

- 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 88.
- [2] 赵国华, 李志孝, 陈宗道. 百合多糖的化学结构及抗肿瘤活性 [J]. 食品与生物技术, 2002, 21(1): 62-66.
- [3] 曾 明, 李守汉, 曾 爽, 等. 兰州百合抗运动性疲劳的实验研究 [J]. 山西师大体育学院学报, 2005, 20(1): 110-112.
- [4] 胡焕萍, 张 剑, 百银凰, 等. 单味新鲜百合止咳镇静催眠作用药理实验 [J]. 时珍国医国药, 2006(9): 1704-1705.
- [5] 胡敏敏, 蔡宝昌, 张志杰, 等. 百合多糖的药效学研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(2): 107-109.
- [6] 滕利荣, 孟庆繁, 刘浩源, 等. 酶法提取百合多糖及其体外抗氧化活性研究 [J]. 吉林大学学报理学版, 2003, 41(4): 538-542.
- [7] 曾 嵘, 李福元, 龙洛娜. 3 种百合水煎液抗疲劳与耐低氧作用比较 [J]. 医药导报, 2007, 26(8): 850-851.
- [8] 任凤莲, 邱昌桂, 连 琰. 百合总皂甙的提取工艺 [J]. 中南大学学报自然科学版, 2005, 36(1): 69-71.
- [9] 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱的技术要求(暂行) [S]. 2000.
- [10] 胡敏敏, 蔡宝昌, 张志杰. GC 法分析药用百合和食用百合的区别 [J]. 中成药, 2007, 29(4): 476-479.
- [11] 张志杰, 蔡宝昌, 李 林, 等. 百合的 GC/MS 指纹图谱研究 [J]. 中成药, 2006, 28(5): 625-627.
- [12] 李 林, 张志杰, 蔡宝昌. 中药百合有效部位的药效学筛选 [J]. 南京中医药大学学报, 2005, 21(3): 175-177.

荷叶药材 HPLC 指纹图谱研究

王福刚¹, 刘 斌², 曹 娟¹, 高允生¹, 齐永秀¹, 王 伟²

(1. 泰山医学院 药学院, 山东 泰安 271016; 2. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102)

摘要:目的 建立荷叶药材的 HPLC 指纹图谱, 为该药材的质量评价提供实验依据。方法 采用 RP-HPLC 技术, 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水(0.01% 磷酸-三乙胺) 梯度洗脱, 检测波长 270 nm, 体积流量 1 mL/min, 柱温 20 ℃。结果 以荷叶碱为对照, 通过对 13 批荷叶药材样品的测定, 确定了 12 个共有峰, 建立了荷叶药材的 HPLC 指纹图谱。结论 该法可用于荷叶药材的质量控制。

关键词: 荷叶; 指纹图谱; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2011)08-1285-04

Fingerprint of *Nelumbinis Folium* by HPLC

WANG Fu-gang¹, LIU Bin², CAO Juan¹, GAO Yun-sheng¹, QI Yong-xiu¹, WANG Wei²

(1. Taishan Medical College, Taian 271016, China; 2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

ABSTRACT: AIM To establish an HPLC fingerprint for *Nelumbinis Folium*. **METHODS** HPLC analysis was performed on a Diamonsil C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was used in gradient elution consisted of methanol-water(0.01% trifluoroacetic acid and acetonitrile), with the flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was 20 ℃ and the wavelength was set at 270 nm. **RESULTS** Taking nunciferine as the reference marker, twelve common peaks were selected as the common fingerprint peaks through the measurement of thirteen batches of *Nelumbinis Folium*. **CONCLUSION** The method can be used in quality control of *Nelumbinis Folium*.

KEY WORDS: *Nelumbinis Folium*; fingerprint; HPLC

荷叶为睡莲科植物莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 的干燥叶, 具有清热解暑、升发清阳、凉血止血之功

效, 用于暑热烦渴, 暑湿泄泻, 血热吐衄, 便血崩漏等症^[1]。1991 年 11 月中华人民共和国卫生部卫监发

收稿日期: 2010-05-25

基金项目 “十一五” 国家科技支撑计划项目 (2006BAI08B03-04); 北京市自然科学基金课题 (7061002); 国家自然科学基金课题 (90409011, 30672598)

作者简介: 王福刚 (1978—), 男, 讲师, 主要从事中药药效物质基础研究。E-mail: wfg713@sina.com

(1991) 第 45 号文件中,荷叶被列入第二批“既是食品又是药品”的名单^[2]。指纹图谱是在研究中药质控和质量标准过程中诞生的一种分析技术,能够全面反映中药的化学组成,较之单一有效成分控制更为合理^[3]。近年来关于荷叶化学、药理等方面的研究逐步深入,并取得了很大进展^[4-8],为进一步开发利用荷叶这一宝贵资源,本实验建立了荷叶药材的 HPLC 指纹图谱,可为其鉴别、质量评价以及质量标准的制定提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Waters 高效液相色谱仪(Waters1525 泵,Waters2487 检测器,breeze 色谱工作站);Sartorius BT 25S 型 1/100000 电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司);KQ-500DE 型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

