

木瓜药材 HPLC 指纹图谱研究

李晶¹, 白志川^{2*}, 刘杨³

(西南大学园艺园林学院, 重庆 400715)

摘要: 以熊果酸为参照物, 利用高效液相色谱 (HPLC) 梯度洗脱, 测定了 19 批木瓜 (*Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai) 样品。建立了药用木瓜的高效液相指纹图谱, 为评价控制药用木瓜的质量提供了依据。色谱柱为 YPW-KromasilTM-C18 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) (美国迪马公司); 流动相: 甲醇 (A) - 1% 冰醋酸 (B), 流动相 A 为甲醇, 流动相 B 为 1% 冰醋酸水溶液。检测波长 290 nm, 柱温 30℃, 流速 1.0 mL/min, 进样量 20 μL。通过分析 19 批木瓜样品得到的高效液相指纹图谱有 11 个共有峰, 多数峰都可以达到较好分离且 19 批次相似度符合。因此药用木瓜的指纹图谱特征性及专属性强, 可用于药用木瓜的质量控制。

关键词: 木瓜; 高效液相色谱; 指纹图谱

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2011)02-0238-05

Study on HPLC Finger Print of Chinese Quince

LI Jing¹, BAIZhichuan^{2*}, LU Yang³

(College of Horticulture and Landscape Architecture of Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract The chromatogram fingerprint of the compound *Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai was established by HPLC. Analysis was performed on a YPW-KromasilTM-C18 analytical column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with methanol (A) and 1% glacial acetic acid (B) as mobile phases in gradient mode. The column temperature was set at 30℃ and the flow rate was 1.0 mL/min with the detection wavelength of 290 nm. By analyzing the fingerprint chromatogram, *Chaenomeles speciosa* showed 11 characteristic peaks established from 19 specimens. The similarity of each specimen was good. The accuracy, repeatability, and stability of this method were satisfied, the RSDs of relative retention time and area of aimed peaks existed in all samples. Results showed that the chromatographic fingerprint of *Chaenomeles speciosa* with high characteristics and specificity can be used as theoretical dependence to control its quality.

Key words: *Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai; HPLC; Finger Print chromatogram

木瓜是蔷薇科木瓜属植物贴梗海棠 (*Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai) 的干燥近成熟的果实。主产于四川、安徽、湖北、重庆、山东等地。其性酸、涩、温, 具有平肝和胃、生津止渴、舒筋活络、活血通经、滋脾健胃、和胃化湿、敛肺、祛湿热等功能, 能治吐泻转筋、心膈痲唾、湿脾、脚气、水肿、痢疾、霍乱、头风、心痛、阳痿早泄等病症, 尤其对风湿、关节疼痛、腰膝酸痛、肢体麻木以及吐泻腹痛、四肢抽搐等病疗效尤为显著^[1]。近年来的研究表

明, 木瓜果实中含有齐墩果酸、熊果酸等多种有机酸、糖类、氨基酸、维生素以及黄酮类物质, 还特别富含超氧化物歧化酶 (SOD)。其中, 齐墩果酸和超氧化物歧化酶是木瓜果实中两种最重要的有效成分^[2]。目前对木瓜图谱的研究多集中在对木瓜的采收时间和炮制方法方面^[3], 以及利用图谱来区分不同产地的木瓜^[4]。而对于利用木瓜的图谱来评价控制药用木瓜的质量的相关报道还没有, 本实验以不同产地药用木瓜为建模对象, 合成出木瓜的标

收稿日期: 2010-07-12, 修回日期: 2010-09-04。

基金项目: 重庆市自然科学基金攻关项目 (CSTC, 2009AC1180)。

作者简介: 李晶 (1985-), 女, 西南大学园艺园林学院硕士研究生, 研究方向为植物生物技术。

* 通讯作者 (Author for correspondence. Email: baizhichuan@yahoo.com)。

准指纹图谱模型。为辨别药用木瓜真伪、全面控制药用木瓜质量, 提供了科学依据和更全面的质量控制信息, 现报道如下。

1 材料及仪器、试药

1.1 生药样品来源

19个不同产地药用木瓜, 于 2009年 9月 - 11月收集近成熟果实或药用木瓜成品, 由西南大学白志川教授鉴定为木瓜科木瓜属皱皮木瓜 (*Chaenomeles speciosa* (Sweet) Naka)。近成熟果实按药典方法加工成完整药材^[5]。药材来源见表 1。

