

不同采收期小叶榕叶 HPLC 指纹图谱研究

黄 洋, 邵慧凯, 路 丽, 赵丽芳, 李 康*, 刘盛权, 谢淑桐, 李建炫

广东药学院药科学院, 广东 广州 510006

摘 要: **目的** 研究不同采收期小叶榕叶的 HPLC 指纹图谱, 为鉴定小叶榕药材提供依据, 为确定其最佳采收期提供参考。**方法** 以对羟基苯甲酸仲丁酯作为参照峰将指纹图谱分为高极性和低极性 2 部分进行表达。Purospher® STAR C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), Guard 色谱柱: XB-C₁₈ (Welch Materials, 5 μm), 流动相为 0.2%磷酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 采用梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 °C; 检测波长 270 nm (高极性部位) 和 290 nm (低极性部位)。利用 HPLC 法测定不同采收期的 12 个样品的色谱图谱。**结果** 小叶榕叶中所含成分的各色谱峰均得到了有效分离, 在测定的 12 批药材中, 共有 55 个色谱峰, 其中图谱显示有 44 个峰为 12 批样品所共有, 确定为特征指纹峰, 对其中 10 个共有指纹峰进行了标记; 初步发现最佳采收期为秋冬季节。**结论** 该法建立的 HPLC 指纹图谱具有可靠性, 可为进一步研究制定小叶榕叶的质量标准提供依据。

关键词: 小叶榕叶; 高效液相色谱法; 采收期; 指纹图谱; 羟基苯甲酸仲丁酯

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)02-0271-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.02.022

HPLC fingerprint for leaves of *Ficus microcarpa* in different harvest periods

HUANG Yang, SHAO Hui-kai, LU Li, ZHAO Li-fang, LI Kang, LIU Sheng-quan, XIE Shu-tong, LI Jian-xuan

School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To study the HPLC fingerprint for the leaves of *Ficus microcarpa* collected in different harvest periods, and to could provide the basis for the identification of *F. microcarpa* and the optimization of the best harvest periods. **Methods** The fingerprint chromatogram could be divided into high polarity part and low polarity part by the peak No. 29, which was identified as reference peak of *sec*-butyl-4-hydroxybenzoate. Analysis was performed on Purospher® STAR C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) and Guard Column XB-C₁₈ (5 μm, Welch Materials) with the 0.2% phosphoric acid water solution (A)-acetonitrile (B) as mobile phase. The gradient elution was carried out. The flow rate was 1.0 mL/min. The column temperature was 35 °C. The monitoring wavelength of the high polarity part and low polarity part was at 270 and 290 nm, respectively. The chromatograms of 12 batches of traditional Chinese medicinal materials in different harvest periods were determined by HPLC, which existed a total of about 55 chromatographic peaks. Among them there were 44 chromatographic peaks in common. The peaks were named as characteristic fingerprint peaks. **Results** The chemical components contained in the leaves of *F. microcarpa* had been effectively separated. Ten common fingerprint peaks were labeled from the 44 common peaks. The optimal harvest periods were winter and autumn. **Conclusion** The established method has a good reliability, which could provide the basis for the quality standard for further study on the leaves of *F. microcarpa*.

Key words: leaves of *Ficus microcarpa*; HPLC; harvest period; fingerprint chromatogram; *sec*-butyl-4-hydroxybenzoate

小叶榕叶, 来源于桑科榕属植物榕树 *Ficus microcarpa* L. f. 的叶^[1], 为民间常用中药, 味淡、性凉。小叶榕叶具有抗炎、杀菌、镇痛和止咳平喘等作用^[2], 临床上常将其干浸膏用于咳嗽、哮喘等多种疾病的治疗^[3]。由于不同产地、不同采收期的小叶榕叶中的成分有一定的变化, 从而影响到用药

的疗效^[4], 因此需对小叶榕叶的化学成分进行全面地评价, 以保证用药安全及疗效的稳定性。近些年, 指纹图谱技术得到广泛应用^[5-8], 本研究采用 HPLC 法建立了小叶榕叶的 HPLC 指纹图谱, 得到能够标示其特性的共有色谱峰图谱, 为小叶榕叶药材的采收及其内在质量的均一性提供全面的质量控制依据。

