

不同产地垂盆草 HPLC 指纹图谱研究

郭廷东¹, 兰杨¹, 姜红², 张仕瑾¹, 彭贤东¹, 唐志立¹

(1. 川北医学院第二临床医学院, 南充市中心医院药学部, 个体化药物治疗南充市重点实验室, 四川南充 637000; 2. 彭州市人民医院药学部, 四川彭州 611930)

【摘要】目的: 建立垂盆草的 HPLC 指纹图谱, 对比不同产地垂盆草的差异, 为垂盆草质量控制提供参考。**方法:** 采用 Welchrom C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以 0.1% 乙酸水-乙腈为流动相进行梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 柱温 40 °C, 检测波长 360 nm, 建立垂盆草 HPLC 指纹图谱, 采用相似度软件对指纹图谱进行分析, 通过聚类分析和主成分分析, 评价不同产地垂盆草的差异。**结果:** 建立垂盆草特征指纹图谱, 共确定 7 个共有峰, 同产地样品相似度均在 0.90 以上, 而不同产地之间相似度均小于 0.9; 聚类分析和主成分分析结果显示: 四川产的 4 批垂盆草成分之间差异最小, 而安徽产的 3 批垂盆草成分之间差异较大。**结论:** 所建立的垂盆草 HPLC 特征指纹图谱方法简单, 分离效果较好, 可用于垂盆草的质量控制, 为其相关研究提供指导; 并且不同产地垂盆草化学成分差异较大。

【关键词】 垂盆草; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 质量控制; 聚类分析; 主成分分析

【中图分类号】 R282.7 **【文献标志码】** A

HPLC Fingerprint analysis of Sedum sarmentosum Bunge from different habitats

GUO Ting-dong¹, LAN Yang¹, JIANG Hong², ZHANG Shi-jin¹, PENG Xian-dong¹, TANG Zhi-li¹

(Department of Pharmacy, 1. Nanchong Central Hospital, The Second Clinical Medical College of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000; 2. The People's Hospital of Pengzhou, Pengzhou 611930, Sichuan, China)

【Abstract】Objective: To establish an HPLC fingerprint method of Sedum sarmentosum Bunge, and contrast the difference of Sedum sarmentosum Bunge from different habitats, so as to provide a reference for the quality control. **Methods:** Welchrom C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column was adopted, the mobile phase consisted of 0.1% acetic acid water-acetonitrile with gradient elution at the flow rate of 1.0 mL · min⁻¹, and the detection wavelength was 360 nm, the column temperature was 40 °C. HPLC fingerprint of Sedum sarmentosum Bunge was established. Cluster analysis and principal component analysis were used to evaluate the chemical differences of Sedum sarmentosum Bunge from different habitats. **Results:** The fingerprint of Sedum sarmentosum Bunge was established, and included 7 common peaks. The similarity of samples from the same habitat was more than 0.90, while the similarity between different habitats was less than 0.90. Cluster analysis and principal component analysis showed that there was little difference among the four batches of S Sedum sarmentosum Bunge in Sichuan, but there was large difference among the three batches of Sedum sarmentosum Bunge in Anhui. **Conclusion:** The established HPLC fingerprint method is simple in good separation. It can be used for the quality control of Sedum sarmentosum Bunge and provide guidance for its related research. And the chemical constituents of Sedum sarmentosum Bunge from different habitats are different.

【Key words】 Sedum sarmentosum Bunge; HPLC; Fingerprint; Quality control; Cluster analysis; Principle component analysis

垂盆草又称鼠牙半支, 为景天科多年生植物垂盆草的干燥全草, 在全国范围内分布。垂盆草具有利湿退黄、清热解毒的功效, 为利湿退黄类中药, 含有氰苷、生物碱、黄酮、三萜、挥发油及糖类等成分^[1-4]。目前, 垂盆草在临床上广泛用于治疗急性慢性肝损伤^[5-6]、急性胰腺炎肺损伤^[7-8]和肾损伤^[9]

等炎症性疾病。

由于垂盆草广泛分布于全国各地, 受不同地区土壤、温度、光照和水分等自然因素影响较大, 质量难以得到保障。相关研究^[10-11]表明, 不同产地垂盆草化学成分具有一定的差异性。因此, 本研究收集了 3 个产地 12 个批次的垂盆草, 建立 HPLC 指纹图

谱方法,可更加系统、全面地反映垂盆草中的化学成分,以期垂盆草不同产地质量对比及相关研究提供可靠的分析方法,提高其质量控制水平。

1 仪器与材料

Agilent 1020 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);电子天平(JY2000,上海方瑞仪器有限公司);超声波清洗器(KQ5200DB,昆山市超声仪器有限公司);Milli-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司);中药色谱指纹图谱相似度评价系统(国家药典委员会,2012 年版)。

