

# 刺玫果提取物指纹图谱构建及 4 种成分含量测定

崔凤侠<sup>1</sup>, 王领弟<sup>2</sup>, 杜义龙<sup>1</sup>, 潘海峰<sup>1\*</sup>

(1. 河北省承德医学院中药研究与开发重点实验室, 河北承德 067000;  
2. 承德医学院附属医院药房, 河北承德 067000)

**[摘要]** 目的: 研究不同批次刺玫果提取物的 HPLC 指纹图谱, 同时对 4 种指标性成分进行含量测定。方法: 采用 Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 0.5% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)-甲醇(C)-四氢呋喃(D)溶液梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 370 nm, 柱温 30 ℃; 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A) 软件进行指纹图谱分析。结果: 18 批刺玫果提取物的 HPLC 指纹图谱共标定出 10 个共有峰, 鉴定出其中 4 个; 各批次样品的指纹图谱相似度均 >0.9, 相似度良好。结论: 该分析方法准确可靠, 重复性好, 为更好地控制刺玫果提取物的内在质量提供理论依据。

**[关键词]** 刺玫果提取物; 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(2014)07-0093-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2014070093

## Study on HPLC Fingerprint and Quantitative Analysis of 4 Components from Extract of *Rosa davurica*

CUI Feng-xia<sup>1</sup>, WANG Ling-di<sup>2</sup>, DU Yi-long<sup>1</sup>, PAN Hai-feng<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Traditional Chinese Research and Development in Hebei Province, Chengde Medical University, Chengde 067000, China;  
2. Affiliated Hospital of Chengde Medical University Pharmacy, Chengde 067000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the HPLC fingerprint and quantitative analysis of 4 component from extract of *Rosa davurica* from different producing areas. **Method:** With an Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), gradient elution was performed by mobile phase of 0.5% formic acid-acetonitrile-methanol-tetrahydrofuran; detection wavelength was sat at 370 nm. The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; the column temperature was kept at 30 ℃. The data calculation was performed with similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of TCM (Version 2004A). **Result:** 10 common peaks were found from 18 batches of *R. davurica* extract HPLC fingerprint, of which 4 peaks were confirmed. Fingerprint provides a scientific similarity of each batch of samples higher than 0.9. **Conclusion:** This method provides basis for controlling the quality of extract of *R. davurica*.

**[Key words]** extract of *Rosa davurica*; HPLC; fingerprint

**[收稿日期]** 20130715(018)

**[基金项目]** 承德市科学技术研究与发展计划项目(20111116)

**[第一作者]** 崔凤侠, 硕士, 副教授, 从事天然产物活性成分研究工作, Tel: 0314-2291144, E-mail: cfx\_1990@126.com

**[通讯作者]** \* 潘海峰, 硕士, 副主任药师, 从事中药制剂、分析及中药新药研究, Tel: 0314-2291186, E-mail: phf2301@163.com

刺玫果是蔷薇科(rosaceae)蔷薇属植物山刺玫的干燥成熟果实, 广泛分布于我国东北及内蒙、山西等省<sup>[1]</sup>。该果实性温, 味酸, 营养丰富, 民间大量采食用于泡茶、泡酒等<sup>[2]</sup>。《中药大辞典》谓其有健脾理气、养血调经的作用。刺玫果的活性成分主要包括黄酮类、有机酸、香豆素类、多酚类等<sup>[3-5]</sup>, 在药理作用上, 刺玫果的黄酮类成分具有抗氧化<sup>[6-8]</sup>、预防和治疗高血脂、血栓所致的心脑血管疾病的功

效<sup>[9]</sup>,是一种比较有临床应用价值的药物。刺玫果提取物是山玫胶囊的主要组成之一<sup>[10]</sup>,提取物的质量直接影响产品质量,国家药品监督管理局也颁发了《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》<sup>[11]</sup>,对中药从源头、制备过程和成品等环节进行质量要求。本研究采用同样的 HPLC 法建立刺玫果提取物的指纹图谱,以期对中药复方制剂的质量控制提供有力保障。

