

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.02.009

刘幼娴, 谷陟欣, 卢凤来, 等. 不同采收期裸花紫珠的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 广西植物, 2014, 34(2):174-178

Liu YX, Gu ZX, Lu FL, et al. Establishment of high performance liquid chromatographic fingerprint of *Callicarpa nudiflora* on different harvesting time [J]. *Guihaia*, 2014, 34(2):174-178

# 不同采收期裸花紫珠的 HPLC 指纹图谱研究

刘幼娴<sup>1,2</sup>, 谷陟欣<sup>3</sup>, 卢凤来<sup>1</sup>, 黄 胜<sup>3</sup>, 颜小捷<sup>1</sup>, 李典鹏<sup>1\*</sup>

(1. 广西植物功能物质研究与利用重点实验室, 广西植物研究所, 广西 桂林 541006;

2. 广西中医药大学, 南宁 530001; 3. 九芝堂股份有限公司, 长沙 410021)

**摘 要:** 为建立裸花紫珠药材高效液相指纹图谱研究方法, 该研究采用 0.4% 磷酸水溶液(A)-乙腈(B); 梯度洗脱为 0~15 min, 16%~25% B, 15~25 min, 25%~39.7% B; Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 柱温为 30 °C; 流速为 1 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量为 10 μL; 检测波长 327 nm; 检测时间 25 min 等色谱条件, 研究了不同采集时间共 25 批裸花紫珠药材的指纹图谱, 获取 14 个共有特征色谱峰, 确定了其中的 3 个成分, 利用相似度分析、主成分分析及对应分析对它们进行了分析。结果表明: HPLC 指纹图谱结合计量分析法可有效评价裸花紫珠的质量, 该方法可有效应用到裸花紫珠原料及其制品的质量控制中。

**关键词:** 裸花紫珠; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 主成分分析; 对应分析

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2014)02-0174-05

## Establishment of high performance liquid chromatographic fingerprint of *Callicarpa nudiflora* on different harvesting time

LIU You-Xian<sup>1,2</sup>, GU Zhi-Xin<sup>3</sup>, LU Feng-Lai<sup>1</sup>, HUANG Sheng<sup>3</sup>,  
YAN Xiao-Jie<sup>1</sup>, LI Dian-Peng<sup>1\*</sup>(1. *Guangxi Key Laboratory of Functional Phytochemicals Research and Utilization, Guangxi Institute of Botany*, Guilin 541006, China; 2. *Guangxi University of Chinese Medicine*, Nanning 530001, China; 3. *Jiuzhitang CO., Ltd*, Changsha 410021, China)

**Abstract:** The chromatographic fingerprint was established for evaluating and controlling the quality of *Callicarpa nudiflora*. The chromatographic analysis was carried out on a ZORBAX SB - C18 column(250 mm × 4.5 mm, 5 μm). The mobile phase was 0.4% phosphoric acid(A) and acetonitrile(B) with gradient elution(0-15 min, 16% B-25% B; 15-25 min, 25% B-39.7% B). The flow rate was maintained at 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The detection wave length was set at 327 nm and the column temperature was controlled at 30 °C. The sample injection volume was 10 μL. 25 different original samples were analyzed, and the chromatographic fingerprints of *C. nudiflora* were constructed with 14 fingerprint peaks, and 3 main compounds were identified. The Similarity Evaluation System of Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine(Version2004A), hierarchical clustering analysis(HCA) and correspondence analysis were applied to classify the samples according to their sources, and satisfactory results were obtained.

收稿日期: 2013-11-18 修回日期: 2014-02-07

基金项目: 国家科技支撑计划项目(SQ2010BAJY1411-07-05); 海南省中药现代化专项(2012ZY020); 广西科技攻关项目(桂科攻 11107010-3-10); 广西植物功能物质研究与利用重点实验室主任基金(ZRJ2012-5)。

作者简介: 刘幼娴(1987-), 女, 广西贵港人, 硕士研究生, 主要从事植物资源开发与利用研究, (E-mail)liuyouxian2013@126.com。

\*通讯作者: 李典鹏, 博士, 研究员, 主要从事植物活性成分研究与开发, (E-mail)ldp@gxib.cn。

The chromatographic fingerprint can be used to differentiate the raw materials from different sources and be served as a powerful tool for the further quality control of *C. nudiflora*.

