

覆盆子药材的 HPLC 特征指纹图谱研究^{*}

★ 苗菊茹 谢一辉 刘红宁 (江西中医学院 南昌 330006)

摘要:目的:采用 HPLC 法建立覆盆子药材的指纹图谱。方法:应用 Hypersil ODS C₁₈ 色谱柱、1% 冰醋酸水溶液和甲醇采用梯度洗脱,流速 1 ml/min,检测波长 266 nm。结果:精密度和重现性试验中各共有峰相对面积的 RSD 均小于 5%,符合有关规定。结论:HPLC 特征指纹图谱可作为控制覆盆子药材内在质量的标准。

关键词:覆盆子;HPLC;指纹图谱;质量控制

中图分类号:R 282.5 **文献标识码:**A

Study on the HPLC Fingerprinting of Fupenzi Crude Drugs

MIAO Ju-Ru, XIE Yi-Hui, LIU Hogn-Ning

Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006

ABSTRACT: Objective: To study on the HPLC fingerprinting of Fupenzi crude drugs. Methods: The measurement conditions are used as follows: Hypersil ODS C₁₈ column; mobile phase: 1% acetic acid-water and methanol, gradient elute; flow rate: 1.0 ml/min; wavelength: 266 nm. Results: Both the RSD of precision and reproducibility are lower than 5%. Conclusion: The HPLC fingerprinting of Fupenzi can be used for quality control of Fupenzi crude drugs.

Key Words: Fupenzi; HPLC; Fingerprinting; Quality control

覆盆子为蔷薇科悬钩子属植物华东覆盆子 *Rubus chingii* Hu 的果实,因叶裂如掌也称掌叶覆盆子,具有补肾固精,助阳缩尿的功效,除用于阳痿早泻、遗精、肾虚缩尿等症的治疗外,尚用于食疗和保健。近年来有关药理实验证明,覆盆子具有抗诱变^[1],改善学习记忆能力,延缓衰老^[2],增强免疫的作用^[3]。然而,国内外学者对覆盆子的成分和质量控制研究较少,并且均未从整体上表征覆盆子药材品质特性。质量控制是中药现代化的第一步,而指纹图谱技术是质量控制的关键。本文采用 HPLC 法,研究了覆盆子药材甲醇提取物的高效液相色谱

图,考察了 20 种市售药材 HPLC 谱图的相关性,建立了覆盆子药材指纹图谱检测方法,为进一步完善覆盆子质量标准奠定了基础。

1 实验材料

1.1 仪器 色谱柱: Hypersil ODS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 美国 Waters 高效液相色谱仪(510 泵,二极管阵列检测器), Agilent 1100 液相色谱仪(紫外-可见检测器), Agilent 1100 色谱工作站; METTER AE240 电子天平; 指纹图谱分析软件: FPCASE (Finger Print Computer Assist Similarity Evaluation), 中南大学化学化工学院中药现代化

^{*} 基金项目: 国家“十五”攻关项目资助(2004BA721A23)

研究中心(梁逸曾教授小组)编写。计算机运行环境:赛扬 1.7G,WINXP。

1.2 药材及试剂 甲醇为色谱纯,双蒸水(自制),其余试剂均为分析纯;共收集不同地区的 20 个覆盆子产地或市售药材,购买于同一地区的药材是在不同时间购于不同药店,所购药材经我院褚小兰教授鉴定为华东覆盆子(*Rubus chingii* Hu)。详见表 1。

标准样品来源:中国药品生物检定所。

表 1 覆盆子样品来源

购买地	购买方式	购买时间	编号
江西天海药业	基地提供	2002.10	江西 1
南昌黄庆仁栈药店	直接购买	2002.10	江西 2
上海	委托购买	2003.2	上海 1
上海	直接购买	2003.5	上海 2
兰州	直接购买	2003.2	兰州
长沙	直接购买	2003.2	长沙
南昌开心人药店	直接购买	2003.5	江西 3
广州	直接购买	2003.8	广州 1
广州	直接购买	2003.8	广州 2
珠海	直接购买	2003.8	珠海
深圳	直接购买	2003.8	深圳
中国药品生物检定所	直接购买	2003.8	标品
樟树	直接购买	2003.10	樟树
杭州	委托购买	2003.10	杭州
常德	委托购买	2003.10	常德
鹰潭	委托购买	2003.10	鹰潭
山东	委托购买	2003.10	山东
武汉	委托购买	2003.10	武汉
南京	委托购买	2003.10	南京
徐州	委托购买	2003.10	徐州