1.2 仪器

日立 7100 高效液相色谱仪 (日本日立公司); DiamosilTM-C18 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) (美国迪马公司); METTLER AE240 型电子天秤 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]; KQ-250B 型超

声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 和泰 MasterR 系列双级反渗透超纯水机 (上海和泰生化仪器厂); FE102 型微型植物试样粉碎机 (北京中兴伟业仪器有限公司); 药典筛 (新乡市康达新机械有限公司)。

1.3 试药

甲醇为色谱纯 (美国迪马公司), 其他试剂均为分析纯 (重庆川东化工集团有限公司化学试剂厂), 水为超纯水。熊果酸对照品 (批号 0786-9802, 由中国药品生物制品检定所提供)。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱为 YPW-Kromasil TM-C18 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) (美国迪马公司); 流动相: 甲醇 (A) - 1% 冰醋酸 (B)。梯度洗脱: 0 min (95% A) ~ 20 min (65% A) ~ 30 min (54% A) ~ 40 min (25% A) ~ 50 min (12% A)。检测波长 290 nm, 柱温 30℃, 流速 1.0 mL/min, 进样量 20 μL。理论塔板数熊果酸峰计算不低于 2000, 与其它峰的分离度均大于 1.0 所有组分均在 50 min 内被检测完。

2.2 供试品溶液制备

精密称取干燥至恒重的药用木瓜粉末 (过 3 号筛) 约 1.00 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 30 mL, 密塞, 称定重量, 浸泡 1 h 后, 常温下超声处理 (功率 250 W, 频率 40 KHz) 30 min, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液适量, 以 0.22 μm 的微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

2.3 对照品溶液的制备

分别精密称取减压干燥至恒重的熊果酸标准品 10.13 mg, 置 10 mL 容量瓶定容, 加甲醇超声溶解, 制成含 1.013 g/L 的混合对照溶液, 即得对照品储备液。置 4℃ 冰箱保存。临用前过 0.22 μm 滤膜。

2.4 系统适用性实验与精密度考察

2.4.1 精密度考察

精密称取干燥至恒重的 S6 号样品药材粉末 1.00 g, 按 2.2 方法制备供试品溶液, 按 2.1 色谱条件进行测定, 连续进样 5 次, 记录指纹图谱。结果表明, 测得各共有相对峰面积的 RSD 均小于 3.00%,

表 1 不同产地药用木瓜来源 (2009 年)
Table 1 Origin of different *Chaenomeles speciosa* (Sweet) Naka

实验编号 No.	材料来源 Source of material	实验编号 No.	材料来源 Source of material
S1	贵州毕节 Bijie, Guizhou	S10	四川宣汉 Xuanhan, Sichuan
S2	重庆江津古南镇 Guanzhen Jiangxin Chongqing	S11	云南鹤县 Hexian, Yunnan
S3	山东曹县 Caoxian, Shandong	S12	湖北长阳 Changyang, Hubei
S4	重庆奉节 Fengjie, Chongqing	S13	浙江淳安 Chunan, Zhejiang
S5	重庆綦江县打通镇 Datongzhen, Qijiangxian, Chongqing	S14	湖南桑植 Shangzhi, Hunan
S6	重庆巫山 Wushan, Chongqing	S15	安徽宣城 Xuancheng, Anhui
S7	云南大理 Dali, Yunnan	S16	重庆江津 Jiangxin, Chongqing
S8	重庆綦江县石角镇 Shijiaozhen, Qijiangxian, Chongqing	S17	四川平武 Pingwu, Sichuan
S9	重庆綦江县赶水镇 Ganshuizhen, Qijiangxian, Chongqing	S18	重庆綦江县石壕镇 Shihaozhen, Qijiangxian, Chongqing
		S19	重庆万州 Wanzhou, Chongqing

