

木芙蓉药材 HPLC 指纹图谱研究

邓亚利¹, 孙冬梅^{2*}, 卢生杰¹

(1. 华南农业大学制药工程系, 广州 510642; 2. 广东省中医研究所, 广州 510003)

[摘要] 目的: 采用高效液相色谱法建立木芙蓉药材的指纹图谱, 为其品质控制提供依据。方法: 采用 Waters Xbridge C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相乙腈-1% 冰乙酸水溶液梯度洗脱; 检测波长 370 nm; 柱温 25 °C。结果: 10 批各产地的木芙蓉药材指纹图谱峰有 10 个共有峰, 峰面积之和大于总峰面积的 90%, 与对照品比较共有峰中检出芦丁、金丝桃苷、槲皮苷。结论: 该方法准确可靠, 为木芙蓉药材及其制剂质量控制提供了依据。

[关键词] 木芙蓉; 指纹图谱; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)06-0096-04

Fingerprints of *Hibiscus Mutabilis* by HPLC

DENG Ya-li¹, SUN Dong-mei^{2*}, LU Sheng-jie¹

(1. Dept. of Pharmaceutical Engineering, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China;
2. Guangdong Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510003, China)

[Abstract] **Objective:** To study the HPLC fingerprints and to establish a sensitive and specific method for controlling the quality of *Hibiscus Mutabilis*. **Method:** HPLC method was set up by Waters Xbridge C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with gradient elution; the mobile phase was comprised of acetonitrile-1% acetic acid solution, the UV detection wavelength was at 370 nm with a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, and column temperature

[收稿日期] 20101016(001)

[第一作者] 邓亚利, 博士, 副主任药师, 从事药物新剂型及新技术研究, Tel: 020-38297109, E-mail: xiyuandeng@scau.edu.cn

[通讯作者] * 孙冬梅, 主任中药师, 从事中药质量评价, Tel: 020-83501292, E-mail: temgdp@163.com

- [3] Toshiaki Morita, Hiroo Aoki. Isosclerone, a New Metabolite of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary[J]. Agr Biol Chem, 1974, 38 (8): 1501.
- [4] Noro T, Sekiya T, Katoh M, et al. Inhibitors of xanthine oxidase from *Alpinia galanga* L [J]. Chem Pharm Bull, 1988, 36(1): 244.
- [5] Chao-Kuo Chiang, F C Chang. Tetracyclic triterpenoids from *Melia azedarach* L. - III [J]. Tetrahedron, 1973, 29: 1911.
- [6] Salimuzzaman Siddiqui, Bina Shaheen Siddiqui, Ghiasuddin, et al. Tetracyclic triterpenoids of the fruit coats of *Azadirachta indica* [J]. J Nat Prod, 1991, 54 (2): 408.
- [7] Pettit G R, Numata A, Iwamoto C, et al. Antineoplastic agents. 489. Isolation and structures of meliastatins 1-5 and related euphane triterpenes from the tree *Melia dubia* [J]. J Nat Prod, 2002, 65 (12): 1886.
- [8] 亓淑芬, 纪凤锦, 姚庆强. 大高良姜化学成分的研究 [J]. 食品与药品, 2010, 12 (01): 39.
- [9] 韩景兰, 张凤岭, 李志宏, 等. 半边莲化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34 (17): 2200.

[责任编辑 邹晓翠]

was at 25 °C. **Result:** There were 10 common peaks in the fingerprints of *H. mutabilis* based on 10 habitats. Sum of peak areas was larger than 90% of total area. As compared with standard sample, rutin, hyperin and quercitrin were checked out. **Conclusion:** The method is reliable, accurate and can be used as a quality control method for *H. mutabilis*.

