

亮叶杨桐指纹图谱研究

刘元,宋志钊,李文琪
(广西中医药研究院,南宁 530022)

[摘要] 目的:采用反相高效液相色谱法建立亮叶杨桐叶指纹图谱。方法:采用反相高效液相色谱法,以 Kromasil C₁₈ (4.6 mm×250 mm,5 μm)为分离柱,乙腈-0.1%磷酸溶液梯度洗脱;流速 1 mL·min⁻¹;检测波长 254 nm。结果:以梯度洗脱得到的色谱图各色谱峰分离较好,达到指纹图谱的技术要求,10 批样品相似度大于 0.9。结论:采用 HPLC 指纹图谱检测技术可有效控制亮叶杨桐叶药材的质量。

[关键词] 亮叶杨桐叶;指纹图谱;反相高效液相法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)06-0071-03

HPLC Fingerprint Analysis of *Adinandra nitida*

LIU Yuan, SONG Zhi-zhao, LI Wen-qi
(Guangxi Institute for Chinese Medicine & Pharmaceutical Science, Nanning 530022, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the fingerprint of leaves of *Adinandra nitida* by RP-HPLC. **Method:** The chromatographic conditions were as follows: a Kromasil C₁₈ column was used; the mobile phase was composed of acetonitrile-0.1% phosphoric acid with gradient elution; the flow rate was 1 mL·min⁻¹ and the UV absorbance detection was set at 254 nm. **Result:** Under the selected chromatographic conditions, 10 batches of HPLC fingerprint of *A. nitida* with good similarity were obtained, no less than 0.9. **Conclusion:** Quality of *A. nitida* can be controlled effectively by HPLC-UV fingerprint.

[Key words] *Adinandra nitida*; fingerprint; RP-HPLC

亮叶杨桐叶为山茶科杨桐属植物亮叶杨桐 *Adinandra nitida* Merr. ex Li 的干燥叶,俗称石芽茶或亮叶杨桐叶。亮叶杨桐叶香气浓郁,口味甘甜持久,其中含黄酮类 20%、茶多酚 23.47%、氨基酸 0.4%,并具有明显的消炎、解毒、止血和降压等功效,是目前植物中黄酮类含量较高的植物^[1]。亮叶杨桐叶的化学成分主要有黄酮类^[2]、三萜皂苷类^[3],但未见有关其指纹图谱的研究。本文以分析黄酮类为主

的 HPLC 色谱方法,通过化学计量学统计,建立了亮叶杨桐叶药材的液相色谱指纹图谱,较全面地分析和评价亮叶杨桐叶的质量。

1 材料

1.1 样品 亮叶杨桐叶批号 090204(金秀)、090605(金秀)、090711(昭平)、090712(马山)、090711(上思)、090802(金秀)、091118(马山)、091210(昭平)、091215(上思)、091221(金秀)。鉴定人为广西中医药研究院中药所助理研究员黄云峰。

1.2 试药 水为高纯水;乙腈为色谱纯。槲皮苷对照品由中国药品生物制品检定所提供,批号 111538-200403;芹菜素、山茶苷 A 对照品均为自制,纯度>95%。

LC-20ATVP 液相色谱仪、SPD-20AVP 检测器(日本岛津);威玛龙色谱工作站(广西南宁威玛龙

[收稿日期] 20101026(015)

[基金项目] 广西企业科技特派员专项项目(桂科产 09321001);广西区卫生厅自筹经费科研课题(Z2009174);广西壮药质量标准(第二卷)标准研究项目(MZY2010044)

[第一作者] 刘元,高级实验师,从事中药药理学研究与新药开发, Tel: 0771-5868275, E-mail: liuyuan0821 @ vip.163.com

色谱科技有限公司);TC-100 色谱柱恒温箱(天津特纳科技公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱 Kromasil C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm);检测波长 254 nm;柱温室温;流动相乙腈-0.1% 磷酸溶液, 二元梯度洗脱, 洗脱时间 70 min, 流速为 1 mL·min⁻¹;进样量为 10 μL,所有组分在 70 min 内出峰完毕。梯度洗脱条件见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱条件

t/min	乙腈/%	0.1% 磷酸/%
0	15	85
20	15	85
30	19	81
65	19	81
70	15	85

2.2 对照品溶液制备 精密称取芹菜素、槲皮苷、山茶苷 A 对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含芹菜素 100 μg、槲皮苷 20 μg、山茶苷 A 100 μg 的混合对照品溶液,即得。

