

肿节风水提取物及其市售制剂的 HPLC 特征图谱研究

姚志红^{1,2}, 潘宇明¹, 戴毅^{1,2}, 顾利红³, 刘明艳¹, 段营辉⁴, 姚新生^{1,2,4*}

(1 暨南大学 中药及天然药物研究所, 广东 广州 510632; 2 中药药效物质基础及创新药物研究广东省高校重点实验室, 广东 广州 510632; 3 广州市药品检验所 中药室, 广东 广州 510160; 4 沈阳药科大学 天然药物化学教研室, 辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 建立肿节风水提取物的 HPLC 特征图谱并明确其特征色谱峰的化学成分, 对肿节风水提取物及其市售制剂的质量进行评价。方法 以 Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 乙腈-水(各含 0.1% 甲酸)为流动相梯度洗脱, 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温: 30 °C, 检测波长为 330 nm; 以共有模式特征图谱为对照, 对不同厂家的肿节风水提取物及其市售制剂进行相似度评价。结果 建立的肿节风水提取物的 HPLC 特征图谱具有良好的稳定性、精密度、重现性。不同厂家生产的 12 批肿节风水提取物及 20 批市售制剂与共有模式对照特征图谱的相似度分别在 0.883~0.987 和 0.797~0.982。其中 8 个特征色谱峰经化学指认, 分别为新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、β-hydroxypropiovanillone、咖啡酸、异嗪皮啶、迷迭香酸 4-O-葡萄糖苷和迷迭香酸。结论 本研究建立了涵盖肿节风中抗炎活性成分与特征成分的 HPLC 特征图谱, 反映了肿节风水提取物及相关制剂的多成分的整体面貌, 为全面、有效控制肿节风及相关制剂的质量奠定了科学基础。

关键词: 肿节风; 肿节风水提取物; 肿节风制剂; HPLC 特征图谱

中图分类号: R286.02 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)09-1457-04

HPLC Characteristic chromatogram of *Sarcandrae Herba* water extract and its preparations

YAO Zhi-hong^{1,2}, PAN Yu-ming¹, DAI Yi^{1,2}, GU Li-hong³, LIU Ming-yan¹,
DUAN Ying-hui⁴, YAO Xin-sheng^{1,2,4}

(1 Institute of Traditional Chinese Medicine & Natural Products, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2 Guangdong Province Key Laboratory of Pharmacodynamic Constituents of TCM and New Drug Research,

Guangzhou 510632, China; 3 Department of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Institute

for Drug Control, Guangdong 510160, China; 4 Department of Natural Products Chemistry,

Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Objective To develop an HPLC characteristic chromatogram of *Sarcandrae Herba* water extract for evaluation of its quality and the related products. **Methods** The method was developed on a C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) by gradient elution with acetonitrile-water (both containing 0.1% formic acid) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min with the detected wavelength at 330 nm and column temperature at 30 °C. The quality of the water extract and its related products were evaluated by comparing with the established reference characteristic chromatogram. **Results** The HPLC characteristic reference chromatogram was established with good stability, precision, and reproducibility. Its similarity among 12 batches of the extract and 20 batches of related preparations ranged in 0.883–0.987 and 0.797–0.982, respectively. Furthermore, eight peaks in the characteristic chromatogram were identified as neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, β-hydroxypropiovanillone, caffeic acid, isofraxidin, rosmarinic acid 4-O-glucoside, and rosmarinic acid, respectively. **Conclusion** With anti-inflammatory bioactive ingredients and characteristic components included, the HPLC characteristic chromatogram reveals the profile of multiple chemical substances in *Sarcandrae Herba* water extract and its products and this would contribute to its effective quality control.

