

桃枝类药材 HPLC 指纹图谱的鉴别

杨立勇¹, 李雨生¹, 杨焯¹, 石鑫磊¹, 冯华², 王祥培^{1*}

(1. 贵阳中医学院, 贵阳 550002; 2. 遵义市药品检验所, 贵州 遵义 563000)

[摘要] 目的: 建立桃枝类药材高效液相色谱(HPLC)指纹图谱鉴别方法。方法: 采用 RP-HPLC, Diamonsil-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-0.05% 磷酸水, 梯度洗脱, 流速 0.5 mL·min⁻¹, 290 nm 波长下测定山桃枝、桃枝、桃叶及桃仁指纹图谱, 并作相似度比较分析。结果: 建立了山桃枝药材 HPLC 指纹图谱共有模式, 有 47 个共有指纹峰被标定, 并对山桃枝、桃枝、桃叶及桃仁药材的 HPLC 指纹图谱进行相似度比较, 结果有明显差异。结论: HPLC 指纹图谱具有方法简便, 重复性好, 特征性强的特点, 可用于桃枝类药材鉴别。

[关键词] 桃枝; 高效液相色谱; 指纹图谱; 鉴别

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)19-0156-03

[doi] 10.11653/syfj2013190156

Identification of Peach Juvenile Branchlet by HPLC Fingerprint

YANG Li-yong¹, LI Yu-sheng¹, YANG Ye¹, SHI Xin-lei¹, FENG Hua², WANG Xiang-pei^{1*}

(1. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China;

2. Zunyi Institute for Drug Control, Zunyi 563000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC fingerprint for the identification of Peach Juvenile Branchlet. **Method:** The analysis was carried out on a Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with a mobile phase consisting of acetonitrile-0.05% phosphoric acid, gradient eluent, the flow rate of 0.5 mL·min⁻¹. The wave length was 290 nm, data were analyzed by the main component of dried branch of *Prunus persica* and peach leaf and peach seed P. E. to compare the similarity of samples. **Result:** The mutual mode to HPLC fingerprints was established and the 47 mutual peaks were indicated. The similarities among the of the main component of dried branch of *P. persica* and peach leaf and peach seed P. E. collected from different sources were obtained. There was an apparent difference in fingerprint. **Conclusion:** HPLC fingerprint method is repeatable and feasible and can be suitable for identifying Peach Juvenile Branchlet.

[Key words] Peach Juvenile Branchlet; HPLC; fingerprint; identification

桃枝为蔷薇科植物桃的干燥枝条, 具有活血通络、解毒杀虫之功效, 临床上用于心腹刺痛、风湿痹痛、跌打损伤、疥癣等^[1]。而 2003 年版《贵州省中药材、民族药材质量标准》^[2] 中收载桃与山桃的枝条作桃枝使用。目前桃枝药材的性状、显微鉴别及

桃与山桃的枝条两者间的挥发性成分的比较研究已有报道^[1-3], 但对于更客观、准确的去识别两者药材的异同, 目前缺乏研究。由于桃与山桃为同科同属植物, 亲缘关系相近, 其两者枝条的药材性状、显微特征及成分等方面相似或相近, 难以区别。而中药指纹图谱技术能够标示其特征的共有峰的图谱, 借以辨别真伪、评价原料药材、半成品以及成品质量的均一性和稳定性^[4-9]。因此, 本文采用 HPLC 对桃与山桃的枝条及桃叶、桃仁药材的指纹图谱进行测试, 并作指纹图谱的相似度比较, 以期桃枝类药材鉴别和质量控制提供一些依据。

[收稿日期] 20130126(002)

[基金项目] 贵州省科技厅联合基金项目(黔科合中药字【2010】LKZ7025号)

[第一作者] 杨立勇, 硕士, 副教授, 从事民族医药的基础研究

[通讯作者] * 王祥培, 博士, 教授, 从事中药及民族药的品种、品质与资源开发, E-mail: wxp0123@126.com

1 仪器与试药

山桃枝药材分别采收于贵州各地,共 10 份样品,经王祥培教授鉴定为山桃 *Prunus davidiana* (Carr.) Franch. 的干燥枝条;桃枝采集于贵阳花溪、天柱盆处,经王祥培教授鉴定为桃 *P. persica* (L.) Batsch 的干燥枝条;桃叶采集于天柱盆处,经过王祥培教授分别鉴定为山桃的干燥叶和桃的干燥叶;桃仁 *Semen Persicae* 采购于药店。见表 1。

