

HPLC 指纹图谱结合系统聚类法对不同产地关黄柏药材的分析研究

Studies of Cortex Phellodendri Amuren on HPLC Fingerprint and Genealogical Cluster Analysis

张水寒/ZHANG Shui-han¹, 郭伟伟/GUO Wei-wei¹, 蔡光先/CAI Guang-xian^{1,2}

1. 湖南省中医药研究院, 长沙 410006

2. 湖南中医药大学, 长沙 410007

1. Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410006, China

2. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China

[摘要] 目的: 建立关黄柏药材 HPLC 指纹图谱, 为其质量控制提供有效的方法。方法: HPLC 法, Hypersil- C₁₈ 反相色谱柱, A 相为甲醇, B 相为 0.3% 磷酸二乙胺水溶液, 梯度洗脱, 检测波长为 230 nm; 系统聚类法, 对关黄柏样品的 HPLC- FP 中各特征峰的相对峰面积进行分析。结果: 20 批关黄柏样品指纹图谱相似度均在 0.80 以上, 其中道地药材样品质量较好。结论: 该方法稳定可靠, 可以有效地用于关黄柏药材的质量评价。

[关键词] 关黄柏; HPLC 指纹图谱; 系统聚类分析法; 中药学

[中图分类号] F284.1, TQ460.7*2

[文献标识码] A

[文章编号] 1000- 7857(2006)09- 0051- 03

Abstract: Aim: An effective and convenient method was established for HPLC fingerprints of Cortex Phellodendri Amuren, which provided an approach for quality control. Methods: Hypersil- C₁₈ column, phase A: meth, phase B: 0.3%, eluted with a gradient program and detected at 230 nm. Genealogical cluster analysis characteristic absorption band. Results: The fingerprint method for Cortex Phellodendri Amuren was established. The similarity of 20 batches of Cortex Phellodendri Amuren was not lower than 0.80. Conclusion: This validated method is available for quality evaluation and quality control in Cortex Phellodendri Amuren.

Key Words: Cortex Phellodendri Amuren; HPLC fingerprints; genealogical cluster analysis; traditional Chinese materia medica;

traditional Chinese materia medica

CLC Numbers: F284.1, TQ460.7*2

Document Code: A

Article ID: 1000- 7857(2006)09- 0051- 03

关黄柏为芸香科植物黄檗 *Phellodendron amurense* Rupr. 的干燥树皮, 具有清热燥湿、泻火除蒸、解毒疗疮的功能。用于湿热泻痢、黄疸、带下、热淋、脚气、痿痹、骨蒸劳热、盗汗、遗精、疮疡肿毒、湿疹瘙痒等^[1], 为湖南省道地药材。为了更加全面地检测其多种成分在药材中分布的全貌, 使药材的内在质量情况可视, 本文采用高效液相色谱 (HPLC) 法, 按照中药注射剂指纹图谱研究的技术要求 (暂行)^[2], 对不同产地的关黄柏进行了指纹图谱研究, 并应用 SPSS 软件中系统聚类法, 对关黄柏样品的 HPLC- FP 中各特征峰的相对峰面积进行分析, 作为评价和控制关黄柏药材内在质量的标准。

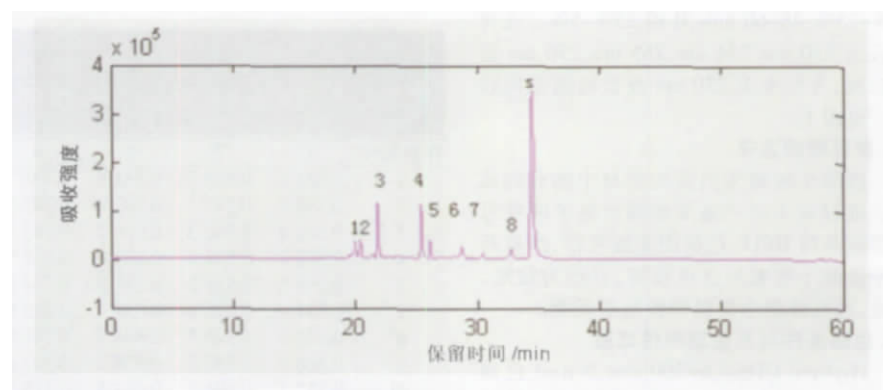


图 1 关黄柏样品高效液相指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of Cortex Phellodendri Amuren

