

女贞子 HPLC 指纹图谱及多指标成分测定

许 浚^{1,2}, 游飞祥¹, 袁雪海³, 韩彦琪², 龚苏晓², 张洪兵², 张铁军^{2*}, 张艳军^{1*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院, 天津 300193

3. 天津中新药业集团股份有限公司隆顺裕制药厂, 天津 300457

摘要: **目的** 建立女贞子 HPLC 指纹图谱及多指标成分测定方法, 为女贞子质量标准提升提供参考。**方法** 采用 HPLC 法, 以乙腈-0.1%甲酸水溶液梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 224 nm, 建立女贞子指纹图谱, 采用 HPLC-Q/TOF-MS^E 指认共有峰, 并同时测定红景天苷、松果菊苷、特女贞苷、橄榄苦苷 4 种成分的量。**结果** 建立了女贞子的 HPLC 指纹图谱, 标定了 14 个共有峰, 指认出其中 12 个色谱峰, 10 批样品相似度在 0.994~1.000; 红景天苷、松果菊苷、特女贞苷、橄榄苦苷 4 个被测组分均达到基线分离, 在线性范围内具有良好的线性关系, r 均大于 0.990, 平均回收率分别为 97.40%、98.99%、97.03% 和 100.55%。**结论** 该方法准确可靠, 重复性好, 可有效地控制和评价女贞子的质量。

关键词: 女贞子; 质量控制; 指纹图谱; 红景天苷; 松果菊苷; 特女贞苷; 橄榄苦苷

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)20-4198-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.20.011

HPLC fingerprint and multi-component content determination of *Ligustri lucidi Fructus*

XU Jun^{1,2}, YOU Fei-xiang¹, YUAN Xue-hai³, HAN Yan-qi², GONG Su-xiao², ZHANG Hong-bing²,
ZHANG Tie-jun², ZHANG Yan-jun¹

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. Tianjin Zhongxin Pharmaceutical Group Co., Ltd., Longshunrong Pharmaceutical Factory, Tianjin 300457, China

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint method for simultaneous determination of four representative components (salidroside, echinacoside, specnuezhenide and oleuropein) of *Ligustri Lucidi Fructus*, so as to provide a reference for the quality control. **Methods** The method was performed on an Diamonsil C₁₈ analytical column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) at the column temperature of 30 °C. The gradient mobile phase consisted of acetonitrile (A)-0.1% formic acid (B) with a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelengths were 224 nm. HPLC-Q/TOF-MS were used for identifying the common peaks. **Results** By studying comparatively the fingerprints of 11 samples, 14 common peaks have been confirmed. There were 12 common peaks were identified by HPLC-Q/TOF-MS^E. The similarity of 10 batches are greater than 0.990. Salidroside, echinacoside, specnuezhenide and oleuropein were baseline separated with good linearity relationships ($r > 0.999$) between concentration and peak areas over the linear ranges. The average recoveries of the investigated compounds were 97.40%, 98.99%, 97.03%, and 100.55%, respectively. **Conclusion** The method is accurate, reliable and with good reproducibility. It could be used for quality control and evaluation of *Ligustri Lucidi Fructus*.

Key words: *Ligustri Lucidi Fructus*; quality control; fingerprint; salidroside; echinacoside; specnuezhenide; oleuropein

女贞子为木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的干燥成熟果实, 冬季果实成熟时采收, 除去枝叶, 稍蒸或置沸水中略烫后, 干燥; 或直接干燥。

具有滋补肝肾、明目乌发的功效, 主要用于治疗肝肾阴虚、眩晕耳鸣、腰膝酸软、须发早白、目暗不明、内热消渴、骨蒸潮热^[1]。女贞子始载于《神农

收稿日期: 2017-08-23

作者简介: 许 浚 (1976—), 男, 副研究员, 硕士, 主要从事中药新药研发和大品种二次开发研究。Tel: (022)23003935 E-mail: xuj@tjipr.com

