

· 色谱指纹图谱研究 ·

侧柏叶及其水煎液 HPLC 特征图谱的相关性研究

申卫红¹, 张子龙^{1,2}, 叶家宏¹, 黄月纯³, 刘东辉², 魏 刚² (1. 广州中医药大学, 广东 广州 510006; 2. 深圳市宝安区中医院, 广东 深圳 518101; 3. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 比较侧柏叶药材及其水煎液高效液相色谱 (HPLC) 特征图谱的差异, 探讨其特征图谱的相关性。**方法** 采用 Zorbax SB-Aq C₁₈ 色谱柱; 流动相为乙腈-磷酸溶液(体积分数为 0.1 %), 梯度洗脱; 检测波长为 254 nm; 柱温为 40 ℃; 流速为 1.0 mL·min⁻¹。**结果** 侧柏叶药材标示出 22 个共有特征峰, 水煎液标示出药材的 16 个特征峰, 鉴别了 5 个黄酮类特征峰(杨梅苷、异槲皮苷、槲皮苷、槲皮素、穗花杉双黄酮)。分别以 10 批药材及其水煎液特征图谱生成的共有模式为对照, 各批次药材及其水煎液的相似度分别大于 0.99 和 0.90。同批次药材及其水煎液特征图谱之间的相似度, 有 7 批大于 0.95, 3 批低于 0.90。**结论** 水煎煮方式能大部分提取侧柏叶的主要特征成分。本研究为侧柏叶粉末及含侧柏叶复方粉末水煎液外用的物质基础研究提供了一定的依据。

关键词: 侧柏叶; 侧柏叶水煎液; 特征图谱; 高效液相色谱法; 相关性

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)05-0487-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.05.015

Analysis of HPLC Characteristic Spectrum for *Cacumen Platycladi* and Its Decoction

SHEN Weihong¹, ZHANG Zilong^{1,2}, YE Jiahong¹, HUANG Yuechun³, LIU Donghui², WEI Gang² (1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. Shenzhen Bao'an District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518101 Guangdong, China; 3. The First Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To compare the differences of characteristic spectrum for *Cacumen Platycladi* and its decoction by high pressure liquid chromatography (HPLC) and to explore the correlation of characteristic spectrum. **Methods** HPLC was performed on the Zorbax SB-Aq C₁₈ column, the acetonitrile-phosphoric acid solution (volume fraction being 0.1 %) by gradient elution was employed as the mobile phase, detection wavelength was set at 254 nm, column temperature was 40 ℃, and flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **Results** Twenty-two common peaks were shown in the medicinal powder of *Cacumen Platycladi* and 16 were separated in the decoction of *Cacumen Platycladi*. Five peaks were identified as myricitrin, isoquercitrin, quercitrin, quercetin and amentoflavone. The similarities of 10 batches of the medicinal powder and their decoction were over 0.99 and 0.90, respectively. The correlation coefficient of 7 batches between them was over 0.95, and that of the other 3 batches was below 0.90. **Conclusion** The decocting method is effective for obtaining the main characteristic components of *Cacumen Platycladi*. The study can provide a reference for the external application of *Cacumen Platycladi* powder and its compound preparation powder.

Keywords: *Cacumen Platycladi*; *Cacumen Platycladi* decoction; Characteristic spectrum; HPLC; Correlation

收稿日期: 2013-04-09

作者简介: 申卫红, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药新药研究与指纹图谱分析。Email: 841226855@qq.com。通讯作者: 黄月纯, 主任中药师, 研究方向: 中药质量标准与指纹图谱研究。Email: huangyuechun@163.com。

基金项目: 国家十一五科技支撑计划项目(2008BA153B074); 广东省产学研结合项目(2011B090400319); 广东高校科技成果转化重大项目(cgzhd1009)。

