

河北不同产地葎草 HPLC 特征图谱对比研究

何燕宁^{1,2}, 赵引利^{1,2}, 杨冬丽^{2,3}, 张东阁^{2,3}, 王春民^{2,3*}

1. 承德医学院中药研究所, 河北 承德 067000
2. 颈复康药业集团有限公司, 河北 承德 067000
3. 河北省中药新辅料工程技术研究中心, 河北 承德 067000

摘要: 目的 建立并比较河北省不同产地葎草 *Humulus scandens* 的 HPLC 特征图谱。方法 色谱柱为 Agilent 5 TC-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.2%磷酸水溶液; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 340 nm; 柱温 25 °C; 进样量 10 μL。收集河北省不同产地 11 批葎草药材进行测定, 建立 11 批药材的特征图谱, 并利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004版)》对 11 批样品的相似度进行评价。结果 从葎草药材特征图谱中分析得出 9 个共有峰, 其中 7 号峰为木犀草苷, 8 号峰为芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷。经分析, 其中 7 批药材的相似度 0.900 以上, 4 批药材的相似度在 0.900 以下。结论 该方法简便、准确、重复性好, 可为有效控制葎草药材的内在质量标准提供科学依据。

关键词: 葎草; 特征图谱; 木犀草苷; 芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷; HPLC

中图分类号: R286.022 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)10-1775-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.10.024

Comparative study on HPLC characteristic spectra of *Humuli Scandentis Herba* from different habitats in Hebei province

HE Yan-ning^{1,2}, ZHAO Yin-li^{1,2}, YANG Dong-li^{2,3}, ZHANG Dong-ge^{2,3}, WANG Chun-min^{2,3}

1. Institute of Traditional Chinese Medicine, Chengde Medical University, Chengde 067000, China
2. Jingfukang Pharmaceutical Group, Chengde City in Hebei Province, Chengde 067000, China
3. The New Excipients of Traditional Chinese Medicine Engineering Research Center of Hebei Province, Chengde 067000, China

Abstract: Objective To establish and compare the HPLC characteristic spectra of *Humuli Scandentis Herba* from different habitats in Hebei province. **Methods** HPLC was performed on Agilent 5 TC-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column, with the mobile phase of acetonitrile -0.2% phosphoric acid at flow rate of 1.0 mL/min; Detection wavelength was 340 nm; The column temperature was 25 °C and the sample size was 10 μL. Eleven batches of *Humuli Scandentis Herba* samples from different habitats in Hebei province were determined and the characteristic spectra of those were established. The fingerprint evaluation software (2004 edition) for Chinese materia medica (CMM) was used to evaluate the similarity of the 11 batches of samples. **Results** There were nine characteristic peaks identified in the characteristic spectra of *Humuli Scandentis Herba* samples. Peak 7 was luteoloside and Peak 8 was apigenin-7-O-β-D-glucosidase. The similarities of seven batches of *Humuli Scandentis Herba* samples were proved to be higher than 0.900 and four batches of them were proved to be less than 0.900. **Conclusion** The method is simple, accurate, and reproducible, and can provide the scientific evidence for controlling the internal quality standards effectively.

Key words: *Humuli Scandentis Herba*; characteristic spectrum; luteoloside; apigenin-7-O-β-D-glucosidase; HPLC

葎草 *Humuli Scandentis Herba* 为桑科 (Moraceae) 葎草属 *Humulus* L. 植物葎草 *Humulus scandens* (Lour.) Merr. 的干燥地上部分, 广泛分布于我国大部分地区, 别名拉拉秧、锯子草、五爪龙等, 始载于《唐本草》, 具有清热解毒、利尿通淋的

功效, 主治肺热咳嗽、肺痈、肺结核、虚热烦渴、热淋、水肿、小便不利、湿热泻痢、热毒疮疡、皮肤瘙痒等症^[1-2]。现代医学研究表明, 葎草具有治疗肺结核潮热、肠胃炎、痢疾、肾盂肾炎及外用治疗毒蛇咬伤等功效和作用, 因此它对人体的作用范围

