

绞股蓝黄酮类成分 HPLC 指纹图谱快速分析

彭亮¹, 李诒光^{1,2*}, 陈杰^{1*}, 饶毅¹, 季巧遇¹, 魏惠珍¹

(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)

[摘要] 目的:建立绞股蓝黄酮类成分 HPLC 指纹图谱。方法:采用反向高效液相色谱法,ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);流动相乙腈(A)-0.2% 磷酸水溶液(B)梯度洗脱,柱温 30 °C,检测波长 360 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。结果:建立了绞股蓝黄酮类成分 HPLC 指纹图谱,标定了 11 个共有指纹特征峰,方法学考察符合指纹图谱技术要求。结论:该方法稳定、可靠,精密度高,重复性好,可为绞股蓝药材的质量控制提供依据。

[关键词] 绞股蓝; 黄酮类成分; 高效液相色谱; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)01-0053-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016010053

Rapid Analysis Method of HPLC Fingerprint Spectrum of Flavonoids in *Gynostemma pentaphyllum*

PENG Liang¹, LI Yi-guang^{1,2*}, CHEN Jie^{1*}, RAO Yi¹, JI Qiao-yu¹, WEI Hui-zhen¹

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China;

2. Jiangzhong Pharmaceutical Co. Ltd., Nanchang 330096, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the HPLC fingerprint spectrum of flavonoids in *Gynostemma pentaphyllum*. **Method:** HPLC was performed on ZORBAX SB-C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), eluting in a gradient mode with the mobile phase of acetonitrile (A) -0.2% H₃PO₄ as (B) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was 30 °C. The detection wavelength was 360 nm. Injection volume was 10 μL. **Result:** Eleven common characteristic peaks were identified as fingerprint peaks, the methodological study was consistent with the technical requirements. **Conclusion:** The established method is stable, reliable and highly accurate, and can provide reference for quality control of *Gynostemma pentaphyllum*.

[Key words] *Gynostemma pentaphyllum*; flavonoids; HPLC; fingerprint spectrum

绞股蓝又名七叶胆、天堂草、遍地生根等,该属植物基源复杂、品种繁多,我国有 14 种和 3 变种^[1-4],广泛分布于陕西、湖北、安徽、福建、云南、广西等地。具有清热解毒、化痰止咳、益气健脾、养阴生津、养心安神等功效^[5]。现代研究表明,黄酮类成分是绞股蓝的主要化学成分,具有抗氧化、清除自由基、抗癌防癌、改善心脑血管循环和调节血压等作用^[6-7]。绞股蓝作为一种与人参相似的免疫增强剂,有“南方人参”的美誉,民间称其为神奇的“不老

长寿药草”,在保健食品和新型药品研发上都有巨大的应用前景,是一种新的药食两用植物资源^[8-11]。目前高效液相色谱法在中药指纹图谱的定性鉴别与定量分析中得到广泛应用^[12],采用高效液相色谱法对中药指纹图谱进行研究可为中药材的种属差异、质量评价和真伪鉴别提供依据,从而达到控制中药质量的目的^[13-14]。目前,关于不同产地绞股蓝药材黄酮类成分指纹图谱研究未见文献报道,为进一步评价绞股蓝药材质量,本研究建立了绞股蓝黄酮类

[收稿日期] 20150304(006)

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

[通讯作者] *李诒光,博士,主任中药师,从事中药质量评价与开发,Tel:15979019136,E-mail:lyg@jzjt.com;

*陈杰,硕士,副教授,从事中药质量评价与开发,Tel:15979019631 E-mail:813680107@qq.com

成分 HPLC 指纹图谱,并对 10 批绞股蓝黄酮类成分 HPLC 指纹图谱进行评价分析,以便能更加全面的反映不同产地之间绞股蓝药材的质量差异,为绞股蓝药材的质量控制和道地药材 GAP 实施提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器 1100 系列高效液相色谱仪(包括 G1379A 在线真空脱气机, G1311A 四元泵, G1367A 自动进样器, G1316A 柱温箱和 G1315B DAD 检测器,美国安捷伦), SK5200LH 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司), AB204-N 型精密分析天平(Mettler Toledo 上海衡器有限公司), HH-4 型数显恒温水浴锅(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司)。

