

①果叶 HPLC 指纹图谱共有模式的建立及在近缘品种扁桃叶鉴别中的应用

覃洁萍, 冯 旭, 邓家刚*, 王胜波*

(广西中医学院, 广西 南宁 530001)

摘 要:目的 建立①果叶药材的 HPLC 指纹图谱, 为①果叶药材的鉴别及质量控制提供新的方法。方法 采用 HPLC 分析方法, 以具有代表性的 28 批①果叶 HPLC 图谱为基础, 建立①果叶药材 HPLC 指纹图谱共有模式。结果 该指纹图谱共有模式可以较好地地区分①果叶与扁桃叶。结论 ①果叶 HPLC 指纹图谱共有模式的建立为①果叶药材的鉴别和质量控制提供了一种新的方法。

关键词:①果叶; 扁桃叶; 指纹图谱; 质量控制

中图分类号: R282.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)09-1543-04

①果叶为漆树科芒果属植物芒果 *Mangifera indica* L. 的叶, 具有行气疏滞、去瘀积的功效; 用于热滞腹痛、气胀、小儿疳积、消渴^[1]。①果叶作为中药记载始于 1977 年的《中药大辞典》^[2]。①果叶中主要含有芒果苷、高芒果苷、异芒果苷、槲皮素等多种化学成分^[3]。扁桃叶为漆树科芒果属植物扁桃 *M. persiciiformis* C. Y. Wu et T. L. Ming 的叶^[4]。扁桃与芒果是同科同属植物, 由于其叶片外形相似, ①果叶与扁桃叶很容易混淆而误用。为了探讨①果叶与扁桃叶化学成分分布的差异性及利用 HPLC 指纹图谱区分①果叶和扁桃叶的可行性, 本实验在相同色谱条件下, 分别测定了 28 批产自广西南宁、百色、田阳 3 个产地的 3 个主要大宗品种台农 1 号芒(TN)、金煌芒(JH)及桂热 82 号芒(GR)的①果叶和 10 批不同产地扁桃叶的 HPLC 图谱, 以测得①果叶样品的 HPLC 图谱为基础, 借助国家药典委员会推荐的中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 版), 建立了①果叶药材的指纹图谱共有模式。所建立的指纹图谱共有模式可较好地地区分①果叶与扁桃叶。本研究为①果叶药材的鉴别和质量控制提供了新的方法和思路。

1 仪器与试剂

1.1 仪器与试剂:Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪, 含高压四元泵(G-1311A)、在线真空脱气机(G-1322A)、标准自动进样器(G-1313A)、柱温箱(G-1316A)、可变波长检测器(G-1314A)、二极管阵列检测器(DAD), Agilent 1100 series 色谱工作站(美国安捷伦科技公司); 超声波清洗仪(SB3200-

T, 上海必能信超声有限公司); 超纯水仪(Millipore Simplicity-185, 美国密里博公司); 电子分析天平(BP211D, 德国赛多利斯公司); 高速微量离心机(LG-16W, 北京医用离心机厂)。乙腈(美国飞世尔科学世界公司, 色谱纯); 甲醇(天津四友生物医学科技有限公司, 色谱纯), 水为超纯水; 其他试剂均为分析纯。芒果苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 111607-200301); 没食子酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110831-200302), 高芒果苷对照品为广西中医学院分析化学教研室提供, 并经¹H-NMR、¹³C-NMR 及 ESI-MS 光谱鉴定。

1.2 材料:实验用①果叶及扁桃叶样品采自广西南宁、田阳、百色等地区, 并经广西亚热带作物研究所黄国第高级工程师鉴定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱为美国 Waters Symmetry C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液, 梯度洗脱 A: 乙腈, B: 0.1%磷酸溶液。洗脱程序 0~20 min, 5%~15% A; 20~25 min, 15% A; 25~35 min, 15%~20% A; 35~40 min, 20% A; 40~50 min, 20%~30% A; 50~60 min, 30%~5% A。柱温 30℃; 检测波长 216 nm; 体积流量 0.8 mL/min; 进样量 5 μL。理论塔板数以芒果苷峰计不少于 20 000。

