

河南产山檀醋酸乙酯部位 HPLC 指纹图谱研究

雷敬卫¹, 陈随清^{1*}, 吴德康² (1.河南中医学院, 郑州 450008; 2.南京中医药大学, 南京 210046)

摘要: 目的 建立山檀醋酸乙酯部位的 HPLC 色谱指纹图谱。方法 采用高效液相色谱法, 色谱条件: 依利特 Hypersil ODS2 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱分析柱; 流动相: 甲醇-水梯度洗脱; 检测波长 297 nm; 柱温 30 ℃; 流速 1.0 mL·min⁻¹。结果 本试验在测定了 23 批山檀药材醋酸乙酯部位的 HPLC 色谱指纹图谱的基础上, 建立了山檀药材醋酸乙酯部位的 HPLC 色谱指纹图谱, 并进行了相似度分析, 除了河南省西峡县产山檀药材的相似度比较低外, 其余相似度都在 0.85 以上。结论 本方法简便、快捷、可靠, 可用于山檀药材的质量控制。

关键词: 山檀; 醋酸乙酯部位; 高效液相色谱法; 指纹图谱

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2009)10-0783-03

Study on HPLC Fingerprint of Ethyl-acetate Part of *Radix Lindera Reflexae* in Henan Province

LEI Jingwei¹, CHEN Suiqing^{1*}, WU Dekang² (1.Henan University of TCM, Zhengzhou 450008, China; 2.Nanjing University of TCM, Nanjing 210046, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish HPLC fingerprint of ethyl acetate part of *Radix linderae reflexae*. **METHODS** HPLC method was used. Chromatographic column was a Hypersil ODS2 C₁₈(250 mm ×4.6 mm, 5 μm); mobile phase was water-methanol with gradient elution; detected wavelength was 297 nm; column temperature was 30 ℃; flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **RESULTS** The HPLC fingerprint of ethyl acetate part of *Radix linderae reflexae* was established based on the determination of 23 batches of *Radix linderae reflexae*, and the similarity was analyzed. The similarity evaluation is above 0.85 except the sample S13 collected from Xixia country in Henan province. **CONCLUSION** The method is simple and reliable, and can be used for control the quality of *Radix linderae reflexae*.

KEY WORDS: *Radix lindera reflexae*; ethyl acetate part; HPLC; fingerprint

山檀 *Lindera reflexa* Hemsl. 系樟科 Lauraceae 山胡椒属植物, 俗名土沉香、香棍等, 以根入药。本品为民间草药, 最早记载于清代的《植物名实图考》, 称为野樟树。现代《浙江药用植物志》、《中药大辞典》、《全国中草药汇编》等著作均有记载, 功能祛风理气, 止血, 主治胃脘胀痛, 胃寒疼痛, 噎气吞酸及消化性溃疡等证。山檀主产于河南大别山区, 为河南特产中成药“胃痛宁片”的主要原料^[1]。为了探讨山檀药材的质量控制标准, 笔者利用 HPLC 对其主要有效部位——醋酸乙酯部位进行了指纹图谱研究。

1 仪器与试剂

岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪, SPD-20A 型紫外检测器, CBM-102 型色谱工作站(日本岛津公司)。甲醇、乙腈为色谱纯, 醋酸乙酯、冰乙酸为分析纯, 水为双蒸水。23 批山檀样品分别于 2004 年

7 月—2006 年 8 月采自河南省信阳地区, 经河南中医学院生药教研室陈随清教授鉴定系樟科山胡椒属植物山檀 *Lindera reflexa* Hemsl 的根, 标本存于河南中医学院生药研究室。对照品球松素, 由本试验室从山檀中提取, 经 ¹³C-NMR、¹H-NMR 鉴定, HPLC 面积归一化法测定纯度为 99.10%。

2 色谱条件

色谱柱: Hypersil ODS2 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇-水, 程序性梯度洗脱: 0~5 min 甲醇(50%→65%); 5~15 min, 甲醇(65%→75%); 15~40 min, 甲醇(75%→100%); 纯甲醇保持 5 min; 检测波长: 297 nm; 柱温: 30 ℃; 流速: 1.0 mL·min⁻¹。