侧柏叶为柏科植物侧柏 *Platycladus orientalis* (L.) Franco 的干燥枝梢和叶, 其性寒, 味苦、涩, 归肺、肝、脾经, 具有凉血止血、化痰止咳、生发乌发的功效, 用于吐血、衄血、咯血、便血, 崩漏下血, 肺热咳嗽, 血热脱发, 须发早白^[1]。侧柏叶的化学成分主要包括挥发油、黄酮类、鞣质及有机酸等化合物, 其中侧柏叶黄酮类化合物主要包括槲皮苷、异槲皮苷、槲皮素、杨梅苷、杨梅素、穗花杉双黄酮、扁柏双黄酮等成分^[2-3]。现代研究^[4-8]表明, 醇提取物及水煎液具有止血、抗菌、抗炎、抗氧化、抗肿瘤等药理活性。黄酮类成分是侧柏叶的主要有效成分, 质量分析以高效液相色谱法(HPLC)含量测定为主^[1]。色谱指纹图谱分析技术因能解决测定个别成分的局限性而获得越来越多的关注。目前, 已有侧柏叶 HPLC 指纹图谱研究报道^[9-10], 但未见采用指纹图谱技术评价侧柏叶水煎液特征成分的研究报道。侧柏叶是传统外用中药, 在皮肤科中应用广泛, 临床上常采用侧柏叶或其复方粉末煎煮 30 min 的水煎液浸洗患处, 或粉末加水调敷^[11], 水煎煮后化学成分如何, 尚不明确。因此, 本研究采用中药指纹图谱分析技术, 分析侧柏叶及其水煎液 HPLC 特征图谱的相关性, 评价临床应用的煎煮方法对侧柏叶成分的提取效果, 为侧柏叶粉末及含侧柏叶复方粉末水煎液外用的物质基础研究提供依据。

1 仪器与试药

HP1200 型高效液相色谱仪(包括二极管阵列检测器, 美国 Agilent 公司); 10 批侧柏叶(编号: S1~S10)购自广州致信中药饮片有限公司等几家药材公司, 经广州中医药大学第一附属医院黄月纯主任中药师鉴定系侧柏叶 *Platycladus orientalis* (L.) Franco 的干燥地上部分; 槲皮苷和槲皮素对照品(批号分别为: 111538-200405, 100081-200406), 购自中国药品生物制品检定所; 异槲皮苷(批号: MUST-11121801)、杨梅苷(批号: MUST-11061601)、穗花杉双黄酮(批号: MUST-11091010), 购自成都曼思特生物科技有限公司; 乙腈为色谱纯, Merk 公司; 其他试剂均为分析纯, 水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Zorbax SB Aq C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A)-磷酸溶液(B, 体积分数为 0.1 %), 梯度洗脱: 0~5 min, A 为 2 %, 5~10 min, A 为 2 %→10 %, 10~40 min, A 为 10 %

→20 %, 40~50 min, A 为 20 %→30 %, 50~60 min, A 为 30%~70 %, 60~65 min, A 为 70 %→80 %, 65~70 min, A 为 80 %→2 %; 检测波长为 254 nm; 柱温为 40 ℃; 流速为 1.0 mL·min⁻¹。

2.2 供试品溶液的制备

2.2.1 药材供试品溶液的制备 精密称取侧柏叶粉末(过 4 号筛) 1.0 g, 加入甲醇 50 mL, 超声处理 40 min, 滤过; 残渣加体积分数为 60 % 的甲醇溶液 50 mL, 超声处理 40 min, 滤过。合并两次滤液, 蒸干, 加体积分数为 60 % 的甲醇溶液溶解并定容至 10 mL 容量瓶中, 摇匀, 即得。

2.2.2 水煎液供试品溶液的制备 精密称取侧柏叶饮片 5.0 g, 加水 50 mL, 加热煮沸 30 min, 滤过, 取滤液 10 mL, 蒸干, 残渣加体积分数为 60 % 的甲醇溶液定容至 10 mL 容量瓶中, 摇匀, 即得。

2.3 对照品溶液的制备 取杨梅苷、异槲皮苷、槲皮苷、槲皮素、穗花杉双黄酮对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含杨梅苷、异槲皮苷、槲皮苷、槲皮素、穗花杉双黄酮分别为 104.0, 135.0, 96.0, 118.8, 136.0 μg 的对照品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 精密吸取侧柏叶供试品溶液 10 μL, 连续进样 6 次。结果所测特征图谱与所得共有模式相似度均大于 0.99, 表明精密度良好, 符合指纹图谱研究要求。

2.4.2 稳定性试验 精密吸取侧柏叶供试品溶液 10 μL, 分别在 0, 4, 8, 12, 24 h 进样。结果所测特征图谱与所得共有模式相似度均大于 0.99, 表明 24 h 内供试品溶液稳定性较好, 符合指纹图谱研究要求。

