

山楂高效液相指纹图谱研究

汤树良¹, 杨 滨¹, 黄璐琦¹, 罗永明¹, 张文惠²

(1 中国中医研究院中药研究所, 北京 100700; 2 江西中医学院, 江西 南昌 330006)

摘要: 目的: 建立山楂药材高效液相色谱指纹图谱。方法: SymmetryShieldWaters RP₁₈ 柱, 乙腈-0.5% 醋酸水液梯度洗脱, 流速 1.0ml·min⁻¹, 检测波长 355nm, 柱温 40℃。结果与讨论: 建立了山楂药材高效液相色谱指纹图谱, 为不同植物来源山楂药材的鉴别提供了依据。

关键词: 山楂; HPLC; 指纹图谱

中图分类号: R284.1 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2004)04-0009-05

Studies on HPLC Fingerprint of Fructus Crataegus

TANG Shu-liang¹, YANG Bin¹, HUANG Lu-qi¹, LUO Yong-ming¹, ZHANG Wen-hui²

(1 Institute of Chinese Material Medica, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China;
2 Jiangxi College of TCM, Nanchang 330006, China)

Abstract: Object: To establish an HPLC fingerprint of *Fructus Crataegus*. Method: A symmetryShieldWaters RP₁₈ column was used, with a mixture solution of acetonitrile and 0.5% acetic acid as mobile phase using a gradient elution. The flow rate was 1ml·min⁻¹, the column temperature was 40℃; and the detection wavelength was 355nm. Result and Conclusion: The HPLC fingerprint was established and can be used to identify *Fructus Crataegus* from different origins.

Key words: *Fructus Crataegus*; HPLC; Fingerprint

山楂为蔷薇科山楂属植物山里红 *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br. 或山楂 *C. pinnatifida* Bge. 的干燥成熟果实^[1], 通称(北)山楂。除此之外, 习用品有云南、湖北山楂和南山楂等, 伪品有广山楂等。文献报道不同山楂品种临床疗效不同^[2], 如山楂为消食积、健胃、助消化; 云山楂有一定的活血化瘀及消食作用; 南山楂为活血化瘀、镇痛; 广山楂长于理气健脾, 消食导滞。由于各山楂品种从形态与显微方面难以鉴别, 为确保安全用药, 我们对山楂的高效液相指纹图谱进行了研究, 旨在建立一个准确鉴别不同山楂品种的方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Waters Alliance 高效液相色谱仪, 包括 2695 Separations Module 四元泵、在线真空脱气机、自动进样器、柱温箱, Waters 2996 二极管阵列检测器, Millennium³² 色谱工作站。Sartorius 电子天平(德国 Sartorius 公司), BüCHI Rotavapor R-200 旋转蒸发器

(瑞士 BüCHI 公司), KQ-100DE 型医用数控超声波清洗器(江苏省昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂与样品 乙腈为色谱纯(美国 Fisher 公司), 重蒸馏水, 甲醇、乙酸乙酯、正丁醇(北京化工厂)和乙酸(北京化学试剂公司)均为分析纯。金丝桃苷对照品(批号 1521-200001)购自中国药品生物制品检定所。实验中所用的山楂药材见表 1。

2 实验方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: SymmetryShieldWaters RP₁₈ 柱(3.9mm × 150mm, 5μm); 流速为 1.0ml·min⁻¹; 检测波长为 355nm; 柱温为 40℃; 进样量 20μl; 流动相为乙腈-0.5% 醋酸水液梯度洗脱: 0~14min(10:90~13:87), 14~44min(13:87), 44~80min(13:87~48:52)。

2.2 对照器及供试品溶液的制备

对照品溶液的制备 精密称取适量的金丝桃苷对照品, 加甲醇制成 1ml 甲醇含 0.08mg 金丝桃苷作为对照品溶液。

供试品溶液的制备 取山里红样品(过 100 目筛) 1.0g, 精密称定, 置 100ml 锥形瓶中, 精密加入甲醇 50ml, 称重, 冷浸 12h, 超声提取 30min, 冷却后补足重量。滤过, 取续滤液 25ml, 回收甲醇, 残渣加水

