

◇ 药物分析 ◇

不同产地山楂叶 HPLC 指纹图谱比较分析

高婧^{1,2}, 王领弟³, 李艳荣¹, 潘海峰¹

(1. 承德医学院河北省中药研究与开发重点实验室, 河北 承德 067000;

2. 承德市食品药品检验检测中心, 河北 承德 067000;

3. 承德医学院附属医院药剂科, 河北 承德 067000)

摘要:目的 建立不同产地的山楂叶 50% 乙醇提取物的 HPLC 指纹图谱, 并对其中 5 种主要成分进行含量测定, 结合聚类分析评价不同产地的山楂叶药材质量。方法 采用 Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱; 以乙腈-0.1% 冰醋酸-四氢呋喃体系梯度洗脱; 检测波长 320 nm; 流速 0.9 mL · min⁻¹; 柱温 30 °C; 应用中药色谱指纹图谱相似度评价系统建立 HPLC 指纹图谱进行评价, 用 SPSS 19.0 统计软件进行聚类分析。结果 标定出山楂叶 HPLC 指纹图谱共有峰 7 个, 相似度 0.09 ~ 0.90; 聚类分析后, 可以区分不同产地山楂叶, 最终以 19 批主产地的山楂叶为样本, 重新建立山楂叶 50% 乙醇提取物 HPLC 指纹图谱, 标定出共有峰 11 个, 相似度均大于 0.85; 对 25 批山楂叶提取物 5 种主要成分进行含量测定, 结果显示主产区山楂叶的质量比较稳定。结论 建立的山楂叶 HPLC 指纹图谱重现性和特征性较好, 能够快速鉴别山楂叶。应用 SPSS 19.0 聚类分析软件, 可以较全面的反映不同产地山楂叶化学成分的差异, 为其质量控制提供实验依据。

关键词: 山楂叶提取物; 指纹图谱; 含量测定

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2018.01.009

HPLC fingerprint comparative analysis of the hawthorn leaf from different regions

GAO Jing^{1,2}, WANG Lingdi³, LI Yanrong¹, PAN Haifeng¹

(1. Hebei Province, Chinese Medicine Research and Development Key Laboratory, Chengde, Hebei 067000, China;

2. Chengde Food and Drug Inspection and Testing Center, Chengde, Hebei 067000, China;

3. Department of Pharmacy, Chengde Medical College Affiliated Hospital, Chengde, Hebei 067000, China)

Abstract: **Objective** To establish HPLC fingerprints of 50% ethanol extract from hawthorn leaves from different regions, to determine five kinds of main composition content, and to evaluate the qualities of hawthorn leaves from different regions combining with clustering analysis. **Methods** The method was performed on a Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase was set in a gradient elution model consisting of acetonitrile, 0.1% glacial acetic acid and tetrahydrofuran at a flow rate of 0.9 mL · min⁻¹. The detection wavelength was 320 nm, and the column temperature was 30 °C. HPLC fingerprint was established for evaluation with the similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of TCM and clustering analysis was made by SPSS 19.0 software. **Results** Seven peaks were selected as the common peaks in the fingerprint and the similarity of samples was 0.09 to 0.90. The result of clustering analysis could be used to distinguish hawthorn leaves from different regions, and eventually 19 batches of hawthorn leaves from main producing areas were chosen as samples and HPLC fingerprints of 50% ethanol extract from hawthorn leaves were re-established. Calibration of 11 common peaks were determined, and the similarity was greater than 0.85. The results of the determination of five kinds of main components showed that the qualities of hawthorn leaves from main producing areas were stable. **Conclusions** HPLC fingerprint of hawthorn leaf is good in repeatability and characterization, which can be used for rapid identification of hawthorn leaf. The clustering analysis with SPSS 19.0 software can demonstrate the differences in chemical composition of hawthorn leaves from different regions and provide reference for the quality control.