收稿日期: 2013-09-03

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金 ([2011]1139); 国家自然科学基金青年基金资助项目 (30801515)

作者简介: 黄 洋 (1987—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药药效物质基础及其质量评价方法研究。E-mail: hy1987615@163.com

*通信作者 李 康, 男, 教授, 研究方向为中药药效物质基础及其质量评价方法研究。E-mail: likang229@aliyun.com

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪, 包括 G1322A 在线真空脱气装置、G1311A 四元泵、G1314B 检测器、Agilent 化学色谱工作站 (美国安捷伦科技有限公司)、中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A (国家药典委员会); HH—S 型恒温水浴锅 (巩义市予华仪器有限公司)、离心机 (Thermo Electron Corporation)、AUW220D 型十万分之一电子天平 (日本岛津公司)、涡旋混合器 (天津药典标准仪器厂制造)、电热套 (海宁市新华医疗器械厂)、旋转蒸发器 (巩义市英峪高科仪器厂)。水为超纯水; 甲醇、乙腈为色谱纯; 磷酸为分析纯。

1.2 药材

小叶榕新鲜叶子采自广州大学城穗石村, 经广东药学院中药学院生药学教研室刘基柱教授鉴定为桑科榕属植物榕树 *Ficus microcarpa* L. f. 的叶, 从 2012 年 1~12 月, 每月采收 1 批小试样品, 标号为 S₁~S₁₂。

1.3 对照品

苯甲酸、对羟基苯丙酸、紫丁香酸、对羟基苯乙酸、水杨酸、3, 5-二甲氧基-4-羟基-苯乙酮 (乙酰丁香酚, acetosyringone)、3, 5-二甲氧基-4-羟基苯甲酸 (丁香酸, syringic acid)、邻羟基苯丙酸、十五烷酸、2-羟基-3-甲基丁酸、对羟基苯甲酸仲丁酯均为本课题组从小叶榕叶水提取物中分离得到, 并经 IR、NMR 等技术鉴定其结构, 质量分数均大于 99.0%。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

由于小叶榕叶水提取物化学成分复杂, 在一张图谱上很难将所有的化学信息全部展示出来, 故本实验以对羟基苯甲酸仲丁酯为分界点将指纹图谱分为高极性和低极性 2 部分进行表达。

2.1.1 高极性指纹图谱色谱条件 Purospher® STAR C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), Guard 色谱柱: XB-C₁₈ (Welch Materials, 5 μm), 流动相为 0.2%磷酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱 0~20 min, 95% B; 20~30 min, 95%~93% B; 30~70 min, 93% B; 70~100 min, 93%~90% B; 100~110 min, 90%~95% B。体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 270 nm; 柱温 35 °C; 进样量 20 μL。

2.1.2 低极性指纹图谱色谱条件 Purospher® STAR C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), Guard 色谱柱: XB-C₁₈ (Welch Materials, 5 μm), 流动相

为 0.2%磷酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~10 min, 25% B; 10~18 min, 25%~30% B; 18~25 min, 30%~50% B; 25~40 min, 50%~90% B; 40~50 min, 90%~25% B; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 290 nm; 柱温 35 °C; 进样量 20 μL。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取苯甲酸 3.1 mg、对羟基苯丙酸 2.2 mg、3, 5-二甲氧基-4-羟基苯甲酸 2.1 mg、对羟基苯乙酸 2.2 mg、水杨酸 1.9 mg、3, 5-二甲氧基-4-羟基-苯乙酮 2.5 mg、邻羟基苯丙酸 3.4 mg、十五烷酸 2.3 mg、2-羟基-3-甲基丁酸 2.4 mg、对羟基苯甲酸仲丁酯 2.0 mg。用甲醇溶解后, 各定容至 2 mL。用 0.22 μm 微孔滤膜滤过后, 取续滤液即得。