收稿日期: 2006- 06- 29

基金项目: 湖南省卫生厅中医药科研基金课题(24303)

作者简介: 张水寒, 女, 湖南长沙市麓山路 58 号中医药研究院, 副研究员, 研究方向为中药制剂、中药质量分析;

E- mail: zhangshuihan0220@126.com;

蔡光先 (通讯作者), 男, 湖南长沙市韶山中路 113 号湖南中医药大学、湖南省中医药研究院, 研究员, 研究方向为内科学、中药临床药理学; E- mail: emily_gws@hotmail.com

1 仪器与试剂

1.1 仪器和设备

Agilent1100 高效液相色谱仪, SPD-M10Avp 二极管阵列检测器, Agilent 色谱工作站。

1.2 试剂

乙腈, 甲醇(色谱纯), 超纯水, 其余试剂均为分析纯; 对照品: 盐酸小檗碱(中国药品生物制品检定所)。

20 批关黄柏商品药材采购自湖南、四川、贵州、江西等地, 经湖南中医药研究院生药室温俊达副研究员鉴定, 为黄檗 *Phellodendron amurense* Rupr.

2 试验方法

2.1 对照物溶液的制备

精密称取盐酸小檗碱对照品, 适量, 加甲醇制成每 1 ml 含 50 μg 的溶液, 即得。

2.2 供试品溶液的制备

取本品粉末约 0.2 g, 精密称定, 置 50 ml 三角锥形瓶中, 加 1% 乙酸甲醇 30 ml, 超声 (360 W, 35 Hz) 2 次, 每次 1 h; 放冷, 滤过, 滤液合并, 蒸干, 残渣置 10 ml 容量瓶中, 加甲醇使其溶解; 定容, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 不同流动相体系及不同检测波长的选择

选择下列 2 种不同流动相体系梯度洗脱, 以同一样品(批号: 200502)进样, 进样量 5 μl 。乙腈-0.1%磷酸溶液。甲醇-0.3%磷酸二乙胺水。结果表明, 采用 b 流动相体系进行梯度洗脱分离效果比较理想。梯度洗脱程序: 0~25 min, B 相 95%~60%; 25~35 min, B 相 60%~45%; 35~45 min, B 相 45%~25%; 45~60 min, B 相 25%~5%。选择波长为 230 nm、254 nm、265 nm、270 nm 进行检测, 考察发现 230 nm 波长检测效果好。见图 1。

2.4 参照物的选择

盐酸小檗碱为关黄柏药材中的有效成分, 通过对不同产地及相同产地不同批号关黄柏药材 HPLC 色谱图系统考察, 所有药材中盐酸小檗碱的含量较高, 且较为稳定, 因此, 选取盐酸小檗碱峰作为参照物。

2.5 色谱条件与系统适用性试验

Hypersil ODS(4.6 $\times$ 200 mm, 5 μm) 色谱柱(Agilent 1100); 甲醇-0.3%磷酸二乙胺水为流动相体系, 按照上述梯度顺序; 检测波长为 330 nm; 理论板数按盐酸小檗碱峰计算, 不低于 3 000。

2.6 测定方法

分别精密量取对照品溶液及供试品溶液各 5 μl , 注入液相色谱仪, 记录 100 分钟的色谱图即得。以盐酸小檗碱的色谱峰(S 峰)的保留时间和峰面积为 1 计算其他各峰的相对保留时间和相对峰面积比值。

表 1 精密度试验结果(相对保留时间)
Tbl. 1 Result of precision(relative retention time)

峰号	相对保留时间					RSD(%)
	1	2	3	4	5	
1	0.594 5	0.586 8	0.590 4	0.593 5	0.587 8	0.57
2	0.605 8	0.614 5	0.601 8	0.607 8	0.600 1	0.93
3	0.636 1	0.636 4	0.634 1	0.635 4	0.629 8	0.43
4	0.737 9	0.736 8	0.737 9	0.741 5	0.739 5	0.25
5	0.758 3	0.758 0	0.757 1	0.751 4	0.750 2	0.51
6	0.825 8	0.831 5	0.831 3	0.832 2	0.828 4	0.42
7	0.844 5	0.845 8	0.838 7	0.840 9	0.841 5	0.34
8	0.948 3	0.953 9	0.952 7	0.947 4	0.945 7	0.37
S	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.00

