

# 艾叶饮片 HPLC 指纹图谱研究

于凤蕊<sup>1</sup> 孙立立<sup>2</sup> 周倩<sup>2</sup>

(1. 山东中医药大学, 山东 济南 250014; 2. 山东省中医药研究院, 山东 济南 250014)

**摘要:**目的: 采用 HPLC 法建立艾叶饮片的指纹图谱, 为艾叶饮片质量评价提供依据。方法: 采用 Agilent Eclipse XDB - C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm 5 μm) 色谱柱; 以乙腈 (B) - 0.2% 磷酸 (A) 为流动相, 进行梯度洗脱; 采用 DAD 检测器检测, 检测波长 330nm, 参比波长 420nm。流速: 1.0 mL/min; 柱温: 25℃。结果: 建立了艾叶饮片 HPLC 指纹图谱, 方法学考察结果符合指纹图谱技术要求, 采用该方法共检测了不同产地 10 批艾叶饮片, 共标定 12 个共有特征指纹峰。结论: 本法准确、可靠, 建立的 HPLC 指纹图谱为艾叶的质量控制提供更全面的信息。

**关键词:** 艾叶饮片; HPLC; 指纹图谱; 异泽兰黄素

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1673 - 7717(2012)11 - 2432 - 03

## Analysis on Fingerprint of Artemisiae Aigy Folium by HPLC

YU Feng-rui<sup>1</sup> SUN Li-li<sup>2</sup> ZHOU qian<sup>2</sup>

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, Shandong, China;

2. Shandong Academy of Chinese medicine, Jinan 250014, Shandong, China)

**Abstract:** *Objective:* To establish fingerprints of Artemisiae Aigy Folium by HPLC. *Methods:* The chromatographic column was Agilent Eclipse XDB - C<sub>18</sub> (250mm × 4.6mm 5 μm) and the mobile phase consisted of acetonitrile - 0.2% phosphoric acid at flow rate of 1.0 mL · min<sup>-1</sup>. The detection wavelength and reference wavelength were respectively set at 330nm and 420nm. The column temperature was 25℃. *Results:* The fingerprint of Artemisiae Aigy Folium was established by HPLC. Methodological study results met the technical requirements for fingerprinting, 12 peaks were identified as the characteristic fingerprints of Artemisiae Aigy Folium through the determination of 10 samples. *Conclusion:* The method has a good precision, stability and repeatability. The established fingerprints can be used for the quality control of Artemisiae Aigy Folium.

**Key words:** Artemisiae Aigy Folium; HPLC; fingerprints; eupatilin

艾叶来源于菊科植物艾 *Artemisia argyi* levl. et Vant. 的干燥叶<sup>[1]</sup> 在全国各地均有分布, 生长于路旁、草地、荒野等处, 亦有栽培者。艾叶所含化学成分主要为挥发油类、黄酮类、鞣质类和三萜类等, 2010 版《中华人民共和国药典》通过测定艾叶饮片中桉油精的含量来控制其质量, 但是桉油精的含量受产地、采集时间和储存时间的影响较大<sup>[2-3]</sup>, 因此通过单一指标不能有效的控制艾叶质量, 中药指纹图谱能比较全面的反映中药中所含化学成分的种类和数量, 从而反映中药的质量<sup>[4]</sup>。本文收集了 10 批不同产地的艾叶饮片进行测定, 初步建立了高效液相色谱指纹图谱, 标定出 12 个共有特征指纹峰, 为艾叶饮片的质量评价提供了依据。

收稿日期: 2012 - 05 - 01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81173545); 国家中医药行业科研专项基金资助项目 (200807039)

作者简介: 于凤蕊 (1987 -), 女, 山东临沂人, 硕士研究生, 研究方向: 中药新药与中药炮制原理研究。

通讯作者: 孙立立, 女, 山东济南人, 研究员, 硕士研究生导师, 研究方向: 中药新药与中药炮制原理研究。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

Agilent1100 型四元泵高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司), DAD 检测器, 德国 Sartorius 10<sup>-5</sup> 电子天平, LC - 350A 超声波中药处理机 (济宁市中区鲁超仪器厂)。