*通信作者 张铁军 Tel: (022)23006848 E-mail: zhangtj@tjipr.com

张艳军 E-mail: zyjsunye@163.com

本草经》，列为上品，历代本草及《中国药典》(1963～2015 年版) 均有记载。现代研究表明，女贞子中主要含有环烯醚萜类、苯乙醇苷类等化合物。其中环烯醚萜苷具有保肝利胆、抗肝纤维化、抗菌消炎、抗肿瘤、调血脂、降血糖、免疫调节等多种活性，红景天苷有抗疲劳、抗衰老、免疫调节、清除自由基等多种作用^[2-6]。女贞子现行标准收载于《中国药典》2015 年版一部，包括性状鉴定、显微鉴别、薄层色谱鉴别以及特女贞苷的定量测定^[1]，现行质量标准存在着质控指标单一，难以有效控制产品质量等问题。采用指纹图谱技术并结合多成分测定，可从整体上控制产品质量^[7-9]。

本实验收集了 11 批大生产投料用女贞子，建立了其 HPLC 指纹图谱，采用 HPLC-Q/TOF-MS^E 指认共有峰，并同时定量测定红景天苷、松果菊苷、特女贞苷、橄榄苦苷 4 种成分的量。所建立的质量控制方法可同时从定性和定量 2 方面控制女贞子饮片的质量，为女贞子饮片的质量标准完善提供实验参考。

1 仪器与材料

Agilent 1260 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司)，micrOTOF-Q II 质谱仪 (德国 Bruker 公司)，AB204-N 电子天平 (十万分之一，瑞士 METELER 公司)，BT25S 电子天平 (万分之一，德国 Sartorius 公司)，超声波清洗仪 (宁波新芝生物科技公司)。

红景天苷 (批号 110818-201507)、特女贞苷 (批号 111926-201404) 购自中国食品药品检定研究院，质量分数大于 98%；松果菊苷 (批号 MUST-16032701)、橄榄苦苷 (批号 MUST-16052512) 购自成都曼思特生物科技有限公司，质量分数大于 98%。乙腈 (色谱纯，德国 Merck 公司)，甲酸 (分析纯，美国 Fisher 公司)，纯净水 (广州屈臣氏有限公司)。11 批女贞子饮片 (批号 Y901～Y911) 均由天津中新药业集团股份有限公司隆顺裕制药厂提供，由天津药物研究院张铁军研究员鉴定为木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的干燥成熟果实。

2 方法与结果

2.1 色谱和质谱条件

2.1.1 色谱条件 迪马 Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱。流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B)，梯度洗脱，0～5 min，10% B；5～20 min，10%～20% B；20～50 min，20%～33% B；50～55 min，33%～100% B；55～60 min，100% B。体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 224 nm；进样量 10

μL。结果各成分色谱峰与相邻峰的分离度均大于 1.5，理论塔板数按特女贞苷计算不低于 4 000。对照品和供试品色谱图见图 1。

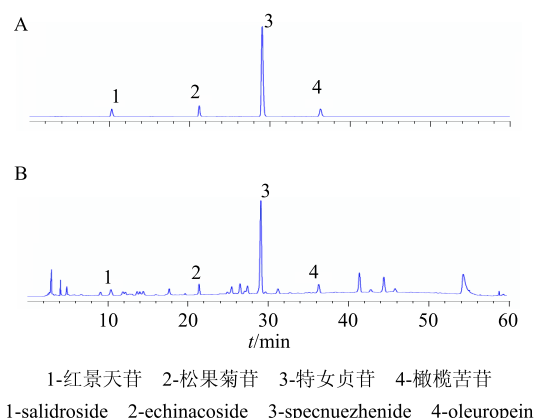


图 1 混合对照品 (A) 及女贞子供试品 (B) HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC of reference substance (A) and *Ligustri Lucidi Fructus* (B)

