

• 论 著 •

## 狼毒药材 HPLC 指纹图谱研究

邓德红<sup>1</sup>, 胡 菊<sup>2△</sup>

(1. 湖北省孝感麻风防治中心, 湖北汉川 431600; 2. 湖北工业职业技术学院环境工程系, 湖北十堰 442000)

**摘要:**目的 采用高效液相色谱法(HPLC)建立狼毒药材的指纹图谱。方法 2013 年 10 月至 2014 年 10 月, 使用 Hypersil ODS (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-水为流动相, 梯度洗脱, 洗脱流速为 1.0 mL/min, 柱温 20 ℃, 检测波长 210 nm, 进样 20 μL。结果 对不同来源 15 批狼毒药材进行了分析, 标定了 15 个共有峰, 15 个共有峰相对保留时间相对标准差(RSD)≤3.7%, 相对峰面积 RSD≤3.6%; 各色谱峰分离度较好, 相似度较高, 15 批不同来源狼毒药材中, 除了广西南宁药材材料相似度为 0.858, 其他产地药材材料相似度均在 0.95 以上。达到了中药指纹图谱的技术要求。结论 该方法简便、准确、重现性好, 可用于狼毒指纹图谱的测定及质量控制。

**关键词:**狼毒; 高效液相; 指纹图谱; 质量控制

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.04.006

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)04-0447-03

## Study on HPLC fingerprint of radix euphorbiae fischerianae

Deng Dehong<sup>1</sup>, Hu Ju<sup>2△</sup>

(1. Hubei Xiaogan Leprosy Prevention and Control Center, Hanchuan, Hubei 431600, China; 2. Department of Environmental Engineering, Hubei Industrial Polytechnic, Shiyan, Hubei 442000, China)

**Abstract:** Objective To establish fingerprint of Radix Euphorbiae Fischerianae by high performance liquid chromatography (HPLC). Methods The samples were separated on Hypersil ODS(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with gradient mobile phase of acetic-water, the column temperature was 20 ℃ with the flow rate of 1.0 mL/min and UV detection wavelength was 210 nm, the sample injection was 20 μL. Results 15 samples of different origin Radix Euphorbiae Fischerianae were detected and each chromatographic peak was separated well with conforming to the requirements of fingerprint by calibrating the 15 peaks. 15 common peak retention time RSD, relative peak area RSD were 3.7%, 3.6% or less respectively; The chromatographic peak separation degree was better, similarity was higher, 15 batches of different sources of stellera medicinal materials, in addition to the Guangxi nanning medicine material similarity was 0.858, other origin medicine material similarity above 0.95. Have reached the technical requirements of traditional Chinese medicine (TCM) fingerprint. Conclusion The method is accurate, reliable, and the HPLC fingerprint shows good repeatability, which can be used for one of the quality control of Radix Euphorbiae Fischerianae.

**Key words:** Radix Euphorbiae Fischerianae; high performance liquid chromatography; fingerprints; quality control

狼毒为瑞香科植物瑞香狼毒或大戟科植物狼毒大戟、月腺大戟的根,有毒。中医学上用其根祛痰、止痛、消积、杀虫<sup>[1]</sup>。狼毒主要含有二萜、黄酮、木质素、香豆精类成分;其中二萜类主要包括格尼迪木任、河朔莪花素、赭雷毒素等;黄酮类主要包括狼毒素 A、狼毒素 B、狼毒素 C、异狼毒素、7-甲氧基狼毒素、新狼毒素等<sup>[2-3]</sup>。现代药理学研究表明,其提取物具有良好的抗肿瘤、抗病毒、杀菌、抗癫痫和免疫调节作用<sup>[4-6]</sup>。因此,近年来,加快了狼毒的化学成分与质量标准研究。本文对不同来源 15 批狼毒药材进行了分析,从而建立了狼毒药材的指纹图谱,为狼毒的体内外研究和临床应用等提供了依据。

## 1 材料与方 法

**1.1 标本来源** 2013 年 10 月至 2014 年 10 月,狼毒素 A 购于中国药物检定研究院,异狼毒素 B 为实验室自制(面积归一化法,其纯度为 98.2%)。乙醇(AR,北京化学试剂厂),乙腈(色谱纯,欧普森)。15 批不同来源狼毒药材经鉴定为瑞香科植物瑞香狼毒的干燥根。

**1.2 仪器与试剂** 2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),超声波清洗仪(宁波新芝生物科技股份有限公司),电子天平(梅特勒-托利多有限公司);中药粉碎机(瑞安市百信药器械厂),鼓风干燥箱(广州泰思科学仪器有限公司)。

