

千年健 HPLC 指纹图谱研究

何 丹¹, 张舒涵¹, 王佳凤¹, 李晋奇^{1,2*}, 胡 远²

1. 电子科技大学医学院, 四川 成都 610054

2. 四川省医学科学院, 四川省人民医院, 四川 成都 610072

摘要: 目的 采用 HPLC 法对 10 批不同厂家的千年健药材进行指纹图谱研究, 并采用相似度计算的方法, 评价千年健药材的质量。方法 采用 HPLC 法测定不同厂家的 10 批千年健药材。Phenomenex Gemini 110A C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 乙腈 (A) -0.01% 磷酸水溶液 (B) 为流动相进行梯度洗脱, 柱温 30 ℃, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 290 nm。利用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”对指纹图谱进行相似度评价。结果 建立了千年健药材 HPLC 指纹图谱, 确定了 11 个共有峰, 指认了 1 个峰, 除了 S4 和 S10 两批, 指纹图谱的相似度达到 0.887 以上; 所建立的千年健药材指纹图谱测定方法精密性、稳定性和重复性良好。结论 首次建立了千年健药材的 HPLC 特征指纹图谱, 不仅为千年健药材的鉴别、质量控制等提供了新的科学依据, 还对千年健药材的质量评价具有重要的意义。

关键词: 千年健; HPLC; 指纹图谱; 质量控制; 原儿茶酸

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)05-1165-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.05.027

HPLC fingerprint of *Homalomena occulta*

HE Dan¹, ZHANG Shu-han¹, WANG Jia-feng¹, LI Jin-qi^{1,2}, HU Yuan²

1. School of Medicine of UESTC, Chengdu 610054, China

2. Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the fingerprint analysis of *Homalomena occulta* and evaluate the quality through similarity calculation. **Methods** Waters e2695 was applied to analyze ten batches of *H. occulta*. Phenomenex Gemini 110A C₁₈ column was performed (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile and 0.01% phosphoric acid in a gradient mode at a flow rate of 1.0 mL/min at 290 nm and the separation was performed at 30 ℃. The similarity was analyzed with *Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Chinese Materia Medica 2004A*. **Results** The HPLC characteristic fingerprint of *H. occulta* with 11 common peaks, and one of them were identified by comparing with reference substances. The values of similarity was higher than 0.887. The HPLC method showed better results of stability, precision, and repeatability. **Conclusion** It is the first time to establish the HPLC fingerprint of *H. occulta*. Those described can not only provide an identification method for fingerprint, but also provide the foundation of quality control.

Key words: *Homalomena occulta* (Lour.) Schott; HPLC; fingerprint; quality control; protocatechuic acid

千年健为天南星科植物千年健 *Homalomena occulta* (Lour.) Schott 的干燥根茎, 又名千颗针、丝棱线^[1], 产于我国广西、云南^[2]等地, 具有祛风湿、壮筋骨之功效, 临床常用于治疗风湿性关节炎、类风湿性关节炎。化学研究表明千年健中含大量挥发油成分, 《中国药典》2015 版一部规定以千年健中芳樟醇的含量 (不少于 0.2%) 来控制千年健药材的质量^[3], 但此单指标成分不能全面地评价该药材的

优劣。中药指纹图谱是控制天然药物质量的有效方式之一, 指纹图谱能全面整体地反映药材的内在质量^[4-7], 能为中药的质量评价和控制提供一个有效的参考方法。全面、系统而又特征地指纹图谱有利于全方位地控制中药质量并与国际接轨, 高效液相色谱指纹图谱的研究日益增多, 查阅文献, 目前尚未发现千年健指纹图谱的研究报道。

本实验以中药千年健为研究对象, 基于 HPLC

收稿日期: 2017-06-22

作者简介: 何 丹 (1991—), 女, 研究生在读, 初级药师, 研究方向为药物研究与转化。Tel: 15756362665 E-mail: m15756362665@163.com