Key words: *Sarcandrae Herba*; *Sarcandrae Herba* water extract; *Sarcandrae Herba* preparation; HPLC characteristic chromatogram

* 收稿日期: 2009-12-05

基金项目: 中国药典项目资助项目(TS-61); 广州市中药现代化重大专项资助项目(2004ZF-E5011)

作者简介: 姚志红(1967-), 女, 上海人, 副教授, 主要从事中药质量控制、药动学研究。

Tel: (020) 85221767 E-mail: tyaozh@jnu.edu.cn

肿节风又名九节茶,草珊瑚等,为金粟兰科植物草珊瑚 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai 的干燥全株,具有抗菌、消炎及肿瘤抑制作用^[1-2]。目前全国有 56 家药厂以肿节风为原料生产相关制剂^[3]。肿节风主要化学成分为有机酸、倍半萜、黄酮及香豆素类化合物等,但主要的药效成分尚不明确^[4]。《中国药典》2005 年版对肿节风药材及市售制剂的鉴别项下方法包括试管反应、对照药材和异嗪皮啶对照品的 TLC 鉴别法。试管鉴别反应专属性太差,操作繁琐、影响因素多。对照药材 TLC 鉴别法及林瑞超^[5-6]、程翼宇等^[7]开展的肿节风 HPLC 指纹图谱的研究成果,虽然都在一定程度上反映了肿节风及产品的整体质量,但前者操作繁琐、影响因素多;后者除指认了特征成分异嗪皮啶外,未能对其他色谱峰进行化学指认;两种方法都未能反映肿节风的抗炎活性,无法对肿节风及其相关制剂进行全面、有效的整体质量控制。本课题组前期对肿节风水提物进行了化学成分研究,活性研究发现其中量较高的迷迭香酸能够有效抑制 15-脂加氧酶的活性,结合文献报道^[8-10],提示其为肿节风中的抗炎活性成分。为此,本研究以绿原酸、异嗪皮啶和迷迭香酸为参照,建立了肿节风水提物的 HPLC 特征图谱,指认了其中 8 个特征色谱峰的化学结构,并对不同厂家生产的 12 批肿节风水提物及 20 批市售肿节风制剂

进行了相似度考察,建立的 HPLC 特征图谱能反映肿节风水提物及其市售制剂多成分(包括指标成分与抗炎活性成分)的整体面貌,研究成果为全面、有效地控制其产品质量奠定了科学基础。

1 仪器与试剂

安捷伦 1200 高效液相色谱仪(包括 G1311A-Quat 泵, G1329A-ALS 自动进样器, G1316A-TCC 柱温箱, G1365D-MWD 紫外检测器); Sartorius BP211D 十万分之一电子天平; 中药指纹图谱相似度评价系统 2004 A 版(国家药典委员会)。

肿节风对照药材(中国药品生物制品检定所,批号 1048-200504); 自制肿节风水提物(批号 ZJF-1、ZJF-2); 异嗪皮啶对照品(中国药品生物制品检定所,质量分数为 98% 以上,批号 1108347-200304); 迷迭香酸对照品(Sigma 公司,质量分数为 97% 以上,批号 536954)。新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、4β-hydroxypropiovanillone、咖啡酸、迷迭香酸 4-O-β-D-葡萄糖苷对照品均为本实验室从肿节风水提物中分离获得,并经过波谱学实验鉴定结构,质量分数均在 95% 以上。乙腈(色谱纯, Digma 公司); 甲醇(色谱纯, 山东禹王实业有限公司), 甲酸(分析纯, 广州化学试剂厂); 蒸馏水(怡宝食品饮料有限公司)。实验用肿节风水提物及相关制剂的样品信息见表 1。

表 1 肿节风水提物及市售制剂

Table 1 *Sarcandrae Hebra* water extract and its preparations

生产厂家	品名	规格	批号
广州敬修堂(药业)股份有限公司	水提物		N02002、N02003、N02004、S12284、S12285、S12286
上海信谊嘉华药业有限公司	水提物		090103、090104、090105
江西天施康中药股份有限公司	水提物		081207、081208、081209
广州敬修堂(药业)股份有限公司	清热消炎宁胶囊	每粒含干浸膏 0.5 g	Z11128、Z11138、Z11139、Z12144、S04008、Z11128、Z05072、Z07090、Z10120、S05009
上海信谊嘉华药业有限公司	肿节风片	每片质量 0.354 g	081001
江西天施康中药股份有限公司	肿节风片	片芯质量 0.25 g	08071501、08011101、08011102、08052102、09033801、09022202、09024301、09051201
广西河丰药业股份有限公司	肿节风片	每片质量 0.535 g	081202、090203