**Key words:** *Callicarpa nudiflora*; high performance liquid chromatographic; fingerprint; hierarchical clustering analysis; correspondence analysis

裸花紫珠为马鞭草科植物裸花紫珠(*Callicarpa nudiflora*)的干燥叶和带叶的嫩枝,主产于我国海南,为海南道地药材,我国广东、广西也有分布。国外主要分布于印度、越南和马来西亚。其根、叶可入药,有抗菌止血,消炎解毒,散瘀消肿,驱风祛湿之功效(周桑玉等,2010;朱立新等,2009;万文萃等,2010)。裸花紫珠临床主要应用于治疗化脓性炎症、急性传染性肝炎、呼吸道及消化道出血、创伤出血等症,外用治烧、烫伤及外伤出血等(刘宏奇等,2010;刘丰等,2008;彭兵,2004;廖丽锦等,2009;孔凤利,2010;陈春等,2010;梁纪军等,2009;陈颖等,2006)。近年来由裸花紫珠制成的裸花紫珠片、裸花紫珠栓、裸花紫珠分散片、裸花紫珠胶囊、裸花紫珠软胶囊和裸花紫珠颗粒等产品在市场日益受到患者的青睐,其药材也呈现出供不应求的趋势。而紫珠属植物品种繁多,市场上常出现以假乱真,以次充好的情况,所以对裸花紫珠进行进一步质量研究是非常必要的。

目前裸花紫珠质量控制的方法主要为以分光光度法测定总黄酮含量(谌乐刚等,2005),以高效液相法测定指标性成分如木犀草素、熊果酸、齐墩果酸、毛蕊花糖苷等(胡蓉等,2009;张艳秋等,2009)。有关该药材的指纹图谱研究还鲜有报道。本论文建立了裸花紫珠 HPLC 指纹图谱方法,并考察了不同采收期裸花紫珠的药材的质量差异,运用主成分分析与对应分析法对实验数据进行了分析,实验结果表明,HPLC 指纹图谱结合数学方法可有效的评价裸花紫珠药材,该方法可应用到裸花紫珠质量控制实践中。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料、仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪;KQ 3200 DE 型数控超声波清洗器(昆山市仪器有限公司);Milli-Q 纯水系统(美国 Millipore 公司);16K 台式离心机(珠海黑马医学仪器有限公司)。ZORBAX SB C-18 分析柱(4.6 mm×250 mm,5 μm,美国 Agilent 公司);BS110S 电子天平(北京赛多利斯天平有限公

司)。乙腈为色谱纯(美国 TEDIA 公司),水为娃哈哈制超纯水,其余试剂均为分析纯。对照品连翘酯苷 B(中国药品生物制品检定所 111811-201001)、毛蕊花糖苷(中国药品生物制品检定所 111530-201208)、异毛蕊花糖苷(成都瑞芬思生物科技有限公司 Y-073-121023)。

样品为裸花紫珠的叶及嫩枝,采集于海南,具体样品信息见表 1。

表 1 样品来源信息

Table 1 The origins of samples

编号 No.	采收时间 Harvest time	地点 Place	编号 No.	采收时间 Harvest time	地点 Place
S1	2010.01.13	海口	S14	2010.11.04	陵水
S2	2010.02.25	海口	S15	2010.12.03	白沙
S3	2010.03.22	海口	S16	2010.12.03	陵水
S4	2010.04.20	海口	S17	2010.01.07	白沙
S5	2010.06.23	海口	S18	2010.01.07	陵水
S6	2010.07.21	海口	S19	2010.03.09	白沙
S7	2010.09.21	海口	S20	2010.03.09	陵水
S8	2010.08.14	白沙	S21	2010.05.04	白沙
S9	2010.09.11	白沙	S22	2010.05.04	陵水
S10	2010.09.11	陵水	S23	2010.06.11	白沙
S11	2010.10.01	白沙	S24	2010.06.11	陵水
S12	2010.10.01	陵水	S25	2010.08.14	陵水
S13	2010.11.04	白沙			

### 1.2 方法

1.2.1 色谱条件 流动相:0.4%磷酸水溶液(A)-乙腈(B);梯度洗脱:0~15 min,16%~25% B,15~25 min,25%~39.7% B;Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱:4.6 mm×250 mm,5 μm;柱温:30 ℃;流速:1 mL·min<sup>-1</sup>;进样量:10 μL;检测波长:327 nm;检测时间:25 min。

1.2.2 样品溶液的制备 新鲜样品采集后,于室内阴干,粉碎机将其粉碎过 40 目筛。准确称取药材粉末 0.5 g,加入 50%乙醇 50 mL,称重,超声提取,提取时间 1 h,放凉后用 50%乙醇补重。取上清液离心 5 min,0.22 μm 滤膜过滤,备用。

