

## 山楂药材 HPLC 指纹图谱研究

罗文, 刘斌\*, 王伟, 石任兵

(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

**摘要:**目的 建立山楂药材 HPLC 指纹图谱, 为有效控制山楂药材的质量奠定基础。方法 采用 HPLC 法, 色谱柱为 Agilent TC-C<sub>18</sub> 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 乙腈-0.01% 甲酸水梯度洗脱, 检测波长为 280 nm, 体积流量为 1.0 mL/min, 分析时间为 120 min, 分析了 10 批山楂药材的 HPLC 指纹图谱。结果 在选定的色谱条件下, 通过相似度分析确定 23 个色谱峰构成山楂药材指纹图谱的特征峰。结论 采用 HPLC 方法建立的指纹图谱具有精密、稳定、重现性好的特点, 可用于山楂药材的质量控制。

**关键词:** 山楂; 指纹图谱; HPLC

中图分类号: R282.710.3

文献标识码: A

文章编号: 1674-5515(2009)01-0039-04

### Fingerprint of *Fructus Crataegus* by HPLC

LUO Wen, LIU Bin, WANG Wei, SHI Ren-bing

(School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

**Abstract: Objective** To study the fingerprints of *Fructus Crataegus* by HPLC and establish a sensitive, specific method for quality control. **Methods** The gradient elution mode was applied in chromatographic separation; Agilent TC-C<sub>18</sub> column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used with the mobile phase of acetonitrile-water (0.01% formic acid), UV detection wavelength of 280 nm, flow rate of 1.0 mL/min, analysis time of 120 min. Ten batches of *Fructus Crataegus* were studied. **Results** 23 Peaks were identified as the characteristic fingerprints of *Fructus Crataegus*. **Conclusion** The established method shows satisfactory accuracy, stability, and reproducibility, and can be used as a quality control method for *Fructus Crataegus*.

**Key words:** *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br; *C. pinnatifida* Bge.; fingerprint; HPLC

中药山楂为蔷薇科山楂属植物山里红 *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br. 或山楂 *C. pinnatifida* Bge. 的干燥成熟果实, 味酸、甘, 微温, 入脾胃、肝经。用于肉食积滞、胃脘胀满、泻痢腹痛、瘀血经闭、产后瘀阻、心腹刺痛、疝气疼痛、高脂血症等<sup>[1]</sup>。山楂化学成分主要为有机酸和黄酮类。有关山楂药材及其制剂的质量控制, 目前文献报道较多的是主要成分的测定<sup>[2-3]</sup>, 而采用指纹图谱技术评价和控制山楂药材质量的研究报道很少, 且供试品制备过程较为繁琐<sup>[4]</sup>, 难以全面反映山楂所含化学成分特征, 难以保证分析检测结果的重现, 难以准确评价和控制药材质量。本实验采用 HPLC 法, 对山楂药材指纹图谱进行了研究, 为改进山楂药材的质量评价方法提供参考。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

Waters 高效液相色谱仪, 包括 1525 型二元高压梯度泵系统、2487 型二极管阵列检测器、1500 型柱温控制系统(美国 Waters 公司)。25 μL 可调进样器; Sartorius BT 25S 型十万分之一电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司); KQ-500DE 超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

### 1.2 试药与药材

金丝桃苷对照品购自中国药品生物制品检定所, 批号 1521-200202; 山楂药材: S1~S3 产于河北, S4、S7、S9、S10 产于山东, S5、S8 产于河南, S6 产于安徽, 经北京中医药大学张贵君教授鉴定 S6 为蔷薇科山楂 *Crataegus pinnatifida* Bge. 的干燥成熟果

基金项目 “十一五”国家科技支撑计划(2006BAI08B03-04)

\* 通讯作者 刘斌, 男, 教授, 硕士生导师。E-mail: Liubinyn67@163.com

实,其余药材为山里红 *C. pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br. 的干燥成熟果实。

