

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.03.005

绞股蓝皂苷类成分的超高效液相色谱指纹图谱研究

黄盼盼¹, 马临科², 唐登峰², 赵维良^{2△}

(1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江省食品药品检验研究院, 浙江 杭州 310052)

摘要:目的 建立绞股蓝药材皂苷类化合物的超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱法,为绞股蓝药材的质量控制和质量评价提供参考。方法 色谱柱采用 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm),流动相以乙腈(A)–水(B)梯度洗脱,检测波长为 203 nm,流速为 0.2 mL/min,柱温为 30 ℃。结果 绞股蓝药材皂苷类化合物指纹图谱有 9 个共有峰,指认了 1 个 S 峰为参照峰;11 批绞股蓝药材的相似度达 0.88 以上,方法学考察符合指纹图谱的技术要求。结论 该方法较传统的高效液相色谱法有更好的分离效果,准确性、精密度、重复性高,可为绞股蓝药材的质量控制提供参考。

关键词:绞股蓝;皂苷;质量控制;超高效液相色谱法;指纹图谱

中图分类号:R932;R284.2;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)03-0016-03

Study on UPLC Fingerprint of Saponins from *Gynostemma Pentaphyllum*

HUANG Panpan¹, MA Linke², TANG Dengfeng², ZHAO Weiliang²

(1. Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou, Zhejiang, China 310053; 2. Zhejiang Institute of Food and Drug Control, Hangzhou, Zhejiang, China 310052)

Abstract: Objective To establish an UPLC fingerprint of saponins from *Gynostemma pentaphyllum*, and to provide a reference for quality control and quality evaluation of *Gynostemma pentaphyllum*. **Methods** The chromatographic column was ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), the mobile phase was acetonitrile(A)–water(B) with gradient elution, the detection wavelength was 203 nm, the flow rate was 0.2 mL/min, and the column temperature was 30 ℃. **Results** There were 9 common peaks in the fingerprint of saponins from *Gynostemma pentaphyllum*, and one S peak was identified as the reference peak. The similarity of 11 batches of *Gynostemma pentaphyllum* reached above 0.88, and the methodological investigation met the technical requirements of the fingerprint. **Conclusion** Compared with the traditional HPLC method, this method has better separation effect, accuracy, precision and repeatability, which can provide a reference for the quality control of *Gynostemma pentaphyllum*.

Key words: *Gynostemma pentaphyllum*; saponins; quality control; UPLC; fingerprint

绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Mak. 是葫芦科 *Cucurbitaceae* 绞股蓝属 *Gynostemma* 的干燥地上部分,产于我国陕西南部及长江以南各省区,生于山坡疏林、灌丛中或路旁草丛中,本种入药,有消炎解毒、止咳祛痰的功效^[1]。其药用成分主要为皂苷类和黄酮类物质,以及氨基酸和多糖类等成分,其中绞股蓝皂苷有抗疲劳、促进细胞新陈代谢、增强免疫力等多种生理活性^[2-5]。目前,关于绞股蓝药材皂苷类物质的超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱尚未见报道。本研究中建立了 UPLC 绞股蓝皂苷类物质的指纹图谱,并对浙江、四川、陕西和湖南 4 个产地的绞股蓝药材进行比较分析,为绞股蓝药材及其饮片的质量控制提供了科学依据,同时为其产地研究提供了研究思路。

1 仪器与试剂

仪器:ACQUITY H-Class 型超高效液相色谱仪(包括四元溶剂管理器、PDA 检测器,上海沃特世科技公司);Milli-Q Advantage A10 型超纯水机(美国 Millipore 公司);Elmasonic P 300 型超声波清洗器(德国 Elma 公

司);XPE205 型电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司);Minispin 12 000 转离心机(德国 Eppendorf 公司)。

试剂:绞股蓝药材购于浙江武义寿仙谷药业有限公司提供,经浙江省食品药品检验研究院主任中药师郭增喜鉴定为葫芦科植物绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Mak. 的干燥地上部分,采收于 2017 年 7 月或 9 月(S2 于 9 月),详见表 1。乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯,均购于 Merck 公司;水为超纯水。

表 1 绞股蓝药材来源

批号	批次	产地	批号	批次	产地
S1	201707	浙江武义	S9	20170808	浙江武义
S2	20170801	浙江武义	S10	20171113-2	浙江武义
S3	20170802	浙江武义	S11	170701	四川
S4	20170803	浙江武义	S12	170702	四川
S5	20170804	浙江武义	S13	20171002	湖南绥宁鹅公岭
S6	20170805	浙江武义	S14	20171003	湖南绥宁朝仪
S7	20170806	浙江武义	S15	20171201	陕西平利
S8	20170807	浙江武义	S16	20171202	陕西平利