1.2 试剂 荷叶药材均由泰山医学院药学院生药学教研室高红莉副教授鉴定为睡莲科植物莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 的叶,具体来源见表 1。荷叶碱、金丝桃苷对照品由天津一方科技有限公司提供,乙腈为色谱纯(Sigma 公司),水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。

表 1
Tab. 1 荷叶药材来源
Sources and lot numbers of
Nelumbinis Folium samples

批次	购买地	批次	购买地
1	山东	8	上海
2	山东	9	河北
3	河北	10	北京
4	河北	11	重庆
5	河北	12	成都
6	河北	13	山东
7	河北		

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为迪马公司 Diamonsil C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-水(0.01% 磷酸-三乙胺)梯度洗脱:0 ~ 10 min,乙腈由 10% 增加至 20%,10 ~ 22 min,乙腈维持在 20%,22 ~ 60 min,乙腈由 20% 增加至 40%;柱温 20 °C;体积流量 1.0 mL/min;检测波长 270 nm;进样量 20 μL。

2.2 对照品溶液的制备 精密称定荷叶碱对照品 4.3 mg,置 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得;取金丝桃苷对照品 4.4 mg,制备方法同上。

2.3 供试品溶液的制备 取荷叶样品 10 g,粉碎

(均过三号筛),精密称定 1.0 g,置具塞锥形瓶中,精密加入 100 mL 甲醇,称定质量,超声处理 1 h,补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.4 测定方法 精密吸取对照品和供试品溶液各 20 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图。以供试品 HPLC 图谱中荷叶碱为参照峰,分别计算各色谱峰相对保留时间和相对峰面积,采用国家药典委员会推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价软件 A 版”对各批供试品色谱图进行相似度评价。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密实验 取同一供试品溶液,连续进样 6 次,记录色谱图。结果各色谱图相对保留时间 RSD 小于 1%,相对峰面积的 RSD 小于 2%。

2.5.2 重复性实验 取同一批荷叶药材,按 2.3 项所示方法制备 6 份供试品溶液,分别进样,记录色谱图。结果各色谱图相对保留时间 RSD 小于 1%,相对峰面积的 RSD 小于 3%。

2.5.3 稳定性实验 取荷叶药材,按 2.3 项所示方法制备一份供试品溶液,分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样,记录色谱图。结果各色谱图相对保留时间 RSD 小于 1%,相对峰面积的 RSD 小于 3%。

2.6 不同来源荷叶药材 HPLC 指纹图谱分析

将 13 批荷叶药材按 2.3 项所示方法制备供试品溶液,分别进样,依法测定并记录 60 min 色谱图。结果见图 1。样品 S1 至 S13 色谱图出峰总数依次为 13、15、18、19、24、13、13、15、15、13、18、22、23,共有峰面积占总峰面积的比值依次为 98.06、91.60、94.97、94.12、90.44、97.10、97.02、95.26、97.00、97.12、93.54、90.36、90.86。

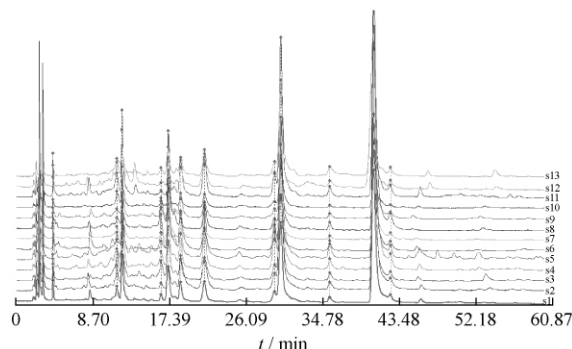


图 1 13 批荷叶药材指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprint for thirteen batches of *Nelumbinis Folium*

采用中位数法进行多点校正生成对照图谱,确定了 12 个共有峰,保留时间(峰面积)依次为 4.19

(49.75)、11.46(117.14)、12.04(247.27)、16.46(77.65)、17.29(256.35)、18.67(169.61)、21.39(226.96)、29.33(123.79)、30.05(810.94)、35.6(48.17)、40.58(1510.43)、42.48(70.66)。其中 5 号峰为荷叶碱,8 号峰为金丝桃苷,见图 2。以荷叶碱为参照峰,计算共有峰相对保留时间和相对峰面积见表 2、3。相似度评价结果见表 4,各批荷叶样品与共有模式的相似度在 0.95 以上。

