

## 预知子药材 HPLC-ELSD 指纹图谱研究

余黄鹏<sup>1,2</sup>, 李志峰<sup>1,2</sup>, 孟月华<sup>2</sup>, 何明珍<sup>1</sup>, 苏丹<sup>1,2</sup>, 冯育林<sup>1,2\*</sup>, 杨世林<sup>1,2</sup>

(1. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006;

2. 江西中医学院, 南昌 330006)

**[摘要]** **目的:**建立不同产地预知子药材的 HPLC-ELSD 指纹图谱分析方法,并与不同产地预知子药材指纹特征相比较,为科学评价与有效控制预知子药材质量提供新方法。**方法:**采用 HPLC-ELSD 法测定了 10 个不同产地的预知子药材样品。使用 Cosmosil-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), ELSD 检测器,流动相乙腈-0.2% 甲酸水,梯度洗脱,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, ELSD 检测器,漂移管温度 110 °C,气流流速 3.0 L·min<sup>-1</sup>。采用直观分析和相似度软件评价不同产地预知子药材指纹图谱的相似度。**结果:**建立了不同产地预知子的 HPLC-ELSD 指纹图谱,检测了 10 个产地的预知子药材,标定了 14 个共有峰,各色谱峰分离度较好,相似度较高,达到了中药指纹图谱研究的技术要求。对其中的常春藤皂苷元 3-O-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→3)-α-L-吡喃鼠李糖基-(1→2)-α-L-吡喃阿拉伯糖苷(皂苷 X, saponins X),常春藤皂苷元 3-O-β-D-吡喃木糖基-(1→2)-α-L-吡喃阿拉伯糖苷(皂苷 B, saponins B),常春藤皂苷元 3-O-α-L-吡喃鼠李糖基-(1→2)-α-L-吡喃阿拉伯糖苷(皂苷 P<sub>D</sub>, saponins P<sub>D</sub>),常春藤皂苷元 3-O-α-L-吡喃阿拉伯糖苷(皂苷 A, saponins A)进行了首次归属。**结论:**该法具有良好的重复性和稳定性,数据准确可靠,建立的 HPLC-ELSD 指纹图谱可为预知子药材的质量控制提供科学准确的依据。

**[关键词]** 预知子; 指纹图谱; 高效液相色谱-蒸发光检测

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0066-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013160066

## Studies on Fingerprint of Akebiae Fructus by HPLC-ELSD

YU Huang-peng<sup>1,2</sup>, LI Zhi-feng<sup>1,2</sup>, MENG Yue-hua<sup>2</sup>, HE Ming-zhen<sup>1</sup>,  
SU Dan<sup>1,2</sup>, FENG Yu-lin<sup>1,2\*</sup>, YANG Shi-lin<sup>1,2</sup>

(1. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China; 2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a fingerprint analysis method for identification of Akebiae Fructus by HPLC-ELSD, get the control chromatogram and compare the fingerprints of Akebiae Fructus collected from different producing areas so as to establish a sensitive and specific method for controlling the quality of Akebiae Fructus. **Method:** The HPLC-ELSD fingerprints of Akebiae Fructus from 10 different places were obtained. The HPLC separation was performed on a Cosmosil-C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) in gradient elute mode with a mixture consisting of acetonitrile and 0.2% formic acid water at the flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The ELSD detector is used and the drift tube temperature of ELSD was set at 110 °C with the flow rate of 3.0 L·min<sup>-1</sup>. The data were analyzed by Fingerprint Similarity Evaluation Software to compare the similarity of the samples from different habitats. **Result:** Fingerprint spectrum of Akebiae Fructus was established. 10 samples were detected and 14 peaks in the chromatogram were common. There was a high similarity and each chromatographic peak was obtained

**[收稿日期]** 20121211(007)

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09103201-008);江西省科技支撑计划项目(201111BBG70005-2, 201211BBG70019);江西省自然科学基金项目(20114BAB215046)