第一作者:黄盼盼,女,硕士研究生,研究方向为药物分析,(电子信箱)623311271@qq.com。

△通信作者:赵维良,男,硕士研究生,主任中药师,研究方向为生药品种鉴定与品质评价,(电话)0571-86452373(电子信箱)zwl@zjyj.cn。

2 方法与结果

2.1 UPLC 分析

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: 乙腈(A) - 水(B), 梯度洗脱, 程序见表2; 流速: 0.2 mL/min; 检测波长: 203 nm, 柱温: 30 °C; 进样量: 2 μL。吸取 S3 批制备的供试品溶液 2 μL, 按上述色谱条件进样分析, 色谱图见图1。

表2 流动相梯度洗脱表

时间(min)	乙腈(A, %)	水(B, %)	时间(min)	乙腈(A, %)	水(B, %)
0~8	32	68	15~16	37→40	63→60
8~12	32→36	68→64	16~30	40→60	60→40
12~15	36→37	64→63			

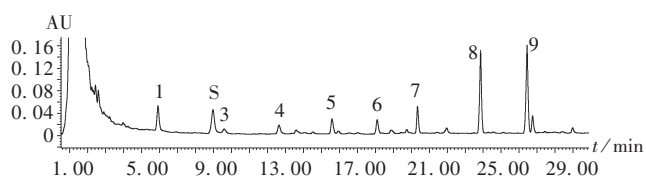


图1 超高效液相色谱图

2.1.2 溶液制备

取绞股蓝干燥地上部分粉末(过4号筛)1.7 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加入70%甲醇25 mL, 超声处理(功率250 W, 80 kHz)30 min, 放置至室温, 用70%甲醇补足丢失质量, 取2 mL 供试品上清液, 以转速为13 000 r/min 离心5 min, 取上清液用0.22 μm 微孔过滤, 即得供试品溶液。

2.1.3 方法学考察

精密度试验: 精密吸取 S3 批供试品溶液, 按照2.1项下色谱条件连续进样6次, 记录色谱图, 选取 S 峰作为参照峰, 计算其他特征峰的相对保留时间和相对峰面积。结果各特征峰相对保留时间的 RSD 为 0.23% (n=6), 相对峰面积的 RSD 为 2.12% (n=6), 表明该方法精密度良好, 符合指纹图谱技术要求。

稳定性试验: 吸取 S3 批供试品溶液, 按拟订色谱条件在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 时进样, 以 S 峰作为参照峰计算其他特征峰的相对保留时间和相对峰面积。结果各特征峰相对保留时间的 RSD 为 1.01% (n=6), 相对峰面积的 RSD 为 1.43% (n=6), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

重复性试验: 取 S3 批绞股蓝药材, 依法制备 6 份供试品溶液, 按拟订色谱条件分别进样测定, 记录色谱图。结果各特征峰的相对保留时间的 RSD 为 0.10% (n=6), 相对峰面积的 RSD 为 1.29% (n=6), 表明该方法重复性良好, 符合指纹图谱技术要求。

2.2 指纹图谱分析

皂苷类成分指纹图谱的建立: 取 S1 - S16 批样品,

分别按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按照拟订色谱条件进样分析, 记录色谱图, 将所得色谱图导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012 版(以下简称 2012 年版评价系统)进行分析, 选择 S1 批绞股蓝药材作为参照图谱, 其指纹图谱见图2。根据以上分析结果, 取 S1 - S10 批绞股蓝药材作为模板药材建立指纹图谱, 选择 S1 批作为参照图谱, 进行峰匹配, 建立的指纹图谱见图3, 多点校正后经自动匹配生成的对照指纹图谱见图4。

