

不同基源的瑶药羊开口 HPLC 特征图谱对比研究

叶羽苗, 闵建国, 刘立辉, 钟小清, 邹节明, 邹准

桂林三金药业股份有限公司, 广西 桂林 541004

[摘要] 目的: 建立羊开口药材 HPLC 特征图谱的质量评价方法, 并比较不同基源的羊开口 HPLC 特征图谱。方法: 色谱柱为 Phenomenex C₁₈ (250.0 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 364 nm, 柱温 35 °C, 进样量 20 μL。结果: 从羊开口药材特征图谱中分析得出 6 个共有峰, 其中 2 号峰为鞣花酸, 4 号峰为 3, 3', 4'-三甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-葡萄糖苷。结论: 本研究建立的羊开口药材的特征图谱特征性和专属性强, 且展毛野牡丹和野牡丹的特征图谱相似度较高, 这为将野牡丹和展毛野牡丹作为羊开口药用基源开发提供了科学依据。

[关键词] 羊开口; 鞣花酸; HPLC; 特征图谱; 不同基源

[中图分类号] R29 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2019) 04-0022-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2019.04.007

Comparative Study on Characteristic Chromatograms by HPLC of *Melastoma Radix Et Rhizoma* in Yao Medicine from Different Sources

YE Yumiao, MIN Jianguo, LIU Lihui, ZHONG Xiaoqing, ZOU Jieming, ZOU Zhun

Abstract: Objective: To establish a quality evaluation method for the characteristic chromatograms of *Melastoma Radix Et Rhizoma* by HPLC, and to compare the characteristic chromatograms from different sources. **Methods:** The column was Phenomenex C₁₈ (250.0 mm × 4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric acid at the flow rate of 1.0 mL/min; the detection wavelength was 364 nm; the column temperature was 35 °C and the sample size was 20 μL. **Results:** There were six common peaks identified in the characteristic chromatograms of *Melastoma Radix Et Rhizoma*, among which Peak 2 was ellagic acid and Peak 4 was 3, 3', 4'-tri-omethylellagic acid-4-O-β-D-glucoside. **Conclusion:** The characteristic chromatograms of *Melastoma Radix Et Rhizoma* established in this study are obviously characteristic and specific, and the characteristic chromatograms of *Melastoma Normale D. Don* and *Melastoma Candidum D. Don* show high similarity, which provides a scientific basis for the development of *Melastoma Candidum D. Don* and *Melastoma Normale D. Don* as the sources of *Melastoma Radix Et Caulis*.

Keywords: *Melastoma Radix Et Rhizoma*; Ellagic acid; HPLC; Characteristic chromatogram; Different sources

羊开口为野牡丹科植物展毛野牡丹 *Melastoma normale* D. Don 和野牡丹 *Melastoma candidum* D. Don 的根和根茎^[1], 收载于《广西壮族自治区瑶药材质量标准(第一卷)》, 瑶药名为邕开锤。味甘、酸、涩, 性温, 有收敛、止血、解毒的功效, 用于泄痢、崩漏带下、内外伤出血。为中成药三金片、野牡丹颗粒的处方用药, 也是广西壮瑶医药民间习用药材。

文献[2]报导羊开口主要含没食子酸和鞣花酸为代表的鞣酸类化合物, 也有关于羊开口主要成分的含量测定方法研究^[3-5]。为考察不同植物来源作为药用药材的合理性, 本研究建立了多

批次不同产地羊开口药材主要化学成分特征图谱分析方法, 比较不同产地不同基源羊开口药材所含化学成分的异同。可用于羊开口药材的真伪鉴定、药材质量优劣整体评价, 也为羊开口药用资源的合理开发应用提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器和试剂 液相系统 PAD 检测器(安捷伦 1260); 万分之一电子天平(梅特勒 XP404s)。自制含量为 98.5%的鞣花酸对照品; 自制含量为 99.2%的 3, 3', 4'-三甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-葡萄糖苷对照品; 水为 Milli-Q 超纯水, 乙腈为色

[收稿日期] 2018-12-03

[基金项目] “重大新药创制”科技重大专项 (2011ZX09201-201-17); 广西科技重大专项 (桂科 AA17202045)

