

蕪艾的HPLC指纹图谱研究

卢化^{1*}, 张义生¹, 黎强², 杨小金², 卢金清^{2#} (1.武汉市中医医院药剂科, 武汉 430014; 2.湖北中医药大学/湖北省药用植物研发中心, 武汉 430065)

中图分类号 R283.6; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)09-1255-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.09.37

摘要 目的: 建立蕪艾的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱。方法: 采用HPLC法。色谱柱为ZORBAX Extend-C₁₈, 流动相为乙腈-0.2%磷酸水溶液(梯度洗脱), 检测波长为330 nm, 流速为1.0 ml/min, 柱温为30 ℃。以柚皮苷为参照物, 对10批蕪艾样品进行指纹图谱分析, 并利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》对所得数据进行相似度评价。结果: 10批蕪艾样品共标定12个共有峰, 共指出3个共有峰, 分别为绿原酸、柚皮苷、山柰酚; 10批药材的相似度>0.90。结论: 所建立的指纹图谱可用于蕪艾药材的品质评价和质量控制。

关键词 蕪艾; 高效液相色谱法; 相似度; 指纹图谱

Study on the Fingerprint of *Artemisia argyi* by HPLC

LU Hua¹, ZHANG Yi-sheng¹, LI Qiang², YANG Xiao-jin², LU Jin-qing² (1. Dept. of Pharmacy, Chinese Medicine Hospital of Wuhan, Wuhan 430014, China; 2. Hubei University of Chinese Medicine/Medicinal Plant Research and Development Center of Hubei Province, Wuhan 430065, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the HPLC fingerprint of *Artemisia argyi*. METHODS: HPLC was conducted with ZORBAX Extend-C₁₈ column; the mobile phase was acetonitrile-0.2% phosphoric acid solution (gradient elution); detection wavelength was 330 nm and flow rate was 1.0 ml/min with column temperature of 30 ℃. The fingerprint of 10 batches of *A. argyi* was determined with the reference substance of naringin and *Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System* was used for similarity evaluation. RESULTS: There were 12 common peaks in the 10 batches of *A. argyi* samples, and 3 common peaks were identified, including chlorogenic acid, naringin and kaempferol. The similarity of the 10 batches of samples was more than 0.90. CONCLUSIONS: The established fingerprint can be used for the evaluation and quality control of *A. argyi*.

KEYWORDS *Artemisia argyi*; HPLC; Similarity; Fingerprint

艾叶为菊科植物艾 *Artemisia argyi* 的干燥叶, 具有散寒止痛、温经止血的作用^[1]。艾叶在全国各地均有分布, 其中以湖北蕪春者品质最好, 谓之蕪艾, 誉为道地药材。蕪艾 *Artemisia argyi* Lev. et Van. var. *argyi* cv. Qiai 为湖北省蕪春四宝之一, 属于我国国家地理标志产品, 其茎、叶均可入药。《本草纲目》中记载: “近代惟汤阳者谓之北艾, 四明者谓之海艾, 自成化以来, 则以蕪州(蕪春旧称)者为胜, 用充方物, 天下重之, 谓之蕪艾。”现代研究表明, 蕪艾具有抗炎、抗过敏、镇痛、抗肝纤维化、抗疲劳、抗肿瘤、增强免疫、抗氧化等多种药理活性^[2-8]。有学者利用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法同时测定艾叶及其炮制品中棕矢车菊素和异泽兰黄素的含量^[9]。但蕪艾的药效成分复杂, 仅靠单一指标不能有效控制蕪艾质量。指纹图谱对于中药及其制剂可提供丰富的鉴别信息, 能够全面反映中药多组分复杂体系, 其宏观、量化的鉴别手段能综合反映和有效控制中药的质量, 已成为国际公认的中药质量评价和质量控制的有效手段。中药指纹图谱法从中药材到中成药的生产过程中, 每一步都有明确的控制指标, 而指纹图谱就是将这些指标图形化、信息化^[10]。目前尚未有关于蕪艾指纹图谱的相

关研究。为了从整体上有效地评价和控制其质量, 本试验采用HPLC法对蕪艾指纹图谱进行了初步的研究, 以期完善蕪艾的品质评价和质量控制提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

DIONEX-ULTIMATE 3000 型 HPLC 仪(美国戴安公司); CP225D 型电子分析天平(德国赛多利斯公司, 精度: 0.01 mg); UP5200H 型超声波清洗器(熊猫集团南京电子计量有限公司)。