### 1.2 试药

本研究收集了 10 批不同产地的艾叶饮片, 经山东省中医药研究院林慧彬研究员鉴定均为菊科植物艾的干燥叶。棕矢车菊素、异泽兰黄素对照品由实验室自制, 经 HPLC 检测纯度大于 98%。乙腈为色谱纯, 水为娃哈哈纯净水, 甲醇、磷酸等其他试剂均为分析纯。样品产地来源见表 1。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

AgilentEclipseXDB - C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm 5 μm) 色谱柱; 以乙腈 (B) - 0.2% 磷酸 (A) 为流动相, 进行梯度洗脱, 洗脱程序见表 2; 采用 DAD 检测器检测, 检测波长 330nm, 参比波长 420nm; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 25℃。

### 2.2 对照品溶液的制备

取棕矢车菊素、异泽兰黄素对照品适量, 精密称定, 加

甲醇制成每 1mL 含棕矢车菊素、异泽兰黄素对照品 0.043mg、0.060mg 的混合溶液。

### 2.3 供试品溶液的制备

取各供试品粉末 0.5g,精密称定,精密加入 80% 甲醇 20mL,称重,超声提取 1h,放凉,再次称重,用 80% 甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,滤液过 0.45 $\mu$ m 微孔滤膜,即得。

### 2.4 测定方法

分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 20 $\mu$ L,注入高效液相色谱仪,依法测定。

表1 样品产地来源信息

样品编号	产地	来源
S-1	安徽	安徽沪谯中药饮片厂
S-2	黑龙江	南京药业股份有限公司中药饮片厂
S-3	湖南	药圣堂(湖南)制药有限公司
S-4	江西	安徽海鑫中药饮片有限公司
S-5	河南	河南省禹州益众医药有限公司
S-6	江苏	徐州医药股份有限公司中药饮片厂
S-7	山东	济南市建联中药饮片公司
S-8	湖北	亳州市京皖中药饮片厂
S-9	广东	广东省药材公司中药饮片厂
S-10	河北	济南漱玉平民大药房

表2 流动相梯度洗脱程序

时间( min)	0	12	25	50
乙腈( %)	10	20	25	65
0.2% 磷酸( %)	90	80	75	35

### 2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 取样品 S-8 供试品溶液连续进样 5 次,记录指纹图谱。以异泽兰黄素的色谱峰为参照峰,计算各特征指纹峰的相对保留时间和相对保留峰面积。结果,12 个特征指纹峰的相对保留时间的 RSD 值在 0.11% ~ 1.01% 之间,相对保留峰面积在 1.13% ~ 2.93% 表明仪器精密度良好,符合指纹图谱要求。

2.5.2 重复性试验 精密称取样品 S-8 粉末 5 份,照“2.3 项下供试品溶液制备方法”制备 5 份供试品溶液,分别进样并记录指纹图谱。结果,12 个特征指纹峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值分别在 0.05% ~ 0.35%、0.85% ~ 4.84% 之间,表明本方法重现性良好,符合指纹图谱要求。

2.5.3 稳定性试验 将室温下放置的样品 S-8 的供试品溶液分别于 0、4、8、12、24h 进样分析,记录指纹图谱。结果,12 个特征指纹峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值分别在 0.09% ~ 0.75%、0.97% ~ 4.50% 之间,表明样品溶液在 24h 内稳定。

### 2.6 指纹图谱的建立及相似度评价

2.6.1 艾叶饮片指纹图谱共有模式的建立 按照上述试验方法和色谱条件对 10 批艾叶饮片供试品溶液进行测定,记录色谱图。将所得的 10 批艾叶饮片的 HPLC 图谱以 AIA 格式依次导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版》软件,以 S-1 号样品色谱图作为参照谱进行指纹匹配,匹配结果中共有 22 个共有峰,通过峰面积的比较,

