

玉米须的 HPLC 指纹图谱

谢彩侠, 刘蕊, 白雁*, 谢惠英, 王丽娜
(河南中医学院, 郑州 450046)

[摘要] 目的:建立玉米须 HPLC 指纹图谱的测定方法。方法:采用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),检测波长 273 nm,柱温 30 ℃,进样量 10 μL,流速 0.8 mL·min⁻¹,以甲醇(A)-0.2% 磷酸水溶液(B)为流动相梯度洗脱。结果:24 批样品中的色谱峰得到了有效分离,确定了 18 个共有峰,其中 11 号峰是芦丁,15 号峰是芹菜素。结论:HPLC 指纹图谱对饮片的质量评价分类也应参考聚类分析和主成分分析,本实验建立的 HPLC 指纹图谱为玉米须饮片质量标准的评价提供了参考。

[关键词] 玉米须; 高效液相色谱指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析; 质量标准

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)09-0064-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015090064

HPLC Fingerprint for Stigma Maydis XIE Cai-xia, LIU Rui, BAI Yan*, XIE Hui-ying, WANG Li-na
(Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determination of HPLC fingerprint of Stigma Maydis, provide reference, and basis for a quality standard of Stigma Maydis pieces. **Method:** Analysis was performed on an Agilent Zorbax SB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), with the methanol-0.2% phosphoric acid as mobile phase. The gradient elution was carried out. The flow rate was 0.8 mL·min⁻¹. The column temperature was 30 ℃. The injection volume was 10 μL. **Result:** HPLC fingerprint was established based on 24 batches of Stigma Maydis were 18 common peaks, and two of them were identified as rutin (peak 11), apigenin (peak 15). **Conclusion:** Cluster analysis and principal component analysis should also participate in quality evaluation of Chinese herbal medicine, the HPLC fingerprint provides a reference for the quality standards for Stigma Maydis.

[Key words] Stigma Maydis; HPLC fingerprint; cluster analysis; principal component analysis; quality control

玉米须又叫玉米胡子、玉米花丝^[1],具有利尿、泄热、平肝、利胆的功效。玉米须所含的主要化学成分为多聚戊糖、黄酮、挥发油、生物碱、皂苷、尿囊素、有机酸等^[2-3],常用于治疗肾炎水肿、脚气、黄疸肝炎、高血压、胆囊炎、胆结石、糖尿病、鼻渊、乳痈等^[4-6]。我国是玉米的生产大国,玉米须资源非常丰富,但因其各地气候及品种不同,玉米的植物形态及化学成分都会存在一定的差异。玉米须是传统中药,但 2010 年版《中国药典》并未收录玉米须,故本实验对玉米须的 HPLC 指纹图谱进行研究,为建立

玉米须饮片标准提供依据,为玉米须的进一步开发和推广奠定基础。

1 材料

1.1 仪器 1200 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司),FW-100 型高速万能粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司),CPA225D 型分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司),AL204 型分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),Milli-Q Academic A10 型超纯水机(美国 Millipore 公司)。

[收稿日期] 20140819(004)

[基金项目] 河南中医学院科技创新人才计划项目(2012XCXRC03);河南省中药开发工程技术研究中心项目(142102313109);河南中医学院研究生创新基金项目(2013YCX015)

[第一作者] 谢彩侠,副教授,博士,从事现代仪器分析方法在中药质量控制中应用研究,Tel:13673651577 E-mail:1210571736@qq.com

[通讯作者] *白雁,教授,从事利用现代仪器分析方法对中药质量控制进行研究,Tel:0371-65962967,E-mail:white-yan@hotmail.com

1.2 试药 芦丁(MUST-13040302), 芹菜素(MUST-130505050), 成都曼思特生物科技有限公司, 纯度 $\geq 98\%$; 甲醇(色谱纯, Dikma Technology INC.), 甲醇(色谱纯, 天津市四友精细化学品有限公司)。

1.3 药材 24批玉米须样品经河南中医学院生药学科董诚明教授鉴定为禾本科植物玉米 *Zea mays* 的雌花花柱和柱头。S1~S3产地广东省茂名市, S4~S12产地河北省保定市, S14产地湖北省武汉市, S15~S24产地河南省郑州市。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备 精密称取玉米须粉末(过50目筛)6.0 g, 加60%乙醇180 mL, 80℃回流2 h, 抽滤, 取上清液水浴蒸干, 甲醇溶解并定容于10 mL量瓶中, 超声30 min, 过0.45 μm 微孔滤膜即得。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取芹菜素2.20 mg, 芦丁2.70 mg, 置50 mL量瓶中, 甲醇定容, 摇匀, 临用前过0.45 μm 微孔滤膜即得。

2.3 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C₁₈色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 检测波长273 nm, 柱温30℃, 进样量10 μL , 流速0.8 mL \cdot min⁻¹, 以甲醇(A)-0.2%磷酸水溶液(B)为流动相梯度洗脱(0~45 min, 10%~40% A; 45~85 min, 40%~60% A; 85~100 min, 60%~70% A)。

