

苦丁茶冬青 HPLC-DAD-ELSD 指纹图谱研究

倪帅帅^{1,2}, 焦安妮³, 冯琳琳^{2,3}, 于敏², 赵春芳³, 张晶¹, 焦连庆^{1,2*}

1. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

2. 吉林省中医药科学院, 吉林 长春 130012

3. 吉林大学药学院, 吉林 长春 130021

摘要: 目的 采用高效液相色谱-二极管阵列检测器-蒸发光检测器 (HPLC-DAD-ELSD) 联用技术, 建立苦丁茶冬青叶的指纹图谱。方法 岛津 C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-水为流动相进行梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 210 nm, 柱温 35 ℃。结果 通过 10 批苦丁茶冬青药材的指纹图谱, 建立了共有模式, 其中 HPLC-DAD 指纹图谱共有峰 18 个, 相似度为 0.911~0.970, HPLC-ELSD 指纹图谱共有峰 11 个, 相似度为 0.914~0.962。结论 方法精密度、重现性、稳定性好, 为客观评价苦丁茶冬青药材的质量提供了科学依据。

关键词: 苦丁茶冬青; 指纹图谱; 高效液相色谱法-二极管阵列检测器-蒸发光检测器; 多酚; 黄酮; 皂苷

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)23-5000-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.23.028

Study on HPLC-DAD-ELSD fingerprint of *Ilex kudingcha*

NI Shuai-shuai^{1,2}, JIAO An-ni³, FENG Lin-lin^{2,3}, YU Min², ZHAO Chun-fang³, ZHANG Jing¹, JIAO Lian-qing^{1,2}

1. Jinlin Agricultural University, Changchun 130118, China

2. Jinlin Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130012, China

3. College of Pharmacy Jilin University, Changchun 130021, China

Abstract: **Objective** In this paper, HPLC-DAD-ELSD technique was used to establish the chromatography fingerprint of *Ilex kudingcha*. **Methods** Shimadzu C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used. Acetonitrile-water as the mobile phase; The flow speed was 1.0 mL/min. The detection wavelength was 210 nm and the column temperature was 35 ℃. **Results** The chromatography fingerprint of *Ilex kudingcha* from 10 different origins was established. In the chromatography fingerprint with HPLC-DAD of *Ilex kudingcha*, 18 common peaks were damarcated and the similarities of *Ilex kudingcha* were between 0.911—0.970, and the chromatography fingerprint with HPLC-ELSD of *Ilex kudingcha*, 11 common peaks were damarcated and the similarities of *Ilex kudingcha* were between 0.914—0.962. Chlorogenic acid, kaempferol-3-O-β-D-rhamnoside, isorhamnetin-3-O-β-D-rhamnoside, kudioside C, kudioside A, kudioside E, kudioside D were confired by LC-MS and binding control. **Conclusion** The method of precision, reproducibility, stability is accurate, which can be used as the evaluation of the quality of *Ilex kudingcha*.

Key words: *Ilex kudingcha* C. J. Tseng; chromatography fingerprint; HPLC-DAD-ELSD; polyphenols; flavonoids; saponins

苦丁茶冬青 *Ilex kudingcha* C. J. Tseng 为冬青科冬青属乔木植物, 主产于广西、湖北、湖南、广东、海南等地, 是药食兼用的名贵珍品。苦丁茶冬青含有皂苷类、黄酮类、多酚类、多糖类、氨基酸类等多种化学成分^[1]。已有关于苦丁茶冬青指纹图谱研究报道^[2], 确认的成分仅为多酚类。本实验采用高

效液相色谱-二极管阵列检测器-蒸发光检测器 (HPLC-DAD-ELSD) 联用技术对苦丁茶冬青进行较为系统的指纹图谱分析, 对指纹图谱中黄酮及皂苷类化合物的分布特点进行了确认。本实验研究了 10 批苦丁茶冬青的 HPLC-DAD-ELSD 指纹图谱, 相似度均大于 0.90, 表明建立的指纹图谱方法准确、稳

收稿日期: 2017-04-19

基金项目: 吉林省科技发展规划 (20150311037YY); 吉林省卫生计生科研计划项目 (2014z206); 吉林省中医药科技项目 (2014-ZD28)

