

# 广西地产黄杞叶指纹图谱研究

张霞<sup>1</sup>, 傅旭春<sup>2</sup>, 白海波<sup>1\*</sup> (1.杭州华东医药集团生物工程研究所, 杭州 310011; 2.浙江大学城市学院药物研究所, 杭州 310015)

**摘要:** 目的 建立广西地产黄杞叶指纹图谱检测方法, 为提高黄杞叶的质量控制提供依据。方法 采用 Diamonsil<sup>®</sup>C<sub>18</sub>(2) (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, C<sub>18</sub>(4.6 mm × 15 mm, 5 μm) 为保护柱, 乙腈-0.05% 磷酸溶液(19:81) 为流动相, 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 240 nm, 进样量 10 μL, 柱温 30 °C, 分析时长 60 min; 采用中国药典委员会组织编制的中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版(2004) 计算相似度。结果 该指纹图谱测定方法具有很好的重复性和稳定性, 符合指纹图谱相关要求, 且操作简便、快速; 11 批样品指纹图谱可检测出 11 个相对位置稳定的共有峰, 且各批样品指纹图谱与建立的对照指纹图谱之间的相似度均在 0.95 以上。结论 本方法简便、快速而且准确、可靠, 可用于黄杞叶的质量控制。  
**关键词:** 黄杞; 指纹图谱; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1; R917.101 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2014)01-0054-04

## Fingerprint Research of *Engelhardia Roxburghiana* Leaves from Origination in Guangxi

ZHANG Xia<sup>1</sup>, FU Xuchun<sup>2</sup>, BAI Haibo<sup>1\*</sup> (1. Biological Engineering Research Institute, Hangzhou Huadong Medicine Group, Hangzhou 310011, China; 2. Institute of Materia Medica, Zhejiang University City College, Hangzhou 310015, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To study the HPLC fingerprints of 11 batches of *Engelhardia roxburghiana* Wall leaves from different regions of Guangxi province for their quality control. **METHODS** The HPLC separation was achieved on a reverse phase Diamonsil<sup>®</sup> C<sub>18</sub>(2) column(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with a C<sub>18</sub> guard column(4.6 mm × 15 mm, 5 μm) maintained at 30 °C. The mobile phase was acetonitrile-water containing 0.05% phosphoric acid (19 : 81). The flow rate was set at 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The detection wave length was 240 nm. The injection volume was 10 μL. The analyzing time was 60 min. Similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of TCM published by Chinese Pharmacopoeia Commission(Version: 2004A) was used in data analysis. **RESULTS** A sensitive, reproducible and selective detection method and a rapid, stable and simple extraction procedure were developed and validated. A reference fingerprint spectrum was established and 11 co-possessing peaks were selected as fingerprints. The similarity between the reference fingerprint spectrum and each fingerprint spectrum from the eleven samples was analyzed and all the similarity values were ≥0.95. **CONCLUSION** The method for fingerprint spectrum establishment is scientific and reasonable and can be used for quality control of *Engelhardia roxburghiana* leaves from origination in Guangxi.

**KEY WORDS:** *Engelhardia roxburghiana* Wall; fingerprint spectrum; HPLC

黄杞(*Engelhardia roxburghiana* Wall)是胡桃科黄杞属植物, 为传统草药, 在我国广东、广西、福建等南方地区广泛分布, 资源十分丰富。根、茎皮药用治疗湿热黄疸、呕吐、泄泻、脱肛、外伤出血。叶可消除暑热口渴、食滞、腹痛。在民间, 黄杞叶还常作为甜茶服用, 可预防高血压, 并有降血脂的功效<sup>[1-6]</sup>。二氢黄酮是黄杞叶的主要活性成分<sup>[7]</sup>, 其中以落新妇苷和黄杞苷的含量最高。现代药理学研究表明, 落新妇苷和黄杞苷均具有显著的抗炎活性<sup>[8]</sup>。南京大学已经将以落新妇苷为主要成分的土茯苓总苷在免疫系统疾病中的应用申报了专利, 美国专利号: US6, 531, 505 (Immunosuppressive agents); 中国专利号: CN1154488C(免疫抑制剂), 并将其作

为新药进行开发。

目前国内外尚没有黄杞叶指纹图谱研究的文献报道。本研究利用甲醇超声提取结合反相高效液相色谱对广西地区 11 种黄杞叶的 HPLC 指纹图谱进行了研究, 建立了广西地区黄杞叶的 HPLC 对照指纹图谱, 并对落新妇苷峰和黄杞苷峰进行了指认, 为广西地产黄杞叶的质量控制提供了新的依据。