Keywords: hawthorn leaf extract; fingerprint; content determination

基金项目: 河北省高等学校科学技术研究重点项目 (ZD2015097); 河北省中医药管理局课题 (2017216); 承德市科学技术研究与发展计划项目 (201601A043); 承德市科学技术研究与发展计划项目 (201606A016)

作者简介: 高婧, 女, 硕士研究生

通信作者: 潘海峰, 女, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 中药分析, E-mail: phf2301@163.com

山楂叶为蔷薇科植物山里红 (*Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br.) 或山楂 (*Crataegus pinnatifida* Bge.) 的干燥叶,夏、秋二季采收,晾干。功效为活血化瘀、理气通脉、化浊降脂,用于气滞血瘀、胸痹心痛、胸闷憋气、心悸健忘、眩晕耳鸣、高血脂症^[1]。主产于东北、华北、河南、陕西、江苏、山东等地^[2]。含有多种化学成分,主要含有黄酮和三萜两大类,如牡荆素鼠李糖苷、槲皮素、牡荆素、山柰酚、金丝桃苷、对羟基苯甲苹果酸、熊果酸、山梨醇、盐酸二乙胺等^[3-4],黄酮类是山楂叶生理活性的主要成分。本课题组前期对山楂叶进行化学指纹图谱^[5]的研究,并针对道地产区承德产山楂叶的总黄酮和主要成分含量进行动态监测^[6]。《中国药典》收载的山玫胶囊和《卫生部药品标准》收载的心安胶囊主要原料是山楂叶的 50% 乙醇提取物,所以本文将采用 HPLC 法,以 8 个产地共 25 批山楂叶 50% 乙醇提取物为对象进行指纹图谱研究,通过聚类分析区分不同产地山楂叶化学成分的差异,同时对 5 个主要成分进行含量考察。该方法提供的信息量多,特征性强,可用于山楂叶药材的鉴别和质量评价,并为成药山玫胶囊和心安胶囊的质量控制提供一定依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Agilent1100 Series 高效液相色谱仪 (G1322A 在线脱气机、G1311A 二元泵、G1316A 柱温箱、G1315D 二极管阵列检测器、G1329A 自动进样器);Agilent Chemstation 色谱工作站;AG245 电子分析天平;KQ-700 超声波清洗器。

1.2 药品与试剂 25 批山楂叶药材由承德民族师范学院董建新教授鉴定为蔷薇科植物山楂的干燥叶。产地及编号:S1~S9 产自河北;S10~S13 产自山东;S14、S15 产自河南;S16、S17 产自山西;S18 产自四川;S19 产自江苏;S20~S23 产自广西;S24、S25 产自广东。样品标本存放在承德医学院中药研究所。

绿原酸 (批号 110753-201415)、牡荆素鼠李糖苷 (批号 111668-200602)、金丝桃苷 (批号 111521-201507) 和牡荆素对照品 (批号 100081-200907) 均购自中国食品药品检定研究院,供含量测定用;牡荆素葡萄糖苷 (批号 151103) 购自上海融禾医药科技有限公司。

甲醇、乙腈和四氢呋喃为色谱纯购自 Fisher 科技有限公司,实验用水为娃哈哈纯净水,其他试剂为分析纯。

1.3 统计学方法 中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (国家药典委员会 2004A 版),统计学软件

SPSS 19.0。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Diamondsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:乙腈 (A)-0.1% 冰醋酸 (B)-四氢呋喃 (C),梯度洗脱程序见表 1;检测波长:320 nm;流速:0.9 mL · min⁻¹,柱温 30 ℃。对照品溶液和供试品溶液进样量均为 10 μL。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	A/%	B/%	C/%
0	10	90	0
5	12	88	0
15	12	88	0
35	12	82	6
40	12	82	6
50	30	62	8
60	60	32	8
65	80	12	8

2.2 混合对照品溶液的制备 精密称取绿原酸 10.23 mg、牡荆素葡萄糖苷 10.59 mg、牡荆素鼠李糖苷 13.28 mg、牡荆素 10.01 mg、金丝桃苷 10.15 mg 置同一 100 mL 容量瓶中,加 60% 甲醇溶解并稀释至刻度 (混合对照品 1 号);再分别精密量取 25、10、5、1 mL,分别置 50 mL 容量瓶中,加 60% 甲醇稀释至刻度分别制成 4 个不同浓度的混合对照品溶液 (混合对照品 2 号、3 号、4 号、5 号)。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 50% 乙醇提取物的制备 将 25 批不同产地山楂叶药材分别进行粉碎,称取 50 g,105 ℃ 干燥至恒重,加 200 mL 50% 乙醇加热回流 3 h,滤过,滤渣再加 100 mL 50% 乙醇加热回流 1 h,滤过,合并滤液,减压回收溶剂,浓缩成浸膏。