2.3 供试品的制备 取本品药材粉末(过 80 目筛)0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 50 mL,称定质量,加热回流 1 h,放冷,再称定质量,用 50% 甲醇补足缺失的质量,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.4 精密度和稳定性试验 取批号为 090204 的亮叶杨桐叶,按供试品溶液制备方法制备供试品,分别在 0,4,8,12,16 h 进样,检测指纹图谱,记录各共有峰的保留时间和峰面积,以山茶苷 A 色谱峰的保留时间和峰面积为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示,各共有峰的相对保留时间和相对峰面积没有明显变化,RSD 均 < 3%,符合指纹图的技术要求。

2.5 重复性试验 取批号为 090802 的亮叶杨桐叶共 6 份,分别按供试品溶液制备方法制备供试品溶液,检测指纹图谱,记录各共有峰的保留时间和峰面积,以山茶苷 A 色谱峰的保留时间和峰面积为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示,各共有峰的相对保留时间和相对峰面积没有明显变化,RSD 均 < 3%,符合指纹图的技术要求。

2.6 指纹图谱的建立 按照供试品溶液制备方法

将 10 批药材制备成供试品溶液,分别进样检测,测定所有供试品溶液的 HPLC 色谱图。根据 10 批次供试品测定结果所给出的峰数、峰值(积分值)和相对保留时间等相关参数,进行分析、比较,制定优化的指纹图谱。见图 1。

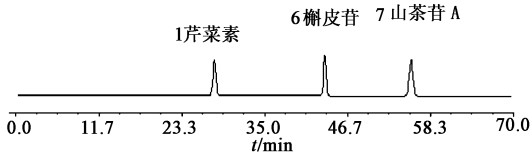


图 1 混合对照品 HPLC 指纹图谱

2.7 共有峰确定 根据 10 批亮叶杨桐叶供试品的检测结果,比较色谱图。选择亮叶杨桐叶供试液图谱中峰面积较大、峰形较好的色谱峰作为共有峰,共 8 个(图 2),其中 7 号峰为山茶苷 A(为亮叶杨桐叶主要成分),其峰面积约占总峰面积 50%,峰形稳定,可将该峰作为参照峰。

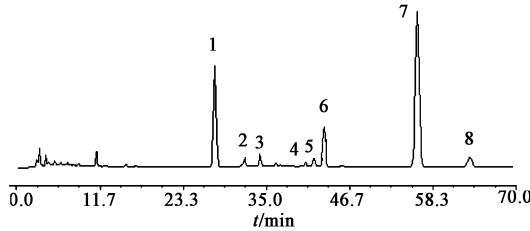


图 2 亮叶杨桐叶 HPLC 指纹图谱

2.8 共有峰相关信息 根据 10 批亮叶杨桐叶样品的色谱图结果,以 7 号峰作为参照峰,计算各共有峰相对保留时间,结果 RSD < 2%(表 2)。8 个共有峰其峰面积总和占总峰面积平均百分比为 93% 以上。以参照峰峰面积为基准,计算各共有峰峰面积与参照峰峰面积的比值,共有峰面积比值基本固定(表 3)。均符合指纹图谱的要求。

2.9 指纹图谱相似度评价 本实验记录了广西 4 个区域 10 批亮叶杨桐叶的指纹图谱(图 3)。将 10 批样品的电平信号转换为数字数据后,测试数据导入国家药典委员会 2004 年 A 版“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”进行数据处理。得到亮叶杨桐叶指纹峰共有模式 R(图 3);与共有模式比较,广西 4 个区域 10 批亮叶杨桐叶药材的指纹图谱相似度分别为 0.989,0.982,0.990,0.994,0.990,0.999,0.971,0.962,0.997,0.997。

表 2 10 批石崖茶样品共有峰相对保留时间比较

峰号	090204 金秀	090605 金秀	090711 昭平	090711 上思	090712 马山	090802 金秀	091118 马山	091210 昭平	091215 上思	091221 金秀	平均值	RSD /%
1	0.488 6	0.484 5	0.487 4	0.484 3	0.479 9	0.491 7	0.487 8	0.496 3	0.501 3	0.492 0	0.489 4	1.27
2	0.570 6	0.565 6	0.567 4	0.566 8	0.564 2	0.571 5	0.568 6	0.569 6	0.571 2	0.572 5	0.568 8	0.48
3	0.608 9	0.605 1	0.605 3	0.607 4	0.604 8	0.609 7	0.596 5	0.607 2	0.610 5	0.610 5	0.606 6	0.68
4	0.725 7	0.721 8	0.721 6	0.723 7	0.722 0	0.724 7	0.714 3	0.720 0	0.723 8	0.725 5	0.722 3	0.46
5	0.746 7	0.742 9	0.742 7	0.744 9	0.743 0	0.745 9	0.735 4	0.741 3	0.745 2	0.746 7	0.743 5	0.45
6	0.768 9	0.766 3	0.765 5	0.768 8	0.766 6	0.768 4	0.763 6	0.769 7	0.771 8	0.769 2	0.767 9	0.31
7	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.00
8	1.132 9	1.132 4	1.133 3	1.132 0	1.132 3	1.134 0	1.126 1	1.127 7	1.129 2	1.133 4	1.131 3	0.24