*通信作者 李晋奇 Tel: 17708130637 E-mail: lijinqi2002@126.com

建立了方法稳定、简便、可靠的千年健高效液相色谱指纹图谱,结合指纹图谱对千年健药材相似度进行评价,以期为千年健药材的鉴别、质量控制提供新的科学依据,并为其全面的质量评价提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters e2695 高效液相色谱仪, Waters 2998 PDA 检测器, Empower3 色谱数据工作站(美国 Waters 公司); BP211D 型十万分之一电子分析天平(德国 Sartorius 公司); 优普系列纯水系统(成都超纯科技有限公司); KQ-500DB 型数控超声波清洗器

(昆山市超声仪器有限公司); 标准药典筛(浙江绍兴市不锈钢筛厂)。

1.2 试药

10 批不同厂家千年健信息见表 1, 经成都中医药大学蒋桂华教授鉴定为天南星科植物千年健 *Homalomena occulta* (Lour.) Schott 的干燥根茎。原儿茶酸对照品(成都普思生物科技股份有限公司, 批号 PS0916-0025), 质量分数大于 98%。甲醇、乙腈均为色谱纯(DIKMA 公司), 磷酸为分析纯(成都科龙化工试剂厂), 试验用水为超纯水。

表 1 千年健信息

Table 1 Information of *H. occulta*

编号	厂家	批号	产地	编号	厂家	批号	产地
S1	广东顺和堂药业	160617	广西	S6	北京同仁中药堂	170101	广西
S2	河北省安国市瑞琪中药材有限公司	161211	广西	S7	亳州市大西北药业有限公司	16080997	亳州
S3	广西康美药业股份有限公司	160809341	广西	S8	四川省中药饮片有限责任公司	151008	广西
S4	安徽亳州三义堂(百姓平价药业)	130601	亳州	S9	四川成都市荷花池中药材专业市场港鑫堂	未知	广西
S5	安徽亳州兴和堂中药材批发	1702010	湖北	S10	四川成都市荷花池中药材专业市场 1701 号商铺	未知	广西

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱: Phenomenex Gemini 110A C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A)-0.01% 磷酸溶液(B), 梯度洗脱, 0~10 min, 2.5% A; 10~20 min, 2.5%~3% A; 20~35 min, 3%~5% A; 35~40 min, 5%~8% A; 40~50 min, 8%~10% A; 50~60 min, 10%~14% A; 60~80 min, 14%~15% A; 80~90 min, 15%~20% A; 90~110 min, 20%~30% A; 其中 0~10 min 体积流量为 0.5 mL/min, 其余体积流量均为 1 mL/min; 柱温 30 ℃; 进样量 10 μL; 检测器 Waters 2998 PDA; 检测波长 290 nm。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取原儿茶酸对照品, 加入甲醇制成含原儿茶酸 1.001 3 mg/mL 的对照品溶液, 摇匀, 涡旋 30 s, 即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取千年健药材粉末(3 号筛) 2.00 g, 置于 10 mL 容量瓶中, 加甲醇 8 mL, 超声提取 30 min, 静置冷却, 再用甲醇补足减失质量, 离心, 取上清液蒸发干燥, 残渣加 1 mL 甲醇复溶, 涡旋 30 s, 用 0.45 μm 有机系微孔滤膜滤过, 取续滤液, 所得溶液即为供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取千年健药材(S8), 按“2.2.2”

项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图。各共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 2.56%, 相对峰面积 RSD 均小于 1.46%, 将同一供试品溶液连续进样 6 次得到的色谱图进行相似度分析, 结果显示其相似度均大于 0.980, 表明仪器精密度良好, 符合指纹图谱的技术要求。

