

绿萼梅药材超高效液相色谱指纹图谱研究

王灿灿¹, 杨沫^{1,2}, 吴德玲^{1,2,3}, 张伟^{1,2,3}, 金传山^{1,2,3}

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 新安医学教育部重点实验室, 安徽 合肥 230038; 3. 中药饮片制造新技术安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230012)

[摘要]目的 采用超高效液相色谱法(ultra performance liquid chromatography, UPLC)建立绿萼梅药材的指纹图谱, 为有效控制绿萼梅药材的质量奠定基础。**方法** 采用 CORTECS C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.6 μm), 以乙腈(A)-0.1%甲酸水(B)溶液为流动相进行梯度洗脱, 进样量为 1 μL, 流速为 0.3 mL/min, 检测波长 260 nm。**结果** 通过相似度分析确定 19 个色谱峰构成绿萼梅药材指纹图谱的特征峰。**结论** 采用 UPLC 方法建立的指纹图谱具有精密度、稳定性、重复性良好的特点, 可为绿萼梅化学成分的进一步提取分离和药效物质基础的研究提供科学依据。

[关键词]绿萼梅; 超高效液相色谱; 指纹图谱

[中图分类号]R932 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2019.01.023

绿萼梅为蔷薇科植物梅[*Prunus mume* (Sieb.) Sieb. et Zucc.]的干燥花蕾, 具有疏肝和中、化痰散结之功效, 用于治疗肝胃气痛、郁闷心烦、梅核气、瘰疬、疮毒等症^[1]。绿萼梅以长江流域以南为多, 如安徽、浙江、湖北等地, 日本、朝鲜、新西兰亦有分布^[2]。绿萼梅始载于《本草纲目》, 近年来国内外学者对绿萼梅化学成分进行了相关研究^[3-6], 已经发现的成分中主要包括黄酮、苯丙素、挥发油等化学成分。有关绿萼梅药材的质量控制, 目前文献报道较多的是多成分的含量测定^[7-8], 而采用指纹图谱技术评价和控制绿萼梅药材质量的研究报道很少, 难以全面反映绿萼梅所含化学成分特征, 难以准确评价和控制药材质量。本实验采用超高效液相色谱法(ultra performance liquid chromatography, UPLC)对绿萼梅药材指纹图谱进行研究, UPLC 具有耐高压、快速分离、高灵敏度、高分离度等特点, 能克服高效液相色谱灵敏度低、分析时间长等缺点, 在中药等复杂体系的分离分析上具有明显优势, 被广泛地应用于中药复杂体系的研究。利用 UPLC 建立绿萼梅的指纹图谱, 能缩短分析时间、节约溶剂消耗, 可为建立绿萼梅药材的质量控制与评价标准提供借鉴。

1 仪器和试剂

1.1 仪器 Agilent technologies 1290 infinity II

基金项目: 安徽省高等学校自然科学研究重点项目(KJ2017A295); 安徽省科技攻关项目(1501051174); 新安医学教育部重点实验室开放基金项目(2018xayx09)

作者简介: 王灿灿(1991-), 女, 硕士研究生

通信作者: 吴德玲(1973-), 男, 硕士, 教授, dlwu7375@sina.com

(G7120A 二元泵系统, G7167B 自动进样器, G7114B VWD 检测器); 美国安捷伦科技有限公司; BP211DS 十万分之一天平, BSA224S 万分之一天平; 德国 Sartorius 公司; KQ-500DB 型数控超声波清洗器; 昆山超声仪器有限公司; SYZ-C 型石英自动亚沸高纯水蒸馏器; 金坛市杰瑞尔电器有限公司; F80 型高速粉碎机; 金坛市金城国胜实验仪器厂。

1.2 试剂 对照品绿原酸(批号 CF1026): 武汉天植生物技术有限公司; 金丝桃苷(批号 111521-201408): 中国食品药品检定研究院; 异槲皮苷(批号 111809-201403): 中国食品药品检定研究院; 芦丁(批号 YM0316SA13): 上海源叶生物科技有限公司; 甲醇、乙腈和甲酸均为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。绿萼梅药材采自安徽歙县、浙江杭州, 经安徽中医药大学药学院刘守金教授鉴定为蔷薇科植物梅[*Prunus mume* (Sieb.) Sieb. et Zucc.]的干燥花蕾。绿萼梅样品来源和加工方式见表 1。