作者简介: 倪帅帅 (1991—), 男, 在读硕士, 研究方向为天然产物化学。Tel: 13596035372 E-mail: nss13596035372@163.com

*通信作者 焦连庆, 博士, 研究员, 天然药物研究与开发。E-mail: jiaolq2017@163.com

定,重复性好,为苦丁茶冬青药材的质量控制提供了科学依据。

1 仪器与材料

1.1 材料

10批苦丁茶冬青产地依次为海南(S1~S5)、广西(S6~S8)、贵州(S9~S10),经吉林省中医药科学院赵全成研究员鉴定为冬青科冬青属苦丁茶冬青 *Ilex kudingcha* C. J. Tseng 的干燥叶。

对照品山柰酚-3-*O*- β -D-芸香糖苷、异鼠李素-3-*O*- β -D-芸香糖苷、苦丁冬青皂苷C、苦丁冬青皂苷A、苦丁冬青皂苷E、苦丁冬青皂苷D均为实验室自制,经HPLC检测质量分数均大于98%、绿原酸(批号206-325-6,质量分数大于98%)购于中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯(TEDIA公司,美国),水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器

LC-20A型高效液相色谱仪,SPD-M20A二极管阵列检测器(岛津公司,日本);BT25S型十万分之一电子天平(Sartorius公司,德国);ELSD-2000蒸发光散射检测器(奥泰公司,美国);AS5150A型超声仪(奥特赛斯仪器有限公司);XWK-3A型空气发生器(天津市津分分析仪器制造有限公司);AK-400A粉碎机(温岭市奥力中药机械有限公司)。

2 方法

2.1 色谱条件

岛津C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m);流动相乙腈(A)-水(B),二元梯度洗脱:0~15 min, 15% A; 15~65 min, 15%~42% A。分析时间65 min, 体积流量1 mL/min, 柱温35 $^{\circ}$ C, 检测波长210 nm, 进样量20 μ L, 蒸发光检测器漂移管温度为110 $^{\circ}$ C, 载气体积流量3.2 L/min。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取绿原酸、山柰酚-3-*O*- β -D-芸香糖苷、异鼠李素-3-*O*- β -D-芸香糖苷、苦丁冬青皂苷C、苦丁冬青皂苷A、苦丁冬青皂苷E、苦丁冬青皂苷D对照品适量,用甲醇溶解、定容,制成质量浓度分别为177、156、20、970、188、866、220 μ g/mL的混合对照品,避光低温保存。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取1.0 g苦丁茶冬青药材粉末(过60目筛),定量转移至50 mL量瓶中,加入70%乙醇适量,超声提取1 h,加70%乙醇至刻度,摇匀,0.45 μ m滤膜滤过,即得。

2.4 HPLC-DAD-ELSD 指纹图谱的方法学考察

2.4.1 精密度试验 精密称取1.0 g苦丁茶冬青药材(S1)粉末,按“2.3”项所述方法制备供试品溶液,精密吸取苦丁茶冬青供试品溶液20 μ L,按照“2.1”项所述的色谱条件连续进样6次,统计并计算所得谱图保留时间及峰面积的RSD,结果显示,HPLC-DAD谱图的各主要色谱峰保留时间及峰面积的RSD分别在0.08%~0.39%、0.97%~2.71%,相似度均大于0.99,HPLC-ELSD谱图的各主要色谱峰保留时间及峰面积的RSD分别在0.07%~0.13%、0.33%~2.98%,相似度均大于0.99,精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 精密称取1.0 g苦丁茶冬青药材(S1)粉末,按“2.3”项所述方法制备供试品溶液,分别在0、2、4、8、16、24 h精密吸取苦丁茶冬青供试品溶液20 μ L,按照“2.1”项所述的色谱条件进样,统计并计算所得谱图保留时间及峰面积的RSD,结果显示,HPLC-DAD谱图的各主要色谱峰保留时间及峰面积的RSD分别在0.06%~0.73%、0.11%~2.87%,相似度均大于0.98,HPLC-ELSD谱图的各主要色谱峰保留时间及峰面积的RSD分别为0.07%~0.32%、0.34%~2.49%,相似度均大于0.99,样品在24 h内稳定。