1.2.3 对照品溶液的制备 分别精确称量连翘酯苷 B 2.3 mg、毛蕊花糖苷 5.0 mg、异毛蕊花糖苷 5.5 mg 对照品,用 50%乙醇溶解到 3 个 5 mL 的容量瓶中,超声使其充分溶解,并用 50%乙醇定容制成储备液。

## 2 结果与分析

### 2.1 指纹图谱条件优化

以检测出的峰的数量,主要色谱峰峰面积为主要指标,比较了不同提取方法,不同提取溶剂,溶剂

体积,提取时间等参数对提取效果的影响。从表 2 结果看出,这些因素对提取效果有明显影响,除了考虑峰数量、峰面积外,我们还综合考虑峰型,主要成分提取效果等,最后确定出最佳的提取条件如 1.2 所示。同时考察不同检测器,不同色谱柱、柱温、流速等条件,确定最优的分析条件如 1.2.1 所示。

表 2 不同提取条件与不同分析条件对裸花紫珠指纹图谱的优化结果

Table 2 Different extraction conditions and detection conditions to optimize the fingerprint

不同提取方法 Different extraction methods		峰数目 Number of peaks	峰面积 Peak area	不同分析条件 Different analytical conditions		峰数目 Number of peaks	峰面积 Peak area
提取方法 Extraction methods	超声提取 Ultrasonic extraction	52	13048.7	检测器 Detector	UV	52	13 048.7
	加热回流 Heating reflux extraction	51	11332		ELSD	7	2 248.51
不同溶剂 Different solvents	水 Water	47	8 737.05	色谱柱 Column	ZORBAX SB-C18 (5 $\mu\text{m}$ , 4.6 $\times$ 250 mm)	55	30 658.7
	25% 甲醇 25% Methanol	51	10 370		ZORBAX SB-C18 (5 $\mu\text{m}$ , 4.6 $\times$ 150 mm)	43	29 166.1
	50% 甲醇 50% Methanol	52	10 554.8	Eclipse XDB-C18 (5 $\mu\text{m}$ , 4.6 $\times$ 150 mm)	25 $^{\circ}\text{C}$	45	29 321.8
	75% 甲醇 75% Methanol	55	10 306.3			51	17 576.7
	100% 甲醇 100% Methanol	50	9 915.84	柱温 Column temperature	30 $^{\circ}\text{C}$	52	17 583
	25% 乙醇 25% Ethanol	50	10 127		35 $^{\circ}\text{C}$	52	17 573.5
	50% 乙醇 50% Ethanol	55	11 669	40 $^{\circ}\text{C}$	0.8 mL $\cdot$ min $^{-1}$	51	17 405.2
	75% 乙醇 75% Ethanol	52	13 048.7			51	16 326.6
	100% 乙醇 100% Ethanol	43	7 293.88	流速 Flow rate	1.0 mL $\cdot$ min $^{-1}$	51	17 983.4
	25 mL	52	13 680.5		1.2 mL $\cdot$ min $^{-1}$	51	15 123.2
不同体积 Different volume	50 mL	60	24 862.7	缓冲溶液 pH Buffer pH	2.0	45	15 187.4
	75 mL	45	7 877.17		3.0	48	16 194
	100 mL	44	6 804.69		4.0	52	17 573.5
	0.5 h	50	8 726.01				
不同提取时间 Different extraction time	1 h	52	12 508.2				
	1.5 h	47	9 584.60				
	2 h	49	9 857.47				
	2.5 h	49	9 980.47				

### 2.2 方法学考察

2.2.1 精密度实验 取 S8 药材样品制备供试品溶液,在 1.2.1 条件下连续进样 5 次,各主要色谱峰的保留时间和峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为 0.04%~0.13%和 0.18%~3.00%,这表明仪器的精密度良好。

2.2.2 重现性实验 取 S8 药材样品 5 份,分别按 1.2.2 中的方法制备供试品溶液,按照 1.2.1 节所述色谱条件进行 HPLC 分析。色谱图中各主要色谱峰的保留时间和峰面积的 RSD 分别为 0.09%~1.20%和 1.43%~2.89%,这表明本方法的重现性良好。

2.2.3 稳定性实验 取 S8 药材样品制备供试品溶液,分别在样品制备完成后第 0、4、8、16、24、48 h 进行 HPLC 分析测定,色谱图中各主要色谱峰的保留时间和峰面积的 RSD 分别为 0.09%~0.40%和 0.47%~3.28%,这表明供试品在 48 h 内稳定。