[**Key words**] *Hibiscus m*; fingerprint; HPLC

木芙蓉叶 *Hibiscus mutabilis* 具清热解毒、凉血消肿功效,用于痢疽肿毒初起、疔疮等。其主要化学成分为黄酮类和甾醇类,制剂品种有芙蓉抗流感胶囊、片剂、颗粒剂,其质量标准中多采用紫外分光光度法测定总黄酮含量,专属性不强。虽有采用 HPLC 测定其中芦丁、槲皮苷、金丝桃苷含量的报道^[1-3],但不能体现中医理论的整体观念,忽略了其他黄酮类成分的作用。本实验旨在构建木芙蓉的高效液相指纹图谱分析方法,为木芙蓉药材及制剂的质量控制提供依据。

1 材料

美国 Waters 600-2998 型高效液相色谱仪(四元高压梯度泵、手动进样、柱温箱,2998PAD 检测器、Empower Pro 工作站);FA1004N(电子天平,上海精密科学仪器有限公司);芦丁对照品(批号 100080-200707),金丝桃苷对照品(批号 111521-200303),槲皮苷对照品(批号 111538-200302)均购自中国药品生物制品检定所。木芙蓉药材分别购于广州多家药材公司(表 1),经陕西省中医药研究院孙平川主任中药师鉴定,木芙蓉药材均源于锦葵科植物木芙蓉 *H. mutabilis* L. 的干燥叶。乙腈(色谱纯),屈臣氏蒸馏水。

表 1 木芙蓉药材来源

样品号	批号 (采收时间)	供货单位	产地
S1	09-08-08	广东省药材公司中药饮片厂	江西
S2	09-07-01	广东致信药业中药饮片厂	湖南
S3	09-06-16	广东康美药业中药饮片厂	浙江
S4	09-12-04	广东杏林药业有限公司	湖南
S5	09-07-22	广州市药材公司中药饮片厂	四川
S6	09-12-08	广州中医药大学大药房公司	湖南
S7	09-11-05	广东致信药业中药饮片厂	四川
S8	10-01-16	广东杏林药业有限公司	四川
S9	10-02-26	广东省药材公司中药饮片厂	江西
S10	10-05-09	广东康美药业中药饮片厂	江西

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱 Waters Xbridge C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流速 1 mL · min⁻¹, 柱温 25 °C, 检测波长 370 nm, 进样量 20 μL; 流动相乙腈(A)-0.1% 冰乙酸水溶液(B), 采用梯度洗脱 A 相 0 ~ 10 min, 15% ~ 18%; 10 ~ 30 min, 18% ~ 23%; 30 ~ 40 min, 23% ~ 32%; 40 ~ 45 min, 32% ~ 35%; 45 ~ 60 min, 35%。

2.2 对照溶液的制备 精密称取芦丁、金丝桃苷、槲皮苷对照品适量,用甲醇配制成每 1 mL 分别含 40.0, 31.2, 28.0 μg 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取本品粉末(过三号筛)约 5.0 g, 精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 80% 乙醇 50 mL, 称定质量,加热回流 1.5 h, 放冷,再称定质量,用 80% 乙醇补足减失质量,摇匀,滤过,滤液减压浓缩至无醇味,用水稀释至 15 mL, 每次加入石油醚(60 ~ 90 °C) 15 mL 萃取 2 次,石油醚液弃去;水层继续用 15 mL 乙酸乙酯萃取 2 次,合并乙酸乙酯液并减压蒸干,残渣加甲醇溶解并定容至 10 mL, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密密度实验 分别吸取同一批供试品溶液各 20 μL, 按拟定的方法连续进样 6 次, 结果 10 个共有峰的相对保留时间的 RSD 均 < 2%, 相对峰面积的 RSD 均 < 5%, 提示精密密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取同一供试品溶液 20 μL, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样 6 次结果 10 个共有峰的相对保留时间的 RSD 均 < 2%, 相对峰面积的 RSD 均 < 5%, 提示 24 h 内供试品溶液稳定性较好。

2.4.3 重复性试验 取同一批样品, 按供试品溶液的制备方法, 制备 6 份供试品溶液, 各取供试品溶液 20 μL, 依法进样分析, 结果 10 个共有峰的相对保留时间的 RSD 均 < 2%, 相对峰面积的 RSD 均 < 5%, 提示重复性良好。

