

猴耳环叶 HPLC 指纹图谱

彭亮¹, 陈杰^{1*}, 李诒光^{2*}, 饶毅¹, 魏惠珍¹, 眭荣春¹, 袁桂平³

(1. 江西中医药大学, 南昌 330006; 2. 江中药业股份有限公司, 南昌 330096;
3. 江西省食品药品检验所, 南昌 330046)

[摘要] 目的:建立猴耳环叶的 HPLC 指纹图谱。方法:色谱条件为 Odyssll C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相甲醇-0.5% 磷酸水梯度洗脱,柱温 35 ℃,流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 273 nm,进样量 10 μL。结果:采用 UPLC/DAD/Q-TOF-MS xevo G2 Q-ToF LC-MS 对 15 个共有峰中的 6 个色谱峰进行初步归属,确定为没食子酸、木犀草苷、没食子酸乙酯、(-)-(2S)-5,3',4',5'-四羟基黄酮-7-没食子酸酯和 7,4'-二-O-没食子酰基特利色黄酮、槲皮苷,10 批猴耳环叶的相似度均在 0.97 以上。结论:该方法符合方法学要求,可用于猴耳环叶的全面质量评价。

[关键词] 猴耳环; 高效液相色谱法; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)03-0063-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015030063

HPLC Fingerprint Spectrum of Archidendron clypearia Leaves PENG Liang¹, CHEN Jie^{1*}, LI Yi-guang^{2*}, RAO Yi¹, WEI Hui-zhen¹, SUI Rong-chun¹, YUAN Gui-ping³ (1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China; 2. Jiangzhong Pharmaceutical Corporation, Nanchang 330096, China; 3. Jiangxi Provincial Institute for Drug and Food Control, Nanchang 330046, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the HPLC fingerprint of *Archidendron clypearia* leaves. **Method:** The chromatographic fingerprint was obtained with Odyssll C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) and gradient eluted with methanol and 0.5% phosphoric acid. The column temperature was maintained at 35 ℃, and the flow rate was 1 mL · min⁻¹. The detection wavelength was 273 nm. The injection volume was 10 μL. **Result:** Six chromatographic peaks among 15 common peaks were identified by UPLC/DAD/Q-TOF-MS xevo G2 Q-ToF LC-MS and be intended to be gallic acid, galuteolin, gallic acid ethyl ester, (-) - (2S) -5, 3', 4', 5'-tetrahydroxyflavan-7-gallate, 7, 4'-O-di-gallyoltricitiflavan, quercitrin. The similarities of ten batches of *Archidendron clypearia* leaves were above 0.97. **Conclusion:** The method accordance with the requirements of the methodology and can be used for the full quality evaluation of *Archidendron clypearia* leaves.

[Key words] *Archidendron clypearia* leaves; HPLC; fingerprint spectrum

猴耳环主要分布于我国西南及浙江、福建、台湾、广东、海南、广西、西藏等地。具有清热解毒、凉血消肿、止泻等作用,临床上主要用于上呼吸道感染、急性咽喉炎、急性扁桃体炎、急性胃肠炎等^[1]。现代研究发现猴耳环叶主要含有没食子酸、槲皮苷、没食子酸乙酯和(-)-(2S)-5,3',4',5'-四羟基黄酮-7-没食子酸酯等成分^[2-3],具有抗炎、抗菌、抗病毒和抗氧化等作用^[4]。

目前猴耳环叶的质量控制主要以单一成分作为定性、定量的考察指标^[5],这与中药所含化学成分复杂,发挥药效时多成分、多靶点协同作用的特性不甚吻合。中药指纹图谱是一种综合的、可量化的质量控制手段,其基本属性是整体性和模糊性,这与中医理论的整体性原则和中药作用机制的模糊性是相对应的^[6],因此中药指纹图谱是目前中药质量评价较合理的方法。为进一步评价猴耳环叶质量,本

[收稿日期] 20140805(017)

[第一作者] 彭亮,在读硕士,从事中药质量控制研究,Tel:15079048763,E-mail:602982740@qq.com

[通讯作者] *陈杰,硕士,副教授,从事中药质量与开发研究,Tel:15979019631,E-mail:813680107@qq.com;