收稿日期: 2003-12-31

基金项目: 中央级科研院所科技基础性工作(2001DEA20010)

中国科学院知识创新工程领域前沿项目(2F02J03)

表 1 山楂药材来源

序号	中文名	拉丁名	来源	采集时间
1	山里红	<i>Crataegus pinnatifida</i> var. <i>major</i> ¹	山东临朐县青崖村	2002. 10
2	山里红	<i>Crataegus pinnatifida</i> var. <i>major</i> ¹	山东济南	2002. 10
3	山里红	<i>Crataegus pinnatifida</i> var. <i>major</i> ¹	山东平邑	2002. 4
4	山里红	<i>Crataegus pinnatifida</i> var. <i>major</i> ¹	山东青州市郭家村	2002. 10
5	山里红	<i>Crataegus pinnatifida</i> var. <i>major</i> ¹	山东临朐县柳宝村	2002. 10
6	山里红	<i>Crataegus pinnatifida</i> var. <i>major</i> ¹	山东临朐县 I	2002. 10
7	山里红	<i>Crataegus pinnatifida</i> var. <i>major</i> ¹	山东费县泉田乡 I	2002. 11
8	山里红	<i>Crataegus pinnatifida</i> var. <i>major</i> ¹	山东平邑小营村	2002. 10
9	山里红	<i>Crataegus pinnatifida</i> var. <i>major</i> ¹	山东费县朱田乡 II	2003. 2
10	山里红	<i>Crataegus pinnatifida</i> var. <i>major</i> ¹	山东临朐县 II	2003. 2
11	山楂	<i>C. pinnatifida</i> ²	辽宁沈阳	2002. 10
12	南山楂	<i>C. cuneata</i> ³	江西南昌	2002. 2
13	云南山楂	<i>C. scabrifolia</i> ⁴	云南弥渡	2003. 7
14	湖北山楂	<i>C. hupehensis</i> ⁵	中国科学院武汉植物研究所	2003. 9
15	广山楂	<i>Malus doumeri</i> ⁶	广西靖西	2002. 11

¹ 经中国中医研究院中药研究所谢宗万教授鉴定, ² 经沈阳药科大学孙启时教授鉴定, ³ 经江西中医学院范崔生教授鉴定, ⁴ 经中国中医研究院中药研究所何希荣老师鉴定, ⁵ 经湖北中医学院陈家春教授鉴定, ⁶ 经广西中医学院药用植物研究室刘寿养副教授鉴定。

25ml 溶解, 以乙酸乙酯萃取 3 次(25ml、10ml、10ml), 回收醋酸乙酯液, 残渣以乙腈-0.5% 醋酸水液(30:70) 定容至 5ml 容量瓶中, 过 0.45μm 微孔滤膜, 续滤液作为供试品溶液。

2.3 参照峰的选择 文献报道金丝桃苷为山楂中的有效成分^[3], 从山里红药材高效液相色谱指纹图谱(图 1) 中可见金丝桃苷峰与相邻峰分离良好, 分离度 α 为 2.6, 且峰位居中, 故定为参照峰, 其色谱峰标号为 S。

2.4 精密度试验 取山里红样品按供试品溶液制备方法制备, 在上述色谱条件下, 连续进样 5 次, 记录指纹图谱, 结果表明各色谱峰相对峰面积和相对保留时间比值基本一致(RSD 分别小于 5% 和 1%)(表 2)。

2.5 稳定性试验 取山里红样品按供试品溶液制备方法制备, 在上述色谱条件下, 分别在 0.4、6、8、12 和 24h 进样, 记录指纹图谱, 结果表明各色谱峰相对峰面积和相对保留时间比值基本一致(RSD 分别小于 5% 和 2%)(表 3)。