1.2 试药 绞股蓝药材经李治光主任中药师鉴定为葫芦科绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* 的根茎或全草,药材来源见表 1。芦丁(批号 100080-200707),槲皮素(批号 100081-200907)对照品购自中国食品药品检定研究院。甲醇、乙腈为色谱纯,水为娃哈哈饮用纯净水,其他试剂均为分析纯。

表 1 绞股蓝药材样品的来源

Table 1 Source of *Gynostemma pentaphyllum*

编号	产地	品种	采集日期
S1	陕西平利-1	七叶绞股蓝	2014-02-19
S2	陕西平利-2	五叶绞股蓝	2014-02-19
S3	陕西平利-3	五叶绞股蓝	2014-02-19
S4	陕西平利-4	五叶绞股蓝	2014-02-19
S5	湖北十堰	七叶绞股蓝	2014-04-21
S6	湖北神农架	七叶绞股蓝	2014-06-25
S7	云南昆明	五叶绞股蓝	2014-07-29
S8	广西桂林	七叶绞股蓝	2014-07-21
S9	福建古田	七叶绞股蓝	2014-08-05
S10	安徽亳州	五叶绞股蓝	2014-09-02

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 取芦丁、槲皮素对照品适量,精密称定,加甲醇溶解制成含芦丁 $253.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,槲皮素 $3.62 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 取绞股蓝药材干燥粉末(过四号筛)约 1.0 g,精密称定,置索氏提取器中,加石油醚(60~90℃)适量,加热回流至提取液无色,放冷,弃去石油醚液,药渣连同滤纸挥干溶剂,移入具塞锥形瓶中,加入 70% 甲醇溶液 50 mL,称定质

量,回流提取 1.0 h,放冷,再称定质量,用 70% 甲醇补足减失的质量,过滤,滤液蒸干,残渣用甲醇溶解并转移至 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,用 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.3 色谱条件 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);流动相乙腈(A)-0.2% 磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~15 min, 13% A; 15~35 min, 13%~28% A; 35~45 min, 28%~40% A; 45~55 min, 40%~55% A);柱温 30℃,检测波长 360 nm,流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,进样量 10 μL。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度考察 取同一份绞股蓝供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件连续进样 6 次,记录色谱图。选取芦丁色谱峰作为参照峰,计算其他特征峰的相对保留时间和相对峰面积。结果各特征峰的相对保留时间 RSD < 0.8%,相对峰面积 RSD < 4.8%,表明该方法精密度良好。

2.4.2 稳定性考察 取同一份绞股蓝供试品溶液,按 2.3 项所述色谱条件在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 依次进样,记录不同时间的色谱图,计算各特征峰的相对保留时间和相对峰面积。结果各特征峰相对保留时间的 RSD < 0.2%,相对峰面积 RSD < 5.0%,表明样品在 24 h 内稳定性良好。

2.4.3 重复性考察 取同一批绞股蓝样品(陕西平利-1)6 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件进样测定。结果各特征峰的相对保留时间 RSD < 0.4%,相对峰面积 RSD < 4.7%,表明该方法重复性较好。

2.5 指纹图谱及技术参数

2.5.1 不同产地绞股蓝黄酮类成分指纹图谱的建立 按 2.2 项下方法制备供试品溶液和 2.3 项下色谱条件分析 10 个不同产地的绞股蓝药材,所得 10 批绞股蓝黄酮类成分 HPLC 指纹图谱见图 1。10 批绞股蓝药材共有 11 个特征指纹峰,共有峰的峰面积和大于总峰面积的 90%。

2.5.2 特征指纹峰的标定 根据相对保留时间标定特征指纹峰,对 10 批绞股蓝测定结果进行比较分析,发现 10 批绞股蓝共有 11 个特征峰。其中,通过与对照品对照,确定 1 号峰为芦丁,8 号峰为槲皮素,见图 2。以 1 号峰(芦丁)为参照峰,计算其他特征峰相对保留时间和相对峰面积,见表 2,3。

