

# 齿叶白鹃梅叶总黄酮提取物 HPLC 指纹图谱研究

祁晓旭, 刘玉强, 才谦\*

(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

**[摘要]** **目的:**建立齿叶白鹃梅叶总黄酮提取物的指纹图谱。**方法:**采用高效液相色谱法进行测定,用国家药典委员会出版的《中药色谱指纹图谱相似度评价》(2004年A版)软件,对10批不同批次的齿叶白鹃梅叶总黄酮提取物中黄酮类成分指纹图谱进行相似度计算。**结果:**测定10批齿叶白鹃梅叶总黄酮的HPLC图谱,建立标准指纹图谱,有19个共有峰,通过与对照品的对照,指认了其中8个化合物色谱峰,各共有峰之间分离度较好;用中药指纹图谱相似度评价系统计算其相似度,各批总黄酮的相似度均>0.90。**结论:**该方法精密性、稳定性及重复性较好,特征性及专属性强,为齿叶白鹃梅综合利用开发提供了科学依据。

**[关键词]** 齿叶白鹃梅叶; 总黄酮; 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)06-0152-03

## HPLC Fingerprint Spectrum of the Flavonoids from *Exochorda serratifolia* Leaves

QI Xiao-xu, LIU Yu-qiang, CAI Qian\*

(College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the fingerprint of total flavonoids from *Exochorda serratifolia* leaves. **Method:** The fingerprint of *E. serratifolia* was established by HPLC. **Result:** Ten samples were determined, 19 common peaks in the fingerprints were positioned with index component of flavonoids. The Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM software was adopted, and the similarity of the fingerprint of flavonoids extracts was greater above 0.90. **Conclusion:** The precision, repeatability and stability of all measurement were up to standard, this study will provide a scientific basis for the development of the *E. serratifolia*.

**[Key words]** *Exochorda serratifolia*; flavonoids; HPLC; fingerprint

齿叶白鹃梅是蔷薇科绣线菊亚科白鹃梅属植物<sup>[1]</sup>,主要生长在辽宁凌源、喀左及河北一带,其花蕾和幼叶可食用。民间多用其预防和治疗糖尿病。本课题组对其化学成分进行了分离分析,从中得到芹菜素、木犀草素、槲皮素、芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷、槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-β-D-新

橙皮糖苷等10种黄酮类化合物<sup>[2-3]</sup>。同时本课题组对齿叶白鹃梅叶进行药理活性研究,证明其确有改善小鼠耐糖量及降血糖作用<sup>[4]</sup>。

本课题组采用大孔树脂法对齿叶白鹃梅叶中的总黄酮进行了富集,并建立了总黄酮提取物中芹菜素-7-O-β-D-新橙皮糖苷的含量及总黄酮含量测定方法来控制齿叶白鹃梅叶总黄酮提取物的质量,但不能反映其他成分的情况,难于真正控制其质量。鉴于植物药具有复杂的化学成分,色谱指纹图谱方法是评价植物药质量的有效方法之一<sup>[5]</sup>。本实验应用HPLC方法<sup>[6]</sup>对齿叶白鹃梅叶总黄酮的指纹图谱进行了研究,建立了齿叶白鹃梅叶总黄酮提取物指纹图谱,为全面控制总黄酮的质量提供了可靠

**[收稿日期]** 20121030(008)

**[第一作者]** 祁晓旭,硕士生,从事中药化学方面的研究, Tel: 15998428712, E-mail: xuxuhappy1987121@sina.com

**[通讯作者]** \*才谦,博士,教授,从事中药化学方面的研究, Tel:0411-87586318, E-mail: caiqianmail@sina.com

方法。

## 1 材料

Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪(真空脱气机、四元泵、柱温箱、VWD、HP1100 化学工作站), (美国安捷伦科技有限公司); KH-300B 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司)。

相似度计算软件:国家药典委员会提供的中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)。

药材采自朝阳凌源县,经辽宁中医药大学植物教研室王冰教授鉴定为齿叶白鹃梅 *Exochorda serratifolia* S. Moore. 叶;总黄酮提取物(采用 50% 乙醇提取,经 D101 大孔树脂富集纯化所得,总黄酮含量 >60%);各对照品从齿叶白鹃梅叶中分得(纯度 >98%);甲醇为色谱纯,水为纯净水,使用前均经 0.45 μm 滤膜虑过;其他试剂均为分析纯。

## 2 方法及结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱 Promosil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-2% 冰乙酸梯度洗脱(表 1), 柱温 25 °C, 进样量 10 μL, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 267 nm。