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 美国 Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(B, 含 0.1% 甲酸)-0.1% 甲酸(A), 梯度洗脱(0~5 min 8% B, 60 min 35% B, 70 min 60% B, 72~80 min 100% B); 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 330 nm; 进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液的制备: 取肿节风水提物粉末约 0.5 g(制剂各取 20 粒; 清热消炎宁胶囊取其内容

物; 肿节风片刀刮法除去外层包衣, 充分研碎), 精密称定, 加入 60% 甲醇 50 mL, 超声处理 30 min, 取出, 放冷, 摇匀, 滤过, 即得。

2.2.2 参照物溶液的制备: 各取绿原酸、异嗪皮啶和迷迭香酸对照品适量, 精密称定, 加 60% 甲醇溶解制成含绿原酸 15 μg/mL、异嗪皮啶 15 μg/mL、迷迭香酸 25 μg/mL 的混合溶液, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 稳定性试验: 取同一份肿节风水提物(批号 N02002), 制备供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12、16、

24 h 进行检测, 计算得色谱图的相似度值不低于 0.99, 10 个主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 2%。上述结果表明, 供试品在室温下 24 h 内稳定。

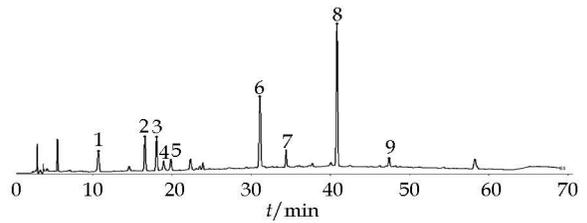
2.3.2 重现性试验: 取同一批肿节风水提取物(批号 N02002), 平行制备 6 份供试品溶液, 进行检测。计算得各色谱图的相似度值不低于 0.99, 10 个主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 2%。

2.3.3 精密度试验: 取同一份肿节风水提取物(批号 N02002), 制备供试品溶液, 连续进样 6 次, 进行检测, 计算得各色谱图的相似度值不低于 0.99, 10 个主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 2%。

2.4 肿节风水提取物 HPLC 特征图谱的相似度评价及色谱峰的化学指认: 分别制备不同厂家(表 1)生产的肿节风水提取物供试品溶液, 进行检测, 采用《中药指纹图谱相似度评价系统 2004 A 版》软件对所得特征图谱进行分析。以 5 点(峰 1, 2, 3, 6, 8)进行多点校正, 时间窗 0.1, 中位数法, 自动匹配后生成肿节风水提取物对照特征图谱(共有模式), 见图 1。计算 12 批肿节风水提取物特征图谱与肿节风水提取物对照特征图谱、实验室自制肿节风水提取物特征图谱及肿节风对照药材水提取物特征图谱的相似度, 见表 2。结果显示 12 批肿节风水提取物特征图谱与对照特征图谱的相似度在 0.883~0.987; 与自制水提取物特征图谱相似度在 0.720~0.975, 而与对照药材水提取物特征图谱的相似度较差, 仅在 0.404~0.810。以异嗪皮啶(峰 6)为参照峰, 12 批供试品特征图谱中的 8 个共有峰(峰 1~6, 8, 9)的相对保留时间的 RSD 均小于 2.0%, 但相对峰面积的 RSD 差别较大, 在 13%~49%。结果提示, 各批次肿节风水提取物整体具有一定的相似性, 但色谱峰所代表的化学成分量有较大的差异。