2.2 供试品溶液的制备:取样品粉末 0.1 g, 精密称定, 置索氏提取器中, 加石油醚(60~90℃) 100 mL, 回流至无色, 弃去石油醚。再用 100 mL 乙醇回流提取至无色, 将提取浓缩至干, 加甲醇溶解, 置 5 mL 量

* 收稿日期: 2010-03-17

基金项目: 国家科技部重大资助项目(2004BA901A09); 广西科技厅资助项目(桂科能 07109004-6Z)

作者简介: 覃洁萍(1962—), 女, 广西南宁人, 教授, 研究方向为中药分析与质量控制。

Tel: (0771) 2279189 E-mail: chinaqip6380@yahoo.com.cn

* 通讯作者 邓家刚 Tel: (0771) 3137555 E-mail: dengjg@tom.com

瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,离心 10 min (转速 12 000 r/min),取上清液即得供试品溶液。

2.3 对照品溶液的制备:精密称取芒果苷对照品适量,用 40% 甲醇溶解并配成质量浓度为 0.5 mg/mL 的芒果苷对照品储备液;取芒果苷对照品储备液 5 mL,置 10 mL 量瓶中,用 40% 甲醇稀释至刻度,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验:取同一份供试品溶液,连续进样 6 次,每次 5 μ L,考察色谱峰保留时间的一致性,结果各色谱峰保留时间的 RSD 在 0.014% ~ 0.40%,相对峰面积 RSD 在 0.04% ~ 1.4%。

2.4.2 稳定性试验:取同一供试品溶液,在 0、2、6、12、24 h 进样测定,检测色谱图。各共有色谱峰的相对保留时间的 RSD 值在 0.020% ~ 1.2%,各共有峰的相对峰面积的 RSD 值在 0.15% ~ 2.3%。

2.4.3 重现性试验:取同一批 ① 果叶药材粉末 6 份,精密称定,制备供试品溶液,测定,考察各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明,6 份样品中各共有色谱峰的相对保留时间的 RSD 在 0.012% ~ 0.26%,各共有峰的相对峰面积的 RSD 在 1.2% ~ 2.9%。

2.5 ① 果叶、扁桃叶样品及 ① 果苷对照品的 HPLC 图谱测定:分别取 ① 果叶(百色 GR050604)、扁桃叶样品(百色 G070914),制备供试液,将制得的各供试液及混合对照品溶液进行测定,得混合对照品及各药材样品的 HPLC 色谱图(图 1)。

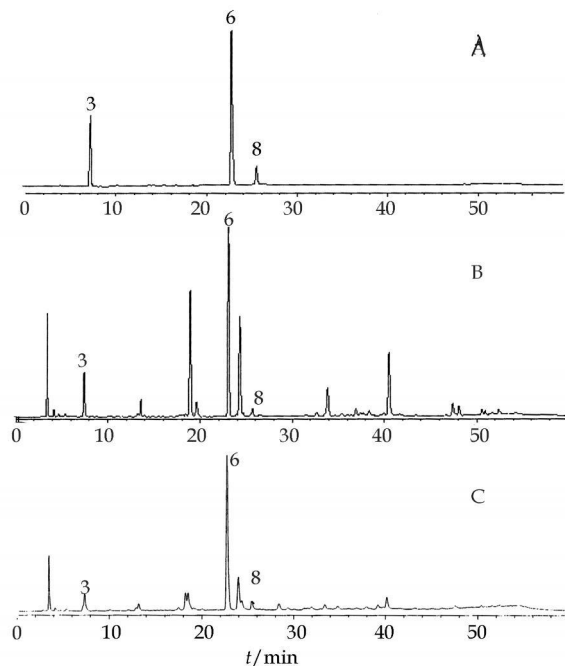


图 1 对照品(A)、① 果叶(B)和扁桃叶(C) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of reference substances (A), *M. indica* leaves (B), and *M. persicae formis* (C)

2.6 ① 果叶药材 HPLC 图谱共有模式的建立:以 28 批 ① 果叶药材样品的 HPLC 图谱为基础,通过图谱比对及峰位校正,从中找出构成其指纹特征的色谱峰;结果确定 13 个共有指纹峰作为特征,组成 ① 果叶药材的指纹图谱共有模式,见图 2、3。

