

娑罗子药材 HPLC 指纹图谱的建立及其在药材鉴定中的应用

石召华¹, 叶利春¹, 关小羽¹, 杜文杰¹, 张晓存¹, 梅之南^{2*}

(1. 武汉爱民制药股份有限公司, 湖北省天然组分药物工程技术研究中心, 湖北 鄂州 436070;
2. 中南民族大学 民族药物研究院, 武汉 430074)

[摘要] 目的:建立娑罗子药材的高效液相色谱指纹图谱分析方法,检测不同产地娑罗子药材的化学成分,并进行聚类分析,为娑罗子药材的真伪鉴别和质量研究提供依据。方法:采用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.2% 磷酸水溶液,梯度洗脱;流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 220 nm,柱温 30 ℃,进样量为 10 μL;采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)”,对采集的 36 批娑罗子药材进行指纹图谱分析及相似度评价,并结合药材性状特征探讨品种鉴别方法;运用 SPSS 19.0 统计学软件对 36 批药材进行聚类分析。结果:建立了 36 批不同产地七叶树属植物药材的化学成分指纹图谱,相似度为 0.657~0.994;将药材分为 4 大类,其中包括天师栗、七叶树、浙江七叶树以及混淆品种云南七叶树,用对照品指认了 2 个主要化学成分,分别为七叶皂苷 A 和七叶皂苷 B;聚类分析将 36 批药材分为 4 类,与相似度分类结果完全一致。结论:该研究建立了娑罗子药材的 HPLC 指纹图谱分析方法,为其进一步质量研究提供理论依据。

[关键词] 娑罗子; 高效液相色谱指纹图谱; 聚类分析; 天师栗; 七叶树; 浙江七叶树; 云南七叶树

[中图分类号] R284.1; R282.7; R931.6; R22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)14-0052-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181307

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180412.1319.026.html>

[网络出版时间] 2018-04-13 8:53

HPLC Fingerprint of Aesculi Semen and Its Application in Identification of Medicinal Materials

SHI Zhao-hua¹, YE Li-chun¹, GUAN Xiao-yu¹, DU Wen-jie¹, ZHANG Xiao-cun¹, MEI Zhi-nan^{2*}

(1. Wuhan Aimin Pharmaceutical Co. Ltd., Engineering Research Center of Hubei Province
Natural Components Medicine, Ezhou 436070, China;

2. Institute of Ethnomedicine Research, South-central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an analysis method for high performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint of Aesculi Semen, detect the chemical constituents in Aesculi Semen from different origins and conduct cluster analysis, providing basis for its identification and quality control. **Method:** The conditions of separation and detection were achieved on an Agilent ZORBAX SB-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.2% phosphoric acid solution as the mobile phase for gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹; the detection wavelength was 220 nm; the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. The similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine (2004A) was adopted for fingerprint analysis and similarity evaluation of the 36 batches of Aesculi Semen samples, and the identification method was discussed in combination with the characteristics of medicinal materials. SPSS

[收稿日期] 20171017(029)

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2017YFC1701000);国家“重大新药创制”科技重大专项(2014ZX09201-022-03);湖北省重大科技创新专项(2013ACC005)

[第一作者] 石召华,博士,高级工程师,从事中药资源和质量研究工作,Tel: 0711-3818216,E-mail: whimyf@163.com

[通信作者] *梅之南,博士,教授,从事民族药物的药效基础研究工作,Tel: 027-67841196,E-mail: meizhinan@163.com

19.0 statistical software was used for cluster analysis. **Result:** A preferable method for fingerprint determination of *Aesculus* was established, with a similarity of 0.657-0.994. The medicinal materials were divided into four categories, including *A. wilsonii*, *A. chinensis*, *A. chinensis* var. *chekiangensis* and its adulterants *A. wangii* var. *wangii*. By comparing with control products, two chemical components were identified as escin A and escin B. 36 batches of these samples were also divided into 4 categories in cluster analysis, consistent with the similarity classification results. **Conclusion:** This study can be used for the determination of *Aesculi Semen* fingerprint and provides a theoretical basis for its further quality study.