### 1 仪器与试剂

#### 1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪(Agilent 公司, 美国, 包括高精度四元梯度泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱和 DAD 二极管阵列检测器); 高效液相色谱分析柱 Diamonsil<sup>®</sup>C<sub>18</sub>(2)(4.6 mm ×

作者简介: 张霞, 女, 博士, 工程师 Tel: 15068861982 E-mail: 545216153@qq.com \*通信作者: 白海波, 男, 博士, 研究员 Tel: (0571)89918210 E-mail: hzbhb@163.com

250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 保护柱  $\text{C}_{18}$ (4.6 mm $\times$ 15 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 纯水仪(PURELAB Ultra Genetic, 英国 ELGA 公司); 中草药粉碎机(FW177 型, 天津市泰斯特仪器有限公司)。

## 1.2 试药

甲醇(色谱纯, 美国 Amethyst Chemicals); 乙腈(色谱纯, 加拿大 Promptar Company LTD); 落新妇苷对照品[成都普恩生物有限公司, 批号: PS10013001, 纯度: 99%(HPLC)]; 黄杞苷对照品[上海鼓臣生物技术有限公司, 批号: A0533, 纯度 $\geq$ 98%(HPLC)]; 黄杞叶样品来源于广西南宁、桂林两地, 经本实验室白海波教授鉴定为胡桃科植物黄杞 *Engelhardia roxburghiana* Wall 的干燥叶。

## 2 方法与结果

### 2.1 11 种黄杞叶药材指纹图谱检测方法

**2.1.1 色谱条件及系统适用性实验** 色谱柱: Diamonsil<sup>®</sup>  $\text{C}_{18}$ (2)(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 保护柱  $\text{C}_{18}$ (4.6 mm $\times$ 15 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相: 乙腈-0.05%磷酸溶液(19:81); 流速: 1.0 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>; 检测波长: 240 nm; 进样量: 10  $\mu\text{L}$ ; 柱温: 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 分析时长: 60 min; 理论板数按落新妇苷峰计算, 应不低于 3 000。落新妇苷峰与相邻色谱峰之间的分离度应 $>$ 1.5。

**2.1.2 参照物选择** 落新妇苷为黄杞叶中主要活性成分, 含量较高, 与相邻色谱峰分离良好, 所以选择落新妇苷峰为参照物。

**2.1.3 对照品溶液的制备** 分别取落新妇苷、黄杞苷对照品各约 2 mg, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含 1.0 mg 的溶液, 12 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清即得。

**2.1.4 供试品溶液的制备** 取黄杞叶粗粉约 1.0 g(过 24 目筛, 50  $^{\circ}\text{C}$  干燥至恒重), 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加甲醇 30 mL, 超声 60 min, 混匀, 取适量, 12 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 低温(4  $^{\circ}\text{C}$ )离心 10 min, 取上清即得供试品溶液。

**2.1.5 测定法** 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10  $\mu\text{L}$ , 注入液相色谱仪, 记录 1 h 色谱图。供试品指纹图谱中应呈现与参照物色谱峰保留时间相同的色谱峰, 按中药色谱指纹图谱相似度评价系统计算, 以落新妇苷峰和黄杞苷峰进行校正, 供试品指纹图谱与所建立的对照指纹图谱的相似度不得低于 0.95, 落新妇苷的峰高值不得低于其他指纹峰的峰高值。

## 2.2 方法学考察

**2.2.1 色谱柱考察** 取供试品溶液一份, 用不同厂家的标识为同种填料、同长度、内径、粒径的色谱柱检测, 结果显示部分共有峰相对其内参照峰(落新妇苷峰)的相对保留时间和相对峰面积有明显改变(相对保留时间 RSD $>$ 5%), 所以指纹图谱检测时要固定色谱柱厂家、型号和规格。该结果同《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》中对高效液相色谱指纹图谱色谱柱的规定相一致。

**2.2.2 仪器精密度试验** 取供试品溶液一份, 连续进样 5 次, 结果显示主要共有峰相对其内参照峰(落新妇苷峰)的相对保留时间 RSD 均 $<$ 0.5%, 相对峰面积 RSD 均 $<$ 2.0%, 说明仪器精密度良好。

**2.2.3 稳定性试验** 取供试品溶液一份, 室温下放置, 分别于 0, 5, 10, 34, 70 h 进样, 结果主要共有峰相对其内参照峰(落新妇苷峰)的相对保留时间 RSD 均 $<$ 1.0%, 相对峰面积 RSD 均 $<$ 3.0%, 说明供试品溶液至少在 70 h 内保持稳定。