2.3 供试品溶液的制备

取阴干后小叶榕叶约 100 g, 剪碎后, 用水提取, 液料比 20:1, 回流提取 3 次, 每次 2 h, 浓缩至适当的相对密度后, 静置冷却。按部颁标准用 95%乙醇醇沉至含醇量为 80%~85%, 慢加快搅, 静置 24 h, 抽滤, 回收乙醇。加水形成悬浮液定容至 50 mL, 即母液浓度相当于生药量 2 g/mL, 取母液 1 mL, 加石油醚 3 mL, 涡旋 30 s, 连续萃取 3 次, 弃去上清液, 后加醋酸乙酯萃取 3 次, 取有机相, 自然挥干, 定容至 1 mL。用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一批小叶榕叶样品, 按“2.3”项下方法进行制备, 连续进样 5 次, 检测指纹图谱。结果各主要共有峰相对峰面积的 RSD 在 0.054%~2.45%, 相对保留时间的 RSD 在 0.018%~0.16%, 表明仪器精密度良好, 共有峰的相对保留时间和峰面积比值的 RSD 均符合指纹图谱检测要求^[7]。

2.4.2 重复性试验 取同一批小叶榕叶样品 5 份, 按“2.3”项下方法进行制备, 检测指纹图谱, 结果各主要共有峰相对峰面积的 RSD 在 0.8%~2.7%, 相对保留时间的 RSD 在 0.04%~0.44%, 表明方法重复性较好, 共有峰的相对保留时间和峰面积比值的 RSD 均符合指纹图谱检测要求^[7]。

2.4.3 稳定性试验 取同一批小叶榕叶样品, 按“2.3”项下方法进行制备, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 检测指纹图谱。结果各主要共有峰相对峰面积的 RSD 在 0.2%~2.97%, 相对保留时间的 RSD 在 0.09%~0.29%, 供试品溶液在 24 h 内稳定性良好, 表明共有峰的相对保留时间和峰面积比值的 RSD 均符合指纹图谱检测要求^[7]。

2.5 不同采收期小叶榕叶 HPLC 指纹图谱的建立

取不同采收期的 12 批小叶榕叶药材,按照“2.3”项下方法制备供试品溶液,记录色谱图,并利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A(国家药典委员会)对 12 批样品的图谱数据进行分析、比较,采用均值法,以 12 批样品的图谱生成对照图谱,结果见图 1 和图 2。以对照图谱为基准,对图谱间的相似度进行评价,见表 1。

2.6 不同采收期各化学成分量的变化

以 12 个月份的各样品共有峰的总峰面积作图,见图 3,比较数据结果可以看出,一年内各成分量较为稳定。但是各样品共有峰面积又有所不同。通过比较可以看出,小叶榕叶秋冬季节成分总量较高,可作为最适采收期参考。

2.7 指纹图谱及技术参数

2.7.1 共有峰的标定及部分共有峰的标识 按照“2.3”项下方法制备供试品溶液,记录色谱图,对其 HPLC 指纹图谱做初步考察,以 29 号峰对羟基苯甲酸仲丁酯作为参照峰将指纹图谱分为高极性和低极性两部分进行表达,初步确定了 44 个分离度较好且峰面积稳定的峰为共有峰。取各对照品溶液 20 μ L,分别注入高效液相色谱仪,其色谱图见图 4~7。结果确认了以下 10 个共有峰:苯甲酸、对羟基苯丙酸、3,5-二甲氧基-4-羟基苯甲酸、对羟基苯乙酸、水杨酸、3,5-二甲氧基-4-羟基-苯乙酮、邻羟基苯丙酸、十五烷酸、2-羟基-3-甲基丁酸、对羟基苯甲酸仲丁酯。

2.7.2 10 个化学成分在不同采收期的峰面积 小叶榕叶中各成分峰面积随着采收期的不同而不同,故对 10 个已鉴定出的化学成分进行追踪,判断出一

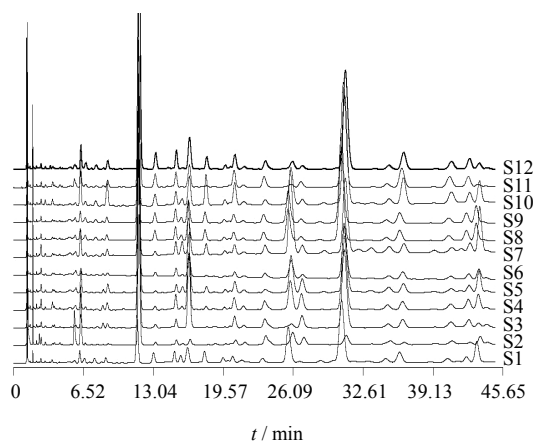


图 1 不同采收期小叶榕叶高极性部位 HPLC 色谱图
Fig. 1 Chromatogram of high polarity part for leaves of *F. microcarpa* from different harvest periods

