

胡颓子叶药材 HPLC 指纹图谱

张伟欣, 刘伟*, 林帅军, 李睢, 黄丽杰
(河南中医药大学, 郑州 450008)

[摘要] 目的:建立了胡颓子叶药材的指纹图谱分析方法,为胡颓子叶药材质量控制提供新的方法。方法:采用高效液相色谱法,色谱条件为 Agilent ZOTBAX XDB-PhenylC₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相 0.1% 磷酸水-乙腈梯度洗脱,柱温 30 ℃,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 360 nm。运用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件 A 版”对 12 批胡颓子叶药材进行相似度评价。结果:以银锻苷为参照峰,确定了 16 个共有峰构成 12 批胡颓子叶药材的指纹特征指纹图谱,各批样品的相似度均>0.8。并采用欧氏距离平方法进行聚类分析。结论:该方法准确稳定,重复性好,可为胡颓子叶药材的质量控制提供依据。

[关键词] 胡颓子叶; 高效液相色谱法; 指纹图谱
[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2017)04-0098-04
[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2017040098
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161130.0908.008.html>
[网络出版时间] 2016-11-30 9:08

HPLC Fingerprint of *Elaeagnus pungens* Leaves

ZHANG Wei-xin, LIU Wei*, LIN Shuai-jun, LI Sui, HUANG Li-jie
(Henan College of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC-fingerprint (HPLC-FP) analysis method for *Elaeagnus pungens* leaves and provide a new method for their quality control. **Method:** HPLC separation was performed on Agilent ZOTBAX XDB-Phenyl C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with 0.1% phosphoric acid-acetonitrile as the mobile phase for gradient elution; the column temperature was 30 ℃; the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹; the detection wavelength was set at 360 nm. The *Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM* (2004A edition) was used to evaluate the similarity of 12 batches of *E. pungens* leaves. **Result:** With tiliroside as the reference peak, sixteen common peaks were obtained in 12 batches of samples. The similarity of each fingerprint within one group was over 0.80, and squared Euclidean distance method was used for clustering analysis. **Conclusion:** This method shows high precision, stability and good reproducibility, and it can provide basis for the quality control of *E. pungens* leaves.

[Key words] *Elaeagnus pungens* leaves; HPLC; fingerprint

胡颓子叶具有平喘、镇咳、祛痰、安神、缓解支气管痉挛等功效,主治肺虚、支气管哮喘、慢性气管炎等^[1-2]。国内外学者对胡颓子叶进行了大量的化学成分和药理作用方面的研究,郭明娟等^[3]、黄丽杰

等^[4]分别对胡颓子叶乙酸乙酯、正丁醇部位进行了化学成分的分离及鉴定,并从中首次分到 3,4 个化合物;付成义等^[5]对胡颓子叶正丁醇部位化学成分进行研究,同时采用 MTT 法测定化合物对体外肿瘤

[收稿日期] 20160331(003)
[基金项目] 河南省科技攻关项目(102102310089)
[第一作者] 张伟欣,硕士,从事中药质量控制的研究,Tel:18739912840,E-mail:1522387074@qq.com
[通讯作者] *刘伟,教授,长期从事中药质量标准 and 仪器分析方法的研究,Tel:0371-65575838,E-mail:hnliuwei2088@sina.com

传代 SGC-7901 和 HeLa 的细胞毒活性,但缺乏全面的质量控制方法,随着含有胡颓子叶药材定喘灵、消炎止咳片、海珠喘息灵等中成药的应用^[1],建立其质量标准尤为重要。本实验对来自河南、贵州、云南等产地的 12 批胡颓子叶药材,采用反相高效液相色谱,进行梯度洗脱,展开了指纹图谱分析研究,为进一步完善该药材的质量标准提供理论依据。

1 材料

1260 系列高效液相色谱仪(含四元梯度泵、DAD 检测器,美国 Agilent),BS210S 型电子天平(北京赛多利斯天平公司),AE240 型电子分析天平(瑞士 Mettler);对照品芦丁(批号 100416-201405,中国食品药品检定研究院),银锻苷(自制,HPLC 归一化法测定纯度达 98% 以上),山柰酚(批号 MUST-13121112,成都曼思特生物科技有限公司,纯度 > 96%);乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。聚类分析应用 SPSS 软件采用欧氏距离平方法进行聚类。所有胡颓子叶药材(表 1)产自于河南等省份,以上样品由河南中医药大学董诚明教授鉴定为胡颓子科胡颓子 *Elaeagnus pungens* 的干燥叶。

表 1 胡颓子叶来源表

Table 1 Source of *Elaeagnus pungens* leaf

No.	产地来源	No.	产地来源	No.	产地来源
S1	安徽	S5	江苏	S9	河南
S2	安徽	S6	广西	S10	四川
S3	贵州	S7	湖北	S11	蕲春
S4	贵州	S8	云南	S12	陕西