2.4.3 重复性试验 取同一批样品 6 份, 分别制备供试品溶液, 进样分析。结果所测特征图谱与所得共有模式相似度均大于 0.99, 表明重复性良好, 符合指纹图谱研究要求。

2.5 样品检测 精密吸取侧柏叶供试品溶液与水煎液供试品溶液各 10 μL, 对照品溶液 5 μL, 依法进样分析。

2.6 侧柏叶及其水煎液特征图谱的相关性分析

2.6.1 共有峰的确定 根据以上 10 批样品分析结果, 侧柏叶药材标示了 22 个特征峰, 水煎液标示了 16 个特征峰, 通过与对照品对照, 鉴别了 5 个特征峰, 以峰 16(槲皮苷)为参照峰分别计算各共有峰的相对保留时间(RTR)与相对峰面积(RA), 结果见表 1。

2.6.2 相似度分析 采用国家药典委员会中药色谱指

表 1 侧柏叶及其水煎液 HPLC 特征图谱分析结果($\bar{x} \pm s$)Table 1 Analysis results of HPLC characteristic spectrum of *Cacumen Platycladi* and its decoction

峰号	药材 RTR	药材 RA	水煎液 RTR	水煎液 RA	成分
1	0.2847 ± 0.0030	0.014 ± 0.002	0.2831 ± 0.0003	0.097 ± 0.067	
2	0.2960 ± 0.0025	0.032 ± 0.009	0.2956 ± 0.0003	0.180 ± 0.127	
3	0.3189 ± 0.0014	0.051 ± 0.030	0.3180 ± 0.0010	0.277 ± 0.164	
4	0.3441 ± 0.0017	0.013 ± 0.003	0.3457 ± 0.0005	0.064 ± 0.028	
5	0.3502 ± 0.0019	0.027 ± 0.004	0.3513 ± 0.0003	0.116 ± 0.079	
6	0.4026 ± 0.0013	0.024 ± 0.003	0.4042 ± 0.0006	0.113 ± 0.065	
7	0.4202 ± 0.0009	0.018 ± 0.003	0.4189 ± 0.0007	0.095 ± 0.058	
8	0.5029 ± 0.0008	0.011 ± 0.003	0.5015 ± 0.0006	0.066 ± 0.036	
9	0.5259 ± 0.0011	0.061 ± 0.007	0.5276 ± 0.0005	0.291 ± 0.167	
10	0.5351 ± 0.0008	0.022 ± 0.007	0.5366 ± 0.0004	0.065 ± 0.025	
11	0.5922 ± 0.0004	0.036 ± 0.007	0.5922 ± 0.0003	0.116 ± 0.070	
12	0.6677 ± 0.0101	0.021 ± 0.012	0.6636 ± 0.0003	0.141 ± 0.114	
13	0.8230 ± 0.0006	0.393 ± 0.042	0.8215 ± 0.0008	0.555 ± 0.059	杨梅苷
14	0.8667 ± 0.0005	0.051 ± 0.006	0.8656 ± 0.0004	0.051 ± 0.008	异槲皮苷
15	0.8956 ± 0.0012	0.027 ± 0.004	0.8987 ± 0.0003	0.125 ± 0.078	
16(s)	1.0000	1.000	1.0000	1.000	槲皮苷
17	1.0374 ± 0.0012	0.022 ± 0.010	-	-	
18	1.1292 ± 0.0013	0.104 ± 0.010	-	-	
19	1.2287 ± 0.0011	0.009 ± 0.005	-	-	槲皮素
20	1.2298 ± 0.0008	0.021 ± 0.004	-	-	
21	1.4133 ± 0.0009	0.014 ± 0.006	-	-	槲花杉双黄酮
22	1.4942 ± 0.0010	0.037 ± 0.029	-	-	

注：“-”表示未检出。

纹图谱相似度评价系统软件(2004A 版),以均值法生成特征图谱的共有模式,分别以侧柏叶及其水煎液特征图谱生成的共有模式为对照,分析各批侧柏叶及其水煎液样品的相似度,同时以侧柏叶为对照,计算同批次水煎液的相似度,结果见表 2。10 批侧柏叶及其水煎液 HPLC 特征图谱指纹重叠图及共有模式见图 1~4。