[作者简介] 叶羽苗 (1990-), 女, 助理工程师, 研究方向: 中药新药开发。

[通信作者] 邹准, E-mail: zouzhu@hotmial.com。

谱纯试剂,其他试剂均为分析纯。

1.2 3, 3', 4'-三甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷 NMR、MS 解析数据 白色粉末, UV λ_{max}^{M^{OH}}nm: 246, 364。MS-ESI⁺: m/z [M+Na]⁺529。¹HNMR (C₅D₅N)δ: 8.47 (1H, s, H-5'), 7.82 (1H, s, H-5), 5.93 (1H, d, H-1''), 4.25, 4.15 (6H, s, 3, 3'-2 × OCH₃), 3.87 (3H, s, 4'-OCH₃); ¹³C NMR (C₅D₅N) δ: 158.8(C-7), 158.6(C-7'), 154.8(C-4'), 152.8(C-4), 142.6(C-3), 141.8(C-2), 141.8(C-2', 3'), 113.9(C-1), 113.3(C-6), 113.1(C-1''), 113.1(C-5), 112.6(C-6''), 108.0(C-5'), 102.7(C-1'''), 78.9(C-2''), 78.31(C-3''), 74.6(C-4''), 70.86(C-5''), 62.10(C-6''), 61.7(3-OCH₃), 61.3(3'-OCH₃), 56.4(4'-OCH₃)。

1.3 样品来源 见表1。野牡丹和展毛野牡丹药材各10批。羊开口药材均采自广西境内,经钟小清高级工程师鉴定为野牡丹 *Melastomus candidum* D.Don 和展毛野牡丹 *Melastomus normale* D.Don 的根和根茎。

表1 样品来源

编号	基源	产地	批号	编号	基源	产地	批号
S1	野牡丹	广西恭城	GC180103	S11	展毛野牡丹	广西恭城	GC180203
S2	野牡丹	广西龙胜	LS180301	S12	展毛野牡丹	广西龙胜	LS180311
S3	野牡丹	广西临桂	LG171001	S13	展毛野牡丹	广西临桂	LG170912
S4	野牡丹	广西钟山	ZS171103	S14	展毛野牡丹	广西钟山	ZS170305
S5	野牡丹	广西桂平	GP170909	S15	展毛野牡丹	广西桂平	GP171005
S6	野牡丹	广西梧州	WZ170105	S16	展毛野牡丹	广西梧州	WZ170908
S7	野牡丹	广西贵港	GG171104	S17	展毛野牡丹	广西贵港	GG170610
S8	野牡丹	广西南宁	NN180403	S18	展毛野牡丹	广西南宁	NN180301
S9	野牡丹	广西宾阳	BY180107	S19	展毛野牡丹	广西宾阳	BY180205
S10	野牡丹	广西武鸣	WM171004	S20	展毛野牡丹	广西武鸣	WM171101

1.4 色谱条件 采用十八烷基键合硅胶色谱柱,以乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)为流动相,梯度洗脱(0~30 min, 10% A~16% A; 30~70 min, 16% A~20% A; 70~110 min, 20% A~48% A; 110~120 min, 48% A~90% A); 检测波长为364 nm;