2.3.2 供试品溶液的制备 取山楂叶 50% 乙醇提取物浸膏,干燥至恒重,研细,精密称取 0.1 g,分别置具塞锥形瓶中,精密加入 60% 甲醇溶液 50 mL,称定重量,超声处理 30 min,再称定重量,用 60% 甲醇溶液补足减失的重量,滤过,取续滤液,用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过,即得。

2.4 方法学考察

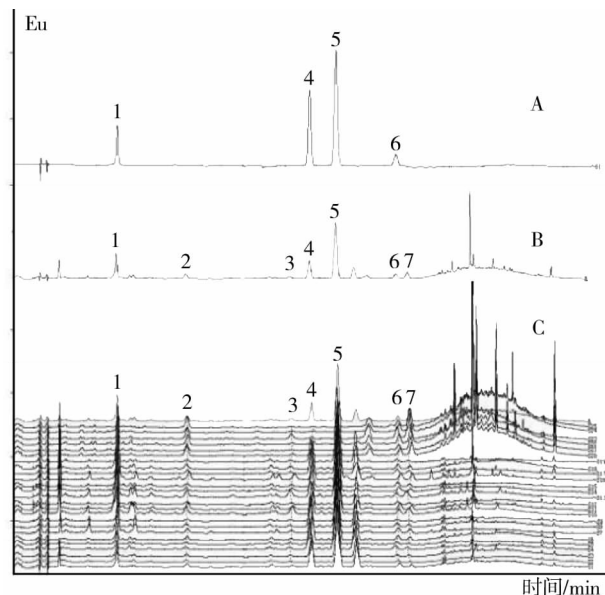
2.4.1 精密度试验 取药材 (S1) 的供试品溶液,重复进样 5 次,按“2.1”项下色谱条件进样测定,考察各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果相对保留时间 RSD < 1.7%,相对峰面积 RSD < 2.6%,表明精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取药材 (S1) 50% 乙醇提取物

的粉末按“2.3.2”项下方法平行制备供试品溶液6份,按“2.1”项下色谱条件分别进样测定,考察各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果相对保留时间 RSD < 1.8%, 相对峰面积 RSD < 2.4%, 表明重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取药材(S1)的供试品溶液分别于0、2、4、8、12、24 h按“2.1”项下色谱条件进样测定,考察各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果相对保留时间 RSD < 1.5%, 相对峰面积 RSD < 2.7%, 表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.5 指纹图谱的建立 将25批山楂叶50%乙醇提取物制备的供试品溶液按“2.1”项下色谱条件分别进样,记录色谱图。根据25批样品测定结果,利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(国家药典委员会,2004A版)建立指纹图谱,设定S2为参照图谱,自动匹配,采用中位数法生成对照图谱,标定共有峰7个,根据对照品比对并结合文献,对山楂叶50%乙醇提取物HPLC指纹图谱中的7个共有峰进行鉴定,鉴定出4个主要成分,见图1。从指纹图谱叠加图中可以看出广东、广西产区的极性小的物质集中在后半段,与其他产区的图谱明显不同。



注:A为混合对照品;B为山楂叶50%乙醇提取物HPLC对照指纹图谱;C为25批山楂叶50%乙醇提取物HPLC指纹图谱叠加图。其中1-绿原酸,4-牡荆素葡萄糖苷,5-牡荆素鼠李糖苷,6-金丝桃苷。

图1 山楂叶50%乙醇提取物HPLC指纹图谱

由于产地的不同,山楂叶品质有所差异,计算25批山楂叶50%乙醇提取物指纹图谱的相似度范围为0.090~0.995,变化幅度很大。其中,广东、广西产区的山楂叶相似度较高,其他主产区的样品较为相似。

2.6 聚类分析 应用SPSS 19.0统计软件进行聚类分析。聚类分析是将大量样本和数据进行分类的一种多元统计学方法,该方法按“物以类聚”的思想将彼此相似的样本或数据聚集成簇以实现分类。理想的聚类分析要求类间差异大,类内差异小,以反映类内样本的共同特性和类间样本的差异性特征,利于结果的分析。传统的聚类分析方法包括系统聚类法、动态聚类法和模糊聚类法等^[7]。本次分析以7个共有峰峰面积为变量,运用SPSS 19.0统计软件,以平均Euclidean距离为度量标准,采用组间联接的方法对25批山楂叶进行系统聚类分析。在距离为15~20区间内分为两大类。第I类的样品S1~S19产自主产区,且第I类中不同产地的山楂叶比较分散,交叉排布,可以看出主产区山楂叶质量没有明显差异;第II类样品S20~S25均产自广东和广西,质量明显不同于主产区的样品。结果见图2。