[**Key words**] *Aesculi Semen*; HPLC fingerprint; cluster analysis; *Aesculus wilsonii*; *Aesculus chinensis*; *Aesculus chinensis* var. *chekiangensis*; *Aesculus wangii* var. *wangii*

娑罗子原植物包括七叶树属植物七叶树、浙江七叶树或天师栗^[1],具有理气、疏肝、治疗胃痛的功效。该功效主治早在清代《本草纲目拾遗》中已有记载^[2],现临床上多用于治疗肺胃气痛、胸腹胀闷、乳房胀痛、胃脘疼痛等疾病。

七叶树属植物中化学成分主要包括皂苷、黄酮、甾醇等^[3],其主要成分七叶皂苷为 30 多种皂苷成分组成的一类三萜皂苷类化合物,其中皂苷 A 和皂苷 B 为 β -七叶皂苷,皂苷 C 和皂苷 D 为 α -七叶皂苷^[4],七叶皂苷系列产品临床上常用于治疗静脉水肿、静脉曲张等疾病^[5]。目前,全世界范围内共有七叶树属植物约 30 余种,其中分布在我国华中、华东、西北、西南大部分地区的品种约 10 余种,品种繁多,化学成分复杂;部分品种仅用于行道树;本研究拟建立不同产地娑罗子药材的指纹图谱分析方法,并将该方法用于娑罗子药材鉴定,为进一步规范娑罗子药材市场提供技术保障。

1 材料

1260 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);SB-5200 D 型超声波清洗仪(宁波新芝生物科技股份有限公司,功率 200 W,频率 40 kHz);AB265-S 型电子分析天平(瑞士梅特勒公司)。

七叶皂苷钠对照品(中国食品药品检定研究院,批号 100346-200402,其中七叶皂苷 A 和七叶皂苷 B 的纯度分别为 38.8%,28.3%);甲醇(分析纯,上海振兴化工一厂);乙腈(色谱纯,美国天地);纯化水(杭州娃哈哈);磷酸(分析纯,武汉市化学试剂厂)。

采集的 36 批娑罗子药材名称、产地、收集时间见表 1,药材均由湖北中医药大学陈科力教授鉴定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μ m),流动相乙腈(A)-0.2% 磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 5 min, 5% A; 5 ~

6 min, 5% ~ 10% A; 6 ~ 20 min, 10% ~ 20% A; 20 ~ 30 min, 20% ~ 34% A; 30 ~ 59 min, 34% A; 59 ~ 60 min, 34% ~ 45% A; 60 ~ 75 min, 45% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 220 nm,柱温 30 $^{\circ}$ C,进样量 10 μ L。

2.2 对照品溶液制备 称取七叶皂苷钠对照品适量,用甲醇溶解得到 1.0 g·L⁻¹对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备 取娑罗子药材,粉碎,过三号筛;精密称定粉末 1.0 g,置于具塞锥形瓶,加入甲醇 50 mL,超声溶解,定容,0.45 μ m 滤膜过滤,得到供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取 1 份供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件下连续进样 6 次,各主要色谱峰保留时间 RSD < 0.2%,峰面积 RSD < 3.0%,结果表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取 1 批药材样品,按 2.3 项下方法制备供试品溶液 6 份,按 2.1 项下色谱条件测定,各主要色谱峰保留时间 RSD < 0.2%,峰面积 RSD < 2.5%,结果表明本方法重复性符合要求。

2.4.3 稳定性试验 取 1 份供试品溶液,室温条件下放置 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 h,按 2.1 项下色谱条件测定,各主要色谱峰的保留时间 RSD < 0.2%,峰面积 RSD < 2.7%,结果表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

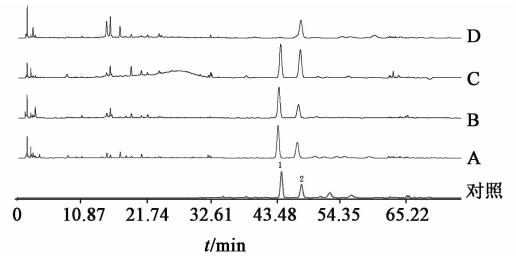
2.5 指纹图谱建立及相似度分析 将 36 批娑罗子药材分别按 2.3 项下方法制备得到供试品溶液,2.1 项下色谱条件测定并建立 HPLC 指纹图谱。利用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)”,分析各样品指纹图谱与对照指纹图谱之间相似性,其相似度在 0.657 ~ 0.994,结果表明不同批次娑罗子药材之间化学成分有显著差异。