各色谱峰的相对保留时间在平均保留时间 ± 1 min 内,符合指纹图谱要求。说明仪器的精密度良好。

2.4.2 稳定性考察

精密称取干燥至恒重的 S6 号样品药材粉末 1.00 g,按 2.2 方法制备供试品溶液,按 2.1 色谱条件测定其在 0、6、12、24、48 h 的色谱图,记录指纹图谱。结果表明,测得各共有峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD 均小于 3.00%,各色谱峰的相对保留时间在平均保留时间 ± 1 min 内,符合指纹图谱要求。说明供试品溶液的成分在 48 h 内是稳定的,符合指纹图谱要求。

2.4.3 重复性考察^[6]

精密称取干燥至恒重的 S6 号样品药材粉末 5 份,每份 1.00 g,照前述方法进行测定,实验表明该方法的重现性较好。

3 结果

3.1 药用木瓜指纹图谱的建立

3.1.1 参比峰的选择

选择熊果酸为参照峰。

3.1.2 指纹图谱的建立

精密称取干燥至恒重的药材粉末(过 3 号筛) 10 份,每份 1.00 g,按 2.2 方法制备供试品溶液,按 2.1 色谱条件进行测定,记录其 HPLC 图。通过考察色谱柱、流动相、检测波长、柱温等影响后优化,以及 19 批次供试品溶液测定结果所给出的峰数、峰值(积分值)和峰位(相对保留时间)等相关参数,进行分析、比较,制定优化的药用木瓜 HPLC 指纹图谱(见图 1)。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件,生成药用木瓜共有模式的对照指纹图谱(见图 2)。

3.1.3 不同来源的药用木瓜相似度评价

19 种不同产地药用木瓜的指纹图谱(图 1),利用夹角余弦法原理和采用相对峰面积进行相似度计算,其中 11 个峰是各批药材所共有的。通过对照品试验,考察对照品的保留时间,确立药用木瓜 HPLC 指纹图谱中的熊果酸(10 号峰)为特征标志峰,求出所有共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果见表 2 表 3。并采用国家药典委员会的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版》(研究

