

布渣叶超高效液相指纹图谱研究

陈伟韬^{1,2} 梁之桃² 周立敏² 周劲松³ 赵中振²

(1 广东省中医药工程技术研究院,广东广州,510095; 2 香港浸会大学,香港; 3 广州中医药大学,广东广州,510405)

摘要 目的:建立布渣叶超高效液相指纹图谱,为快速有效对布渣叶进行质量评价,改进其质量控制方法提供理论依据。方法:采用 Waters Acquity BEH UPLC C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.7 μm),以乙腈-0.1% 甲酸水溶液作为流动相梯度洗脱,检测波长为 278 nm,流速为 0.3 mL/min,柱温为 20 ℃;对建立的布渣叶指纹图谱进行相似度计算,并对数据进行主成分分析。结果:方法学考察结果良好,确立了 11 个共有峰,布渣叶指纹图谱的相似度明显高于伪品;主成分分析结果显示布渣叶密集分布在一个区域内,伪品分布在该区域外。结论:该方法稳定可靠,能对布渣叶药材作出真伪优劣评价,为建立布渣叶超高效液相指纹图谱提供理论依据。

关键词 布渣叶;指纹图谱;超高效液相色谱。

Study on Chemical Fingerprint of *Microctis Folium* by Ultra Performance Liquid Chromatography

Chen Weitao^{1,2}, Liang Zhitao², Zhou Limin², Zhou Jinsong³, Zhao Zhongzhen²

(1 Guangdong Province Engineering Technology Research Institute of T. C. M., Guangzhou China; 2 Hong Kong Baptist University, Hong Kong China; 3 Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou China)

Abstract Objective: To establish the chemical fingerprint of *Microctis Folium* by ultra performance liquid chromatography (UPLC). **Methods:** The separation was developed on ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column(2.1 mm×100 mm,1.7 μm) by gradient elution with acetonitrile-water containing 0.1% formic acid as mobile phase at a flow rate of 0.3 mL/min, the detection wavelength at 278 nm and column temperature at 20 ℃. The fingerprint was evaluated by similarity assay and principal component analysis (PCA). **Results:** Eleven characteristic peaks were established in the fingerprint, and two peaks were identified. The similarities of *Microctis Folium* was calculated and used for differentiating its adulterant. PCA showed that *Microctis Folium* and its adulterant were distinctly separated by the three most important principal components. **Conclusion:** The method is stable and reliable which could be applied to the authentication and quality control of *Microctis folium*.

Key Words *Microctis Folium*; Fingerprint; UPLC

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.02.040

布渣叶(*Microctis Folium*)来源于椴树科(*Tiliaceae*)植物破布叶(*Microcos paniculata* L.)的干燥叶。性凉、味微酸,归脾、胃经。有消食化滞,清热利湿的功效,可用于治疗饮食积滞,感冒发热,湿热黄疸^[1-2]。布渣叶分布于广东、海南、广西、云南等地^[3]。其中以广东分布资源最为丰富,广东的阳西、湛江是主产地。生于丛林中、灌丛中或路旁。本品无毒,民间有将其采叶晒干泡茶饮的习惯,亦是凉茶配方的常见材料,有清热、解渴、开胃的作用。

目前 2010 版中国药典对评价布渣叶质量的含量检测成分仅牡荆苷一项,牡荆苷具有抗肿瘤、抗病毒、抗菌、抗炎、降糖等与布渣叶功效相关的药理作用^[4-6],但并无直接证据可表明牡荆苷为布渣叶的有效成分^[7],且以单一成分的检测来评价中药过于片面^[8],因此建立布渣叶指纹图谱具有科学意义。

本研究采用 UPLC 建立布渣叶指纹图谱,与现时布渣叶指纹图谱的研究相比较,具有分析时间更短,分析能力更强的优点^[9-10]。研究通过相似度计算、主成分分析等方法对指纹图谱进行评价,为布渣叶质量评价研究提供一种快速、高效的新方法。

1 资料与方法

1.1 仪器 ACQUITY UPLC(Waters,配有二极管数组检测器,Empower2 色谱工作站);MILLIPORE 纯水机(美国);冷冻干燥机(TriadTM);分析天平(AdventurerTM);离心机(Eppendorf Centrifuge 5810);高速离心机 Eppendorf Centrifuge 5417R,超声仪(CREST)。