收稿日期: 2016-03-15

作者简介: 何燕宁 (1988—), 女, 河北邯郸人, 2013 级中药学在读硕士, 研究方向为中药材质量标准。

*通信作者 王春民 (1968—), 男, 河北承德人, 硕士, 主任中药师, 主要研究方向为中药的新技术与新应用。

十分广泛, 有较高的药用价值^[3]。葎草主要含有黄酮类、萜类, 挥发油类及甾体等化合物^[4-5], 其中黄酮类化合物是从葎草中分离出的量较高的成分。目前所检测到有关葎草的文献大多是对其进行测定^[6-7]。为确保和控制葎草药材质量的稳定性, 本实验对 11 批河北省不同地区的葎草药材进行了特征图谱分析和相似度的计算, 不同产地葎草药材特征峰之间存在差异, 表明其所含成分的量不尽相同, 该方法能够从整体上控制葎草药材的质量, 达到鉴别真伪、评定药材优劣的目的, 为葎草药材的质量控制提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱 (HPLC) 系统 (美国), 配置 G1311C 1260 Quat Pump VL、G1315D 1260 DAD VL、G1316A 1260 TCC、G1329B 1260 ALS、安捷伦化学工作站 B.04.03 DSP1 版本; 十万分之一电子分析天平。

1.2 试剂

木犀草苷购自中国食品药品检定研究院, 批号 111720-201408, 质量分数为 94.9%, 芹菜素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷 (成都普菲德生物技术有限公司, 批号 140528, 质量分数 $\geq 98\%$)。水为 Milli-Q 超纯水, 甲醇为色谱纯试剂, 其他试剂均为分析纯。

1.3 药材

所有药材样品经过本所王春民主任中药师鉴定均为桑科植物葎草 *Humulus scandens* (Lour.) Merr. 的干燥地上部分, 样品来源见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

采用 Agilent 5 TC-C₁₈ (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱, 以乙腈 (A) -0.2% 磷酸水溶液 (B) 为流动相梯度洗脱, 梯度洗脱程序见表 2; 波长 340 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 进样量 10 μ L。在上述色谱条件下, 理论塔板数以木犀草苷计, 不低于 10 000, 分离度大于 1.5。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 精密称取木犀草苷、芹菜素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷对照品适量, 置 50、10 棕色量瓶中, 木犀草苷以 70% 甲醇溶解并定容至刻度, 芹菜素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 得质量浓度分别为 185.6、151.0

表 1 样品来源

Table 1 Sources of Samples

编号	产地	批号
S1	邯郸	LCHD20150707
S2	邢台	LCXT20150827
S3	衡水	LCHS20150826
S4	石家庄	LVSJZ20150828
S5	沧州	LVCZ20150826
S6	保定	LCBD20150821
S7	廊坊	LCLF20150826
S8	唐山	LCTS20150825
S9	秦皇岛	LCQHD20150825
S10	张家口	LCZJK20150820
S11	承德	LVCD20150810

表 2 梯度洗脱程序

Table 2 Gradient elution programs

时间/min	A/%	B/%
0	7	93
10	13	87
38	17	83
40	15	85
60	19	81
65	20	80
75	35	65
80	7	93
85	7	93

mg/mL 的木犀草苷、芹菜素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷对照品储备液溶液。再各取 2 种储备液适量, 用甲醇稀释并定容, 得含木犀草苷、芹菜素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷分别为 37.12、15.10 μ g/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取葎草药材细粉 (过 5 号筛) 约 1.5 g, 精密称定, 置平底烧瓶中, 精密加入 70% 甲醇 30 mL, 称定质量, 于 85 $^{\circ}$ C 水浴回流 1 h, 冷却至室温, 再称定质量, 并用 70% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.3 参照峰的选择

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液和供试品溶液各 10 μ L, 注入 HPLC 仪, 进行测定, 记录色谱图, 见图 1。葎草药材经“2.1”项下色谱条件分析后出现多个色谱峰, 以木犀草苷 (S) 作为参照峰。

