

肿节风的 HPLC 指纹图谱的研究

王钢力¹, 翟为民², 姚令文¹, 林瑞超¹

(1. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050; 2. 国家药典委员会, 北京 100061)

摘要:目的 考察不同产地肿节风的质量。方法 收集不同产地肿节风药材 20 批, 采用 HPLC 法测定药材的指纹图谱, 以 Agilent Elipse XDB-C₁₈ 色谱柱, 乙腈-0.1% 磷酸溶液 (含 2.5% 乙腈) 为流动相进行梯度洗脱, 检测波长 344 nm, 柱温 38 ℃; 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版》, 以 1# 样品为模版, 计算各被测样品的 HPLC 指纹图谱的整体相似度。结果 其他 19 批被测样品的色谱指纹图谱的整体相似度在 0.334~0.999。结论 本法操作简便, 重现性好, 可用于不同产地药材的指纹图谱的测定和质量评价。由于不同产地肿节风药材指纹图谱差异较大, 有必要对原料药材的产地进行考察。

关键词: 肿节风; 高效液相色谱; 指纹图谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2005)12-1801-03

HPLC fingerprint of *Sarcandra glabra*

WANG Gang-li¹, ZHAI Wei-min², YAO Ling-wen¹, LIN Rui-chao¹

(1. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China;

2. Chinese Pharmacopoeia Commission, Beijing 100061, China)

Key words: *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai; HPLC; fingerprint

肿节风又名九节茶、接骨木, 系金粟兰科植物草珊瑚 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai 的干燥全株, 为《中国药典》2000 年版一部收载品种。味苦、辛, 性平, 具清热凉血、活血消斑、祛风通络等功效, 用于治疗血热紫斑、紫癜, 风湿痹痛, 跌打损伤等症。肿节风具有抗菌消炎、抑制流感病毒、抗肿瘤、促进骨折愈合及镇痛等多种活性; 而且肿节风及其提取物具有较好的安全性, 急性毒性试验结果属实际无毒, 动物精子畸形试验、小鼠骨髓细胞微核试验、Ames 试验均为阴性, 未发现致突变作用。治疗肿瘤 (晚期胰腺癌、消化系统恶性肿瘤和鼻部恶性肿瘤、白血病等)、细菌性痢疾、骨折及多种口腔疾病取得良好的治疗效果。

许多中成药都使用肿节风作为原料药材, 如: 复方草珊瑚含片、肿节风片、血康口服液等。目前, 肿节风药材的来源基本上都是靠野生资源。但由于年需求量大, 肿节风的野生资源正面临日趋减少的局面。面对上述情况, 几年前已有制药企业在江西信丰和浙江龙泉等地展开了肿节风人工栽培的研究, 并取得令人满意的进展。但由于药材的人工栽培涉及的因素较多, 短时间内人工栽培的药材还难以替代野生品。从长远看, 人工栽培品替代野生品势在必行。

肿节风的全草含有酚类、鞣质、黄酮苷、香豆素、

内酯和有机酸类成分。现行肿节风药材质量标准测定项下是测定药材中异秦皮啶。为全面控制药材的质量, 保证肿节风注射液产品质量的均一、稳定, 本实验建立 HPLC 法测定肿节风的色谱指纹图谱。

1 仪器与材料

Waters 2695 高效液相色谱仪, Waters 2996 PDA 检测器, Empower 色谱工作站; 《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版》(国家药典委员会发行)。

异秦皮啶对照品 (中国药品生物制品检定所); 乙腈 (色谱纯), 磷酸 (分析纯), Milli-Q 水。

收集 20 批不同产地肿节风药材 (主产地或商品), 经中国药品生物制品检定所张继副主任药师鉴定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 采用 Agilent Zorbax Eclipse XDB C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); A (乙腈)-B (0.1% 磷酸溶液, 含 2.5% 乙腈) 为流动相, 进行梯度洗脱, 0~13 min, 100% B, 体积流量为 0.5 mL/min; 13 min 以后, 体积流量改为 0.7 mL/min, 13~43 min, A-B (5 : 95); 43~48 min, A-B (20 : 80), 48 min 以后, A-B (70 : 30); 柱温 38 ℃; 检测波长 344 nm。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液的制备:取药材粗粉 0.5 g,加水 15 mL,煎煮 0.5 h,滤过,用水将滤液补足至 15 mL,加乙醇 35 mL,摇匀,置冰箱中冷藏过夜;取上清液 10 mL,离心 5 min (4 000 r/min),小心吸取上清液置蒸发皿中,蒸干,残渣加 1 mL 0.1%磷酸溶液(含 2.5%乙腈)溶解,离心 5 min (12 000 r/min),小心吸取上清液,即得。