### 1 材料

**1.1 仪器** Agilent 1100 型 Series 高效液相色谱仪(G1322A 在线脱气机、G1311A 二元泵、G1316A 柱温箱、G1315D 二极管阵列检测器、G1329A 自动进样器),Agilent Chemstation 色谱工作站(美国安捷伦),HC-2062 型高速离心机(科大创新股份有限公司),KQ-700 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),AG-245 型电子分析天平(瑞士梅特勒)。

**1.2 试药** 没食子酸(110831-200803)、芦丁(批号 100080-200707)、金丝桃苷(批号 111521-201004)、槲皮素(批号 100081-200907)均购自中国药品生物制品检定所。甲醇、乙腈为色谱纯(Fisher Scientific, USA),四氢呋喃为色谱纯(Mreda Technology Inc, USA),水为娃哈哈纯净水(河北省高碑店市经济开发区),其他试剂为分析纯。

18 批刺玫果提取物由承德御室金丹药业有限公司提供。

**1.3 处理软件** 中药色谱指纹图谱相似度评价系统(国家药典委员会,2004A 版)。

### 2 方法

**2.1 色谱条件** Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相 0.5% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)-甲醇(C)-四氢呋喃(D),梯度洗脱方式见表 1,检测波长 370 nm,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30 °C,进样量 10 μL。

表 1 流动相梯度洗脱程序

t/min	A/%	B/%	C/%	D/%
0	97	0.5	0.5	2
15	93	0.5	0.5	6
20	89	0.5	0.5	10
30	80	0.5	0.5	19
35	80	0.5	0.5	19
60	56	6	6	32
65	0	0	100	0

**2.2 溶液的制备** 对照品溶液的制备:精密称取没食子酸 6 mg 置 10 mL 量瓶,芦丁 4 mg 置 100 mL 量

瓶,金丝桃苷 3 mg 置 10 mL 量瓶,槲皮素 5 mg 置 25 mL 量瓶中,分别用甲醇溶解并定容,得 0.6 g·L<sup>-1</sup>的没食子酸,0.04 g·L<sup>-1</sup>的芦丁,0.3 g·L<sup>-1</sup>的金丝桃苷,0.2 g·L<sup>-1</sup>的槲皮素储备液。精密量取没食子酸 5 mL、芦丁、金丝桃苷和槲皮素储备液各 1 mL 置 10 mL 量瓶中,用甲醇定容,制成每 1 mL 中含没食子酸 0.30 mg、芦丁 0.004 mg、金丝桃苷 0.03 mg 和槲皮素 0.02 mg 的混合对照品溶液。

供试品溶液的制备:称取刺玫果提取物 0.3 g,精密称定,置 10 mL 量瓶中,用 75% 的甲醇定容,超声 20 min,静置 15 min,离心 10 min,取上清液过 0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液,即得。

### 2.3 指纹图谱的建立与分析

**2.3.1 方法学考察** 精密度试验:取 1 号刺玫果提取物,按 2.2 项制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件操作检测色谱图,连续进样 5 次,以金丝桃苷为参照峰,分别计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积,计算 RSD。10 个共有峰的相对峰面积 RSD 分别为 0.25%、0.36%、0.20%、0.44%、0.38%、0.29%、0.00%、0.66%、0.62%、0.61% (n = 5);相对保留时间 RSD 分别为 0.34%、0.21%、0.62%、0.45%、0.33%、0.69%、0.00%、0.32%、0.29%、0.41% (n = 5)。表明精密度良好。

重复性试验:取 1 号刺玫果提取物 5 份,按 2.2 项制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件操作检测色谱图,以金丝桃苷为参照峰,分别计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积,计算 RSD。10 个共有峰的相对峰面积 RSD 分别为 0.33%、0.28%、0.66%、0.30%、0.50%、0.75%、0.00%、0.10%、0.51%、0.47% (n = 5);相对保留时间 RSD 分别为 0.55%、0.21%、0.36%、0.20%、0.35%、0.24%、0.00%、0.77%、0.50%、0.28% (n = 5),表明重复性良好。

