

美味猕猴桃茎与根的 HPLC 指纹图谱初步研究

甄汉深*, 梁 洁, 葛 静, 李生茂, 丘 琴, 杜 秀
(广西中医学院, 广西 南宁 530001)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 色谱指纹图谱, 对美味猕猴桃茎与根药材进行比较, 以考察指纹图谱的鉴别效果。方法: 将美味猕猴桃茎与根各自的对照指纹图谱进行比较, 比较各自的共有峰个数以及各自共有峰的相对含量, 并比较美味猕猴桃茎与根药材指纹图谱间的相似性。结果: 茎的共有峰为 28 个, 根的共有峰为 27 个, 其中茎与根共有峰为 15 个。茎与根药材的相似度相差较大。结论: 美味猕猴桃茎与根药材在相同的色谱条件下存在较明显的差异, 建立的高效液相指纹图谱色谱条件可以用于两者的鉴别。

[关键词] 美味猕猴桃茎与根; 高效液相色谱法; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)10-0013-04

美味猕猴桃为猕猴桃科猕猴桃属植物。本课题组曾对美味猕猴桃茎的化学成分及生药鉴别进行初步研究^[1-3]。为了弄清其茎与根的化学成分有何差异, 是否也具有抗肿瘤作用, 我们对不同来源的美味猕猴桃茎与根的高效液相指纹图谱进行分析与比较, 为进一步结合化学成分和药理研究进行美味猕猴桃茎与根的系统的质量分析比较和科学合理选择药用部位提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent1100 高效液相色谱仪, 含在线真空脱气机(G-1322A), 高压四元梯度泵(G-1311A), 标准自动进样器(G-1313A), 智能化柱温箱(G-1316A), 可变波长检测器(G-1314A), 二级管阵列检测器, Agilent1100, Series 色谱工作站; LG16-W 高速微量离心机; KQ-200VDB 型双频数控超声波清洗器; Millipore Simplicity-185 超纯水器; BP211D 电子分析天平。

1.2 试剂与样品 甲醇和乙腈为色谱纯, 乙酸乙酯和磷酸为分析纯, 水为超纯水; 对照品: 槲皮苷对照品由中国药品生物制品检定所提供(批号: 110753-

200212)。药材: 为猕猴桃科猕猴桃属植物美味猕猴桃 *Actinidia deliciosa* C. F. Liang et A. R. Ferguson. 的干燥茎与根, 经中国科学院广西植物研究所植物分类室鉴定, 实验所用各产地美味猕猴桃茎与根药材于广西北部地区收集, 产地和采收时间见表 1。

表 1 不同产地美味猕猴桃茎与根药材来源

	样品编号	来源	收集时间
茎药材	A1	桂林雁山植物园	2006. 03
	A2	桂林九屋镇	2006. 06
	A3	兴安县大溶江镇	2006. 06
	A4	桂林雁山植物园	2006. 07
	A5	龙胜县西江坪自然保护区	2006. 10
	A6	兴安县大溶江镇	2006. 10
	A7	柳州三江林溪乡	2006. 11
	A8	桂林九屋镇	2006. 12
	A9	桂林雁山植物园	2006. 12
	A10	资源县瓜里乡	2006. 12
	A11	全州大西江自然保护区	2006. 12
	A12	资源县瓜里乡	2007. 03
	A13	全州大西江自然保护区	2007. 04
	A14	龙胜县西江坪自然保护区	2007. 04
	A15	兴安县猫耳山	2007. 05
A16	兴安县大溶江镇	2007. 05	
根药材	B1	龙胜县西江坪自然保护区	2007. 04
	B2	兴安县大溶江镇	2006. 10
	B3	桂林雁山植物园	2006. 03

[收稿日期] 2009-02-16

[基金项目] 国家自然科学基金地区联合资助项目(30160095); 广西教育厅科研项目(200810LX107); 广西高校人才小高地建设创新团队资助计划(G2006047)

[通讯作者] * 甄汉深, Tel: (0771) 2219867; E-mail: 8zhen@163.com

2 实验方法

2.1 色谱条件 色谱柱 Thermo Hypersil BDS C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸梯度洗脱, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 20 °C, 检测波长 296 nm, 进样量 20 μL, 梯度洗脱程序见表 2。

表 2 流动相组成及梯度

时间(min)	乙腈(%)	0.1% 磷酸(%)
0	7	93
29	21	79
31	24	76
39	29	71
46	37	63
51	50	50
58	50	50
59	60	40
67	60	40
69	75	25
71	85	15
85	85	15