**2.2.4 重复性试验** 取同一批样品 5 份, 精密称定, 按“2.1.4”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.5”项下方法进样, 记录各色谱峰的保留时间和峰面积, 计算各主要共有峰相对其内参照峰(落新妇苷峰)的相对保留时间和相对峰面积。结果表明, 占总峰面积 $>$ 5%的主要共有峰, 其相对保留时间 RSD 均 $<$ 1.0%, 相对峰面积 RSD 均 $<$ 3.0%, 参照《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》, 该实验结果表明方法的重复性良好。

## 2.3 指纹图谱制备

**2.3.1 落新妇苷、黄杞苷图谱的制备** 取落新妇苷、黄杞苷对照品溶液各 10  $\mu\text{L}$  注入液相色谱仪, 按“2.1.1”项下色谱条件进行实验, 落新妇苷、黄杞苷的保留时间分别为 12.10 min 和 19.65 min, 分离度良好。

**2.3.2 供试品指纹图谱的制备** 取各药材供试品溶液 10  $\mu\text{L}$  注入液相色谱仪, 按“2.1.1”项下色谱条件进行实验, 记录色谱图。以落新妇苷峰为参照, 计算各峰的相对保留时间, 结果, 11 个峰的相对保留时间 RSD 均 $<$ 2%, 相对保留时间 RSD 均 $<$ 1%, 因此确定这 11 个峰为共有指纹峰。将落新妇苷峰标记为峰 1, 黄杞苷峰标记为峰 2, 其余依据保留时间大小依次标记为峰 3~11。11 个共有峰的峰号、保留时间以及相对保留时间分别为: 峰 1 (11.99 min, 1, 落新妇苷), 峰 2 (19.54 min, 1.63, 黄杞苷), 峰 3 (7.21 min, 0.60), 峰 4 (9.44 min, 0.79),

峰 5(10.15 min, 0.85), 峰 6(10.82 min, 0.90), 峰 7(15.90 min, 1.33), 峰 8(16.50 min, 1.38), 峰 9(17.08 min, 1.42), 峰 10(29.04 min, 2.42), 峰 11(31.54 min, 2.63)。代表性图谱见图 1。

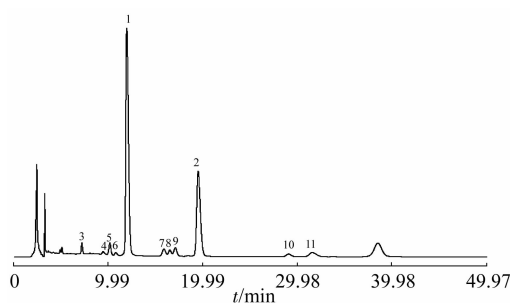


图 1 黄杞叶药材代表性 HPLC 指纹图谱

1-落新妇苷; 2-黄杞苷

Fig 1 The representative HPLC fingerprint spectrum of *Engelhardia roxburghiana* leaves

1-astilbin; 2-engeletin

### 2.3.3 对照指纹图谱的建立和相似度评价

采用中国药典委员会组织编制的中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版(2004), 将 11 批黄杞叶色谱图导入该软件, 以落新妇苷峰和黄杞苷峰进行校正, 自动匹配, 采用中位数法生成了 11 批样品的对照指纹图谱 R, 见图 2。计算各批黄杞叶药材图谱与该对照指纹图谱的相似度, 结果 11 批样品相似度均>0.95, 平均为 0.98, 相对保留时间 RSD 为 1.54%。11 批药材的相似度较高, 也表明 11 批药材所含黄酮类物质基本相同。

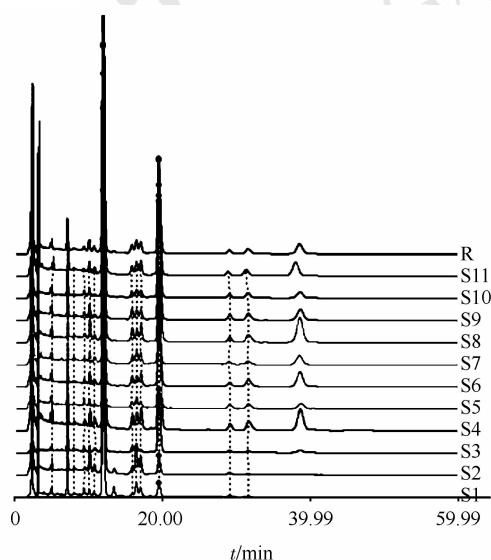


图 2 11 批黄杞叶药材指纹图谱与生成的对照指纹图谱

Fig 2 The produced reference fingerprint spectrum and each fingerprint spectrum from the eleven samples of *Engelhardia roxburghiana* leaves