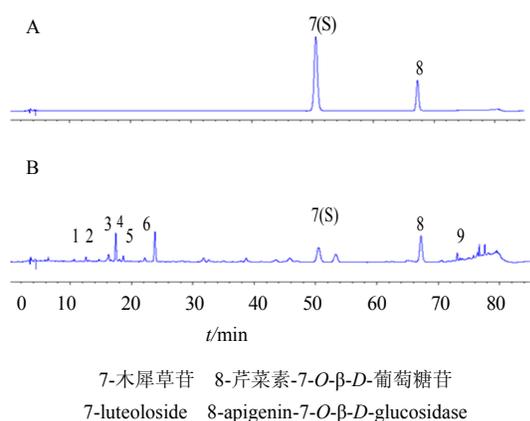


图1 混合对照品 (A) 和葎草药材 (B) HPLC 图

Fig. 1 HPLC of *H. scandens* of mixed reference substances (A) and *Humuli Scandentis Herba* (B)

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 精密吸取 S7 样品供试品溶液 10 μL, 按“2.1”项下色谱条件, 连续进样 6 次, 记录色谱图, 以 7 号峰为参照峰, 其保留时间和峰面积为 1, 计算出 9 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 值均小于 3%, 结果表明, 仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 精密吸取 S7 样品供试品溶液 10 μL, 按“2.1”项下色谱条件, 于 0、3、6、9、12 h 进样测定, 记录色谱图, 以 7 号峰为参照峰, 其保留时间和峰面积为 1, 计算出 9 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 值均小于 3%, 结果表明, 供试品溶液 12 h 内稳定。

2.4.3 重复性试验 取 S7 样品供试品溶液 6 份, 每份精密吸取 10 μL, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 以 7 号峰为参照峰, 其保留时间和峰面积为 1, 计算出 9 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 值均小于 3%, 结果表明, 重复性好。

2.5 河北省不同产地葎草药材特征图谱的建立及评价

取 11 批河北省不同产地的葎草药材各适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图。根据 11 批样品特征图谱的特点, 确定 9 个峰作为共有峰, 并标定了其中 9 个色谱峰, 其中 7 号峰为木犀草苷, 8 号峰为芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷, 7 号峰分离度较好, 保留时间适宜, 因此可作为参照峰, 将各批葎草药材的特征图谱信号导入国家药典委员会颁布

的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 版)》, 计算生成对照特征图谱, 11 批药材特征图谱的共有模式详见图 2, 并计算对照图谱和 11 批样品图谱之间的相似度数据, 相似度计算结果见表 3。相似度在 0.900 以上的, 认为相似度较高, 可归为一类; 相似度在 0.900 以下的, 认为相似度较低, 可归为一类。结果发现, S3、S5、S7、S8、S9、S10、S11 相似度在 0.900 以上, 即衡水、沧州、廊坊、唐山、秦皇岛、张家口、承德的葎草药材相似度较高, 归为一类, 编号为 S1、S2、S4、S6 相似度均小于 0.900, 即邯郸, 邢台, 石家庄, 保定的葎草药材相似度较低, 归为一类。

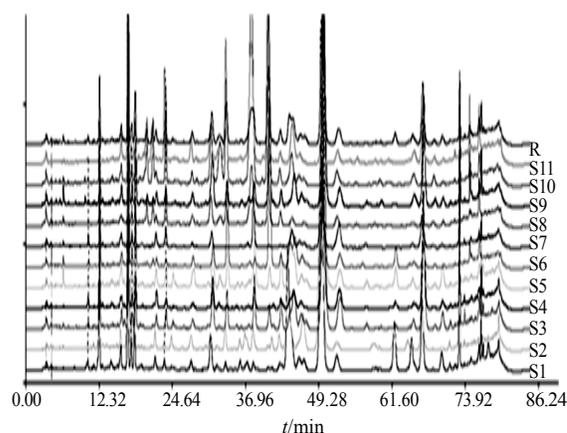


图2 11 批葎草药材的特征图谱

Fig. 2 Fingerprint of 11 batches of *Humuli Scandentis Herba*

表3 11 批药材 HPLC 特征图谱相似度分析结果

Table 3 Analysis on similarities of HPLC characteristic spectra of 11 batches of samples