*李诒光,博士,主任中医师,从事中药质量评价与开发研究,Tel:15979019136,E-mail:lyg@jzjt.com

研究建立了猴耳环叶 HPLC 指纹图谱,运用 UPLC/DAD/Q-TOF-MS 对共有峰中的部分色谱峰进行了归属,并对 10 批猴耳环叶 HPLC 指纹图谱进行分析,以便能够更加全面的体现不同批次药材之间的质量差异,为猴耳环叶药材质量的综合评价和道地药材 GAP 实施进一步提供依据。

1 材料

1.1 仪器 LC-20AT 型液相色谱仪(日本岛津),Acquity UPCL, xevo G2 Q-Tof 液质联用仪(包括 2489UV/Visible Detector,美国 Waters);CP225D 型电子天平(Sartorius),AB204-N 型精密分析天平(Mettler Toledo 公司)。

1.2 试药 猴耳环叶原药材经江西省食品药品检验所袁桂平主任中药师鉴定,为豆科植物猴耳环的叶 *Archidendron clypearia*,药材来源见表 1。没食子酸对照品(批号为 110708-201106,中国食品药品检定研究院)。乙腈为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,甲醇等其他试剂均为分析纯。

表 1 不同批次猴耳环叶样品来源及采收时间

Table 1 Different batches of *Archidendron clypearia*

No.	产地/批次	采收日期	No.	产地/批次	采收日期
S1	北粤山区-1	2012-07-12	S6	北粤山区-6	2012-08-27
S2	北粤山区-2	2012-09-22	S7	北粤山区-7	2012-08-18
S3	北粤山区-3	2012-07-15	S8	北粤山区-8	2012-06-21
S4	北粤山区-4	2012-06-29	S9	从化太平	2012-08-02
S5	北粤山区-5	2012-07-05	S10	增城中新	2012-07-25

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 取没食子酸对照品适量,精密称定,以甲醇溶解并稀释,得到 $49.28 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的没食子酸对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 取本品粉末(过二号筛)约 0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 乙醇 50 mL,称定质量,回流提取 1.5 h,放冷,再称定质量,用 50% 乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取滤液,即得。

2.3 色谱条件 Odyssll C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温 35 $^{\circ}\text{C}$,以甲醇(A)-0.5% 磷酸(B)为流动相梯度洗脱(0 ~ 10 min, 10% ~ 25% A; 10 ~ 60 min, 25% ~ 47% A),检测波长 273 nm,流速 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,进样量 10 μL 。

2.4 质谱条件 离子源 ESI(负离子模式),干燥温度 250 $^{\circ}\text{C}$,干燥流速 800 $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$,雾化器流速 50 $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$,离子源温度 100 $^{\circ}\text{C}$,扫描质核比范围

100 ~ 1 000。

2.5 方法学考察

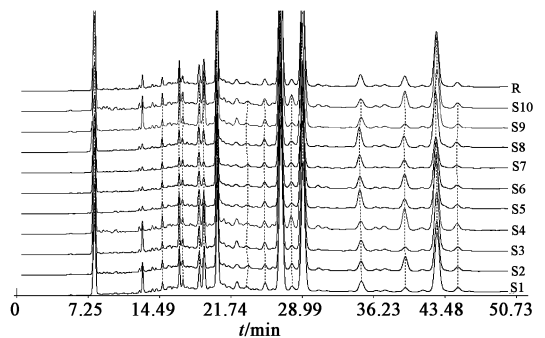
2.5.1 精密度试验 取同一供试品溶液(增城中新样品),按 2.3 项下色谱条件,连续进样 6 次,以没食子酸峰为参照峰,结果各共有峰的相对保留时间 $\text{RSD} < 0.3\%$,相对峰面积 $\text{RSD} < 1.3\%$,表明仪器精密度良好。

2.5.2 稳定性试验 取本品(增城中新样品),按 2.2 项下制成供试品溶液,分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样,以没食子酸峰为参照峰,结果各共有峰的相对保留时间 $\text{RSD} < 0.3\%$,相对峰面积 $\text{RSD} < 2.3\%$,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5.3 重复性试验 取本品(增城中新样品) 6 份,按 2.2 项制成供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件测定,以没食子酸峰为参照峰,结果各共有峰的相对保留时间 $\text{RSD} < 0.3\%$,相对峰面积 $\text{RSD} < 1.4\%$,表明该方法重复性好。