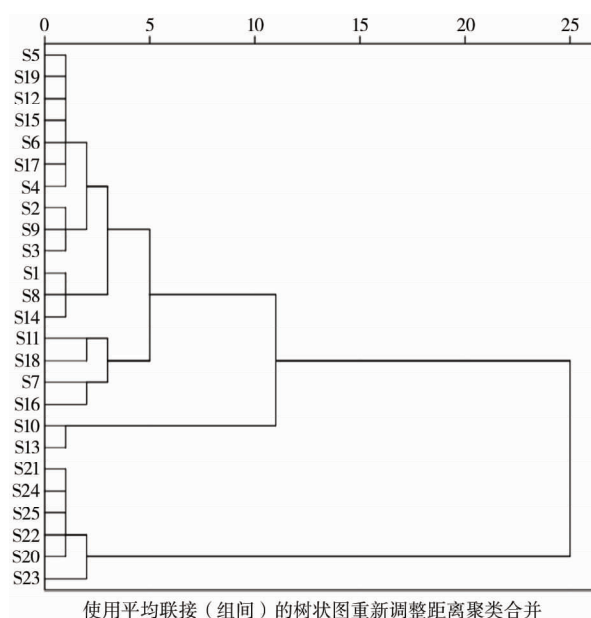
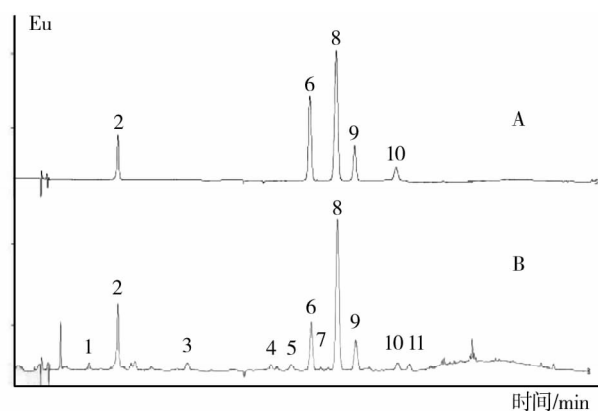


图2 聚类分析结果

2.7 山楂叶50%乙醇提取物指纹图谱共有模式的建立 根据聚类分析结果,选择第I类中主产区的19批样品建立指纹图谱的共有模式,结果见图3。相似度结果均大于0.85。标定共有峰为11个。通过和对照品保留时间和紫外吸收光谱的对比确认5个主要成分,其中峰2为绿原酸,峰6为牡荆素葡萄糖苷,峰8为牡荆素鼠李糖苷,峰9为牡荆素,峰10为金丝桃苷。

2.8 5种主要成分的含量测定

2.8.1 对照品溶液的制备 参见“2.2”项下制备方法制备。



注:A为混合对照品溶液1号;B为19批山楂叶50%乙醇提取物HPLC对照指纹图谱。其中2-绿原酸,6-牡荆素葡萄糖苷,8-牡荆素鼠李糖苷,9-牡荆素,10-金丝桃苷。

图3 山楂叶50%乙醇提取物指纹图谱的共有模式

2.8.2 供试品制备方法考察 取S1山楂叶50%乙醇提取物4份分别精密加入溶剂30%甲醇、60%甲醇、100%甲醇、60%乙醇50 mL,超声30 min提取,按“2.1”的色谱条件分别进样,结果表明使用60%甲醇溶剂时,5个对照品含量均为最大,故选取60%甲醇为提取溶剂。

取S1山楂叶50%乙醇提取物4份,精密加入60%甲醇溶液50 mL,分别进行超声15、30、45 min和加热回流30 min条件提取,按“2.1”项下的色谱条件分别进样,结果超声30 min即可提取完全,并且操作方便,故为最佳的提取方法。

2.8.3 方法学考察 精密度、重复性、稳定性分别见“2.4.1~2.4.3”项下。

对照品线性关系的考察,取上述“2.2”项下中的对照品混合溶液1号到5号,按“2.1”项下的色谱条件分别进样,以峰面积为纵坐标(Y),对照品浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)为横坐标(X)计算回归方程,结果见表2。