制备肿节风水提取物供试品溶液, 并取咖啡酸、异嗪皮啶和迷迭香酸对照品, 以及从肿节风水提取物中分离得到 5 种化学成分适量, 以 60% 甲醇水溶解, 分别进行检测。对比 8 个对照品的色谱保留行为, 肿节风水提取物 HPLC 特征图谱中 8 个特征色谱峰得到了明确的化学指认, 见图 1。按保留时间先后顺序依次为新绿原酸(峰 1)、绿原酸(峰 2)、隐绿原酸(峰 3)、 β -hydroxypropiovanillone(峰 4)、咖啡酸(峰 5)、异嗪皮啶(峰 6)、迷迭香酸 4-O-葡萄糖苷(峰 7)和迷迭香酸(峰 8)。

2.5 肿节风市售制剂 HPLC 特征图谱相似度评



1 新绿原酸 2 绿原酸 3 隐绿原酸 4 β -hydroxypropiovanillone 5 咖啡酸 6 异嗪皮啶 7 迷迭香酸 4-O-葡萄糖苷 8 迷迭香酸
1 neochlorogenic acid 2 chlorogenic acid 3 cryptochlorogenic acid 4 β -hydroxypropiovanillone 5 caffeic acid 6 isofraxidin 7 rosmarinic acid 4-O-glucoside 8 rosmarinic acid

图 1 肿节风水提取物对照特征图谱

Fig 1 HPLC Chromatogram of reference characteristic of *Sarcandrae Hebra* water extract

表 2 各图谱的相似度计算结果

Table 2 Similarity of characteristic chromatograms

批号	与对照特征图谱相似度	与 ZJF-1 相似度	与 ZJF-2 相似度	与对照药材相似度
081207	0.941	0.975	0.939	0.722
081208	0.883	0.964	0.959	0.797
081209	0.910	0.969	0.942	0.787
090103	0.985	0.935	0.844	0.513
090104	0.977	0.897	0.800	0.426
090105	0.967	0.883	0.791	0.404
N02002	0.987	0.901	0.790	0.479
N02003	0.974	0.871	0.760	0.406
N02004	0.971	0.882	0.770	0.440
S12284	0.902	0.826	0.725	0.510
S12285	0.899	0.821	0.722	0.499
S12286	0.934	0.826	0.720	0.456
ZJF-1	0.913	1.000	0.959	0.733
ZJF-2	0.804	0.959	1.000	0.810
对照药材	0.485	0.733	0.810	1.000

价: 将所收集的不同厂家生产的 20 批肿节风市售单方制剂, 制备供试品溶液, 分别进行检测, 并计算所得特征图谱与 12 批肿节风水提取物对照特征图谱的相似度, 见图 2。结果显示, 所收集的 20 批市售肿节风单方制剂中 13 批的相似度在 0.9 以上(表 3), 其中江西天施康药业的肿节风片占 4 批(共 8 批), 广州敬修堂药业清热消炎宁胶囊占 7 批(共 9 批)。可见本研究所建立的对照特征图谱可以对不同厂家生产的市售肿节风单方制剂的质量进行初步的质量评价, 并为生产厂家从中间环节对产品的稳定性进行监控提供了参考。

3 讨论

3.1 提取方法的选择: 实验比较了甲醇、不同比例的甲醇水及水等作为提取溶剂及不同提取时间的分析结果, 最终以 60% 甲醇超声提取供试品 30 min 时效果最佳。

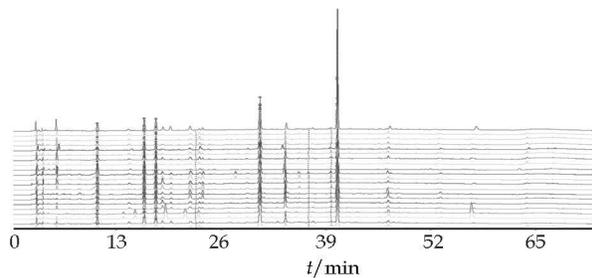


图 2 相似度计算市售肿节风制剂特征图谱与肿节风水提物对照特征图谱的叠加图

Fig 2 Overlay of characteristic chromatograms of *Sarcandrae Herba* preparations and reference characteristic chromatogram of its herb extract for similarity

