

没食子药材 HPLC 指纹图谱研究

周 露¹, 斯拉甫·艾白^{1,2*}, 李治建¹, 范晓红¹, 孟繁龙¹

1. 新疆维吾尔自治区维吾尔医药研究所, 新疆 乌鲁木齐 830049

2. 新疆维吾尔自治区维吾尔医医院, 新疆 乌鲁木齐 830049

摘 要: 目的 研究 10 个产地没食子药材的高效液相色谱指纹图谱, 为科学评价和有效控制其质量提供可靠方法。方法 采用 Waters Symmetry ShieldTM RP C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 甲醇-0.2%磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 柱温 30 ℃, 体积流量 1 mL/min, 检测波长 270 nm, 进样量为 20 μL。结果 对所采集的没食子药材进行测定, 建立了没食子药材的指纹图谱, 有 7 个共有峰, 有 2 批药材的相似度低于 0.9, 与其他批次样品差异较大; 此 HPLC 方法的精密度、稳定性和重现性良好。结论 此方法准确、可靠、可控性强, 可用于没食子药材的质量控制。

关键词: 没食子; HPLC; 指纹图谱; 壳斗科; 没食子酸

中图分类号: R282.7 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)05-0919-04

Studies on HPLC fingerprint of *Quercina Galla*

ZHOU Lu¹, Silafu·Aibai^{1,2}, LI Zhi-jian¹, FAN Xiao-hong¹, MENG Fan-long¹

1. Institute of Xinjiang Uighur Medicine, Urumqi 830049, China

2. Xinjiang Uighur Medical Hospital, Urumqi 830049, China

Key word: *Quercina Galla*; HPLC; fingerprint; Fagaceae; gallic acid

没食子 *Quercina Galla* 是一种维吾尔医常用药材, 是壳斗科植物没食子树 *Quercus infectoria* Oliv. 幼枝上的干燥虫瘿, 由没食子蜂科昆虫没食子蜂 *Cynips gallae-tinctoriae* Oliv. 幼虫寄生而形成。其含有没食子鞣质 50%~70%、没食子酸 2%~4% 及并没食子酸、树脂等。性苦温, 具有收敛、止汗、止血等功能。用来治疗各种体癣、舌头炎、咽炎、牙龈炎、结肠溃疡及慢性腹泻等病症^[1]。色谱指纹图谱方法是评价药材质量的有效方法之一^[2-4]。目前, 关于没食子药材的 HPLC 指纹图谱研究未见报道, 因此本实验应用 HPLC 方法建立没食子药材指纹图谱, 并对其进行分析研究, 为控制没食子质量提供可靠方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters 1525 高效液相色谱仪, 配有 Waters 1525 Binary HPLC pump、Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector、手动微型进样器、Waters

Symmetry ShieldTM RP C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); BS224S 型电子天平 (德国)。

1.2 试药

没食子药材, 购于全国各地, 由新疆维吾尔自治区维吾尔医医院制剂中心艾尼瓦尔主任药师鉴定为没食子 *Quercina Galla*, 来源见表 1。没食子酸对照品 (批号 110831-200803) 购于中国药品生物制品检定所, 色谱甲醇 (美国 Fisher 公司), 分析甲醇 (天津市红岩化学试剂厂), 双蒸水 (自制)。

表 1 没食子药材
Table 1 Source of sample

编号	购买地	批号	编号	购买地	批号
1	湖北	20091012	6	湖北	20091211
2	山东	20090101	7	江苏	20100309
3	山东	20090522	8	江苏	20091022
4	山东	20091120	9	新疆	20100314
5	湖北	20100415	10	新疆	20090325

收稿日期: 2010-06-23

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划 (2007BAI30B03); 新疆维吾尔自治区科技支疆工程资助项目 (200840102-34)

作者简介: 周 露 (1985—), 女, 新疆伊犁人, 石河子大学硕士研究生。Tel: 15292856755 E-mail: zhoulu_bin@163.com

* 通讯作者 斯拉甫·艾白 Tel: (0991)2563702

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备^[5-7]

取没食子粉末(过 40 目筛) 2.5 g, 加入甲醇 50 mL, 超声提取 2 次, 料液比 1 : 20, 提取时间为 60、30 min, 滤过, 合并滤液, 用双蒸水定容至 250 mL 棕色量瓶中。从中取出 5 mL, 定容至 25 mL, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 得供试品溶液。