11 个特征峰在不同产地绞股蓝指纹图谱中都存在,但部共有分特征峰峰高相差较大,且相对峰面

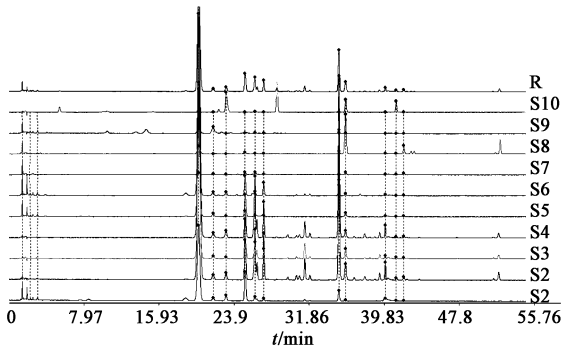


图 1 10 个不同产地绞股蓝黄酮类成分指纹谱
Fig.1 Fingerprint overlap and generated mutual mode fingerprint of 10 batches of *Gynostemma pentaphyllum*

积也有较大差异,表明不同产地的绞股蓝药材,其黄酮类成分的种类相近,但含量差别显著。

表 2 10 批绞股蓝指纹图谱中共有特征峰相对保留时间

Table 2 Relative retention time of common peaks in 10 batches of *Gynostemma pentaphyllum*

No.	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
2	1.080	1.085	1.082	1.084	1.079	1.080	1.079	1.077	1.079	1.075
3	1.147	1.150	1.146	1.148	1.145	1.144	1.143	1.142	1.147	1.145
4	1.249	1.255	1.251	1.252	1.245	1.247	1.247	1.245	1.247	1.243
5	1.294	1.300	1.296	1.297	1.290	1.292	1.286	1.292	1.291	1.302
6	1.350	1.357	1.353	1.353	1.345	1.349	1.348	1.345	1.347	1.350
7	1.743	1.751	1.745	1.746	1.736	1.740	1.741	1.736	1.738	1.739
8	1.775	1.785	1.778	1.780	1.769	1.773	1.773	1.769	1.775	1.769
9	1.983	1.992	1.985	1.986	1.973	1.978	1.977	1.973	1.977	1.978
10	2.005	2.012	2.005	2.007	1.993	2.003	1.997	1.998	1.998	2.001
11	2.072	2.082	2.074	2.076	2.062	2.067	2.066	2.063	2.068	2.064

表 3 10 批绞股蓝指纹图谱中共有特征峰相对峰面积

Table 3 Relative peak areas of common peaks in 10 batches of *Gynostemma pentaphyllum*

No.	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
2	0.031	0.015	0.015	0.014	0.026	0.033	0.419	0.074	1.010	0.529
3	0.053	0.018	0.008	0.017	0.005	0.028	0.196	0.044	0.182	0.687
4	0.218	0.081	0.130	0.051	0.124	0.107	0.842	0.156	0.152	0.356
5	0.034	0.102	0.055	0.112	0.008	0.005	0.877	0.087	0.241	1.271
6	0.019	0.084	0.029	0.059	0.011	0.060	0.228	0.074	0.080	0.717
7	0.074	0.278	0.230	0.267	0.007	0.051	0.216	0.205	0.121	0.383
8	0.012	0.038	0.040	0.017	0.026	0.014	0.812	3.100	0.064	10.243
9	0.005	0.029	0.011	0.019	0.008	0.006	0.158	0.067	0.054	0.444
10	0.056	0.011	0.013	0.005	0.008	0.013	0.331	0.078	0.084	0.288
11	0.004	0.005	0.007	0.002	0.006	0.004	0.564	0.597	0.068	0.466

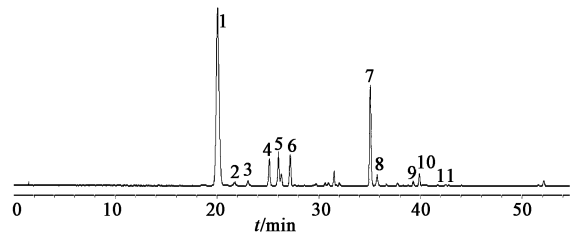


图 2 绞股蓝黄酮类成分 HPLC 指纹谱
Fig.2 HPLC Fingerprint Spectrum of Flavonoids in *Gynostemma pentaphyllum*