2.4 方法学考察

2.4.1 系统适应性试验 分别按照2.1、2.2项下方法制备供试样品溶液和对照品溶液, 取样品S15按照2.3项下色谱条件记录色谱图。

2.4.2 精密度考察 取S15号供试品溶液, 连续进样6次, 记录色谱图, 计算主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的, 结果各色谱峰相对保留时间的RSD $<0.9\%$, 相对峰面积的RSD $<1.9\%$, 符合指纹图谱的要求。

2.4.3 稳定性试验 取S15号供试品溶液, 分别在0, 2, 4, 8, 12, 24 h进样, 检测指纹图谱, 结果各色谱峰的相对保留时间的RSD $<0.9\%$, 相对峰面积的RSD $<2.1\%$, 表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.4.4 重复性试验 取6份S15号样品, 按2.1项下的方法制备, 分别制成供试品溶液进行分析, 检测指纹图谱, 结果表明各色谱峰的相对保留时间的RSD $<0.4\%$, 相对峰面积的RSD $<2.5\%$, 表明分析方法重复性良好。

2.5 指纹图谱的构建和解析

2.5.1 不同产地的玉米须饮片 HPLC 指纹图谱的

建立 按2.1项下方法制备供试品, 按2.3项下色谱条件测定24批玉米须样品, 采用国家药典委员会制定的“中药指纹图谱相似度计算软件”2004 A版, 对所测得的数据进行分析, 设S1为参照图谱, 中位法生成对照图谱, 时间窗宽度设为0.3, 以生成的对照图谱为基准, 对图谱间的相似度进行了评价, 结果24批玉米须样品相似度分别为0.920, 0.903, 0.848, 0.937, 0.874, 0.875, 0.912, 0.937, 0.896, 0.945, 0.750, 0.942, 0.922, 0.932, 0.794, 0.913, 0.927, 0.873, 0.923, 0.889, 0.815, 0.890, 0.840, 0.922。相似度 >0.9 的样品质量较好, 则S1, S2, S4, S7, S8, S10, S12, S13, S14, S16, S17, S19, S24共13批样品质量较好。见图1。

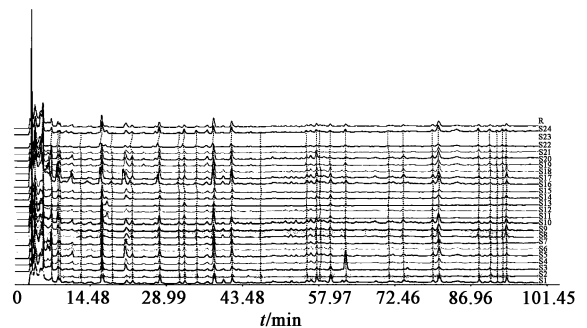
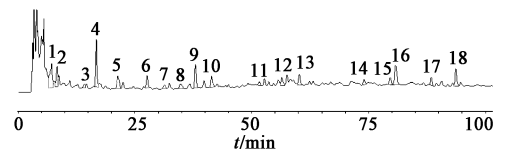


图1 24批玉米须 HPLC 指纹谱叠加

Fig. 1 Vertical overlap of HPLC fingerprint for 24 batches of *Stigma Maydis*

2.5.2 共有模式的建立 用CHROMAP 1.5软件对24批玉米须色谱图进行了处理, 标定了18个玉米须特征图谱的共有峰, 见图2。共有模式是在0~5 min的峰面积 <200 的色谱峰不参与分析, 其中标定了芦丁和芹菜素。



1~18. 共有峰; 11. 芦丁; 15. 芹菜素

图2 玉米须的 HPLC 指纹谱共有峰

Fig. 2 Common fingerprinter of 24 batches of *Stigma Maydis*

2.5.3 指纹图谱聚类分析 运用CHROMAP 1.5软件对24批玉米须样品 HPLC 的指纹图谱进行聚类分析, 输出结果为树状图, 见图3。从结果上可看出, 样品分为4类时, I类为S11, S13, II类为S3, III类为S1, S8, S10, S12, S17, S18, 其余为IV类。从结果上可以看出, 聚类分析为4类的结果与相似度的分类结果不一致, 这说明了这两类分析方法的算法