2.2 对照品溶液的制备

取没食子酸对照品适量, 精密称定, 置于棕色量瓶中, 加甲醇制成 3 μg/mL 的溶液, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

2.3 色谱条件

色谱柱: Waters Symmetry Shield™ RP C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇(A)-0.2% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱, 0~10 min, 20%A; 10~30 min, 40%A; 30~50 min, 45%A; 50 min 以后, 50%(A)。检测时间: 50 min; 柱温: 30 ℃; 体积流量: 1 mL/min; 进样量: 20 μL; 检测波长: 270 nm。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取没食子酸对照品, 精密称定, 按“2.2”项方法制备对照品溶液, 连续进样 5 次, 记录 HPLC 图谱, 以相对应的色谱峰相对保留时间和相对峰面积为指标计算 RSD。结果 RSD<3%, 表明该方法精密度良好。

2.4.2 重复性试验 精密称取同一药材粉末 5 份, 按“2.1”项方法制备供试品溶液, 记录 HPLC 图谱, 以色谱峰相对保留时间和相对峰面积为指标计算 RSD 值。结果 RSD<3%, 表明该方法重现性良好。

2.4.3 稳定性试验 取没食子药材粉末 1 份, 精密称定, 按“2.1”项方法制备供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12 h 检测, 以色谱峰相对保留时间为指标计算 RSD。结果 RSD<5%表明供试品溶液 12 h 稳定性良好。

2.5 HPLC 指纹图谱的建立^[8]

2.5.1 将 10 批没食子药材的供试品溶液按“2.3”项色谱条件进样, 通过 Waters 液相工作站处理, 得到不同产地没食子药材的 HPLC 指纹图谱叠加图和共有模式图(图 1)以及 10 批药材供试品的检测结果(表 2~4)。从图 1 可见, 原药材的主要特征峰相同, 说明不同产地的没食子药材的主要化学成分特征相似, 只是在峰高、峰面积等方面有所差异, 标定了 7 个共有峰。从表 2~4 的数据得出, 10 批药材共有峰峰面积占总峰峰面积比例都在 96%以上; 共有峰的相对峰面积的 RSD 值较大; 各相对峰的峰保留时间 RSD<5.0%。

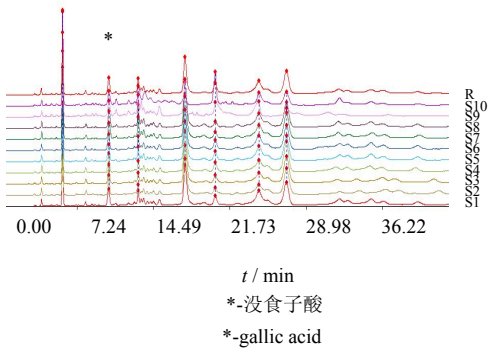


图 1 10 批没食子药材 HPLC 图谱叠加图
Fig. 1 HPLC overlapping chromatograms for 10 beaches of Quercina Galla

表 2 10 批没食子药材指纹图谱共有峰的峰面积
Table 2 Areas of common peaks for 10 batches of Quercina Galla in fingerprints

样 品	峰面积							共有峰峰面积	总峰峰面积	所占比例/%
	1(S)	2	3	4	5	6	7			
1	4 945	2 923	4 018	9 521	2 150	4 041	7 965	35 564	36 328	97.90
2	4 401	2 398	2 573	9 200	1 679	8 388	10 605	39 244	39 905	98.34
3	3 564	2 853	2 552	9 028	1 813	8 964	10 870	39 645	40 322	98.32
4	4 715	2 679	2 651	9 305	2 246	9 226	11 002	41 824	42 344	98.77
5	4 221	2 743	2 459	9 488	2 278	4 146	8 551	33 886	34 601	97.93
6	4 051	2 665	2 390	9 606	2 237	4 100	8 612	33 661	34 355	97.98
7	6 240	3 232	4 080	10 469	1 535	3 786	9 054	38 395	39 249	97.83
8	6 782	3 317	3 918	10 389	1 100	3 939	8 545	37 991	38 858	97.77
9	10 288	2 430	2 517	8 483	8 744	5 703	2 009	40 173	41 519	96.76
10	9 272	2 206	1 958	1 376	7 692	5 123	4 699	32 326	33 532	96.40
均值	5 848	2 745	2 912	8 686	3 147	5 742	8 191	37 271	38 101	97.82