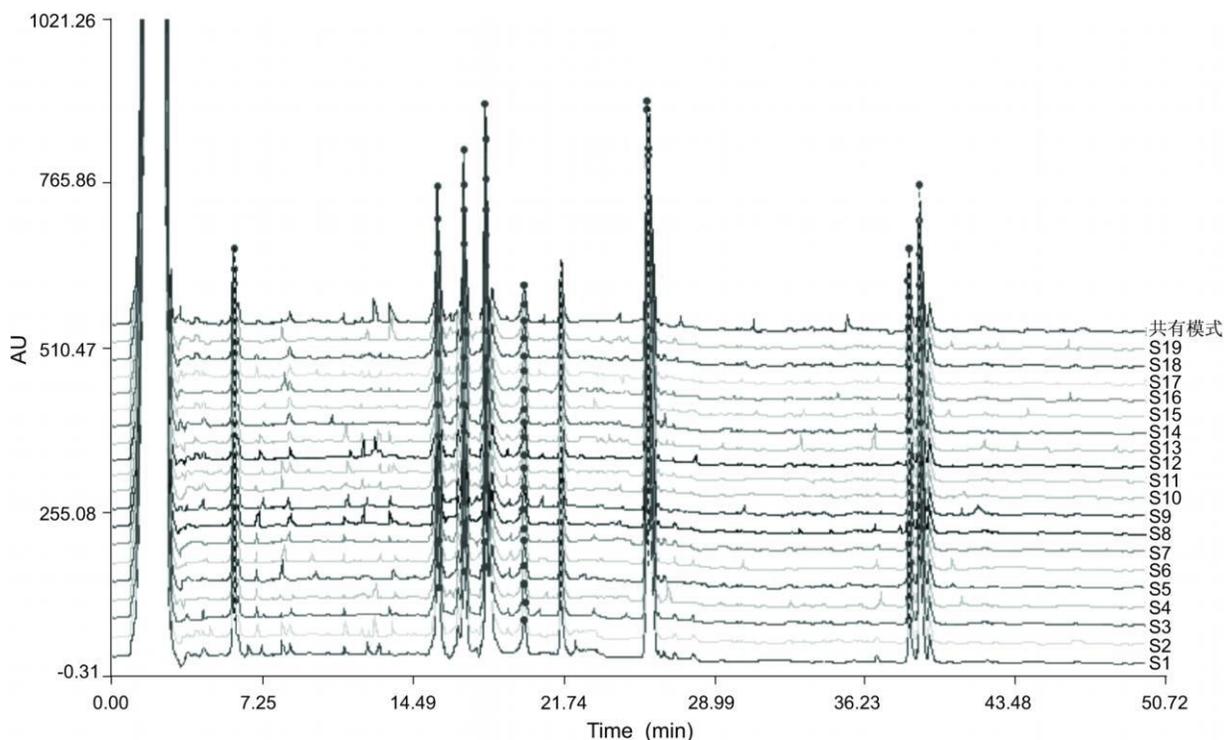


图 1 19 批次药用木瓜的 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC Fingerprint of 19 specimens of *Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai

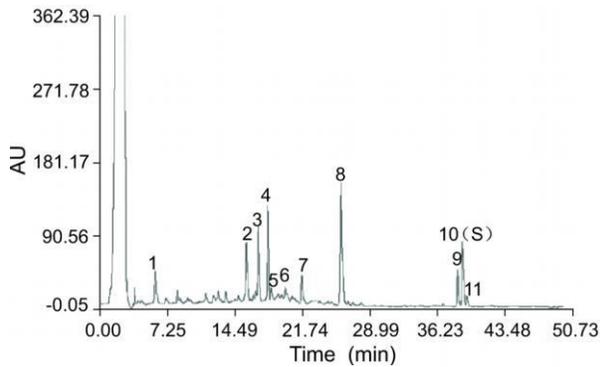


图 2 19 批不同产地药用木瓜甲醇提取物的 HPLC 指纹图谱共有模式 (10 号峰为参照物熊果酸)

Fig. 2 Common pattern of HPLC Fingerprint of methanol extracts of 19 *Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai specimens from different habitats (ursolic acid as reference is represented by peak ten)

版) 软件, 对重庆市綦江县、安徽省宣城、四川省宣汉等地 19 批次药用木瓜的指纹图谱进行相似度的分析。19 批样品的相似度分别为 0.918、0.963、0.932、0.962、0.971、0.969、0.928、0.959、0.964、0.968、0.928、0.973、0.930、0.970、0.972、0.976、0.944、0.963、0.973。结果表明, 不

同产地的 19 批次药用木瓜样品的相似度为 0.918 ~ 0.976 之间, 均大于 0.900, 符合《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求 (暂行)》规定。

4 讨论

(1) 本实验建立了药用木瓜的指纹图谱对各批样品的提取条件, 对色谱条件进行了考察后用 HPLC 进行检测, 并采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版》对不同批次的药用木瓜的 HPLC 指纹图谱进行了相似度评价, 结果表明, 其指纹图谱相互间较为吻合。但由于药材的采收季节及保存时间等方面的影响, 各个批次间的木瓜有效成分的含量有一定的差别。同时从药用木瓜的整体色谱图入手, 选取了 11 个较明显且分离度较好的共有峰构成了木瓜的指纹图谱, 以共有模式作为药用木瓜辨别真伪研究, 能提供更全面的质量控制信息, 具有参考意义。实验证明该方法操作性强, 重复性好, 可为药用木瓜的内在质量控制提供科学的依据。

