

湖北海棠 HPLC 指纹图谱的研究

冯改利¹, 郭东艳^{1*}, 李瑾¹, 师延琼², 汪鋈植²

(1. 陕西中医学院药学院, 陕西 咸阳 712046;

2. 天然产物研究与应用湖北省重点实验室, 湖北 宜昌 443002)

[摘要] 目的: 研究湖北海棠 HPLC 指纹图谱。方法: 采用高效液相色谱法, Hypersil BDS C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 乙腈-水梯度洗脱, 检测波长为 287 nm, 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C。结果: 确定了湖北海棠的 10 批指纹图谱共有模式, 进行了相似度比较。结论: 所建立的方法可用于湖北海棠指纹图谱测定, 并可对其今后规范药用资源及质量评价提供科学依据。

[关键词] 湖北海棠; 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(2011)16-0067-03

Study on Fingerprint of *Malus hupehensis* by HPLC

FENG Gai-li¹, GUO Dong-yan¹, LI Jin¹, SHI Yan-qiong², WANG Jun-zhi²

(1. The Medicine College of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China;

2. Hubei Key Laboratory of Natural Products Research and Development, Yichang 443002, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the fingerprints of *Malus hupehensis* by HPLC. **Method:** Hypersil BDS C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column was used and the acetonitrile-water was chosen as the mobile phase in a gradient mode. The column temperature was at 25 °C and the detection wavelength was at 287 nm. The detection time was 70 min and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **Result:** There were eleven characteristic peaks indicated in fingerprints. **Conclusion:** This method is simple and accurate with a good reproducibility. It provides a reference standard for the quality control of *M. hupehensis*.

[Key words] *Malus hupehensis*; HPLC; fingerprints

湖北海棠 *Malus hupehensis* (Pamp.) Rehd 又名野海棠、野花红、花红茶、茶海棠、林檎茶, 为药食两用植物, 属蔷薇科苹果属落叶小乔木^[1]。湖北海棠干叶中主要含有黄酮、茶多酚、蛋白质各种矿物质等。国内外学者研究报道湖北海棠具有抗氧化、降血糖、抑菌与耐缺氧、耐低温、抗疲劳作用等, 主要用于治疗慢性肝炎、脂肪肝、急慢性肝损伤、高血糖、高

血脂等^[2-3]。湖北海棠集中分布于我国重庆东部、湖北西部、湖南西北部、陕西南部地区。由于长期适应各地的生长环境和作为嫁接苹果的砧木使用, 形成了很多种下类型。其中较多的是变叶海棠 *Malus toringoides* (Rehd.) Hughes 和平邑甜茶 *M. hupehensis* var. *pinyiensis* Jiang。变叶海棠、平邑甜茶是否能够代替湖北海棠作为药用资源品种应用尚不得而知。本文以 HPLC 对湖北海棠的指纹图谱进行分析研究, 旨在为今后规范药材资源及质量评价提供科学依据。

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪 (Waters 2695, Waters 2996 PAD 检测器) 含在线真空脱气机、四元梯度泵、自动进样器、柱温箱。色谱数据的采集与处理由

[收稿日期] 20110315(010)

[基金项目] 陕西省科技厅计划项目(2008K16-04)

[第一作者] 冯改利, 学士, 从事中药药效相质基础研究, Tel: 029-38185180, E-mail: fgl258@163.com

[通讯作者] * 郭东艳, 博士, 教授, 从事中药新制剂与新剂型研究, Tel: 029-38185180, E-mail: winter180@163.com

Waters 化学工作站完成。SB3200DT 超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司);乙腈、甲醇为色谱纯,水为超纯水;其他试剂均为分析纯。

湖北海棠天然产物研究与开发湖北省重点实验室提供,经三峡大学汪鋆植教授鉴定为苹果属湖北海棠 *Malushupehensis* (Pamp.) Rehd 的干燥叶。湖北海棠 10 批样品由实验室自制(批号分别为 20100912, 20100921, 20101003, 20101018, 20101106, 20101106, 20101124, 20101202, 20101210, 20101218, 20101226)。