**[第一作者]** 余黄鹏, 硕士研究生, 从事药物质量控制与评价研究, Tel:0791-87119632, E-mail:yu420208137@126.com

**[通讯作者]** \*冯育林, 博士, 副教授, 从事中药化学成分研究, Tel:0791-87119632, E-mail:fengyulin2003@hotmail.com.cn

with good separation. And the correlation could meet the technical requirements of fingerprint of Chinese traditional medicine. And four peaks in HPLC-ELSD chromatogram were firstly assigned as 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 3) - $\alpha$ -*L*-rhamnopyranosyl- (1 $\rightarrow$ 2) - $\alpha$ -*L*-arabinopyranosyl hederagenin (saponins X), 3-*O*- $\beta$ -*D*-xylopyranosyl- (1 $\rightarrow$ 2) - $\alpha$ -*L*-arabinopyranosyl hederagenin (saponins B), 3-*O*- $\alpha$ -*L*-rhamnopyranosyl- (1 $\rightarrow$ 2) - $\alpha$ -*L*-arabinopyranosyl hederagenin (saponins P<sub>D</sub>), 3-*O*- $\alpha$ -*L*-arabinopyranoside hederagenin (saponins A). **Conclusion:** This method shows high precision and reliability and the fingerprint spectrum provides a scientific basis for controlling the quality of *Akebiae Fructus*.

[**Key words**] *Akebiae Fructus*; fingerprint; HPLC-ELSD

预知子为木通科植物木通、三叶木通或白木通的干燥近成熟果实。夏、秋二季果实绿黄时采收,晒干,或置沸水中略烫后晒干<sup>[1]</sup>,分布于亚洲东部,果味甜可食,也可酿酒,种子可榨油。预知子主要的化学成分是皂苷类化合物<sup>[2-6]</sup>,皂苷类化合物活性较高具有抗癌、抗菌、抗炎等<sup>[7-8]</sup>广泛的生物活性。

近年来关于采用 HPLC-ELSD 建立中药材指纹图谱研究的报道很多<sup>[9-11]</sup>,但是未见用此方法建立预知子药材的 HPLC-ELSD 指纹图谱。本文以预知子药材的醇提物为考察对象,建立了预知子总皂苷 HPLC-ELSD 指纹图谱,运用中药指纹图谱相似度计算软件进行数字化处理。对 10 个不同产地的预知子药材采用 HPLC-ELSD 方法并通过对照品外标法确定皂苷 X,皂苷 B,皂苷 P<sub>D</sub>,皂苷 A。此前宋永贵等<sup>[12]</sup>运用 HPLC-UV 一测多评法同时测定预知子中 4 种三萜皂苷。本文首次运用 HPLC-ELSD 法对 4 个单体进行归属,为预知子药材的质量控制提供科学准确的依据。

## 1 材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪, Agilent 1100 色谱工作站, Alltech-2000 型蒸发光散射检测器(美国奥泰科技公司), Millipore Simplicity 超纯水器, AR5120 型托利多 1/万电子分析天平, AB135-S 型 1/10 万天平(Mettler Toledo)。

常春藤皂苷元 3-*O*- $\beta$ -*D*-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -*L*-吡喃鼠李糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -*L*-吡喃阿拉伯糖苷(皂苷 X, saponins X), 常春藤皂苷元 3-*O*- $\beta$ -*D*-吡喃木糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -*L*-吡喃阿拉伯糖苷(皂苷 B, saponins B), 常春藤皂苷元 3-*O*- $\alpha$ -*L*-吡喃鼠李糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -*L*-吡喃阿拉伯糖苷(皂苷 P<sub>D</sub>, saponins P<sub>D</sub>), 常春藤皂苷元 3-*O*- $\alpha$ -*L*-吡喃阿拉伯糖苷(皂苷 A, saponins A) 对照品自制,经 HPLC-ELSD 面积归一化法测定其纯度达到 98% 以上,乙腈为色谱纯,其余试剂为分析纯,水为超纯水。