2.1.2 质谱条件 采用电喷雾离子源；V 模式；毛细管电压正模式 3.0 kV、负模式 2.5 kV；锥孔电压 30 V；离子源温度 110 ℃；脱溶剂气温度 350 ℃；脱溶剂氮气流量 600 L/h；锥孔气流量 50 L/h；检测器电压正模式 1 900 V，负模式 2 000 V；采样频率 0.1 s，间隔 0.02 s；质量数检测范围 50～1 500；柱后分流，分流比为 1：5；内参校准液采用甲酸钠溶液。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液制备 取红景天苷、松果菊苷、特女贞苷、橄榄苦苷对照品适量，精密称定，加甲醇制成含红景天苷 0.058 mg/mL、松果菊苷 0.065 μg/mL、特女贞苷 0.680 mg/mL、橄榄苦苷 0.065 mg/mL 的混合对照品溶液，摇匀，即得。

2.2.2 供试品溶液制备 取女贞子粉末 (过 3 号筛) 1.0 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 70% 的甲醇 30 mL，称定质量，超声处理 30 min，放至室温，补足减失质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.3 指纹图谱的建立

2.3.1 精密度试验 取同一批女贞子饮片 (Y911)，按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，按照“2.1.1”项下色谱条件测定，连续进样 6 次，记录指纹图谱，以特女贞苷峰 (8 号峰) 的保留时间和色谱峰面积为参照，计算出各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。各共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%，符合指纹图谱的要求。

2.3.2 稳定性试验 取精密度试验项下同一供试品

溶液,按照“2.1.1”项下色谱条件,分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样测定,记录指纹图谱,以特女贞苷峰(8 号峰)的保留时间和色谱峰面积为参照,计算出各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%。

2.3.3 重复性试验 取同一批次女贞子饮片(Y911)6 份,按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按照“2.1.1”项下色谱条件测定,记录指纹图谱,以特女贞苷峰(8 号峰)的保留时间和色谱峰面积为参照,计算出各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。各共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%,符合指纹图谱的要求。

2.3.4 指纹图谱建立和相似度评价 按照“2.2.2”项下方法制备 11 批女贞子饮片供试品溶液,按照“2.1.1”项下色谱条件测定,得到 11 批女贞子 HPLC 指纹图谱(图 2)。将 11 批女贞子饮片的数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004A 版进行分析,以 Y901 为参照图谱,时间窗宽度为 0.5,采用多点校正后进行自动匹配后共得到 14 个共有峰,生成对照指纹图谱(图 3)。将 11 批女贞子样品与对照指纹图谱匹配,进行相似度评价,结果见表 1。

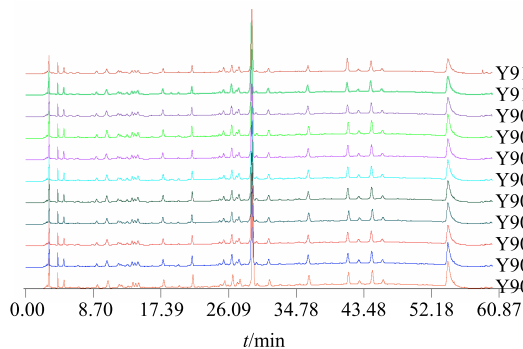
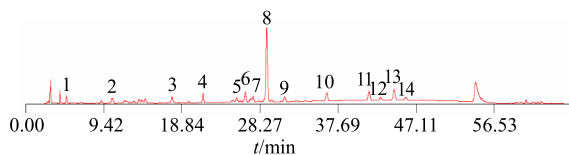


图 2 11 批女贞子 HPLC 指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprints of 11 batches of *Ligustri Lucidi Fructus*



2-红景天苷 3-木樨榄苷-11-甲酯 4-松果菊苷 5-新女贞苷 6-橄榄苦苷酸 7-女贞子苷 8-特女贞苷 9-异女贞子苷 10-橄榄苦苷 11-女贞苷 G13 12-女贞苷 13-oleonuezhenide
2-salidroside 3-oleoside-11-methyl ester 4-echinacoside 5-neonuezhenide 6-oleuropein acid 7-nuezhenide 8-specnuezhenide 9-isonuezhenide 10-oleuropein 11-privet glycosides G13 12-ligustroside 13-oleonuezhenide

图 3 女贞子对照指纹图谱

Fig. 3 Reference fingerprint of *Ligustri Lucidi Fructus*

表 1 11 批女贞子饮片相似度评价结果

Table 1 Similarity of HPLC fingerprint for 11 batches of *Ligustri Lucidi Fructus*