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取芦丁、银锻苷、山柰酚对照品适量,置 50 mL 量瓶中,加入甲醇定容,制成质量浓度分别为 20 mg·L⁻¹ 的对照品溶液,即得。

2.2 供试品溶液的制备 取各产地胡颓子叶粉末(过四号筛)约 1 g,精密称定,加入乙醇 30 mL,加热回流提取 1.5 h,滤过,蒸干,残渣加水 10 mL 溶解,用乙酸乙酯萃取 2 次,每次 10 mL,合并乙酸乙酯液,蒸干,残渣加甲醇定容至 10 mL,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.3 试验条件的考察^[6-8]

2.3.1 流动相的选择 考察了多种流动相梯度洗脱系统。最初选用了甲醇-水、乙腈-水梯度洗脱系统,结果发现,乙腈-水作为流动相时所得色谱峰分离效果较好,并且基线平稳,但是个别峰的分离效果

不好,考察了在水相中加入不同比例的磷酸(0.01%,0.05%,0.1%,0.2%,0.3%,0.4%,0.5%)和不同比例的乙酸进行调节,结果发现,磷酸对色谱峰峰形和基线的改善效果比乙酸好,且不同比例的磷酸对色谱峰峰形和基线的改善效果相差不大,考虑对柱子的保护及成本等因素,最后确定流动相洗脱系统为 0.1% 磷酸水(A)-乙腈(B)溶液梯度洗脱,并进行洗脱条件的优选,最后确定最佳梯度洗脱程序(0~5 min,15%~20% B,5~15 min,20%~26% B,15~20 min,26%~30% B,20~25 min,30%~35% B,25~30 min,35%~46% B,30~35 min,46%~63% B,35~40 min,63%~68% B,46~60 min,68% B),色谱图可见色谱峰分离较好,峰形对称,且保留时间适中。

2.3.2 供试品溶液制备方法的选择 曾考察了 95% 乙醇,80% 乙醇,60% 乙醇,甲醇,80% 甲醇,60% 甲醇 6 种提取溶剂,结果表明甲醇和乙醇作为提取溶剂所得供试品很难使每个色谱峰完全分离,所得色谱图特征性不明显,最重要的是制得的供试品不稳定,在 24 h 内连续进样所得色谱峰相差较大。不同比例乙醇制得的供试品中,95% 乙醇所得色谱峰较其他比例略好,还存在供试品不稳定的问题,确定以乙醇作为提取溶剂。

2.3.3 提取方法的选择 考察了 80% 乙醇作为提取溶剂,采用超声和水浴回流 2 种提取方法进行试验,结果发现超声提取所得色谱峰比回流所得色谱峰少,且在相同进样量的前提下,采用超声提取所得供试品显示所得色谱峰峰形小,峰高值小,因此,采用水浴回流提取方法。

2.3.4 检测波长的选择 采用二极管阵列紫外检测器,在确定的色谱条件下 190~400 nm 波长采集三维色谱,综合考虑出峰情况、基线平稳程度、各成分分离情况等因素,最终选定检测波长为 360 nm。

2.4 指纹图谱的建立

2.4.1 色谱条件 Agilent ZOTBAX XDB-Phenyl C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相 0.1% 磷酸水(A)-乙腈(B),按 2.3.1 项下选定的条件进行梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 360 nm,柱温 30 ℃,记录时间 60 min,进样量为 10 μL。

2.4.2 方法学考察

2.4.2.1 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL,按照 2.4.1 项下色谱条件进样,连续 6 次,记录色谱图中共有峰的保留时间和峰面积,以 4 号峰

银锻苷作为内标峰,结果表明,共有峰的相对保留时间和相对峰面积积分值的 RSD 分别为 0.06% ~ 0.3% 和 0.1% ~ 2.4%,提示精密度良好。

2.4.2.2 重复性试验 精密称取同一批样品 5 份,按照 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.4.1 项下方法测定,记录各共有峰保留时间和峰面积。以 4 号峰作为内标准峰,结果表明,共有峰的相对保留时间和相对峰面积积分值的 RSD 分别为 0.03% ~ 1.8% 和 0.1% ~ 2.4%,提示重复性良好。

2.4.2.3 稳定性试验 取同一批供试品溶液,在相同条件下分别于 0,2,4,8,12,24 h 测定结果,以 4 号峰的保留时间和峰面积值作为参照,共有峰的相对保留时间和相对峰面积积分值的 RSD 分别为 0.02% ~ 0.4% 和 0.2% ~ 2.1%,表明供试液在 24 h 内稳定良好。