选取峰面积较大且稳定的图谱共有峰,最后标定了 12 个共有特征指纹峰。结果见图 2。

参比峰的选择:异泽兰黄素的色谱峰在各批次样品图谱中分离良好,峰面积较大且为所有样品共有,所以确定其为参照峰。

以异泽兰黄素保留时间和峰面积为参照,对 10 批样品中 12 个特征指纹峰的相对保留时间和相对峰面积进行统计分析,结果分别见表 3~4。

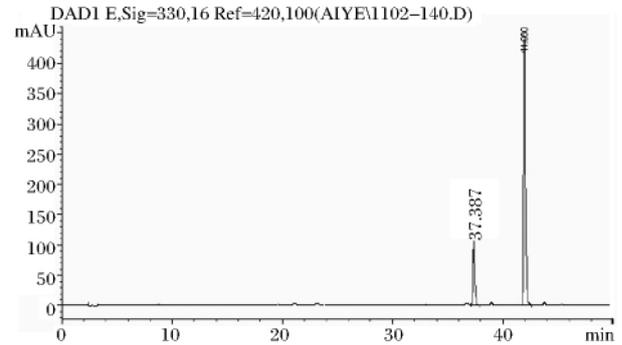


图1 混合对照高效液相图谱

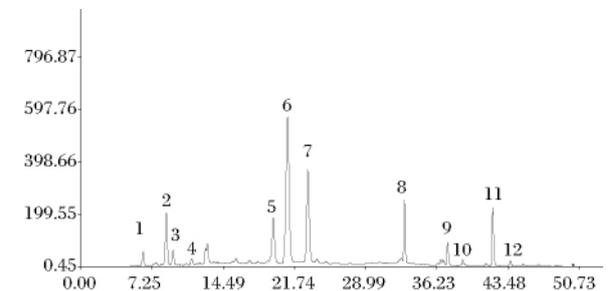


图2 艾叶饮片对照指纹图谱

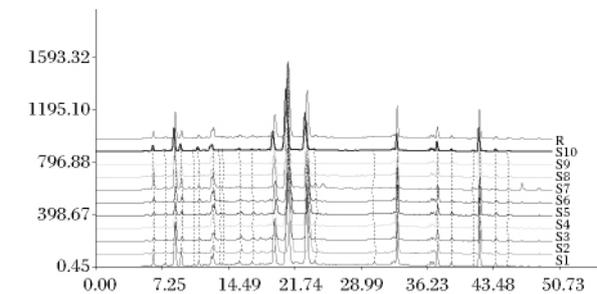


图3 10批艾叶饮片高效液相指纹图谱  
(R 为生成的对照图谱)

2.6.2 艾叶饮片相似度评价 根据《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版》软件,采用中位数法,以样品 S-1 图谱作为参照谱进行指纹图谱相似度匹配,得到 10 批艾叶饮片的指纹图谱及对照指纹图谱,与对照指纹图谱比较 10 批艾叶饮片的相似度在 0.950 ~ 0.995 之间,表明相似度良好。结果见表 5。

### 3 讨论

建立中药指纹图谱,色谱条件的优化是关键。因此,本研究首先对色谱流动相、柱温、检测波长进行了考察:比较了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.2% 磷酸、乙腈-0.2% 磷酸系统,结果发现选择乙腈-0.2% 磷酸作为流动相时,各

表3 10批艾叶饮片共有特征峰相对保留时间

NO	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6	S-7	S-8	S-9	S-10	对照图谱
1	0.1504	0.1516	0.1507	0.1510	0.1517	0.1514	0.1505	0.1499	0.1494	0.1450	0.1507
2	0.2065	0.2084	0.2072	0.2077	0.2071	0.2080	0.2068	0.2063	0.2050	0.2066	0.2071
3	0.2229	0.2250	0.2237	0.2242	0.2240	0.2245	0.2232	0.2228	0.2212	0.2232	0.2236
4	0.2682	0.2702	0.2690	0.2689	0.2696	0.2698	0.2684	0.2679	0.2663	0.2683	0.2688
5	0.4652	0.4667	0.4711	0.4650	0.4696	0.4671	0.4653	0.4646	0.4624	0.4670	0.4670
6	0.5003	0.5018	0.5066	0.4995	0.5050	0.5023	0.5001	0.4995	0.4974	0.5027	0.5018
7	0.5493	0.5503	0.5563	0.5489	0.5553	0.5520	0.5504	0.5497	0.5468	0.5520	0.5511
8	0.7855	0.7853	0.7872	0.7845	0.7858	0.7860	0.7860	0.7856	0.7858	0.7869	0.7859
9	0.8905	0.8905	0.8911	0.8902	0.8907	0.8909	0.8907	0.8905	0.8907	0.8912	0.8906
10	0.9274	0.9273	0.9277	0.9272	0.9274	0.9274	0.9274	0.9274	0.9275	0.9278	0.9275
11	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
12	1.0429	1.0429	1.0427	1.0430	1.0428	1.0423	1.0425	1.0428	1.0447	1.0435	1.0429