表 2 精密度试验结果(相对峰面积/相对保留时间)

共有峰峰号	进样序号					RSD%
	1	2	3	4	5	
1	0.202/0.232	0.201/0.232	0.186/0.232	0.197/0.232	0.186/0.233	4.29/0.19
2	1.854/0.259	1.878/0.259	1.789/0.258	1.871/0.259	1.874/0.259	2.00/0.17
3	0.387/0.308	0.403/0.308	0.381/0.307	0.396/0.308	0.394/0.308	2.12/0.14
4	0.206/0.624	0.192/0.624	0.194/0.623	0.194/0.623	0.203/0.622	3.05/0.21
S	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	
5	0.777/1.071	0.803/1.072	0.830/1.702	0.820/1.072	0.794/1.072	2.59/0.04
6	0.086/1.780	0.095/1.772	0.090/1.759	0.093/1.769	0.097/1.768	4.57/0.43

表 3 稳定性试验结果(相对峰面积/相对保留时间)

共有峰峰号	进样时间						RSD%
	0h	4h	6h	8h	12h	24h	
1	0.184/0.226	0.185/0.234	0.180/0.235	0.186/0.233	0.179/0.234	0.169/0.234	3.48/1.38
2	2.123/0.254	2.104/0.261	2.127/0.261	2.171/0.260	2.157/0.260	2.042/0.261	2.15/1.00
3	0.268/0.302	0.264/0.311	0.264/0.311	0.280/0.310	0.283/0.309	0.257/0.311	3.75/1.12
4	0.175/0.620	0.181/0.625	0.182/0.623	0.172/0.621	0.171/0.619	0.168/0.624	3.22/0.39
S	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	
5	0.821/1.072	0.841/1.070	0.833/1.701	0.856/1.071	0.846/1.070	0.799/1.069	2.44/0.07
6	0.119/1.801	0.114/1.824	0.114/1.816	0.117/1.809	0.113/1.802	0.118/1.840	2.14/0.52

表 4 重复性试验结果(相对峰面积)

共有峰峰号	样品批号									RSD%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
1	0.131	0.134	0.129	0.135	0.130	0.134	0.132	0.155	0.140	5.89
2	1.945	2.066	2.003	2.077	1.982	1.967	1.948	2.091	2.040	2.81
3	0.284	0.289	0.270	0.273	0.272	0.295	0.307	0.274	0.285	4.38
4	0.140	0.145	0.144	0.151	0.133	0.146	0.147	0.140	0.138	5.41
S	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
5	0.759	0.774	0.793	0.752	0.797	0.789	0.846	0.777	0.826	3.45
6	0.122	0.128	0.129	0.137	0.129	0.140	0.132	0.125	0.114	5.86

表 5 重复性试验结果(相对保留时间)

共有峰峰号	样品批号									RSD%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
1	0.230	0.228	0.228	0.228	0.228	0.230	0.228	0.228	0.230	0.44
2	0.253	0.251	0.251	0.251	0.251	0.253	0.251	0.252	0.255	0.56
3	0.301	0.299	0.299	0.299	0.299	0.301	0.298	0.301	0.304	0.53
4	0.604	0.599	0.599	0.601	0.598	0.602	0.599	0.605	0.611	0.70
S	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
5	1.074	1.074	1.074	1.074	1.074	1.072	1.074	1.072	1.073	0.08
6	1.711	1.692	1.691	1.692	1.712	1.706	1.706	1.740	1.767	1.49

2.6 重复性试验 取 9 份山里红样品,按供试品溶液制备方法制备,在上述色谱条件下,记录指纹图谱,结果相对峰面积和相对保留时间比值基本一致(*RSD* 分别小于 6% 和 2%)(表 4 5)。

