

龙眼叶药材 HPLC 指纹图谱研究

梁洁^{1*}, 柳贤福², 李耀华¹, 韦志英¹, 翁翎¹

(1. 广西中医药大学药学院, 南宁 530001; 2. 广西中医药大学赛恩斯新医药学院, 南宁 530001)

[摘要] 目的: 建立龙眼叶药材的 HPLC 色谱指纹图谱。方法: 采用 HPLC, Hypersil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以甲醇-0.2% 磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 20 °C, 洗脱时间 90 min, 检测波长 360 nm。结果: 检测了广西不同来源的 10 批龙眼叶药材, 确定 11 个共有色谱峰, 相似度评价结果表明, 各产地龙眼叶药材相似度均 > 0.90。结论: 龙眼叶 HPLC 指纹图谱可用于龙眼叶药材的鉴别及质量控制。

[关键词] 龙眼叶; 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(2013)18-0120-03

[doi] 10.11653/syjf2013180120

Studies on HPLC Fingerprint of the Leaf of *Dimocarpus longan*

LIANG Jie^{1*}, LIU Xian-fu², LI Yao-hua¹, WEI Zhi-ying¹, WENG Ling¹

(1. Faculty of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China;

2. Faculty of Chinese Medical Science, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the chromatography fingerprint of the leaf of *Dimocarpus longan* by HPLC. **Method:** HPLC analysis was performed on a Hypersil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with the gradient eluting system consisted of methanol and 0.2% H₃PO₄. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was maintained at 20 °C and the detection wavelength was set at 360 nm. The time of gradient elution was 90 min. **Result:** Ten samples of the leaf of *D. longan* in different origin of Guangxi were detected and eleven main marker peaks were selected in the standard fingerprint. The similarity of samples is all over 0.90. **Conclusion:** The HPLC fingerprint can be used for identification of the leaf of *D. longan* as well as quality control.

[Key words] the leaf of *Dimocarpus longan*; HPLC; fingerprint

龙眼叶药材为无患子科龙眼属龙眼的叶或嫩芽, 广西、广东、福建及台湾等省区是主产区, 海南、云南、四川和贵州等省也有栽培, 具有发表清热、利湿解毒之功效, 主治感冒发热、疟疾、疔疮、湿疹^[1]。龙眼叶主要含有鞣质、酚酸类、黄酮类及挥发油等成

分^[2-5]。本课题组对龙眼叶进行了系统的化学成分研究, 发现其主要活性成分为黄酮成分。已有对其总黄酮的鉴别和提取条件的优化研究^[6-7], 但未见其指纹图谱研究的报道。本实验采用 HPLC 梯度洗脱法构建广西地区不同来源龙眼叶药材的指纹图谱, 对 10 批样品进行了相似度评价, 旨在为今后规范药材资源及质量评价提供科学依据。

1 材料

Agilent-1100 型高效液相色谱仪, 包括四元梯度泵、高速自动进样器、柱温箱和紫外检测器, Agilent 工作站。LG16-W 型高速离心机 (北京医用离心机厂), B3500S-MT 型超声清洗仪 (上海必能信超声有限公司), Millipore Simplicity-185 型超纯水仪 (美国

[收稿日期] 20121107(006)

[基金项目] 广西自然科学基金项目 (2010GXNSFB013071); 2009 年度广西高校优秀人才计划项目 [桂教人 2009(62) 号]; 广西研究生教育创新计划项目 (JGY2012032)

[通讯作者] * 梁洁, 博士, 副教授, 从事中药质量分析研究, Tel: 0771-3137585, E-mail: liangjie1101@126.com

密里博公司),BP211D 型电子分析天平(德国赛多利斯)。槲皮素对照品(中国药品生物制品检定所,批号 100081-200406),山柰素对照品(中国药品生物制品检定所,批号 100861-200606),木犀草素对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号 10032),甲醇(色谱纯,美国 Fisher 科学世界公司),水为超纯水。10 批龙眼叶药材产地见表 1。所有药材经广西中医药大学中药鉴定教研室滕建北副教授鉴定为 *Dimocarpus longan* Lour. 的叶。

