

十大功劳 HPLC 指纹图谱及聚类分析

刘布鸣^{1,2*}, 刘偲翔^{1,2}, 林霄^{1,2}, 黄艳^{1,2}, 何开家^{1,2}, 陈明生^{1,2}, 陈德眉³

(1. 广西中医药研究院, 南宁 530022; 2. 广西中药质量标准研究重点实验室, 南宁 530022;
3. 百色广洋百草开发公司, 广西 百色 533000)

[摘要] **目的:**对十大功劳的 HPLC 指纹图谱及聚类分析进行研究,用以评价与控制药材内在质量。**方法:**采用 HPLC 法分析阔叶、长柱十大功劳的指纹图谱,运用指纹图谱相似度评价和聚类分析进行研究。**结果:**建立了十大功劳指纹图谱,确定 10 个色谱峰为共有峰,方法的精密度、稳定性、重现性良好,其指纹图谱相似性高,特征性和专属性强。**结论:**阔叶、长柱十大功劳的指纹图谱化学成分基本相同,但含量差异较大,相似度与聚类分析显示二者无明显差异,利用指纹图谱可对十大功劳进行质量控制。

[关键词] 十大功劳;液相色谱;指纹图谱;聚类分析

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)04-0095-05

Study on HPLC Chromatographic Fingerprint of the Mahonia Fortunei

LIU Bu-ming^{1,2*}, LIU Si-xiang^{1,2}, LIN Xiao^{1,2}, HUANG Yan^{1,2},
HE Kai-jia^{1,2}, CHEN Ming-sheng^{1,2}, CHEN De-mei³

(1. Guangxi Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Science, Nanning 530022, China;
2. Guangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards, Nanning 530022, China;
3. Company of Baise Guangyang Baicao, Baise 533000, China)

[Abstract] **Objective:**To establish the method of fingerprint analysis on Mahonia Fortunei for controlling the quality. **Method:**The main components of the Mahonia Fortunei from different samples were determined by HPLC. **Result:**Ten common peaks were confirmed on the fingerprint, studying on the fingerprint of the Mahonia Fortunei. **Conclusion:**The method is reliable and accurate with good reproducibility and characteristic, providing a scientific base for controlling the quality of Mahonia Fortunei by establishing fingerprint of the Mahonia Fortunei.

[Key words] Mahonia Fortunei; chromatographic fingerprint; HPLC

十大功劳属植物广泛分布于南方各地,主要以根、茎入药^[1]。《中国药典》一部“功劳木”项下收载其中两个品种:阔叶十大功劳与细叶十大功劳的干燥茎。功能清热燥湿、泻火解毒,主要用于湿热泻痢、黄疸、目赤肿痛、胃火牙痛、痈肿、痢疾、黄疸型肝炎^[2-3]。长柱十大功劳为小檗科十大功劳属植物^[1],与阔叶十大功劳、细叶十大功劳为同一科属,

常与功劳木药材混用。十大功劳中含有多种生物碱,是一类主要有效成分,十大功劳的品种和质量与其相关。指纹图谱分析是国际上公认的控制中药、天然药品种与质量的综合、有效的方法。本文在化学成分比较分析的基础上,利用液相色谱法进行指纹图谱及聚类分析研究,建立十大功劳高效液相指纹图谱分析方法。

1 材料

1.1 仪器 江苏昆山 KQ5200B 型超声波仪(160 W, 40 kHz),上海 TG328A 型分析天平,威玛龙 LC-9000D 高效液相色谱仪,威玛龙 WM2010 型通用多媒体色谱工作站。乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

1.2 对照品 粉防己碱(批号 110711-200507,供

[收稿日期] 20110323(002)

[基金项目] 广西科学基金项目(桂科自 0832226);广西大型仪器协作网项目(685-2008-098)

[通讯作者] * 刘布鸣,研究员,硕士研究生导师,从事中药、天然药化学成分与质量标准研究, Tel: 0771-5883405, E-mail: liubuming@ yahoo. com. cn