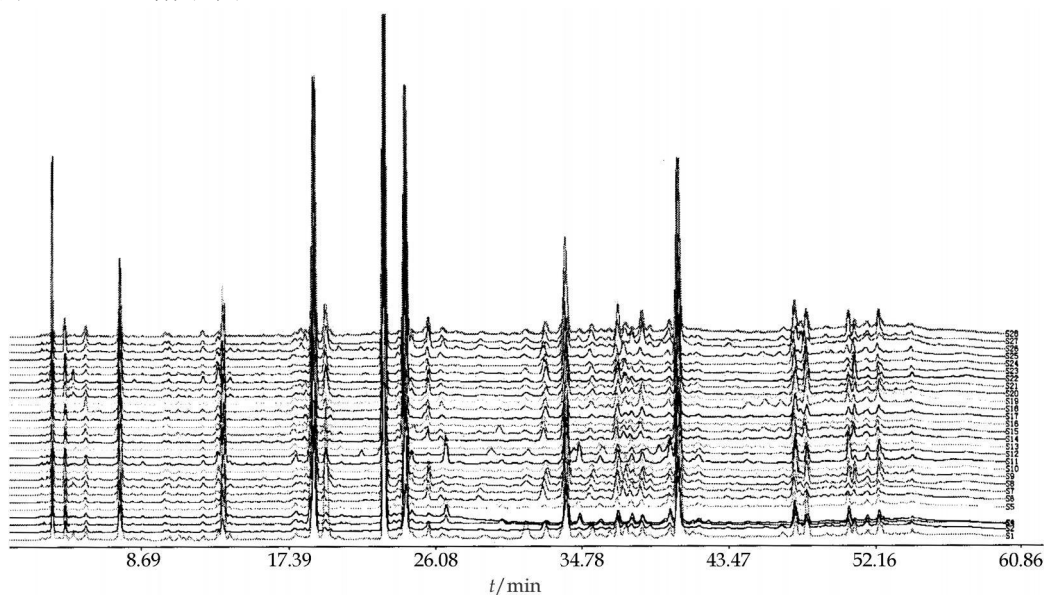


图 2 28 批 ① 果叶药材 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC Chromatograms of 28 batches of *M. indica* leaves

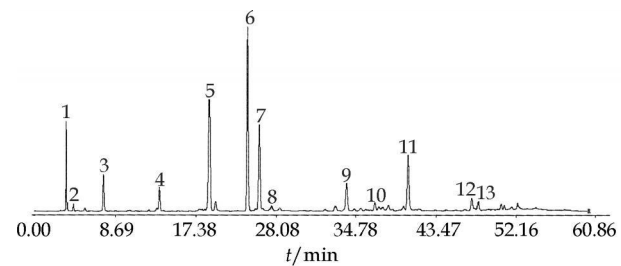


图 3 ①果叶药材 HPLC 指纹图谱共有模式
Fig. 3 Mutual pattern of HPLC fingerprint
on *M. indica* leaves

①果叶指纹图谱的 13 个特征峰中,其中 6 号峰的保留时间及 DAD 检测器测得的在线紫外光谱与芒果苷对照品的保留时间及紫外光谱一致,确定为芒果苷的峰,并作为参照峰。此外,通过与没食子酸及高芒果苷对照品的保留时间与紫外光谱进行对比,确定 3 号峰和 8 号峰分别为没食子酸及高芒果苷的峰。

2.7 ①果叶 HPLC 图谱共有模式在扁桃叶鉴别中的应用:为了考察测得的指纹图谱共有模式对 ①果叶药材及其近缘品种扁桃叶的分辨能力,在同样色谱条件下,分别测定了 10 批采自于广西不同产地的扁桃叶样品,然后以上述建立的 HPLC 指纹图谱共有模式为对照图谱,分别计算测得的各指纹图谱的相似度。实验结果表明,扁桃叶药材与 ①果叶药材的 HPLC 图谱虽有一些相似的特征,但仍有一定的差异,与 ①果叶药材的指纹图谱共有模式相比较,其相似度均小于 0.70,而所有 ①果叶药材的图谱相似度均大于 0.90。计算结果分别见表 1、2。

