闭痛经、脱腹刺痛、跌仆肿痛、血淋涩痛^[1]等症。蒲黄化学成分主要包括黄酮类、甾类、烷烃类等^[2],目前,其质量控制多以一个或几个成分的量指标,采用 HPLC 方法测定^[3-5]。指纹图谱是一种以现代分析技术为依托的新的中药质量控制模式,是目前国际上公认的控制中药质量的理想技术。本实验采用反相高效液相色谱法建立蒲黄的指纹图谱,对 8 批不同蒲黄的质量进行评价。

1 仪器与试剂

Waters 600 型高效液相色谱仪 (Waters 2487 Dual λ 紫外检测器、四元梯度泵、在线脱气装置), Millennium³² Chromatography Manager 化学工作站。蒲黄样品购自北京市 (S-1~S-5) 和内蒙古赤峰市 (S-6~S-8), 采用文献方法^[6], 经刘斌副教授鉴定为香蒲科植物水烛香蒲 *T. angustifolia* L. 的干燥花粉。香蒲新苷对照品 (自制, 经 HPLC 归一化法测定, 质量分数为 99.18%), 乙腈为色谱纯 (美国 Fisher 公司), 水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: YWG-C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 北京分析仪器厂), 柱温为室温, 检测波

收稿日期: 2005-04-28

基金项目: 国家中医药管理局中医药科学技术研究专项中药研究课题 (02-30ZP12)

作者简介: 马红飞 (1978-), 女, 内蒙古自治区赤峰市人, 硕士研究生, 主要研究方向为中药质量控制方法研究。

* 通讯作者 刘 斌 Tel: (010)64711199-6050 E-mail: liubinyan67@163.com

长 254 nm, 进样量 5 μ L, 流动相为 0.05% 磷酸水溶液(A)-乙腈(B), 线性梯度洗脱: 0~3 min, 0%~10% B; 31~140 min, 13% B; 141~160 min, 13%~23% B, 体积流量为 1.0 mL/min。

2.2 对照品溶液制备: 精密称取香蒲新苷对照品 5 mg, 用甲醇溶解并定容至 50 mL, HPLC 分析前用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过。

2.3 供试品溶液制备: 取不同蒲黄样品约 1.0 g, 精密称定, 分别精密加入甲醇 10 mL, 称定质量, 超声提取 30 min 后, 放冷至室温, 补足减失的溶剂质量, 摇匀, 静置, HPLC 分析前用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过上清液, 作为供试品溶液。

2.4 指纹图谱测定: 按照上述色谱条件, 对 8 批不同蒲黄药材进行了测定, 通过比较不同样品色谱峰, 确定共有峰 12 个, 见图 1。相对保留时间和峰面积见表 1 和 2。取香蒲新苷对照品溶液进样, 记录色谱图, 并与样品指纹图谱比较, 确认样品图谱中与香蒲新苷保留时间对应的第 10 号峰为香蒲新苷, 并将其作为参照物峰。

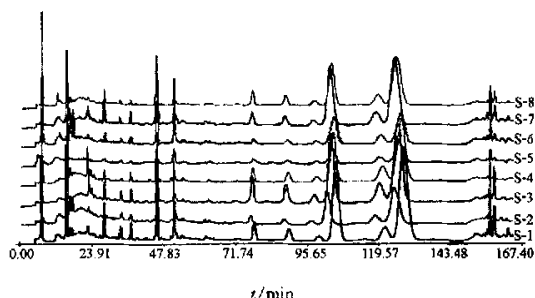


图 1 8 批蒲黄药材的 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC Fingerprints of eight batches of *Pollen Typhae*

表 1 8 批蒲黄药材指纹图谱共有峰的相对保留时间

Table 1 Relative retention times of common peaks for fingerprints of eight batches of *Pollen Typhae*