含量测定用)、盐酸药根碱(批号 0733-200005,供鉴别用)、盐酸巴马汀对照品(批号 110732-200506,供含量测定用)、盐酸小檗碱对照品(批号 1101713-200208,供含量测定用),对照品均购于中国药品生物制品检定所。

1.3 样品 阔叶十大功劳 *Mahonia bealei* (Fort.) Carr 采自广西南宁、蒙山、桂林,长柱十大功劳 *Mahonia duclouxiana* Gagnep. 采自广西百色、南宁、蒙山、湖南吉首,经广西中医药研究院何开家主任药师鉴定。取茎,切片,粉碎,过 80 目筛,备用。

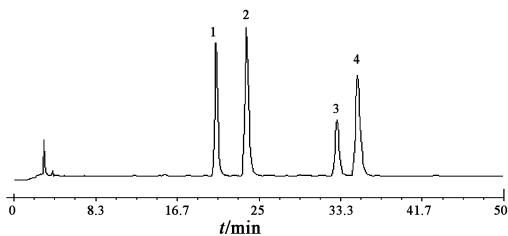
2 方法与结果

2.1 供试品溶液与参照物溶液的制备 供试品溶液的制备:取样品粉末约 0.2 g,精密称定,置于 25 mL 量瓶中,加入 1% HCl-MeOH 约 20 mL,冷浸 30 min,超声处理 30 min,放冷至室温,加入 1% HCl-MeOH 至刻度,摇匀,过滤,精密量取续滤液 10 mL 至蒸发皿,60 °C 以下水浴蒸干,残渣加乙腈-0.2% 磷酸溶解,转移至 10 mL 量瓶,定容,微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

参照物溶液的制备:精密称取粉防己碱、盐酸药根碱、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀适量,置于 10 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2 检测波长的选择 比较了 346, 280, 254, 203 nm 4 个波长,当 $\lambda = 203$ nm 时,色谱峰较多且峰形较好,粉防己碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱均有较强吸收,综合考虑,选定 203 nm 为指纹图谱的测定波长。

2.3 色谱条件与系统适应性试验 大连依利特 Sino Chrom ODS-BP 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相乙腈(A)-0.2% 磷酸水溶液(B) 梯度洗脱(0~45 min, 18%~28% A, 45~55 min, 28%~50% A; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 203 nm; 柱温室温; 进样量 10 μL; 分析时间 60 min。在上述色谱条件下,粉防己碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱的分离均 > 1.5, 各主要峰分离良好(图 1)。



1. 粉防己碱; 2. 盐酸药根碱; 3. 盐酸巴马汀; 4. 盐酸小檗碱

图 1 混合对照品 HPLC 图谱

2.4 特征峰与内参照峰的确定 按上述测定条件

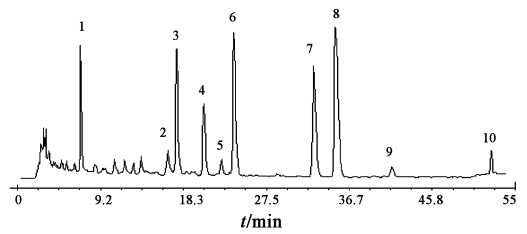


图 2 十大功劳共有峰特征指纹图谱

记录各批样品的色谱图,从中选取了 10 个共有峰作为可以构成指纹图谱的稳定的特征峰,采用对照品确认其中的已知成分为 4 号峰,粉防己碱;6 号峰,盐酸药根碱;7 号峰,盐酸巴马汀;8 号峰,盐酸小檗碱。比较各批样品的色谱图,这 10 个色谱峰是共有的,确定为共有指纹特征峰(图 2),共有指纹峰的峰面积占总峰面积的 90% 以上。盐酸药根碱为十大功劳中主要成分之一,从指纹图谱中可以得出盐酸药根碱的色谱峰分离较好,峰位居中,峰面积所占的比例较大且相对稳定,因此选择盐酸药根碱为内参照物,确定盐酸药根碱峰(6 号峰)为内参照峰,盐酸药根碱的色谱图见图 1。从十大功劳 2 h 指纹图谱(图 3)可见,60 min 后无有意义峰出现,故确定记录时间为 60 min。以盐酸药根碱色谱峰(S 峰)的保留时间和峰面积为 1,计算各共有峰的相对保留时间和峰面积相对比值,共有指纹峰特征参数和相对含量见表 1。取供试品溶液和参照物溶液进行分析,以归一化法计算各主要色谱峰的相对峰面积。记录 60 min 色谱,60 min 以后基本出峰完全。