2.2 对照品溶液的制备 精密称取槲皮苷对照品适量, 用甲醇配制成 0.16 mg · mL 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 分别取美味猕猴桃茎与根药材粉末(过 4 号筛)各 1.0 g, 精密称定, 加 75% 乙醇 50 mL 超声提取 60 min, 滤过, 滤液挥干, 加水约 20 mL 使其呈悬浮液, 加乙酸乙酯萃取 4 次, 每次约 20 mL, 合并乙酸乙酯, 挥干, 残渣加甲醇定容至 5 mL, 通过孔径为 0.45 μm 的微孔滤膜, 滤液为供试品溶液。

2.4 方法学考察 为了考察分析方法的可靠性, 参照《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》^[4], 以 1 号美味猕猴桃茎药材为例进行了精密度、稳定性和重复性的考察。

2.4.1 精密度试验 取同一供试品, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 连续进样 5 次, 各色谱峰的相对保留时间的 RSD 均小于 0.4%, 相对峰面积的 RSD 均小于 3%, 结果表明, 仪器的精密度良好, 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 均小于 0.7%, 相对峰面积的 RSD 均小于 3%, 表明样品在 24 h 内稳定。

2.4.3 重复性试验 取同一批号美味猕猴桃茎药材粉末 5 份, 精密称定, 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 均小于 0.1%, 相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%, 表明实验方法的重复性良好, 符合指纹图谱要求。

2.5 美味猕猴桃茎与根指纹图谱的分析与比较

2.5.1 美味猕猴桃茎药材指纹图谱的建立^[4] 根据 16 批不同产地的美味猕猴桃茎药材 HPLC 指纹图谱检查结果, 利用“中药色谱指纹图谱相似度评价软件”生成美味猕猴桃茎药材共有模式的对照 HPLC 指纹图谱见图 1, 其中共有峰 28 个, 12 号峰为槲皮苷的指纹峰, 其峰面积较大, 与相邻峰分离良好, 出峰位置适中, 其峰高与峰面积较为适中。故选定槲皮苷为指纹图谱参照峰, 其色谱峰为参照峰 S, 以其保留时间和峰面积为 1, 计算各峰的相对保留时间和峰面积比值。16 批美味猕猴桃茎药材的指纹图谱见图 2。

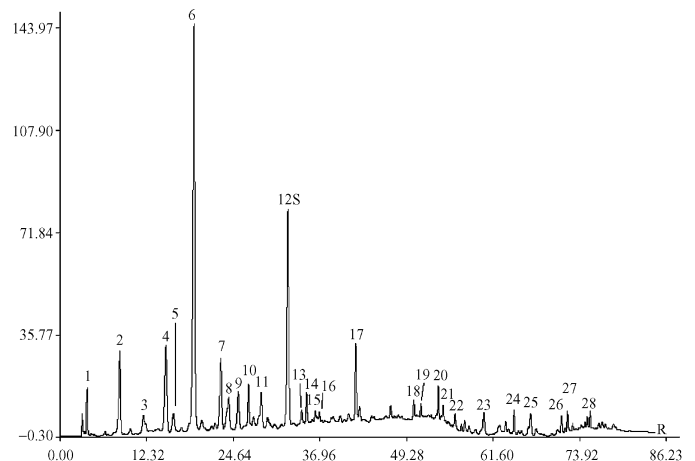


图 1 美味猕猴桃茎药材的对照 HPLC 指纹图谱

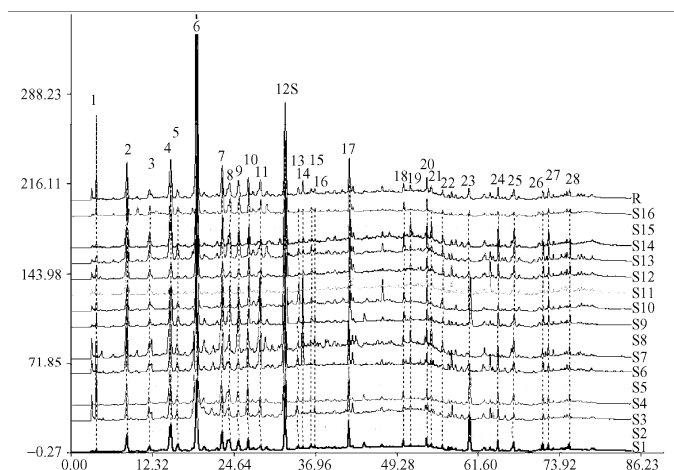


图 2 16 批美味猕猴桃茎药材高效液相色谱叠加图

2.5.2 美味猕猴桃根药材指纹图谱的建立^[6]: 根据 3 批不同产地的美味猕猴桃根药材 HPLC 指纹图谱检查结果, 利用“中药色谱指纹图谱相似度评价软件”生成美味猕猴桃根药材共有模式的对照 HPLC 指纹图谱见图 3, 其中共有峰 27 个。3 批美味猕猴桃根药材的指纹图谱见图 4。