稳定性试验:取 1 号刺玫果提取物 1 份,按 2.2 项制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件分别在 0、4、8、12、24 h 不同时间点操作检测色谱图,以金丝桃苷为参照峰,分别计算共有峰相对保留时间和相对峰面积,计算 RSD。10 个共有峰的相对峰面积 RSD 值分别为 0.32%、0.27%、0.50%、0.27%、0.75%、0.51%、0.00%、0.10%、0.50%、0.60%;相对保留时间 RSD 分别为 0.34%、0.55%、0.55%、0.20%、0.14%、0.34%、0.00%、0.54%、0.44%、0.23%,表明刺玫果提取物样品在 24 h 内稳定性良好。

**2.3.2 指纹图谱的测定及共有峰的标定** 按 2.2 项制备 18 批刺玫果提取物供试品溶液,按 2.1 项下

色谱条件分别记录供试品溶液 65 min HPLC 指纹图谱。比较各批样品的 HPLC 指纹图谱给出的相关参数,对各批供试品共有且峰面积较稳定的峰进行标定。指纹图谱检测结果及共有峰标定见图 1;共标定出 10 个共有峰。经与对照品比对可知,3 号峰为没食子酸,6 号峰为芦丁,7 号峰为金丝桃苷,10 号峰为槲皮素。

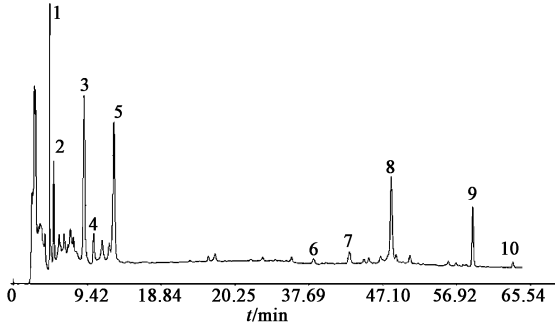


图 1 刺玫果提取物共有峰的指纹图谱

**2.3.3 色谱峰的定位和参照峰的选择** 以金丝桃苷为参照峰(S 峰),分别以参照峰(S 峰)的保留时间和峰面积为 1,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。刺玫果提取物各共有峰的相对保留时间分别为 0.108 6,0.122 5,0.208 9,0.235 3,0.288 7,0.892 3,1.000 0,1.127 9,1.374 5,1.496 0,对应的相对保留时间的 RSD 分别为 0.78%,0.75%,0.64%,0.78%,0.50%,0.09%,0.00%,0.16%,0.25%,0.16%;各共有峰的相对峰面积分别为 5.112 7,6.189 7,12.244,2.557 6,8.555 8,0.241 6,1.000 0,6.193 7,2.767 2,0.307 4,对应的相对峰面积的 RSD 分别为 2.06%,1.57%,6.80%,3.83%,3.42%,5.63%,0.00%,3.23%,6.75%,12.64%。

**2.3.4 相似度评价** 采用国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版》,利用峰面积、峰高以及全谱进行匹配,以 1 号样品 HPLC 指纹图谱为参照图谱,生成对照图谱 R,采用平均数法(时间窗为 0.1)计算各样品与对照图谱的相似度。各批次样品的指纹图谱匹配结果见图 2,相似度均 >0.9,结果见表 2,相似度良好。

**2.4 刺玫果提取物 4 种指标成分的含量测定**

**2.4.1 线性关系考察** 以混合对照品作为 1 号溶液,然后采用倍比稀释法制成系列浓度的溶液,得 2,3,4,5,6 号混合对照品溶液。按 2.1 项下色谱条件分别进样,记录色谱峰面积。以峰面积为纵坐标、对照品浓度为横坐标,进行线性回归,绘制标准曲线方程,结果见表 3。