表 3 10 批没食子药材指纹图谱共有峰相对峰面积

Table 3 Relative areas of common peaks for 10 batches of *Quercina Galla* in fingerprints

样 品	共有峰的相对峰面积						
	1	2	3	4	5	6	7
1	1	0.591 1	0.812 5	1.925 3	0.434 7	0.817 2	1.610 5
2	1	0.544 9	0.584 7	2.090 4	0.381 5	1.906 0	2.409 7
3	1	0.800 4	0.716 1	2.532 9	0.508 7	2.515 0	3.049 7
4	1	0.568 1	0.562 2	1.973 4	0.476 2	1.956 5	2.333 1
5	1	0.649 9	0.582 6	2.247 7	0.539 6	0.982 3	2.025 9
6	1	0.657 9	0.589 9	2.371 0	0.552 1	1.012 0	2.125 8
7	1	0.518 0	0.653 8	1.677 7	0.245 9	0.606 8	1.451 0
8	1	0.489 1	0.577 7	1.531 8	0.162 2	0.580 7	1.259 9
9	1	0.236 2	0.244 7	0.824 5	0.849 9	0.554 4	0.195 2
10	1	0.237 9	0.211 2	0.148 4	0.829 6	0.552 5	0.506 9
均值	1	0.529 3	0.553 5	1.732 3	0.498 1	1.148 3	1.696 8
RSD/%	0	17.72	18.85	73.89	21.93	71.29	87.97

表 4 10 批没食子药材指纹图谱共有峰的相对保留时间

Table 4 Relative retention time of common peaks for 10 batches of *Quercina Galla* in fingerprints

样 品	各峰相对保留时间/min						
	1 (S)	2	3	4	5	6	7
1	1	1.748 3	2.210 0	2.982 3	3.404 8	4.066 4	4.461 0
2	1	1.753 6	2.227 6	3.077 1	3.490 2	3.929 3	4.351 6
3	1	1.787 5	2.268 4	3.069 1	3.532 8	4.056 9	4.482 3
4	1	1.761 0	2.235 1	3.068 6	3.483 5	4.053 8	4.463 6
5	1	1.748 6	2.209 7	2.979 8	3.404 0	4.060 3	4.454 1
6	1	1.748 4	2.210 0	2.981 1	3.402 5	4.064 9	4.452 4
7	1	1.737 2	2.215 8	2.995 9	3.424 4	4.091 7	4.485 7
8	1	1.737 9	2.215 3	3.003 6	3.427 7	4.061 1	4.480 7
9	1	1.734 3	2.211 0	2.985 5	3.408 5	4.072 8	4.469 1
10	1	1.733 7	2.210 0	2.983 9	3.407 1	4.069 5	4.465 1
均值	1	1.749 0	2.221 3	3.017 9	3.440 3	4.044 1	4.456 6
RSD/%	0	1.62	1.87	4.14	4.64	4.46	3.86

2.5.2 指纹图谱相似度计算 利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版计算软件, 对 10 批没食子药材的 HPLC 图谱进行相似度计算, 结果见表 5, 有 8 批药材的相似度在 0.9 以上, 余下 2 批的相似度在 0.6~0.8。

3 讨论

3.1 提取溶剂和提取方法的选择

分别比较以水、甲醇、70%乙醇和 50%丙酮作为提取溶剂, 静置、水浴加热和超声的提取方法, 经过 HPLC 检测, 考察了峰数、峰面积、分离度等因素, 最终选择以甲醇为提取溶剂, 超声法为最佳提取方法。

3.2 检测波长的选择

通过 PDA 检测器对没食子提取物进行全波长

(200~400 nm) 扫描, 从三维信息谱图分析, 在 250~280 nm 波长处检测出的色谱峰较多, 在 270 nm 处出现的峰最多, 且在此波长下, 没食子的主要成分没食子酸有最大吸收, 整体图谱较为匀称, 基线平稳, 因此将 270 nm 设为本实验的检测波长。