2.2.2 参照物溶液的制备:称取异秦皮啉对照品适量,加 0.1%磷酸溶液(含 2.5%乙腈)溶解,制成含异秦皮啉 10 μg/mL 的溶液作为参照物溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 稳定性试验:取肿节风供试品溶液在 0、4、8、16、20 h 分别进样分析,记录 10 个主要色谱峰面积(图 1)。各主要色谱峰的保留时间和峰面积的 RSD 均小于 10%。结果表明:供试品溶液在 20 h 之内稳定。

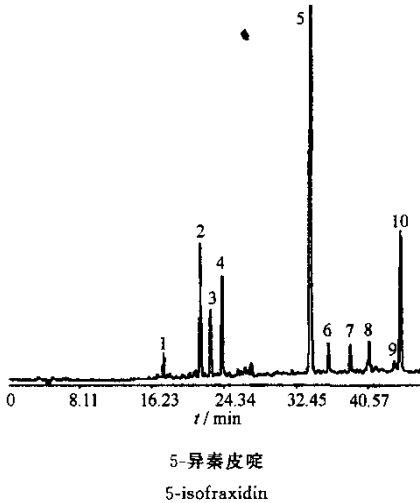


图 1 方法学考察用样品 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatogram of samples for methodological study

2.3.2 精密度试验:取肿节风供试品溶液重复进样 5 次,记录 10 个主要色谱峰面积,结果各主要色谱峰的保留时间和峰面积的 RSD 均小于 10%。

2.3.3 重现性试验:称取同一批江西药材样品 5 份,制备供试品溶液,在上述色谱条件下分析,记录 10 个主要色谱峰面积,结果各主要色谱峰的保留时间和峰面积的 RSD 均小于 10%。

2.4 样品测定:分别吸取上述供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,按照上述色谱条件测定,记录色谱图。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版》对各样品色谱图的原始数据文件(输出格式为

cdf)进行分析,以 20 批样品生成的对照谱图(平均值法和中位数法)作为对照模版,计算各色谱图的整体相似度。20 批被测样品的指纹图谱见图 2,测定结果见表 1。

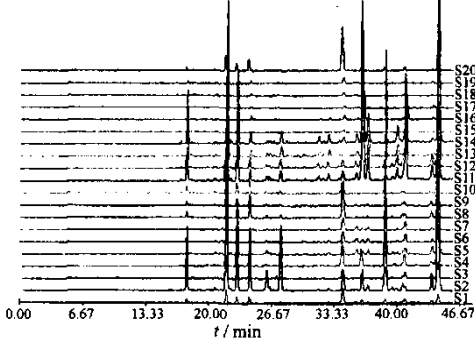


图 2 20 批不同产地肿节风药材的液相指纹图谱
Fig. 2 Fingerprints of 20 batches of tested samples from different habitats

表 1 样品来源及测定结果

Table 1 Sources and results of tested samples

批号	产地(收集地)	指纹图谱相似度(以对照指纹图谱为模版)	
		平均值	中位数
1	浙江龙泉	0.907	0.874
2	广西贺川	0.734	0.863
3	四川(广西玉林)	0.907	0.975
4	江西信丰	0.971	0.929
5	广西	0.944	0.884
6	江西	0.903	0.929
7	江西	0.859	0.909
8	江西	0.806	0.901
9	福建浦城	0.732	0.876
10	浙江庆元	0.776	0.891
11	浙江龙泉	0.968	0.865
12	江西广丰	0.965	0.858
13	浙江景宁	0.965	0.883
14	福建松溪	0.916	0.784
15	浙江遂昌	0.910	0.838
16	浙江云河	0.434	0.362
17	福建政和	0.472	0.691
18	广西(安徽亳州)	0.517	0.689
19	江西赣州	0.746	0.859
20	江西上饶	0.539	0.698

2.5 推荐产地原料药材指纹图谱及对照谱图:由于肿节风药材为天然野生产品,其化学成分受生长环境及加工、储存等环节因素的影响,为便于企业在日后原料采购的需求,现提供 3 批推荐产地药材指纹图谱及药材对照指纹图谱(图 3,4),供原料质量控制参考。