### 2.3 裸花紫珠指纹图谱的建立

在优化的色谱条件下,对 25 个裸花紫珠样品进行了分析,其典型图谱见图 1。通过比较对照品与样品色谱峰的保留时间,以及往样品中添加对照品等方法,确定了其中的 3 个成分,即 6 号峰为连翘酯苷 B、9 号峰为毛蕊花糖苷、11 号为异毛蕊花糖苷。其中异毛蕊花糖苷是本课题组首次从裸花紫珠药材

中分离得到。所采集的 25 个样品,采集时间从 1—12 月,为了考察这些样品化学成分的一致性,我们采用“中药色谱指图谱相似度评价系统(2004 A 版)”对供试品色谱图的相似度进行了计算,结果显示这些样品的相似度在 0.901~0.965 之间。样品共有色谱峰数目一致,即其中所含化学成分比较相似。仔细对比发现不同采收期的裸花紫珠样品,其色谱峰的峰面积存在明显差异,如图 1 所示。

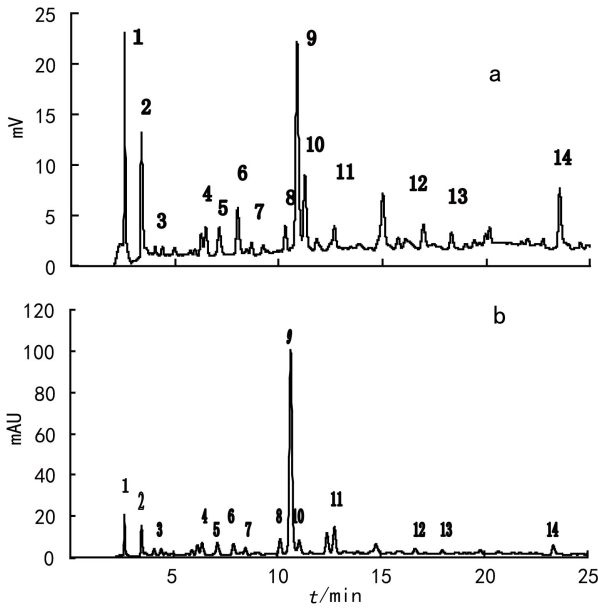


图 1 不同采收期裸花紫珠典型 HPLC 色谱图  
a: S19 样品,2010.03.09 采收; b: S11 样品,2010.10.01 采收。  
Fig. 1 HPLC Chromatogram of *Callicarpa nudiflora*  
on different harvesting time  
a: sample S19; b: ample S11

## 2.4 裸花紫珠主成分分析

为了考察样品的质量差异,以 14 个共有峰的绝对峰面积为变量,用 SPSS11.5 软件进行了 HCA 分析,结果表明除个别样品外,25 个样品被分为两大类,以上半年采集的样品为一类,下半年样品为另一类。两者的区别主要表现在上半年样品的色谱峰面积(图 1:a)要小于下半年的样品(图 1:b),尤其明显的是 9 号峰。这说明在不同的生长阶段,药材本身积累的次生代谢产物的量有差异,采集时间对裸花紫珠药材质量有明显的影响。

## 2.5 裸花紫珠对应分析

以 14 个共有峰的绝对峰面积为变量,用 SAS 9.1 软件进行对应分析,结果表明除个别样品外,25 个样品被分为两大类,以上半年采集的样品为一类,

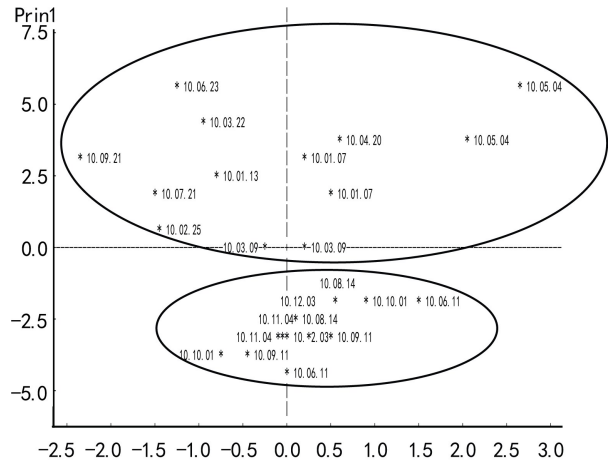


图 2 不同采收期裸花紫珠药材聚类分析结果  
Fig. 2 HCA result of *Callicarpa nudiflora*  
on different harvesting time