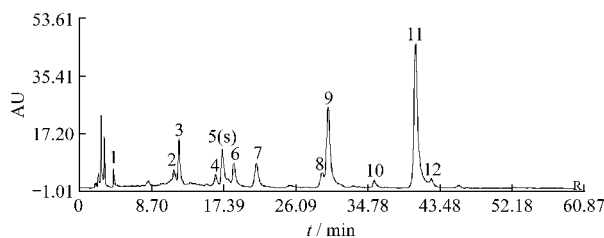


图 2 荷叶药材对照指纹图谱

Fig. 2 Reference fingerprint of *Nelumbinis Folium*

表 2

荷叶药材指纹图谱共有峰相对保留时间

Tab. 2

Relative retention time of common peaks for fingerprint of *Nelumbinis Folium*

峰号	药材批次													RSD/%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	
1	0.245	0.240	0.244	0.252	0.257	0.250	0.247	0.249	0.247	0.246	0.243	0.245	0.241	1.893
2	0.669	0.671	0.667	0.684	0.670	0.673	0.654	0.670	0.661	0.657	0.657	0.663	0.705	2.024
3	0.706	0.710	0.699	0.705	0.705	0.696	0.692	0.700	0.702	0.692	0.691	0.710	0.734	1.584
4	0.971	0.979	0.957	0.957	0.957	0.949	0.951	0.957	0.951	0.951	0.983	0.974	0.955	1.204
5	1.000	1.034	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
6	1.077	1.067	1.080	1.068	1.066	1.068	1.068	1.094	1.078	1.081	1.070	1.083	1.160	2.308
7	1.238	1.241	1.267	1.246	1.244	1.213	1.219	1.273	1.265	1.239	1.223	1.278	1.309	2.156
8	1.697	1.705	1.739	1.715	1.717	1.674	1.681	1.742	1.737	1.702	1.676	1.807	1.774	2.265
9	1.741	1.744	1.779	1.764	1.766	1.722	1.726	1.782	1.780	1.740	1.722	1.846	1.807	2.054
10	2.069	2.051	2.095	2.109	2.122	2.068	2.071	2.105	2.101	2.104	2.048	2.146	2.110	1.384
11	2.352	2.306	2.398	2.418	2.438	2.416	2.429	2.461	2.467	2.360	2.341	2.301	2.269	2.703
12	2.464	2.417	2.503	2.534	2.556	2.516	2.526	2.557	2.559	2.542	2.451	2.445	2.412	2.165

表 3

荷叶药材指纹图谱共有峰相对峰面积

Tab. 3

Relative peak area of common peaks for fingerprint of *Nelumbinis Folium*

峰号	药材批次													
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	
1	0.176	0.192	0.209	0.195	0.192	0.082	0.153	0.195	1.740	1.640	0.136	0.176	0.192	
2	0.889	0.563	0.411	0.571	0.566	0.102	0.445	0.830	3.355	3.232	0.742	0.889	0.563	
3	0.949	1.265	0.900	0.713	1.008	0.213	0.752	1.154	6.139	5.832	1.243	0.949	1.265	
4	0.473	0.430	0.613	0.154	0.222	0.354	0.252	0.268	2.330	3.993	0.189	0.473	0.430	
5	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	
6	0.520	0.831	0.654	0.986	1.004	0.101	0.880	0.502	4.327	2.125	0.604	0.520	0.831	
7	0.838	1.195	1.100	0.592	0.606	0.334	0.656	0.810	5.822	4.889	1.004	0.838	1.195	
8	0.364	1.326	0.766	0.259	0.340	0.121	0.299	0.370	2.890	1.549	0.430	0.364	1.326	
9	3.180	4.463	3.399	1.817	2.468	0.957	2.031	2.997	22.824	15.874	4.094	3.180	4.463	
10	0.198	0.371	0.312	0.145	0.164	0.069	0.152	0.218	1.479	0.768	0.239	0.198	0.371	
11	4.794	11.665	5.176	4.207	4.776	3.022	3.696	3.578	29.266	27.469	5.877	4.794	11.665	
12	0.310	0.591	0.255	0.299	0.379	0.259	0.217	0.228	1.741	1.182	0.181	0.310	0.591	

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

本实验中考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-三乙胺、乙腈-磷酸、乙腈-磷酸-三乙胺流动相系统,结果发现加入三乙胺消除拖尾,磷酸调节 pH 值后,色谱峰峰形较好,分离程度较高,基线也较平稳,因而选定乙腈-水(0.01% 磷酸-三乙胺)为流动相。

在选定的色谱条件下,比较了 220、250、270、300 nm 波长下的色谱图,发现 270 nm 波长下出峰

数多,峰的分度良好,基线也较平稳,因而选定 270 nm 作为测定波长。

3.2 参照峰的选择

荷叶主要含有黄酮和生物碱这两大类活性成分^[9-11],本实验通过标准品确认了金丝桃苷(8 号峰),荷叶碱(5 号峰),经 HPLC 图谱比较,发现荷叶碱分离度良好,且位置居中,因而选定 5 号峰为参照峰。