2.3.2 稳定性试验 取千年健药材(S8), 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别于 0、3、6、9、12、24 h 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图, 考察各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明, 各共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 3.00%, 相对峰面积 RSD 均小于 2.18%。将得到的色谱图导入分析软件进行相似度分析, 结果显示其相似度均大于 0.980, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 取千年健药材(S8) 6 份, 分别按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图。各共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 2.26%, 相对峰面积 RSD 均小于 2.85%。将得到的色谱图导入分析软件进行相似度分析, 结果显示其相似度均大于 0.990, 表明方法重复性良好, 符合指纹图谱的技术要求。

2.4 结果与分析

2.4.1 千年健药材指纹图谱的建立与分析 取 10 批

千年健药材按“2.2.2”项下制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,得到 10 批千年健药材的液相色谱图。取原儿茶酸对照品按“2.2.1”项下制备对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,得到原儿茶酸对照品的液相色谱图(图 1)。将 10 批千年健药材的液相色谱图导入国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版),设 S6 为参照图谱,采用中位数、时间窗为 0.6 的方法,计算 10 批千年健药材和对照指纹图谱之间的相似度,得到 10 批药材在 290 nm 波长下的指纹图谱(图 2),经过谱峰多点校正后生成共有模式的对照指纹图谱(图 3),确定 11 个共有峰。

2.4.2 峰的确认 根据已确认的 11 个共有峰,通过与对照品溶液色谱图的比对,确认其中的 7 号峰为原儿茶酸。因其在各样品中均存在,分离度好,故选取 7 号峰原儿茶酸为参照峰(S)。

2.4.3 数据分析 对 10 批不同厂家的千年健药材指纹图谱进行分析,以 7 号峰原儿茶酸为参照峰,以参照峰的保留时间和峰面积作为 1,分别计算共有色谱峰的相对保留时间(表 2)和相对峰面积(表 3)。采用“色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”对 10 批样品的指纹图谱数据进行分析,计算 10 批千年健和对照指纹图谱之间的相似度,除 S4 和 S10 与对照图谱的相似度分别为 0.492 和 0.624 外,其余厂家千年健样品与对照图谱的相似度分别是 S1 为 0.951、S2 为 0.988、S3 为 0.968、S5 为 0.887、S6 为 1.000、S7 为 0.965、S8 为 0.912、S9 为 0.902、均在 0.887~0.988,其中 S1、S2、S3、S7 与对照图谱的相似度高达 0.95 以上。不难看出千年健总体相似度较高,说明本实验所购买的不同厂家的千年健质量稳定,个别厂家相似度较低,可能与产地、栽培、采收等因素有关。