表 1 流动相梯度洗脱程序

t/min	流速/mL·min <sup>-1</sup>	乙腈/%	2.0% 冰乙酸/%
0	1.0	8	92
5	1.0	12	88
31	1.0	18.5	81.5
40	1.0	18.5	81.5
40.01	1.0	20	80
90	1.0	90	10

**2.2 对照品溶液的制备** 取槲皮素-3-*O*-β-*D*-半乳糖-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、对羟基桂皮酸、槲皮素-7-*O*-β-*D*-新橙皮糖苷、芦丁、木犀草素-7-*O*-β-*D*-新橙皮糖苷、芹菜素-7-*O*-β-*D*-新橙皮糖苷、木犀草素和芹菜素各对照品适量,至 10 mL 量瓶中,分别甲醇定容,制成对照品溶液,备用。

**2.3 供试品溶液的制备** 取各批次总黄酮样品 50 mg,置 50 mL 量瓶中,加入甲醇 40 mL,超声处理 10 min,甲醇定容至刻度,0.45 μm 滤膜虑过,即得。

### 2.4 色谱条件的选择及结果

**2.4.1 色谱流动相的选择** 精密称取总黄酮样品 50 mg,按供试品溶液制备方法制备。吸取供试品溶液 10 μL,注入液相色谱仪,分别以乙腈-水,甲醇-冰乙酸水,乙腈-冰乙酸水等不同溶剂系统及不同梯度进行检测。经比较,以乙腈-2% 冰乙酸溶液进行梯

度洗脱时,各色谱峰分离效果最好,得到色谱峰形较好,且较稳定。经反复摸索流动相梯度变化程序,最终确定上述表 1 梯度洗脱程序。

**2.4.2 检测波长的选择** 比较了 256, 267, 350, 365 nm 各波长下的色谱图,在 267 nm 波长下色谱图基线稳定,包含的信息量较大,峰信号强。

**2.4.3 分离柱温的选择** 考察了分离柱温对齿叶白鹃梅叶总黄酮指纹图谱的检测影响。结果显示,柱温变化对各色谱峰的保留时间和峰面积影响不大。但在恒温条件下,各色谱峰保留时间和峰面积的稳定性和重复性均得到明显改善,实验选择分离柱温为 25 °C。

**2.5 参照峰的选择** 芦丁是从齿叶白鹃梅叶中分离得到的含量比较高的化合物。在本实验条件下,其色谱峰为图谱中 7 号峰,其色谱保留时间和峰面积稳定,与相邻其他色谱峰分离较好,故选为指纹图谱的内参物。

### 2.6 方法学考察

**2.6.1 精密度试验** 取同一供试品溶液 10 μL,连续进样 5 次,结果各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3%,符合色谱指纹图谱研究技术的要求。

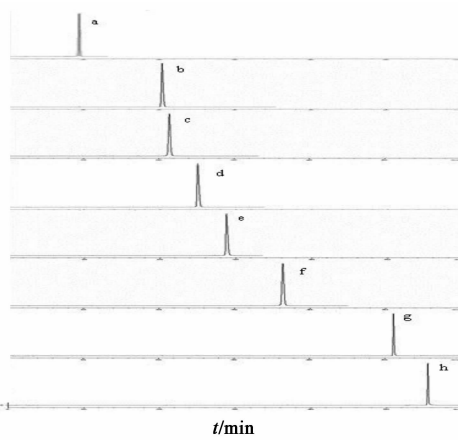
**2.6.2 稳定性试验** 取同一供试品溶液 10 μL,分别在 0, 3, 6, 9, 12, 24 h 检测指纹图谱,计算各色谱峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3%,表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定,符合色谱指纹图谱研究技术的要求。

**2.6.3 重复性试验** 取同一批样品 5 份,按 2.3 项下方法制备供试品溶液并检测指纹图谱,计算各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积及其 RSD < 3%,符合色谱指纹图谱研究技术的要求。

### 2.7 指纹图谱测定<sup>[7-9]</sup>

**2.7.1 齿叶白鹃梅总黄酮指纹图谱的建立** 分别将各对照品溶液及 10 批齿叶白鹃梅叶总黄酮提取物供试品溶液各 10 μL 注入高效液相色谱仪,按确定的色谱条件进行测定,并记录 60 min 内的色谱图,各对照品溶液和齿叶白鹃梅叶总黄酮提取物供试品溶液色谱图见图 1, 2。