有较大差别,也说明了样品之间的唯一性,即使同一产地同一个批次差别也是存在的。

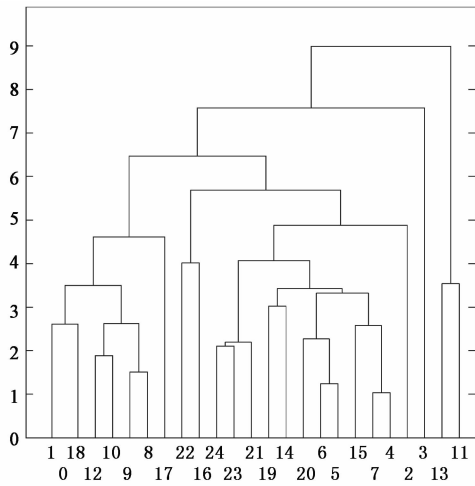


图 3 24 批玉米须聚类分析结果树状
Fig. 3 Dendrogram of 24 batches of Stigma Maydis

2.5.4 主成分分析 运用 CHROMAP 1.5 软件对 24 批样品 HPLC 的指纹图谱进行聚类分析,输出结果为树状图,得到 PCA1, PCA2, PCA3 3 个主成分的响应值。取 PCA1 和 PCA2 作图,结果见图 4。按区域对样品进行分类, I 类为要 S11, S13, II 类为 S3, III 类为 S1, S8, S9, S10, S16, S17, S18, IV 类为 S2, S15, S19, S21, S22, S23, 其余为 V 类。可以看出主成分分析的结果与聚类分析的结果一致大于相似度分析,这可能是因为主成分分析与聚类分析的算法比较相近。

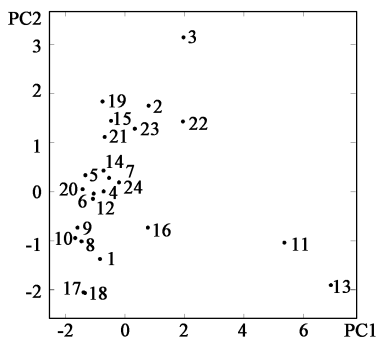


图 4 主成分分析响应值平面
Fig. 4 Score graph of principal components

3 讨论

3.1 供试品的制备方法的考察 本实验考察了回流提取、超声提取和煎煮提取法,结果发现,煎煮法可控性较差,同批次样品的色谱峰面积相差较大;超声提取没有回流提取的指标成分芦丁和芹菜素的峰面积大。同时了考察了回流提取时间 1, 2, 3 h, 料液

比(溶液体积-样品质量)10: 1, 20: 1, 30: 1 的提取效果,发现 30 倍量的 60% 乙醇回流提取 2 h 时间较短且色谱峰数量多、峰形好、含量高、分离度好。

3.2 色谱条件的优化 本实验考察了乙腈-磷酸, 甲醇-磷酸两种流动相体系,发现甲醇-磷酸体系梯度洗脱出峰较多,且分离度较好。考察了 220, 254, 273, 320 nm 不同波长对检测结果的影响^[7-8], 结果发现 273 nm 波长下,各峰的面积较大。

3.3 结果分析 本实验得到指纹图谱的共有模式后,以芹菜素的参照峰对样品的共有峰的相对峰面积进行了计算。这样减弱了系统误差,也反映不同产地样品中各共有峰所代表的化学成分的含量高低^[9]。结果表明,各样品之间共有成分相对峰面积 RSD 远大于相对保留时间的 RSD,而相对保留时间 RSD 与相似度结果的 RSD 相差较小,这可能是因为相似度的计算定性的权重较大,聚类分析和主成分分析的定性权重和定定量权重也是有较大的差别。对比 3 种分析结果发现, S1, S8, S10, S17 在 3 种分析中皆分为一类,说明这 4 批样品的相似性稳定,质量也较好。故 HPLC 指纹图谱对多批次中药材进行质量控制和分类不仅要进行相似度计算,同时也要参考聚类分析和主成分分析对所测样品的质量进行分类和评价。

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998: 97.
- [2] 朱旭, 邱智东. 玉米须的化学成分及药理作用研究[J]. 长春中医药大学学报, 2009, 25(2): 183-184.
- [3] 李静, 李常胜, 张友杰. 玉米须挥发性化学成分研究[J]. 数理医药学杂志, 2001, 6(14): 538-539.
- [4] 王润霞, 谢安建, 李士阔, 等. 玉米须提取液对尿液中草酸钙晶体形成的影响[J]. 无机化学学报, 2009, 25(10): 1711-1716.
- [5] 袁放, 江纓, 郑和听, 等. 自拟玉米须汤对早期糖尿病肾病的保护作用[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(11): 2468-2469.
- [6] 苗明三, 孙艳红. 玉米须总皂苷降糖作用研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(7): 711-712.
- [7] 黄兴富, 黎其万, 刘宏程, 等. 高效液相色谱法同时测定苦荞中芦丁、槲皮素和山柰酚的含量[J]. 中成药, 2011, 33(2): 345-347.
- [8] 郝子博, 王丽莉, 张铁军. 落花生茎叶 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药, 2012, 43(10): 2050-2054.
- [9] 侯艳鹏, 王建华, 尚明英, 等. 旋覆花药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药学杂志, 2002, 37(12): 894-899.

[责任编辑 顾雪竹]