预知子药材由南昌市食品药品监督管理局主管药师

吴蓓鉴定,来源见表 1。

表 1 预知子样品来源

No.	采收地	种属	采收时间
1	安徽大别山	<i>A. tridoliata</i> (Thunb.) Koidz. var. <i>australis</i> (Diels) Rehd.	2011-09
2	安徽金寨	<i>A. trifoliata</i> (Thunb.) Koidz.	2011-09
3	安徽滁州	<i>A. trifoliata</i> (Thunb.) Koidz.	2011-09
4	四川峨眉	<i>A. quinata</i> (Thunb.) Decne.	2011-09
5	湖北宜昌	<i>A. trifoliata</i> (Thunb.) Koidz.	2011-09
6	湖南怀化	<i>A. tridoliata</i> (Thunb.) Koidz. var. <i>australis</i> (Diels) Rehd.	2011-09
7	江苏赣榆	<i>A. trifoliata</i> (Thunb.) Koidz.	2011-09
8	陕西咸阳	<i>A. quinata</i> (Thunb.) Decne.	2011-09
9	四川通州	<i>A. trifoliata</i> (Thunb.) Koidz.	2011-09
10	浙江宁波	<i>A. tridoliata</i> (Thunb.) Koidz. var. <i>australis</i> (Diels) Rehd.	2011-09

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Cosmosil-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m), 流动相乙腈(A)-0.2% 甲酸水(B), 梯度洗脱(0 ~ 10 min, 5% ~ 30% A; 10 ~ 30 min, 30% ~ 35% A; 30 ~ 31 min, 35% ~ 45% A; 31 ~ 50 min, 45% ~ 50% A; 50 ~ 65 min, 50% ~ 90% A), 体积流量 1 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 柱温 30  $^{\circ}$ C, 漂移管温度 110  $^{\circ}$ C, 气流流速 3.0 L  $\cdot$  min<sup>-1</sup>。

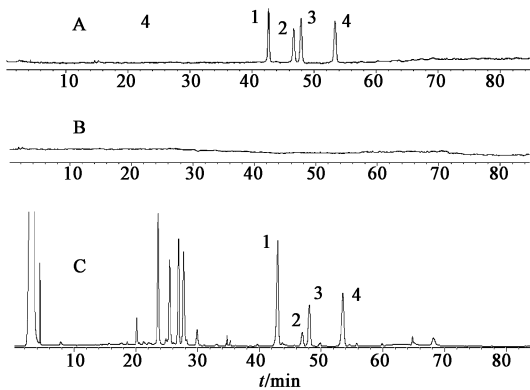
**2.2 对照品溶液的制备** 取皂苷 X, 皂苷 B, 皂苷 P<sub>D</sub>, 皂苷 A 对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成 0.2 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 的对照品溶液, 即得。

**2.3 供试品溶液制备** 精密称取预知子药材干燥粉末(过 1 号筛) 1 g, 精密称定, 加 70% 乙醇溶液 8 mL, 加热回流提取 2 h, 过滤, 重复操作 1 次, 合并 2 次滤液, 用乙醇定容至 100 mL, 振摇混匀, 用 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜过滤, 滤液即为供试品溶液。

## 2.4 方法学考察

**2.4.1 对照试验** 吸取混合对照品溶液按照 2.1

项色谱条件下进样 20  $\mu\text{L}$ , 记录图谱, 色谱图见图 1; 空白溶液色谱图见图 2。



1. 皂苷 X; 2. 皂苷 B; 3. 皂苷 P<sub>D</sub>; 4. 皂苷 A  
A. 混合对照品; B. 空白; C. 预知子药材

图 1 预知子药材对照指纹图谱

**2.4.2 精密度试验** 取供试品溶液, 按照 2.1 项色谱条件, 连续进样 6 次, 结果显示各共有峰保留时间基本一致, 各色谱峰相对保留峰面积的 RSD < 3%, 表明精密度良好。

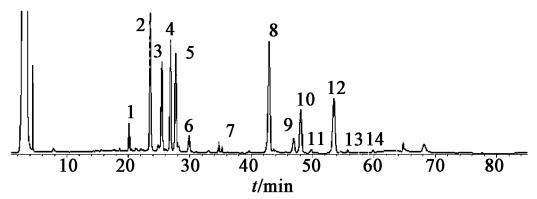
**2.4.3 稳定性试验** 取供试品溶液, 按照 2.1 项色谱条件, 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 h, 进样 20  $\mu\text{L}$ , 测定各峰面积及保留时间。结果显示, 各共有峰保留时间基本一致, 各色谱峰相对保留峰面积的 RSD < 3%, 表明供试品溶液在 24 h 内是稳定的, 符合指纹图谱的要求 (RSD < 5%)。