2 方法与结果

2.1 样品的制备 取湖北海棠叶 1 g, 加入 10 mL 甲醇超声提取 30 min, 过滤, 取续滤液, 以 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.2 方法学考察

2.2.1 色谱条件的考察

2.2.1.1 检测波长的考察 为获得更多的色谱信息, 笔者使用 3D 数据采集对样品在 200 ~ 600 nm 的谱图信息进行了考察, 结果见图 1。从图 1 中可以看出在 287 nm 下色谱峰较多且各色谱峰的分度度较好, 故选择 287 nm 作为检测波长。

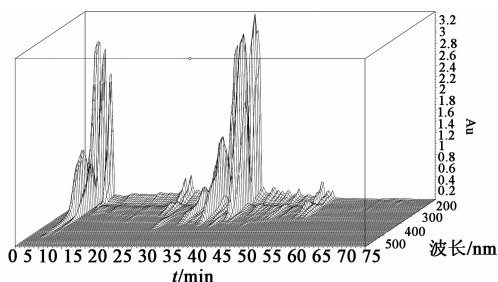


图 1 3D 数据采集对检测波长的考察

2.2.1.2 色谱柱考察 在实验过程中, 分别考察了 Akasil-C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), AQUASIL C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 及 Hypersil BDS C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 结果以 Hypersil BDS C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 峰形对称, 分离度较好, 故采用其作为指纹图谱考察用。

2.2.1.3 流动相体系的考察 在流动相的选择时, 分别考察了不同比例的乙腈-水系统和甲醇-水系统, 结果表明以乙腈-水系统色谱峰的分布明显优于甲醇-水系统, 且分离度较好, 故最终选择乙腈-水系统作为流动相。

2.2.1.4 对流动相比例的优化 根据尽可能得到最多的色谱峰和最大分离度的原则, 对乙腈-水系统

进行了不同比例的优化选择, 结果表明最佳条件为 Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈 (A)-水 (B) 梯度洗脱, 0 ~ 15 min 5% ~ 20% A, 15 ~ 40 min 20% A, 40 ~ 60 min 20% ~ 40% A, 60 ~ 70 min 40% ~ 5% A; 检测波长 287 nm; 柱温室温; 流速 1 mL · min⁻¹。在此条件下 10 批湖北海棠能检出 11 个共有色谱峰。

2.2.2 精密度考察 精密称取 20100912 样品, 按 2.1 项下样品制备方法制样, 于高效液相连续进样 5 次, 记录色谱图。进行了保留时间精密度考察, 结果 RSD > 3%, 表明仪器精密度良好。

2.2.3 稳定性考察 精密称取 20100912 样品, 按 2.1 项下样品制备方法制样, 分别于 0, 2, 4, 8 h 进样, 记录色谱图。进行了保留时间精密度考察, 结果 RSD < 3%, 表明稳定性良好。

2.2.4 重复性考察 精密称取同一份样品 (20100912) 5 份, 按 2.1 项下样品制备方法制样, 按照 2.1.1.4 项下色谱条件进行分析, 每次进样 10 μL, 记录色谱图。结果色谱峰保留时间的 RSD < 3%, 表明重复性良好。

2.2.5 延长测试时间测试滞后峰 将色谱峰采集时间延长至 2 h, 未出现滞后峰。

2.3 湖北海棠指纹图谱测定

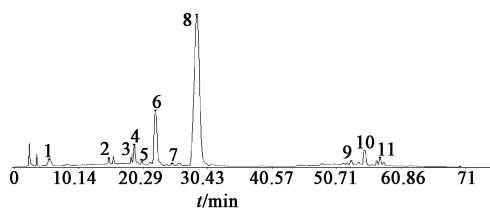
2.3.1 参照峰的选择 根皮苷为湖北海棠的主要成分, 将根皮苷对照品色谱图与样品色谱图中相应位置的色谱峰进行比较, 以选择的流动相进行梯度洗脱, 其相对保留时间与紫外吸收光谱一致的峰是 8 号峰, 故样品图谱中的 8 号特征峰为根皮苷, 在各批次样品的色谱图中根皮苷的分离度好, 无杂质干扰, 峰面积较大, 处于色谱峰的中间位置, 且比较稳定, 故确定其为参照峰 (S), 将其保留时间、峰面积值均设为 1.0, 分别计算各峰相对保留时间和相对峰面积。