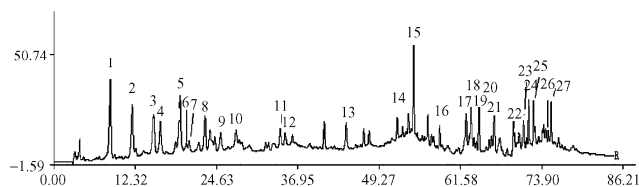


图 3 美味猕猴桃根药材的对照 HPLC 指纹图谱

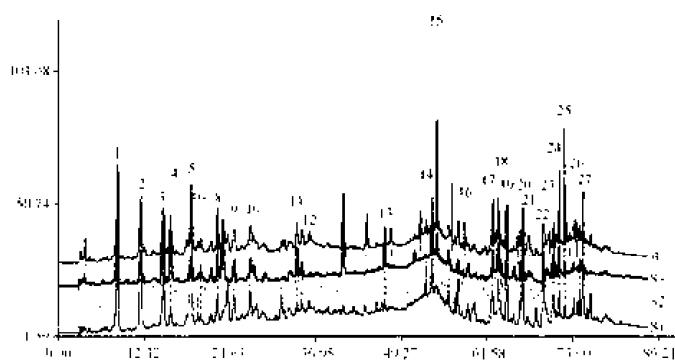


图 4 3 批美味猕猴桃根药材高效液相色谱叠加图

2.5.3 美味猕猴桃茎与根药材共有峰面积的比较
美味猕猴桃茎与根药材的对照指纹图谱相比较, 两者各自的共有峰个数和各共有峰的相对含量比较结果见表 3 和表 4。

比较表 3 和表 4 可知, 3 批不同来源的美味猕猴桃根药材有共有峰 27 个; 在美味猕猴桃茎的 HPLC 指纹图谱中, 共有峰的数目为 28 个。通过相似度软件自动匹配, 其中茎与根 HPLC 指纹图谱之间的共有峰为 15 个。该 15 个共有峰出峰时间依次为: 8.5, 11.9, 15.0, 16.1, 19.0, 22.9, 25.3, 34.3, 35.0, 53.8, 54.5, 64.6, 66.9, 71.3, 75.4 min。

比较表 3 和表 4 可知, 在 3 批美味猕猴桃根药材的对照指纹图谱中, 各峰的相对含量比较均衡且不高, 占总峰面积比例大于 5% 的仅有 1 号峰和 5 号峰, 且所占相对含量也都不高, 仅为 6.28% 和 5.16%; 在 16 批美味猕猴桃茎药材中, 有几个峰的相对含量较高, 占总峰面积比例大于 5% 的有 4 号、6 号和 12 号峰, 且后两者的相对含量较高, 分别为 27.30% 和 13.51%。就出峰相对靠后的色谱峰来说, 根药材各峰的相对含量普遍比茎药材的高一些, 表明, 极性较低的成分在美味猕猴桃根部位中的含

量较茎部位的高一些。

表 3 16 批美味猕猴桃茎药材的对照指纹图谱中各共有峰的峰面积

峰号	保留时间 (min)	共有峰峰面积	各共有峰占总峰面积的比例 (%)
1	3.84	211.9	2.07
2	8.45	477.386	4.65
3	11.90	136.086	1.33
4	15.03	688.804	6.71
5	16.12	140.916	1.37
6	19.03	2 800.911	27.30
7	22.85	483.18	4.71
8	23.96	306.252	2.98
9	25.33	259.78	2.53
10	26.80	212.881	2.07
11	28.61	273.541	2.67
12	32.41	1 385.976	13.51
13	34.35	87.432	0.85
14	35.05	148.007	1.44
15	36.31	60.343	0.59
16	36.88	46.868	0.46
17	42.08	382.071	3.72
18	50.31	81.416	0.79
19	51.33	54.708	0.53
20	53.83	124.38	1.21
21	54.47	71.549	0.70
22	56.19	74.698	0.73
23	60.19	195.656	1.91
24	64.59	104.859	1.02
25	66.96	144.637	1.41
26	71.35	85.481	0.83
27	72.21	81.876	0.80
28	75.42	59.853	0.58

2.5.4 美味猕猴桃茎与根药材的指纹图谱相似性比较 通过国家药典颁布的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统版 A》软件, 将 16 批不同来源的美味猕猴桃茎与 3 批不同来源的美味猕猴桃根色谱图的 HPLC 指纹图谱进行比较。采用软件的中位数相关系数法生成对照图谱, 时间窗为 0.2 min。通过软件自动匹配, 可知不同来源的茎与根之间有 15 个共有峰, 其色谱叠加图见图 5, 相似度结果见表 5。