3 讨论

3.1 试验方法的选择

3.1.1 提取方法的选择:为使肿节风药材的指纹图

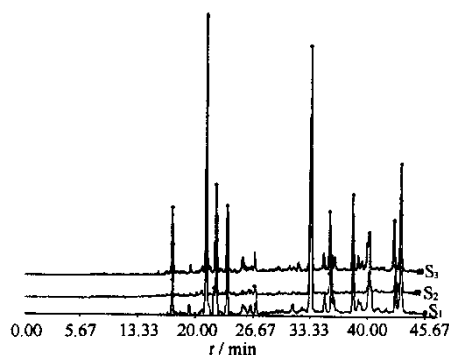


图3 推荐产地药材指纹图谱

Fig. 3 Fingerprint of samples from recommended sources

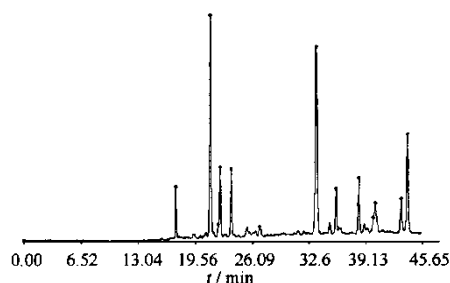


图4 推荐产地药材的模式指纹图谱

Fig. 4 Pattern fingerprint of samples from recommended sources

谱能表现与肿节风注射液指纹图谱所呈现的化学成分相关性,采用类似成品生产工艺的药材提取方法制备供试品溶液。

3.1.2 色谱条件的选择:色谱柱的选择:选用 Agilent Zorbax Eclipse XDB C₁₈、Agilent Zorbax SB-C₁₈、Alltech Alltima C₁₈ 色谱柱试验。结果表明 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 对肿节风供试品溶液的分离效果最好。流动相的选择:选用乙腈-水、甲醇-水、乙腈-0.1%磷酸作为流动相进行试验。结果表明乙腈-0.1%磷酸对肿节风供试品溶液的分离效果最好。检测波长的选择:根据异嗪皮啶的紫外吸收光谱特征,210、344 nm 波长处应为最佳波长选取

点。但由于肿节风注射液的质量标准中,指纹图谱的检测波长为 344 nm,故选其作为指纹图谱的检测波长。

3.2 样品测定结果分析:从 20 批不同产地药材的指纹图谱可以看出,来自不同产地的野生药材中化学成分差异较大。这将直接影响成品化学成分及指纹图谱的稳定性。在没有大量人工栽培品的情况下,有必要相对固定肿节风的产地,以保证制剂质量的稳定和均一。但由于肿节风注射液的生产企业数量较多(现为 7 家),且该品种既没有专利保护,也不是中药保护品种,今后可能还会有其他生产企业仿制该品种。因此,将肿节风原料药材固定在一个产地不是非常现实。考虑到药材产地的地理位置、企业的年度需求量、传统用药习惯及维护资源的可持续利用等因素,暂定原料产地为广西贺川县、浙江龙泉县和江西信丰县。

由于原料药材来源的限制,以及天然药物生长环境及加工、储存等环节因素的不确定性,导致药材化学成分的差异较大,现暂不规定原料药材指纹图谱的标准,待日后人工栽培技术成熟和规模扩大,能够满足注射液原料需求时再作规定。建立企业在采购原料药材时,应对其指纹图谱加以考察,以保证产品质量的均一性和稳定性。

在对照谱图生成的方式中,《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版》提供了中位数和平均值两种计算方法。本实验同时使用了这两种方法进行计算,结果见表 1。对于同一样品而言,两种算法得到的计算结果有一定的差别。考虑到药材为野生的天然产物,受环境、气候、生长条件等因素影响较大,对于过于离散的样品应该降低其在对照谱图生成中的权重,故笔者认为,选择中位数法应较平均值法合理。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2000.
- [2] Wang G L, Chen D F, Lin R C. Advances in chemical and quality control studies on *Herba Sacandrar* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34 (8): a-x-xi.

敬告读者

《中草药》杂志编辑部尚存部分过刊合订本,包括:1974-1975 年、1976 年、1979 年、1985-1994 年(80 元/年)、1995-1997 年(110 元/年)、1998 年(120 元/年)、1999 年(135 元/年)、2000 年(180 元/年)、2001-2003 年(200 元/年)、2004 年(220 元/年)。1996 年增刊(50 元)、1997 年增刊(45 元)、1998 年增刊(55 元)、1999 年增刊(70 元)、2000 年增刊(70 元)、2001 年增刊(70 元)、2002 年增刊(65 元)、2003 年增刊(65 元)、2004 年增刊(65 元)、2005 年增刊(65 元)。欢迎订购。订购者请直接与《中草药》杂志编辑部联系。

电话:(022) 27474913 23006821 传真:(022) 23006821 E-mail: zcyzjb@tjipr.com