表 6 样品共有峰相对峰面积

共有峰峰号	样品批号									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.044	0.060	0.193	0.084	0.057	0.132	0.100	0.150	0.130	0.082
2	0.604	0.905	0.650	0.494	0.591	0.757	0.560	0.631	0.577	0.614
3	0.055	0.081	0.121	0.066	0.061	0.073	0.078	0.089	0.082	0.078
4	0.076	0.109	0.052	0.093	0.082	0.071	0.048	0.077	0.103	0.100
S	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	0.546	0.824	0.718	0.587	0.555	0.582	0.698	0.718	0.706	0.562
6	0.056	0.190	0.293	0.021	0.028	0.100	0.131	0.264	0.327	0.232

表 7 样品共有峰相对保留时间

共有峰峰号	样品批号									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.229	0.231	0.229	0.229	0.231	0.230	0.230	0.231	0.232	0.232
2	0.253	0.255	0.254	0.253	0.255	0.255	0.256	0.258	0.258	0.257
3	0.301	0.304	0.302	0.300	0.302	0.303	0.303	0.305	0.306	0.305
4	0.602	0.605	0.602	0.600	0.604	0.604	0.609	0.610	0.612	0.604
S	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	1.074	1.073	1.072	1.073	1.071	1.072	1.073	1.070	1.070	1.074
6	1.719	1.731	1.722	1.710	1.727	1.751	1.775	1.787	1.790	1.778

2.7 山里红药材指纹图谱测定 取十批山里红样品,按供试品溶液制备方法制备,在上述色谱条件下,分别进样并记录指纹图谱(图 1)。以金丝桃苷色谱峰(S 峰)为基准,计算其它各峰相对峰面积和相对保留时间(表 6.7)。

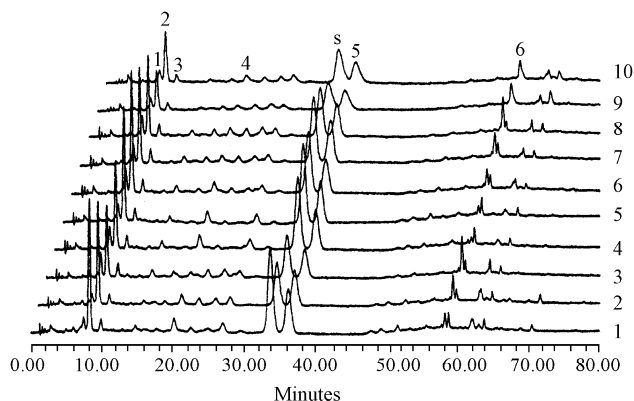


图 1 山里红 (*C. pinatifida. var. major*) 指纹图谱
(右侧编号相对应于表 1 中样序号)

2.8 不同植物来源山楂药材的测定 分别取山楂、南山楂、云南山楂、湖北山楂及广山楂样品,按供试品溶液制备方法制备,在上述色谱条件下,分别进样,记录指纹图谱(图 2~ 6)。