体积流量为1.0 mL/min;柱温为35℃;进样量20 μL。理论塔板数以鞣花酸峰计不低于3000,各被测组分与相邻峰之间分离度均大于1.5。

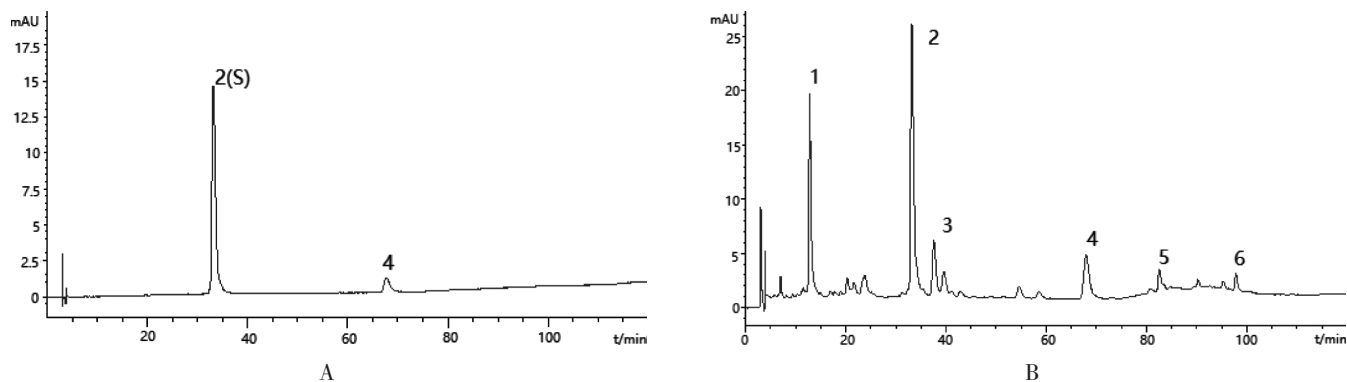
1.5 溶液制备 取鞣花酸对照品、3, 3', 4'-三甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-葡萄糖苷对照品适量,精密称定,置容量瓶中,加80%甲醇溶解,制成每1 mL含40.5 μg鞣花酸、11 μg 3, 3', 4'-三甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-葡萄糖苷的混合对照品溶液。

取羊开口药材细粉(过3号筛)约5 g,精密称定,置平底烧瓶中,加水50 mL,称定重量,水浴回流2 h,冷却至室温,再称定重量,并用水补足减失的重量,滤过。精密量取续滤液25 mL,用水饱和正丁醇萃取3次,每次20 mL,合并正丁醇层,蒸干,残渣加80%甲醇溶解,转移至5 mL容量瓶中并定容刻度,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

1.6 方法学考察 ①精密密度试验:取S1号样品粉末5 g,精密称定,制备供试品溶液,进样20 μL,重复进样6次,记录色谱图,以2号峰为参照,其相对保留时间和相对峰面积为1,计算6个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD值,结果均小于3%,表明仪器精密密度良好。②稳定性试验:取S1号样品粉末5 g,精密称定,制备供试品溶液,按“1.4”项下色谱条件,于0、2、4、8、12、24 h进样测定,记录色谱图,以2号峰为参照峰,其相对保留时间和相对峰面积为1,计算6个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD值,结果均小于3%,表明供试品溶液24 h内稳定。③重复性试验:取S1号样品粉末6份,精密称定,分别制备供试品溶液,按“1.4”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,以2号峰为参照峰,其相对保留时间和相对峰面积为1,计算6个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD值,结果均小于3%,表明该方法重复性良好。

2 结果

2.1 参照峰选择 见图1。精密量取1.4项下对照品溶液10 μL,注入HPLC色谱仪,进行测定,记录色谱图,羊开口经分析后出现多个色谱峰,以鞣花酸2(S)作为参照峰。



注: 2 (S) 为鞣花酸 2 (S); 4 为 3, 3', 4'-三甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-葡萄糖苷

图1 混合对照品 (A) 和样品 (B) HPLC 图

2.2 羊开口药材特征图谱建立及评价 见图2。采用国家药典委员会颁布的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004版)》，计算生成对照特征图谱。取20批羊开口药材各适量，按“1.5”项下方法制备供试品溶液，再按“1.4”项下色谱条件进行测定，记录色谱图。根据20批样品特征图谱的特点，确定6个峰作为共有峰，并标定了其中6个色谱峰，其中2号峰为鞣花酸，4号峰为3, 3', 4'-三甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-葡萄糖苷，2号峰峰面积大，分离度较好，保留时间适宜，因此可作为参照峰。各特征峰与S峰的相对保留时间分别为：0.323(峰1)、1.000[峰2(S)]、1.143(峰3)、2.144(峰4)、2.626(峰5)、3.125(峰6)。

分析20批药材特征图谱的共有模式，并计算对照图谱和20批样品图谱之间的相似度数据。见表2、图3。编号为S2、S12、S4、S14、S9、S19药材相似度低于0.900，其余批药材相似度均在0.900以上，这可能与地理位置、采收时间有关，提示药材采收应考虑产地和采收季节等因素。