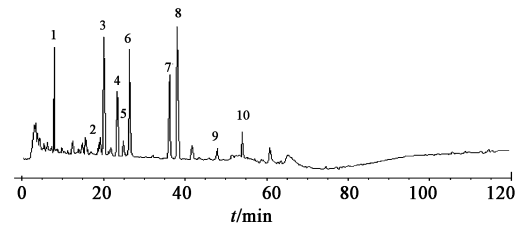


图 3 十大功劳 2 h 指纹图谱

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 取同一批样品制备供试品溶液,连续进样 6 次,检测指纹图谱,记录各共有峰的保留时间和峰面积,以盐酸药根碱色谱峰的保留时间和峰面积为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3%,符合指纹图谱要求。

2.5.2 重复性试验 取同一批样品 6 份,分别制备供试品溶液,检测指纹图谱,记录各共有峰的保留时间和峰面积,以盐酸药根碱色谱峰的保留时间和峰面积为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对

表 1 十大功劳 10 个共有指纹峰的特征

峰号	化学成分	相对保留时间	相对峰面积比值
1		0.297 4	1.069 0
2		0.692 7	0.242 5
3		0.734 2	1.332 9
4	粉防己碱	0.847 8	1.264 1
5		0.942 8	0.183 7
6	盐酸药根碱/S	1.000 0	1.000 0
7	盐酸巴马汀	1.376 5	0.124 0
8	盐酸小檗碱	1.494 9	2.235 3
9		1.696 2	0.147 7
10		2.176 1	0.124 0

峰面积。结果显示,各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均在误差范围内,相对保留时间 RSD < 3%,相对峰面积 RSD < 5%,符合指纹图谱

要求。

2.5.3 稳定性试验 取同一批样品制备供试品溶液,分别于 0,1,3,6,12,24 h 进样,检测指纹图谱,记录各共有峰的保留时间和峰面积,以盐酸药根碱色谱峰的保留时间和峰面积为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示,各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3%,在误差范围内,表明供试品在 24 h 内相对稳定性、相似性良好,符合指纹图谱要求。

2.6 指纹图谱的建立 分别取不同样品制备供试品溶液,检测指纹图谱,记录各共有峰的保留时间和峰面积,以盐酸药根碱色谱峰的保留时间和峰面积积分为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示,各批样品 10 个共有指纹峰的相对保留时间、相对峰面积比值,重叠率和相似度较好,测定结果见表 2,3。