表 1 桃枝类药材及桃叶和桃仁的相似度

No.	样品	来源	采收时间	相似度
S1	山桃枝	天柱盆处①	2009-08	0.989
S2	山桃枝	剑河革东镇八郎村①	2010-01-16	0.995
S3	山桃枝	剑河革东镇方家寨	2010-02-16	0.955
S4	山桃枝	剑河革东镇八郎村②	2010-02-16	0.995
S5	山桃枝	天柱凤城镇	2009-08	0.992
S6	山桃枝	剑河革东镇源江村山坡	2010-02-16	0.998
S7	山桃枝	天柱盆处②	2010-02	0.989
S8	山桃枝	水田①	2009-08	0.978
S9	山桃枝	水田②	2009-08	0.978
S10	山桃枝	天柱盆处③	2010-02	0.997
S11	桃枝	天柱远口	2010-02	0.726
S12	桃枝	花溪①	2009-08	0.800
S13	桃枝	花溪②	2009-08	0.560
S14	桃枝	花溪③	2010-02	0.792
S15	桃枝	花溪④	2009-08	0.858
S16	山桃叶	天柱盆处	2009-07	0.250
S17	桃叶	天柱盆处	2009-08	0.276
S18	桃仁	芝林大药房	2010-07	0.058

Agilent1100 型高效液相色谱仪(自动进样器),二极管阵列检测器(DAD);《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版》(国家药典委员会);乙腈为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Dikma 公司 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.05% 磷酸水(B)进行线性梯度洗脱(0 ~ 55 min, 20% ~ 35% A, 55 ~ 80 min, 35% ~ 44% A, 80 ~ 100 min, 44% ~ 50% A, 100 ~ 105 min, 50% ~ 100% A, 105 ~ 115 min, 100% ~ 20% A),体积流量 0.5 mL · min⁻¹,柱温 25 °C,检测波长 290 nm,运行时间 115 min。

2.2 供试品溶液的制备 取药材粉末(过 40 目筛)约 1.0 g,精密称定,置于 100 mL 具圆底烧瓶中,加 70% 甲醇 50 mL,回流提取 60 min,滤过,药渣加

70% 甲醇 50 mL,回流提取 45 min,滤过,合并 2 次滤液。滤液置水浴锅挥干,残渣加 70% 甲醇定容至 10 mL。用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,即得。

2.3 方法学考察^[6-7]

2.3.1 空白试验 精密吸取空白溶液 7 μL,注入高效液相色谱仪,按规定的梯度条件洗脱,结果表明空白不干扰测定。

2.3.2 精密度试验 取同一供试品溶液,按 2.1 项下的色谱测试条件连续进样 6 次,结果显示各共有峰相对保留时间和相对峰面积比值的 RSD 均 < 3%,表明该方法精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 取同一供试品溶液,按 2.1 项下的色谱测试条件分别在 0, 6, 12, 18, 24, 36 h 检测,结果显示各共有峰相对保留时间和相对峰面积比值的 RSD 均 < 3%,表明该供试品溶液在 36 h 内稳定。

2.3.4 重复性试验 取同一批山桃枝药材分别提取制备 6 份供试品,按 2.1 项下的色谱测试条件进行检测,结果显示各共有峰相对保留时间和相对峰面积比值 RSD 均 < 3%,表明该方法重复性良好。

2.4 指纹图谱建立 按 2.1 项的色谱条件进行检测。同一试验条件下,测定所有供试品高效液相色谱图。根据不同供试品测定结果所给出的峰数,峰值(积分值),峰位(相对保留时间)等相关参数进行分析,比较并得出优化的指纹图谱(图 1 ~ 4)。

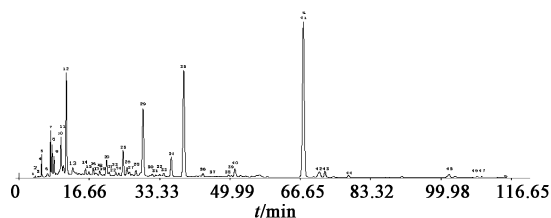


图 1 山桃枝药材 HPLC 指纹

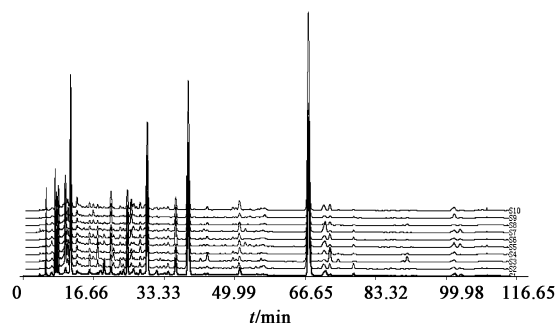


图 2 10 批山桃枝药材的 HPLC 指纹

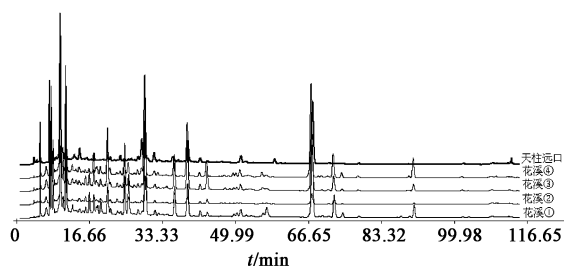


图 3 5 批桃枝药材的 HPLC 指纹

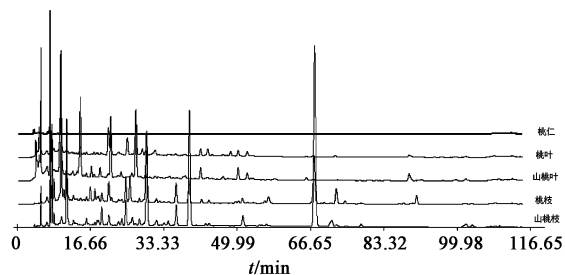


图 4 桃枝类药材及桃叶和桃仁的 HPLC 指纹图谱

2.5 指纹图谱分析

2.5.1 指纹图谱相似度评价 分别将各地样品的色谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004 年 A 版相似度软件,考察图谱相似度的一致性。见表 1。