**2.7.2 共有峰的确定和化合物的指认** 测定了 10 批齿叶白鹃梅叶总黄酮提取物的指纹图谱,在 10 批样品的指纹图谱中,其相对保留时间及色谱峰较稳定的峰有 19 个,确定为齿叶白鹃梅叶总黄酮提取物共有峰,即 1 ~ 19 号峰。通过与对照品的对照,指认了其中 8 个化合物色谱峰。即 4 号峰为槲皮素-3-



a. 槲皮素-3-*O*- $\beta$ -D-半乳糖-7-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷; b. 对羟基桂皮酸;  
c. 槲皮素-7-*O*- $\beta$ -D-新橙皮糖苷; d. 芦丁;  
e. 木犀草素-7-*O*- $\beta$ -D-新橙皮糖苷; f. 芹菜素-7-*O*- $\beta$ -D-新橙皮糖苷;  
g. 木犀草素; h. 芹菜素

图 1 对照品液相色谱

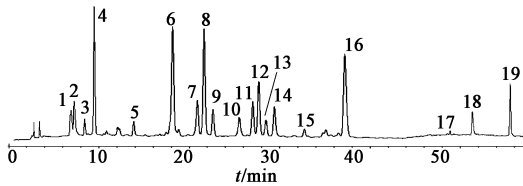


图 2 齿叶白鹃梅叶总黄酮提取物 HPLC 指纹图谱

*O*- $\beta$ -D-半乳糖-7-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷, 7 号峰为对羟基桂皮酸, 8 号峰为槲皮素-7-*O*- $\beta$ -D-新橙皮糖苷, 10 号峰为芦丁, 13 号峰为木犀草素-7-*O*- $\beta$ -D-新橙皮糖苷, 16 号峰为芹菜素-7-*O*- $\beta$ -D-新橙皮糖苷, 18 号峰为木犀草素, 19 号峰为芹菜素。

**2.7.3 不同批次齿叶白鹃梅叶总黄酮提取物的指纹图谱相似度评价** 将 10 批齿叶白鹃梅叶总黄酮提取物供试品溶液的指纹图谱采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)”软件进行数据处理, 生成齿叶白鹃梅叶总黄酮提取物对照指纹图谱, 以此为基准, 进行相似度计算。结果 10 批齿叶白鹃梅叶总黄酮提取物的相似度分别为 0.967, 0.956, 0.954, 0.978, 0.972, 0.957, 0.968, 0.987, 0.978, 0.992。10 批齿叶白鹃梅总黄酮提取物样品色谱叠加图如图 3。

### 3 讨论

色谱指纹图谱用于中药鉴别提供的信息丰富, 对于保证药品质量稳定和提高中药质量控制水平具有重要意义<sup>[10]</sup>。本实验对齿叶白鹃梅叶总黄酮提

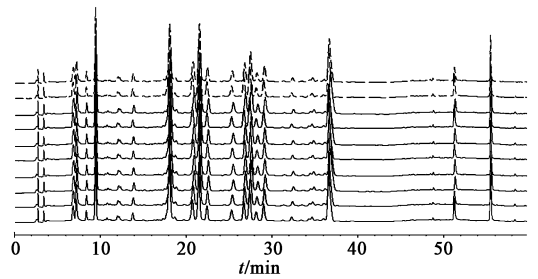


图 3 10 批齿叶白鹃梅叶总黄酮提取物 HPLC 指纹图谱叠加图  
取物建立了 HPLC 指纹图谱分析方法, 10 批总黄酮提取物样品指纹图谱相似度均 >0.9, 有效成分能在色谱图中得到充分体现, 所建立的色谱指纹图谱具有较好的稳定性、重复性和稳定性, 可用于齿叶白鹃梅叶总黄酮提取物的质量控制。

### [参考文献]

[1] 傅沛云. 北植物检索表[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1995: 283.  
[2] 才谦, 王灵芝, 刘玉强, 等. 齿叶白鹃梅叶化学成分研究[J]. 中草药, 2012, 43(4): 673.  
[3] 才谦, 王聪, 刘玉强. 齿叶白鹃梅叶中黄酮类成分的分离与结构鉴定[J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28(3): 190.  
[4] 王聪, 刘玉强, 才谦. 齿叶白鹃梅叶对小鼠糖耐量的影响及降糖作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(2): 283.  
[5] 王睿, 徐伟, 方翼. 中药指纹图谱研究进展[J]. 中国药师, 2004, 7(10): 764.  
[6] 李宇翔, 王丽, 唐书明, 等. 虎杖 HPLC 指纹图谱研究与应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5): 78.  
[7] 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.  
[8] 范莉, 濮润, 赵海誉, 等. 红花药材的 HPLC 指纹图谱及质量研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1): 37.  
[9] 张明昶, 彭小冰, 苗旭辉, 等. 中药虎杖特征指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1): 53.  
[10] 郝旭亮, 张素琼, 王晓剑, 等. 罗布麻总黄酮高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(16): 1968.

[责任编辑 顾雪竹]