2 方法与结果

2.1 供试液的制备 取覆盆子粗粉 0.5 g,精密称定,加甲醇 30 ml,回流提取 1.5h,放冷,滤过,滤液蒸干,残渣用甲醇溶解并定容至 10 ml,过 0.45 μ m 微孔滤膜,为供试液。

本实验用上述 20 个样品按本法制得 20 个供试品液进行 HPLC 检测,得到 1~20 号图谱。结果见图 1。

2.2 色谱条件 流动相:甲醇(A)和 1% 的醋酸水溶液(B)系统;柱温:30 $^{\circ}$ C;流速:1ml/min;检测波长:266 nm;进样量:10 μ l;梯度洗脱条件见表 2。

表 2 梯度洗脱条件

时间(min)	甲醇(%)	醋酸水溶液(%)
0	0	100
30	15	85
35	15	85
60	40	60

2.3 特征共有峰研究 比较 20 个不同来源的覆盆子药材甲醇提取物的 HPLC 图谱,可以看到各个图谱所表现的峰形大致相同又有所不同,体现了指纹

图谱整体性和模糊性的特点。从图 1 和图 2 可以看出,供试液中主要成分基本完全分离,并且,第 1 号峰至第 10 号峰为各样品的共有峰。

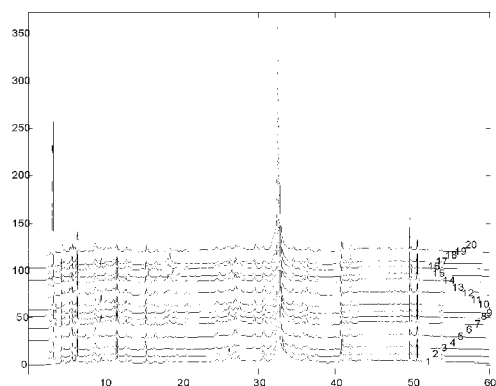


图 1 不同地区 20 个覆盆子样品 HPLC 指纹图谱

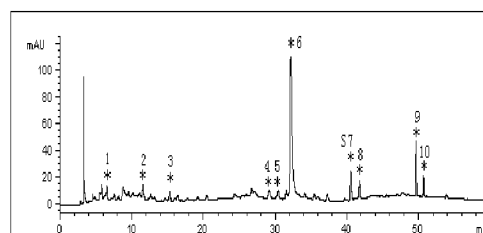


图 2 覆盆子 HPLC 指纹图谱

在 20 个样品色谱图中,第 7 号峰保留时间和峰面积均较其它峰相对稳定,故选定第 7 号峰为参照峰,其他各峰的保留时间和峰面积分别与参照峰的保留时间和峰面积相比,比值作为各峰的相对保留时间(RT)和相对峰面积(RS),以考察方法的精密度和稳定性。

2.4 精密度及稳定性考察 取供试液,进样 6 次,依法检测 HPLC 色谱图,色谱图中第 1~10 号峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 见表 3。表明本方法精密度良好,12h 内稳定性良好。

2.5 重现性试验 精密称取上海 1 号药材 6 份,按 2.1 供试液制备方法制得供试液 6 份,依法检测分别得色谱图。以第 7 号峰为内标,计算各峰的相对保留时间和相对面积,色谱图中第 1~10 号峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 见表 4。结果表明,该方法重现性令人满意。

2.6 相似度分析 将所得到的 20 个样品的 HPLC 图谱数据,采用国家药典委员会所推荐的中南大学梁逸曾教授小组编写指纹图谱相似度评价软件进行

评价。计算出相关系数和相合系数指标进行评价。结果见表 5。

表 3 覆盆子 HPLC 指纹图谱精密度和稳定性考察结果

峰号	相对峰面积 RSD(%)	相对保留时间 RSD(%)
1	2.41	0.3
2	2	0.12
3	1.82	0.14
4	3.69	0.09
5	0.71	0.03
6	1.37	0.05
7	0	0
8	0.97	0.01
9	2.32	0.03
10	1.07	0.03

表 4 覆盆子 HPLC 指纹图谱重现性试验结果

峰号	相对峰面积 RSD(%)	相对保留时间 RSD(%)
1	5.21	1.42
2	2.31	1.51
3	3.71	0.87
4	1.24	1.04
5	2.11	1.89
6	2.5	0.5
7	0	0
8	3.01	2.01
9	0.91	2.12
10	2.12	2.12