1.2 试剂

柚皮苷、绿原酸、山柰酚对照品(中国食品药品检定研究院, 批号分别为: 110722-201111、110753-201314、110861-00405); 乙腈为色谱纯(美国天地公司), 其余试剂均为分析纯, 水为蒸馏水。

1.3 药材

10批蕪艾均于2011年5月采自湖北省蕪春县, 经湖北中医药大学药学教研室鉴定为菊科植物艾 *A. argyi* 的干燥叶。10批蕪艾药材来源见表1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: ZORBAX Extend-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流

* 药师。研究方向: 药剂学。电话: 027-68890101

通信作者: 教授。研究方向: 中药及其天然产物活性成分。电话: 027-68890101。E-mail: lj59169@sohu.com

动相:乙腈(A)-0.2%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(梯度洗脱程序见表2);流速:0.8 ml/min;柱温:30 ℃;检测波长:330 nm。色谱见图1。

表1 10批蕪艾药材来源

Tab 1 Origins of 10 batches of *A. argyi*

样品编号	来源	批号
S1	湖北省蕪春县横岗山	120512
S2	湖北省蕪春县横岗山	120515
S3	湖北省蕪春县赤龙湖	120518
S4	湖北省蕪春县赤龙湖	120521
S5	湖北省蕪春县三角山	120524
S6	湖北省蕪春县三角山	120527
S7	李时珍医药集团有限公司药园	120530
S8	李时珍医药集团有限公司药园	120533
S9	湖北省蕪春县仙人台	120536
S10	湖北省蕪春县仙人台	120539

表2 梯度洗脱程序

Tab 2 Gradient elution procedures

时间, min	流动相A, %	流动相B, %
0~12	10→20	90→80
12~25	20→25	80→75
25~50	25→65	75→35
50~55	65→10	35→90

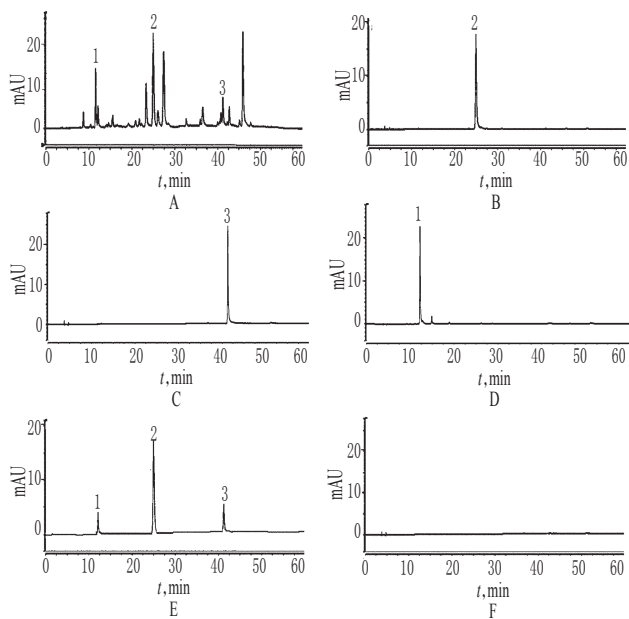


图1 高效液相色谱图

A.供试品;B.柚皮苷对照品;C.山柰酚对照品;D.绿原酸对照品;E.混合对照品溶液;F.阴性对照;1.绿原酸;2.柚皮苷;3.山柰酚

Fig 1 HPLC chromatograms

A. test sample; B. naringin control; C. kaempferol control; D. chlorogenic acid control; E. mixed control; F. negative control; 1. chlorogenic acid; 2. naringin; 3. kaempferol

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 分别精密称取柚皮苷、绿原酸、山柰酚对照品各适量,分别加甲醇溶解制成质量浓度为1.00、0.12、0.15 mg/ml的柚皮苷、绿原酸、山柰酚对照品溶液,即得。

2.2.2 混合对照品溶液 分别精密称取柚皮苷、绿原酸、山柰酚对照品各适量,混匀,置同一量瓶中,加甲醇溶解制成质量

浓度分别为1.29、0.05、0.09 mg/ml的柚皮苷、绿原酸、山柰酚的混合对照品溶液,即得。

2.2.3 供试品溶液 取蕪艾药材样品约3 g,粉碎,精密称定,精密加入80%甲醇溶液100 ml,静置24 h,超声萃取1 h,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇适量使溶解,转移至10 ml量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取同一批次蕪艾药材样品适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件下连续进样5次,记录色谱图。结果,各共有峰的相对保留时间与相对峰面积的RSD值均<2%,表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取同一批次蕪艾样品适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,分别于制备0、2、4、8、16、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,各共有峰的相对保留时间与相对峰面积的RSD值均<2%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 取同一批次蕪艾样品适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,各共有峰的相对保留时间与相对峰面积的RSD值均<2%,表明本方法重复性良好。