2 方法和结果

2.1 溶液制备

2.1.1 供试品溶液的制备 取过四号筛的绿萼梅粉末约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理(功率 100 W, 频率 40 kHz)30 min, 放冷, 再称定质量, 用 50% 甲醇补充减失的质量, 混匀后过孔径为 0.22 μm 的滤膜, 取续滤液作为供试品溶液。

2.1.2 对照品溶液的制备 分别取金丝桃苷对照品、绿原酸对照品、异槲皮苷对照品、芦丁对照品适量, 精密称定, 加 50% 的甲醇制成一定质量浓度的母液, 取单标母液适量, 加 50% 甲醇制成每毫升含金丝桃苷 30.6 μg, 异槲皮苷 33.2 μg、绿原酸

42.9 μg 、芦丁 43.6 μg 的混合对照品溶液。

表 1 绿萼梅样品来源和加工方式

编号	加工方式	来源	编号	加工方式	来源
S1	产地收集(烘干)	安徽 杨家宅 1	S10	实验室加工(烘干)	安徽 姬公尖 6
S2	实验室加工(烘干)	安徽 杨家宅 2	S11	微波杀青后烘干	安徽 姬公尖 7
S3	微波杀青后烘干	安徽 杨家宅 3	S12	实验室加工(烘干)	安徽 石河村 1
S4	产地收集(烘干)	安徽 杨家宅 4	S13	产地收集(烘干)	安徽 石河村 2
S5	产地收集(烘干)	安徽 姬公尖 1	S14	产地收集(烘干)	安徽 石河村 3
S6	产地收集(烘干)	安徽 姬公尖 2	S15	实验室加工(烘干)	安徽 石河村 4
S7	产地收集(烘干)	安徽 姬公尖 3	S16	实验室加工(烘干)	安徽 石河村 5
S8	实验室加工(烘干)	安徽 姬公尖 4	S17	微波杀青后烘干	安徽 石河村 6
S9	微波杀青后烘干	安徽 姬公尖 5	S18	产地收集(烘干)	浙江 杭州

2.2 色谱条件 Waters CORTECS C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×100 mm,1.6 μm),柱温 35 $^{\circ}\text{C}$;流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸水(B),洗脱程序(0~6 min, 6%→9% A;6~12 min,9%→13% A;12~16 min, 13%→13% A;16~25 min,13%→30% A;25~30 min,30%→40% A);进样量为 1 μL ;流速 0.3 mL/min,检测波长 260 nm。

2.3 方法学考察

2.3.1 稳定性试验 取 S4 供试品溶液,分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样检测,各主要色谱峰的相对金丝桃苷峰(13 号峰)的保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 2.0%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.2 精密度试验 取 S4 供试品溶液,连续进样 6 次,各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积

的 RSD 均小于 2.0%,表明仪器精密度高。

2.3.3 重复性试验 取同一批药材 S4,按“2.1”项下方法制备供试品溶液 6 份,分别进样测定,各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 都小于 2.0%,说明该方法的重复性良好。

2.4 指纹图谱研究

2.4.1 指纹图谱的建立 将 18 个色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012.130723 版),先进行数据剪切,以除去 2 min 前的溶剂峰和 30 min 之后色谱柱平衡的部分,设置 S1 为参照图谱,对照图谱的生成方法为中位数,时间窗的宽度为 0.1,经过多点校正之后,然后再进行自动匹配,生成绿萼梅药材 UPLC 指纹图谱及对照图谱(R),分别见图 1、图 2。