样品编号	相似度	样品编号	相似度
S1	0.784	S7	0.993
S2	0.338	S8	0.995
S3	0.975	S9	0.951
S4	0.604	S10	0.987
S5	0.989	S11	0.966
S6	0.895		

2.6 聚类分析

应用 SPSS 19.0 统计软件对 11 批葎草药材样品进行聚类分析, 采用 Ward 法, 利用 Euclidean 距离测量技术, 聚类分析结果见图 3。由图 3 可知, 以距离 5 划分, 11 批葎草药材样品可分为 2 大类, S1、S2、S4、S6 为第 1 类, S3、S5、S7、S8、S9、S10、S11 为第 2 类, 与上述相似度结果一致。

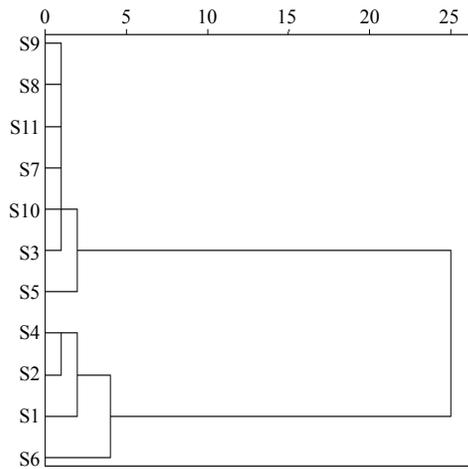


图 3 11 批葎草聚类分析结果

Fig. 3 Cluster analysis of 11 batches of *Humuli Scandentis Herba*

3 讨论

3.1 提取条件的选择

前期在提取方法选择过程中考察了加热回流提取^[8-10]、酸水解法^[11-13]、超声提取法^[14]及石油醚脱脂法^[15-19]，结果加热回流提取法可使大部分峰在色谱图中真实体现，接着又考察了甲醇的体积分数、用量、回流时间和回流次数的影响，结果方法确定为 70% 甲醇 30 mL 回流提取 1 h 1 次。

3.2 检测波长的选择

对葎草药材 70% 甲醇提取液、木犀草苷和芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷对照品溶液分别进行紫外全波长扫描，结果 3 种溶液在 340 nm 波长处均有较大吸收，且在该波长下色谱峰较多。因此选择 340 nm 作为测定波长。

3.3 色谱柱的选择

实验过程中比较了 Agilent 5 TC-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)，Brownlee Validated C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)，Kromasil 0.1 nm C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。通过比较，本实验研究予以采用 Agilent 5 TC-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)，该色谱柱能较好地将葎草药材中多种成分分离，且峰形较好，因此，可用于葎草药材特征图谱的测定。

3.4 流动相系统的选择

实验中对比了甲醇-0.2% 磷酸水溶液、乙腈-0.2% 磷酸水溶液等流动相系统，考察了该流动相等浓度洗脱、多种梯度洗脱方式，以甲醇-0.2% 磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱，特征峰出现的时间较晚，且峰形稍有拖尾，而以乙腈-0.2% 磷酸水溶液为最后