**2.4.4 重复性试验** 取样品 6 份, 精密称定, 按 2.3 项下方法制备样品, 按照 2.1 项色谱条件下进样 20  $\mu\text{L}$ , 结果显示各共有峰的保留时间基本一致, 各色谱峰相对保留峰的 RSD < 3%, 表明该方法的重复性较好。

## 2.5 指纹图谱的建立及共有峰的标定

**2.5.1 预知子药材的指纹图谱** 把各对照品溶液和制备好的 10 个样品的供试品溶液按 2.1 项下的色谱条件操作, 记录 85 min 色谱图。通过对照品外标法得出对照品的保留时间与其中 4 个色谱峰的保留时间一致, 由此可确定 8 号峰为皂苷 X, 9 号峰为皂苷 B, 10 号峰为皂苷 P<sub>D</sub>, 12 号峰为皂苷 A。见图 2。

**2.5.2 共有模式的建立和相似度的计算** 将 10 个药材的 HPLC-ELSD 图谱的实验数据导入国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》<sup>[13]</sup>, 以安徽滁州的预知子药材为相应的参照谱图, 生成对照图谱, 确定 14 个共有峰, 进行相似度的计算, 并



1 ~ 14. 共有峰

图 2 10 批药材指纹图谱共有峰

得出各批药材的相似度。10 个药材的 HPLC-ELSD 指纹图谱见图 3, 相似度计算结果见表 2。

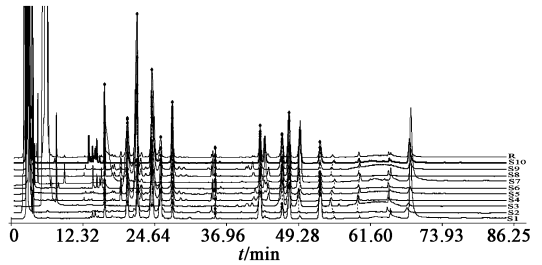


图 3 10 个预知子药材的 HPLC-ELSD 指纹图谱

表 2 不同产地预知子的 HPLC-ELSD 指纹图谱相似度分析

样品	相似度	样品	相似度
S1	0.645	S6	0.701
S2	0.893	S7	0.815
S3	0.901	S8	0.701
S4	0.705	S9	0.832
S5	0.912	S10	0.611

## 3 结果与讨论

通过分析不同来源预知子药材的指纹图谱, 可以观察到相似度在 0.9 以上的有 2 个产地, 0.8 以上的有 5 个产地, 0.7 以上的有 8 个产地, 0.7 以下的有 2 个产地。可将相似度定在 0.7 以上, 部分药材相似度较低是因为预知子为 3 个种的果实, 药材来源较多, 可见白木通、木通和三叶木通之间化合物比例还是有一定区别的, 有待我们进一步研究。

尝试甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.2% 甲酸水溶液等系统进行梯度洗脱, 发现采用乙腈-0.2% 甲酸水系统时不但基线稳定, 而且可以使共有峰达到良好的分离。200 min 的图谱显示 85 min 后再没有其他特征峰出现。

有国内学者用 RP-HPLC (反相高效液相法) 法建立预知子药材指纹图谱, 检测波长为 210 nm<sup>[14]</sup>。由于预知子药材中主要成分是三萜皂苷, 没有紫外吸收或紫外吸收系数很低, 所以选择 ELSD 检测器,