2.6 相似度评价 采用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),对 10 个产地绞股蓝药材进行相似度评价分析。结果 S1 ~ S10, 10 个不同产地的绞股蓝药材指纹图谱相对参照谱的相似度结果为 0.989, 0.962, 0.976,

0.963, 0.997, 0.995, 0.462, 0.363, 0.569, 0.128。其中,云南昆明、广西桂林、福建古田、安徽亳州 4 个产地的相似度较差,不同产地绞股蓝的黄酮类成分指纹图谱存在明显差异。

3 讨论

本实验所建立的分析方法更加稳定、可靠,精密度高,重复性好。在样品提取、流动相筛选及样品分析等方面都更加优化,可为今后绞股蓝黄酮类成分 HPLC 指纹图谱研究分析方法的建立提供参考和依据。

采用 HPLC-UV 检测分析发现,在 360 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 360 nm 波长作为指纹图谱检测波长。

本实验分别采用甲醇-水、甲醇-0.2% 磷酸水溶液、乙腈-水、乙腈-0.2% 磷酸水溶液进行梯度洗脱。结果表明,在乙腈-0.2% 磷酸水溶液的流动相中,各色谱峰的分布、峰形和分离度均优于其他流动相,因此,选择乙腈-0.2% 磷酸水溶液作为流动相。

在供试品制备过程中,为了使黄酮类成分提取完全,除去影响测定干扰性的成分,先用石油醚回流除去脂溶性较大的干扰性成分,再以 70% 甲醇回流提取效果最好。本实验还对提取溶剂、提取方法进行了考查,并对提取时间、提取体积进行了单因素试验,结果发现用 70% 甲醇 50 mL 回流提取 1.0 h 效果最佳。

通过相似度评价分析,发现不同产地绞股蓝药材质量存在差异,其中以陕西平利、湖北十堰和湖北神农架药材质量较优。为确保绞股蓝药材临床安全有效,应规范该药材 GAP 种植,选择优良种质资源。

[参考文献]

- [1] 何显忠,邱江沁. 绞股蓝化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15 (增刊): 84-86.
- [2] 秦双双,李海涛,汪周勇,等. 绞股蓝属植物亲缘关系初步分析[J]. 中国中药杂志, 2015, 40 (9): 1681-1687.
- [3] 李金青,杨洪军. 绞股蓝的药理作用研究进展[J]. 中国现代药物应用, 2009, 3(7): 189-190.
- [4] 丁树利,朱兆仪,李勇. 绞股蓝及同属植物的生药学研究[J]. 中国药学杂志, 1994, 29(2): 79-83.
- [5] 陈武,邹盛勤,吴晓春,等. 绞股蓝无糖口含片的制备工艺研究[J]. 食品科学, 2008, 29(3): 245-248.
- [6] 阴建. 中药现代研究与临床应用[M]. 北京: 中医古籍出版社, 1999: 524.
- [7] 吴宗群,王艳. 绞股蓝的化学成份和药理作用研究现状[J]. 中华全科医学, 2011, 9(1): 116-117.
- [8] Ding S L, Zhu Z Y, Li Y. Pharm aceutical study of genus *Gynostemma* of cucurbitaceous in China[J]. *Chin Pharm Aceutical J*, 1994, 29(2): 79-84.
- [9] 张晓喻,黎艳,雍彬,等. 复方绞股蓝皂甙改善小鼠学习记忆的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(3): 330-333.
- [10] 周建华,张兴亚. 绞股蓝开发研究新进展及应用[J]. 食品科技, 2010, 35(2): 74-77.
- [11] 王睿. 绞股蓝皂苷提取工艺研究进展[J]. 广西轻工业, 2010(7): 16-17.
- [12] 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.
- [13] 李兰,王学军,张立国. 色谱指纹图谱及其在中药质量控制中的应用[J]. 天津药学, 2002, 14(6): 6-10.
- [14] 宋小妹,杨新杰,王薇,等. 珠子参的 HPLC 指纹图谱及模式识别[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (11): 59-62.

[责任编辑 顾雪竹]