**2.4.2 精密度试验** 取 1 号刺玫果提取物,按 2.2

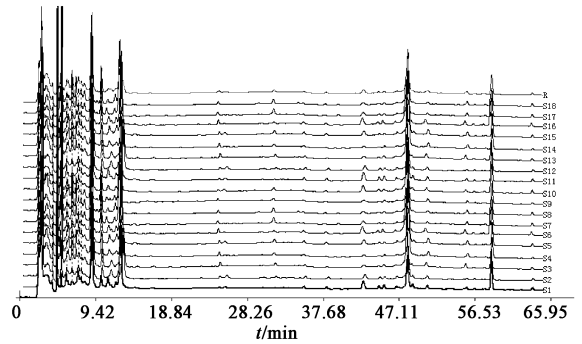


图 2 不同批次刺玫果提取物指纹图谱比较

表 2 18 批刺玫果提取物相似度

批号	相似度	批号	相似度
20110301	0.950 0	20110601	0.952 0
20110302	0.921 0	20110602	0.987 0
20110303	0.922 3	20110603	0.948 0
20110401	0.926 5	20110701	0.985 5
20110402	0.934 5	20110702	0.989 6
20110403	0.934 6	20110703	0.944 5
20110501	0.930 0	20110801	0.906 4
20110502	0.950 0	20110802	0.970 2
20110503	0.903 0	20110803	0.987 8

表 3 4 个指标成分的线性关系

成分	线性回归方程	相关系数	线性范围 /g·L <sup>-1</sup>
没食子酸	A = 13 379C - 13.81	0.999 9	0.025 ~ 0.30
芦丁	A = 8 363C + 0.995 8	0.999 9	0.00 013 ~ 0.004 0
金丝桃苷	A = 11 678C - 1.908 5	0.999 9	0.00 094 ~ 0.030
槲皮素	A = 15 916C + 0.31	0.999 9	0.00 063 ~ 0.020

项制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件操作检测色谱图,连续进样 5 次,记录没食子酸、芦丁、金丝桃苷、槲皮素 4 个指标成分的峰面积,其峰面积的 RSD 分别为 0.40%,0.45%,0.00%,0.40%,精密度良好。

**2.4.3 重复性试验** 取 1 号刺玫果提取物,共 5 份,按 2.2 项制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件操作检测色谱图,记录没食子酸、芦丁、金丝桃苷、槲皮素 4 个指标成分的峰面积,其峰面积的 RSD 分别为 0.30%,0.51%,0.00%,0.22%,重复性良好。

**2.4.4 稳定性试验** 取 1 号刺玫果提取物,1 份,按 2.2 项制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件分别在 0,4,8,12,24 h 不同时间点操作检测色谱图,记录 4 中指标成分的峰面积,其峰面积值 RSD 分别

为 0.25% , 0.41% , 0.00% , 0.36% , 表明刺玫果提取物样品在 24 h 内稳定性良好。

**2.4.5 加样回收率试验** 精密称定已知各指标成分含量 1 号刺玫果 0.15 g 共 6 份, 分别加入对应的对照品储备液适量, 按 2.2 项制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定峰面积, 由标准曲线方程计算样品中没食子酸、芦丁、金丝桃苷和槲皮素的含量, 计算平均回收率, 结果见表 4。

表 4 刺玫果提取物加样回收率

成分	样品中含量	加入量	测得量	平均回收率	RSD
	/mg	/mg	/mg	/%	/%
没食子酸	0.302	0.30	0.601	99.77	0.60
芦丁	0.0012	0.002 0	0.003 3	99.17	3.80
金丝桃苷	0.030	0.030	0.060	100.0	2.95
槲皮素	0.006 0	0.010	0.016	99.0	1.28

**2.4.6 样品含量测定结果** 分别精密称量试验用 18 批刺玫果提取物 0.3 g, 按 2.2 项制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件分别吸取 10 μL 进样依次测定各批样品色谱图, 以外标法计算各指标成分含量, 结果见表 5。

