

藤梨根药材 HPLC 指纹图谱及质量研究

邸学, 王海波, 杨欣欣, 翟延君*, 王添敏
(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

[摘要] 目的: 建立藤梨根药材的 HPLC-UV 特征指纹图谱, 为其品质评价提供参考。方法: 以乙腈-0.25% 甲酸水为流动相梯度洗脱, 测定波长 280 nm, 指纹图谱相似度评价软件确定共有峰后, 建立藤梨根的标准指纹图谱并计算了每批药材的相似度, 利用聚类分析方法对指纹图谱数据进行分析。结果: 建立了含有 15 个共有指纹峰的藤梨根 HPLC-UV 特征指纹图谱, 并标定熊果酸、油酸、阿魏酸、槲皮素等 7 种共有成分。结论: 该方法快速、准确, 可用于评价藤梨根药材质量。

[关键词] 藤梨根; 指纹图谱; HPLC

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0135-03

[doi] 10.11653/syjf2013100135

Study on HPLC Fingerprint and Quality Control of Radix Actinidiae

DI Xue, WANG Hai-bo, YANG Xin-xin, ZAI Yan-jun*, WANG Tian-min

(School of Pharmaceutical Sciences, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a sensitive and specific HPLC method and a standard fingerprint for quality control of Radix Actinidiae. **Method:** The HPLC characteristic chromatographic profiles of 11 samples from different sources were eluted with the mobile phases of water containing 0.25% formic acid and acetonitrile in gradient mode. The detection wavelength was set at 280 nm. By the similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine (Version 2004 A), mean chromatogram was generated as the representative standard fingerprint and the similarity of each chromatogram against the standard chromatogram was also calculated. Peaks were applied to grade by hierarchical cluster analysis. **Result:** Fifteen main marker peaks were selected in the standard fingerprint and 7 peaks of them were identified. **Conclusion:** The quality control of crude drug can be evaluated by comparing with the standard fingerprint. The method was rapid, accurate, and can be applied for quality assessment of Radix Actinidiae.

[Key words] Radix Actinidiae; HPLC; chromatographic fingerprint

藤梨根又称阳桃根、猕猴桃根、猕猴桃梨根, 为猕猴桃科猕猴桃属植物中华猕猴桃或软枣猕猴桃的根, 具清热解毒、活血散结功效, 是临床常用的抗癌中药之一^[1]。目前对其提取物抗肿瘤作用研究很多^[2-4], 在其化学成分分离上也有相应的研究^[5-6], 但缺少深入的品种、质量评价研究资料。

本实验尝试在前期研究基础上^[7-8], 建立藤梨根特征指纹图谱, 结合高分辨质谱分析, 确定藤梨根药材中酚酸类成分的共有指纹峰及其归属, 并利用聚类分析方法研究不同产地药材的成分(色谱峰)类别, 为完善其质量评价方法提供试验依据。

1 材料

Agilent1100 型高效液相色谱仪(四元梯度泵), Agilent G1969 型飞行时间质谱仪, Agilent Tc-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Instrument online 色谱工作站(Agilent 公司), ACCULAB ALC-110.4 型 1/万天平(SARTORIUS), CP225D 型 1/10 万天平(SARTORIUS), KQ5200DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

[收稿日期] 20121023(007)

[第一作者] 邸学, 硕士, 实验师, 从事中药品种鉴定评价研究, Tel: 15942491966, E-mail: dix_email@163.com

[通讯作者] * 翟延君, 博士, 教授, 从事中药品种鉴定与质量标准研究, Tel: 13019499386, E-mail: lnzyzyj@sohu.com

甲醇、乙腈(色谱纯,天津科密欧),水为超纯水,甲酸、乙醇为分析纯;对照品阿魏酸(成都曼思特生物科技有限公司,批号 A0050);熊果酸(成都曼思特生物科技有限公司,批号 A0139);经 HPLC 检测,纯度均 > 98.0%。槲皮素(中国药品生物制品检定所,批号 100081-200907)。自采药材经辽宁中医药大学药学院翟延君教授鉴定为来源于猕猴桃科软枣猕猴桃 *Actinidia arguta* (Sieb. & Zucc.) Planch. ex Miq. 的根。藤梨根样品来源见表 1。

表 1 藤梨根药材来源表

No.	产地	采收时间	No.	产地	采收时间
S1	辽宁丹东宽甸 1	2010-09-17	S2	辽宁千山中沟	2010-05-19
S3	辽宁千山南沟	2011-06-28	S4	陕西西安	2010-10-12
S5	辽宁本溪桓仁 1	2010-08-07	S6	西安灞桥区	2010-10-19
S7	牡丹江林场 1	2010-05-18	S8	辽宁本溪桓仁 2	2010-10-06
S9	牡丹江林场 2	2011-09-16	S10	辽宁丹东宽甸 2	2011-10-05
S11	辽宁开源	2010-08-23			