批号	相似度	批号	相似度
Y901	0.998	Y907	0.999
Y902	0.998	Y908	0.999
Y903	1.000	Y909	0.999
Y904	0.999	Y910	0.994
Y905	1.000	Y911	0.997
Y906	1.000		

各批女贞子饮片与对照指纹图谱间的相似度为 0.994~1.000,表明各批次饮片之间具有较好的一致性,本方法可用于综合评价女贞子饮片的整体质量。

2.3.5 共有色谱峰指认 依据对照品、文献质谱数据和色谱保留行为对女贞子 HPLC 指纹图谱中 14 个共有峰进行了指认(图 3),其中主要为环烯醚萜类和苯乙醇苷类成分。具体鉴定结果见表 2。

2.4 多指标成分测定研究

2.4.1 线性关系考察 精密吸取混合对照品储备液,分别制成 6 个不同质量浓度的溶液,依法测定。记录相应的峰面积,以峰面积积分值为纵坐标(Y),对照品质量为横坐标(X),绘制标准曲线并进行回归计算。4 个化合物的线性回归方程见表 3。

结果表明,红景天苷、松果菊苷、特女贞苷、橄榄苦苷 4 个化合物的浓度在线性范围内,与峰面积具有良好的线性关系。

2.4.2 精密度试验 取同一批次女贞子饮片(Y911),按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按照“2.1.1”项下色谱条件测定,连续进样 6 次。记录红景天苷、松果菊苷、特女贞苷、橄榄苦苷的色谱峰面积,计算峰面积 RSD,分别为 1.1%、2.1%、0.5%和 1.4%,表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 取精密度下的供试品溶液,密闭,放置于室温,分别在 0、3、6、9、12、24 h 时检测,记录红景天苷、松果菊苷、特女贞苷、橄榄苦苷 4 个化合物的色谱峰面积,计算峰面积 RSD,分别为 1.5%、1.6%、0.7%和 1.0%,表明供试品溶液在室温放置 24 h 内稳定性良好。

2.4.4 重复性试验 取同一批次女贞子饮片(Y911)粉末 6 份,分别按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按照“2.1.1”项下色谱条件测定。记录红景天苷、松果菊苷、特女贞苷、橄榄苦苷 4 个化合物

表 2 女贞子化学物质组鉴定信息表

Table 2 MS/MS data in positive and negative ESI modes and the identification results of *Ligustri Lucidi Fructus*

峰号	t_R/min	$[M-H]^-/[M+H]^+ (m/z)$	$MS^2 (ESI^-/ESI^+)$	化合物	分子式
1	4.92	315.121 1/—	260, 248, 135/291, 237, 196, 163, 135, 117	—	$C_{14}H_{20}O_8$
2	10.61	299.125 5/—	299, 208, 188/323, 200, 163	红景天苷*	$C_{14}H_{20}O_7$
3	17.81	403.143 7/—	807, 403, 371, 223/405, 225, 151	木樨榄苷-11-甲酯	$C_{17}H_{23}O_{11}$
4	21.56	785.294 8/—	623, 461, 392, 248, 161, /439, 325, 277, 163	松果菊苷*	$C_{35}H_{46}O_{20}$
5	25.67	701.267 3/—	612, 469, 423, 315, 252, 135/563, 531, 461, 339, 277, 165	新女贞苷 ^[10]	$C_{31}H_{42}O_{18}$
6	26.72	569.182 1/571.134 3	525, 389, 209/431, 377, 355, 273	橄榄苦苷酸 ^[11]	$C_{25}H_{30}O_{15}$
7	27.66	685.267 2/—	951, 685, 443/975, 701, 369, 225	女贞子苷 ^[11]	$C_{31}H_{42}O_{17}$
8	29.32	685.272 8/—	534, 461, 354, 305, 247, 223, 179, 153, 139, 113	特女贞苷 ^{*[10]}	$C_{31}H_{42}O_{17}$
9	31.47	685.265 8/—	411, 295, 223/547, 515, 323, 275	异女贞子苷 ^[12]	$C_{31}H_{42}O_{17}$
10	36.54	539.182 9/—	525, 389, 209/431, 377, 355, 273	橄榄苦苷 ^{*[10]}	$C_{25}H_{32}O_{13}$
11	41.64	1 071.406 5/—	1 117, 685, 523, 223/771, 547, 339, 165	女贞苷 G13 ^[12]	$C_{48}H_{64}O_{27}$
12	43.07	723.243 7/—	534, 461, 354, 305, 247, 179, 153	女贞苷 ^[12]	$C_{33}H_{40}O_{18}$
13	45.06	1 071.407 4/1 095.318 5	1 107, 1 135, /893, 875, 713, 593, 369, 225, 165	oleonuezhenide ^[12]	$C_{48}H_{64}O_{27}$
14	46.12	553.182 8/555.153 9	509, 347, 315, 245/433, 415, 383, 295, 263	—	$C_{25}H_{30}O_{14}$