乙腈(Sigma-aldrich公司,色谱纯);屈臣氏蒸馏水,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 供试品溶液的制备

取山楂药材粉末(65目)2g,精密称定,置锥形瓶中,加甲醇50mL,称质量,超声处理30min,放冷,称质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,0.45 $\mu$ m微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

### 2.2 对照品溶液的制备

取金丝桃苷对照品约8mg,精密称定,置25mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,精密吸取1mL置25mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液。

### 2.3 色谱条件

色谱柱:Agilent TC-C<sub>18</sub>柱(250mm $\times$ 4.6mm,5 $\mu$ m)。流动相A(乙腈)-B(0.01%甲酸水溶液),梯度洗脱,分析时间120min;0~20min,B 98% $\rightarrow$ 90%;20~55min,B 90% $\rightarrow$ 86%;55~80min,B 86% $\rightarrow$ 82%;80~115min,B 82% $\rightarrow$ 70%;115~120min B 70% $\rightarrow$ 50%。体积流量:1.0mL/min。检测波长:280nm。柱温:30 $^{\circ}$ C。

### 2.4 精密度试验

精密吸取山楂供试品溶液10 $\mu$ L,连续进样5次,测定其HPLC图谱。以金丝桃苷峰(18号峰)为参照峰,计算各共有峰相对保留时间的RSD值 $<$ 2%,相对峰面积的RSD值 $<$ 3%。表明方法精密度良好。

### 2.5 稳定性试验

精密吸取山楂供试品溶液,分别于制备后0、3、6、9、12、15、24h进样,测得各共有峰相对保留时间的RSD值 $<$ 2%,相对峰面积的RSD值 $<$ 3%,表明供试品溶液在24h内稳定。

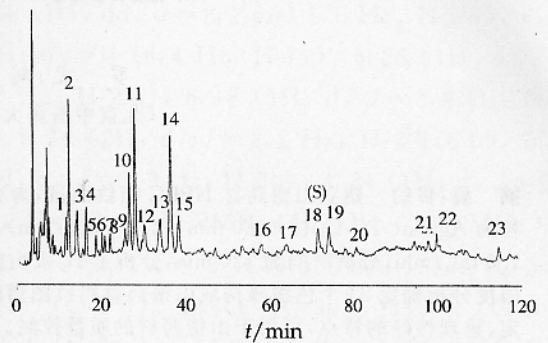
### 2.6 重现性试验

取同一批山楂药材5份,按2.1项下方法制备供试品溶液,分别进样,测得各共有峰相对保留时间的RSD值 $<$ 2%,相对峰面积的RSD值 $<$ 3%。表明方法重现性良好。

### 2.7 指纹图谱的建立

按上述液相色谱条件检测不同产地10批山楂药材的指纹图谱。分别将10批山楂药材的指纹图谱输入国家药典委员会开发的《中药指纹图谱相似度评价系统研究版(2004A)》中,进行时间窗的设定、

谱峰匹配,最后确定山楂色谱图中含有23个共有色谱峰,见图1、2。



S-金丝桃苷

图1 山楂药材 HPLC 图谱

根据《中药指纹图谱相似度评价系统研究版(试行)》,选择金丝桃苷峰(18号峰)作为参照峰。各峰相对保留时间、相对峰面积见表1、2。计算各样品指纹图谱与生成的对照图谱R的相似度,结果见表3。

## 3 讨论

### 3.1 提取方法的选择

通过对提取方式(超声、冷浸、热回流提取)的考察,发现热回流与冷浸提取效率相当,其色谱图中成分数量及其量均小于超声提取。对不同提取溶剂(甲醇、水、50%甲醇水溶液、50%乙醇水溶液)考察结果表明,甲醇提取物色谱图信息量最多,分量最高。故供试品溶液的制备方法确定以甲醇为提取溶剂,超声提取30min。