表 3 肿节风制剂特征图谱与肿节风水提物对照特征图谱的相似度计算结果

Table 3 Similarity between HPLC characteristic chromatograms of *Sarcandrae Herba* preparations and reference characteristic chromatogram of its herb extract

批号	与肿节风水提物对照特征图谱的相似度结果	批号	与肿节风水提物对照特征图谱的相似度结果
081001	0.939	09051201	0.931
081202	0.865	S00048	0.843
090203	0.920	S05009	0.850
08011101	0.981	Z05072	0.976
08011102	0.982	Z07090	0.935
08052102	0.845	Z10120	0.947
08071501	0.830	Z11128	0.944
09022202	0.819	Z11138	0.910
09024301	0.960	Z11139	0.973
09033801	0.797	Z12144	0.971

3.2 色谱条件的选择

3.2.1 色谱柱的选择: 选用了 Ultimate XB C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Phenomenex Gemini C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱进行试验, 结果以 Ultimate XB C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 分离效果最佳。

3.2.2 流动相的选择: 比较了甲醇-水、甲醇(0.2% 醋酸)-0.2% 醋酸、乙腈-水、乙腈(0.1% 甲酸)-0.1%

甲酸作为流动相在不同梯度洗脱下的色谱图, 以乙腈(0.1% 甲酸)-0.1% 甲酸分离效果最佳。

3.2.3 检测波长的选择: 考虑到课题组从肿节风水提物中分离得到的化合物多为酚酸类物质, 为能在同一张色谱图尽可能地展示出此类成分, 本研究选择了 330 nm 作为检测波长。该波长下异嗪皮啶的响应较现行药典对肿节风药材及部分肿节风制剂测定项所采用 344 nm 的响应并没有明显地减弱。

3.3 对照特征图谱的选择: 由于所收集到的 12 批肿节风水提物间相似度较高, 而与对照药材水提物的相似度较低(大部分在 0.5 以下), 同时考虑到肿节风水提物大多为肿节风制剂的中间产品, 其共有模式特征图谱可以较好地反映肿节风水提物及市售制剂中的多成分的整体面貌, 并有助于实现肿节风从生产的中间环节到市售产品的整体质量控制, 本研究中以 12 批肿节风水提物供试品生成的共有模式图谱作为肿节风对照特征图谱。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005
- [2] 应国清, 陆红娅, 王 鸿, 等. 中药肿节风的研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2007, 41(6): 85-87.
- [3] 国家食品药品监督管理局官方网站 (<http://app1.sfda.gov.cn/datasearch/fac3/base.jsp>).
- [4] 王钢力, 陈道峰, 林瑞超, 等. 肿节风的化学成分及其制剂质量控制研究进展[J]. 中草药, 2003, 34(8): 附 12-14.
- [5] 王钢力, 翟为民, 姚令文, 等. 肿节风的 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中草药, 2005, 36(12): 1801-1803.
- [6] 王钢力, 姚令文, 翟为民, 等. 肿节风不同药用部位及野生与栽培品指纹图谱的对比研究[J]. 中草药, 2006, 37(7): 1092-1095.
- [7] 吴永江, 侯晓蓉, 程翼宇. 肿节风 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(1): 67-39.
- [8] 李晖莹, 何蓉蓉, 梁 婷, 等. 九节茶提取物对小鼠免疫性肝炎及急性炎症的影响[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(2): 244-250.
- [9] Vivek S, Joydeep G, Soumya G, et al. Antiviral and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of Japanese encephalitis[J]. AAC, 2007, 51(9): 3367-3370.
- [10] Osakabe N, Takano H, Sanbongi C, et al. Anti-inflammatory and anti-allergic effect of rosmarinic acid (RA); inhibition of seasonal allergic rhinoconjunctivitis (SAR) and its mechanism [J]. Bio Factors, 2004, 21: 127-131.