1.2 试剂 甲醇为分析纯(RCI Labscan Limited);液相色谱用的甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯(RCI Labscan Limited);水为超纯水。

基金项目:广东省中医药局建设中医药强省项目(编号:20142012)

作者简介:陈伟韬(1990—),男,硕士,研究方向:中药质量分析的研究;E-mail:chenwt009@126.com

通信作者:赵中振,男,博士,教授,研究方向:中药鉴定和中药品质控制方面的研究,Tel:(00852)34112424;E-mail:zzzhao@hkbu.edu.hk

1.3 药品 布渣叶药材经广州医药大学周劲松博士鉴定为椴树科植物破布叶 (*Microcos paniculata* L.) 的干燥叶,样品来源见表 1,其中 18 至 21 号为新鲜采摘后冷冻干燥品,10 号样本为伪品。牡荆苷(上海同田生物技术有限公司,13082932);异牡荆苷(成都瑞芬思生物科技,Y-116-131015);布渣叶对照药材(中国药品生物制品检定所,QUZL-8E3N)。

表 1 布渣叶药材样品来源表

样品编号	药材来源	产地/购买地
1	海王星辰	广州海珠区(购买地)
2	广州市白云区	广州白云区(购买地)
3	通济堂	广州荔湾区(购买地)
4	济和堂	广州荔湾区(购买地)
5	二天堂	广州天河区(购买地)
6	广州	广州
7	汕头市创美药业有限公司	广东梅县
8	天城饮片有限公司	广东
9	潮州药材市场	广东潮州
10	湛江宏丰饮片有限公司(伪品)	广西
11	阳江药材市场	广西
12	广州市健和中药饮片有限公司	广东惠州
13	永昌堂药行	香港(购买地)
14	鸿德中西药业	香港(购买地)
15	日安新城门中西药行	香港(购买地)
16	永泰中西药行	香港(购买地)
17	德信药行	香港(购买地)
18	香港(冷冻干燥)	香港九龙塘
19	香港(冷冻干燥)	香港九龙塘
20	肇庆(冷冻干燥)	肇庆鼎湖山
21	广州(冷冻干燥)	广州天河区

1.4 方法

1.4.1 色谱条件 色谱仪:ACQUITY UPLC(Waters);色谱柱:Waters Acquity UPLC BEH C₁₈(2.1 mm×100 mm,1.7 μm);流动相:流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液,流动相 B 为乙腈,按表 2 进行梯度洗脱;柱温:20 ℃;流速:0.3 mL/min;检测波长:278 nm;进样量:2 L。

表 2 梯度洗脱条件

洗脱时间	A(%)	B(%)
0 min	90	10
19 min	84	16
41 min	62	38
44 min	30	70
46 min	30	70
46.1 min	90	10
50 min	90	10

1.4.2 对照品溶液的制备 精密称取牡荆苷、异牡荆苷适量,加入 100% 甲醇溶解,配成每 1 mL 含 0.1 g 的混合对照品溶液,即得。

1.4.3 供试品溶液的制备 取各批次布渣叶样品粉末(过 40 目筛)约 1 g,置于 50 mL 离心管中,精密加入 100% 甲醇 20 mL,称定重量,超声(220 W,40 kHz)60 min,冷却,用 100% 甲醇补足减少的重量,以 3 000 r/min 离心 5 min,取上清液 1 mL 至 2 mL 离心管中,再以 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,即得。