### 3.2 色谱条件的选择

分别用甲醇-水、乙腈-水、乙腈-甲酸水体系为流动相,以不同梯度进行试验,结果表明乙腈-甲酸水线性梯度洗脱效果最好。同时采用Waters二级管阵列检测器对检测波长进行了选择,通过比较238、254、280、320nm检测波长下的色谱图,发现检测波长为280nm时,色谱图所包含的信息量最大、分量高,且各色谱峰分离较好,基线平稳。

### 3.3 指纹图谱的评价

在中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)的辅助下,得出了山楂药材的HPLC指纹图谱的对照指纹图谱,为山楂药材提供了质量上的技术监控手段。比较10批山楂饮片样品指纹图谱后发现,不同产地山楂饮片指纹图谱中主要峰群的整体图貌基本一致,虽然不同产地样品中各成分量的相对比值有所差别,但相似度计算结果表明,10批样品指纹图谱相似度均 $>$ 0.9,这种在共性特征基础上

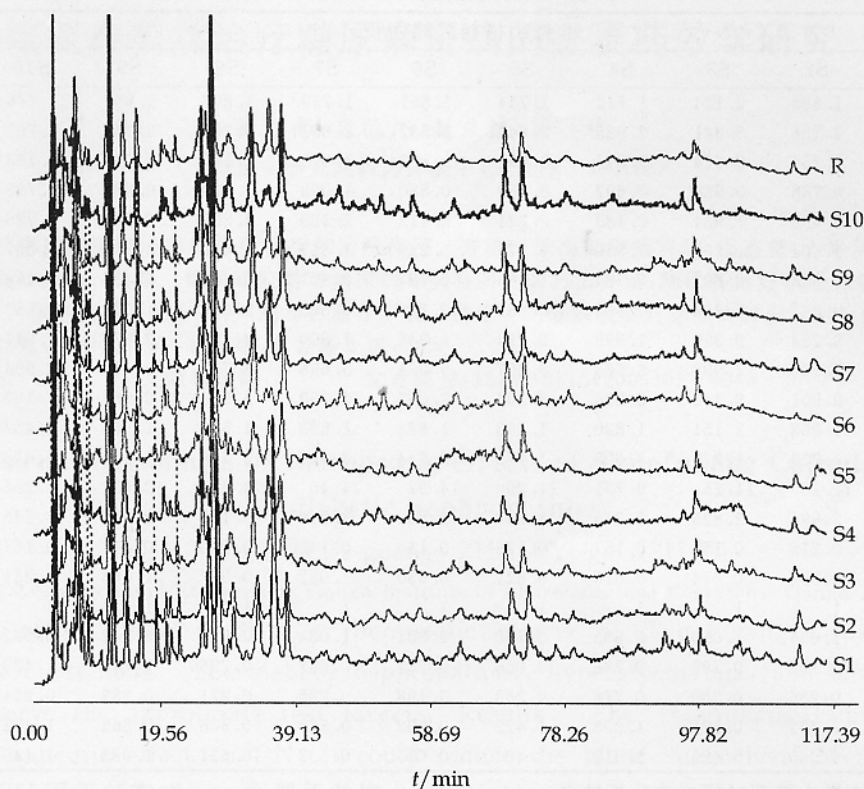


图2 10批山楂药材HPLC图谱

表1 10批山楂药材共有峰相对保留时间

峰号	10批山楂相对保留时间										均值	RSD/%	
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10			
1	0.164	0.163	0.164	0.164	0.164	0.164	0.164	0.164	0.164	0.164	0.164	0.164	0.19
2	0.173	0.173	0.174	0.174	0.175	0.174	0.176	0.174	0.173	0.174	0.174	0.174	0.52
3	0.201	0.199	0.202	0.201	0.203	0.200	0.202	0.203	0.204	0.201	0.202	0.202	0.65
4	0.221	0.220	0.221	0.221	0.221	0.221	0.222	0.219	0.221	0.222	0.221	0.221	0.38
5	0.263	0.261	0.263	0.263	0.264	0.263	0.264	0.263	0.264	0.264	0.264	0.263	0.32
6	0.282	0.281	0.282	0.284	0.284	0.284	0.282	0.284	0.284	0.284	0.282	0.283	0.35
7	0.293	0.291	0.293	0.293	0.291	0.291	0.290	0.293	0.293	0.293	0.292	0.292	0.34
8	0.310	0.309	0.309	0.310	0.310	0.308	0.309	0.309	0.309	0.309	0.309	0.309	0.20
9	0.357	0.356	0.358	0.359	0.355	0.358	0.358	0.357	0.358	0.358	0.358	0.357	0.34
10	0.371	0.368	0.370	0.372	0.372	0.372	0.371	0.371	0.372	0.372	0.371	0.371	0.33
11	0.389	0.386	0.388	0.391	0.390	0.390	0.389	0.390	0.390	0.390	0.388	0.389	0.36
12	0.422	0.420	0.424	0.423	0.424	0.422	0.423	0.423	0.424	0.422	0.423	0.423	0.24
13	0.473	0.472	0.476	0.476	0.471	0.472	0.473	0.473	0.471	0.470	0.473	0.473	0.43
14	0.505	0.504	0.506	0.506	0.505	0.507	0.508	0.506	0.506	0.505	0.506	0.506	0.23
15	0.533	0.530	0.533	0.534	0.542	0.531	0.533	0.532	0.532	0.532	0.533	0.533	0.64
16	0.805	0.802	0.805	0.806	0.806	0.804	0.806	0.806	0.806	0.804	0.805	0.805	0.19
17	0.893	0.887	0.890	0.890	0.891	0.888	0.892	0.895	0.895	0.888	0.891	0.891	0.27
18(S)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	—
19	1.035	1.030	1.036	1.034	1.034	1.036	1.038	1.035	1.038	1.034	1.035	1.035	0.21