表 5 刺玫果提取物 4 种指标性成分含量测定 (n=3) mg·g<sup>-1</sup>

批号	没食子酸	芦丁	金丝桃苷	槲皮素
20110301	1.951 1	0.059 4	0.195 3	0.040 3
20110302	1.552 0	0.073 3	0.128 3	0.032 0
20110303	1.401 8	0.059 1	0.245 0	0.030 7
20110401	1.552 0	0.055 0	0.188 2	0.035 0
20110402	1.315 6	0.045 9	0.182 5	0.045 0
20110403	1.158 0	0.055 5	0.141 0	0.029 0
20110501	1.854 2	0.042 3	0.107 1	0.037 5
20110502	1.420 9	0.041 1	0.105 5	0.028 3
20110503	1.434 2	0.041 3	0.101 1	0.018 1
20110601	1.346 7	0.040 8	0.102 4	0.014 4
20110602	1.463 3	0.038 1	0.124 5	0.033 2
20110603	1.482 2	0.038 3	0.116 3	0.024 1
20110701	1.615 3	0.058 2	0.180 9	0.034 5
20110702	1.703 1	0.053 9	0.185 9	0.035 1
20110703	1.490 7	0.057 0	0.160 5	0.029 1
20110801	1.351 5	0.052 8	0.139 3	0.028 1
20110802	1.408 0	0.050 6	0.150 7	0.032 7
20110803	1.519 8	0.057 3	0.135 5	0.031 2
均值	1.501 1	0.0517	0.149 4	0.031 0
RSD%	12.68	17.89	26.71	23.35

### 3 讨论

**3.1 色谱条件的选择** 采用 Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相 0.5% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B)-甲醇 (C)-四氢呋喃 (D), 梯度洗脱 (0 ~ 15 ~ 20 ~ 30 ~ 35 ~ 60 min, 97% A ~ 93% A ~ 89% A ~ 80% A ~ 80% A ~ 56% A, 0.5% B ~ 0.5% B ~ 0.5% B ~ 0.5% B ~ 6% B, 0.5% C ~ 0.5% C ~ 0.5% C ~ 0.5% C ~ 0.5% C ~ 6% C, 2% D ~ 6% D ~ 10% D ~ 19% D ~ 19% D ~ 32% D); 柱温 30 °C, 进样量 10 μL, 能使各共有峰分离效果较好, 峰形亦较好。

**3.2 共有峰的标定** 18 批刺玫果提取物的指纹图谱共标定 10 个共有峰, 通过与标准品对照, 鉴定其中 3 号峰为没食子酸, 6 号峰为芦丁, 7 号峰为金丝桃苷, 10 号峰为槲皮素; 相似度均在 0.9 以上, 相似度结果表明刺玫果提取物在化学成分上比较稳定。

### [参考文献]

- [1] 中国植物志. 第 37 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1985: 402.
- [2] 陈帅, 钟方丽, 祝波. 刺玫果药理学研究进展[J]. 吉林化工学院学报, 2011, 28(5): 31.
- [3] 王领弟, 李艳荣, 潘海峰, 等. 不同产地刺玫果中总黄酮含量的测定[J]. 承德医学院学报, 2012, 29(1): 5.
- [4] 于晓瑾, 于翔龙. 正交试验法优选刺玫果总黄酮成分提取工艺[J]. 黑龙江中医药, 2000, 39(1): 46.
- [5] 程东岩, 王隶书, 范艳君, 等. 刺玫果总黄酮纯化工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(3): 664.
- [6] 宋志坚, 王秀丽. DPPH 清除法评价刺玫果黄酮的抗氧化活性[J]. 科技创新导报, 2010(23): 212.
- [7] 王光函, 姜鸿, 张振秋, 等. 刺玫果药材中黄酮类成分测定[J]. 中成药, 2011, 33(4): 710.
- [8] 魏颖, 周峰, 吴薇, 等. 刺玫果多酚对 HepG2 细胞氧化应激损伤保护作用的研究[J]. 食品科技, 2012, 37(8): 181.
- [9] 白瑶, 张燕, 张丽, 等. 山玫胶囊对急性血瘀模型大鼠血液流变学及高血脂大鼠降脂作用的研究[J]. 中国药物与临床, 2007, 7(6): 447.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 467.
- [11] 国家药品监督管理局. 中成药, 2000, 22(10): 671.

[责任编辑 蔡仲德]