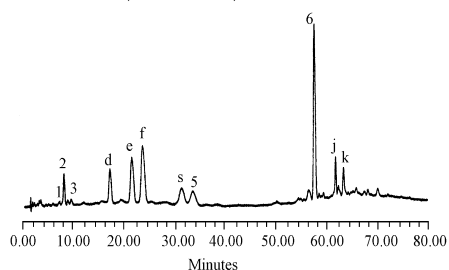


图 2 山楂 (*C. pinatifida*) 指纹图谱

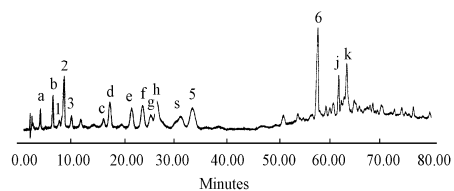


图 3 南山楂 (*C. cumata*) 指纹图谱

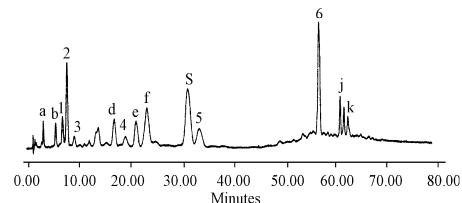


图 4 云南山楂 (*C. scabrifolia*) 指纹图谱

3 山里红模式图谱的建立

3.1 模式图谱的建立 对上述十批山里红药材指纹图谱的相对峰面积进行匹配,以不同相似度计算方法算它们的相似度(表 8),结果表明十批样品在

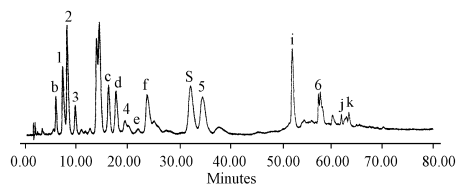


图 5 湖北山楂 (*C. hupehensis*) 指纹图谱

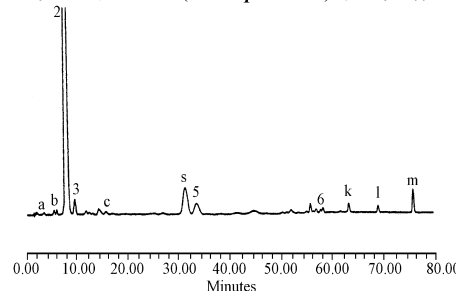


图 6 广山楂 (*M. doumeri*) 指纹图谱

整体上相似,故以这十批药材相对峰面积和相对保留时间的均值建立模式图谱。

表 8 十批山里红药材相似度分析结果

山里红药材	测度		
	相关系数 ¹	相关系数 ²	夹角余弦 ²
1	0.9933	1	1
2	0.9725	0.9580	0.9769
3	0.9892	0.9679	0.9750
4	0.9840	0.9904	0.9950
5	0.9911	0.9993	0.9996
6	0.9870	0.9895	0.9932
7	0.9947	0.9842	0.9910
8	0.9937	0.9750	0.9810
9	0.9832	0.9615	0.9734
10	0.9926	0.9888	0.9905

¹ 以十批样品相对峰面积均值为模板;

² 以第一批样品相对峰面积为模板。

3.2 技术参数 按“中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)”中有关注射剂用中药材指纹图谱技术要求^[4],规定山里红指纹图谱的技术参数为:

共有峰峰号(相对保留时间): 1(0.2304)、2(0.2554)、3(0.3031)、4(0.6052)、S(1)、5(1.0722)、6(1.7490);

占总峰面积 5% 以上共有峰峰号(相对峰面积): 2(0.6383)、3(0.0784)、S(1)、5(0.6496)。

4 不同植物来源山楂药材指纹图谱的比较

以南山楂药材指纹图谱为基准,对其它山楂药材图谱进行标号。以金丝桃苷色谱峰(S 峰)为基准,计算其它各峰相对峰面积(表 9),以此进行相似度分析(表 10),从表 10 可看出不同植物来源山楂有差异。为了更直观地鉴别不同来源的山楂药材,以指

纹图谱中共有峰号为横坐标,以相应峰号的相对峰面积为纵坐标,作不同山楂品种指纹条形码图(图 7),从该条形码图中较容易获得主要指标成分相对含量信息,从而能快捷地对样品的来源作出判定。