12 批不同产地的垂盆草(见表 1)来源于安徽亳州、湖北黄冈和四川达州;乙腈和乙酸为色谱纯;水为超纯水;其他试剂均为分析纯。

表 1 不同产地垂盆草

编号	产地	编号	产地	编号	产地
S1	安徽亳州	S5	湖北黄冈	S9	四川达州
S2	安徽亳州	S6	湖北黄冈	S10	四川达州
S3	安徽亳州	S7	湖北黄冈	S11	四川达州
S4	湖北黄冈	S8	湖北黄冈	S12	四川达州

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Welchrom C18 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm);流动相:0.1% 乙酸水-乙腈,采用梯度洗脱,程序为 0~5 min,15% 乙腈;5~25 min,15%~18% 乙腈;25~40 min,18%~23% 乙腈;40~50 min,23%~30% 乙腈;50~75 min,30%~35% 乙腈;流速为 1.0 mL/min;柱温为 40 ℃;检测波长为 360 nm;进样量:10 μL。

2.2 供试品溶液的制备

取本品粉末(过二号筛)约 0.5 g,精密称定,精密加入甲醇-25% 盐酸溶液(4:1)混合溶液 25 mL,称定重量,加热回流 1 h,放置室温,再称定重量,用甲醇-25% 盐酸溶液(4:1)混合溶液补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 HPLC 指纹图谱的建立与分析

2.3.1 HPLC 指纹图谱测定 取上述 12 批垂盆草,按照“2.2”项下分别制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,记录色谱图,将色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 年版)。以 S8 为参考图谱,时间窗宽度设为 0.3 min,得到指纹图谱,见图 1,共标定 7 个共有峰。其中以 6 号色谱为参照峰,计算其他峰的相对峰面积,结果见表 2 所示,相似度结果见表 3。由结果可知,同一产地垂盆

草的相似度较高,不同产地相似度差异较大,表明不同产地垂盆草中化学成分差异较大,由图 1 也可知,四川产地的垂盆草化学成分最多,而安徽产地垂盆草化学成分最少。

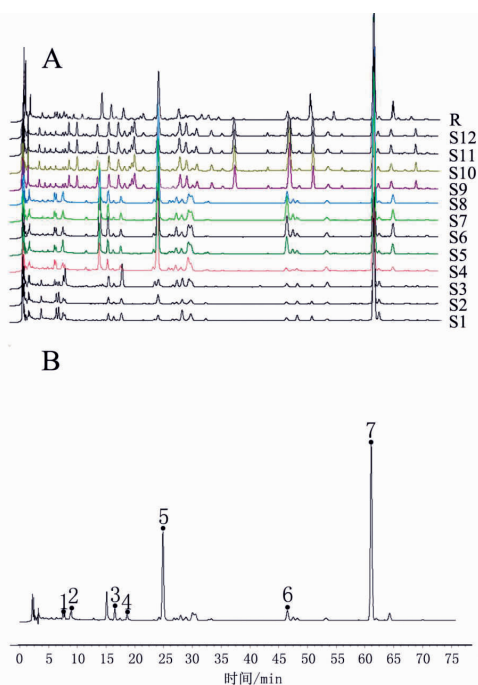


图 1 指纹图谱图

A.12 批垂盆草 HPLC 指纹图谱;B.对照指纹图谱。

表 2 12 批样品中共有峰的相对峰面积

峰号	批号											
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
P1	2.18	1.77	0.70	0.31	0.13	0.16	0.10	0.29	0.03	0.03	0.02	0.03
P2	1.18	2.33	2.69	0.51	0.42	0.22	0.19	0.58	0.03	0.03	0.03	0.03
P3	2.49	2.17	4.34	1.78	0.55	0.63	0.47	0.76	0.20	0.22	0.19	0.22
P4	3.33	2.31	10.23	1.02	0.29	0.27	0.22	0.43	0.25	0.23	0.21	0.30
P5	2.55	4.14	3.45	3.73	5.05	3.49	2.75	7.13	0.42	0.45	0.39	0.45
P6	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
P7	57.46	37.61	30.48	5.77	11.57	7.24	5.00	15.33	0.71	0.70	0.69	0.67

2.3.2 精密度试验 取 S1 供试品溶液连续进样 6 次,得到色谱图,记录上述 7 个色谱峰的保留时间,并计算峰面积。计算峰面积的 RSD 值在 0.37%~1.36%,保留时间的 RSD 值在 0.04%~1.05%,表明仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 取 S1 供试品溶液分别于 0、2、4、6、8、10、12、15、24 h 进行液相色谱分析。计算上述 7 个色谱峰的保留时间和峰面积,结果峰面积的 RSD 值在 0.59%~1.69%,保留时间的 RSD 值 0.15%~1.23%,说明垂盆草供试品溶液在 24 h 内稳定。