2 方法

2.1 色谱条件 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-0.25% 甲酸水(B) 梯度洗脱, 0 ~ 50 min, 10% ~ 15% A; 50 ~ 85 min, 15% ~ 31% A; 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 280 nm, 进样量 10 μL。

飞行时间质谱条件: ESI 源, 负离子模式检测, N₂ 流速 9 L · min⁻¹, 干燥气温度 350 °C, 雾化器压力 35 psi, 毛细管电压 3.5 kV。

2.2 对照品溶液制备 分别精密称取阿魏酸、熊果酸、槲皮素对照品适量, 用甲醇配制成 0.96 g · L⁻¹ 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备 取藤梨根药材粉末(过 40 目筛) 5 g, 精密称定, 加 75% 乙醇 50 mL 超声提取 60 min, 滤过, 滤液蒸干, 加水约 20 mL 分次溶解, 水溶液合并后加乙酸乙酯萃取 4 次, 每次约 20 mL, 合并乙酸乙酯液, 挥干, 残渣加甲醇定容至 5 mL, 即得。

2.4 方法学考察 参照《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》^[9], 选择 3 号样品进行考察。

2.4.1 精密度的试验 取同一供试品溶液, 连续进样 5 次, 各色谱峰的相对保留时间的 RSD 均 > 1.0%, 相对峰面积的 RSD 均 < 2.0%, 结果表明精密度良好, 符合指纹图谱要求。

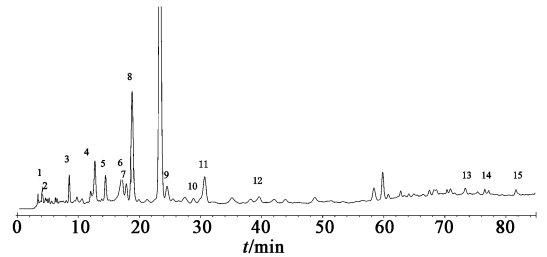
2.4.2 稳定性试验 取同一供试品, 按 2.1 项下色谱条件测定, 分别在 0, 4, 6, 8, 12, 24 h 检测指纹图谱。结果表明各色谱峰的相对保留时间的 RSD

均 < 1.2%, 相对峰面积 RSD 均 < 3.0%, 表明样品在 24 h 内稳定。

2.4.3 重复性试验 取同一样品, 精密称定 5 份, 按 2.3 项下供试品溶液制备方法制备, 按 2.1 项下色谱条件测定, 记录指纹图谱。结果表明 5 份样品的 HPLC 指纹图谱中各色谱峰相对保留时间的 RSD 均 < 1.1%, 相对峰面积的 RSD 均 < 3%, 表明实验方法的重复性良好, 符合指纹图谱技术要求。

2.5 藤梨根指纹图谱的建立

2.5.1 指纹图谱的绘制 在上述色谱条件下, 分别测定 11 批不同产地的藤梨根药材, 记录图谱。对供试品结果进行分析、比较, 利用“中药色谱指纹图谱相似度评价软件”生成藤梨根药材 HPLC 指纹图谱, 标定了 15 个共有指纹峰(图 1), 11 批供试品指纹图谱(图 2)。



1. 熊果酸; 2. 二氢猕猴桃内酯; 4. 油酸;
5. 表儿茶素; 12. 阿魏酸; 13. 棕榈酸; 15. 槲皮素

图 1 藤梨根 S1 号药材 HPLC-UV 指纹图谱

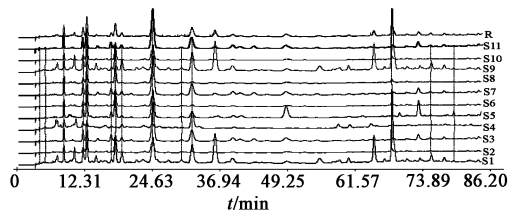
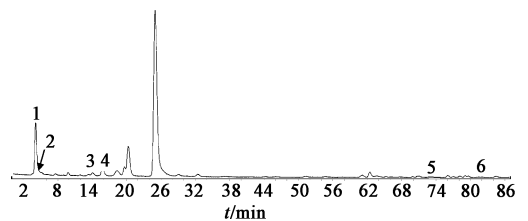


图 2 藤梨根药材 HPLC-UV 指纹图谱共有峰图



1. 熊果酸; 2. 二氢猕猴桃内酯; 3. 油酸;
4. 表儿茶素; 5. 棕榈酸; 6. 槲皮素

图 3 HPLC-TOFMS(负离子模式)分析

2.5.2 参照峰的选择 利用 HPLC 标定 15 个共有峰, 其中利用 HPLC 测定并结合对照品加样, 确定了熊果酸、阿魏酸、槲皮素指纹峰所对应的成分。按照 2.1 项下液相-质谱测定条件, 利用 HPLC-TOF-MS 测定, 根据化学成分质量数推测了二氢猕猴桃内酯、