表 2 精密度试验结果(峰面积比值)
Tbl. 2 Result of precision(relative retention areas)

峰号	相对峰面积					RSD(%)
	1	2	3	4	5	
3	0.627 1	0.622 2	0.619 8	0.628 7	0.629 7	0.69
4	0.270 6	0.267 1	0.264 2	0.264 9	0.268 2	0.97
S	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.00

表 3 20 批关黄柏样品含量测定结果
Tbl. 3 The content of berberine hydrochloride in 20 batches of Cortex Phellodendri Amuren from diferent origi

样品编号	样品收集地	产地	盐酸小檗碱(%)	样品编号	样品收集地	产地	盐酸小檗碱(%)
1	广东二天堂	江西	1.30	11	武汉阳慷	辽宁	2.00
2	北京西苑医院	湖南邵阳	2.32	12	安徽协和城	吉林	1.01
3	樟树药材市场	湖南	1.33	13	江西仁德	江西	1.03
4	万泽医药	贵州	2.09	13	成都荷花池	四川	1.00
5	亳州	贵州	2.08	14	贵州同济堂	贵州	1.01
6	阳光同仁堂	四川	2.00	15	湖南张家界	(道地产区)	1.15
7	辽宁中医学院	湖南邵阳	1.01	16	湖南张家界	(道地产区)	2.18
8	甘肃	河南	1.03	17	湖南张家界	(道地产区)	2.23
9	四川太极	广西	1.00	18	湖南张家界	(道地产区)	2.40
10	方回春	江西	1.01	20	湖南张家界	(道地产区)	2.31

表 4 20 批关黄柏样品测定结果(相对保留时间)
Tbl. 4 Relative retention time of 20 batches of Cortex Phellodendri Amuren

样品批号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	0.581 4	0.594 5	0.634 8	0.738 3	0.759 5	0.827 2	0.835 1	0.950 2	1.000 0
2	0.587 2	0.597 3	0.637 4	0.743 2	0.764 3	0.827 0	0.841 2	0.951 6	1.000 0
3	0.586 4	0.596 3	0.636 5	0.742 4	0.763 5	0.826 8	0.840 4	0.951 4	1.000 0
4	0.582 4	0.594 9	0.634 8	0.738 5	0.759 7	0.827 6	0.835 2	0.950 1	1.000 0
5	0.590 0	0.598 2	0.638 8	0.744 8	0.766 1	0.827 3	0.843 4	0.951 8	1.000 0
7	0.584 9	0.596 9	0.638 1	0.742 6	0.763 8	0.827 4	0.840 1	0.951 4	1.000 0
8	0.583 2	0.595 7	0.636 7	0.741 9	0.763 0	0.827 2	0.839 5	0.950 3	1.000 0
9	0.586 8	0.596 3	0.637 2	0.742 2	0.763 5	0.827 6	0.840 0	0.951 3	1.000 0
10	0.582 1	0.594 7	0.634 4	0.738 3	0.759 5	0.827 3	0.835 0	0.950 1	1.000 0
11	0.583 4	0.594 9	0.635 6	0.738 5	0.759 6	0.827 4	0.835 1	0.950 1	1.000 0
12	0.531 0	0.582 4	0.632 4	0.729 8	0.748 6	0.819 2	0.828 4	0.948 9	1.000 0
13	0.542 1	0.574 9	0.612 8	0.730 1	0.751 8	0.815 5	0.830 1	0.942 1	1.000 0
14	0.553 7	0.581 9	0.628 8	0.734 6	0.761 1	0.829 5	0.832 1	0.937 5	1.000 0
15	0.556 1	0.588 9	0.631 8	0.740 1	0.762 1	0.824 2	0.841 6	0.931 8	1.000 0
16	0.570 8	0.590 2	0.634 5	0.743 1	0.763 8	0.826 7	0.843 6	0.949 8	1.000 0
17	0.597 2	0.597 8	0.637 8	0.741 5	0.759 2	0.825 9	0.841 8	0.950 7	1.000 0
18	0.590 7	0.601 8	0.632 8	0.739 8	0.763 4	0.826 4	0.839 7	0.953 1	1.000 0
19	0.600 2	0.615 7	0.637 8	0.741 4	0.761 9	0.825 9	0.840 5	0.952 8	1.000 0
20	0.546 1	0.590 1	0.640 8	0.743 9	0.763 5	0.828 8	0.840 7	0.953 8	1.000 0
平均	0.576 0	0.593 8	0.634 4	0.739 7	0.760 9	0.826 0	0.838 0	0.948 8	1.000 0