20	1.130	1.124	1.127	1.129	1.131	1.126	1.128	1.126	1.128	1.127	1.128	1.128	0.20
21	1.366	1.348	1.365	1.359	1.361	1.365	1.366	1.366	1.367	1.366	1.363	1.363	0.43
22	1.394	1.388	1.395	1.394	1.393	1.391	1.393	1.396	1.391	1.393	1.393	1.393	0.17
23	1.600	1.593	1.597	1.598	1.602	1.602	1.603	1.598	1.601	1.603	1.600	1.600	0.20

表2 10批山楂药材共有峰相对峰面积

峰号	10批山楂相对峰面积										均值	RSD/%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10		
1	1.391	1.895	2.124	1.712	1.744	1.551	1.730	1.808	1.958	1.768	1.768	11.71
2	2.883	3.158	3.341	2.929	2.842	2.837	2.851	3.204	3.341	2.792	3.018	6.63
3	2.166	2.257	2.624	1.845	1.891	1.872	1.891	2.120	2.074	2.133	2.087	11.89
4	0.468	0.788	0.926	0.697	0.559	0.880	1.063	1.429	0.834	0.788	0.843	31.89
5	1.863	2.092	1.954	2.183	2.321	2.412	2.330	2.303	2.000	2.229	2.169	8.90
6	1.046	1.504	1.367	1.550	1.275	1.229	1.367	1.642	1.065	1.367	1.341	13.12
7	0.647	0.683	0.693	0.784	1.105	0.784	0.601	0.464	0.876	1.196	0.783	28.43
8	0.824	0.857	1.282	0.595	0.689	0.788	0.698	0.656	1.072	0.612	0.807	24.81
9	1.938	2.224	2.350	1.995	2.224	1.945	1.800	2.271	2.176	1.940	2.086	8.97
10	5.715	7.986	7.998	6.163	9.007	5.694	5.696	6.722	6.717	7.994	6.969	18.18
11	8.985	9.901	9.443	8.898	8.504	7.087	6.759	8.086	6.661	7.160	8.148	13.75
12	1.647	1.968	2.151	1.830	1.693	1.673	1.523	1.570	1.665	1.487	1.721	12.02
13	3.585	3.039	1.979	3.603	3.768	3.644	3.464	3.318	3.305	3.413	3.312	15.83
14	13.09	11.10	11.25	9.731	11.25	14.92	14.46	13.52	12.63	1.293	11.329	35.67
15	2.861	2.994	2.829	3.319	3.099	2.860	3.319	3.195	2.956	3.145	3.058	6.34
16	0.172	0.218	0.158	0.157	0.126	0.140	0.148	0.166	0.147	0.167	0.160	15.69
17	0.472	0.807	0.614	0.816	0.871	0.930	1.022	0.907	1.068	1.251	0.876	24.33
18(S)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	—
19	0.896	1.034	1.080	0.805	0.713	0.851	1.034	0.988	0.942	0.982	0.932	12.73
20	0.507	0.707	0.798	0.758	0.965	0.781	0.657	0.736	1.194	1.423	0.853	29.06
21	0.317	0.285	0.280	0.276	0.363	0.198	0.285	0.271	0.289	0.294	0.286	17.60
22	0.780	0.753	0.872	1.238	1.422	0.702	0.566	0.506	0.665	1.422	0.893	38.11
23	0.854	0.565	0.625	1.312	1.404	0.625	0.533	0.671	1.083	1.449	0.912	41.07