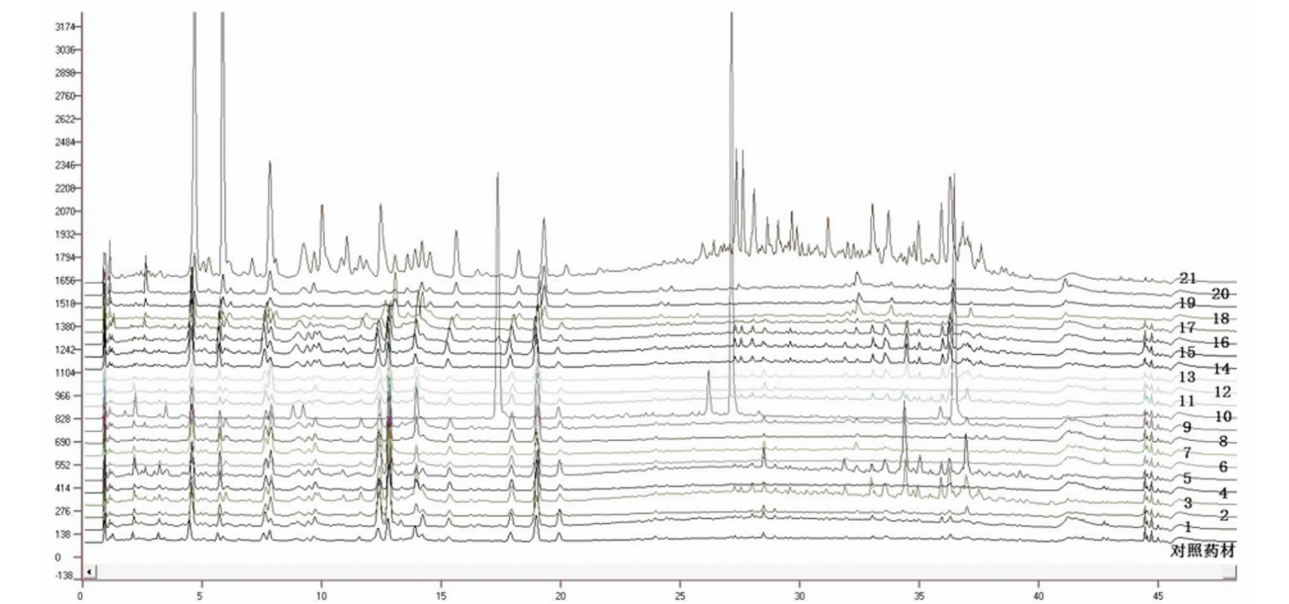


图 1 22 批药材样品 UPLC 色谱图

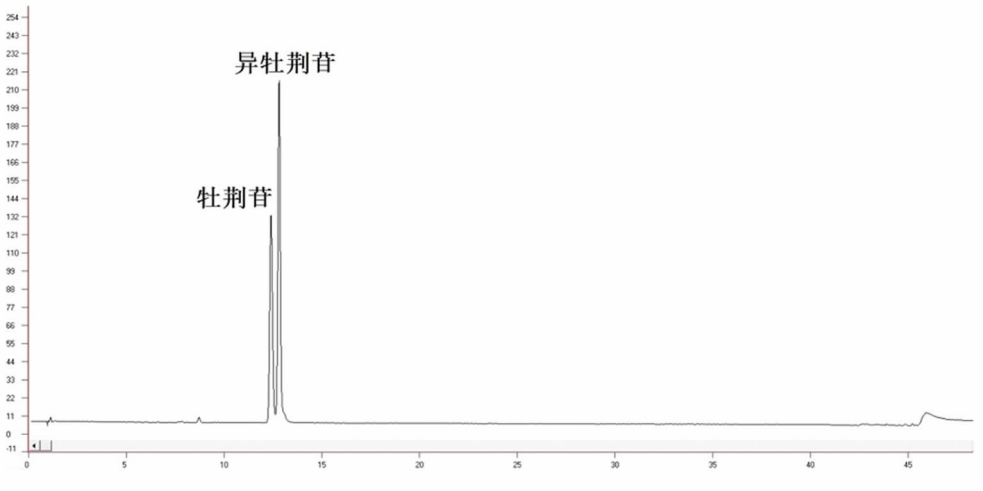


图2 对照品 UPLC 色谱图

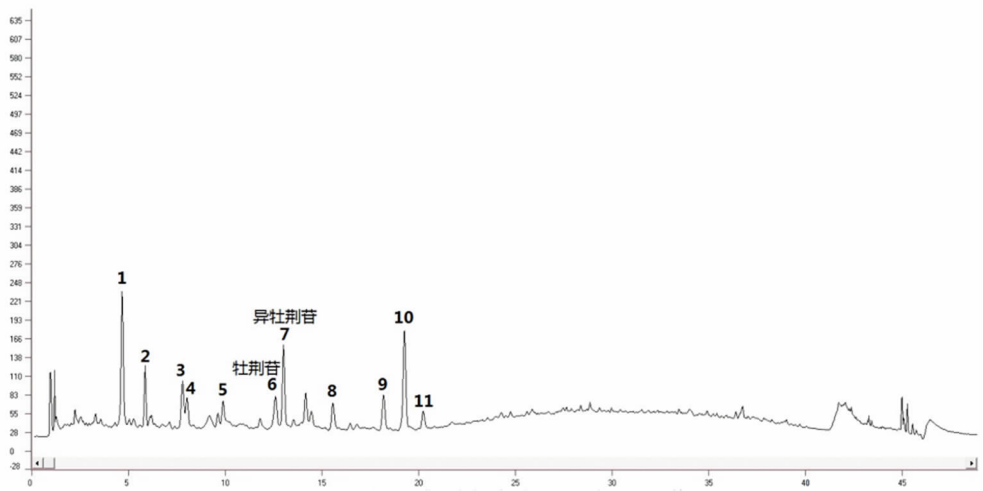


图3 典型布渣叶 UPLC 指纹图谱

2 结果

2.1 精密度试验 取同一份布渣叶样品供试品溶液(3号样品),连续进样3次。记录主要色谱峰保留时间和峰面积,各色谱峰保留时间 RSD 为 0.02% ~ 0.19%;各色谱峰峰面积 RSD 为 3.08% ~ 8.04%。结果表明仪器精密度良好。

2.2 稳定性试验 取同一份布渣叶供试品溶液(3号样品)分别在 0、2、4、8、12、24、48 h 进样分析。记录主要色谱峰保留时间和峰面积,各色谱峰保留时间 RSD 为 0.09% ~ 0.42%;各色谱峰峰面积 RSD 为 3.33% ~ 8.58%。结果表明各成分在 48 h 内性质稳定。

2.3 重复性试验 取同一批次的布渣叶样品粉末 3 份(3号样品),分别按照供试品溶液制备方法制备供试品溶液,进样分析。记录主要色谱峰保留时间和峰面积,各色谱峰保留时间 RSD 为 0.04% ~ 3.23%;各色谱峰峰面积 RSD 为 0.44% ~ 7.43%。

结果表明试验重复性良好。

2.4 布渣叶指纹图谱分析

2.4.1 布渣叶指纹图谱建立 取布渣叶药材 21 批以及对照药材,共 22 批,按 1.4.3 项下制备供试品溶液,以 1.4.1 项色谱条件检测,得 22 批样品(含对照药材和伪品)色谱图,见图 1。取对照品溶液,以相同条件检测,见图 2。从图 1 可明显看出 10 号样品为伪品,18 ~ 21 号样品为新鲜采摘后冷冻干燥品,图谱与其他布渣叶样品的比较有差异。从其余 17 批样品中可见典型布渣叶 UPLC 指纹图谱,存在 11 个共有峰,根据对照品色谱图,指认出其中 2 个共有峰,分别为牡荆苷、异牡荆苷,见图 3。

2.4.2 共有峰相对保留时间和相对峰面积计算 以 6 号共有峰为参照,分别计算各批布渣叶样品和对照药材图谱中 11 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果见表 3、表 4。结果显示 11 个共有峰的相对保留时间 RSD 小于 1%,共有峰的平均相对

保留时间 (min) 为: 0.36、0.46、0.61、0.63、0.78、1.61。11 个共有峰的相对峰面积变异较大,显示不同来源的布渣叶样品之间,其质量差异较大。

表 3 11 个共有峰的相对保留时间

峰号	对照药材	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.00	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.37
2	0.45	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.00	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.47
3	0.61	0.61	0.61	0.61	0.61	0.61	0.61	0.61	0.61	0.61	0.00	0.61	0.61	0.61	0.61	0.61	0.61	0.61	0.62	0.62	0.62	0.63
4	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.00	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.64	0.63	0.64	0.65
5	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.00	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.76	0.76	0.76	0.78
6(S)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
7	1.03	1.03	1.03	1.03	1.03	1.03	1.03	1.03	1.03	1.03	0.00	1.03	1.03	1.04	1.04	1.03	1.04	1.03	1.03	1.03	1.03	1.05
8	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24	0.00	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24	1.26
9	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	0.00	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.44	1.44	1.45	1.47
10	1.54	1.54	1.54	1.54	1.54	1.54	1.53	1.54	1.54	1.53	0.00	1.54	1.54	1.54	1.54	1.54	1.54	1.53	1.53	1.53	1.53	1.55
11	1.62	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61	0.00	1.61	1.61	1.62	1.62	1.62	1.62	1.61	1.60	1.60	1.61	1.63