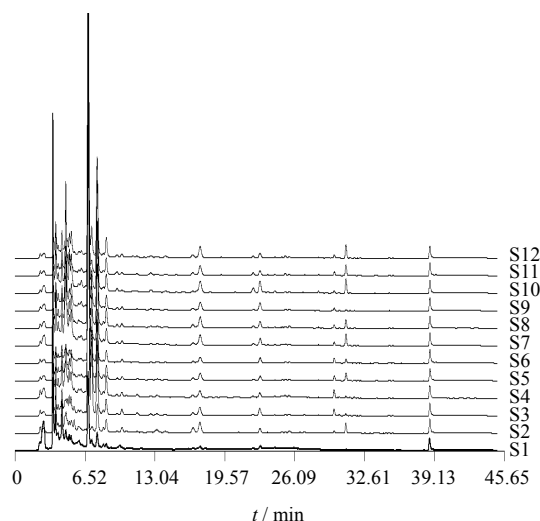


图 2 不同采收期小叶榕叶低极性部位 HPLC 色谱图
Fig. 2 HPLC of low polarity part for leaves of *F. microcarpa* from different harvest periods

表 1 12 批不同采收期小叶榕叶的相似度评价结果
Table 1 Similarity evaluation on 12 batches of leaves of *F. microcarpa* from different harvest periods

月份	相似度	月份	相似度
1	0.714	7	0.893
2	0.782	8	0.982
3	0.966	9	0.930
4	0.975	10	0.925
5	0.982	11	0.958
6	0.990	12	0.981

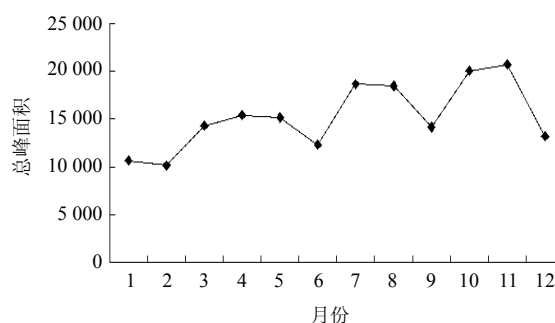


图 3 不同采收期各共有峰总峰面积的变化
Fig. 3 Changes of total peak area of each common peak of leaves of *F. microcarpa* from different harvest periods

年中这些化学成分的递变规律,为小叶榕药材的质量控制提供更多的化学信息参考,其结果见表 2。

3 讨论

在本实验条件下,大多数色谱峰都得到了较好地分离,12 批样品中 29 号峰(4-羟基苯甲酸仲丁酯)

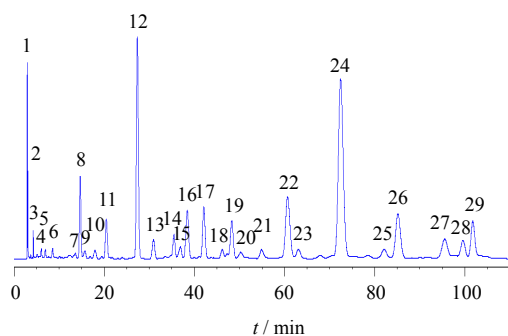
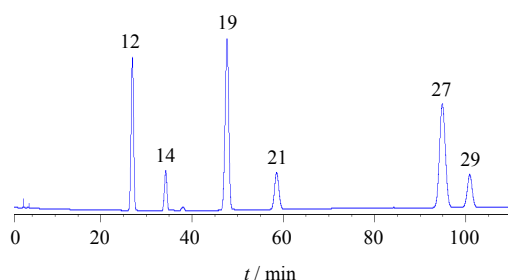