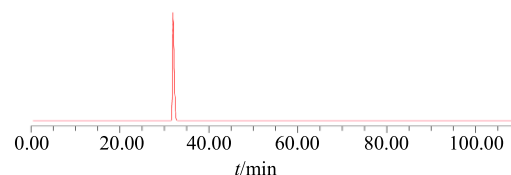


图 1 原儿茶酸对照品色谱图谱

Fig. 1 HPLC standard chromatographic fingerprint for protocatechuic acid

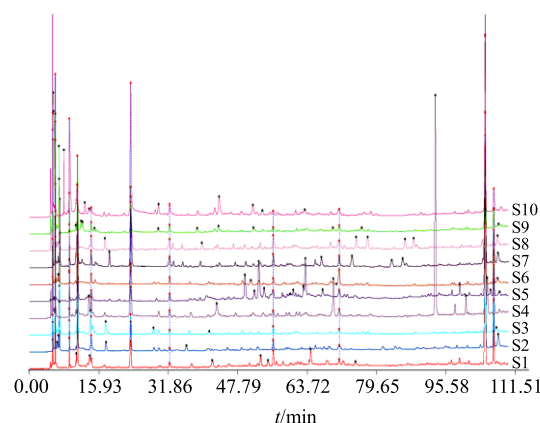


图 2 10 批千年健药材叠加指纹图谱

Fig. 2 HPLC standard chromatographic fingerprint for ten batches of *H. occulta*

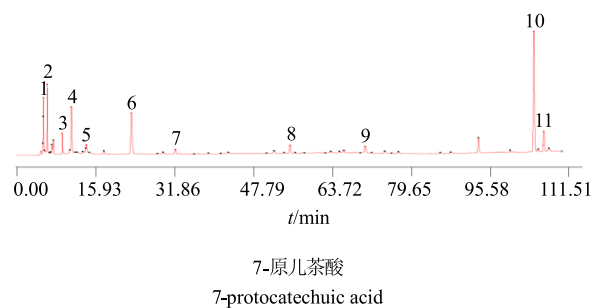


图 3 对照指纹图谱

Fig. 3 HPLC standard chromatographic fingerprint of *H. occulta*

表 2 共有指纹峰相对保留时间

Table 2 Relative retention time of common peaks

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	RSD/%
1	0.176 8	0.175 5	0.170 1	0.175 0	0.169 8	0.168 9	0.169 1	0.176 5	0.165 5	0.164 4	2.65
2	0.204 1	0.207 4	0.204 8	0.205 0	0.198 9	0.201 8	0.205 5	0.212 9	0.195 7	0.194 8	2.71
3	0.276 9	0.283 3	0.279 4	0.281 4	0.275 5	0.278 9	0.281 6	0.296 6	0.271 1	0.269 1	2.71
4	0.350 7	0.346 9	0.333 6	0.344 9	0.330 3	0.327 0	0.325 1	0.381 3	0.324 5	0.316 6	5.55
5	0.445 5	0.438 4	0.441 7	0.452 7	0.414 3	0.406 0	0.408 6	0.509 6	0.410 5	0.397 1	7.70
6	0.713 2	0.718 8	0.706 7	0.709 3	0.718 6	0.718 8	0.719 5	0.818 5	0.715 4	0.711 1	4.57
7	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.00
8	1.728 7	1.786 7	1.780 6	1.678 3	1.654 7	1.598 1	1.770 2	1.875 1	1.639 8	1.563 3	5.69
9	2.281 3	2.385 2	2.161 8	2.180 8	2.129 8	2.126 1	2.282 3	2.290 8	2.082 2	2.110 2	4.54
10	3.278 1	3.302 9	3.293 1	3.294 3	3.207 7	3.235 8	3.281 2	3.408 3	3.101 1	3.142 6	2.69
11	3.342 3	3.366 2	3.357 5	3.355 8	3.267 8	3.299 7	3.344 8	3.468 2	3.161 8	3.197 3	2.68

表 3 共有指纹峰相对峰面积

Table 3 Relative peak area of common peaks

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	RSD/%
1	4.157 2	4.237 8	4.542 9	5.094 7	4.463 0	4.667 0	4.593 1	4.690 6	5.157 6	5.140 7	8.36
2	1.946 9	2.268 4	2.417 9	2.472 1	1.803 3	2.188 8	2.101 5	2.299 5	2.297 2	2.242 9	10.14
3	0.847 8	0.868 3	0.835 6	1.044 8	0.849 1	0.955 2	0.892 5	0.881 5	0.928 1	0.931 7	7.70
4	4.748 0	5.846 0	5.666 1	7.509 2	6.367 0	6.230 9	5.389 7	5.641 7	5.860 2	6.349 2	13.31
5	1.448 6	1.299 4	1.306 7	1.622 4	1.127 6	1.373 8	1.134 0	1.459 1	1.135 2	1.030 7	15.64
6	3.026 9	3.338 4	2.490 8	13.254 2	13.143 3	2.501 4	6.092 7	6.291 5	3.694 7	12.625 6	71.00
7	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.00
8	0.801 0	0.906 0	0.913 1	0.927 0	0.742 8	0.732 1	0.849 4	0.723 1	0.638 1	0.690 8	14.01
9	1.212 1	1.093 5	1.077 9	1.213 5	1.046 3	1.269 0	1.025 1	1.021 2	1.099 8	1.063 1	8.60
10	12.018 0	14.375 6	16.163 9	13.306 0	9.984 5	16.860 0	15.169 2	15.242 8	12.856 1	10.543 2	18.39
11	3.271 1	3.263 7	3.380 8	3.687 2	2.450 2	3.528 0	3.100 4	3.087 0	2.547 3	2.931 4	13.77