流动相系统可以看出谱图特征峰出现时间适宜，且峰形明显较好，分离度好，基线漂移小，因此以乙腈-0.2% 磷酸水溶液为最后流动相系统。

综上所述，本实验对河北省不同产地的 11 批葎草药材进行了特征图谱研究，通过国家药典委员会颁布的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004 版)》，得到葎草药材的对照特征图谱，以及 11 批药材对于对照特征图谱的相似度。相似度在 0.900 以上认为相似度较高，可归为一类；相似度在 0.900 以下的，认为相似度较低，归为一类。结果发现，编号为 S3、S4、S5、S7、S8、S9、S10、S11 的葎草药材相似度均在 0.900 以上，即衡水、沧州、廊坊、唐山、秦皇岛、张家口、承德的葎草药材相似度较高，归为一类，编号为 S1、S2、S4、S6 葎草药材相似度均在 0.900 以下，即邯郸、邢台、石家庄、保定的葎草药材相似度相似度较低，归为一类，且聚类分析的分析结果与相似度的分析结果一致，说明河北省不同产地葎草药材相似度存在差异，可能与地理位置、环境、气候等自然条件相差较大有关，提示葎草药材采收应考虑产地因素。本研究采用 HPLC 色谱法，建立的葎草药材特征图谱分析方法简便、准确、重复性好，为有效地控制葎草药材的内在质量标准提供科学依据。

参考文献

- [1] 候宽昭. 中国种子植物科属词典 [M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 23 卷, 第 1 分册) [M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [3] 中国药材公司. 中国中药资源志要 [M]. 北京: 北京科学出版社, 1994.
- [4] 尹海波, 王颖, 郑太坤, 等. 中国葎草属植物的研究进展 [J]. 辽宁中医学院学报, 2001, 3(1): 60.
- [5] 曹运记, 李天磊, 潘卫东, 等. 葎草化学成分研究 [J]. 中草药, 2011, 42(9): 1692-1695.
- [6] 卢静华, 彭纓, 董自艳, 等. 不同产地连翘药材的高效液相色谱特征图谱研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(19): 1625-1628.
- [7] 吴立宏, 朱恩圆, 张紫佳, 等. 广西产丁公藤原植物的调查及商品丁公藤主流品种的鉴定 [J]. 中草药, 2005, 36(9): 1398-1400.
- [8] 喻微, 赵留存, 吴家红, 等. HPLC 法测定黔今葎草中木犀草苷的含量 [J]. 贵阳中医学院学报, 2014, 36(5): 38-41.
- [9] 邹素华, 刘太宇. 葎草不同生长月份营养成分及总黄

- 酮含量的动态变化 [J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(5): 21-24.
- [10] 丁勇, 王新风, 杨芳. 葎草的黄酮含量测定及抗氧化性研究 [J]. 江苏中医药, 2009, 41(2): 55-57.
- [11] 韩炜, 杨玉林, 康廷国. HPLC 法测定红花地上部分中木犀草苷和木犀草素的含量 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(6): 1315-1317.
- [12] 曹伟国, 陶燕铎, 张丹, 等. 葎草中总黄酮与木犀草素含量的季节动态变化 [J]. 西北林学院学报, 2010, 25(6): 134-137.
- [13] 张丹, 曹伟国, 王刚. 西南地区不同居群葎草中总黄酮与木犀草素的含量分析 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(8): 1934-1936.
- [14] 陈伟光, 盛静. 葎草叶总黄酮的测定及最佳采收期研究 [J]. 中草药, 2008, 39(1): 120-122.
- [15] 陈再兴, 孟舒, 朱旭, 等. 葎草不同部位中木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷和大波斯菊苷的含量测定 [J]. 中国药事, 2011, 25(6): 547-549.
- [16] 陈再兴, 陈佳琪, 朱旭, 等. 不同季节葎草中木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷和大波斯菊苷的含量测定 [J]. 天津中医药, 2010, 27(1): 74-76.
- [17] 芦金清, 裴学军, 吕翼. 聚酰胺薄层扫描法测定金菊花中木犀草素的含量 [J]. 湖北中医学院学报, 2002, 4(1): 27-28.
- [18] 石秀梅, 刘璇, 刘佳维. 葎草不同部位总黄酮含量的测定 [J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(11): 2545-2546.
- [19] 孟晓岩, 丁勇. 沈阳北陵地区葎草不同部位总黄酮含量考察 [J]. 实用药物与临床, 2012, 15(5): 288-289.