2.4 指纹图谱的建立与分析

2.4.1 指纹图谱的测定与特征峰的确定 分别精密吸取10批样品溶液各2 μl,注入色谱仪,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,共标定12个共有峰作为蕪艾药材的指纹图谱特征峰,并选择6号峰(柚皮苷峰)作为参照峰。蕪艾的指纹图谱见图2;10批次蕪艾样品的HPLC指纹图谱见图3。

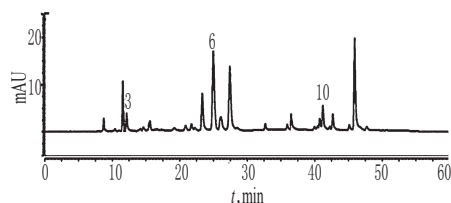


图2 蕪艾的指纹图谱

3.绿原酸;6.柚皮苷;10.山柰酚

Fig 2 fingerprint of *A. argyi*

3. chlorogenic acid; 6. naringin; 10. kaempferol

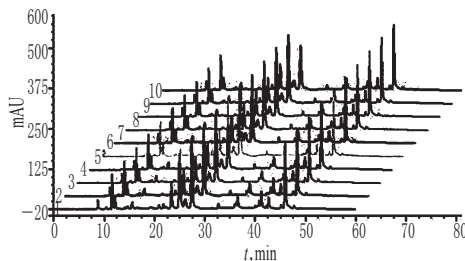


图3 10批次蕪艾样品的HPLC指纹图谱

Fig 3 HPLC fingerprint of 10 batches of *A. argyi* samples

2.4.2 相似度评价 将所得的图谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004版),经过色谱峰匹配,进行色谱峰差异性评价和整体相似性评价;通过该评价系统得出蕪艾的HPLC指纹图谱共有模式,经过与共有模式比较,10批蕪艾

共有峰的相对保留时间以及相对峰面积的差别均较小,详见表3、表4。10批蕪艾药材的相似度均>0.90,表明所建立的指纹图谱技术指标稳定、重复性好,10批蕪艾药材的主成分基本相同,详见表5。

表3 10批次蕪艾样品指纹图谱各共有峰的相对保留时间

Tab 3 Relative retention time of 10 batches of *A. argyi* samples fingerprint peaks

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	RSD, %
峰1	0.350	0.352	0.349	0.348	0.349	0.351	0.352	0.353	0.351	0.352	0.47
峰2	0.462	0.463	0.461	0.464	0.465	0.462	0.467	0.463	0.468	0.469	0.59
峰3	0.485	0.487	0.484	0.483	0.486	0.489	0.485	0.490	0.487	0.486	0.41
峰4	0.624	0.623	0.621	0.625	0.627	0.628	0.625	0.632	0.627	0.622	0.52
峰5	0.935	0.936	0.938	0.934	0.937	0.940	0.942	0.939	0.938	0.941	0.28
峰6(s)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
峰7	1.042	1.046	1.045	1.044	1.043	1.037	1.048	1.049	1.047	1.042	0.34
峰8	1.098	1.097	1.102	1.092	1.112	1.095	1.105	1.101	1.095	1.096	0.54
峰9	1.462	1.463	1.476	1.458	1.473	1.454	1.469	1.472	1.468	1.465	0.47
峰10	1.648	1.652	1.641	1.659	1.647	1.636	1.657	1.665	1.639	1.635	0.62
峰11	1.709	1.707	1.712	1.715	1.714	1.708	1.706	1.705	1.709	1.718	0.25
峰12	1.837	1.832	1.842	1.845	1.847	1.831	1.836	1.835	1.846	1.843	0.32

表4 10批次蕪艾样品指纹图谱各共有峰的相对峰面积

Tab 4 Relative retention area of 10 batches of *A. argyi* samples fingerprint peaks