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

中药 HPLC 指纹图谱应以尽量多的检测出样品的有效成分、洗脱尽量多的色谱峰,并且分离度良好为指标^[8]。流动相的一般要求是对样品有适当的溶解度,不与样品发生化学反应,也不与固定液互溶,不对样品组分检测产生干扰作用。根据试凑试验法^[9],本研究对比考察了甲醇-水、甲醇-0.01%磷酸溶液、乙腈-水、乙腈-0.01%磷酸溶液流动相系统,综合考虑,最终选定乙腈-0.01%磷酸溶液为实验流动相系统;实验中对千年健样品 200~500 nm 波长内的色谱图进行扫描,综合比较主要色谱峰信息,最终选定 290 nm 为检测波长。

3.2 HPLC 法在千年健指纹图谱中的首次尝试

《中国药典》2015 版一部规定千年健的质量采用气相色谱法(通则 2201)测定芳樟醇的含量控制,并规定芳樟醇($C_{10}H_{18}O$)的量不得少于 0.20%^[3]。芳樟醇气相色谱的研究已经明确,但这种单一成分的质量控制不足以体现药材质量的优劣,中药指纹图谱是控制天然药物质量的有效方式之一。查阅文献,尚未发现千年健指纹图谱的研究报道,HPLC 法因其不受样品的挥发性和热稳定性的限制,固定相种类多,流动相影响分离过程^[7]等优势在指纹图谱的研究中发挥越来越重要的作用,因此,本实验借助高效液相色谱技术弥补了千年健药材指纹图谱的空白,首次建立了不同厂家千年健的 HPLC 特征指纹图谱,且方法稳定、简便、可靠,除 S4 和 S10 与对照图谱的相似度分别为 0.492 和 0.624 外,另外 8 批千年健药材的指纹图谱整体峰形相似,图谱的

相似度达到 0.887 以上,说明药材质量总体比较稳定。确定 11 个共有峰,确认了其中的 7 号峰为原儿茶酸,相似度分析结果反映出千年健质量较平稳。

4 结论

本实验所建立的千年健药材的 HPLC 指纹图谱的分析方法,精密度、稳定性、重复性和分离度良好。通过比较确定了 11 个共有峰,指认了 1 个峰。通过相似度评价,分析千年健药材 HPLC 指纹图谱有一定的差别。本研究可为千年健药材的鉴别、质量控制提供一定的科学依据。指纹图谱结合相似度分析对不同厂家千年健药材的全面质量控制具有重要的意义。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草 (第八册) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998.
- [2] 中华人民共和国卫生部药政管理局, 中国药品生物制品检定所. 中药材手册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1989.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [4] 王月红, 韩璐, 许浚, 等. 基于化学指纹图谱和多指标测定的柿叶药材质量研究 [J]. 中草药, 2017, 48(6): 1205-1209.
- [5] 罗国安, 梁琼麟, 王义明. 中药指纹图谱: 质量评价、质量控制与新药研发 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2009.
- [6] 李彤彤, 韩红园, 王宝丽, 等. 红花 UPLC 法特征指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2017, 48(5): 997-1004.
- [7] 刘亚楠, 石典花, 雷留成. 金银花与山银花的 HPLC 指纹图谱鉴别研究 [J]. 中草药, 2017, 48(4): 773-776.
- [8] 彭韵燕. 高效液相色谱结合化学计量学在中药指纹图谱及复杂药物体系分析中的应用 [D]. 南昌: 南昌大学, 2007.
- [9] 张玉奎, 王杰, 张维冰. 实用高效液相色谱法的建立 [M]. 北京: 华文出版社, 2001.