各共有峰的相对保留时间依次为: 0.190 7(1), 0.542 7(2), 0.641 6(3), 0.659 2(4), 0.698 9(5), 0.773 9(6), 0.860 4(7), 1(S), 1.852 3(9), 1.927 6(10), 2.022 5(11)。相对峰面积依次为: 0.002 4(1), 0.010 8(2), 0.007 2(3), 0.028 9(4), 0.004 5(5), 0.177 2(6), 0.005 0(7), 1(S), 0.009 1(9), 0.045 5(10), 0.011 2(11)。

2.3.2 共有峰的指定 采用国家药典委员会开发的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 A 版》

对 10 批样品色谱图相关参数进行比较分析,最终确定在 287 nm 波长下共有峰 11 个。

2.3.3 各样品对照指纹图谱 根据建立的指纹图谱方法,依法对 10 批样品以中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件进行匹配分析后,按照中位数法建立各样品的对照指纹图谱,结果见图 2。



1~11. 共有峰

图 2 样品的对照指纹图谱

2.3.4 相似度分析 采用中药指纹图谱处理软件,得到 10 批湖北海棠 HPLC 指纹图谱叠加图,并对 10 批次样品与对照图谱进行整体相似度评价,结果 10 批样品与对照指纹图谱相比,相似度均在 0.9 以上。表明所建立的对照指纹图谱具有较好的代表性,能够用于湖北海棠的指纹图谱比较测定。结果见图 3 及表 1。

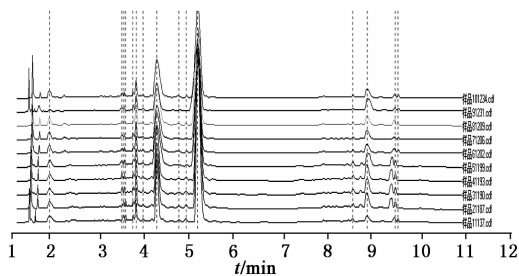


图 3 10 批湖北海棠 HPLC 指纹图谱叠加

表 1 湖北海棠指纹图谱相似度

No.	相似度	No.	相似度
1	0.977	6	0.973
2	0.997	7	0.961
3	0.999	8	0.965
4	1	9	0.958
5	0.975	10	0.971

3 讨论

中药现代化的关键之一是建立中药现代质量评价体系,而无论是薄层鉴别,还是含量测定,都无法全面系统地揭示中药的内在质量。指纹图谱具有整体性和模糊性统一的特点,提供的有效信息较单一化学对照品作为鉴定依据要丰富得多,同时,它也是目前能够为国内外广泛接受的一种中药质量评价模式^[4]。本文采用 HPLC,通过对 10 个批次的湖北海棠指纹图谱分析,初步构建了湖北海棠的指纹图谱,并进行了相似度评价,为湖北海棠药材及今后制剂的质量控制提供了科学依据。

通过图 3 可以看出,在所建立的色谱条件下,各色谱峰分离效果较好。湖北海棠指纹图谱的共有特征峰,其分离度也较好,同时 10 批样品指纹图谱的概貌也表现出较好的一致性,能够较为全面地反映湖北海棠的特征。

[参考文献]

- [1] Zaldivar J, Nielsen J, Olsson L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration[J]. *Applied Microbiol Biotechnol*, 2001, 56(1/2): 17.
- [2] Sylvain Guyot, Solenn Serrand, Jean Michel Le Qur, et al. Enzymatic synthesis and physicochemical characterisation of phloridzin oxidation products (POP), a new water-soluble yellow dye deriving from apple [J]. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2007, 8: 443.
- [3] Yusuke I, Ito Shiyuki Kida, Shinji Sakuma, et al. Polymer-phloridzin conjugates as an anti-diabetic drug that inhibits glucose absorption through the Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) in the small intestine [J]. *J Controlled Release*, 2008, 125: 42.
- [4] 陶金华,狄留庆,文红梅,等. 中药指纹图谱谱效相关性研究思路探讨[J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(18): 2410.

[责任编辑 蔡仲德]