表 1 不同产地扁桃叶的相似度

Table 1 Similarity of <i>M. persici formics</i> leaves from different sources			
编号	批号	产地	相似度
1	070501	南宁	0.691
2	070508	合浦	0.641
3	070610	南宁	0.698
4	070820	玉林	0.683
5	070914	百色	0.698
6	071025	柳州	0.399
7	080801	崇左	0.661
8	080804	隆安	0.668
9	080809	浦北	0.491
10	080815	横县	0.693

3 讨论

3.1 谢培山^[5]认为中医药理论和实践的非线性特点要求综合评价中药质量,色谱指纹图谱(图像)分析是对中药及其制剂进行综合宏观分析的可行手段之一;本实验以 28 批广西大宗品种芒果叶的 HPLC

表 2 28 批 ①果叶药材相似度

Table 2 Similarity of 28 batches of <i>M. indica</i> leaves			
编号	样品	产地	相似度
S1	TN050530	南宁	0.996
S2	TN050710	南宁	0.915
S3	TN050806	南宁	0.901
S4	TN050907	南宁	0.921
S5	TN050604	田阳	0.987
S6	TN050708	田阳	0.988
S7	TN050808	田阳	0.992
S8	TN050909	田阳	0.989
S9	TN050604	百色	0.998
S10	TN050707	百色	0.901
S11	TN050807	百色	0.931
S12	TN050908	百色	0.911
S13	JH 050530	南宁	0.993
S14	JH 050710	南宁	0.974
S15	JH 050806	南宁	0.991
S16	JH 050907	南宁	0.992
S17	JH 050604	百色	0.961
S18	JH 050707	百色	0.961
S19	JH 050807	百色	0.994
S20	JH 050908	百色	0.971
S21	G R050530	南宁	0.957
S22	G R050710	南宁	0.981
S23	G R050806	南宁	0.982
S24	G R050907	南宁	0.986
S25	G R050604	百色	0.969
S26	G R050707	百色	0.984
S27	G R050807	百色	0.976
S28	G R050908	百色	0.939

图谱为基础,建立了 ①果叶药材的指纹图谱共有模式;利用 HPLC 色谱指纹图谱结合主要有效成分芒果苷的测定^[6]来控制芒果叶药材的质量优劣,比单一使用芒果苷等个别有效成分进行质量控制要更全面、客观,该法为芒果叶药材的质量控制提供了更全面的信息。

3.2 HPLC 指纹图谱近年来在中药质量控制方面已有较多应用^[7-19]。中药提取物在给定实验条件下所得的 HPLC 指纹图谱反映了该中药所含的化学成分及其分布状况,根据不同药材在同样条件下测得的指纹图谱中各个色谱峰的位置、大小及分布情况,初步推断出其所含的化学成分及其量的分布是否相同。本实验结果表明,扁桃叶与 ①果叶药材的 HPL 图谱有一些相似的特征峰;通过对比色谱峰位及相应峰的在线 UV 图谱,发现 ①果叶指纹图谱共有模式中的 1、3、4、6、7、8、11 号峰在扁桃叶的 HPLC 图谱中均可找到,即两者均含有没食子酸、芒果苷及高芒果苷等成分,由此可见扁桃叶与 ①果叶的许多化学成分是相同的;但仍有一定差异,如 ①果叶共有模式中的 2、5、9、10、12 和 13 号峰在扁桃叶的图谱中却不存在或不明显;扁桃叶与 ①果叶的

这些差异成分及其对药效的影响,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准 [M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 1990
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上册. 上海: 上海人民出版社, 1977
- [3] 陆仲毅, 毛 德, 何孟如, 等. 芒果叶化学成分研究 [J]. 中草药, 1982, 13(3): 3
- [4] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1980
- [5] 谢部山. 中药色谱指纹图谱鉴别的概念、属性、技术与应用 [J]. 中国中药杂志, 2001, 26(10): 653-655
- [6] 邓家刚, 冯 旭, 王 勤, 等. 不同产地及不同品种芒果叶中芒果苷的含量对比研究 [J]. 中成药, 2006, 28(12): 1755-1756
- [7] 覃洁萍, 刘 进, 叶 勇, 等. 复方扶芳藤合剂 HPLC 指纹图谱共有模式的建立及其在制剂质量控制中的应用 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(2): 1422-1425
- [8] 刘晓涵, 陈永刚, 林 励, 等. 不同产地巴戟天中糖类成分 HPLC-ELSD 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2009, 40(10): 1641-1643
- [9] 罗 文, 刘 斌, 王 伟, 等. 山楂药材 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(1): 39-42
- [10] 崔 洋, 王 巧, 张兰桐, 等. 河北道地药材连翘的高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2010, 41(2): 297-301