2.6 指纹图谱的建立与共有指纹峰的指认

2.6.1 指纹图谱的建立 按 2.2 项下制备 10 批猴耳环叶药材供试品溶液,依次进样,记录高效液相色谱图,60 min 内有 15 个吸收峰是 10 批猴耳环叶药材共有的,见图 1。



R. 共有模式;S1 ~ S10. 样品

图 1 10 批猴耳环叶 HPLC 指纹谱重叠及共有模式指纹谱

Fig.1 Fingerprint overlap and generated mutual mode fingerprint spectrum of 10 batches of *Archidendron clypearia* leaves

2.6.2 共有指纹峰的标定 对 10 批猴耳环叶药材 HPLC-FPS 测定结果进行比较分析,发现 15 个特征峰是 10 批猴耳环叶药材共有的,且 15 个特征峰的峰面积总和大于总峰面积的 90%,因此确定这 15 个峰为特征指纹峰。以没食子酸峰为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果见表 2,3。

2.6.3 部分特征峰的确认 为确认猴耳环叶特征峰的化学信息,采用 UPLC/DAD/Q-TOF-MS xevo G2

表 2 10 批猴耳环叶指纹图谱中共有峰的相对保留时间

Table 2 Relative retention time of common peaks in fingerprint spectrum of 10 batches of *Archidendron clypearia*

No.	相对保留时间										RSD/%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	
1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
2	1.872	1.873	1.873	1.873	1.871	1.873	1.868	1.873	1.872	1.873	0.09
3	2.089	2.090	2.090	2.091	2.088	2.090	2.085	2.090	2.089	2.091	0.08
4	2.132	2.135	2.132	2.134	2.133	2.135	2.128	2.134	2.132	2.135	0.10
5	2.344	2.345	2.345	2.346	2.344	2.345	2.339	2.345	2.344	2.346	0.09
6	2.406	2.406	2.407	2.407	2.405	2.406	2.401	2.408	2.406	2.408	0.08
7	2.576	2.577	2.578	2.578	2.576	2.577	2.570	2.577	2.575	2.577	0.09
8	3.190	3.189	3.192	3.193	3.189	3.189	3.183	3.192	3.190	3.194	0.10
9	3.395	3.392	3.395	3.396	3.392	3.393	3.384	3.395	3.393	3.397	0.11
10	3.536	3.533	3.537	3.537	3.536	3.534	3.526	3.537	3.542	3.539	0.12
11	3.678	3.675	3.677	3.679	3.676	3.675	3.666	3.680	3.676	3.681	0.11
12	4.424	4.426	4.417	4.421	4.425	4.416	4.404	4.429	4.414	4.432	0.19
13	4.995	4.992	4.994	4.997	4.991	4.991	4.990	4.996	4.990	4.999	0.06
14	5.401	5.398	5.401	5.403	5.386	5.398	5.404	5.403	5.398	5.407	0.11
15	5.671	5.670	5.671	5.674	5.411	5.666	5.675	5.675	5.668	5.676	1.46

表 3 10 批猴耳环叶指纹图谱中共有峰的相对峰面积

Table 3 Relative peak areas of common peaks in fingerprint spectrum of 10 batches of *Archidendron clypearia*

No.	相对峰面积										RSD/%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	
1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
2	0.071	0.073	0.074	0.068	0.067	0.065	0.069	0.067	0.071	0.074	4.55
3	0.192	0.213	0.199	0.196	0.190	0.183	0.194	0.208	0.191	0.193	4.50
4	0.069	0.069	0.061	0.068	0.066	0.067	0.068	0.068	0.063	0.061	4.79
5	0.186	0.203	0.206	0.196	0.181	0.197	0.196	0.209	0.198	0.194	4.32
6	0.187	0.176	0.183	0.178	0.181	0.171	0.164	0.169	0.185	0.173	4.23
7	1.309	1.301	1.314	1.293	1.328	1.317	1.334	1.373	1.376	1.323	2.10
8	0.125	0.129	0.123	0.128	0.118	0.112	0.129	0.131	0.127	0.118	4.97
9	2.952	3.195	3.182	3.171	3.153	3.217	3.187	3.207	3.260	3.160	2.59
10	0.146	0.147	0.140	0.145	0.140	0.150	0.142	0.148	0.144	0.136	2.98
11	2.553	2.664	2.560	2.460	2.449	2.681	2.642	2.667	2.619	2.612	3.22
12	0.272	0.248	0.273	0.278	0.251	0.266	0.254	0.265	0.245	0.256	4.42
13	0.255	0.253	0.263	0.274	0.235	0.262	0.256	0.242	0.255	0.238	4.76
14	1.514	1.529	1.521	1.536	1.518	1.519	1.526	1.530	1.493	1.489	1.02
15	0.115	0.111	0.114	0.105	0.101	0.113	0.118	0.105	0.112	0.108	4.82