表 2 十大功劳指纹图谱共有峰的相对保留时间

批号	产地	峰号									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0701B	广西百色	0.298 3	0.697 6	0.743 2	0.861 1	0.942 9	1.000 0	1.373 5	1.479 0	1.696 8	2.158 6
0701N	广西南宁	0.303 3	0.685 3	0.734 4	0.855 1	0.942 9	1.000 0	1.392 9	1.500 4	1.766 0	2.282 3
0804B	广西百色	0.292 8	0.695 5	0.735 7	0.860 7	0.943 1	1.000 0	1.369 7	1.469 3	1.730 7	2.189 9
0807B	广西百色	0.301 0	0.681 0	0.727 2	0.842 9	0.934 2	1.000 0	1.380 4	1.487 2	1.761 3	2.236 5
0808M1	广西蒙山	0.297 6	0.690 3	0.737 8	0.847 5	0.938 2	1.000 0	1.385 3	1.483 4	1.728 3	2.235 4
0808M2	广西蒙山	0.296 8	0.683 2	0.728 4	0.843 5	0.895 9	1.000 0	1.375 3	1.487 4	1.726 2	2.217 5
0808B	广西百色	0.292 8	0.695 5	0.735 7	0.860 7	0.943 1	1.000 0	1.369 7	1.469 3	1.730 7	2.189 9
0906B	广西百色	0.301 1	0.690 6	0.734 8	0.847 3	0.938 7	1.000 0	1.388 6	1.493 2	1.765 4	2.261 7
0906H	湖南吉首	0.289 5	0.723 2	0.732 0	0.902 4	0.941 5	1.000 0	1.381 5	1.450 0	1.824 4	2.120 3
0906M	广西蒙山	0.286 5	0.741 4	0.775 7	0.904 4	0.941 8	1.000 0	1.375 4	1.453 4	1.815 8	2.096 4
平均值	/	0.296 0	0.698 4	0.738 5	0.862 6	0.936 2	1.000 0	1.379 2	1.477 3	1.754 6	2.198 8
RSD/%	/	1.838 7	2.749 8	1.875 0	2.624 6	1.543 3	0.000 0	0.573 3	1.122 6	2.318 6	2.731 4

将所得的色谱图采用中药色谱指纹图谱相似度评价软件 2004 版(国家药典委员会)进行数据处理,将 10 批样品的色谱图进行校正匹配并比较(图 4),生成可全面反映多个色谱图特征的对照色谱图(图 5),并以此模式为基准,计算每个色谱图与之比较的相似度,均 > 0.9。

2.7 阔叶、长柱十大功劳指纹图谱比较与聚类分析

在相同色谱条件下,将阔叶和长柱十大功劳指纹图谱进行分析,并与对照指纹图谱比较。结果发现相似度均 > 0.9。将 5 批阔叶和 10 批长柱十大功劳

样品的 10 个共有峰相对峰面积作为特征,采用组间联接法,以欧式平方距离对样品聚类,结果 15 个样品分作 3 类,第 1 类包括 0701B,0701N,0804B,0807B,0808M1,0808M2,0808B,0906B,0701N,K0805B,K0806B,K0807M;第 2 类包括 0906H,K0808G;第 3 类为 0906M;得到聚类分析树状图(图 6)。采用 Mahalanobis 法,以 F 值作标准对本方法的分类结果进行判别,聚类判别结果(图 7)显示本方法对初始分组 100% 正确分类,对交叉验证分组 94.4% 正确分类。

表 3 十大功劳指纹图谱共有峰的相对峰面积

批号	产地	峰号									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0701B	广西百色	0.781 5	0.156 3	0.654 3	0.774 3	0.170 4	1.000 0	1.814 4	2.677 8	0.217 8	0.394 0
0701N	广西南宁	0.016 6	0.027 1	0.009 6	0.218 9	0.096 2	1.000 0	0.759 4	0.475 8	0.046 3	0.004 5
0804B	广西百色	0.486 8	0.174 3	0.820 6	0.444 8	0.103 2	1.000 0	0.855 5	1.416 8	0.084 2	0.104 8
0807B	广西百色	0.654 2	0.121 1	1.488 6	0.582 6	0.175 8	1.000 0	1.341 2	2.316 5	0.123 3	0.029 1
0808M1	广西蒙山	1.639 2	0.147 1	0.525 8	2.827 8	0.233 9	1.000 0	1.055 4	3.379 1	0.093 7	0.066 2
0808M2	广西蒙山	1.901 8	0.367 9	0.667 3	2.181 4	0.351 9	1.000 0	2.344 4	2.808 8	0.401 7	0.284 1
0808B	广西百色	0.486 8	0.174 3	0.820 6	0.444 8	0.103 2	1.000 0	0.855 5	1.416 8	0.084 2	0.104 8
0906B	广西百色	0.447 6	0.100 6	0.284 2	0.369 5	0.152 3	1.000 0	1.071 1	0.922 3	0.066 5	0.100 8
0906H	湖南吉首	0.433 5	0.043 9	7.663 6	0.022 1	0.146 3	1.000 0	0.446 8	3.428 3	0.079 3	0.118 3
0906M	广西蒙山	3.842 0	1.112 0	0.394 6	4.774 8	0.303 5	1.000 0	2.864 8	4.511 2	0.280 1	0.033 8
平均值	-	1.069 0	0.242 5	1.332 9	1.264 1	0.183 7	1.000 0	1.340 8	2.335 3	0.147 7	0.124 0
RSD/%	-	105.92	131.74	169.45	121.11	47.462	0.000 0	57.322	54.356	78.203	98.587