油酸、表儿茶素、棕榈酸 4 个成分的色谱峰(图 3)。选择 12 号峰(阿魏酸)作为参照峰(S 峰),以其保留时间和峰面积为 1.0,计算各批指纹峰的相对保留时间和相对峰面积。11 批样品共有峰面积情况见表 2。

表 2 不同产地样品色谱峰面积

序号	总面积	相似度	序号	总面积	相似度
样品 1	1 836.5	0.904 0	样品 7	916.69	0.752 5
样品 2	740.8	0.427 9	样品 8	559.7	0.765 3
样品 3	1 593.7	0.750 4	样品 9	1 213.7	0.777 7
样品 4	248.03	0.749 6	样品 10	1 501.6	0.629 6
样品 5	664.7	0.865 1	样品 11	440.2	0.776 7
样品 6	355.6	0.328 6			

结果显示,1,3,5,7,8,9,11 号样品的相似度 > 0.75,而且不同产地样品的共有成分总量(总面积)差异很大,其中采于辽宁宽甸的 1 号样品共有成分总量最大,采于陕西西安的 2 种药材总量最小,能够提示区分不同产地药材的质量情况。

2.6 指纹图谱聚类分析 采用平方欧氏距离作为样本间相似度测度,按照组间连接法分别对相对保留时间和不同产地样品进行分析,结果见图 2。

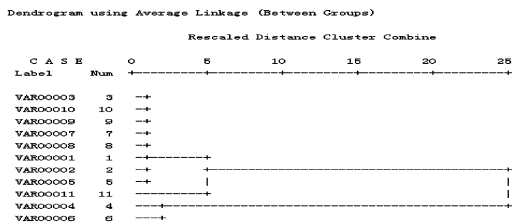


图 2 藤梨根药材指纹图谱聚类分析

由聚类分析结果可知,此方法可将药材分为 3 大类,陕西的两个药材归为 1 类,将辽宁开源的样品归为 1 类,其余样品归为 1 类,直观地实现了不同产地藤梨根药材的成分与品质的区别情况。

3 讨论

通过建立的高效液相色谱条件对不同产地的藤梨根供试品的 HPLC 色谱图进行采集,通过相似度软件匹配计算,得到了藤梨根指纹图谱的 15 个共有峰。结果从各自对照指纹图谱中各共有峰的相对含量来看,虽然同一产地的药材出现了相应的共有峰,但相对的峰面积比值有较大不同,不同产地的藤梨根药材存在较明显的差异,提示这些样本质量可以根据不同样品与基准样品的距离值或利用相似度对药材样品进行定性鉴别,采用指纹谱综合评价体

系来建立藤梨根药材的质量评价标准是有其必要性。

综合相似度评价和聚类分析结果可以看出,2 种分析方法分别从指纹峰成分含量、种类 2 方面对藤梨根药材进行了评价。在以后实验中,在扩大样本数量、收集更多对照品的基础上,应结合活性成分研究实验,进一步探索可以更准确地反应药物作用效果的药材质量评价体系。

[参考文献]

[1] 章红燕,芦柏震,侯桂兰. 我院四年间抗肿瘤中草药用药的调查分析[J]. 中国药业, 2002, 11(6):63.

[2] 曹书芬,国宏莉,张丽,等. 藤梨根乙酸乙酯提取物对人食管癌细胞生长的抑制作用[J]. 山西医科大学学报, 2007, 38(5):413.

[3] 孙雪飞,杜贾军,孟龙,等. 藤梨根提取物抗人肺腺癌 A549 细胞生长的实验研究[J]. 山东医药, 2006, 46(9):40.

[4] 王岚,康琛,杨伟鹏,等. 藤梨根正丁醇提取物和总黄酮苷抗肿瘤作用研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(16):184.

[5] 金永日,桂明玉,马冰如,等. 软枣猕猴桃根化学成分的研究[J]. 中国药理学杂志, 1998, 33(7):402.

[6] 崔莹,张雪梅,陈纪军,等. 中华猕猴桃根的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(16):1663.

[7] 邸学,王海波,翟延君,等. 藤梨根红外光谱聚类分析及可视化鉴别[J]. 光谱实验室, 2012, 29(1):99.

[8] 邸学,王海波,翟延君,等. HPLC 测定藤梨根中熊果酸、齐墩果酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1):66.

[9] 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究技术要求[S]. 2004.

[10] 甄汉深,梁洁,葛静,等. 美味猕猴桃茎与根的 HPLC 指纹图谱初步研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(10):13.

[11] 闫艳,杜晨晖,裴香萍,等. 不同产地酸枣仁药材 HPLC-DAD-ELSD 指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4):61.

[12] 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):284.

[13] 陈丰连,张文进,徐鸿华. 不同采收期及不同产地广金钱草地上部分 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(14):96.

[责任编辑 顾雪竹]