表 3 10 批石崖茶样品共有峰相对峰面积比较

峰号	090204 金秀	090605 金秀	090711 昭平	090711 上思	090712 马山	090802 金秀	091118 马山	091210 昭平	091215 上思	091221 金秀	平均值	RSD /%
1	0.486 2	0.712 9	4.922 6	0.633 6	1.207 7	1.333 0	0.329 1	0.377 8	0.286 3	0.767 1	1.105 6	125.4
2	0.035 3	0.047 4	0.350 6	0.031 9	0.058 7	0.077 1	0.022 1	0.026 5	0.017 8	0.051 0	0.071 8	138.7
3	0.031 6	0.028 1	0.102 9	0.048 8	0.050 5	0.037 1	0.051 6	0.044 1	0.026 7	0.044 5	0.046 6	46.8
4	0.017 2	0.018 7	0.025 7	0.018 7	0.024 2	0.021 8	0.024 1	0.022 5	0.011 2	0.013 5	0.019 8	24.2
5	0.041 3	0.039 6	0.066 5	0.046 1	0.040 5	0.041 8	0.056 1	0.055 8	0.028 2	0.031 6	0.044 8	26.2
6	0.170 9	0.260 8	0.507 5	0.221 3	0.070 4	0.232 2	0.135 0	0.186 1	0.042 1	0.178 8	0.200 5	63.8
7	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.00
8	0.062 1	0.076 6	0.086 9	0.049 6	0.057 4	0.064 7	0.060 4	0.045 5	0.028 8	0.055 0	0.058 7	27.4

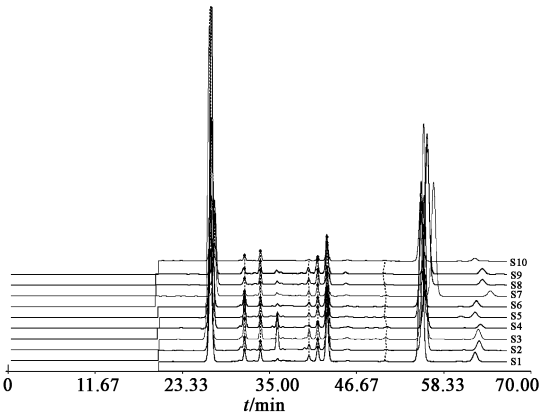


图 3 10 批亮叶杨桐叶药材指纹图谱 (时间窗:0.8)

3 讨论

3.1 提取溶剂的选择 取同样量的亮叶杨桐叶药材分别采用 50% 甲醇超声提取、甲醇超声提取、水超声后过滤提取,微孔滤膜过滤直接进样。结果表明,50% 甲醇超声提取,色谱峰数适中,主要成分分离较好。

3.2 梯度洗脱条件的选择 参考 2005 年版《中国药典》一部有关槲皮苷含量测定项下流动相,采用乙

腈-0.1% 磷酸系统进行洗脱效果最佳。试验结果表明:等度洗脱,色谱峰重叠严重,分离效果不好。由于成分复杂,为保证尽可能多峰且分离效果好,采用了梯度洗脱,梯度洗脱的色谱峰形及分离较好,可比较全面的反映亮叶杨桐叶的各化学成分。

3.3 相似度分析 广西 4 个区域 10 批亮叶杨桐叶的相似度很好,品质基本一致。本实验对亮叶杨桐叶药材指纹图谱的构建进行的初步探索,可以为亮叶杨桐叶药材的品质评价、质量控制提供检测方法。

[参考文献]

[1] Chen M Z, Yu J, She G Z, et al. Analysis of nutritional components and medicinal components in wild Shi Ya Cha [J]. Nat Prod Res Deve, 1996, 8: 85.
[2] 刘本国, 战宇, 许克勇, 等. 液质联用鉴定亮叶杨桐叶中的类黄酮化合物 [J]. 食品研究与开发, 2007, 28 (3): 118.
[3] 王英, 叶文才, 殷志琦, 等. 亮叶杨桐的三萜皂苷类成分 [J]. 药学学报, 2008, 43 (5): 504.

[责任编辑 蔡仲德]