## 3 讨论

以单一的有效成分来控制中药质量已不能适应中药现代化的要求, 中药指纹图谱就是运用现代分析技术对中药化学信息以图形或图像的方式进行表征并加以描述, 可以在不清楚全体化学成分的情况下, 有效控制中药的内在质量, 提高中药质量的稳定性。高效液相色谱法是目前最广泛使用的技术之一<sup>[9]</sup>, 也是目前中药指纹图谱研究的主要手段。本文建立了广西地产黄杞叶药材 HPLC 指纹图谱测定方法, 并进行了系统的方法学研究。

黄杞叶中主要功效成分为黄酮、二氢黄酮类脂溶性成分, 分别采用 95%乙醇、75%乙醇、甲醇 30 mL 为提取溶剂, 超声时间试验了 30, 60 min, 提取 1 次或 2 次, 12 000 r·min<sup>-1</sup> 常温或低温离心 10 min。结果显示, 采用 30 mL 甲醇超声 60 min 提取 1 次, 12 000 r·min<sup>-1</sup> 低温(4℃)离心 10 min, 不但所得供试品溶液室温放置至少 70 h 稳定, 而且操作简便、重现性好, 能适应实验室常规检测的需要, 故采用此方法。检测波长试验了 215, 225, 230, 235, 240, 254, 280, 291, 300, 365 nm 10 个波长, 结果显示, 254, 280, 291, 300, 365 nm 检测图谱中, 共有峰数目明显减少; 215, 225, 230, 235, 240 nm 共有峰数目几乎一致, 但在 240 nm 下检测, 5 min 以前出峰数目明显减少, 而且避免了落新妇苷吸收太强出现平头峰的情况, 综合考虑, 选择 240 nm 作为检测波长。洗脱溶剂比较了甲醇-水和乙腈-0.05%磷酸溶液, 比较了等度和梯度洗脱, 考察了有机相和水相的比例对出峰的影响, 考察了合理的色谱图记录时间, 最后确定乙腈-0.05%磷酸溶液(19:81)为洗脱方法并确定色谱图记录时间为 60 min。耐用性实验中, 发现使用不同厂家的色谱柱、柱温对部分共有峰相对其内参照峰(落新妇苷峰)的相对保留时间、相对峰面积有较显著影响, 水相磷酸浓度(0.04%→0.06%)所得分析结果没有显著差异。所以检测时要固定色谱柱厂家、型号和规格并控制柱温。

利用建立的检测方法测定了 11 批广西地产黄杞叶药材的指纹图谱, 确定了 11 个共有峰。与对照品保留时间比较, 其中 2 个归属为: 落新妇苷(共有峰 1, 参照峰)、黄杞苷(共有峰 2)。11 批样品图谱中, 落新妇苷峰、黄杞苷峰是最主要的色谱峰, 其中落新妇苷峰更是明显。采用中国药典委员会组织编制的中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A

版(2004年版),以落新妇苷峰和黄杞苷峰做校正,生成对照图谱,对11批样品图谱与对照图谱进行了相似度评价,结果相似度均在0.95以上,且落新妇苷的峰高均明显高于图谱中其它峰。该结果反映11批药材的整体面貌是一致的,说明该指纹谱对于从整体上控制广西地产黄杞叶药材质量具有实际意义。

## REFERENCES

- [1] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae, Agendae Academica Sinicae Edita. Flora Reipublicae Popularis Sinicae (中国植物志) [M]. Vol 21. Beijing: Science Press, 1979: 11.
- [2] Chinese Herbalism Editorial Board. Chinese Materia Medica (中华本草) [M]. Vol 2. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1996: 371.
- [3] XU R, WEI S. Study on chemical constituents of *Engelhardtia colebrookinana* Lindl.ex Wall [J]. Guangxi J Tradit Chin Med(广西中医药), 2007, 30(4): 56-57.