2.6 共有峰标定 将各样品指纹图谱与 2.2 项下对照品溶液的色谱峰进行比对,其中 2 个主要共有

表 1 娑罗子药材来源

Table 1 Sources of *Aesculi semen*

产地	编号	收集时间	药材名称
湖北	HB001	2012-09	天师栗 <i>Aesculus wilsonii</i>
	HB002	2012-09	天师栗 <i>A. wilsonii</i>
	HB003	2012-09	天师栗 <i>A. wilsonii</i>
	HB004	2012-09	天师栗 <i>A. wilsonii</i>
	HB005	2012-09	天师栗 <i>A. wilsonii</i>
	HB006	2012-09	天师栗 <i>A. wilsonii</i>
	HB007	2012-09	天师栗 <i>A. wilsonii</i>
	HB008	2012-10	天师栗 <i>A. wilsonii</i>
	HB009	2012-08	天师栗 <i>A. wilsonii</i>
	HB010	2012-08	天师栗 <i>A. wilsonii</i>
陕西	SX001	2012-08	七叶树 <i>A. chinensis</i>
	SX002	2012-08	七叶树 <i>A. chinensis</i>
	SX003	2012-08	七叶树 <i>A. chinensis</i>
	SX004	2012-08	七叶树 <i>A. chinensis</i>
	SX005	2012-08	七叶树 <i>A. chinensis</i>
	SX006	2012-08	七叶树 <i>A. chinensis</i>
	SX007	2012-08	七叶树 <i>A. chinensis</i>
	SX008	2012-08	七叶树 <i>A. chinensis</i>
	SX009	2012-08	七叶树 <i>A. chinensis</i>
	SX010	2012-08	七叶树 <i>A. chinensis</i>
	SX011	2012-08	七叶树 <i>A. chinensis</i>
	SX012	2012-08	七叶树 <i>A. chinensis</i>
浙江	ZJ001	2012-08	浙江七叶树 <i>A. chinensis</i> var. <i>chekiangensis</i>
	ZJ002	2012-08	浙江七叶树 <i>A. chinensis</i> var. <i>chekiangensis</i>
	ZJ003	2012-08	浙江七叶树 <i>A. chinensis</i> var. <i>chekiangensis</i>
	ZJ004	2012-08	浙江七叶树 <i>A. chinensis</i> var. <i>chekiangensis</i>
	ZJ005	2012-08	浙江七叶树 <i>A. chinensis</i> var. <i>chekiangensis</i>
	ZJ006	2012-08	浙江七叶树 <i>A. chinensis</i> var. <i>chekiangensis</i>
	ZJ007	2012-08	浙江七叶树 <i>A. chinensis</i> var. <i>chekiangensis</i>
	ZJ008	2012-08	浙江七叶树 <i>A. chinensis</i> var. <i>chekiangensis</i>
	ZJ009	2012-08	浙江七叶树 <i>A. chinensis</i> var. <i>chekiangensis</i>
云南	YN001	2012-09	云南七叶树 <i>A. wangii</i> var. <i>wangii</i>
	YN002	2012-09	云南七叶树 <i>A. wangii</i> var. <i>wangii</i>
	YN003	2012-09	云南七叶树 <i>A. wangii</i> var. <i>wangii</i>
	YN004	2012-09	云南七叶树 <i>A. wangii</i> var. <i>wangii</i>
	YN005	2012-09	云南七叶树 <i>A. wangii</i> var. <i>wangii</i>



A. 天师栗; B. 七叶树; C. 浙江七叶树; D. 云南七叶树

图 1 4 类娑罗子药材与对照品的 HPLC 指纹谱

Fig. 1 HPLC chromatographic fingerprint of four types *Aesculi Semen* and reference standards

发现不同批次娑罗子药材之间化学成分有显著差异,不利于指纹图谱的建立,本研究结合药材化学组成及形态特征,将 36 批药材分为 4 类,分别建立指纹图谱。见图 2~5。