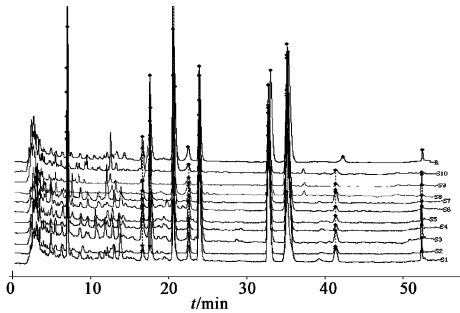


图 4 10 批十大功劳指纹图谱 (时间窗 0.5) 比较

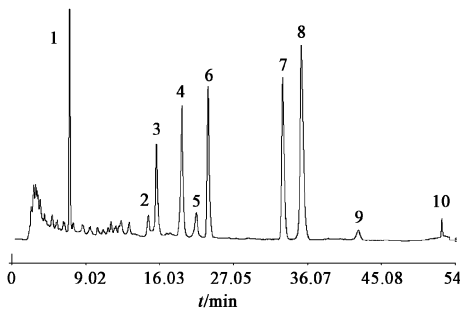


图 5 十大功劳对照指纹图谱

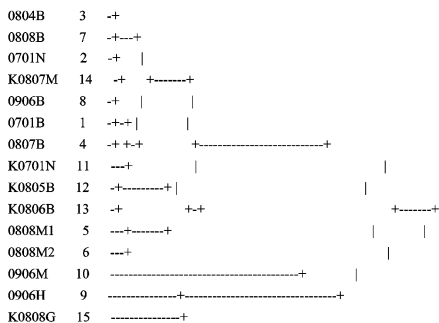


图 6 聚类分析树状图

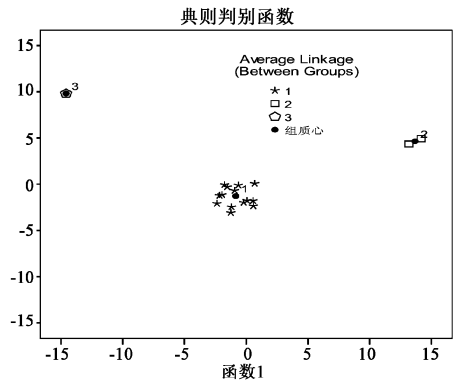


图 7 聚类判别结果

聚类分析实验结果,15 批样品相似度均 > 0.80, 聚类分析树状图亦显示长柱十大功劳与阔叶十大功劳样品属同一类,无明显差异,推断阔叶和长柱十大功劳与所含化学成分非常相似。由于样品 0906H, 0906M, K0808G 为幼枝,其余批次均为成熟茎,从相似度计算结果可见这 3 批样品的相似度相对偏低 (0.808, 0.806, 0.863), 聚类分析结果亦显示这 3 批样品与其余批次样品不在同一类中,是主要成分含量偏低所致,推测药材部位的成熟程度与所含化学成分及含量密切相关。

3 讨论

本研究建立的 HPLC 分析方法,精密度、重复性及稳定性均良好,不同来源的十大功劳主要成分基本相同,都含有粉防己碱、药根碱、小檗碱、巴马汀等 10 个共有指纹峰,共有峰的相对保留时间 RSD 均 < 3%,表明其在 HPLC 色谱的相对位置稳定,可作为定性鉴别的指标参数;相对含量部分成分存在差异,