表3 10批山楂药材相似度分析结果

批号	相似度	批号	相似度
S1	0.935	S6	0.912
S2	0.911	S7	0.936
S3	0.953	S8	0.945
S4	0.945	S9	0.953
S5	0.944	S10	0.947

存在的个体差异是常见的现象,因为药材生产过程中受到土壤、气候、环境等因素及采收加工过程中诸多因素的影响,通过量化比较可以为选购原料药材及指导 GAP 提供质量信息。

### 3.4 结论

指纹图谱是目前控制中药材质量最有效、最直

观的手段之一。本实验采用 HPLC 方法,建立了山楂药材的指纹图谱。结果表明该方法稳定、可靠、重现性好,可为山楂药材质量分析、评价与控制提供依据。

### 参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2005.
- [2] 张忠会,秦婷,王慧达,等. RP-HPLC 法测定山楂提取物中金丝桃苷的含量[J]. 中草药, 2004, 35(8): 884-885.
- [3] 杨滨,李化,汤树良,等. 高效液相法测定山楂中枸橼酸的含量[J]. 中国药学杂志, 2004, 39(9): 697-699.
- [4] 杨树良,杨演,黄璐琦,等. 山楂高效液相指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(4): 9-13.

(收稿日期 2008-09-18)

## 含蒲公英属植物活性成分的护发剂

### WO 2008043644 A3

含蒲公英属植物活性成分的制剂可以激活毛囊、促进毛发生长,增粗毛发,应用于毛发或头皮,可治疗脱发,调节毛发。

本品具生长因子释放促进剂、毛发角化细胞增强促进剂、毛发基因表达调节剂的作用。在皮肤乳头状细胞培养中,加入的商品蒲公英提取物质量分数为 0.01% 时,能增强角化细胞生长因子的表达达 5.08 倍;在无囊模型中,质量分数 0.1% 时,增加毛

根鞘角化细胞层的厚度达 20 倍。

蒲公英的活性成分作为著名的植物治疗剂已经用来净化血液,诱导多尿,治疗风湿病、痛风、湿疹和肝病。

蒲公英属植物活性成分使毛发健康、强壮地生长,无副作用(如药剂积聚在毛发纤维上),使毛发变粗,疗效长久。还可调节毛发基因的表达,改善毛发结构,促进毛发生长和代谢。在成纤维细胞培养试验中,本品浓度为 62.5~500 ng/mL 时,未见细胞损害作用或毒理作用(如肿瘤促进作用)。

(陈蕊芳摘)