表 2 12 批胡颓子叶共有峰的相对峰面积

Table 2 Twelfth batches of *Elaeagnus pungens* leaf relative peak area

No.	1	2	3	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
S1	0.103	0.206	0.514	0.169	0.061	0.131	0.026	0.008	0.024	0.017	0.498	0.079	0.642	1.206	0.215
S2	0.019	0.033	0.250	0.159	0.081	0.084	0.166	0.078	0.088	0.064	0.748	0.231	1.361	2.213	0.451
S3	0.261	0.431	0.427	0.230	0.108	0.063	0.083	0.022	0.041	0.033	1.202	0.159	1.530	2.103	0.403
S4	0.024	0.059	0.267	0.176	0.109	0.094	0.109	0.039	0.116	0.074	0.831	0.209	1.476	2.451	0.489
S5	0.005	0.011	0.257	0.199	0.054	0.150	0.023	0.012	0.014	0.016	0.562	0.108	0.717	1.410	0.300
S6	0.005	0.007	0.276	0.169	0.036	0.030	0.029	0.009	0.013	0.025	0.342	0.070	0.433	0.877	0.161
S7	0.039	0.137	0.249	0.180	0.044	0.021	0.021	0.011	0.008	0.011	0.470	0.081	0.665	1.167	0.243
S8	0.103	0.207	0.375	0.196	0.088	0.107	0.038	0.012	0.029	0.015	0.599	0.090	0.768	1.234	0.251
S9	0.012	0.083	0.173	0.176	0.106	0.044	0.030	0.013	0.007	0.029	0.090	0.024	0.176	0.351	0.058
S10	0.020	0.025	0.292	0.180	0.057	0.035	0.046	0.014	0.015	0.020	0.488	0.092	0.625	1.184	0.237
S11	0.003	0.011	0.218	0.169	0.040	0.034	0.021	0.008	0.004	0.013	0.296	0.098	0.378	0.926	0.182
S12	0.023	0.046	0.273	0.180	0.121	0.137	0.103	0.044	0.101	0.082	0.942	0.222	1.696	2.792	0.606

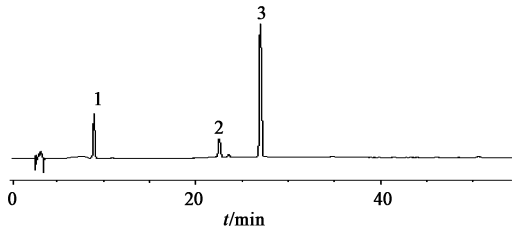
注:4 号峰均为 1.000。

2.5 胡颓子叶样品共有模式的建立 采用国家药典委员会《中药指纹图谱相似度评价系统》2004A 版软件对上述 12 批胡颓子叶药材 HPLC 指纹图谱,进行分析并建立了胡颓子叶药材的照指纹图谱,生成了 16 个共有峰作为基本特征峰。指纹图谱匹配结果和共有模式见图 2,3。

2.6 指纹图谱相似度计算 采用夹角余弦法对上述 12 批药材的指纹图谱进行相似度分析,计算结果见表 3。结果表明,相似度在 0.9% ~ 1.0%。

2.7 聚类分析 应用 SPSS 软件,用组间距离法对 12 批药材的 16 个共有峰相对峰面积进行标准化处理,采用欧氏距离平方法进行聚类。12 批胡颓子叶样本 9,10,2,5,7,8,1,12,4 号样品为第 I 类;11,6

2.4.3 样品测定 取 12 批供试品,按照 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.4.1 项下方法进行测定,并以混合对照品(芦丁、银锻苷、山柰酚)进行定位,混合对照品见图 1。以银锻苷(4 号峰)的保留时间和峰面积值作为参照,共有峰的相对保留时间 RSD 0.01% ~ 0.7%,共有峰的相对峰面积见表 2。