- [4] Fujian Institute of Traditional Chinese Medicine. Fujian Medical Records(福建药物志) [M]. Vol 2. Fuzhou: Fujian Science and Technology Press, 1983: 69.
- [5] LI J S, JIANG Z H, MU Y B, et al. The ether constituents from the barks of *Engelhardtia fenzell* Merr [J]. Plant Resour Environ(植物资源与环境), 1993, 2(1): 7-9.
- [6] HE J C, WEI S, LAN S B, et al. Study on chemical constituents from the barks of *Engelhardtia colebrookinana* Lindl.ex Wall [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2006, 37(12): 1788-1789.
- [7] LI X, CHEN G M, WANG M Q. Investigations on the resources and exploiting situation of the substituting for tea plant in China [J]. Sum Rev(综述与述评), 2008, 11(12): 4.
- [8] HUANG H Q, CHENG Z H, SHI H M, et al. Isolation and characterization of two flavonoids, engeletin and astilbin, from the leaves of *Engelhardtia roxburghiana* and their potential anti-inflammatory properties [J]. J Agric Food Chem, 2011, 59(9): 4562-4569.
- [9] ZHANG X, YAO Y, ZENG S, et al. Metabolism of ebracteolata compound B studied *in vitro* with human liver microsomes, HepG2 Cells and recombinant human enzymes [J]. Drug Metab Dispos, 2010, 38(12): 2157-2162.

收稿日期: 2013-05-08

## 盐酸氨酮戊酸溶液剂与水凝胶的透皮及体内转化效果评价

郭倩倩<sup>1,2</sup>, 刘金华<sup>1,2</sup>, 刘二刚<sup>2</sup>, 赵永星<sup>1</sup>, 华海婴<sup>2</sup>, 薛逸君<sup>3</sup>, 黄永焯<sup>2</sup>, 蒋剑平<sup>3\*</sup>, 苏勇<sup>3\*</sup> (1.郑州大学药学院, 郑州 450001; 2.中科院上海药物研究所, 上海 201203; 3.上海复旦张江生物医药有限公司, 上海 201203)

**摘要:** 目的 考察盐酸氨酮戊酸溶液剂及水凝胶2种制剂的透皮性能及皮内转化效果,为药物的临床应用提供参考。方法 通过体外透皮实验考察盐酸氨酮戊酸的水凝胶和溶液剂的透皮效果,并对2种制剂在活体动物皮肤中的转化产物原卟啉 IX(PpIX)进行定量分析,综合考察2种制剂的潜在治疗效果。结果 体外透皮实验中,溶液剂在乳猪单位面积皮肤中的滞留量为 $(52.68 \pm 9.95) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ,4 h 累积透过量(Q)为 $(38.83 \pm 15.70) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ,透皮速率为 $(12.27 \pm 5.99) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ,透皮时滞( $T_1$ )为 $(0.70 \pm 0.35) \text{h}$ ;凝胶剂分别为 $(59.90 \pm 28.68) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ , $(41.91 \pm 18.80) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ , $(13.22 \pm 5.82) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ 和 $(0.80 \pm 0.32) \text{h}$ ;体内实验中,用药4 h 时裸鼠单位质量皮肤中的 PpIX 含量分别为 $(2.14 \pm 0.22) \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ (水凝胶)和 $(2.17 \pm 0.48) \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ (溶液剂)。结论 体内外实验结果表明,2种制剂的透皮效果及动物皮肤内转化生成 PpIX 的能力无显著差异,可根据临床需要选择合适的剂型和给药方案。

**关键词:** 盐酸氨酮戊酸;透皮吸收;原卟啉 IX

中图分类号: R943

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)01-0057-04

## Transdermal and Biotransformation Differences between Amindevulinic Acid Hydrochloride Solution and Gel Formula

GUO Qianqian<sup>1,2</sup>, LIU Jinhua<sup>1,2</sup>, LIU Ergang<sup>2</sup>, ZHAO Yongxing<sup>1</sup>, HUA Haiying<sup>2</sup>, XUE Yijun<sup>3</sup>, HUANG Yongzhuo<sup>2</sup>, JIANG Jianping<sup>3\*</sup>, SU Yong<sup>3\*</sup> (1.School of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2.Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China; 3.Shanghai Fudan-Zhangjiang Bio-pharmaceutical Co.,Ltd., Shanghai 201203, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To assess the transdermal and *in vivo* biotransformation behavior of the topical applied

基金项目:“重大新药创制”国家科技重大专项(2009ZX09401-001, 2012ZX09401001);上海市科研计划项目(13431901900, 11PJ1411800)

作者简介:郭倩倩,女,硕士生 Tel: (021)20231000-1403 E-mail: qian1291@sohu.com \*通信作者:蒋剑平,男,工程师 Tel: (021)58953355-1217 E-mail: jjjiang@fd-zj.com 苏勇,男,博士,高级工程师 Tel: (021)58953355-1303 E-mail: ysu@fd-zj.com