(2) 真正建立一套较完整的中药色谱指纹图谱还有大量细致而繁重的工作要做。需进一步研究鉴

表 2 药用木瓜 HPLC 指纹图谱共有峰的相对保留时间比值

Table 2 Ratio of relative retention time of the common peak of HPLC Fingerprint

峰名 Peak name	峰 1 Peak 1	峰 2 Peak 2	峰 3 Peak 3	峰 4 Peak 4	峰 5 Peak 5	峰 6 Peak 6	峰 7 Peak 7	峰 8 Peak 8	峰 9 Peak 9	峰 10 Peak 10	峰 11 Peak 11
S1	0.15211	0.40196	0.43455	0.46176	0.47397	0.51010	0.55683	0.65869	0.98738	1.00000	1.01037
S2	0.15084	0.40389	0.43663	0.46398	0.47376	0.51264	0.55909	0.66293	0.98748	1.00000	1.01033
S3	0.15037	0.40320	0.43583	0.46339	0.47341	0.51240	0.55897	0.66201	0.98392	1.00000	1.01035
S4	0.15375	0.40189	0.43469	0.45996	0.46895	0.50889	0.55316	0.66418	0.98759	1.00000	1.01072
S5	0.15356	0.40346	0.43623	0.46137	0.47037	0.51025	0.55428	0.66652	0.98769	1.00000	1.01069
S6	0.15089	0.40465	0.43270	0.46464	0.47491	0.51292	0.55998	0.66436	0.98743	1.00000	1.01035
S7	0.15029	0.40292	0.43559	0.46284	0.47281	0.51175	0.55828	0.66145	0.98743	1.00000	1.01035
S8	0.15299	0.40176	0.43459	0.45982	0.46922	0.51002	0.55314	0.66473	0.98765	1.00000	1.01071
S9	0.15410	0.40340	0.43622	0.46121	0.47016	0.51004	0.55413	0.66639	0.98763	1.00000	1.01070
S10	0.15370	0.40241	0.43525	0.46034	0.46966	0.50956	0.55344	0.66490	0.98765	1.00000	1.01070
S11	0.15230	0.40210	0.43468	0.46188	0.47409	0.51021	0.55693	0.65877	0.98739	1.00000	1.01036
S12	0.15065	0.40375	0.43650	0.46386	0.47364	0.51253	0.55899	0.66285	0.98748	1.00000	1.01033
S13	0.15017	0.40306	0.43570	0.46327	0.47329	0.51229	0.55887	0.66194	0.98392	1.00000	1.01035
S14	0.15310	0.40184	0.43466	0.45989	0.46929	0.51008	0.55319	0.66478	0.98765	1.00000	1.01071
S15	0.15421	0.40347	0.43629	0.46128	0.47022	0.51011	0.55419	0.66643	0.98764	1.00000	1.01069
S16	0.15359	0.40233	0.43518	0.46027	0.46959	0.50949	0.55339	0.66486	0.98765	1.00000	1.01071
S17	0.15381	0.40194	0.43473	0.46000	0.46899	0.50892	0.55319	0.66420	0.98759	1.00000	1.01071
S18	0.15349	0.40342	0.43618	0.46133	0.47033	0.51021	0.55425	0.66649	0.98769	1.00000	1.01070
S19	0.15104	0.40475	0.43280	0.46473	0.47501	0.51300	0.56006	0.66442	0.98743	1.00000	1.01035
RSD (%)	0.9749	0.2329	0.2577	0.3645	0.4752	0.2750	0.4884	0.3525	0.1165	0.0000	0.0181