## 1.3 方 法

**1.3.1 对照品溶液的制备** 精密称取狼毒素 A 和异狼毒素 B 适量,置 10 mL 的容量瓶中,加乙腈-水定容至 10 mL。制成质量浓度分别为 30.15、12.96 mg/L 混合对照品溶液,置 4 ℃ 冰箱冷藏备用<sup>[7-9]</sup>。

**1.3.2 供试品溶液的制备** 将狼毒药材打成粉,过 40 目筛。称取狼毒药材粉末 2.5 g,加甲醇-水 25 mL,称重,超声处理 35 min,放冷,加甲醇补足重量。过 0.45 μm 微孔滤膜,即得狼毒药材供试品<sup>[10]</sup>。

**1.3.3 测定方法** 按上述对照品与供试品制备方法制备对照品溶液和供试品溶液,精密吸取对照品和供试品溶液各 20 μL<sup>[7]</sup>。采用 HPLC 法对 15 批狼毒药材进行指纹图谱构建,以狼毒素 A 和异狼毒素 B 的峰面积和保留时间为参考,计算共有峰的相对峰面积和相对保留时间。

## 1.4 方 法 学 考 察

**1.4.1 精密度的试验** 称取狼毒药材适量,按供试品溶液的方法制备,照上述方法测定,且重复进样 6 次,检测各共有峰的相对保留时间。

**1.4.2 稳定性试验** 取同一供试品溶液,分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样分析。

**1.4.3 重复性试验** 称取狼毒药材适量,按上述供试品溶液制备方法制备 6 份样品,按照测定方法进行检测。

**1.5 色谱条件** Hypersil ODS 色谱柱(4.6 mm×150 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-水(B)洗脱梯度(0~5 min,20%~30% A;5~10 min,30%~45% A;10~30 min,45%~55% A;30~70 min,55%~60% A;70~80 min,60%~65% A;80~100 min,65%~70% A),流速为 1.0(mL/min),检测波长 210 nm,柱温 20 °C,进样量 20 μL<sup>[8]</sup>。

**2 结 果**

**2.1 指纹图谱分析** 对 15 批不同来源的狼毒药材 HPLC 指纹图谱检测结果进行相似度评价,见图 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。标定了分离度较高的 15 个峰作为共有峰。其中狼毒素 A 和异狼毒素 B 出峰位适中,且分离效果好,无前沿和拖尾,因此选定其为参照峰,并计算各峰的相对峰面积,见表 1。

表 1 狼毒药材指纹图谱 15 个共有峰相对峰面积值

样品	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
S1	0.094	0.098	0.079	0.211	1.821	0.387	0.059	0.123	0.083	0.198	0.599	0.128	1.000	0.622	0.128
S2	0.128	0.170	0.113	0.392	2.785	0.631	0.093	0.236	0.086	0.253	0.508	0.131	1.000	0.501	0.088
S3	0.117	0.207	0.198	0.259	2.452	0.542	0.082	0.211	0.185	0.235	0.578	0.126	1.000	0.621	0.089
S4	0.051	0.042	0.046	0.158	1.424	0.347	0.036	0.119	0.086	0.287	0.541	0.138	1.000	0.614	0.134
S5	0.061	0.137	0.154	0.289	2.121	0.481	0.081	0.212	0.173	0.233	0.581	0.129	1.000	0.629	0.115
S6	0.039	0.059	0.037	0.086	0.521	0.144	0.034	0.036	0.027	0.191	0.742	0.079	1.000	0.611	0.079
S7	0.047	0.049	0.085	0.267	1.842	0.456	0.041	0.143	0.089	0.233	0.548	0.137	1.000	0.605	0.122
S8	0.092	0.085	0.094	0.146	1.794	0.398	0.024	0.168	0.088	0.219	0.529	0.108	1.000	0.625	0.119
S9	0.099	0.082	0.089	0.192	2.301	0.447	0.046	0.183	0.142	0.194	0.416	0.149	1.000	0.469	0.121
S10	0.069	0.034	0.095	0.165	1.398	0.359	0.057	0.108	0.093	0.235	0.555	0.158	1.000	0.525	0.109
S11	0.088	0.076	0.088	0.287	1.973	0.422	0.057	0.135	0.079	0.238	0.516	0.175	1.000	0.501	0.087
S12	0.061	0.044	0.085	0.164	1.378	0.369	0.059	0.109	0.083	0.231	0.559	0.151	1.000	0.527	0.112
S13	0.078	0.066	0.089	0.287	1.963	0.432	0.059	0.145	0.089	0.241	0.521	0.181	1.000	0.503	0.089
S14	0.063	0.138	0.159	0.287	2.124	0.482	0.089	0.216	0.178	0.231	0.585	0.132	1.000	0.636	0.117
S15	0.041	0.052	0.047	0.079	0.521	0.148	0.039	0.041	0.031	0.195	0.746	0.082	1.000	0.612	0.081