2.4.3 重复性试验 精密称取1.0 g苦丁茶冬青药材(S1)粉末6份,按“2.3”项所述方法制备供试品溶液,精密吸取苦丁茶冬青供试品溶液20 μ L,按照“2.1”项所述的色谱条件进样,统计并计算所得谱图保留时间及峰面积的RSD,结果显示,HPLC-DAD谱图的各主要色谱峰保留时间及峰面积的RSD分别在0.04%~0.42%、0.65%~2.91%,相似度均大于0.98,HPLC-ELSD谱图的各主要色谱峰保留时间及峰面积的RSD分别在0.06%~0.49%、1.24%~2.54%,相似度均大于0.99,重复性良好。

3 结果与分析

精密称取10批苦丁茶冬青药材粉末各1.0 g,按“2.3”项方法制备供试品溶液,精密吸取苦丁茶冬青供试品溶液20 μ L,按照“2.1”项所述的色谱条件进样。用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统A版”对10批苦丁茶冬青药材的谱图进行处理,以S4批为参照谱,时间窗宽度设定为0.50,自动匹配色谱峰,生成苦丁茶冬青药材HPLC-DAD和

HPLC-ELSD 指纹图谱的对照图谱, 标定出共有峰。苦丁冬青皂苷 C 结构稳定, 且分离度好, 所以选择苦丁冬青皂苷 C 为参比, 计算苦丁茶冬青药材 HPLC-DAD 和 HPLC-ELSD 中共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积。

3.1 苦丁茶冬青的 HPLC-DAD 指纹图谱的建立

HPLC-ELSD 指纹图谱共获得 18 个共有峰, 计算苦丁茶冬青药材 HPLC-DAD 中共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果见表 1、2。10 批苦丁茶冬青的 HPLC-DAD 指纹图谱及对照图谱见图 1。

表 1 10 批苦丁茶冬青 HPLC-DAD 共有峰相对峰面积

Table 1 HPLC-DAD common peak relative peak area of 10 batches of *I. kudingcha*

批号	相对峰面积																	
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13	峰 14	峰 15	峰 16	峰 17	峰 18
S1	1.134	0.057	0.049	0.141	0.657	0.031	0.071	0.191	0.059	0.606	0.231	0.127	0.273	1.000	0.203	0.147	0.691	0.331
S2	1.199	0.061	0.054	0.141	0.694	0.03	0.094	0.19	0.067	0.583	0.169	0.134	0.293	1.000	0.233	0.148	0.768	0.325
S3	1.189	0.059	0.045	0.153	0.708	0.032	0.061	0.18	0.068	0.607	0.17	0.127	0.303	1.000	0.243	0.136	0.73	0.299
S4	1.374	0.061	0.043	0.142	0.655	0.032	0.083	0.206	0.061	0.596	0.174	0.14	0.285	1.000	0.242	0.141	0.774	0.216
S5	1.17	0.069	0.062	0.152	0.701	0.037	0.09	0.198	0.058	0.571	0.191	0.128	0.296	1.000	0.253	0.133	0.759	0.218
S6	0.952	0.041	0.069	0.145	0.659	0.053	0.079	0.152	0.048	0.712	0.251	0.104	0.213	1.000	0.196	0.172	0.545	0.203
S7	1.027	0.04	0.053	0.169	0.656	0.05	0.074	0.147	0.05	0.749	0.245	0.098	0.22	1.000	0.183	0.169	0.563	0.197
S8	0.85	0.045	0.054	0.14	0.638	0.047	0.071	0.15	0.051	0.717	0.249	0.106	0.204	1.000	0.273	0.174	0.521	0.33
S9	1.419	0.064	0.04	0.117	0.507	0.032	0.066	0.199	0.067	0.612	0.15	0.125	0.273	1.000	0.243	0.122	0.617	0.212
S10	1.399	0.069	0.051	0.12	0.554	0.034	0.064	0.19	0.072	0.603	0.161	0.127	0.263	1.000	0.253	0.124	0.601	0.201
RSD/%	17.74	19.18	16.74	10.69	11.33	23.12	14.66	12.34	14.00	10.11	20.24	11.44	13.98	0	12.39	13.15	15.01	23.52