峰号	相对保留时间							
	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6	S-7	S-8
峰 1	0.071	0.072	0.071	0.070	0.071	0.070	0.072	0.069
峰 2	0.152	0.152	0.150	0.148	0.149	0.147	0.152	0.144
峰 3	0.271	0.267	0.269	0.270	0.269	0.266	0.272	0.261
峰 4	0.324	0.321	0.321	0.320	0.320	0.318	0.327	0.308
峰 5	0.354	0.352	0.353	0.354	0.353	0.351	0.358	0.341
峰 6	0.435	0.436	0.436	0.437	0.436	0.434	0.443	0.424
峰 7	0.745	0.743	0.744	0.747	0.745	0.741	0.749	0.736
峰 8	0.854	0.855	0.853	0.854	0.852	0.851	0.857	0.849
峰 9	0.946	0.948	0.946	0.947	0.945	0.945	0.947	0.945
峰 10	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
峰 11	1.157	1.161	1.154	1.150	1.149	1.156	1.160	1.168
峰 12	1.216	1.220	1.215	1.210	1.210	1.216	1.219	1.230

表 2 8 批蒲黄药材指纹图谱共有峰的相对峰面积

Table 2 Relative peak areas of common peaks for fingerprints of eight batches of *Pollen Typhae*

峰号	相对峰面积							
	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6	S-7	S-8
峰 1	0.045	0.094	0.966	0.296	0.114	0.211	0.616	0.068
峰 2	0.244	0.322	0.289	0.228	0.239	0.232	0.333	0.159
峰 3	0.067	0.044	0.095	0.145	0.087	0.116	0.153	0.239
峰 4	0.052	0.012	0.049	0.038	0.028	0.052	0.059	0.071
峰 5	0.034	0.034	0.042	0.049	0.022	0.047	0.046	0.088
峰 6	0.167	0.196	0.505	0.319	0.305	0.264	0.398	0.336
峰 7	0.192	0.138	0.104	0.111	0.170	0.107	0.124	0.113
峰 8	0.174	0.134	0.086	0.097	0.151	0.099	0.094	0.093
峰 9	0.107	0.086	0.101	0.064	0.084	0.051	0.082	0.054
峰 10	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
峰 11	0.354	0.408	0.402	0.269	0.311	0.210	0.375	0.209
峰 12	1.695	1.838	1.593	1.648	1.634	1.704	1.698	1.585

2.5 精密度试验: 取蒲黄样品 S-1 供试品溶液连续进样 5 次, 记录指纹图谱。以第 10 号峰为参照物峰, 计算 12 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值 分别在 0.41%~1.77% 和 1.34%~2.88%, 符合指纹图谱要求。

2.6 重现性试验: 精密称取 5 份蒲黄样品 S-1, 制备供试品溶液, 分别进样并记录指纹图谱。结果显示, 12 个共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值 分别在 0.23%~2.51% 和 1.19%~2.85%, 符合指纹图谱的要求。

2.7 稳定性试验: 取蒲黄样品 S-1 供试品溶液分别于制备后 0、3、6、9、12、18、24 h 进样分析, 记录色谱图, 计算 12 个共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值 分别在 0.42%~3.82% 和 1.08%~2.94%, 表明样品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.8 参照图谱生成及相似度计算: 用中药指纹图谱相似度计算软件(国家药典委员会主持开发), 生成参照图谱, 如图 2。计算不同蒲黄药材指纹图谱与参照图谱的相似度为 0.915~0.996, 见表 3。

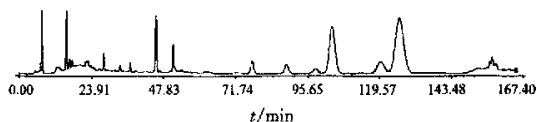


图 2 对照图谱

Fig. 2 Reference fingerprint

3 讨论

3.1 流动相条件优化时用了 4 种流动相: 乙腈-水、乙腈-0.05% 磷酸水、甲醇-水、甲醇-0.05% 磷酸水, 并尝试了这 4 种流动相的多种梯度洗脱, 结果表明乙腈-0.05% 磷酸水系统最佳, 采用该系统各个色谱峰的峰形和分离度都较好, 因此选定该系统为蒲黄药材指纹图谱检测的流动相。

表3 8批蒲黄药材指纹图谱与参照图谱的相似度

Table 3 Similarities of fingerprints of eight batches of *Pollen Typhae*

样品	相似度	样品	相似度
S-1	0.994	S-5	0.947
S-2	0.942	S-6	0.915
S-3	0.989	S-7	0.982
S-4	0.986	S-8	0.996