3 溶液制备

3.1 对照品溶液的制备

精密称取球松素对照品, 加醋酸乙酯超声溶

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目(206085); 河南省科技攻关项目(0523031800); 河南省教育厅科技攻关项目(2008A360016)

作者简介: 雷敬卫, 男, 博士, 副教授 Tel:(0371)65575596
Tel:(0371)65676686 E-mail: suiqingchen@163.com

E-mail: ljwei@hactcm.edu.cn *通信作者: 陈随清, 男, 博士, 教授

解,用醋酸乙酯稀释至刻度,配成 $40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,作为对照品溶液。

3.2 供试品溶液的制备

取山檀药材粉末 0.5 g (过 24 目筛),精密称定,置于具塞三角烧瓶中,加入醋酸乙酯 25 mL ,精密称定重量,超声处理 30 min ,放冷,用醋酸乙酯补足减失的重量,滤过。精密量取续滤液 5 mL ,置于 25 mL 量瓶中,用醋酸乙酯定容至刻度,作为供试品溶液。分析时用 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过。

4 方法与结果

山檀 HPLC 色谱图以 S18 号山檀药材为供试品,取供试品溶液 $5\text{ }\mu\text{L}$ 注入高效液相色谱仪,考察 120 min 药材的色谱分离情况,结果见图 1 A,样品在 50 min 后没有峰出现,故每次进样后的检测时间为 50 min 。以参照物球松素的保留时间和峰面积为 1 ,计算各峰的相对保留时间及相对峰面积,结果见图 1 B。

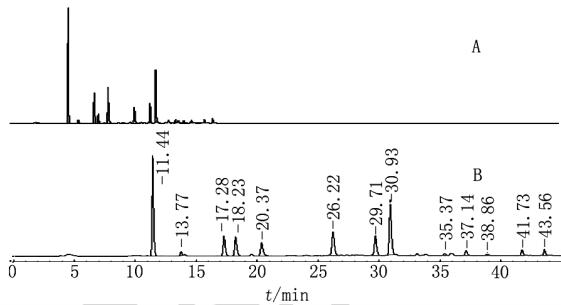


图 1 山檀药材高效液相色谱图

A-供试品; B-对照品

Fig 1 HPLC chromatogram of *Lindera reflexa* Hemsl.

A-sample; B-control

4.1 仪器精密度试验

取 S18 号山檀药材的供试品溶液,连续进样 6 次,计算各色谱峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值,结果显示, RSD 均小于 1.0% ,表明仪器精密度良好。

4.2 重复性试验

以 S18 号山檀药材为供试品,分别称取 6 份各 0.5 g ,按“3.2”项下方法处理, 6 份供试品中各色谱峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均小于

表 1 山檀药材指纹图谱相似度

Tab 1 The similarity of the HPLC fingerprint of *Lindera reflexa* Hemsl.

样品	相似度	样品	相似度	样品	相似度	样品	相似度	样品	相似度	样品	相似度	样品	相似度	样品	相似度
S1	0.970	S4	0.970	S7	0.991	S10	0.970	S13	0.644	S16	0.953	S19	0.940	S22	0.880
S2	1.000	S5	0.969	S8	0.956	S11	0.974	S14	0.930	S17	0.978	S20	0.950	S23	0.969
S3	0.881	S6	0.908	S9	0.967	S12	0.962	S15	0.967	S18	0.957	S21	0.948		

3.0% ,表明该试验方法重复性良好。

4.3 稳定性试验

取新鲜制备的 S18 号山檀药材的供试品溶液,分别在 $0, 1, 2, 4, 8, 12, 24\text{ h}$ 进样,计算各色谱峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值, RSD 均小于 3.0% ,表明样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