表 4 11 个共有峰的相对峰面积

峰号	对照药材	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	1.57	0.70	1.04	0.43	4.04	0.56	0.54	0.55	5.00	2.76	0.00	1.49	0.99	1.00	2.07	2.40	2.60	5.26	0.76	14.65	17.25	2.94
2	0.47	0.17	0.33	0.14	1.35	0.33	0.07	0.26	1.42	0.89	0.00	0.27	0.29	0.48	0.92	0.85	0.93	2.10	0.26	7.25	6.57	2.84
3	0.71	0.28	0.50	0.31	1.50	0.32	0.33	0.26	2.37	1.41	0.00	0.86	0.50	0.63	1.09	1.30	1.39	2.84	0.60	10.92	12.78	1.35
4	0.74	0.12	0.77	0.51	0.89	0.46	0.47	0.66	1.83	1.70	0.00	0.58	2.25	1.00	0.50	0.51	0.54	1.07	0.32	0.97	2.26	0.12
5	0.23	0.11	0.17	0.13	0.58	0.09	0.19	0.13	0.79	0.50	0.00	0.19	0.36	0.28	0.31	0.30	0.28	0.12	0.15	2.65	4.06	0.20
6(S)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
7	1.88	1.95	2.02	1.35	2.26	1.63	1.95	2.20	2.55	1.92	0.00	1.12	1.90	1.02	1.15	1.27	1.27	2.20	2.21	7.18	1.51	0.16
8	0.46	0.17	0.25	0.17	0.86	0.19	0.18	0.13	1.22	0.78	0.00	0.40	0.30	0.32	0.48	0.52	0.60	1.26	0.24	6.13	5.05	0.53
9	0.88	0.28	0.32	0.36	1.23	0.24	0.49	0.14	1.84	1.31	0.00	0.70	0.62	0.61	0.69	0.67	0.67	1.56	0.32	6.01	4.68	0.30
10	2.63	1.25	0.98	1.13	3.52	0.97	1.53	0.30	5.70	4.28	0.00	2.34	2.25	1.43	1.81	1.58	1.70	5.08	0.70	22.91	14.52	0.66
11	0.75	0.34	0.23	0.13	0.60	0.28	0.17	0.07	0.65	0.52	0.00	0.30	0.28	0.22	0.29	0.24	0.24	0.55	0.03	2.39	1.99	0.11

表 5 布渣叶色谱图与对照药材色谱图
相似度计算

No.	相似度	No.	相似度
1	0.921	12	0.925
2	0.942	13	0.922
3	0.921	14	0.940
4	0.951	15	0.921
5	0.871	16	0.932
6	0.952	17	0.949
7	0.772	18	0.846
8	0.954	19	0.821
9	0.948	20	0.821
10	0.153	21	0.585
11	0.945		

2.4.3 相似度分析 把 21 批布渣叶样品色谱图导入中药色谱图分析和数据管理系统软件,以对照药材为参照图谱,用全图谱夹角余弦法计算各样品与之的相似度,见表 5。结果显示 10 号样品的相似度明显低于其他样品,支持 10 号样品为伪品的结论。

2.4.4 主成分分析 把 22 批(含对照药材)布渣叶指纹图谱导入 IBM SPSS 21 Statistics 软件对数据

进行主成分分析,见图 4。由于 10 号样品外观性状上与正品布渣叶也存在明显不同,可明确其为伪品。主成分分析结果显示 10 号样品的指纹图谱特征明显与其他样品不同,本研究所建立的化学指纹图谱明显可以区分布渣叶伪品。同时,相似度分析结果与主成分分析结果一致,2 种方法得到了相互验证。见图 4。

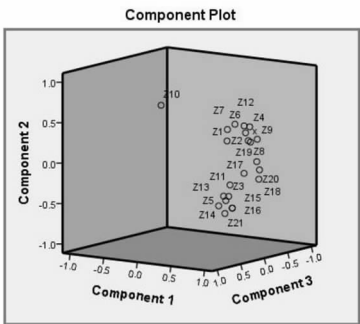


图 4 22 批(含对照药材)布渣叶主成分分析结果
注:X 为对照药材

3 讨论
实验对色谱条件和样品制备方法进行了考察。

色谱检测采用 DAD 检测器作全波长扫描,其中 278 nm,色谱峰较多,峰面积较大,峰形较好,色谱信息丰富,故选择 278 nm 作为检测波长。

考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-甲酸水溶液 3 种流动相系统,发现乙腈-甲酸水溶液系统色谱峰信息最为丰富,并最终选择乙腈-0.1% 甲酸水溶液作为流动相。另甲醇-水系统会导致柱压较高,缩短色谱柱使用寿命,不建议使用。