表2 对照品回归方程和线性

化合物	回归方程	R^2	线性范围/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
绿原酸	$Y = 11\,449X - 4.888$	0.999 9	2.046 ~ 102.3
牡荆素葡萄糖苷	$Y = 9\,141X + 1.189$	0.999 9	2.118 ~ 105.9
牡荆素鼠李糖苷	$Y = 10\,422X - 0.936\,6$	0.999 8	2.656 ~ 132.8
牡荆素	$Y = 10\,437X + 3.265$	0.999 9	2.002 ~ 100.1
金丝桃苷	$Y = 6\,387.3X - 1.631$	0.999 6	2.030 ~ 101.5

加样回收率实验,取已知含量的S1山楂叶50%乙醇提取物6份,分别精密加入对照品绿原酸、牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、金丝桃苷相当于0.05 g提取物的量。按“2.3”项下制备供试品溶液,按“2.1”的色谱条件进样。测得5

个对照品的回收率分别为94.5%、97.5%、99.1%、93.5%、96.8%。

2.8.4 样品测定 按“2.1”方法分别测定25批样品中5种主要成分的含量,结果见表3。以各产区的5种含量的均值作为最终结果。结果见表4。

表3 25批样品主要成分的含量测定数据/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

编号	产地	绿原酸	牡荆素葡萄糖苷	牡荆素鼠李糖苷	牡荆素	金丝桃苷
S1	河北	3.07	11.03	31.56	9.28	2.01
S2	河北	3.06	6.11	22.85	5.16	1.57
S3	河北	2.39	5.14	19.41	5.23	0.85
S4	河北	1.98	10.83	27.12	8.19	2.42
S5	河北	2.73	7.99	27.18	9.10	1.50
S6	河北	3.61	8.83	24.40	8.33	2.55
S7	河北	10.80	13.37	22.01	1.78	3.31
S8	河北	2.90	11.14	31.86	9.42	2.32
S9	河北	2.90	6.28	23.06	5.00	1.63
S10	山东	19.31	5.09	29.53	4.09	2.60
S11	山东	12.11	6.26	20.13	3.08	3.77
S12	山东	3.52	7.79	27.90	7.74	1.91
S13	山东	19.30	5.13	29.90	1.55	3.02
S14	河南	5.25	8.56	32.06	0.67	2.06
S15	河南	4.46	7.65	27.18	1.03	2.64
S16	山西	12.73	14.30	27.04	2.33	3.93
S17	山西	3.66	9.00	24.64	8.34	2.43
S18	四川	7.70	6.89	21.96	1.72	2.56
S19	江苏	2.66	8.19	26.99	9.12	1.38
S20	广西	1.53	1.69	6.02	—	3.40
S21	广西	0.83	0.63	1.47	—	2.36
S22	广西	2.08	0.93	3.10	—	4.80
S23	广西	1.39	1.35	2.12	—	6.99
S24	广东	1.46	1.11	1.35	—	3.44
S25	广东	0.49	0.48	0.94	—	2.48

表4 不同产地5种主要成分含量测定数据
(平均含量及总量)/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

产地	绿原酸	牡荆素葡萄糖苷	牡荆素鼠李糖苷	牡荆素	金丝桃苷	总含量
河北	3.71	8.97	25.49	6.83	2.02	47.02
山东	13.56	6.07	26.86	4.11	2.82	51.46
河南	4.86	8.10	29.62	0.85	2.35	45.78
山西	8.20	11.65	25.84	5.34	3.18	54.20
四川	7.70	6.89	21.96	1.72	2.56	40.83
江苏	2.66	8.19	26.99	9.12	1.38	48.34
广西	1.46	1.15	3.18	0	4.39	10.17
广东	0.975	0.795	1.145	0	2.96	5.88

由结果可以看出,比较绿原酸的含量,各个产区存在差异,山东产区最高,主产区含量明显高于广东、广西产区。比较牡荆素葡萄糖苷的含量,山西产区最高,主产区含量明显高于广东、广西产区。比较牡荆素鼠李糖苷的含量,除了广东、广西产区很低,其余主产区没有明显差异。比较金丝桃苷的含量,各个产区差别不大。比较各产区 5 个主要成分的总含量,广东、广西产区的山楂叶总含量最低,其他产区 5 个主要成分的总含量较稳定,结果与指纹图谱和聚类分析的结果基本一致。