表 3 药用木瓜 HPLC 指纹图谱共有峰的相对峰面积

Table 3 Relative peak area of the common peak of HPLC Fingerprint

峰名 Peak name	峰 1 Peak 1	峰 2 Peak 2	峰 3 Peak 3	峰 4 Peak 4	峰 5 Peak 5	峰 6 Peak 6	峰 7 Peak 7	峰 8 Peak 8	峰 9 Peak 9	峰 10 Peak 10	峰 11 Peak 11
S1	0.68927	0.55121	0.25550	1.37241	0.18667	0.30712	0.13946	1.48497	0.37094	1.00000	0.25487
S2	0.20183	0.97372	1.32248	1.75496	0.32965	0.30741	0.58291	1.53856	0.29751	1.00000	0.20333
S3	0.63051	1.33940	0.85228	1.67969	0.22271	0.28080	0.19888	2.75227	0.35749	1.00000	0.55359
S4	0.23901	0.94713	1.50539	1.76499	0.30433	0.37000	0.54528	1.60023	0.29136	1.00000	0.18924
S5	0.20010	0.93795	1.38488	1.78263	0.31845	0.24160	0.54935	1.56458	0.29380	1.00000	0.23754
S6	0.19791	0.96189	1.34440	1.73792	0.32931	0.30440	0.58843	1.62251	0.28804	1.00000	0.24589
S7	0.18734	0.90124	0.38339	2.01343	0.29459	0.28772	0.26618	1.15818	0.34060	1.00000	0.19010
S8	0.88056	1.79155	1.33550	2.67972	0.23145	0.61560	0.54676	7.51063	0.37268	1.00000	0.26510
S9	0.20095	0.92565	1.37925	1.77467	0.36713	0.35881	0.54393	1.56718	0.29179	1.00000	0.15069
S10	0.67298	0.42386	0.44680	1.71963	0.24720	0.63411	0.24355	4.22359	0.47864	1.00000	0.26652
S11	0.63051	1.33940	0.85228	1.67969	0.22271	0.28080	0.19888	2.84807	0.35749	1.00000	0.55359
S12	0.23901	0.94713	1.50539	1.76499	0.30433	0.37000	0.54528	1.74097	0.29136	1.00000	0.18924
S13	0.20010	0.93795	1.38488	1.78263	0.31845	0.24160	0.54935	1.76186	0.29380	1.00000	0.23754
S14	0.19791	0.96189	1.34440	1.73792	0.32931	0.30440	0.58843	1.88563	0.28804	1.00000	0.24589
S15	0.18734	0.90124	0.38339	2.01343	0.29459	0.28772	0.26618	1.39243	0.34060	1.00000	0.19010
S16	0.88056	1.79155	1.33550	2.67972	0.23145	0.61560	0.54676	7.12528	0.37268	1.00000	0.26510
S17	0.20095	0.92565	1.37925	1.77467	0.36713	0.35881	0.54393	1.89161	0.29179	1.00000	0.15069
S18	0.67298	0.42386	0.44680	1.71963	0.24720	0.63411	0.24355	4.59820	0.47864	1.00000	0.26652
S19	0.68927	0.55121	0.25550	1.37241	0.18667	0.30712	0.13946	1.30405	0.37094	1.00000	0.25487
RSD (%)	63.80	38.86	47.97	18.38	20.21	36.90	43.37	73.08	17.51	0.00	42.86

定药用木瓜指纹图谱中的化学成分。评价中药产品质量的最终标准是安全与有效,尚需与药效相结合,继而采用可进行多变量解析的化学计量学方法,将中药色谱指纹图谱中化学成分的变化,与中药药效结果从数量上联系起来,建立中药的“谱效学”,最终完成指纹图谱对中药的质量控制。

参考文献:

- [1] 白志川. 药用木瓜规范化栽培及开发利用 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2009: 1-3.
- [2] 尹凯, 高慧媛, 李行诺, 等. 皱皮木瓜的化学成分 [J].

沈阳药科大学学报, 2006, 12: 761-763

- [3] 王玉宝, 王成永, 王举涛. HPLC 指纹图谱用于木瓜炮制方法研究初探 [J]. 中医药临床杂志, 2006 (6): 613-614
- [4] 陈洪燕, 万明, 严宜昌, 廖蔚珍, 胡晓雪. 两种产地木瓜不同处理方法的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 湖北中医杂志, 2010 (2): 72-73.
- [5] 国家药典委员会. 中国药典: 一部 [S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 137.
- [6] 屠鹏飞. 高效液相色谱法制定中药材中药注射液特征指纹图谱的探讨 [J]. 中成药, 2000, 22 (7): 516-517.

(责任编辑: 张平)