3 方法学考察

3.1 精密密度试验

取同一批关黄柏(张家界)供试品溶液

在上述色谱条件和测定方法下,连续进样5次,见表1、表2。指纹图谱结果表明,该指纹图谱方法精密密度符合要求,共有峰指纹

峰保留时间和相对峰面积 RSD 均小于 1.0%。

3.2 稳定性试验

取同一批关黄柏(张家界)供试品溶液,在上述色谱条件下,分别在 0 h、2 h、4 h、8 h、16 h 进行指纹图谱测定。结果表明,以盐酸小檗碱为对照峰,在 16 h 内样品各共有峰相对保留时间和相对峰面积比值无明显变化,说明本方法稳定。

3.3 重现性试验

取关黄柏(张家界)药材 5 份,按供试品溶液制备方法处理,按上述条件进行测定。结果表明,以盐酸小檗碱为对照峰,各样品共有峰指纹峰保留时间和相对峰面积 RSD 均小于 3.0%。

3.4 盐酸小檗碱含量的测定

分别精密量取各样品溶液 5 μ l,注入液相色谱仪,按上述方法进行测定,计算各样品溶液的盐酸小檗碱含量,结果见表 3。

3.5 样品测定

按供试品溶液的制备方法操作,分别取各批药材制成样品溶液,取 5 μ l 进样。同前条件测定图谱,见表 4、表 5 及图 2。采用中南大学“计算机辅助相似性评价系统”进行相似度计算。结果表明,20 批关黄柏样品指纹图谱相似度均大于 0.80,说明该方法较稳定。用该方法对关黄柏药材进行质量控制较可靠。

3.6 系统聚类分析

应用 SPSS 软件中系统聚类法,对 20 批关黄柏样品的 HPLC- FP 中各特征峰的相对峰面积进行分析,以欧氏平方距离为测度的聚类图见图 3。通过系统聚类分析,关黄柏样品 HPLC- FP 的特征峰数据的系统聚类结果为 16、17、18、19、20 号样品,均为道地药材样品,质量均较好。分析结果与表 3 中不同产地及市售的关黄柏样品中盐酸小檗碱的含量结果相吻合,以湖南的道地药材样品为好。

4 结论

试验结果显示,20 批关黄柏药材指纹图谱中主要峰群的整体图貌基本一致,但各成分峰面积的相对比值有所不同,均为快速鉴别区分不同来源的药材提供了科学依据。由系统聚类分析结果显示,不同产地、不同市场收集的关黄柏药材中盐酸小檗碱成分参差不齐,为保证药材的质量,宜固定基源、选择道地药材。

参考文献(References)

- [1] 中华人民共和国药典一部[S].北京:化学工业出版社,2005: 100.
- [2] 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)[J]. 中成药,2000, 22(10): 671- 675.

(责任编辑 李慧政)

表 5 20 批关黄柏样品测定结果(峰面积比值)

Tb1. 5 Area of common fingerprint peak of 20 Batches of Cortex Phellodendri Amuren