Q-ToF LC-MS 对 15 个共有峰中的 6 个色谱峰进行了指认,结果见表 4。

2.7 相似度评价 根据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》(2004A 版), 计算 10 批猴耳环叶药材的相似度分别为 0.995, 0.998, 0.995, 0.997, 0.978, 0.988, 0.988, 0.984,

表4 猴耳环叶指纹图谱中共有峰的指认

Table 4 Identify results of common peaks in fingerprint spectrum of *Archidendron clypearia* leaves

峰号	保留时间/min	准分子离子峰[M + H] ⁺	分子式	化合物
1	7.904		C ₇ H ₆ O ₅	没食子酸
6	18.997	447.094 5	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	木犀草苷
7	20.329	197.045 0	C ₉ H ₁₀ O ₅	没食子酸乙酯
9	26.794	441.083 5	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	(-)-(2S)-5,3',4',5'-四羟基黄烷-7-没食子酸酯
11	29.039	593.092 3	C ₂₉ H ₂₁ O ₁₄	7,4'-二-O-没食子酰基特利色黄烷
14	42.647		C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	槲皮苷

0.995 和 0.993。由结果可知,10 批猴耳环叶药材的相似度均 >0.97,表明药材质量稳定,差异较小。

3 讨论

在参考文献^[7-8]的基础上,本实验曾用甲醇-水、甲醇-0.5%磷酸、乙腈-水、乙腈-0.5%磷酸为流动相进行梯度洗脱。结果表明,以甲醇-0.5%磷酸为流动相进行梯度洗脱,各色谱峰的峰形和分离度均优于其他流动相系统。

本实验通过对提取溶剂、提取方法、提取时间进行考查,确定以50%乙醇为溶剂,回流提取1.5 h为最佳提取条件。采用HPLC-UV检测分析发现,在273 nm波长处指纹峰较多,多数特征成分的响应值较大,而且基线较平稳,故选择273 nm波长作为指纹图谱检测波长。

本实验对10批猴耳环叶药材指纹图谱进行相似度评价分析,结果表明药材质量稳定,能较全面反映药材的品质。鉴于本实验的样品出自其主产地广东,其他省份的药材质量还有待研究。

[参考文献]

[1] 陈元胜,叶永才.广东省中药材标准.一册[M].广州:广东科学技术出版社,2004:197-199.

[2] 苏妙贤,唐之岳,黄伟欢,等.猴耳环化学成分研究[J].中药材,2009,32(5):705-707.

[3] 李镜友,罗巧红,张曼,等.HPLC法测定不同采收期猴耳环中没食子酸的含量[J].中药材,2009,32(6):915-916.

[4] 刘莉莹,康洁,陈若芸.猴耳环属植物化学成分和药理作用研究进展[J].中草药,2013,44(18):2623-2629.

[5] 张志坚,李镜友,李国强.猴耳环研究进展[J].中国药业,2010,19(18):82-83.

[6] 周建良,齐炼文,李萍关.色谱指纹图谱在中药质量控制中的应用[J].色谱,2008,26(2):153-159.

[7] 陈艳伟,张欢,杨世磊,等.HPLC同时测定猴耳环消炎胶囊中没食子酸与槲皮素的含量[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(9):126-128.

[8] 梁泰刚,刘伟,赵承孝,等.HPLC法同时测定养心草中没食子酸、槲皮素和山萘酚的含量[J].光谱实验室,2009,26(4):881-884.

[责任编辑 顾雪竹]