下半年样品为另一类。与主成分分析的结果一致,这充分说明采收期对裸花紫珠药材的品质有显著影响。

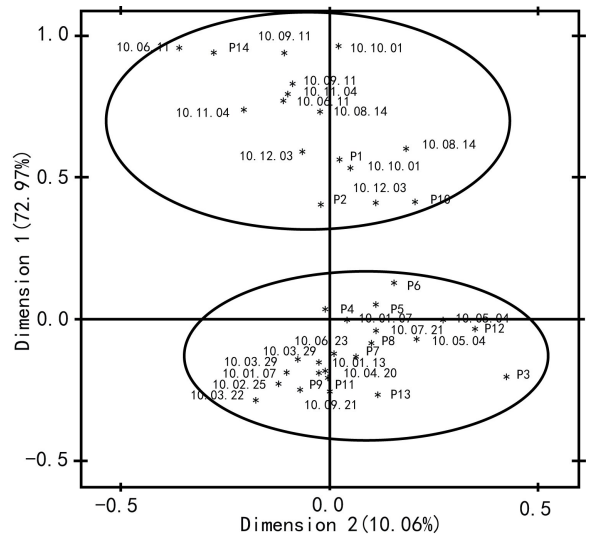


图 3 不同采收期裸花紫珠药材对应分析结果  
Fig. 3 Correspondence analysis result of *Callicarpa nudiflora*  
on different harvesting time

## 3 结论与讨论

本实验以峰数量及峰面积为指标,通过大量实验考察了裸花紫珠提取方法,提取溶剂、溶剂体积、提取时间等条件,同时考察了不同检测器,不同色谱柱、柱温、流速等条件,优化了裸花紫珠指纹图谱的研究方法。所建立的方法在在精密度、重现性和稳

定性方面完全符合指纹图谱研究的技术要求,也为裸花紫珠的质量控制提供部分的科学依据。

迄今已从裸花紫珠中分离得到多种化学成分,主要为苯乙醇苷类、萜类、黄酮类、酚酸类、甾体类、挥发油类等化合物。其中苯乙醇苷类成分具有抗炎、抗菌、免疫调节、增强记忆力、抗肿瘤、抗氧化、保肝等作用,为其含量较高的活性成分(靖会等,2006;宋光西等,2011;张洁等,2010)。目前已经收录到中国药典的紫珠属植物,包括广东紫珠、大叶紫珠、杜红花均以一种或两种苯乙醇苷类化合物作为指标性成分。本课题组通过研究发现裸花紫珠药材,尤其是裸花紫珠提取物中,苯乙醇苷类化合物包括连翘酯苷 B、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷是其中的主要成分,其中异毛蕊花糖苷是我们首次从裸花紫珠中分离得到的。

通过对 25 个不同采收期的样品进行测定,利用相似度分析、主成分分析及对应分析三种分析方法对数据进行了分析发现,裸花紫珠上、下半年采集的样品存在差异,主要是化学成分含量高低差异,尤其是毛蕊花糖苷等成分。结果表明我们所建立的方法能有效地评价裸花紫珠的质量,同时说明裸花紫珠的质量跟采收期有密切的联系。

## 参考文献:

Chen C(陈春). 2010. Luohuazizhu capsules with oxytocin reduce vaginal bleeding after medical abortion clinical analysis(裸花紫珠胶囊联合缩宫素减少药物流产后阴道出血临床分析)[J]. *Chin Mod Doctor*(中国现代医生), **13**(18):138—142

Chen Y(陈颖) Yang GuoC(杨国才). 2006. Luohuazizhu tablets anti-inflammatory effects and enhance the immune function of experimental study(裸花紫珠抗炎作用及增强免疫功能的实验研究)[J]. *J Trace Ele Guangdong Sci*(广东微量元素科学), **13**(8):39—41

Chen LG(湛乐刚), Song YQ(宋永强). 2005. Spectrophotometry of total flavonoids in water extract content of *Callicarpa nudiflora*(分光光度法测定裸花紫珠药材水提物中总黄酮的含量)[J]. *J Wes Chin Pharm*(华西药理学杂志), **20**(5):449—451

Hu R(胡蓉), Yao M(姚闽), Li YY(李玉云), et al. 2009. HPLC determination of luteolin callicarpa nudiflora Hook. et Arn. (HPLC 法测定裸花紫珠药材中木犀草素的含量)[J]. *Trad Chin Drug Res & Clin Pharma*(中药新药与临床药理), **20**(3):271—272