2.5.2 指纹图谱共有峰的确立 以保留时间约 67.61 min 的 41 号峰作为参照峰,对 10 批山桃枝药材的指纹图谱进行考察,确立了 47 个共有指纹峰(图 1)。

2.5.3 山桃枝、桃枝、桃叶和桃仁的指纹图谱比较 从山桃枝、桃枝、桃叶和桃仁的指纹图谱中,可以直观地看出各自的色谱指纹图谱明显不同,其特征峰数目、位置(相对保留时间)、积分值均有差异,山桃枝、桃枝、桃叶和桃仁的指纹图谱相比,相似度结果见表 1。各药材指纹图谱比较结果见图 4。

3 讨论

在色谱分离过程中考察了甲醇-水,乙腈-水,甲醇-磷酸水溶液,乙腈-磷酸水、乙腈-0.05% 磷酸水溶液等系统,结果显示乙腈-0.05% 磷酸水溶液系统的分离度高,峰形对称,基线稳定;对不同检测波长进行考察,结果在 290 nm 检测波长下,桃枝色谱中色谱峰较多,信息丰富,基线稳定。

对不同体积分数的甲醇与乙醇并采用回流提取和超声提取进行考察发现,70% 甲醇回流提取比超声提取的提取效率高且色谱峰较多。还对回流提取中不同提取时间,不同提取次数进行比较,结果表明 70% 甲醇提取 2 次(60,45 min)后基本完全。故拟定上述供试品溶液的制备方法。

研究表明,各批次山桃枝指纹图谱相似度较好并有 47 个共有峰,而与桃枝、桃叶和桃仁指纹图谱相似度及共有峰的个数有明显差异。说明本文建立的高效液相色谱指纹图谱的鉴别方法,具有方法简便、色谱峰多、信息丰富、基线稳定、客观等特点,可用于桃枝类药材的鉴别。

桃仁味苦、甘,性平,具有活血祛瘀、润肠通便、止咳平喘的功效,用于经闭痛经,症瘕痞块,肺癰肠痈,跌扑损伤,肠燥便秘,咳嗽气喘等症^[1];桃叶味苦,性平具有清热解暑,杀虫止痒的功效,用于疟疾,痈疔,痔瘡,湿疹,阴道滴虫等症^[10];而桃枝(桃与山桃的枝条)在功效与主治方面,与桃仁、桃叶有明显的区别,结合他们的高效液相色谱指纹图谱的差异性,从而提示他们各自治疗疾病的药效物质基础也可能不同。在《中国药典》中只记载桃的枝条作为桃枝药材的来源,而《贵州省中药材、民族药材质量标准》中却记载桃与山桃的枝条作为桃枝药材来源,从指纹图谱的鉴别研究结果看,两者的相似度有一定的区别,但与桃仁、桃叶比较,两者间有较大的相似性(共有峰个数及相似度),提示两者在功能主治方面的共同点,可能与他们指纹图谱上的相似性有关。

[参考文献]

- [1] 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.
- [2] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[S]. 贵阳:贵州科技出版社,2003:296.
- [3] 郝俊杰,王祥培,李雨生,等. 桃枝挥发油化学成分的 GC-MS 分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(16):45.
- [4] 吴红梅,王祥培,贺祝英,等. 热淋清颗粒 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中成药,2009,31(4):496.
- [5] 郭念欣,李颖春,谢伟桥,等. 广陈皮与陈皮 HPLC 指纹图谱的建立与鉴别[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(7):90.
- [6] 王祥培,黄婕,靳风云,等. 威灵仙类药材 HPLC 指纹图谱鉴别研究[J]. 中成药,2010,32(5):704.
- [7] 邵林,郭庆梅,冉蓉,等. 山东不同栽培品种金银花 HPLC 指纹图谱的比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(19):117.
- [8] 杨立勇,李雨生,王祥培,等. 菝葜药材 HPLC 指纹图谱的鉴别[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(8):104.
- [9] 苏娟,黄勤挽,王瑾,等. 基于 HPLC 指纹图谱技术对小包装熟地黄饮片的稳定性考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(19):16.
- [10] 谢宗万,范崔生,朱兆仪,等. 全国中草药汇编. 上册[M]. 北京:人民卫生出版社,1996:681.

[责任编辑 邹晓翠]