阿里红中总三萜酸及去氢硫色多孔菌酸的测定

吴 霞¹, 徐 硕², 罗 容¹, 于 萍¹, 毕 赢^{1*}

(1 首都医科大学中医药学院, 北京 100069; 2 北京大学药学院, 北京 100083)

摘 要:目的 建立新疆维吾尔民间常用药阿里红中总三萜酸及去氢硫色多孔菌酸的测定方法。方法 采用香草醛-冰醋酸-高氯酸比色法,以药材中指标成分去氢硫色多孔菌酸为对照品,检测波长为 554 nm,测定总三萜酸的量。采用 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),以乙腈-0.4%磷酸水溶液(61:39)为流动相,242 nm 为检测波长,柱温 25 ℃,体积流量 1.0 mL/min,高效液相色谱法测定去氢硫色多孔菌酸的量。结果 阿里红中总三萜酸在 0.040 4~0.242 4 mg/mL 呈良好的线性关系($r=0.998\ 9$),加样回收率均值为 98.56%。HPLC 法测定去氢硫色多孔菌酸在 0.022 3~0.133 7 mg/mL 线性关系良好($r=0.999\ 7$),加样回收率均值为 100.68%。结论 两种方法均操作简便,重现性好,结果可靠,适用于阿里红药材中三萜成分的质量控制。

关键词:阿里红;三萜酸;去氢硫色多孔菌酸;比色法;高效液相色谱法

中图分类号:R284.1 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2010)09-1546-03

阿里红 *Fomes officinalis* (Vill. ex. Fr.) Ames 是多孔菌科层孔菌属的真菌子实体,收载于中华人民共和国卫生部药品标准《维吾尔药分册》,为维吾尔药复方阿里红片的主要成分之一,主要用于祛痰平喘^[1],广泛分布于新疆天山东部和阿尔泰山区,新疆维吾尔医常用其治疗慢性支气管炎、腹痛、感冒、肺结核和各种癌症^[2,3]。阿里红中主要含有三萜酸、脂肪酸等^[4-7]。三萜类成分是很多药用真菌的有效成分之一,在提高人体免疫功能、抗衰老及其他许多保健功能方面已受到高度重视。研究表明阿里红中主要的羊毛甾烷型三萜酸类化合物对凝血酶具有一定的抑制活性^[7],但其测定方法国内外未见报道。为了更好地开发利用阿里红资源,本实验首次建立了阿里红中去氢硫色多孔菌酸的 RP-HPLC 测定方法及比色法测定总三萜酸成分的方法,为其质量控制提供了科学依据。

1 材料

1.1 样品来源:阿里红 2007 年 7 月至 2009 年 2 月购

于维吾尔医院及维吾尔药材市场,经新疆药物研究所刘庆华研究员鉴定为多孔菌科层孔菌属阿里红 *Fomes officinalis* (Vill. ex. Fr.) Ames 的子实体。

1.2 仪器与试剂:Agilent 1100 型高效液相色谱仪,UV762 紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),T460 型超声波清洗器(35 kHz,德国),AR1140 分析天平(OHAUS 公司,美国),ME235S 电子分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司),乙腈(色谱纯),水(娃哈哈纯净水),其余试剂均为分析纯。去氢硫色多孔菌酸对照品,自制,经 IR、MS、¹H-NMR、¹³C-NMR 鉴定为去氢硫色多孔菌酸^[7],质量分数 98.9%。

2 方法与结果

2.1 总三萜酸的测定

2.1.1 对照品溶液的制备:精密称取干燥恒重的去氢硫色多孔菌酸对照品适量,加甲醇制成 0.202 mg/mL 的对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备:取阿里红药材粗粉约 2

* 收稿日期:2009-11-19

基金项目:北京市属高等学校人才强教计划资助项目(PHR200907113, PHR201008402)

作者简介:吴 霞(1967—),女,博士,副教授,主要从事中药化学成分研究。 Tel: (010)83911635 E-mail: wuxia6710@163.com