图4 高极性部分样品色谱图

Fig. 4 Chromatogram of high polarity part samples



12-邻羟基苯丙酸 14-对羟基苯乙酸 19-3, 5-二甲氧基-4-羟基苯甲酸 21-对羟基苯丙酸 27-苯甲酸 29-对羟基苯甲酸仲丁酯
12-3-(2-hydroxyphenyl) propanoic acid 14-4-hydroxyphenylacetic acid
19-syringic acid 21-*p*-hydroxybenzene propanoic acid 27-benzoic acid 29-*sec*-butyl-4-hydroxybenzoate

图5 高极性部分部分共有峰的标识色谱图

Fig. 5 Identification of common peaks from high polarity part

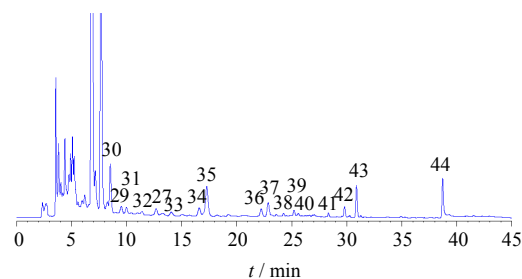
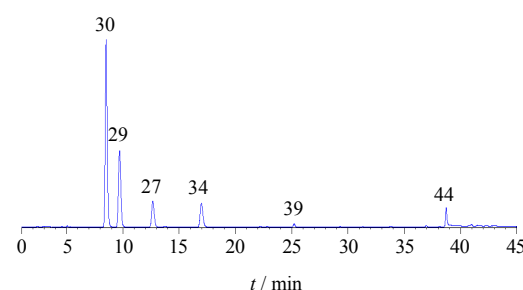


图6 低极性部分样品色谱图

Fig. 6 Chromatogram of low polarity part samples



27-苯甲酸 29-4-羟基苯甲酸仲丁酯 30-3, 5-二甲氧基-4-羟基苯乙酮 34-水杨酸 39-十五烷酸 44-2-羟基-3-甲基丁酸
27-benzoic acid 29-*sec*-butyl-4-hydroxybenzoate
30-salicylic acid 34-acetosyringone 39-pentadecylic acid 44-2-hydroxy-3-methylbutyric acid

图7 低极性部分部分共有峰的标识色谱图

Fig. 7 Identification of common peaks from low polarity part

表2 10个化学成分在不同采收期的峰面积

Table 2 Peak areas of 10 chemical constituents in leaves of *F. microcarpa* from different harvest periods

月份	峰面积									
	12号峰	14号峰	19号峰	21号峰	27号峰	29号峰	30号峰	34号峰	39号峰	44号峰
1	1 513.7	1 022.4	191.8	71.5	214.2	57.5	76.7	423.0	4.0	342.0
2	2 484.2	88.8	109.3	383.1	135.0	251.8	280.1	213.0	12.1	365.5
3	5 350.1	142.2	279.4	360.0	260.9	123.0	348.2	92.0	20.2	338.8
4	5 235.7	283.1	306.0	358.5	262.0	561.6	454.9	85.2	35.3	330.3
5	3 942.7	150.0	272.6	151.5	167.7	697.4	309.8	86.4	18.2	331.5
6	2 218.0	149.9	137.8	156.7	175.4	320.1	288.4	51.6	23.3	368.1
7	3 070.5	260.6	222.0	319.3	192.2	1 607.6	345.0	78.0	32.6	348.6
8	3 822.4	195.0	342.9	195.4	270.8	914.5	414.7	98.1	22.2	343.0
9	2 084.5	252.5	193.0	279.7	253.8	566.1	326.3	78.8	20.2	351.9
10	2 314.5	300.7	589.8	182.6	535.9	637.1	364.7	30.2	6.4	364.0
11	7 509.9	288.6	440.1	387.8	555.1	95.9	376.1	91.5	56.4	329.9
12	5 044.4	355.6	357.5	320.9	397.8	173.8	460.5	111.3	41.8	329.7