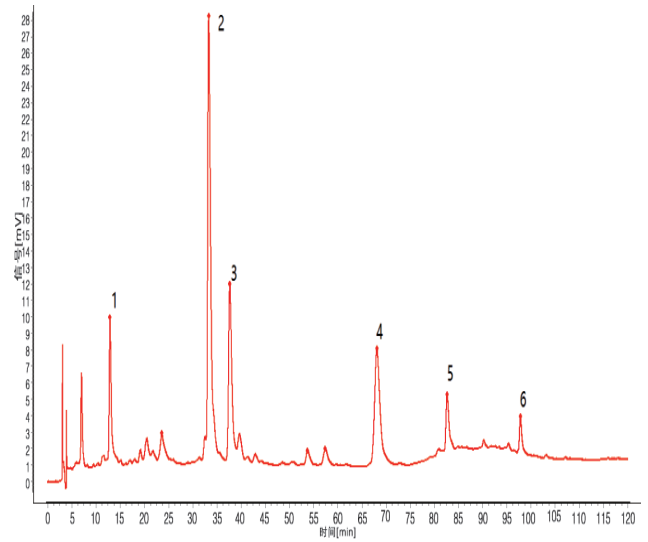


图2 混合对照品溶液特征图谱

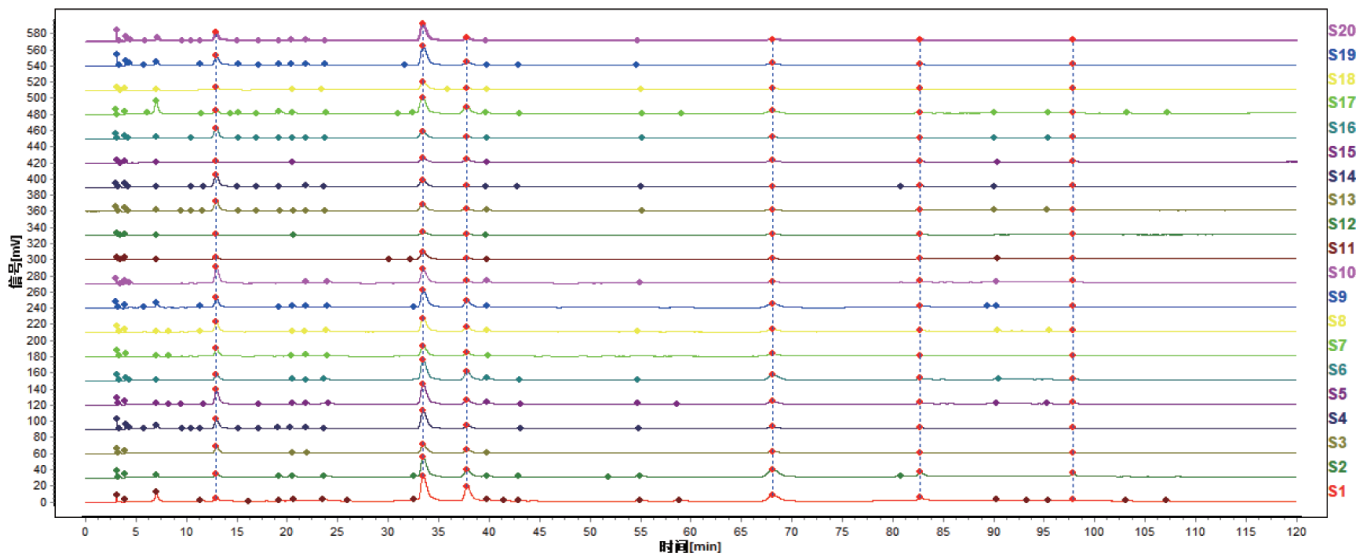


图3 20批样品 HPLC 特征图谱

表2 20批药材特征图谱相似度分析结果

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.939	S11	0.927
S2	0.893	S12	0.885
S3	0.991	S13	0.968
S4	0.879	S14	0.880
S5	0.981	S15	0.945
S6	0.991	S16	0.939
S7	0.975	S17	0.983
S8	0.994	S18	0.964
S9	0.895	S19	0.863
S10	0.996	S20	0.980

2.3 羊开口药材根和根茎特征图谱比较 见表3、图4。取相同产地的20批羊开口药材根和根茎各适量，按“1.5”项下方法制备供试品溶液，再按“1.4”项下色谱条件进行测定，记录色谱图，导入相似度软件中计算根和根茎相似度。羊开口药材根和根茎特征图谱相似度较高，说明羊开口以根和根茎入药有一定的科学性、合理性。