3.2 试验过程中选择了210、254、280、360 nm等多个波长分析,发现检测波长为254 nm时,色谱峰的峰强度普遍比较强,基线比较平稳,而且蒲黄的许多黄酮类成分在此波长都有吸收,所以选择254 nm作为指纹图谱的检测波长。

3.3 由不同蒲黄样品HPLC指纹图谱的相对保留时间、相对峰面积以及相似度结果可以看出,不同蒲黄药材之间存在较大差异。因此,采用指纹图谱这种

新的质量控制模式来控制药材质量,对于保证临床疗效的稳定具有重要意义。

References:

- [1] *Ch P* (中国药典) [S]. Vol. 1. 2005.
- [2] Gao Q R, Tian J M. The development in the research of *Pollen Typhae* (Puhuang) [J]. *Neimenggu J Tradit Chin Med* (内蒙古中医药), 2001, 20(12): 81-83.
- [3] Gao G Y, Liu M C, Feng Y X. Determination of flavonoids and quality evaluation of Chinese traditional drug "puhuang" [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1998, 33(4): 300-303.
- [4] Zhang N R, Wang S Q. The comparison of the content of quercetin and isorhamnetin in 5 kinds of *Pollen Typhae* (Puhuang) [J]. *Hunan Guiding J Tradit Chin Med* (湖南中医药导报), 1999, 5(2): 36-37.
- [5] Liu B, Lu Y R. HPLC Determination of two flavonoids in *Pollen Typhae* (Puhuang) [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1998, 18(2): 80-83.
- [6] Liu B, Lu Y R. Observation on pollen morphology of six species of *Typha* (Puhuang) by SEM [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 1997, 20(10): 497-499.

不同产地甘草的聚类分析

王跃飞¹, 文红梅^{1*}, 郭立玮¹, 高永厚²

(1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210029; 2. 鄂尔多斯市药品检验所, 内蒙古 鄂尔多斯 017000)

摘要:目的 对不同产地甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 的 HPLC 指纹图谱进行研究, 并对 HPLC 指纹图谱结果进行聚类分析, 以探讨产地对甘草药材活性成分积累的影响。方法 以甘草药材所含活性成分为分析对象, 选择适宜的 HPLC 条件, 建立了甘草指纹图谱分析方法, 并对该方法进行了考察。以甘草酸、甘草苷、甘草素、异甘草苷、异甘草素 5 个活性成分峰面积的标准化结果对 17 批样品进行了聚类分析。结果 方法学考察结果表明, 本研究建立的分析方法有较好的重现性, 不同产地甘草中甘草酸和甘草黄酮的量存在较大差别。结论 甘草活性成分的积累与产地有一定的相关性。

关键词:甘草; 指纹图谱; 聚类分析

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)03-0435-05

Hierarchical cluster analysis of *Radix Glycyrrhizae* from different habitatsWANG Yue-fei¹, WEN Hong-mei¹, GUO Li-wei¹, GAO Yong-hou²

(1. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 2. Eerduosi Institute for Drug Control, Neimenggu 017000, China)

Abstract: Objective To study HPLC fingerprints of *Radix Glycyrrhizae* from different habitats, develop the method of hierarchical cluster analysis by using the results of fingerprints, and discuss regional effect on accumulation of active ingredients of *Radix Glycyrrhizae*. **Methods** HPLC Fingerprint analysis method of active ingredients was developed and the method had been evaluated. Based on the standardized result of peak area of glycyrrhizin, liquiritin, liquiritigenin, isoliquiritin, and isoliquiritigenin, seventeen batches of *Radix Glycyrrhizae* were classified and identified using hierarchical cluster analysis. **Results** The methodological evaluation showed that this method had a good repeatability. The amounts of gly-

收稿日期: 2005-06-12

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2001BA701A41-1)

作者简介: 王跃飞(1980-), 男, 浙江金华人, 硕士, 南京中医药大学 2003 级硕士研究生, 从事药物分析研究。

Tel: (025)86798397 E-mail: wangyuefei@mail.china.com

* 通讯作者 文红梅