表 2 10 批苦丁茶冬青 HPLC-DAD 共有峰相对保留时间

Table 2 HPLC-DAD common peak relative retention time of 10 batches of *I. kudingcha*

批号	相对保留时间																	
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13	峰 14	峰 15	峰 16	峰 17	峰 18
S1	0.077	0.249	0.442	0.528	0.54	0.564	0.581	0.596	0.619	0.634	0.65	0.956	0.970	1.000	1.027	1.094	1.122	1.153
S2	0.077	0.249	0.442	0.529	0.541	0.564	0.582	0.597	0.62	0.634	0.651	0.956	0.971	1.000	1.028	1.095	1.123	1.153
S3	0.077	0.248	0.442	0.528	0.54	0.564	0.581	0.596	0.619	0.634	0.650	0.956	0.970	1.000	1.027	1.094	1.122	1.155
S4	0.079	0.248	0.442	0.526	0.538	0.563	0.579	0.593	0.619	0.633	0.649	0.956	0.970	1.000	1.027	1.094	1.126	1.156
S5	0.076	0.248	0.441	0.525	0.537	0.562	0.578	0.594	0.618	0.632	0.649	0.956	0.970	1.000	1.027	1.094	1.122	1.153
S6	0.077	0.248	0.441	0.528	0.54	0.564	0.581	0.596	0.619	0.634	0.65	0.956	0.970	1.000	1.027	1.094	1.122	1.153
S7	0.077	0.248	0.443	0.532	0.544	0.567	0.585	0.6	0.621	0.637	0.653	0.955	0.969	1.000	1.027	1.094	1.122	1.153
S8	0.078	0.245	0.44	0.534	0.545	0.57	0.588	0.601	0.621	0.639	0.655	0.955	0.968	1.000	1.027	1.096	1.123	1.153
S9	0.077	0.248	0.44	0.526	0.538	0.563	0.586	0.595	0.618	0.633	0.650	0.956	0.970	1.000	1.027	1.094	1.122	1.152
S10	0.077	0.249	0.442	0.53	0.542	0.566	0.583	0.599	0.621	0.635	0.652	0.956	0.970	1.000	1.027	1.094	1.122	1.153
RSD/%	1.022	0.466	0.243	0.529	0.48	0.418	0.538	0.433	0.19	0.326	0.294	0.046	0.081	0	0.031	0.062	0.113	0.102

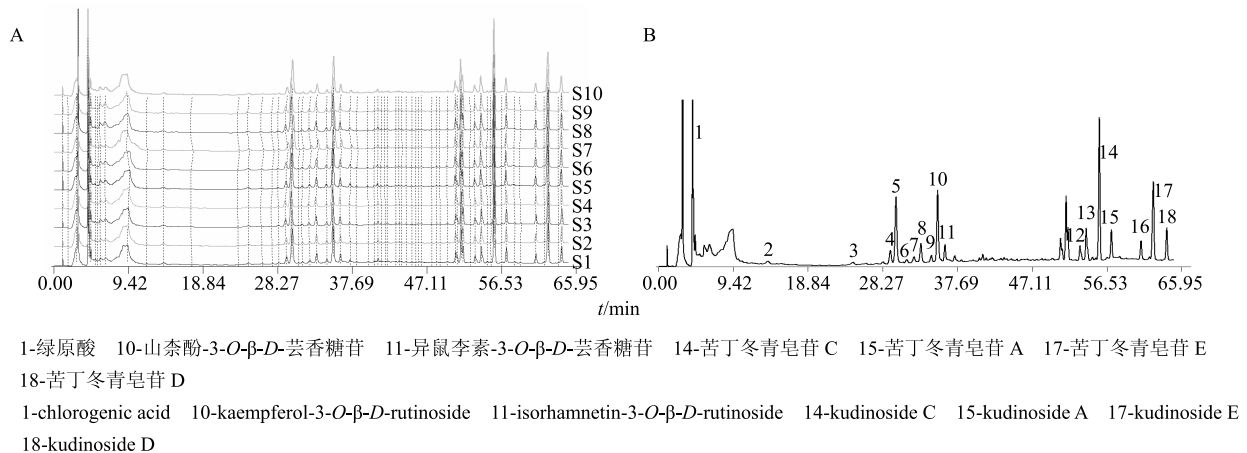


图 1 10 批苦丁茶冬青药材 HPLC-DAD 指纹图谱 (A) 和对照图谱 (B)