**2.2 相似度评价** 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A 版)》软件<sup>[11]</sup>,导入 15 批样品色谱图,结果表明,15 批不同来源狼毒药材中,除了广西南宁药材材料相似度为 0.858,其他产地药材材料相似度均在 0.95 以上。

表 2 不同来源狼毒药材相似度计算结果

项目	样品来源	相似度
S1	河南郑州	0.972
S2	山东菏泽	0.983
S3	河南商丘	0.991
S4	江苏南京	0.968
S5	江苏南京	0.992
S6	安徽亳州	0.984
S7	湖北武汉	0.979
S8	广西南宁	0.858
S9	安徽亳州	0.995
S10	湖北宜昌	0.989
S11	山东莱州	0.986
S12	江苏泰州	0.952
S13	黑龙江哈尔滨	0.967
S14	吉林长春	0.982
S15	江西樟树	0.973

**3 讨 论**

瑞香狼毒属于瑞香科植物的干燥根,也称为断肠草,其性平、味苦、辛,有毒,可入肺脾肝经,具有破积杀虫、逐水祛痰的作用。狼毒通常广泛分布于我国黑龙江、内蒙古、西北等地,并在西北地区销售、应用。现阶段,国内外诸多学者对狼毒的化学成分进行了深入的探究,从中发现了许多二萜类、香豆素类、黄酮类等成分均存在较强的抗病毒、抗肿瘤等作用,尤其是抗人类免疫缺陷病毒的作用。部颁标准对狼毒药材的质量控制局限于理化鉴别,无法完整、系统的体现狼毒的内在质量。近些年来,指纹图谱已经成为国际统一公认的控制中药、天然药物质量最有效的手段。为了更有效地控制狼毒中药材,或是含有狼毒的中药复方剂的质量,本次试验采用 HPLC 建立狼毒药材的指纹图谱,结果发现不同来源 15 批狼毒药材,标定了 15 个共有峰,15 个共有峰相对保留时间 RSD≤3.7%,相对峰面积 RSD≤3.6%;各色谱峰分离度较好,相似度较高,15 批不同来源狼毒药材中,除了广西南宁药材材料相似度为 0.858,其他产地药材材料相似度均在 0.95 以上。达到了中药指纹图谱的技术要求。

本研究考察了不同的提取溶媒和提取方法,分别为索氏、超声、回流及冷浸,以及提取时间。试验结果表明以乙腈超声提取 35 min,能全面反应狼毒全谱峰,且峰面积较大,方法简单。试验比较了乙腈-水、乙腈-磷酸、甲醇-磷酸 3 种体系;以及通过二极管阵列进行检测结果表明,以乙腈-水梯度洗脱、210 nm 为波长时,各色谱峰均有较大的吸收,且峰(下转第 451 页)

续表 4 分离自胆汁中主要肠球菌的耐药情况(%)

抗菌药物	粪肠球菌	屎肠球菌
奎奴普丁/达福普汀	85.0	3.4
利奈唑胺	2.4	3.4
四环素	43.4	47.5
替加环素	0.0	0.0
左旋氧氟沙星	4.2	54.3

3 讨论

近年来随着侵入性医疗操作的广泛应用,各种条件致病菌如肠杆菌科、肠球菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌等易通过壶腹或胆肠吻合口逆行至胆道系统,诱发内源性感染或通过医护人员工作者以及被其污染的医院环境或带菌患者而引起医院内感染。

本研究结果发现 16.1%(35/217)的患者胆汁中同时分离出 2 种病原菌。病原菌以革兰阴性杆菌常见,占 65.5%,47.3% 大肠埃希菌居首位,分离率远高于肺炎克雷伯菌和阴沟肠杆菌,与相关文献报道相同<sup>[1]</sup>。革兰阳性菌中,肠球菌属分离率最高,占 77.1%(64/83)。其中,34 株粪肠球菌居第 1 位,与王涛<sup>[2]</sup>的报道相同。有 16 株非发酵菌,常见铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌,可能与广泛开展内镜、长时间放置引流管引起的院内感染有关<sup>[3]</sup>。

由于近年 NDM-1 型金属酶、KPC 型碳青霉烯酶及头孢菌素酶等新耐药机制的发现,肠杆菌科细菌的耐药性越来越高,耐药种类越来越多。本研究显示肠杆菌科细菌对 2、3 代头孢类抗菌药物耐药性高,普遍大于 40.0%,特别阴沟肠杆菌对头孢唑啉耐药率高达 96.4%。喹诺酮类抗菌药物在胆汁中的浓度远高于其血药浓度<sup>[4]</sup>,是临床医生凭经验治疗胆道感染的常见选择之一。本次研究数据显示肠杆菌科细菌对于喹诺酮类抗菌药物的耐药率尚可,仅大肠埃希菌对其耐药率大于 50.0%,由于肠杆菌科细菌存在质粒介导喹诺酮类耐药基因,阳性菌株可同时携带整合子进行水平传播<sup>[5]</sup>,提示要注意监测