表 3 12 批样品相似度评价结果

样品	相似度												R
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	
S1	1	0.983	0.926	0.799	0.813	0.867	0.845	0.804	0.568	0.598	0.603	0.611	0.821
S2	0.983	1	0.938	0.736	0.815	0.873	0.858	0.808	0.559	0.542	0.595	0.608	0.811
S3	0.926	0.938	1	0.781	0.841	0.816	0.802	0.838	0.613	0.621	5.991	5.853	0.842
S4	0.799	0.736	0.781	1	0.994	0.974	0.968	0.995	0.712	0.721	0.732	0.725	0.997
S5	0.813	0.815	0.841	0.994	1	0.979	0.976	0.991	0.799	0.806	0.815	0.821	0.995
S6	0.867	0.873	0.816	0.974	0.979	1	0.996	0.982	0.835	0.846	0.874	0.862	0.989
S7	0.845	0.858	0.802	0.968	0.976	0.996	1	0.979	0.825	0.811	0.829	0.8301	0.982
S8	0.804	0.808	0.838	0.995	0.991	0.982	0.979	1	0.816	0.805	0.827	0.813	0.998
S9	0.568	0.559	0.613	0.712	0.799	0.835	0.825	0.816	1	0.994	0.994	0.996	0.826
S10	0.598	0.542	0.621	0.721	0.806	0.846	0.811	0.805	0.994	1	0.995	0.989	0.819
S11	0.603	0.595	5.991	0.732	0.815	0.874	0.829	0.827	0.994	0.995	1	0.987	0.835
S12	0.611	0.608	5.853	0.725	0.821	0.862	0.8301	0.813	0.996	0.989	0.987	1	0.824

2.3.4 重复性试验 取 S1 批次垂盆草共 6 份,按“2.2”项下方法制备 6 份垂盆草供试品溶液,按照“2.1”项下方法测定,计算上述 7 个色谱峰的保留时间和峰面积,结果峰面积的 RSD 值 0.21% ~ 1.17%,保留时间的 RSD 值在 0.10% ~ 1.73%,表明方法重复性良好。

2.4 聚类分析和主成分分析

将 12 批垂盆草中 7 个峰的峰面积导入 Metabo-Analyst 3.0 分析软件,采用 PCA 和 Heatmap 处理方法对不同批次样品 7 个峰进行主成分分析和聚类分析,结果见图 2。图 2A 所示,四川的 4 批垂盆草和湖北的 5 批垂盆草在主成分空间中分布较集中,而安徽的 3 批垂盆草在主成分空间中分布较分散;由图 2B 可知,四川的 4 批次垂盆草差异最小,而安徽的 3 批次垂盆草差异较大。结果表明四川产地垂盆草成分差异小,质量更加稳定。

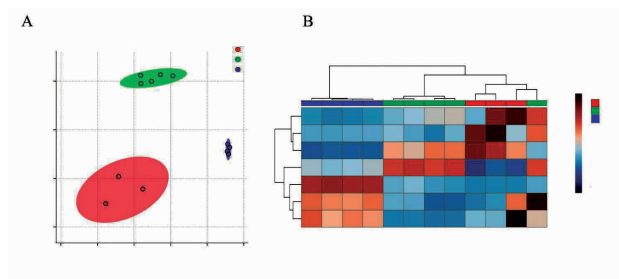


图 2 12 批垂盆草主成分分析和聚类分析结果

3 讨论

药材的产地是保障药材质量的重要因素,早在《神农本草经》中就有记载“土地所出,真伪新陈,并各有法”,故中药有道地药材的说法,道地药材成为

评价药材品质的综合标准之一^[12]。但对于无道地性的药材而言,其质量如何评价和控制是重要的研究方向。

目前,指纹图谱已广泛应用于不同产地药材的鉴别和质量控制等多个方面。卢敏南等^[13]采用指纹图谱联合化学计量学鉴别不同产地云木香,为云木香质量控制提供依据,也为云木香资源合理开发提供参考。田甜等^[14]建立指纹图谱比较不同产地和不同生长年限黄芩的化学成分变化规律;胡传芹等^[15]通过建立指纹图谱结合聚类分析评价了不同产地当归的质量优劣;冀艳花等^[16]利用指纹图谱与聚类分析评价了不同产地白鲜皮药材的质量,为白鲜皮质量评价体系的建立提供参考。因此,本文收集不同产地多批次垂盆草建立指纹图谱,实现对垂盆草的质量控制,通过主成分分析和聚类分析对比不同产地垂盆草的差异。

前期指纹图谱方法建立过程中仅选用 3 个产地垂盆草,简单对比了 3 个产地化学成分的差异。后期将增加产地样本量,评价多个产地垂盆草的质量,以望优选出质量更优,成分更稳定的产地,为临床应用及相关研究提供指导。

参考文献

- [1] 宋玉华,李春雨,郑艳.垂盆草的研究进展[J].中药材,2010,33(12):1973-1976.
- [2] 李慧娟,杜成林,王晓静.垂盆草的研究进展[J].药学研究,2015,34(11):661-663.

(下转第 530 页)