Fig. 1 HPLC-DAD fingerprinting (A) and control (B) of 10 batches of *I. kudingcha*

测得 S1~S10 批苦丁茶冬青药材与对照指纹图谱间的相似度分别为 0.968、0.970、0.941、0.916、0.924、0.963、0.911、0.948、0.953、0.934，均大于 0.90。

3.2 苦丁茶冬青的 HPLC-ELSD 指纹图谱的建立

HPLC-ELSD 指纹图谱共获得 11 个共有峰，计

算苦丁茶冬青药材 HPLC-ELSD 中共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积，结果见表 3、4。10 批苦丁茶冬青的 HPLC-ELSD 指纹图谱见图 2。测得 S1~S10 批苦丁茶冬青药材与对照指纹图谱间的相似度分别为 0.955、0.943、0.928、0.914、0.943、0.920、0.946、0.933、0.941、0.962，均大于 0.90。

表 3 10 批苦丁茶冬青 HPLC-ELSD 共有峰相对保留时间

Table 3 HPLC-ELSD common peak relative retention time of 10 batches of *I. kudingcha*

批号	相对保留时间										
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11
S1	0.081	0.542	0.633	0.742	0.955	0.969	1.000	1.028	1.096	1.124	1.154
S2	0.08	0.531	0.635	0.737	0.95	0.956	1.000	1.027	1.094	1.122	1.152
S3	0.08	0.551	0.635	0.737	0.95	0.956	1.000	1.027	1.094	1.122	1.153
S4	0.08	0.537	0.634	0.737	0.943	0.962	1.000	1.016	1.094	1.122	1.153
S5	0.08	0.54	0.633	0.737	0.947	0.956	1.000	1.027	1.094	1.122	1.162
S6	0.08	0.542	0.635	0.736	0.948	0.956	1.000	1.027	1.095	1.322	1.153
S7	0.081	0.539	0.639	0.737	0.952	0.962	1.000	1.032	1.095	1.122	1.173
S8	0.081	0.542	0.64	0.736	0.955	0.969	1.000	1.027	1.096	1.123	1.153
S9	0.08	0.542	0.635	0.719	0.943	0.956	1.000	1.027	1.094	1.12	1.152
S10	0.08	0.541	0.635	0.737	0.944	0.956	1.000	1.027	1.094	1.123	1.152
RSD%	0.227	0.925	0.368	0.833	0.472	0.576	0	0.378	0.056	0.284	0.577

表 4 10 批苦丁茶冬青 HPLC-ELSD 共有峰相对峰面积

Table 4 Peak relative area of HPLC-ELSD common peak of 10 batches of *I. kudingcha*

批号	相对峰面积										
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11
S1	0.107	0.117	0.021	0.035	0.173	0.485	1.000	0.069	0.062	1.361	0.204
S2	0.122	0.151	0.016	0.032	0.169	0.501	1.000	0.064	0.061	1.37	0.247
S3	0.107	0.141	0.019	0.032	0.169	0.496	1.000	0.059	0.062	1.339	0.120
S4	0.125	0.126	0.017	0.035	0.168	0.486	1.000	0.069	0.062	1.366	0.176
S5	0.078	0.134	0.020	0.028	0.175	0.514	1.000	0.059	0.062	1.376	0.200
S6	0.079	0.095	0.021	0.036	0.273	0.372	1.000	0.051	0.071	1.075	0.138
S7	0.089	0.086	0.017	0.032	0.172	0.417	1.000	0.051	0.070	1.102	0.165
S8	0.095	0.157	0.019	0.034	0.175	0.423	1.000	0.047	0.078	1.083	0.101
S9	0.108	0.152	0.018	0.034	0.143	0.547	1.000	0.041	0.042	1.761	0.204
S10	0.107	0.141	0.016	0.033	0.169	0.511	1.000	0.043	0.041	1.639	0.190
RSD%	15.931	18.968	10.228	11.555	19.229	11.325	0	18.667	20.619	16.819	22.220