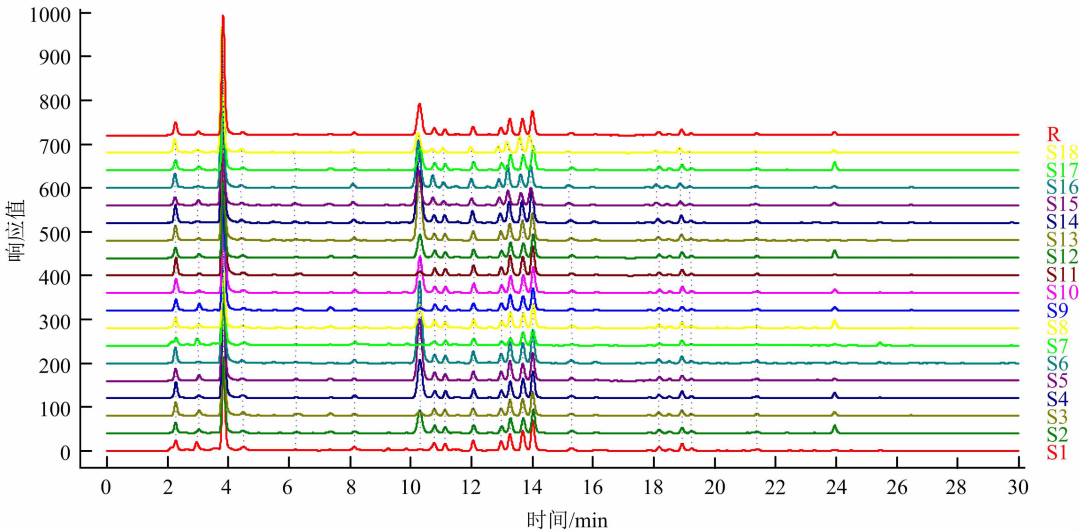


图 1 绿萼梅药材 UPLC 指纹图谱

2.4.2 相似度评价 在上述数据处理的基础上,采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012.130723 版)软件对 18 批绿萼梅进行相似度评价,结果表明相似度均>0.92,说明绿萼梅样品相互之间相似度较好。

2.4.3 不同批次绿萼梅药材指纹图谱聚类分析 采用 SPSS 23.0 软件包中的聚类分析程序对不同批次的绿萼梅提取物样品进行聚类分析。在方法上采用 Euclidean 距离计算,然后根据数值顺序用 Avergae linkage 法作图、得出聚类分析树状图,结果见图 3。