4.4 乙酸乙酯部位指纹图谱的建立

根据 23 批供试品 HPLC 图谱所给出的相关参数,见图 2,与对照品图谱对照指认其中的 5 号峰为球松素。以球松素为参照峰,参照《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求》(2004 A),并根据 10 批供试品气相图谱,采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件生成对照指纹图谱,见图 3。参照物球松素标号为 $5(S)$,其他共有峰依次标号为 $1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13$ 。

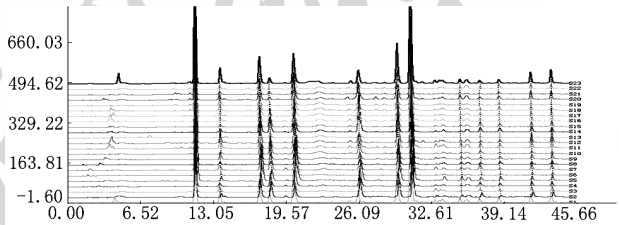


图 2 23 批山檀药材的高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of samples

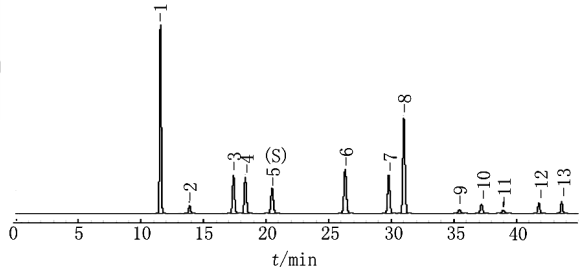


图 3 山檀对照指纹图谱

Fig 3 The fingerprint of *Lindera reflexa* Hemsl.

4.5 不同来源山檀原药材指纹图谱相似度分析

采用国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A)对 23 批山檀药材的指纹图谱进行相似度分析,结果见表 1。

结果显示:不同产地山檀药材在上述色谱条件下分析所获得的指纹图谱,以共有模式为参照进行相似度分析,其相似度除 S13(河南省西峡县)为 0.644 外,其余均在 0.85 以上,说明山檀药材化学成分一致性较好,质量比较稳定^[2]。

5 讨论

在本研究中,试验所分离的黄酮类成分主要是在醋酸乙酯部位,所以采用醋酸乙酯作为提取溶剂。另与甲醇作溶剂进行了对比试验。甲醇提取液色谱图虽然比醋酸乙酯部位多一峰,但是其他时间段的峰面积都比醋酸乙酯提取液色谱图要小,且分离度不理想。

在山檀药材的液相图谱中,检测出的成分主要是有紫外吸收的物质,而紫外光谱又是鉴定黄酮类化合物的一项重要方法,所以选择用紫外检测器作为山檀指纹图谱的检测器。本试验还将醋酸乙酯提取液进行了紫外全波长扫描,发现其在 297 nm 有最大吸收,因此,本试验选用 297 nm 作为检测波长。

药材的化学成分含量与生长地点、生态环境、生长年限、气候、采收贮藏、炮制加工等因素有关。本试验用的样品,来源比较广泛,样品间存在一定

差异,差异性表现在各共有峰的相对峰面积差别较大,如样品 S13 的相似度较低(0.644),研究其挥发油指纹图谱时,其相似度也较低。笔者将进一步研究其药效的相关性,为山檀的质量标准提供依据。

本研究前期工作对山檀进行系统溶剂提取,确定其抗溃疡、镇痛、抗炎的有效部位为乙酸乙酯部位,通过对 23 批药材的有效部位(乙酸乙酯部位)的指纹图谱进行研究,最终建立山檀的有效部位的指纹图谱,与简单的建立山檀药材的指纹图谱相比,更能反映药材的内在质量,对于确定药材的采收年限,进一步开发其地上部位的药用价值,保证药效提供参考。

REFERENCES

- [1] CHEN S Q, ZUO T. Medicinal plant resources lindera genus in Henan: studies of its pharmacology, chemical components and application [J]. J Henan Univ Chin Med (河南中医学院学报), 2005, 20(3): 25-27.
- [2] LIU E H, CAI G M, ZHU H S, et al. HPLC fingerprint of bupleurum smithii var parvifolia [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2008, 39(10): 1560-1562.