实验还考察了柱温分别为 20 ℃、30 ℃、40 ℃ 时对色谱图的影响,发现随着柱温升高,保留时间减少,部分色谱峰峰面积减少甚至消失,综合考虑,选择 20 ℃ 作为柱温。

在样品制备方面,比较了用不同浓度甲醇提取样品和不同提取方法对色谱图的影响。当中以 100% 甲醇提取样品所得的色谱图色谱峰最多,峰面积最大,选定为提取溶剂。又考察了超声与加热回流两种提取方法,发现无明显差异,由于超声方法操作较为简便,故选作为样品提取方法,超声时间为 60 min。

本研究采用超高效液相色谱法对 21 批布渣叶样品进行分析,建立布渣叶指纹图谱,通过相似度计算和主成分分析对指纹图谱进行评价,结果表明实验方法通过方法学考察,结果良好,成功建立了布渣叶超高效液相指纹图谱,确立了 11 个共有峰。图谱评价,结果发现 10 号样品相似度明显较其他样品低,主成分分析亦表明 10 号样品与其他样存在较大差异,两种评价方法结果一致。因此该方法能从布渣叶样品中把伪品区分开来,达到鉴别和质量控制的目的。

观察图 1 可得不同布渣叶样品之间色谱峰差异主要体现在 25 ~ 40 min 这段时间内,表明出该部份化学成分及其含量的不同,在比较药材粉末后发现,不同样品粉末颜色有所不同,从褐至墨绿不等,这提示成分差异可能与植物色素或其他物质有关。

另外,四批新鲜采摘后经冷冻干燥的 18 ~ 21 号样品相似度相对较低,原因可能与采收时间和干燥方法有关。

中药指纹图谱与以往的单一成分检测相比较,更能体现中药的复杂性和整体性,更好地中药质量进行评价。现时中药色谱指纹图谱中以高效液相色谱法的研究较多,已有关于布渣叶高效液相指纹图谱的文献报道^[11]。本次研究运用的超高效液相色谱法较以往的高效液相色谱法具有分析时间短,分离度、灵敏度高的优点,研究应用前景广阔^[12]。本研究建立的布渣叶超高效液相指纹图谱经过方法学验证,有良好的稳定性和重现性,为布渣叶质量控制的进一步研究提供理论依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:88-89.
- [2] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药材标准[S]. 广州:广东科学技术出版社,2004:66-68.
- [3] 国家中医药管理局. 中华本草(第五册)[M]. 上海:上海科技出版社,1999:324-326.
- [4] 张雪,徐道华. 牡荆苷的药理作用研究进展[J]. 中国医药导报, 2013,10(35):35-38,42.
- [5] Yan-Gan Chen, Ping Li, Peng Li, et al. α -Glucosidase inhibitory effect and simultaneous quantification of three major flavonoid glycosides in *Microtis folium* [J]. *Molecules*, 2013(18):4221-4232.
- [6] 田素英,曾聪彦,梅全喜,等. 布渣叶的化学成分、药理作用与临床研究进展[J]. 亚太传统医药,2009,5(1):134-136.
- [7] Patrick C. Still, Bitna Yi, Tatiana F. González-Cestari, et al. Alkaloids from *Microcos paniculata* with cytotoxic and nicotinic receptor antagonistic activities[J]. *Journal of Natural Products*, 2013, 76(2):243-249.
- [8] 林菲娟,许晓锋. UPLC 测定中药中牡荆苷和异牡荆苷的含量[J]. 深圳中西医结合杂志,2013,23(4):71-74.
- [9] 吴剑威,赵润怀,陈波,等. 超高效液相色谱在中药领域的应用[J], 中草药,2009,40(增刊):79-81.
- [10] 陈佳,王钢力,姚令文,等. 超高效液相色谱(UPLC)在药物分析领域中的应用[J]. 药物分析杂志,2008,28(11):1976-1981.
- [11] 卢鹏,陈伟韬,陈浩桢,等. 布渣叶 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中药新药与临床药理,2012,23(5):567-569.
- [12] 孙冬梅,谭志灿,罗文汇,等. 布渣叶药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(12):84-87.

(2015-05-25 收稿 责任编辑:张文婷)