表 2 侧柏叶及其水煎液相似度

Table 2 Similarities of *Cacumen Platycladi* and its decoction

批次	药材相似度	水煎液相似度	药材-水煎液相似度
S1	0.998	0.993	0.982
S2	0.998	0.908	0.779
S3	0.996	0.995	0.978
S4	0.999	0.991	0.985
S5	0.998	0.931	0.807
S6	0.999	0.998	0.953
S7	0.997	0.993	0.978
S8	0.999	0.911	0.786
S9	0.999	0.994	0.985
S10	0.998	0.996	0.943

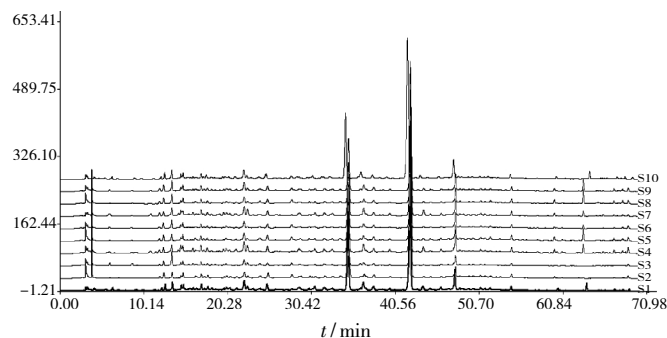


图 1 10 批侧柏叶 HPLC 特征图谱重叠图

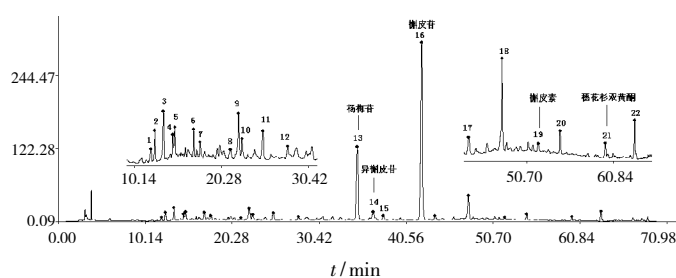
Figure 1 HPLC characteristic spectrum overlapping of 10 batches of *Cacumen Platycladi*

图 2 侧柏叶 HPLC 特征图谱共有模式

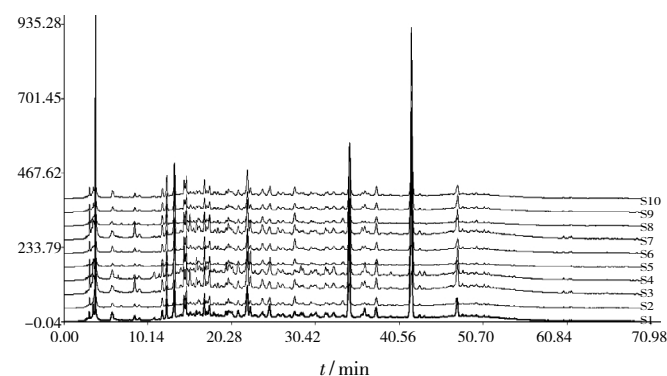
Figure 2 Common pattern of HPLC characteristic spectrum of *Cacumen Platycladi*

图 3 10 批侧柏叶水煎液 HPLC 特征图谱重叠图

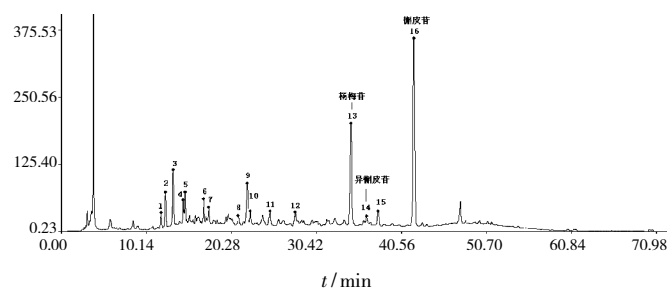
Figure 3 HPLC characteristic spectrum overlapping of 10 batches of *Cacumen Platycladi* decoction

图 4 侧柏叶水煎液 HPLC 特征图谱共有模式

Figure 4 common pattern of HPLC characteristic spectrum of *Cacumen Platycladi* decoction