*通过对照品确认

*confirmation by reference substance

表 3 4 种成分标准曲线

Table 3 Calibration curves for four constituents

成分	线性方程	R^2	线性范围/(mg·L ⁻¹)
红景天苷	$Y=633.83 X+106.14$	0.999 2	0.117~1.170
松果菊苷	$Y=416.15 X+177.33$	0.999 0	0.131~1.315
特女贞苷	$Y=984.39 X+872.03$	0.999 3	1.361~13.61
橄榄苦苷	$Y=1 205.5 X+12.076$	0.999 6	0.131~1.318

的色谱峰面积, 计算 4 个化合物的量, 并计算各化合物质量分数 RSD, 分别为 2.4%、2.5%、0.8%和 0.3%, 表明本方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验 取同一批女贞子饮片(Y911)粉末 6 份, 每份 0.5 g, 精密称定, 按样品中红景天苷、松果菊苷、特女贞苷、橄榄苦苷 4 个化合物测定量 100%加入相应的对照品, 分别按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.1.1”项下色谱条件测定。记录红景天苷、松果菊苷、特女贞苷、橄榄苦苷 4 个指标成分的色谱峰面积, 按“2.4.1”项计算 4 个指标成分的量, 并计算红景天苷、松果菊苷、特女贞苷、橄榄苦苷的加样回收率及 RSD, 平均回收率分别为 97.40%、98.99%、97.03%、100.55%, RSD 分别为 2.0%、2.9%、2.1%、2.8%。

2.4.6 样品的测定 分别取 11 批女贞子饮片粉末, 按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.1.1”

项下色谱条件测定, 计算样品中红景天苷、松果菊苷、特女贞苷、橄榄苦苷 4 个成分的量, 结果见表 4, 各指标成分质量分数累积加和图见图 4。

3 讨论

本实验考察了乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸水、乙腈-0.02%磷酸水、乙腈-0.1%甲酸水, 发现以乙腈-水为流动相时, 色谱峰拖尾严重; 流动相中加入磷酸或甲酸时, 色谱峰峰形较好, 分离度较高; 考虑

表 4 11 批女贞子定量测定结果

Table 4 Contents for 11 batches of *Ligustri Lucidi Fructus*

批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)			
	红景天苷	松果菊苷	特女贞苷	橄榄苦苷
Y901	0.40	0.46	3.08	0.40
Y902	0.34	0.42	2.68	0.37
Y903	0.33	0.33	2.52	0.30
Y904	0.30	0.31	2.47	0.34
Y905	0.34	0.36	2.80	0.34
Y906	0.33	0.33	2.56	0.33
Y907	0.31	0.31	2.59	0.34
Y908	0.42	0.42	3.07	0.35
Y909	0.30	0.31	2.40	0.33
Y910	0.30	0.29	2.54	0.31
Y911	0.25	0.28	2.24	0.24