样品批号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	0.121 4	0.173 8	0.591 0	0.308 1	0.063 6	0.056 2	0.061 0	0.036 0	1.000 0
2	0.112 4	0.170 6	0.615 5	0.308 5	0.069 1	0.029 7	0.038 7	0.030 4	1.000 0
3	0.130 8	0.176 6	0.685 8	0.307 2	0.077 7	0.046 4	0.054 2	0.050 6	1.000 0
4	0.200 0	0.283 6	1.158 5	0.466 6	0.120 1	0.061 4	0.095 2	0.059 5	1.000 0
5	0.111 3	0.151 0	0.578 1	0.261 3	0.076 7	0.079 4	0.054 0	0.039 7	1.000 0
6	0.121 8	0.157 6	0.595 8	0.317 2	0.097 7	0.056 4	0.042 2	0.061 6	1.000 0
7	0.088 4	0.142 1	0.572 6	0.310 2	0.061 8	0.047 4	0.033 2	0.034 5	1.000 0
8	0.124 4	0.201 5	0.761 1	0.356 0	0.096 5	0.044 9	0.033 9	0.161 4	1.000 0
9	0.141 8	0.237 9	0.879 6	0.433 6	0.095 0	0.071 0	0.061 4	0.051 3	1.000 0
10	0.133 9	0.201 4	0.809 1	0.311 7	0.076 8	0.042 6	0.047 1	0.037 0	1.000 0
11	0.195 3	0.289 3	0.847 2	0.455 9	0.113 2	0.086 6	0.084 1	0.060 6	1.000 0
12	0.082 1	0.184 6	0.648 2	0.410 2	0.085 7	0.079 4	0.059 0	0.060 6	1.000 0
13	0.091 0	0.174 6	0.756 9	0.556 0	0.071 8	0.057 4	0.043 2	0.049 5	1.000 0
14	0.101 2	0.168 8	0.697 7	0.493 6	0.089 5	0.054 9	0.039 9	0.032 7	1.000 0
15	0.148 6	0.156 1	0.546 8	0.511 7	0.095 0	0.069 0	0.058 4	0.041 5	1.000 0
16	0.121 4	0.254 7	0.850 1	0.455 9	0.076 8	0.052 6	0.057 1	0.141 4	1.000 0
17	0.123 4	0.268 4	0.861 2	0.456 0	0.102 4	0.063 4	0.042 1	0.115 6	1.000 0
18	0.120 7	0.278 3	0.857 9	0.443 6	0.118 4	0.071 9	0.039 9	0.102 1	1.000 0
19	0.119 8	0.264 2	0.862 7	0.411 7	0.107 4	0.065 0	0.048 1	0.095 6	1.000 0
20	0.119 7	0.271 6	0.854 6	0.475 9	0.096 2	0.066 6	0.047 4	0.094 5	1.000 0

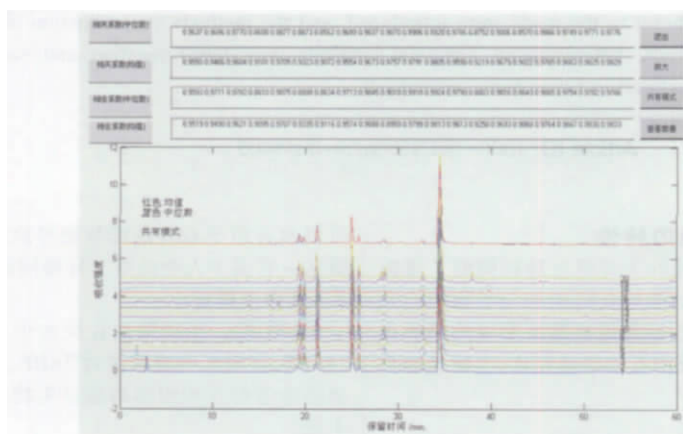


图 2 20 批关黄柏药材指纹图谱

Fig. 2 Fingerprints of 20 batches of Cortex Phellodendri Amuren

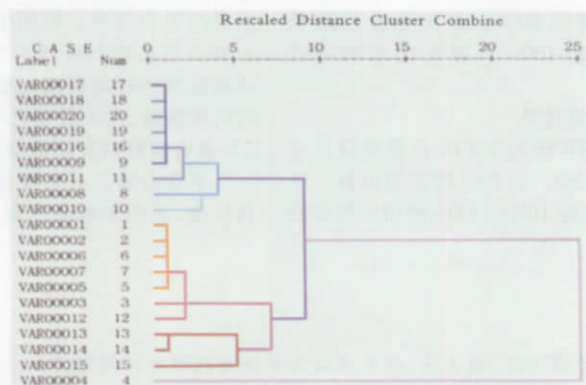


图 3 系统聚类分析图

Fig. 3 figure of genealogied cluster analysis