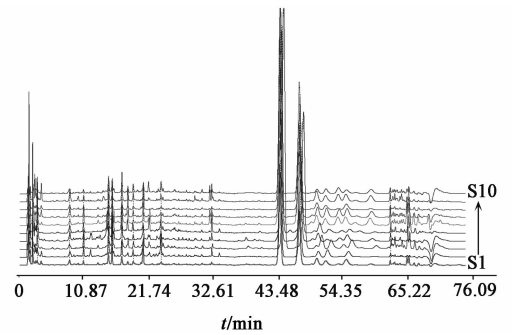


图 2 天师栗药材 HPLC 指纹谱

Fig. 2 HPLC fingerprint of *Aesculus wilsonii*

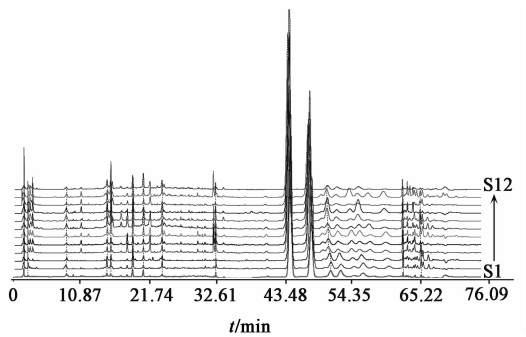


图 3 七叶树药材 HPLC 指纹谱

Fig. 3 HPLC fingerprint of *Aesculus chinensis*

来自湖北的 10 批娑罗子药材外形相似,其中小叶柄较长,基部呈圆形,侧脉 15~20 对,蒴果较小呈球形,种脐小^[6];指纹图谱共有 14 个共有峰,相似度为 0.974~0.998,综合考虑药材化学组成及形态特征将其归为一类,与植物标本记载信息一致,结果表明 A 类为娑罗子原植物天师栗。

来自陕西的 12 批娑罗子药材外形相似,其中小叶呈披针形,侧脉 13~17 对,蒴果呈球形或倒卵形,

峰 1,2 分别指被认为七叶皂苷 A 和七叶皂苷 B,见图 1。

2.7 娑罗子药材分类鉴别 指纹图谱建立过程中

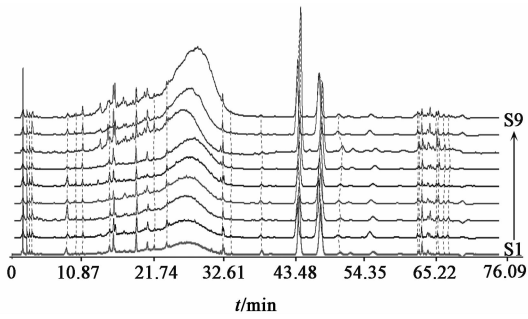


图 4 浙江七叶树药材 HPLC 指谱
Fig. 4 HPLC fingerprint of *Aesculus chinensis* var. *chekiangensis*

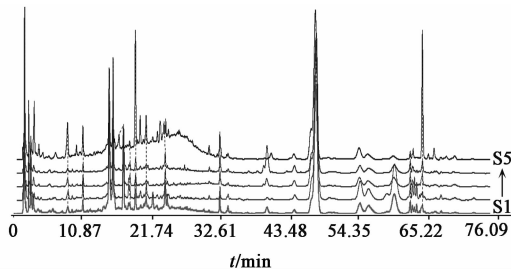


图 5 云南七叶树药材 HPLC 指纹谱
Fig. 5 HPLC fingerprint of *Aesculus wangii* var. *wangii*

中部下凹,种脐大,约占种子体积 1/2^[6];指纹图谱共有 14 个共有峰,相似度为 0.975 ~ 0.997,综合考虑药材化学组成及形态特征将其归为一类,与植物标本记载信息一致,结果表明 B 类为娑罗子原植物七叶树。

来自浙江的 9 批娑罗子药材外形相似,其中小叶背面呈绿色且有少量白粉,中间小叶柄较长,侧脉 18 ~ 22 对,蒴果皮薄,种脐小^[6];指纹图谱共有 24 个共有峰,相似度为 0.966 ~ 0.998,综合考虑药材化学组成及形态特征将其归为一类,与植物标本记载信息一致,结果表明 C 类为娑罗子原植物浙江七叶树。

来自云南的 5 批娑罗子药材外形相似,但是与天师栗、七叶树、浙江七叶树相差较大;其中小叶小,柄长,蒴果呈扁球形,种脐大,约占种子体积 1/2^[6];指纹图谱共有 15 个共有峰,相似度为 0.937 ~ 0.999,综合考虑药材化学组成及形态特征将其归为一类,与植物标本记载信息一致,结果表明 D 类为娑罗子原植物混淆品云南七叶树。

2.8 指纹图谱聚类分析 为进一步验证 2.7 项下分类结果,研究不同产地娑罗子药材之间的关系,以 36 批样品指纹图谱中共有峰面积为原始数据,运用 SPSS 19.0 组间联接聚类方法进行聚类分析结果见图 6;其中, S1 ~ S10 聚为 I 类, S23 ~ S31 聚