表 9 不同植物来源山楂共有峰相对峰面积

共有峰 峰号	样品					
	山里红	山楂	南山楂	云南山楂	湖北山楂	广山楂
a	0	0	0.705	0.082	0	0.010
b	0	0	1.667	0.110	0.241	0.047
1	0.103	0.059	0.335	0.164	0.635	0
2	0.638	0.647	3.909	0.526	1.028	13.76
3	0.078	0.114	0.837	0.077	0.250	0.241
3	0.078	0.114	0.837	0.077	0.250	0.241
c	0	0	0.569	0	0.524	0.047
d	0	1.198	2.416	0.263	0.504	0
4	0.081	0	0	0.098	0.085	0
e	0	2.079	2.563	0.301	0.034	0
f	0	2.917	2.833	0.556	0.553	0
g	0	0	0.965	0	0	0
h	0	0	2.937	0	0	0
S	1	1	1	1	1	1
5	0.650	0.856	3.606	0.228	0.716	0.412
6	0.164	4.966	7.594	0.920	0.138	0.018
j	0	0.678	2.255	0.183	0.053	0
k	0	0.561	3.076	0.083	0.073	0.109

表 10 不同植物来源山楂相似度结果*

样品	测度	
	相关系数	夹角系数
山里红	0.1393	0.4494
山楂	0.7922	0.8059
南山楂	1	1
云南山楂	0.5325	0.7701
湖北山楂	0.0191	0.5595
广山楂	0.2329	0.3545

* 以南山楂相对峰面积为模板。

5 讨论

5.1 比较了甲醇 50% 甲醇 60% 乙醇 甲醇-0.5% 醋酸液(50:50) 和乙腈-0.5% 醋酸液(30:70) 等提取溶剂,结果表明以甲醇为提取溶剂时,色谱峰峰数多、峰面积值大、整体基线好。

比较了超声、回流、温浸、索氏提取和冷浸后超声等提取方法,以冷浸 12h 后超声 30min 所出图谱各峰相对峰面积值最大。

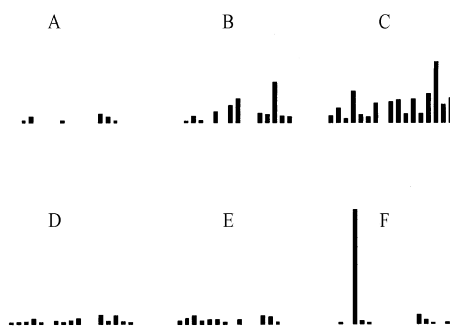


图 7 不同山楂品种条形码图

A 山里红(*C. pinnatifida* var. *major*) B 山楂(*C. pinnatifida*)
C 南山楂(*C. cuneata*) D 云南山楂(*C. scabrifolia*)
E 湖北山楂(*C. hupehensis*) F 广山楂(*M. doumeri*)

考察了样品纯化方法,以醋酸乙酯为萃取溶剂能除掉部分杂质,各色谱峰之间分离良好。同时比较了萃取次数,结果以萃取 3 次为佳。

对检测波长进行了选择,以金丝桃苷的最大吸收波长 355nm 为检测波长时,色谱峰峰数较多,且分离良好。

5.2 山里红(*Crataegus pinnatifida* var. *major*) 及山楂(*C. pinnatifida*) 均为药典所收载,统称(北)山楂,两者从外形上很难区别,而利用液相指纹图谱可轻易实现两者间的鉴别。此外,从本实验结果来看,对于不同植物来源山楂样品,从化学成分的角度进行区分应该是有效的途径。利用典型指纹条形码图,可将山楂习用品如南山楂、云南山楂、湖北山楂及伪品广山楂区分开来,更直观地鉴别不同植物来源山楂。

5.3 山东是山里红的主产地,我们以山东山里红药材为研究对象建立山里红高效液相模式图谱,此图谱是否适用于全国其它地区山里红药材,还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典, (一部)[S]. 北京: 化学工业出版社, 2000. 23.
- [2] 陈平. 四种山楂药材的主区别[J]. 广西中医药, 2001, 24(3): 50-51.
- [3] 李贵海, 孙敬勇, 张希林, 等. 山楂降血脂有效成分的实验研究[J]. 中草药, 2002, 33(1) 50-52.
- [4] 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)[J]. 中成药, 2000, 22(10): 671-675.