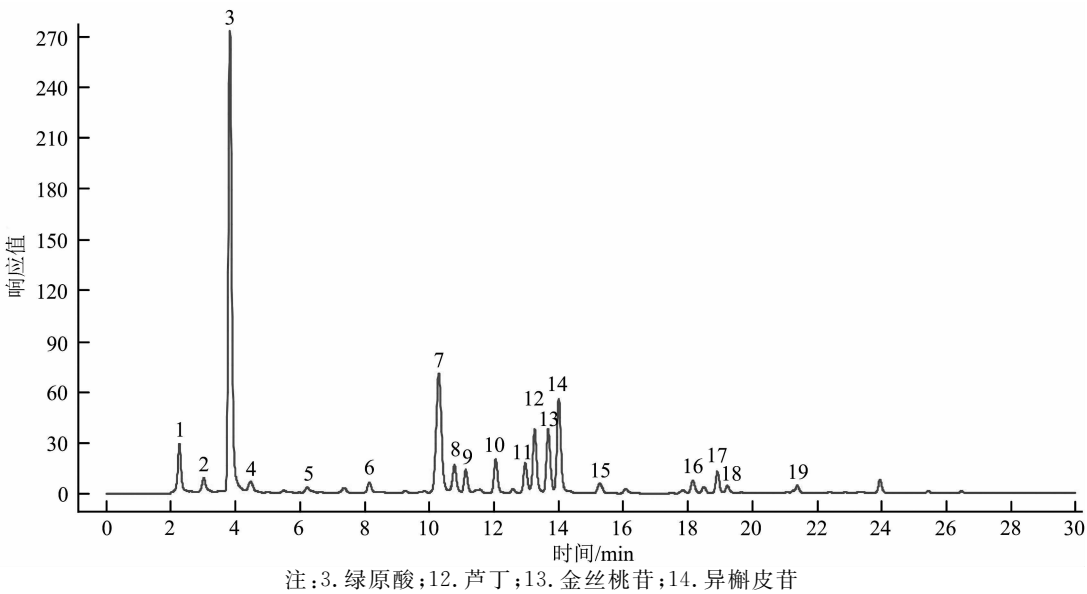


图 2 绿萼梅药材对照图谱

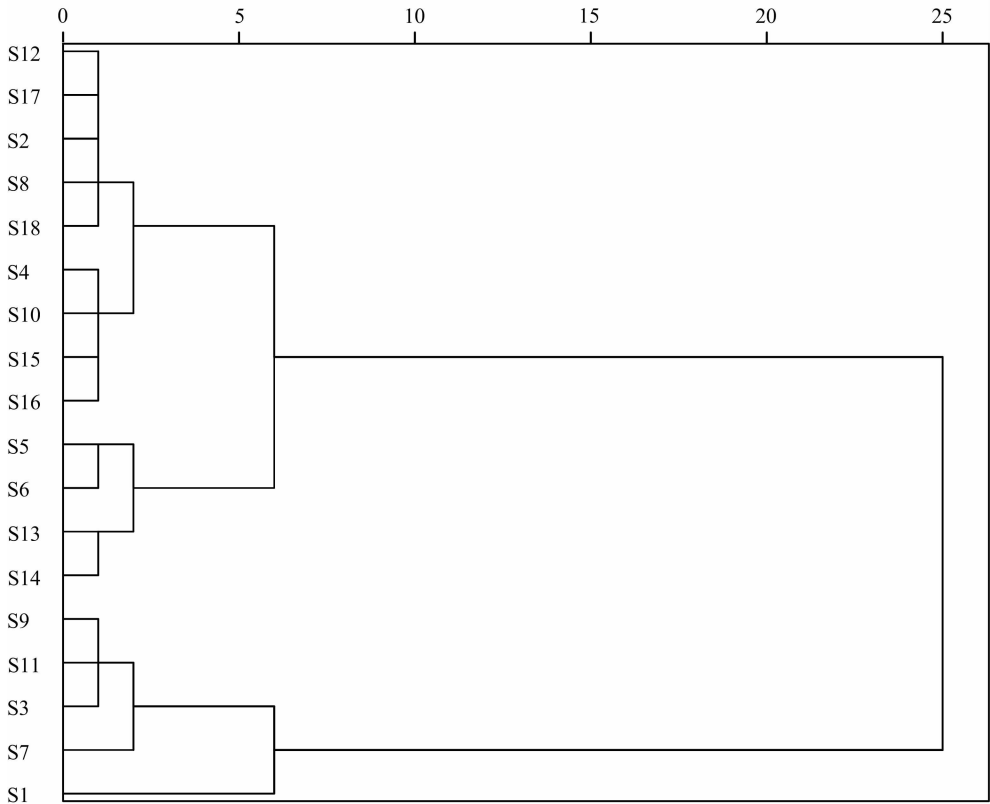


图 3 聚类分析的树状图

由图 3 可见,不同批次绿萼梅提取物可分为 2 个大类,S2、S4、S5、S6、S8、S10、S12、S13、S14、S15、S16、S17、S18 为一类,S1、S3、S7、S9、S11 为一类,结果表明产地直接烘干和实验室直接烘干之间差异性很小,同时也表明了直接烘干与微波杀青后烘干这两种加工方法之间存在一定的差异。由于烘干是先使物体表面加热,再经热传导,使内部温度升高、水分散失缓慢的过程,产地直接烘干和实验室加工都属于烘干,即二者差异性很小;微波干燥属于穿透性加

热,能在短时间内使物料干燥,直接烘干和微波杀青后烘干二者加工方式不同,干燥原理不同,即二者之间存在一定的差异。聚类分析的结果与相似度计算结果基本一致,进一步验证了方法的可靠性,可用于绿萼梅提取物的指纹图谱分析。