它是一种通用型检测器,其检测结果比紫外检测器的检测结果更能代表样品的质量,另外流动相在检测前已蒸发,因此提高了基线的稳定性,适合预知子药材的检测。检测结果表明,其灵敏度和稳定性均符合要求。

雾化气流流速和漂移管温度是 ELSD 检测器的 2 个重要可调节参数。在实验中反复比较,确定了 ELSD 检测器参数漂移管的温度 110 ℃,雾化气体流速为 3.0 L·min<sup>-1</sup>。

#### [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,2010:278.
- [2] 马双成,陈德昌,赵淑杰. 预知子的化学成分研究(Ⅲ)[J]. 天然产物研究与开发,1996,10(3):50.
- [3] 马双成,陈德昌,赵淑杰. 预知子的化学成分研究 I、白木通种子中的三位单糖链皂苷化合物[J]. 中草药,1994,25(4):172.
- [4] 王家明,王智民,高慧敏,等. 预知子化学成分研究[J]. 中国药学杂志,2008,43(2):98.
- [5] 马双成,陈德昌,赵淑杰. 预知子的化学成分研究 II、白木通种子中的 3,28 位双糖链皂苷类化合物[J]. 中草药,1994,25(11):613.
- [6] 高亚玲,张静,高秀玲,等. 预知子的化学成分、药理

作用与临床应用研究[J]. 河北化工,2011,34(5):35.

- [7] 赵春彦,成慧,贾冬梅,等. 龙牙楸木三萜皂苷合成途径关键酶 AeFPS 基因的克隆及原核表达[J]. 中草药,2011,42(10):2092.
- [8] 张佳佳. 黑海海参三萜皂苷的提取分离及其结构鉴定[J]. 中草药,2011,42(8):1467.
- [9] 梁瑾,刘小花,任远,等. 黄芪药材的 HPLC-DAD-ELSD 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(17):70.
- [10] 李文庭,祝明,马临科,等. 桔梗的 HPLC-ELSD 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(22):50.
- [11] 蔡晓翠,贺金华,徐芳,等. 新疆道地药材伊贝母 HPLC-ELSD 指纹图谱研究及西贝母碱的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(21):82.
- [12] 宋永贵,张武岗,刘岩庭,等. 一测多评法同时测定预知子中 4 种三萜皂苷[J]. 中草药,2012,43(7):1418.
- [13] 国家药典委员会. 中药色谱指纹图谱相似度评价系统操作规范[S]. 北京:国家药典委员会,2004A.
- [14] 王家明,王智民,高慧敏,等. 预知子指纹图谱的初步研究[J]. 中国药学杂志,2007,42(13):978.

[责任编辑 顾雪竹]

## 欢迎订阅 2014 年《中国中医药信息杂志》

《中国中医药信息杂志》是由国家中医药管理局主管、中国中医科学院中医药信息研究所主办的中医药学术期刊。1994 年创刊,2002 年,被中国科学技术信息研究所的“中国科技论文统计源期刊”收录,成为中国科技核心期刊。随着期刊影响力的不断提升,已相继被《中国科学引文数据库》、波兰《哥白尼索引》、美国《化学文摘》、美国《乌利希期刊指南》、《世界卫生组织西太平洋地区医学索引》及英国《农业与生物科学研究中心文摘》、英国《全球健康》等知名检索系统收录。

本刊是中医药行业一本独具特色的学术期刊,其内容较全面地反映了我国中医药发展水平。主要栏目有:中医动态、专题论坛、改革与管理、中医药信息学、流行病学调查、临床论著、实验研究、中药研究与开发、临床报道、专家经验、临证心得、思路与方法、中医教育、医院药学、综述等。

本刊为月刊,大 16 开国际开本,136 页,国内外公开发售,每册定价 10 元,全年 120 元。国内邮发代号:82-670;国外代号:M4564。也可直接汇款至本刊编辑部订阅。地址:北京市东直门内南小街 16 号《中国中医药信息杂志》编辑部,邮编:100700,电话:010-64014411-3278, E-mail:Lxx@mail.cintem.ac.cn。