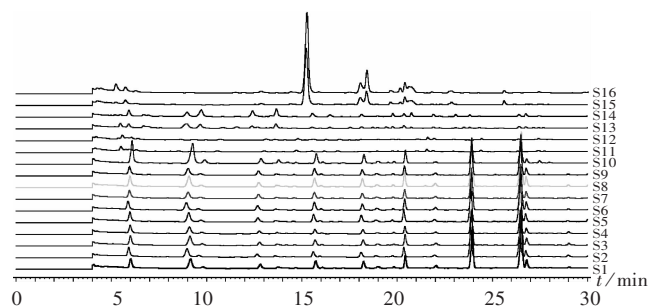


图2 16批样品指纹图谱

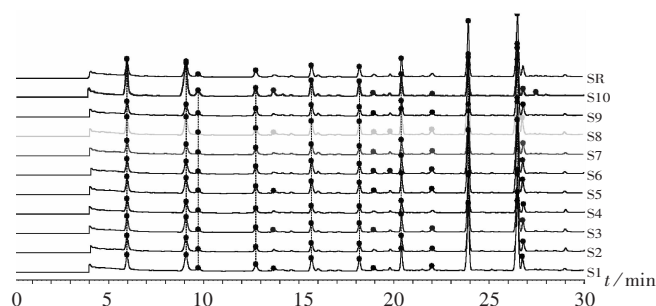


图3 S1 - S10 批指纹图谱

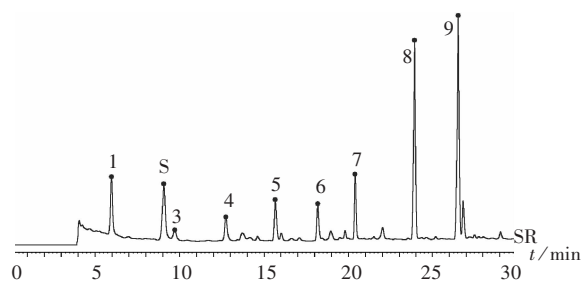


图4 S1 - S10 批对照指纹图谱

特征指纹峰的标定: 根据相对保留时间标定特征指纹峰, 对模板 S1 - S10 批绞股蓝 UPLC 测定结果进行比较, 发现 9 个特征峰为 S1 - S10 批绞股蓝药材共有的, 因此确定这 9 个峰为特征指纹峰, 计算其他特征峰的相对保留时间和相对峰面积。结果见表3。

相似度评价: 2012 版评价系统中, 对 16 批绞股蓝药材进行相似度评价分析, 其中以 S1 - S10 批作为模板药材建立指纹图谱, 生成对照图谱并进行相似度评价, 采用 S1 批样品色谱图作为参照图谱。其中, S1 - S10 批绞股蓝药材的 UPLC 指纹图谱见图3, 多点校正后经自动匹配生成的对照指纹图谱见图4。结果 16 批绞股蓝药材相对于对照图谱的相似度见表4。

表3 S1-S10批绞股蓝指纹图谱中共有特征峰相对保留时间及相对峰面积

峰号	相对保留时间										相对峰面积									
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.657	0.659	0.657	0.658	0.659	0.657	0.659	0.658	0.659	0.657	0.676	0.731	0.694	0.882	0.723	0.748	0.838	0.676	0.788	0.745
2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
3	1.070	1.070	1.071	1.072	1.070	1.070	1.072	1.070	1.072	1.068	0.184	0.220	0.196	0.246	0.208	0.232	0.246	0.180	0.245	0.184
4	1.399	1.409	1.400	1.403	1.400	1.418	1.409	1.403	1.409	1.387	0.363	0.322	0.293	0.377	0.418	0.553	0.581	0.346	0.562	0.206
5	1.716	1.738	1.719	1.724	1.722	1.751	1.734	1.725	1.735	1.700	0.577	0.455	0.429	0.461	0.590	0.770	0.719	0.556	0.708	0.317
6	1.991	2.018	1.995	2.000	1.998	2.033	2.012	2.002	2.012	1.969	0.503	0.407	0.399	0.413	0.511	0.572	0.552	0.511	0.527	0.273
7	2.230	2.268	2.237	2.243	2.244	2.281	2.259	2.245	2.257	2.204	0.761	0.639	0.644	0.570	0.754	0.840	0.816	0.771	0.767	0.349
8	2.614	2.659	2.621	2.626	2.634	2.677	2.647	2.636	2.648	2.579	2.545	1.956	2.117	1.934	2.513	2.980	2.772	2.672	2.541	0.653
9	2.896	2.947	2.905	2.909	2.920	2.965	2.933	2.921	2.933	2.890	3.232	2.246	2.553	2.035	3.211	3.714	3.414	3.442	3.073	0.818

表4 绞股蓝指纹图谱相似度结果

批次	相似度	批次	相似度	批次	相似度	批次	相似度
S1	0.996	S5	0.997	S9	0.998	S13	0.884
S2	0.999	S6	0.994	S10	0.884	S14	0.753
S3	0.999	S7	0.997	S11	0.905	S15	0.569
S4	0.994	S8	0.994	S12	0.925	S16	0.552