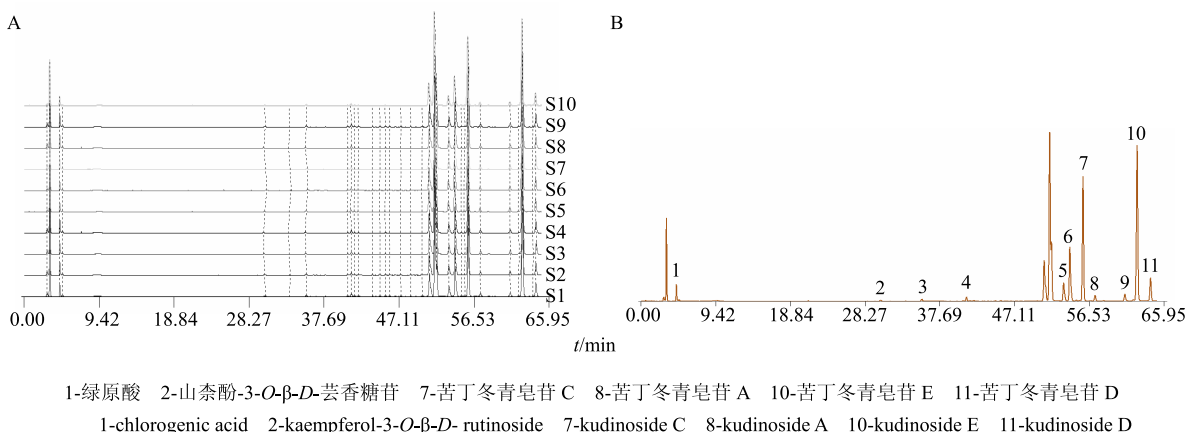


图 3 10 批苦丁茶冬青药材 HPLC-ELSD 指纹图谱 (A) 和对照图谱 (B)

Fig. 3 HPLC-DAD fingerprinting (A) and control (B) of 10 batches of *I. kudingcha*

4 讨论

同一供试品溶液分别在 210、254、330 nm 检测波长下各色谱峰的分离效果表明, 210 nm 波长下的色谱峰最多, 分离效果好, 均能达到基线分离, 峰形对称; 254 nm 波长下色谱峰较少, 对照图谱中 14、15 号峰分离效果差, 皂苷类化合物分布区杂峰多; 330 nm 波长下色谱峰较少, 皂苷类化合物均不能达到基线分离, 故选择 210 nm 作为检测波长可较好地体现苦丁茶冬青中各化学成分的特征。

本课题组从苦丁茶冬青中共分离得到 3 种黄酮类化合物及 15 种皂苷类化合物, 结合对照品结构、供试品中各化合物 DAD 检测波长及 LC-MS 碎片峰, 确定黄酮类物质保留时间集中在 20~30 min, 而皂苷类物质保留时间主要集中在 45~65 min, 对苦丁茶冬青中黄酮及皂苷类物质的分布特点进行了确认。

基于 ELSD 的响应峰值与样品的质量成正比的原理, 对比苦丁茶冬青 HPLC-DAD 与 HPLC-ELSD

指纹图谱的对照图谱可以发现, 黄酮类化合物在苦丁茶冬青中的量要远低于皂苷类化合物。采用 HPLC-ELSD 技术, 可初步的判定出苦丁茶冬青中各成分的量从高到低依次为苦丁冬青皂苷 E、苦丁冬青皂苷 C、苦丁冬青皂苷 D、绿原酸、苦丁冬青皂苷 A、山柰酚-3-*O*- β -D-芸香糖苷、异鼠李素-3-*O*- β -D-芸香糖苷。

参考文献

- [1] 祝晨蓁, 杨金燕, 林朝展. 冬青属植物化学成分及药理活性的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(2): 759-761.
- [2] 冯琳琳, 于 敏, 李美娟. 一测多评法测定苦丁茶冬青中 6 种成分的量 [J]. 中草药, 2017, 48(14): 2955-2959.
- [3] 关 玥, 冯琳琳, 于 敏. HPLC 法同时测定大叶冬青中 6 种三萜皂苷成分的量 [J]. 中草药, 2017, 48(11): 2296-2299.
- [4] 高永艳, 胡建焜, 李瑞明. 苦丁茶高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中医学报, 2014, 29(10): 1479-1481.