表 4

13 批荷叶药材相似度分析结果

Tab. 4

Evaluation of similarity on 13 batches of *Nelumbinis Folium*

样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13
S1	1	0.993	0.993	0.979	0.985	0.978	0.988	0.948	0.983	0.973	0.985	0.991	0.994
S2	0.993	1	0.99	0.986	0.982	0.981	0.993	0.943	0.984	0.958	0.983	0.989	0.988
S3	0.993	0.99	1	0.975	0.991	0.976	0.985	0.955	0.986	0.973	0.98	0.987	0.992
S4	0.979	0.986	0.975	1	0.964	0.974	0.986	0.965	0.97	0.917	0.954	0.972	0.962
S5	0.985	0.982	0.991	0.964	1	0.968	0.973	0.938	0.979	0.973	0.984	0.977	0.987
S6	0.978	0.981	0.976	0.974	0.968	1	0.99	0.964	0.994	0.931	0.951	0.967	0.965
S7	0.988	0.993	0.985	0.986	0.973	0.99	1	0.956	0.989	0.945	0.965	0.982	0.977
S8	0.948	0.943	0.955	0.965	0.938	0.964	0.956	1	0.962	0.882	0.899	0.937	0.926
S9	0.983	0.984	0.986	0.97	0.979	0.994	0.989	0.962	1	0.95	0.96	0.974	0.975
S10	0.973	0.958	0.973	0.917	0.973	0.931	0.945	0.882	0.95	1	0.974	0.966	0.984
S11	0.985	0.983	0.98	0.954	0.984	0.951	0.965	0.899	0.96	0.974	1	0.978	0.991
S12	0.991	0.989	0.987	0.972	0.977	0.967	0.982	0.937	0.974	0.966	0.978	1	0.989
S13	0.994	0.988	0.992	0.962	0.987	0.965	0.977	0.926	0.975	0.984	0.991	0.989	1
对照指纹图谱	0.998	0.997	0.996	0.982	0.988	0.98	0.99	0.95	0.986	0.969	0.987	0.991	0.994

3.3 指纹图谱的评价

本实验通过对不同产地的 13 批荷叶药材指纹图谱进行研究,得到荷叶对照指纹图谱,发现收集来的不同产地荷叶指纹图谱中主要峰群的整体图貌基本一致,且 13 批样品指纹图谱相似度均在 95% 以上,可用于荷叶药材的质量控制。实验中发现不同批次的荷叶药材指纹图谱的相对保留时间有较好的相似性,但是不同产区药材各共有峰相对保留面积差别较大(荷叶的颜色不同,峰面积差别很大),可能因为荷叶生产过程中受到土壤、气候、环境因素以及采收加工过程中等诸多因素的影响,尤其是采集时间的影响^[1]。荷叶资源丰富,分布广泛,但利用率较低,这是因为荷叶采收加工与贮藏研究比较少,没有形成比较规范的标准化操作程序,其质量难以得到有效控制,本研究可为荷叶药材的质量评价以及质量标准的制定提供依据。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010 年版一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 258.

- [2] 范继善. 实用食品添加剂 [M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1993: 10.
- [3] 洪筱坤, 王智华. 中药数字化色谱指纹图谱 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003: 5.
- [4] 王玲玲, 石任兵, 刘 斌, 等. 荷叶黄酮类化学成分研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2008, 31(2): 116-118.
- [5] 王玲玲, 刘 斌, 石任兵. 荷叶的化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(3): 416-419.
- [6] 霍世欣, 周陶忆, 司晓晶. 荷叶黄酮化合物对胰脂肪酶抑制作用的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(2): 328-331.
- [7] 韩 晓, 吴成爱, 王 伟, 等. 荷叶碱对 bel-7402 细胞胆固醇代谢的影响 [J]. 现代医学进展, 2008, 8(9): 1628-1630.
- [8] 张赞彬, 戴妙妙, 李彩侠. 荷叶中黄酮类化合物的化学结构鉴定 [J]. 食品研究与开发, 2006, 127(6): 45-47.
- [9] 李志诚, 左春旭, 杨尚军, 等. 荷叶化学成分的研究 [J]. 中草药, 1996, 33(20): 50-52.
- [10] 赵 骏, 高 岚, 齐召朋, 等. 荷叶总生物碱及其盐的提取和降脂作用的比较 [J]. 天津中医药, 2005, 22(2): 161-162.
- [11] 刘树兴, 赵 芳. 荷叶生物碱的含量测定方法及抑菌活性研究 [J]. 食品研究与开发, 2008, 29(3): 124-127.
- [12] 王福刚, 曹 娟, 刘 斌. 荷叶的化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(9): 2339-2340.