Jing H(靖会), Zuo JF(佐建锋), Li JS(李教社). 2006. Pharmacological research progress of phenethyl alcohol glycoside compounds(苯乙醇苷类化合物的药理研究进展)[J]. *Lishizhen Med Mat Med Res*(时珍国医国药), (3):441

Kong FL(孔凤利). 2010. Aciclovir tablets combined with luohuaz-

izhu dispersible tablets for treating herpes zoster in acute exacerbation period(阿昔洛韦联合裸花紫珠分散片治疗带状疱疹 40 例)[J]. *Clin Med*(临床医药), **19**(5):50

Liang JJ(梁纪军), Xu K(徐凯), Li LF(李留法), et al. 2009. Study of total flavonoids of *Callicarpa nudiflora* on anti-inflammatory and hemostasis effects(裸花紫珠总黄酮的抗炎、止血作用研究)[J]. *Mod J Integ Trad Chin Wes Med*(现代中西医结合杂志), **18**(26):3161—3162

Liao LJ(廖丽锦), Lin RC(林如春), Mo ZD(莫卓鼎), et al. 2009. Treatment with luohuazizhu tablets and western medicine of tuberculosis hemoptysis pharmacological analysis and clinical curative effect(裸花紫珠分散片和西药合用治疗肺结核咯血的药理分析与临床疗效)[J]. *J Contem Chin Med*(中国当代医药), (24):60—61

Liu F(刘丰), Zhang JM(张继民), You W(游伟). 2008. Luohuazizhu tablets in the treatment of hemorrhoids hemorrhage in 126 cases(裸花紫珠片治疗内痔出血 126 例)[J]. *J Pract Med*(实用医学杂志), **24**(5):813—814

Liu HQ(刘宏奇), Xin H(辛辉), Lan YP(兰叶萍), et al. 2010. The prevention and treatment of hemorrhage after drug abortion, 70 cases of clinical observation of Luohuazizhu tablets(裸花紫珠片防治药物流产后出血 70 例临床观察)[J]. *J Shanxi Col Tradit Chin Med*(山西中医学院学报), **11**(2)

Peng B(彭兵). 2004. Treatment hemorrhoid hemorrhage in 110 cases reported by luohuazizhu tablets(裸花紫珠片治疗痔出血 110 例报道)[J]. *Chin J Physician*(中国医师杂志), **21**:162

Song GX(宋光西), Ma LY(马凌云), Wei F(魏锋), et al. 2011. The distribution and pharmacological activities of phenethyl alcohol glycoside research progress(苯乙醇苷的分布及药理活性研究进展)[J]. *J Asia-Pacific Trad Med*(亚太传统医药), **7**(4):171

Wan WC(万文萃), Chen SJ(陈仕建), Wan GM(万光明). 2010. Luohuazizhu tablets in the treatment of retinal vein inflammation clinical observation(裸花紫珠片治疗视网膜静脉周围炎临床观察)[J]. *Mod Comb Trad Chin Wes Med J*(现代中西医结合杂志), (12):1468

Zhang J(张洁), Li BQ(李宝泉), Feng F(冯锋), et al. 2010. The chemical composition of Luohuazizhu tablets and hemostatic activity research(裸花紫珠的化学成分及其止血活性研究)[J]. *Chin J Trad Chin Med*(中国中药杂志), **35**(24):3298—3301

Zhang YQ(张艳秋), Hong JB(洪金波), Liu WL(刘文林). 2009. HPLC method for determination of Luohuazizhu tablets content of oleanolic acid and ursolic acid (HPLC 法测定裸花紫珠中齐墩果酸与熊果酸的含量)[J]. *J Hainan Med Col*(海南医学院学报), **15**(1):5—7

Zhou SY(周桑玉), Hong Q(洪茜), Chen LJ(陈琳洁). 2010. 26 cases of experience in the treatment of ulcerative colitis by Luohuazizhu tablets(裸花紫珠分散片治疗溃疡性结肠炎 26 例体会)[J]. *Chin Gene Med*(中华全科医学), **8**(3):337—338

Zhu LX(朱立新), Jin HL(金宏林), Bai XF(白雪峰). 2009. Luohuazizhu tablets for pharyngitis clinical observation(裸花紫珠片治疗咽炎临床观察)[J]. *Chin J Misdiagnostic*(中国误诊学杂志), **9**(9):2061—2062