3.3 流动相的选择

分别采用甲醇-水、甲醇-0.1%磷酸、甲醇-0.2%磷酸、乙腈-水为流动相, 以甲醇-水和乙腈-水作为流动相系统时, 出峰数目都很少, 并且分离度差, 峰形较差; 甲醇-0.1%磷酸和甲醇-0.2%磷酸系统相比较, 后者出峰数目多, 分离效果更好, 漂移现象较弱。因此选择以甲醇-0.2%磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱。

3.4 柱温的选择

表 5 10 批样品的相似度计算结果
Table 5 Results of similarity analysis in fingerprint for 10 batches of *Quercina Galla*

样 品	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	对照
1	1	0.939	0.926	0.934	0.993	0.991	0.993	0.991	0.785	0.677	0.993
2	0.939	1	0.971	0.971	0.953	0.952	0.929	0.925	0.705	0.663	0.961
3	0.926	0.971	1	0.980	0.942	0.941	0.912	0.906	0.682	0.640	0.949
4	0.934	0.971	0.980	1	0.947	0.946	0.922	0.918	0.717	0.677	0.956
5	0.993	0.953	0.942	0.947	1	0.989	0.986	0.981	0.763	0.661	0.999
6	0.991	0.952	0.941	0.946	0.989	1	0.985	0.979	0.756	0.651	0.998
7	0.993	0.929	0.912	0.922	0.986	0.985	1	0.997	0.764	0.665	0.988
8	0.991	0.925	0.906	0.918	0.981	0.979	0.997	1	0.776	0.673	0.984
9	0.785	0.705	0.682	0.717	0.763	0.756	0.764	0.776	1	0.871	0.766
10	0.677	0.663	0.640	0.677	0.661	0.651	0.665	0.673	0.871	1	0.674
对照	0.993	0.961	0.949	0.956	0.999	0.998	0.988	0.984	0.766	0.674	1

在甲醇-0.2%磷酸为流动相的条件下,根据对柱温 25、30、35 ℃的图谱进行比较,发现 30 ℃时出峰数目最多并且分离度较好。实验结果显示,温度过低,分离度较差;温度过高,使得后半部分峰的峰形变宽变扁,并且柱温过高,对色谱柱损害也较大。因此,最终选择 30 ℃为最佳柱温。

3.5 参照物的选择

没食子中的没食子酸在图谱中出峰时间在 5.9 min,此峰峰面积大,峰形好,稳定,是没食子药材的一个重要鉴别色谱峰。因此,选择没食子酸作为没食子 HPLC 指纹图谱的参照物。

相似度在一定程度可以体现药材的优劣与真假,现已成为一种科学的评价方法,为中药材的质量控制提供依据。从本实验 10 批药材的相似度分析结果来看,新疆的没食子药材相似度低于 0.9,与其他产地药材差异较大。因此本研究建立的指纹图谱可以快速鉴别不同来源的没食子药材,有利于全面控制药材质量,促进药材和制剂水平的提高。今后结合没食子药材药理学方面的相关性研究,会

更全面地对其进行质量评价和控制。

参考文献

[10] 维吾尔药材标准 [S]. 1993.
[11] Shen Z, zhang W T, Hua Y F, *et al.* Fingerprint analysis of four varants of *Chrysanthemi Morifolis Flos* by RP-HPLC [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(2): 153-156.
[12] 罗 文, 刘 斌, 王 伟, 等. 山楂药材指纹图谱研究 [J]. *现代药物与临床*, 2009, 24(1): 39-42.
[13] 逢楠楠, 毕开顺, 闫宝庆, 等. 芫花高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. *中草药*, 2010, 41(5): 818-821
[14] 杜瑞莲, 杨中林. 五倍子中鞣质提取工艺研究 [J]. *中成药*, 2008, 30(6): 839-841.
[15] 周本宏, 王慧媛, 刘 敏, 等. 石榴皮药材 HPLC 指纹图谱研究 [J]. *中药分析与鉴定*, 2008, 19(30): 2351-2353.
[16] 贝玉祥, 郭 英, 和万芬, 等. 诃子中总多酚的测定及其超声提取工艺的研究 [J]. *生物技术*, 2008, 18(2): 82-84.
[17] 汪文涛, 伍城颖, 马一华, 等. 刺壳花椒 HPLC 指纹图谱的研究 [J]. *中草药*, 2009, 40(4): 634-637.