表 1 龙眼叶药材来源

| No. | 样品来源 | No. | 样品来源 |
|-----|------|-----|------|
| S1 | 广西贺州 | S6 | 广西柳州 |
| S2 | 广西南宁 | S7 | 广西北海 |
| S3 | 广西玉林 | S8 | 广西梧州 |
| S4 | 广西钦州 | S9 | 广西崇左 |
| S5 | 广西贵港 | S10 | 广西百色 |

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Hypersil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇(A)-0.2%磷酸(B),梯度洗脱(0~30 min, 30%~32% A; 30~40 min, 32%~35% A; 40~50 min, 35%~40% A; 50~55 min, 40%~45% A; 55~90 min, 45% A),检测波长 360 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 20 ℃,进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取经五氧化二磷减压干燥 36 h 槲皮素、木犀草素和山柰素对照品适量,分别加甲醇制成 0.360 g·L⁻¹的槲皮素对照品溶液、0.118 g·L⁻¹木犀草素对照品溶液和 0.048 g·L⁻¹山柰素对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取龙眼叶药材粉末约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 80% 甲醇-盐酸(4:1)混合溶液 20 mL,密塞,称定质量,超声提取 50 min,放冷,再称定质量,用 80% 甲醇-盐酸(4:1)混合溶液补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取 S1 供试品溶液,连续进样 6 次,分别对共有峰的相对保留时间和相对峰面积进行考察。结果表明,各共有峰的相对保留时间 RSD 0.12%~0.70%;相对峰面积 RSD 0.70%~1.68%,符合指纹图谱分析要求。

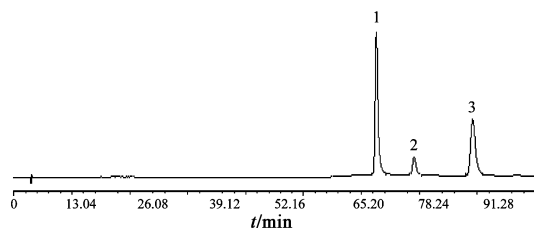
2.3.2 重复性试验 取 S1 供试品药材粉末 5 份,

按已确定指纹图谱方法制备供试品溶液,分别对共有峰的相对保留时间和相对峰面积进行考察。结果表明,各共有峰相对保留时间 RSD 0.37%~1.64%,相对峰面积 RSD 0.62%~1.83%,符合指纹图谱分析要求。

2.3.3 稳定性试验 取 S1 供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 12, 24 h 进样分析,考察其共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明,各共有峰相对保留时间 RSD 0.43%~1.06%,相对峰面积 RSD 0.74%~1.68%,表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.4 龙眼叶药材指纹图谱的建立

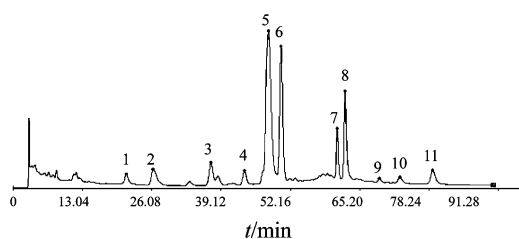
2.4.1 龙眼叶样品 HPLC 指纹图谱测定 分别将 10 批龙眼叶样品按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,在 2.1 项下色谱条件测定,记录 HPLC 图。将 10 批龙眼叶药材的液相图谱导入国家药典委员会指定的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版”,以样品 S2 为参照图谱,时间窗宽度为 0.5,采用中位数法计算。采用该软件生成龙眼叶共有模式的对照指纹图谱,得到 11 个共有峰。通过对照品试验,考察对照品保留时间,指认其中的 8 号峰为槲皮素,9 号峰为木犀草素,11 号峰为山柰素(图 1,2)。因槲皮素峰面积大且峰形最稳定故以其为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间,10 批样品的相对保留时间的 RSD < 3%,符合指纹图谱的要求。经统计共有峰面积占总峰面积百分比为 95%~99%,符合指纹图谱研究的非共有峰占总峰面积百分比 < 10% 的技术要求(图 3)。