2.5 样品的测定 精密吸取对照品溶液及供试品溶液各 20 μL, 按拟定方法进样分析, 见图 1。

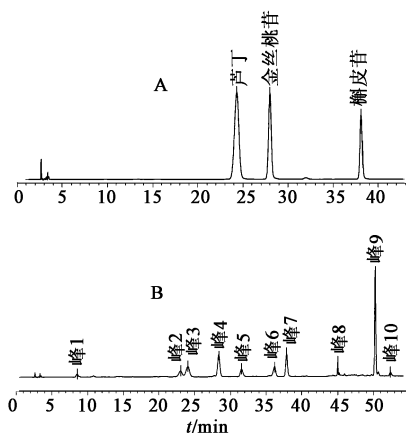


图 1 木芙蓉药材 HPLC 色谱图

A. 对照品; B. 样品

2.6 指纹图谱的建立与分析

2.6.1 共有峰的标定 以上 10 批样品均有 10 个共有峰, 槲皮苷为参照峰(7 号峰), 其保留时间和峰面积为 1, 计算其他各峰的相对保留时间和相对峰面积(见表 2~3, 图 2)。不同产地木芙蓉药材指纹图谱比较, 选择稳定性较好, 特征明显的峰为共有峰。结果表明, 不同产地的 10 批药材共有峰 10 个, 且共有峰面积之和大于总峰面积 90%。从指纹图谱中看出, 峰面积比值不尽相同。

2.6.2 峰的标定 在相同色谱条件下, 对照品芦丁、金丝桃苷、槲皮苷的保留时间分别为 24.31, 28.00, 38.10 min, 样品指纹图谱峰位相对应的分别是峰 3 (24.04 min), 峰 4 (28.38 min), 峰 7 (37.85 min)。

表 2 各批样品共有峰的相对保留时间

No.	批次 1	批次 2	批次 3	批次 4	批次 5	批次 6	批次 7	批次 8	批次 9	批次 10	平均值	RSD/%
1	0.226	0.224	0.228	0.227	0.229	0.226	0.226	0.225	0.227	0.230	0.227	0.7
2	0.607	0.604	0.621	0.607	0.614	0.604	0.608	0.604	0.604	0.617	0.609	1.0
3	0.635	0.632	0.648	0.634	0.641	0.632	0.635	0.632	0.633	0.644	0.637	0.9
4	0.750	0.750	0.756	0.752	0.755	0.747	0.750	0.748	0.750	0.754	0.751	0.4
5	0.835	0.837	0.841	0.836	0.840	0.833	0.834	0.834	0.833	0.839	0.836	0.4
6	0.957	0.958	0.960	0.957	0.959	0.955	0.956	0.955	0.956	0.958	0.957	0.2
7	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.0
8	1.192	1.186	1.177	1.192	1.188	1.190	1.189	1.191	1.201	1.187	1.189	0.5
9	1.331	1.326	1.317	1.331	1.327	1.329	1.328	1.329	1.340	1.326	1.328	0.4
10	1.386	1.383	1.379	1.385	1.382	1.385	1.384	1.383	1.392	1.384	1.384	0.2

表 3 各批样品共有峰的相对峰面积

No.	批次 1	批次 2	批次 3	批次 4	批次 5	批次 6	批次 7	批次 8	批次 9	批次 10	平均值	RSD/%
1	0.112	0.071	0.153	0.112	0.075	0.150	0.149	0.113	0.150	0.151	0.124	25.7
2	0.459	0.290	0.453	0.458	0.293	0.462	0.456	0.457	0.454	0.450	0.423	16.4
3	0.871	0.570	0.858	0.870	0.572	0.873	0.871	0.874	0.869	0.863	0.809	15.5
4	1.205	0.778	1.259	1.206	0.814	1.208	1.209	1.205	1.215	1.226	1.132	15.7
5	0.477	0.320	0.508	0.479	0.320	0.472	0.479	0.475	0.459	0.486	0.447	15.3
6	0.595	0.356	0.627	0.591	0.380	0.593	0.591	0.593	0.621	0.603	0.555	17.9
7	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.0
8	0.223	0.144	0.228	0.223	0.144	0.222	0.216	0.223	0.230	0.223	0.208	16.2
9	2.970	2.009	2.942	2.965	1.996	2.973	2.973	2.978	2.985	2.965	2.776	14.7
10	0.146	0.092	0.146	0.149	0.092	0.148	0.148	0.148	0.133	0.151	0.135	17.2