3 讨论

3.1 UPLC 分析优势

绞股蓝药材皂苷类成分复杂, HPLC 分析需要较长的分析时间(70~80 min)才能获得较理想的分离效果^[5]。UPLC 分析仅需 30 min 且分离情况理想, 在填补了 UPLC 建立绞股蓝药材指纹图谱的空白的同时, 分离效果上也比已报道绞股蓝药材的研究有了提高^[6]。

3.2 色谱条件考察

考察了不同浓度溶剂甲醇(50%, 70%)、不同溶剂体积(25 mL 和 50 mL)、不同提取方法(超声、回流)和提取时间(30 min, 45 min, 60 min)的影响^[7-8], 结果以 25 mL 甲醇超声提取 30min 的提取效果最好。

考察不同流动相系统(甲醇-水、甲醇-0.4% 磷酸、甲醇-0.1 磷酸、乙腈-水、乙腈-0.4% 磷酸、乙腈-0.1% 磷酸)、检测波长(203 nm 和 254 nm)和不同流速的影响。结果显示, 乙腈-水的洗脱能力较强且分离度、峰形较好, 检测波长为 203 nm, 柱温为 30 ℃, 流速为 0.2 mL/min 时, 色谱峰基线平稳、分离度好, 可更好分离绞股蓝皂苷各成分, 因此采用梯度洗脱方式进行分析。

3.3 不同产地绞股蓝药材相似度存在差异

浙江、四川和湖南绥宁县鹅公岭乡的药材相似度均在 0.88 以上, 而陕西和湖南绥宁朝仪乡的相似度较低, 只有 0.55~0.75, 说明浙江产绞股蓝和四川、湖南绥宁县鹅公岭乡产绞股蓝基本一致, 而陕西和湖南绥宁朝仪乡绞股蓝相似度较低。绞股蓝的产地差异不仅存在于省份之间, 也存在于乡镇之间^[9-14]。

3.4 研究价值

本研究中以 UPLC 技术建立的绞股蓝药材指纹图

谱, 分离效果较好。对 10 批绞股蓝药材标定了 9 个共有峰, 比较了浙江、陕西、四川和湖南 4 个产地绞股蓝的差异, 为绞股蓝质量控制提供了科学依据。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1986, 73(1): 269.
- [2] 浙江植物志委员会. 浙江植物志(第六卷)[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1993: 182-184.
- [3] 钟 辉. 绞股蓝黄酮指纹图谱研究[J]. 湖北中医药大学学报, 2010, 12(3): 31-33.
- [4] 彭 亮, 李治光, 陈 杰, 等. HPLC 测定不同产地、不同品种绞股蓝中芦丁和槲皮素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(6): 45-47.
- [5] 范冬冬, 匡艳辉, 向世颢, 等. 绞股蓝化学成分及其药理活性研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2017, 52(5): 342-352.
- [6] 蒋慧宣, 陈燊文, 徐茂保, 等. HPLC 法同时测定绞股蓝药材中 8 种皂苷的含量[J]. 广州中医药大学学报, 2018, 35(2): 324-328.
- [7] 辛 伟, 李山姆, 王 森, 等. 绞股蓝总皂苷的指纹图谱及含量测定[J]. 沈阳药科大学学报, 2016, 33(3): 208-214.
- [8] 李浩飞. RP-HPLC-ELSD 同时测定绞股蓝中各成份含量[J]. 中国卫生产业, 2015(15): 5-8.
- [9] 陈 丹, 李 柯, 吴梅青, 等. 湖南省不同产地绞股蓝药材中总皂苷含量测定[J]. 中国民族民间医药, 2013, 22(7): 17-18.
- [10] 刘 芳, 胡 坪, ANNIKA K, 等. 绞股蓝药材黄酮类化合物的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中成药, 2009, 31(4): 493-495.
- [11] 刘世彪, 林 如, 胡正海. 绞股蓝属 5 种植物的茎叶结构和总皂苷含量差异[J]. 福建农林大学学报(自然版), 2006, 35(5): 495-499.
- [12] 王临润, 黄明珠. 中国东南部 4 种绞股蓝中黄酮成分的分析[J]. 中草药, 2007, 38(4): 618-619.
- [13] 王 翀, 郭志刚, 赵桂仿. 利用 ISSR 分析 6 种绞股蓝属植物的遗传多样性与亲缘关系[J]. 西北大学学报: 自然科学版, 2008, 38(5): 767-770.
- [14] 赵 瑜, 王佩香, 邹芳平, 等. 绞股蓝叶龄变化规律及其应用研究[J]. 中国农学通报, 2005, 21(5): 230.

(收稿日期: 2018-06-27)