1. 槲皮素;2. 木犀草素;3. 山柰素

图 1 混合对照品的 HPLC

2.4.2 相似度分析 对照用指纹图谱和 10 批样品图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度软件”,根据 10 批样品相对保留时间及指纹图谱的整体谱峰特点,以相关系数法对样品的相似度进行评价,各样品相似度分别为 0.904, 0.934, 0.974, 0.913, 0.945, 0.911, 0.927, 0.942, 0.945, 0.932。相似度均 > 0.9,表明相似度良好^[8]。



8. 槲皮素;9. 木犀草素;11. 山柰素

图 2 龙眼叶药材的共有模式

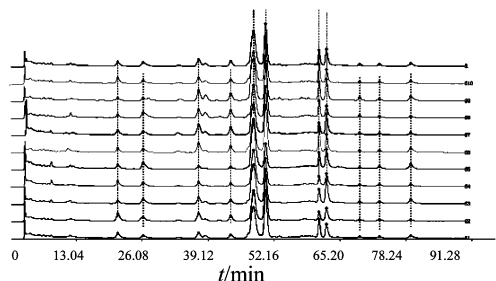


图 3 10 批龙眼叶样品 HPLC 指纹图谱

3 讨论

应用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版》软件,通过对不同产地的龙眼叶药材进行高效液相色谱图的考察,在 360 nm 检测波长下^[9-10],10 批广西龙眼叶药材 HPLC 图谱的相似度均 >0.9,说明不同产地的龙眼叶药材化学成分很相似,所建立的共有模式可用于龙眼叶药材的检测。

指纹图谱反映的是样品整体的特征,进行指纹图谱比较,可以反映样品之间的整体差异以及亲疏程度,本文利用指纹图谱相似度评价软件对结果进行综合评价,避免了人工主观性,可以客观地对样品进行综合评价^[11]。

目前龙眼叶药材中化学成分尚不十分明了,本文通过已有对照品与龙眼叶药材的 HPLC 图谱进行峰的归属匹配,确定了槲皮素、木犀草素及山柰素 3

个成分,其他成分未能得到明确归属匹配,各色谱峰相对应的功效、药理作用也尚不明了,因此有待今后对龙眼叶进行化学成分和药理作用进行深入研究。

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 13 卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:112.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典. 上册[M]. 2 版. 上海:上海科学技术出版社,2006:879.
- [3] 吴妮妮,李雪华. 龙眼化学成分及活性研究进展[J]. 海峡药学,2006,18(4):17.
- [4] 梁洁,滕建北,柳贤福,等. 龙眼叶化学成分预试研究[J]. 中国民族民间医药,2010,19(4):142.
- [5] 梁洁,王雯慧,甄汉深,等. 广西产龙眼叶及花挥发油成分气质联用分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(9):52.
- [6] 陆海峰,赵进,李琳,等. 超声波提取龙眼叶总黄酮及其鉴别[J]. 微量元素与健康研究,2007,24(4):48.
- [7] 陈颖峰,梁志. 龙眼叶中黄酮类物质提取条件的优化[J]. 广东化工,2009,36(8):1967.
- [8] 詹雪艳,史新元,段天璇,等. 色谱指纹图谱相似度方法的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(2):248.
- [9] 朱晓勤,彭水梅,吴锦忠. HPLC 测定截叶铁扫帚不同药用部位中槲皮素、山柰素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(10):80.
- [10] 李慧,许亮,徐保利,等. HPLC 测定地锦草中没食子酸、槲皮素及山柰素含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(7):100.
- [11] 关洪月,李林,刘晓,等. 中药指纹图谱相似度计算方法探析[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(18):282.

[责任编辑 顾雪竹]