2.6.3 相似度计算 利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版进行相似度评价^[4]。结果见表 4。

3 讨论

3.1 供试品溶液的制备 含量控制指标成分的选择, 强调药材与制剂间检测成分的相关性, 选择测定

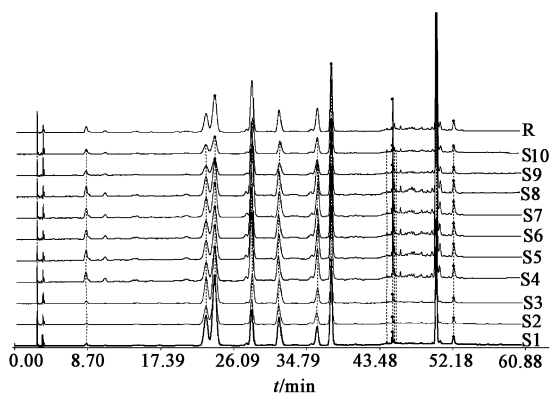


图2 10批样品 HPLC

表4 10批样品的相似度计算

批号	参照	对照
S1	1.000	0.986
S2	0.935	0.965
S3	0.818	0.874
S4	0.941	0.973
S5	0.977	0.971
S6	1.000	0.986
S7	0.984	0.978
S8	0.940	0.972
S9	0.998	0.985
S10	0.924	0.962

样品中的含有成分,尽量避免测定副产物如水解产物。故本实验供试品溶液的制备采用了石油醚除去叶绿素等脂溶性成分后,直接用乙酸乙酯萃取,以未水解的苷类成分作为检测指标,较水解后的槲皮素、山奈素等为指标,更能直接反映出药材的原有成分及含量比例。

对回流提取、超声提取与索氏提取3种提取方法进行比较,以药材中指标成分转移率和共有峰面积之和为筛选指标,结果表明10倍量80%乙醇回流

提取1.5 h转移率最高,故采用回流提取法。

3.2 检测波长、流动相及洗脱方法的优化 供试品溶液进行波谱扫描,其最大吸收波长为370 nm处,选此波长为检测波长。

对甲醇-0.4%磷酸溶液、甲醇-0.01 mol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液-冰醋酸、乙腈-甲醇-四氢呋喃-0.5%醋酸溶液、乙腈-1%冰乙酸水溶液等流动相进行筛选,优化梯度洗脱比例,乙腈-1%冰乙酸水溶液在文中2.1色谱条件下,样品中的共有峰在60 min内得到很好的分离。

3.3 指纹图谱的相似度 10个产地的药材指纹图谱中主要峰群的整体图貌基本一致,特征峰的相对保留时间RSD < 1%;但各成分含量的相对比值有差别。相似度计算结果表明9个产地药材的相似度达到0.9以上,其他1个产地的药材相似度低于0.9。表明不同产地木芙蓉药材质量有所差别。

本研究建立的指纹图谱方法重现性、稳定性与精密密度均较好,可作为鉴别木芙蓉药材真伪优劣的质量控制依据。

[参考文献]

- [1] 沈钦海. HPLC法测定木芙蓉提取物中芦丁含量[J]. 重庆医科大学学报,2005,30(6): 862.
- [2] 孟会宁,罗国平. HPLC法测定木芙蓉叶中芦丁的含量[J]. 安徽医药,2007,11(8): 705.
- [3] 王治平,樊化,杨珂,等. HPLC测定木芙蓉叶药材及其制剂芙蓉抗流感片中金丝桃苷的含量[J]. 中成药,2007,29(8),1230.
- [4] 马丽杰,杨滨,冯学锋,等. 野生与栽培防风中升麻苷和5-O-甲基维斯阿米醇苷的含量测定及指纹图谱分析[J]. 中国中药杂志,2010,35(13):1731.

[责任编辑 蔡仲德]