1. 芦丁;2. 银锻苷;3. 山柰酚

图 1 混合对照品 HPLC

Fig.1 HPLC of hybrid reference substance

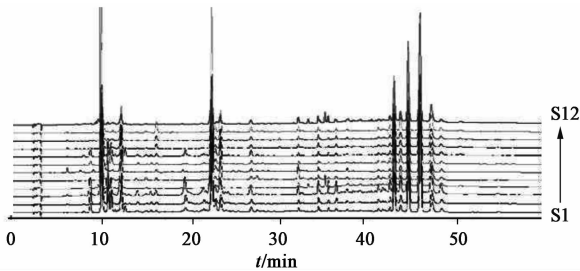


图 2 12 批胡颓子叶指纹谱

Fig.2 12 batches of *Elaeagnus pungens* leaf fingerprint

号样品为第 II 类;3 号样品为第 III 类。试验分析结果表明,第 III 类样品和前两类差距较大。

3 讨论

从 12 批胡颓子叶药材的看来,共有峰的相对保

表 3 12 批胡颓子叶相似度

Table 3 Twelfth batches of *Elaeagnus pungens* leaf similarity

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	对照
S1	1	0.807	0.957	0.914	0.979	0.842	0.988	0.994	0.818	0.972	0.948	0.902	0.973
S2	0.807	1	0.810	0.875	0.829	0.875	0.832	0.889	0.891	0.878	0.821	0.872	0.855
S3	0.957	0.81	1	0.924	0.954	0.895	0.941	0.965	0.854	0.945	0.885	0.923	0.945
S4	0.914	0.875	0.924	1	0.939	0.823	0.942	0.893	0.851	0.876	0.809	0.998	0.970
S5	0.979	0.829	0.954	0.939	1	0.838	0.983	0.977	0.883	0.982	0.954	0.932	0.986
S6	0.842	0.875	0.895	0.823	0.838	1	0.857	0.830	0.842	0.820	0.815	0.832	0.853
S7	0.988	0.832	0.941	0.942	0.983	0.857	1	0.976	0.833	0.960	0.934	0.929	0.992
S8	0.994	0.889	0.965	0.893	0.977	0.830	0.976	1	0.808	0.984	0.961	0.991	0.961
S9	0.818	0.891	0.854	0.851	0.883	0.820	0.883	0.808	1	0.898	0.847	0.818	0.885
S10	0.972	0.878	0.945	0.876	0.982	0.820	0.960	0.984	0.898	1	0.986	0.866	0.952
S11	0.948	0.821	0.885	0.809	0.954	0.815	0.934	0.961	0.847	0.986	1	0.894	0.913
S12	0.902	0.872	0.923	0.998	0.932	0.832	0.929	0.881	0.818	0.866	0.894	1	0.961
对照	0.973	0.855	0.945	0.970	0.986	0.853	0.992	0.961	0.885	0.952	0.913	0.961	1

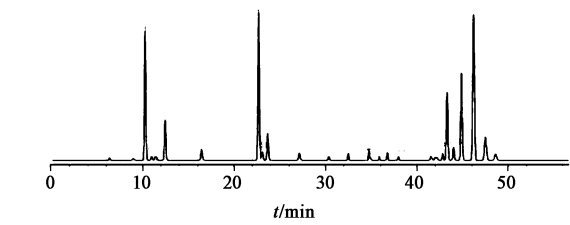


图 3 对照指纹谱

Fig.3 Compared fingerprint

留时间比较一致,各共有峰的相对峰面积变化趋势相似,9 批药材指纹图谱的相似度在 0.9 以上,不同产地胡颓子叶药材有比较好的一致性,本实验具有较好的精密度、重复性和稳定性。因此,该胡颓子叶指纹图谱具有一定的专属性,可以作为胡颓子叶优劣的鉴定手段之一,从而对胡颓子叶药材进行质量控制。

本实验所用胡颓子叶药材产自全国各地,指纹图谱共有峰相对保留时间 RSD 0.01% ~ 0.7%,然而共有峰相对峰面积有一定差别,由图 2 可知,不同产地胡颓子叶化学成分种类差别不明显,但是其化学成分的含量存在一定差异,为更好完善胡颓子叶质量标准的建立,对指纹图谱结合多种成分测定、药效物质基础的考察有待于更多的研究。

利用指纹图谱相似度评价可更加直观分析不同产地药材质量差异,为药物生产过程中药材的选用

提供依据。同时为其提取、干燥、质量控制等工艺、检测方面提供思路,在药物质量出现问题时也可为其产地来源、工艺过程、质量检测等各种原因的探究提供参考。

[参考文献]

[1] 中国科学院植物志编辑委员会. 中国植物志. 第 52 卷 (第二分册) [M]. 北京:科学出版社,1983:1-66.

[2] 李聪,葛月宾,胡婧,等. HPLC 法测定胡颓子叶中山柰素的含量[J]. 中国药房,2012,23(19):1772-1774.

[3] 郭明娟,江洪波,田祥琴,等. 胡颓子叶的化学成分[J]. 华西药学杂志,2008,23(4):381-383.

[4] 黄丽杰,刘伟,崔永霞. 胡颓子叶化学成分的研究[J]. 中成药,2015,37(4):796-800.

[5] 付义成,王晓静,贾献慧,等. 胡颓子叶正丁醇部位化学成分及其细胞毒性初步研究[J]. 中药材,2009,32(12):1848-1850.

[6] 张前飞,杨玉琴,秦利芬,等. 降粘胶囊 HPLC 指纹图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(1):77-81.

[7] 员荣,孙丽丽,杨立伟,等. 咳特灵胶囊的 UPLC 指纹图谱及主要成分的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(6):37-40.

[8] 刘伟,茹凡书,崔永霞,等. 烘干与硫熏金银花药材 HPLC 指纹图谱对比[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(4):111-113.

[责任编辑 顾雪竹]