表4 10批艾叶饮片共有特征峰相对保留峰面积

NO	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6	S-7	S-8	S-9	S-10	对照图谱
1	0.3838	0.1196	0.2066	0.2291	0.1202	0.2149	1.9873	0.4551	0.2606	0.1631	0.3029
2	1.4098	0.6962	0.9202	0.9370	0.5610	0.8122	7.0206	1.7788	1.2416	0.2670	1.1808
3	0.4573	0.1660	0.2492	0.3285	0.1730	0.3067	1.6676	0.5722	0.3596	0.1624	0.3582
4	0.2126	0.0978	0.0999	0.1619	0.0813	0.1906	0.7410	0.3266	0.2047	0.0838	0.1815
5	1.8179	1.0344	1.0028	1.8368	0.8626	1.3888	5.7197	1.6422	1.0428	0.4061	1.3379
6	5.4205	4.0130	3.5303	5.3140	3.0999	3.9691	27.080	6.1352	4.9674	0.9556	5.0384
7	3.4152	2.0785	2.1207	3.0629	1.5529	2.6266	10.978	3.2391	2.5718	0.7034	2.7316
8	1.2119	0.6741	1.2517	2.2992	1.4741	1.2760	3.9573	1.0151	0.6328	0.4254	1.2812
9	0.4315	0.3069	0.3408	0.4083	0.3498	0.6649	0.5604	0.4752	0.4081	0.3120	0.4127
10	0.1702	0.1255	0.1266	0.2583	0.1429	0.1893	0.3057	0.1154	0.1223	0.1798	0.1668
11	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
12	0.1010	0.0939	0.1040	0.1083	0.1181	0.1245	0.1348	0.1117	0.1033	0.0965	0.1073

表5 与对照指纹图谱比较的艾叶饮片相似度

样品号	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6	S-7	S-8	S-9	S-10	对照指纹图谱
相似度	0.984	0.991	0.995	0.985	0.978	0.977	0.966	0.990	0.942	0.950	1.000

峰的保留时间适中,分离度较好,且基线稳定,有利于指纹图谱的分析,因此采用乙腈-0.2%磷酸水作为流动相系统;实验中比较了室温(25℃)、30℃下的分离效果,结果表明柱温对分离效果影响不大,因此柱温选择为室温(25℃);通过在线DAD检测器,比较了210、230、254、280和330nm波长下的液相色谱图,发现330nm条件下色谱峰面积较大,色谱峰分离度最好,色谱图基线噪音较低,因此选择330nm为检测波长。

采用研究确定的指纹图谱色谱条件对10批不同产地艾叶饮片进行了指纹图谱分析,结果,10批艾叶饮片共有12个共有峰,因此将艾叶饮片指纹图谱评价标准暂定为12个特征峰。

通过测定,市售艾叶饮片与生成的对照图谱比较相似度良好,均大于0.90。不同产地艾叶饮片指纹图谱在相对保留时间上具有较高相似性(RSD均<1.3%),但在相对峰面积上又不完全一致,其中样品S-7和S-10的相对峰

面积与其他样品存在较大差异,这可能是由于自然环境等各因素的影响,使饮片的质量存在差异,反映在色谱图上即是在相似的保留时间上具有不同的峰面积。

本研究首次建立了艾叶饮片HPLC指纹图谱,得到的色谱图主要色谱峰分离度较好,基线平稳,色谱信息较为丰富,而且色谱峰分布均匀,可为艾叶饮片的全面质量控制研究提供参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 83.
- [2] 靳然, 于密密, 赵百孝, 等. 不同年份蕲艾叶及不同比例艾绒化学成分研究[J]. 中国针灸, 2010, 30(5): 389-392.
- [3] 梅全喜, 高玉桥. 艾叶化学及药理研究进展[J]. 中成药, 2006, 28(7): 1030-1031.
- [4] 陈根顺, 徐丽芳, 李鹏. 草珊瑚的HPLC指纹图谱研究[J]. 中草药, 2011, 42(2): 293-295.