表 4 3 批美味猕猴桃根药材的对照指纹图谱中各共有峰的峰面积

峰号	保留时间 (min)	共有峰峰面积	各共有峰占总峰面积的比例 (%)
1	8.53	628.113	6.28
2	11.88	469.309	4.70
3	15.06	410.014	4.10
4	16.10	302.422	3.03
5	19.07	515.861	5.16
6	20.04	47.72	0.48
7	20.47	77.572	0.78
8	22.87	288.455	2.89
9	25.26	133.798	1.34
10	27.60	184.678	1.85
11	34.30	125.859	1.26
12	34.97	98.688	0.99
13	46.93	100.497	1.01
14	52.80	48.137	0.48
15	53.73	144.949	1.45
16	54.55	149.878	1.50
17	62.40	301.93	3.02
18	63.65	86.494	0.87
19	64.41	281.554	2.82
20	66.36	125.594	1.26
21	66.73	316.024	3.16
22	69.70	384.462	3.85
23	71.16	268.532	2.69
24	72.16	307.484	3.08
25	72.74	239.918	2.40
26	74.91	100.179	1.00
27	75.35	239.829	2.40

表 5 美味猕猴桃茎与根药材 HPLC 指纹图谱相似度计算结果

		药材名称及来源	相似度
茎药材	A1	桂林雁山植物园	0.95
	A2	桂林九屋镇	0.98
	A3	兴安县大溶江镇	0.96
	A4	桂林雁山植物园	0.94
	A5	龙胜县西江坪自然保护区	0.98
	A6	兴安县大溶江镇	0.96
	A7	柳州三江林溪乡	0.97
	A8	桂林九屋镇	0.98
	A9	桂林雁山植物园	0.95
	A10	资源县瓜里乡	0.97
	A11	全州大西江自然保护区	0.99
	A12	资源县瓜里乡	0.99
	A13	全州大西江自然保护区	0.98
	A14	龙胜县西江坪自然保护区	0.98
	A15	兴安县猫耳山	0.93
	A16	兴安县大溶江镇	0.99
根药材	B1	龙胜县西江坪自然保护区	0.55
	B2	兴安县大溶江镇	0.45
	B3	桂林雁山植物园	0.51

3 讨论

本实验通过建立的高效液相色谱条件对美味猕猴桃茎与根供试品的 HPLC 色谱图进行采集, 并从茎与根各自生成的对照指纹图谱及通过相似度软件匹配计算等方面对美味猕猴桃茎与根进行比较, 实验结果表明, 在该色谱条件下, 美味猕猴桃茎与根存在较明显的差异: 从各自对照指纹图谱中各共有峰的相对含量来看, 茎有几个相对含量较大的峰而根中各峰的相对含量较均衡, 几乎没有相对含量较大的峰。但就极性较低的成分(出峰时间相对靠后的峰)而言, 在根中的含量较茎中的稍多一些。同时, 通过相似度软件自动匹配, 得到了美味猕猴桃茎与根指纹图谱的 15 个共有峰, 分离度好。可为今后进行峰归属研究其化学成分打下了基础, 为进一步结合化学成分和药理研究进行美味猕猴桃茎与根的质量分析比较提供依据。

[参考文献]

- [1] 甄汉深, 梁洁, 梁臣艳, 等. 广西美味猕猴桃茎化学鉴别的初步研究[J]. 广西中医药, 2006, 29(5): 49-50.
- [2] 梁洁, 甄汉深, 梁臣艳, 等. 美味猕猴桃茎醋酸乙酯部位化学成分的研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(7): 1555-1556.
- [3] 吴怀恩, 甄汉深, 梁洁, 等. 美味猕猴桃茎的生药鉴别[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(6): 1281-1282.
- [4] 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究技术要求(暂行). 2004.

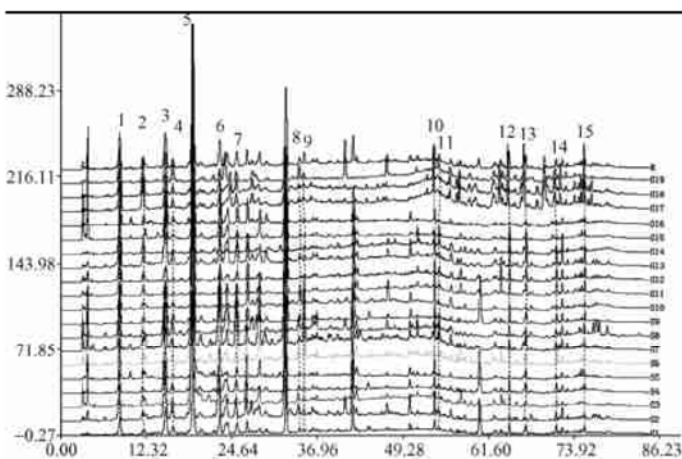


图 5 不同来源美味猕猴桃茎与根的 HPLC 色谱叠加图