肠杆菌科细菌对其的药敏情况。

本研究表明本地区胆汁中肠球菌属细菌和肠杆菌科混合感染(19 例)最常见,占 2 种病原菌混合感染很大比例(54.3%)。肠球菌的耐药性低于国内其他地区<sup>[6]</sup>,对高浓度链霉素和高浓度庆大霉素的耐药率均小于 30.0%,低于修宁宁等<sup>[7]</sup>的报道,对万古霉素、利奈唑胺和替加环素的耐药率极低。由于肠球菌对多种抗菌药物天然耐药,而且一旦产生耐药,耐药肠球菌可通过医疗环境和医护人员传播,尤其增加了临床治疗 2 种细菌混合感染的难度。

重视以肠球菌属细菌和肠杆菌科混合感染为主的 2 种病原菌混合胆道感染,过去临床医生经验治疗胆道感染使用的头孢类和喹诺酮类抗菌药物的耐药性明显上升,尽早采集胆汁进行培养并提高送检率,彻底清洗消毒医疗器械和提高医务人员的手卫生依从性,按照药敏结果选择合适的抗菌药物进行胆道抗感染治疗。

参考文献

[1] 徐伟红,徐斌.胆道感染患者胆汁标本分离的病原体及其耐药性[J].中国感染控制杂志,2014,13(1):32-35.  
 [2] 王涛.168 例胆汁标本病原菌分布及耐药性分析[J].国际检验医学杂志,2013,34(12):1610-1611.  
 [3] 周春妹,胡必杰,吕媛.卫生部全国细菌耐药监测网 2011 年胆汁培养病原菌耐药监测[J].中国临床药理学杂志,2012,28(12):933-936.  
 [4] 鲍峻峻,许建明,胡咏梅,等.不同剂量左氧氟沙星在大鼠胆汁药物浓度分布情况探讨[J].安徽医药,2012,16(3):294-297.  
 [5] 黄丽,高晓坤,张宏.肠杆菌科细菌质粒介导喹诺酮类耐药基因的检测[J].中国感染与化疗杂志,2014,14(4):286-290.  
 [6] 胡付品,朱德妹,汪复,等.2011 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J].中国感染与化疗杂志,2012,12(5):321-329.  
 [7] 修宁宁,辛青松.145 株肠球菌体外药敏结果分析[J].国际检验医学杂志,2013,34(19):2624-2626.

(收稿日期:2015-10-18)

(上接第 448 页)

数较多,各峰分离情况良好。相似度评价结果表明,广西产地的狼毒药材与其他产地的药材存在差异。因此,在临床用药等方面应当关注药材的来源与产地。

参考文献

[1] 卓兆莲,高英,李卫民,等.中药狼毒考证[J].中医学报,2006,34(3):50.  
 [2] 冯宝民,裴月湖.瑞香狼毒中的化学成分研究[J].中国药学杂志,2001,36(1):21-22.  
 [3] 何郁芳,谢秀娟,王美英.狼毒的药理作用和化学成分研究进展[J].河南科技大学学报:医学版,2004,22(1):79.  
 [4] 马健,李永华.瑞香狼毒提取物逆转人肝癌耐药细胞多药耐药的实验研究[J].中国中医药科技,2004,11(4):223.  
 [5] 汤亚杰,徐小玲,李冬生,等.瑞香狼毒化学成分与抗肿瘤作用研究进展[J].中成药,2008,30(7):1035-1038.  
 [6] 杨甲月,燕志强,徐蕊,等.瑞香狼毒根中活性物质的分离鉴定及

作用机理[J].西北植物学报,2011,31(2):291-297.

[7] 谢演晖,严小红,王灿坚.RP-HPLC 法测定月腺大戟中狼毒乙素的含量[J].中药材,2010,33(4):568.  
 [8] 粟晓栗,林瑞超,王兆基.毒性中药狼毒质量标准研究[J].中成药,2006,28(4):498.  
 [9] 乔春峰,韩全斌,贺震旦.RP-HPLC 法测定狼毒中岩大戟内酯 A 和 B 的含量[J].药物分析杂志,2006,26(9):1204.  
 [10] 何南生,周临,曾宪仪.狼毒大戟化学对照品研究[J].实用临床医学,2006,7(12):25.  
 [11] 苗爱东,孙殿甲.Excel 2002 在中药指纹图谱相似度计算中的应用[J].药学进展,2003,27(1):52-54.

(收稿日期:2015-10-18)