为第 II 类, S11 ~ S22 聚为第 III 类, S32 ~ S36 聚为第 IV 类。

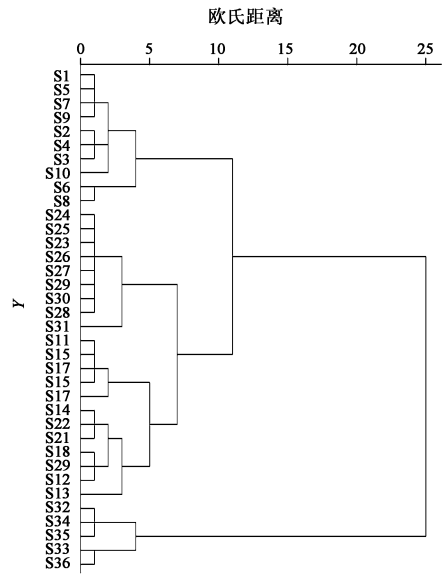


图 6 不同七叶树样品聚类分析
Fig. 6 Cluster analysis of different samples

3 讨论

本研究首先参考 2015 年版《中国药典》娑罗子中七叶皂苷 A 的含量测定方法,通过进一步优化,选择了分离效果较好的乙腈-0.2% 磷酸水溶液流动相体系^[7],结果表明所选梯度条件下 HPLC 指纹图谱色谱峰之间分离度良好,可用于娑罗子药材的指纹图谱分析,为其质量研究提供理论依据;并通过七叶皂苷钠对照品指认了 2 个共有峰,分别为七叶皂苷 A 和七叶皂苷 B。

娑罗子药材品种繁多、产地分布广、质量差异显著^[8-9],本研究收集的 36 批娑罗子药材分别来自湖北、陕西、浙江和云南四个地区,结合娑罗子药材的 HPLC 指纹图谱和性状特征分析,将 36 批药材分为四大类,其中 HB001 ~ HB010 被分为一类, SX001 ~ SX012 被分为一类, ZJ001 ~ ZJ009 被分为一类,分别为 2015 年版《中国药典》中娑罗子的原植物天师栗、七叶树和浙江七叶树。YN001 ~ YN005 被分为一类,其性状特征、化学组成与其他三类差异较大,基本不含主要成分七叶皂苷 A,不符合 2015 年版《中国药典》标准,被归为娑罗子药材混伪品。通过指纹图谱建立及性状特征鉴别娑罗子药材,其实验结果与原标本记载信息一致;说明该方法准确率高,可用于娑罗子药材的真伪鉴别;

通过指纹图谱聚类分析为娑罗子药材的分类鉴别提供理论依据,将 36 批娑罗子药材分为 4 类,分

别对应 2.7 项下分类;从聚类分析树状图可以看出湖北天师栗、陕西的七叶树与浙江七叶树一致性良好,云南七叶树与其他三类七叶树差异性较大;结果与 2.7 项和相似度分析结果一致;另外,树状图显示同类之间仍然存在差异,可能因为采收季节,环境变化等原因导致。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:292-293.
[2] 赵学敏. 本草纲目拾遗[M]. 北京:人民卫生出版社,1963:272.
[3] 尉芹,马希汉,杨秀萍,等. 娑罗子化学成分研究进展[J]. 西北林学院学报,2003,18(4):126-129.
[4] 李菁,叶文才. HPLC-ELSD 法在注射用七叶皂苷钠质

量控制中的应用[J]. 中草药,2000,31(8):582-583.

[5] 陈军辉,李文龙,杨佰娟,等. 高效液相色谱-电喷雾飞行时间质谱分析娑罗子中皂苷类成分[J]. 分析化学,2008,36(3):285-291.
[6] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志. 第46卷[M]. 北京:科学出版社,1981:280.
[7] 石召华. 七叶树属植物资源及品质研究[D]. 武汉:湖北中医药大学,2013:12-20.
[8] 石召华,关小羽,张一娟,等. 娑罗子药材的化学品质研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(11):144-147.
[9] 宋晓虹,王维皓,陈世涛,等. 高效液相色谱-离子阱质谱分析七叶皂苷钠中的皂苷类成分[J]. 中国中药杂志,2016,41(13):2449-2454.

[责任编辑 顾雪竹]