量较为稳定,与其他峰分离度较好,且出峰时间适中,适合作为参照峰。本实验方法重复性好,可信度高,可用于小叶榕叶的质量控制,与前人研究报道^[4,10]相比分离更加细致,得到44个共有峰,结果符合能够全面反映该中药整体化学特征,体现其内在的整体质量,而这无疑对小叶榕叶指纹图谱的研究具有一定参考。此外,通过考察1年当中各个时期小叶榕叶中共有峰成分的总量,结果发现,不同采收期对该药材化学成分的质量分数影响较大,秋冬季节采收最佳。

根据初步研究,共有峰的总面积约占总峰面积95%左右,非共有峰面积占总峰面积的量小于10%,该结果符合《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》标准。此外,采用均值法生成对照图谱,通过相似度软件评价发现,有9批样品的相似度均大于0.9,另外3批样品相似度位于0.7~0.9,说明小叶榕叶药材由于采收期的不同,其所含成分及质量分数虽然相对稳定,但还是存在一定的差异。文献报道小叶榕叶水提物中主要含黄酮类、三萜类、鞣质和酸性树脂等成分^[11],通过采用传统的硅胶柱色谱手段对小叶榕叶水提物中的化学成分进行分离鉴定,得到10个单体化学成分,结果发现其量较大的多为有机酸、酯类,未见黄酮类成分,故后期有待进一步分离研究。通过对小叶榕叶HPLC指纹图谱研究,初步完成了对其水提物指纹图谱的条件摸索和10个共有峰的标定。为小叶榕叶的采收、生产及用药过程中的质量控制提供了科学依据。

本实验采用二极管阵列检测器,通过对200~360 nm吸收与分离效果的考查,也是为了兼顾其他峰的吸收和反映药材化学成分的全貌,分别对前半部分指纹图谱和后半部分指纹图谱进行波长选择,结果以高、低极性部位吸收波长分别为270 nm和290 nm时最佳。此外,由于小叶榕中有机酸成分较多,在流动相系统的选择中,分别以乙腈-0.1%磷酸、乙腈-0.2%磷酸、乙腈-水-冰醋酸、甲醇-0.2%

磷酸、乙腈-甲醇-0.2%磷酸等不同体积分数、不同比例的流动相系统进行等度和梯度洗脱实验。结果表明,用乙腈-0.2%磷酸进行梯度洗脱为佳,此条件下各峰的保留时间适中,基线较平稳,有利于指纹图谱的分析。

本研究方法建立的HPLC指纹图谱可快速鉴别小叶榕叶药材及其最佳的采收期,通过指纹图谱对小叶榕叶药材进行综合宏观分析,有利于全面控制药材质量,促进小叶榕叶药材及其相关制剂研制水平和质量控制的全面提高。

参考文献

- [1] 陈露,蓝鸣生,王硕.小叶榕不同提取物的主要药效学研究[J].广西植物,2009,29(6):871-874.
- [2] 刘力恒,王立升,王天文,等.小叶榕化学成分及药理活性的研究进展[J].时珍国医国药,2008,19(2):390-392.
- [3] 戴臻,李书渊,房志坚,等.HPLC法测定不同采收期小叶榕叶中异牡荆苷的含量[J].广东药学院学报,2008,24(3):231-235.
- [4] 房志坚,戴臻,李书渊.小叶榕叶HPLC指纹图谱的研究[J].中药材,2008,31(10):1485-1489.
- [5] 黄立兰,程文胜,陈耀娣,等.人参指纹图谱的研究进展[J].中草药,2013,44(2):241-246.
- [6] 高新彪,孙磊,乔善义,等.牡丹皮HPLC指纹图谱研究[J].中草药,2013,44(7):900-904.
- [7] 罗文,王伟,石任兵,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.
- [8] 马丽娜,张岩,陶遵威.色谱分析技术在中药指纹图谱研究中的应用[J].药物评价研究,2012,35(1):58-62.
- [9] 蔡宝昌,刘训红.常用中药材HPLC指纹图谱测定技术[M].北京:化学工业出版社,2005.
- [10] 赖毅勤,刘峰,周宏兵,等.小叶榕叶水提物浸膏的HPLC指纹图谱初步研究[J].广东药学院学报,2008,24(1):6-8.
- [11] 韦锦斌,黄仁彬,林军,等.小叶榕水提物和醇提物止咳平喘作用的比较研究[J].广西中医药,2006,29(4):58-59.