3 讨论

本研究分别对甲醇-水,乙腈-水,乙腈-水-四氢呋喃,乙腈-甲酸水-四氢呋喃,乙腈-乙酸水-四氢呋喃等不同比例进行梯度洗脱实验,并对不同仪器和不同色谱柱以及不同波长进行筛选和优化。最后选用色谱柱 Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),以乙腈-乙酸水-四氢呋喃为流动相梯度洗脱,检测波长为 320 nm 时,得到的液相色谱图分离度好,主要成分色谱峰响应值适中。

中药山楂原植物系指蔷薇科山楂属和苹果属几种植物通称,山楂叶中药材商品可分为北山楂、南山楂、云山楂和广山楂^[8]。本文研究的 25 批山楂叶样品,其中 S1 到 S19(分别来自河北、山东、河南、山西、四川、江苏)均属北山楂,而 S20 到 S25 来自广东、广西产区的样品广山楂。本研究首先建立了 25 批样品的 HPLC 指纹图谱,25 批样品的指纹图谱与对照图谱匹配后,相似度相差幅度很大,说明不同产区不同品种的山楂叶化学成分存在很大差异;然后利用软件进行系统聚类分析,结果分为两大类,主产区和广东、广西产南山楂各一类。选择第 I 大类主产区的药典品种北山楂 19 批样品建立指纹图谱共有模式,标定共有峰 11 个;最后对 25 批样品进行含量测定的结果也表明主产区的主要成分总含量相对稳定,且总体偏高,而广东、广西这两个产地的山楂叶质量明显不同于其他产区。

本研究进行含量测定的 5 个主要成分中牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、金丝桃苷均为黄酮类成分,而山楂叶总黄酮是治疗心脑血管疾病的有效活性成分,效果明显^[9]。另外有研究表明药典正品山楂叶提取物具有抗血栓^[10]、调脂^[11]、抗心肌缺血^[12]、抗动脉粥样硬化、减少血管成形术后

再狭窄^[13]以及抗心衰^[14]等多方面的作用。本次实验结果山楂叶广东、广西产区的黄酮类成分明显偏低,在治疗心脑血管疾病的疗效上有待于进一步的研究。所以建议在生产山玫胶囊和心安胶囊成药时最好选用主产区的道地药材作为原料药。本研究可为山楂叶药材质量的控制提供一定的理论依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中国药典(一部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:32.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,1977:199.
- [3] 宋少江,陈佳,寇翔,等. 山楂叶的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报,2006,23(2):88-90.
- [4] 丁杏苞,姜碉青,仲英,等. 山楂叶化学成分的研究[J]. 中国中药杂志,1990,15(5):39-41.
- [5] 王领弟,李艳荣,张晓峰,等. 山楂叶指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(19):74-78.
- [6] 王肖,杜义龙,赵胜男,等. 承德产山楂叶中总黄酮和 5 种黄酮类成分含量的动态分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(17):171-175.
- [7] 于秀林,任雪松. 多元统计分析[M]. 北京:中国统计出版社,1999:62.
- [8] 黄燮才. 中药山楂原植物的研究[J]. 广西植物,1989,9(4):303-310.
- [9] 庞文悦,王莲,张荣泉. 山楂叶总黄酮生物活性研究近况进展[J]. 食品研究与开发,2014,35(13):134-136.
- [10] ARSLAN R, BOR Z, BEKTAS N, et al. Antithrombotic effects of ethanol extract of *Crataegus orientalis* in the carrageenan-induced mice tail thrombosis model[J]. Thromb Res, 2011, 127(3):210-213.
- [11] 杨宇杰,林静,王春民,等. 山楂叶总黄酮对大鼠高脂血症早期干预的实验研究[J]. 中草药,2008,39(12):1848-1850.
- [12] FU JH, ZHENG YQ, LI P, et al. Hawthorn leaves flavonoids decreases inflammation related to acute myocardial ischemia/reperfusion in anesthetized dogs[J]. Chin J Integr Med, 2013, 19(8):582-588.
- [13] FÜRST R, ZIRRGIEBEL U, TOTZKE F, et al. The *Crataegus* extract WS 1442 inhibits balloon catheter-induced intimal hyperplasia in the rat carotid artery by directly influencing PDGFR-beta[J]. Atherosclerosis, 2010, 211(2):409-417.
- [14] KOCH E, MALEK FA. Standardized extracts from hawthorn leaves and flowers in the treatment of cardiovascular disorders—preclinical and clinical studies[J]. Planta Med, 2011, 77(11):1123-1128.

(收稿日期:2017-02-16,修回日期:2017-03-20)