表 5 不同地点覆盆子指纹图谱的相似度分析结果

样品编号	对应图上编号	相关系数 (中位数)	相关系数 (均值)	相合系数 (中位数)	相合系数 (均值)
江西 3	1	0.9767	0.9734	0.9820	0.9801
樟树	2	0.9281	0.9228	0.9236	0.9175
常德	3	0.9751	0.9730	0.9774	0.9746
长沙	4	0.9851	0.9854	0.9896	0.9893
杭州	5	0.9755	0.9741	0.9803	0.9783
山东	6	0.9929	0.9930	0.9943	0.9937
南京	7	0.9964	0.9978	0.9976	0.9985
武汉	8	0.9955	0.9976	0.9939	0.9962
徐州	9	0.9929	0.9949	0.9873	0.9899
标品	10	0.9910	0.9929	0.9938	0.9947
江西 1	11	0.9781	0.9824	0.9848	0.9871
江西 2	12	0.9941	0.9959	0.9916	0.9937
兰州	13	0.9908	0.9933	0.9871	0.9900
鹰潭	14	0.9947	0.9969	0.9945	0.9967
广州 1	15	0.9885	0.9903	0.9919	0.9933
广州 2	16	0.9933	0.9961	0.9941	0.9965
珠海	17	0.9849	0.9888	0.9762	0.9807
深圳	18	0.9811	0.9817	0.9863	0.9859
上海 2	19	0.9841	0.9843	0.9890	0.9888
上海 1	20	0.9842	0.9842	0.9859	0.9847

由相似度数据可知:相关系数的中位数在 0.928 1~0.996 4 之间,相关系数的均值在 0.922 8~0.997 8 之间,相合系数的中位数在 0.923 6~0.997 6 之间,相合系数的均值在 0.917 5~0.998 5 之间。总体来看,除 2 号样品外各个产地样品的相

似度都比较高,均分布在 0.97 以上,以大于 0.98 为多。可见,这些覆盆子药材质量都比较相似,相似度情况反映了其质量较为均一,但 2 号樟树药材的稍低。由 20 个样本所得至的共有模式见图 3。由上述相似度计算可初步认为,相关系数与相合系数均大于 0.9 的为合格产品。

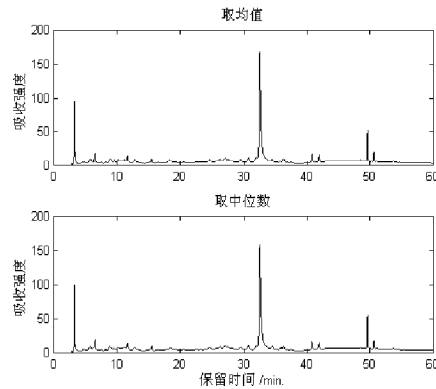


图 3 覆盆子 20 个样本的相关系数的中位数和均值

3 讨论

试验比较了甲醇回流提取、甲醇超声提取、水回流提取和水超声提取等几种样品液制备的方法,结果显示甲醇回流提取的方法最佳。比较了二种色谱柱和多种色谱条件,最后确定用甲醇-醋酸水梯度洗脱。

由于仪器的稳定性和试剂的差异性,即便是相同仪器相同条件下的色谱也不可避免的存在漂移的可能,因此,不同样本的同一组分很可能在保留时间上有所差别。

本方法未采用外加内标或外标物为参照物,而是以药材 HPLC 特征图谱中出峰时间稳定、面积适中的某个共有峰为参照物建立特征共有峰群。尽管目前尚不能确定该参照峰为何种化学成分,但以此建立的特征峰群特征性强、稳定性好,可用于覆盆子药材及其制剂的鉴别与质量评价,也可克服目前中药研究中缺乏标准品的问题。

参考文献

- [1] 付德润,钟承民,郭伟,等.覆盆子抗诱变作用的实验研究[J].中国全科医学杂志,1998,1(1):35~37
- [2] 朱树森,张炳烈,李文彬,等.覆盆子对衰老模型小鼠脑功能的影响[J].中医药学报,1998(3):42~43
- [3] 陈坤华,方军,官斌,等.覆盆子提取成分促进淋巴细胞增殖作用及与环核苷酸的关系[J].上海免疫学杂志,1995,15(5):302~304

(收稿日期:2007-04-18)