3 讨论

对羊开口药材80%甲醇提取液、鞣花酸和3, 3', 4'-三甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-葡萄糖苷混合对照品溶液分别进行紫外全波长扫描，结果溶液在364 nm波长处均有较大吸收，且在该波长下色谱峰分离度好、基线较平，因此选择364 nm作为测定波长。

表3 羊开口药材根和根茎特征图谱相似度分析结果

编号	根和根茎相似度	编号	根和根茎相似度
S1	0.918	S11	0.894
S2	0.906	S12	0.915
S3	0.877	S13	0.941
S4	0.976	S14	0.912
S5	0.931	S15	0.899
S6	0.897	S16	0.915
S7	0.956	S17	0.937
S8	0.941	S18	0.947
S9	0.935	S19	0.890
S10	0.925	S20	0.955

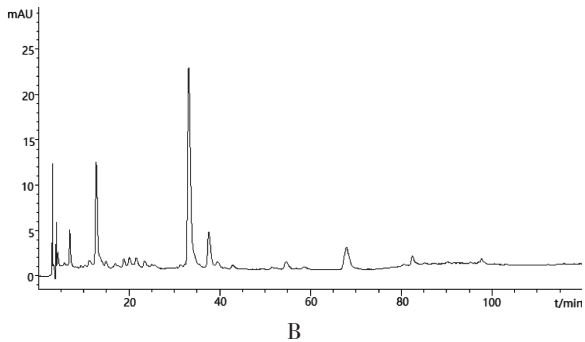
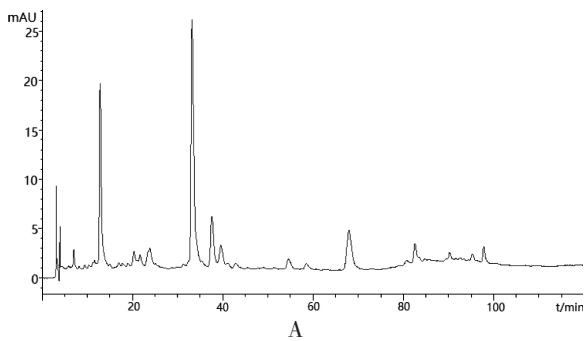


图4 S1样品根(A)和根茎(B)特征图谱

本研究比较了 Phenomenex C₁₈(250.0mm × 4.6 mm, 5 μm), Agilent 5 TC-C₁₈(250.0 mm × 4.6 mm, 5 μm), Brownlee Validated C₁₈(250.0 mm × 4.6 mm, 5 μm)色谱柱, 以及不同品牌的液相系统, 均能较好地重复所建方法, 说明本研究所建方法对色谱柱的耐用性较好。

此外, 本研究对比了多个流动相系统, 经优化后的梯度洗脱方式, 以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 各峰形对称性、分离度较好, 总体特征色谱图较佳, 故以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相。

《广西壮族自治区瑶药材质量标准》收录的羊开口2个基源植物及不同药用部位的特征图谱有较高相似度, 为羊开口的合理应用及可持续发展奠定基础, 且所建特征图谱方法特征性和专属性强, 能较好地反应药材的整体质量情况, 可为羊开口药材质量标准的提升提供科学依据。

[参考文献]

- [1] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区瑶药材质量标准: 第一卷[M]. 南宁: 广西科技出版社, 2014: 101.
- [2] 邹节明, 钟小清, 吕高荣, 等. 广西特色中草药资源选编[M]. 北京: 科学出版社, 2011.
- [3] 邹准, 寿晓云, 闵建国, 等. HPLC法测定壮药羊开口中没食子酸和鞣花酸的量[J]. 中草药, 2012, 43(11): 2206-2208.
- [4] 黄瑞松, 陆峥琳, 高雪锋, 等. HPLC测定羊开口中的鞣花酸[J]. 华西药学杂志, 2017, 32(1): 81-83.
- [5] 袁永兵, 张兰珍, 郭亚健, 等. RP-HPLC法测定叶下珠中没食子酸、柯里拉京和鞣花酸的含量[J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32(1): 56-58.

(责任编辑: 冯天保, 钟志敏)