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	RSD, %
峰1	0.103	0.102	0.105	0.104	0.102	0.106	0.105	0.103	0.104	0.106	1.43
峰2	0.405	0.406	0.408	0.402	0.407	0.412	0.406	0.408	0.411	0.409	0.72
峰3	0.164	0.161	0.165	0.164	0.165	0.162	0.163	0.165	0.162	0.161	0.99
峰4	0.099	0.098	0.097	0.099	0.097	0.098	0.099	0.101	0.097	0.098	1.27
峰5	0.453	0.454	0.452	0.457	0.458	0.462	0.459	0.464	0.459	0.457	0.83
峰6(s)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
峰7	0.186	0.184	0.189	0.185	0.190	0.192	0.187	0.186	0.187	0.189	1.31
峰8	0.883	0.885	0.882	0.887	0.891	0.895	0.890	0.874	0.895	0.892	0.74
峰9	0.141	0.140	0.145	0.143	0.141	0.143	0.142	0.144	0.145	0.142	1.20
峰10	0.203	0.207	0.205	0.204	0.205	0.203	0.206	0.201	0.204	0.202	0.90
峰11	0.144	0.141	0.142	0.146	0.144	0.143	0.146	0.145	0.143	0.145	1.16
峰12	1.057	1.056	1.058	1.054	1.059	1.062	1.067	1.065	1.071	1.085	0.87

表5 10批次蕪艾样品相似度测定结果

Tab 5 Similarity measurement results of 10 batches of *A. argyi* samples

样品编号	相似度	平均值	RSD, %
S1	0.99		
S2	0.97		
S3	0.99		
S4	0.98		
S5	0.97		
S6	0.97	0.98	1.08
S7	0.99		
S8	0.98		
S9	0.96		
S10	0.97		

3 讨论

3.1 检测波长的选择

分别取柚皮苷、山柰酚、绿原酸对照品溶液及供试品溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样分析,采用二极管阵列检测

器(DAD)在190~400 nm波长范围内进行扫描分析。结果显示,在330 nm处对照品溶液与供试品溶液均有最大吸收,检测灵敏度高,因此最终确定以330 nm为检测波长。

3.2 流动相的选择

本试验前期曾以甲醇-水、乙腈-水作为流动相进行等度和梯度洗脱考察,但色谱峰分离效果较差。在不断尝试色谱条件后,最终选用乙腈-0.2%磷酸水溶液梯度洗脱,在该色谱条件下,色谱图分离效果较为理想。

3.3 提取方法的选择

本试验分别采用加热回流提取法、超声提取法对蕪艾进行制样。结果表明,加热回流提取和超声提取的结果差异不大,但超声提取操作简便、快捷,因此采用超声提取法作为供试品溶液的制备方法。

本研究首次采用HPLC法对蕪艾的指纹图谱进行了初步研究,试验结果表明各批次样品之间相似度较高,样品之间相关性良好,符合中药指纹图谱相似度评价的基本要求。本研究初步建立了蕪艾的HPLC指纹图谱,方法学考察结果表明该方法稳定、可靠、重复性好,可为蕪艾的品质评价和质量控制提供参考依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010:82.
- [2] 蒋涵, 侯安继, 项志学, 等. 蕪艾挥发油的抗炎、抗过敏和镇痛作用[J]. 医学新知杂志, 2005, 15(2):36.
- [3] 熊振芳, 邢彩珍, 胡慧, 等. 蕪艾提取液对免疫性肝纤维化大鼠Smad3、Smad7表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(3):627.
- [4] 费新应, 周虹, 李华成, 等. 蕪艾提取液药物血清对大鼠肝星状细胞凋亡的影响[J]. 中西医结合肝病杂志, 2013, 23(5):289.
- [5] 蒋涵, 侯安继, 项志学, 等. 蕪艾挥发油的抗疲劳作用研究[J]. 武汉大学学报:医学版, 2005, 26(3):373.
- [6] 杨琳, 李善俊. MTT法检测蕪艾鞣酸体外抗肿瘤的活性[J]. 中国民康医学, 2013, 25(8):1.
- [7] 黄菁, 陈友香, 侯安继, 等. 蕪艾挥发油对小鼠的免疫调节作用[J]. 中药药理与临床, 2005, 21(2):21.
- [8] 洪宗国, 杨梅, 农熠瑛, 等. 蕪艾燃烧灰烬提取物抗自由基作用[J]. 中南民族大学学报:自然科学版, 2008, 27(3):47.
- [9] 周倩, 孙立立, 江波, 等. RP-HPLC法同时测定艾叶及其炮制品中棕矢车菊素和异泽兰黄素的含量[J]. 中国药房, 2013, 24(47):4464.
- [10] 刘文, 蒋世云. 中药指纹图谱研究与应用进展[J]. 中国药房, 2011, 22(19):1819.

(收稿日期:2014-08-13 修回日期:2014-11-15)

(编辑:孙冰)