3 讨论

通过侧柏叶特征图谱分析发现,侧柏叶具有较稳定的特征指纹峰,大部分峰形尖锐,分离度好。其中,侧柏叶标示出 22 个特征峰,水煎液标示出 16 个特征峰。通过药材与水煎液特征图谱比较,水煎液的峰 1~5 相对峰面积比值明显高于药材,而峰 17~22 则难以检测出。通过特征峰紫外光谱分析,峰 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 为黄酮类成分。其中,以峰 16、峰 13、峰 18 为主,采用对照品定位鉴别了 5 个黄酮类特征峰(杨梅苷、异槲皮苷、槲皮苷、槲皮素、穗花杉双黄酮),其他成分的鉴别有待于进一步研究。

分别以侧柏叶及其水煎液特征图谱生成的共有模式为对照,10 批侧柏叶及其水煎液的相似度分别大于 0.99 和 0.90,相似度较高;以侧柏叶药材特征图谱为对照,分析同批次药材与其水煎液之间的相似度,则有 7 批样品的相似度大于 0.95,3 批低于 0.90,表明常规水煎提取工艺大部分能保留侧柏叶的主要特征成分。

本研究针对侧柏叶药材及水煎液特征峰的特点,在前期研究的基础上^[10],优化了流动相系统,标示出 16~22 个特征峰,为侧柏叶及含侧柏叶复方制剂质量控制提供了方法参考,同时为侧柏叶粉末及含侧柏叶复方粉末水煎液外用的物质基础研究提供了一

定的依据。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 200-201.
- [2] 魏刚, 王淑英. 侧柏叶挥发油化学成分气质联用分析[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(1): 18-19.
- [3] 单鸣秋, 钱雯, 高静, 等. UPLC-MS 分析侧柏叶中黄酮类化合物[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(12): 1626-1629.
- [4] 姚晓东. 侧柏炭质量标准及止血机理研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2009.
- [5] 公衍玲, 金宏, 王宏波. 侧柏叶挥发油提取工艺及其抑菌活性研究[J]. 化学与生物工程, 2009, 26(2): 36-38.
- [6] 梁统, 覃燕梅, 梁念慈, 等. 侧柏总黄酮的抗炎作用及机制[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(12): 1407-1410.
- [7] 丁航, 刘慧明, 梁统, 等. 侧柏叶中黄酮类化合物对 H_2O_2 诱导的人红细胞氧化作用的影响[J]. 实用临床医学, 2003, 4(3): 23-24.
- [8] 蒋继宏, 李晓储, 高雪芹, 等. 侧柏挥发油成分及抗肿瘤活性的研究[J]. 林业科学研究, 2006, 19(3): 311-315.
- [9] 粟晓黎, 林瑞超. 中药侧柏叶黄酮成分指纹图谱分析方法的研究[J]. 药物分析杂志, 2003, 23(6): 317-320.
- [10] 刘翠玲, 魏刚, 刘东辉, 等. 侧柏叶 HPLC 指纹图谱的方法学研究[J]. 中成药, 2010, 32(8): 1281-1283.
- [11] 黄彦, 梁承志, 张毅. 侧柏叶的药理学研究及其在皮肤科的运用[J]. 云南中医中药杂志, 2007, 28(3): 42-44.

(编辑: 宋威)

香草固齿酊的 HPLC 指纹图谱研究

吴淑媛, 谢 谦, 王 岩, 林钦贤, 郭小媚(广东药学院, 广东 广州 510006)

摘要: 目的 建立香草固齿酊的指纹图谱。方法 采用 HPLC 法, 色谱柱为 PLATISIL ODS 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液, 梯度洗脱; 检测波长为 250 nm; 柱温为 30 $^{\circ}$ C; 流速为 0.8 mL·min⁻¹。结果 指纹图谱中共有 16 个特征峰, 其中香附有 10 个特征峰, 墨旱莲有 6 个特征峰。结论 建立的指纹图谱适用于香草固齿酊的质量控制。

关键词: 香草固齿酊; 指纹图谱; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)05-0490-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.05.016

HPLC Fingerprint Analysis of Xiangcao Guchi Tincture

WU Shuyuan, XIE Qian, WANG Yan, LIN Qinxian, GUO Xiaomei (Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

收稿日期: 2013-04-21

作者简介: 吴淑媛, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药新剂型与新技术。Email: yantai20072011@163.com。通讯作者: 王岩, 博士, 教授, 主要从事药物新剂型与质量控制研究。Email: gdpuwy@126.com。

基金项目: 广东省中医药局科研基金(2010202)。