3 讨论

本实验分别对色谱条件中的色谱柱、流动相及检测波长进行了考察。考察了 Waters 公司的两种 UPLC 色谱柱,一种是 ACQUITY UPLC BEH C₁₈

色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm);另一种是CORTECS UPLC C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.6 μm),最终选择CORTECS C₁₈色谱柱进行实验。考察了甲醇-0.1%甲酸水、乙腈-0.1%甲酸水两种流动相体系,发现以乙腈-0.1%甲酸水为流动相,样品的分离效果较好。对260、355 nm不同波长进行考察,发现在260 nm波长下,图谱的色谱峰信息较为全面,故选择260 nm作为检测波长。

本实验依次运用相似度评价和聚类分析方法对绿萼梅样品UPLC指纹图谱进行分析,相似度评价结果表明,不同批次绿萼梅药材的相似度都在0.900以上,表明不同批次绿萼梅样品相似度良好;聚类分析时发现绿萼梅样品聚为两大类,由此发现产地收集和实验室加工之间差异性很小(S1样品除外);烘干和微波杀青后烘干这两种加工方式之间存在差异(S17样品除外),表明不同的加工方法对绿萼梅药材质量有一定的影响,在今后的绿萼梅药材研究中需要规范其加工工艺,方能保证绿萼梅药材的质量。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:311.

[2] 王灿灿,张伟,吴德玲,等. 白梅花化学成分及其药理作用研究进展[J]. 广州化工,2017,45(24):40-42.

[3] 张清华,张玲,尚立霞,等. 白梅花的化学成分研究[J]. 中药材,2008,3(11):1666-1668.

[4] FUJIMOTO K, NAKAMURA S, MATSUMOTO T, et al. Structures of acylated sucroses from the flower buds of *Prunus mume* [J]. *Journal of Natural Medicines*, 2014,68(3):481-487.

[5] NAKAMURA S, FUJIMOTO K, MATSUMOTO T, et al. Structures of acylated sucroses and an acylated flavonol glycoside and inhibitory effects of constituents on aldose reductase from the flower buds of *Prunus mume* [J]. *Journal of Natural Medicines*, 2013, 67(4): 799-806.

[6] FUJIMOTO K, NAKAMURA S, MATSUMOTO T, et al. Medicinal flowers. XXXVIII. structures of acylated sucroses and inhibitory effects of constituents on aldose reductase from the flower buds of *Prunus mume* [J]. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 2013, 61(4): 445-451.

[7] 张伟,郭晶晶,郑太华,等. 不同产地梅花中绿原酸含量测定[J]. 安徽中医学院学报,2013,32(6):89-90.

[8] 张晓霞,房经贵,陈世忠,等. 高效液相色谱法测定中药梅花中绿原酸、芦丁、金丝桃苷和异槲皮素的含量[J]. 中国医院药学杂志,2016,36(1):107-109.

(收稿日期:2018-09-03;编辑:曹健)

A Study of Fingerprints of Mume Flos by Ultra-performance Liquid Chromatography

WANG Can-can¹, YANG Mo^{1,2}, WU De-ling^{1,2,3}, ZHANG Wei^{1,2,3}, JIN Chuan-shan^{1,2,3}

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China; 2. Key Laboratory of Xin'an Medicine, Ministry of Education, Anhui Hefei 230038, China; 3. Anhui Province Key Laboratory of New Manufacturing Technology for Traditional Chinese Medicine Decoction Pieces, Anhui Hefei 230012, China)

[Abstract] **Objective** To establish the fingerprints of Mume Flos by ultra-performance liquid chromatography (UPLC), and to provide a basis for the effective control of quality of Mume Flos. **Methods** UPLC was performed on a CORTECS C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 1.6 mm) with a mobile phase of acetonitrile (A)-0.1% formic acid (B) solution for gradient elution at a sample size was of 1 μL, a flow rate of 0.3 mL/min, and a detection wavelength of 260 nm. **Results** Similarity analysis identified 19 characteristic peaks in the fingerprints of Mume Flos. **Conclusion** The fingerprints established using UPLC are accurate, stable, and reproducible, and provide a scientific basis for further isolation of chemical constituents from Mume Flos and basic research on its effective components.

[Key words] Mume Flos; Ultra-performance liquid chromatography; Fingerprint