三白草体外抗氧化活性

尹震花¹, 顾雪竹², 张一冰¹, 王佳佳¹, 康文艺^{1*}

(1. 河南大学中药研究所, 河南 开封 475000; 2. 中国中医研究院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 研究三白草体外抗氧化活性。方法: 采用清除二苯代苦味酰基 (DPPH) 自由基和 [2,2'-连氮-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐] (ABTS) 自由基测定法, 对三白草提取物抗氧化活性进行评价。结果: 正丁醇提取物清除 DPPH 自由基 ($IC_{50} = 16.94$) 的能力比 BHT 清除能力 ($IC_{50} = 18.71 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 强, 弱于阳性对照 PG 和 BHA 清除 DPPH 自由基的能力 (IC_{50} 分别为 $0.89, 3.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$); 清除 ABTS 自由基的能力 ($IC_{50} = 12.90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 弱于阳性对照 PG 和 BHA 清除 ABTS 自由基的能力 (IC_{50} 分别为 $0.81, 1.95 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 比阳性对照 BHT (IC_{50} 为 $7.72 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 清除 ABTS 自由基的能力略弱; 石油醚提取物和乙酸乙酯提取物清除 DPPH 和 ABTS 自由基的能力均比阳性对照 PG, BHT, BHA 清除 DPPH 和 ABTS 自由基的能力弱。结论: 三白草正丁醇提取物有抗氧化活性。

[关键词] 三白草; 抗氧化活性; 二苯代苦味酰基; 2,2'-连氮-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)04-0099-04

Antioxidant Activity of *Saururus chinensis* in vitro

YIN Zhen-hua¹, GU Xue-zhu², ZHANG Yi-bing¹, WANG Jia-jia¹, KANG Wen-yi^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia, Henan University, Kaifeng 475000, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, Traditional Chinese Medical Research Institute, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To study the antioxidant activity of *Saururus chinensis* in vitro. **Method:** The antioxidant activities of *S. chinensis* were evaluated by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging

[收稿日期] 20110927(001)

[基金项目] 河南省科技厅重点攻关项目(102102310019)

[第一作者] 尹震花, 在读硕士研究生, 从事中药活性成分研究, Tel: 15890342801, E-mail: yinzhenhua1000@126.com

[通讯作者] * 康文艺, 教授, 从事中药活性成分及新药研究, Tel: 0378-3880680, E-mail: kangweny@hotmail.com

提示该部分成分的含量稳定性稍差些, 虽然有差别, 但均为共有构成特征, 故将这 10 个峰作为指纹图谱的特征峰。十大功劳的化学成分较复杂, 组分多且相对含量低, 含量偏差较大, 10 个指标成分群是从 10 多批样品中选出的相对含量较大、特征性较强的共有峰, 10 个共有指纹峰占总峰面积的 90% 以上, 非共有峰总峰面积 < 10%, 具有代表性。不同样品之间相对含量比值有差异, 甚至某些组分差异较大, 这对天然产物是很正常的, 但其指纹图谱的整体面貌极其相似, 所建立的指纹图谱相对保留时间重现性好, 相似度较高, 可以作为鉴别十大功劳质量的指标之一。

聚类分析结果显示长柱十大功劳与阔叶十大功劳所含化学成分非常相似, 为同十大功劳属植物的

化学成分提供了理论参考, 对于扩大功劳木药源及新药开发奠定了理论依据, 目前药材市场上长柱十大功劳常与功劳木药材混用, 广西长柱十大功劳资源丰富、而阔叶十大功劳资源短缺, 长柱十大功劳能否成为功劳木药材的替代品有待进行深入的化学、药理、临床的研究。

[参考文献]

- [1] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志. 29 卷 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 223.
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2005: 58.
- [3] 江苏新医药学院. 中药大辞典. 上册[M]. 上海: 人民出版社, 1977: 11.

[责任编辑 蔡仲德]