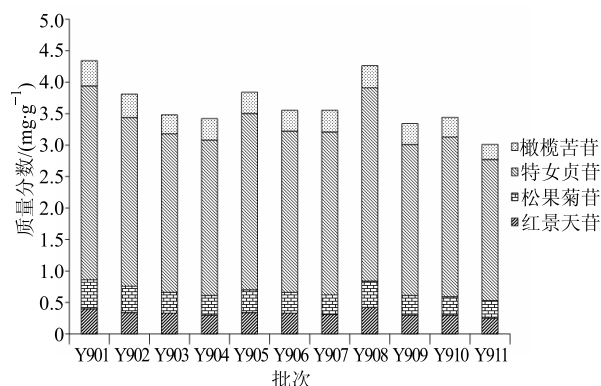


图 4 11 批女贞子饮片指标成分质量分数累积加和图

Fig. 4 Sum graph of contents of four constituents for 11 batches of *Ligustri Lucidi Fructus*

需要采用 HPLC-Q/TOF-MS^E 对指纹图谱共有峰进行归属, 最终选择乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相。

本实验使用 DAD 检测器分别对供试品和对照品进行了 200~400 nm 全波长扫描, 结果在 224 nm 下出峰个数较多, 同时各色谱峰的响应较高, 色谱峰分离良好, 特征峰明显且峰形较好, 故测定波长选择 224 nm。

本实验在分析条件筛选研究中对提取条件 (提取方式、溶剂种类、提取时间) 及其他色谱条件 (色谱柱、梯度洗脱程序) 均进行了优化, 最终建立的分析方法可见色谱峰数量明显增加, 峰形和拖尾均得到改善, 分离度好, 信息丰富且简单易行。

本实验采用 HPLC-Q/TOF-MS^E 对指纹图谱共有峰进行归属, 通过对离子模式、脱溶剂气温度、离子源温度及毛细管电压等质谱条件进行筛选, 确定了准分子离子峰及碎片离子峰响应值均较高的条件, 在该条件下, 研究 4 个对照品及样品多级质谱信息, 鉴定了 14 个共有峰中的 12 个峰。

女贞子的化学成分复杂, 仅以单一成分特女贞苷的量来控制女贞子药材质量较为片面, 药材中其他成分同样有可能对药材质量产生不同程度的影响。因此, 本研究建立了综合评价女贞子药材质量

的方法, 采用同一色谱条件测定指纹图谱的同时对女贞子药材中红景天苷、松果菊苷、特女贞苷、橄榄苦苷 4 种主要成分进行了测定。本研究建立的方法准确可靠, 重复性好, 可有效地控制和评价女贞子的质量, 为女贞子质量标准提升提供了参考。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 刘亭亭, 王 萌. 女贞子化学成分与药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(14): 228-234.
- [3] 张明发, 沈雅琴. 女贞子及其活性成分抗骨质疏松的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2014, 37(6): 566-571.
- [4] 郭鱼波, 马如风, 王丽丽, 等. 女贞子治疗骨质疏松作用及其机制的研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(5): 851-856.
- [5] 张明发, 沈雅琴. 女贞子抗炎、抗肿瘤和免疫调节作用的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(5): 536-542.
- [6] 孙雅文, 张明发, 沈雅琴. 女贞子及其活性成分降血糖、调血脂、抗肥胖作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(6): 1086-1091.
- [7] 刘 芳, 张 浩, 青琳森. 黄连 HPLC 数字化指纹图谱研究及 7 种生物碱含量测定 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(21): 3713-3719.
- [8] 胡益杰, 刘 爽, 邓丽娜, 等. 川木香药材 HPLC 指纹图谱及含量测定方法研究 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(11): 1946-1952.
- [9] 刘素香, 白 雪, 刘 毅, 等. 马鞭草 HPLC 指纹图谱建立及指标性成分的测定 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2069-2073.
- [10] Guo N, Yu Y, Ablajan K, et al. Seasonal variations in metabolite profiling of the fruits of *Ligustrum lucidum* Ait [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2011, 25(12): 1701-1714.
- [11] 占方玲, 张学兰, 蒋海强, 等. 女贞子生制品化学成分 HPLC-ESI/MS 分析 [J]. 中成药, 2013, 35(12): 2707-2710.
- [12] Fukuyama Y, Koshino K, Hasegawa T, et al. New secoiridoid glucosides from *Ligustrum japonicum* [J]. *Planta Med*, 1987, 53(5): 427-431.