

女贞子乙酸乙酯有效部位群的 HPLC 指纹图谱研究

丁雪, 石力夫

[摘要] 目的: 建立女贞子乙酸乙酯有效部位群的指纹图谱, 并评价不同产地女贞子质量的 HPLC 法。方法: 色谱柱为 Platisil(铂金) C₁₈ ODS 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 A: 蒸馏水, B: 乙腈; 梯度洗脱: 0→25→35→40→60 min, B 相: 20%→30%→60%→90%→100%; 检测波长为 220 nm, 流速均为 1.0 ml/min。结果: 确定了女贞子乙酸乙酯有效部位群的 10 个共有指纹峰。结论: 该方法简单、准确, 重复性好, 为女贞子的质量控制提供了指纹图谱依据。

[关键词] 女贞子; 指纹图谱; 红景天苷; 色谱法, 高压液相

[中图分类号] R 284 [文献标志码] A [文章编号] 1674-2838(2010)05-0368-03

Research on HPLC fingerprint of active components in acetic ether extract of *Ligustrum lucidum*

DING Xue^{1,2}, SHI Lifu^{1*} (1. Department of Pharmacy, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. The Shanghai Office, Asia Company, American Lilly Pharmaceutical Factory, Shanghai 200021, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To establish a HPLC method for research on fingerprint chromatogram of active components in acetic ether extract of *Ligustrum lucidum* and evaluation of quality of *Ligustrum lucidum* from different areas. **Methods:** The separation was performed on a Platisil (Platinum) C₁₈ ODS column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase consisting of A(water) and B(acetonitrile). The gradient elution procedure was as follows: 0→25→35→40→60 min, B: 20%→30%→60%→90%→100%. The flow rate was 1.0 ml/min. The detection wavelength was 220 nm. **Results:** Ten characteristic peaks of active components in acetic ether extract of *Ligustrum lucidum* were identified. **Conclusion:** This method is simple and accurate with a good reproducibility and provides a fingerprint chromatogram reference for the quality control of *Ligustrum lucidum*.

[KEY WORDS] *Ligustrum lucidum*; fingerprint; salidroside; chromatography, high pressure liquid

[Pharm Care Res, 2010, 10(5): 368-370]

女贞子是木犀科植物女贞(*Ligustrum lucidum* Ait.) 的干燥成熟果实, 为传统补益类中药, 具有广泛的临床应用基础。近 10 年来的研究表明, 女贞子具有抗菌、抗病毒、抗炎、降血糖、降血脂、保肝、抗衰老、抗癌及提高免疫功能等作用^[1]。女贞子的主要活性成分早期发现的是以脂溶性的齐墩果酸、熊果酸等为代表的五环三萜类化合物; 近 10 多年来, 研究者陆续分离得到了水溶性的红景天苷和裂环环烯醚萜苷类化合物, 包括女贞酸、女贞苷、新女贞苷、特女贞苷和女贞苦苷等, 具有较强的生理活性^[2]。对于女贞子的质量分析, 早期测定齐墩果酸和熊果酸的含量^[3], 近年来对红景天苷和裂环环烯醚萜苷类化合物进行了定量分析^[4-6]。但运用 HPLC 法对女贞子进行指纹图谱分析, 目前尚未见报道。考虑到

女贞子化学成分的多样性和极性差异, 拟将女贞子按两个不同极性的有效部位群分别建立指纹图谱。本研究应用 HPLC 法建立了女贞子乙酸乙酯有效部位群的指纹图谱, 并对不同产地女贞子的指纹图谱进行了分析比较。

1 仪器和试剂

1.1 仪器 岛津 LG-10ATvp 高效液相色谱仪、Class-vp 液相色谱工作站(日本岛津制作所); FA2004 电子分析天平(上海精科天平公司); DL-180A 超声波清洗器(上海之信仪器有限公司); 《中药色谱指纹相似度评价系统 A 版》软件(国家药典委员会推荐, 中南大学和浙江大学研发)。

1.2 药品和试剂 红景天苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110818-200404); 女贞子原药材信息见表 1。经第二军医大学长海医院药学部王忠壮教授鉴定均为女贞的干燥成熟果实, 即为女贞子药材。甲醇和乙腈为色谱纯; 氯仿、无水乙醇和乙酸乙酯为分析纯; 蒸馏水(Millipore 纯水机制备)。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 迪马 Platisil(铂金) C₁₈ ODS 色谱

作者简介 丁雪(女), 硕士生。

E-mail: dingxue1984@163.com

通讯作者: 石力夫, E-mail: shilifu72227@sohu.com

作者单位 200433 上海, 第二军医大学长海医院药学部(丁雪, 石力夫); 200021 上海, 美国礼来制药亚洲公司上海代表处(丁雪)

表 1 女贞子药材信息表

Table 1 Information list of *Ligustrum lucidum* materia medica

编号	产地	采收时间
1	江苏宿迁	2008-09
2	江苏句容中药材 GAP 生产基地	2008-10
3	江苏南京	2008-11
4	四川广元	2008-11
5	山东临沂	2008-11
6	上海	2009-02
7	云南开远	2009-02
8	江苏大丰	2009-03
9	四川攀枝花	2009-03
10	浙江金华	2009-03

柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: A 为蒸馏水, B 为乙腈, 梯度洗脱: 0 → 25 → 35 → 40 → 60 min, B: 20% → 30% → 60% → 90% → 100%; 流速为 1.0 ml/min, 柱温为 25 °C; 进样量: 20 μl; 检测波长: 220 nm。

2.2 红景天苷对照品溶液的制备 精密称取红景天苷对照品, 加甲醇溶解制成 10 μg/ml 的溶液, 按 2.1 项进样测定得到色谱图 (见图 1), 在 9.97 min 出峰的物质是红景天苷。

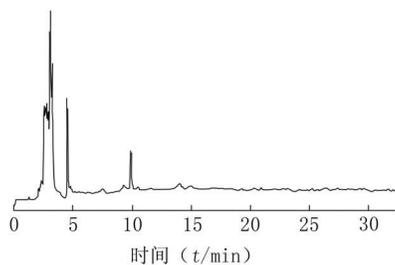


图 1 红景天苷对照品的 HPLC 谱图

Figure 1 HPLC photogram of salidroside reference standard

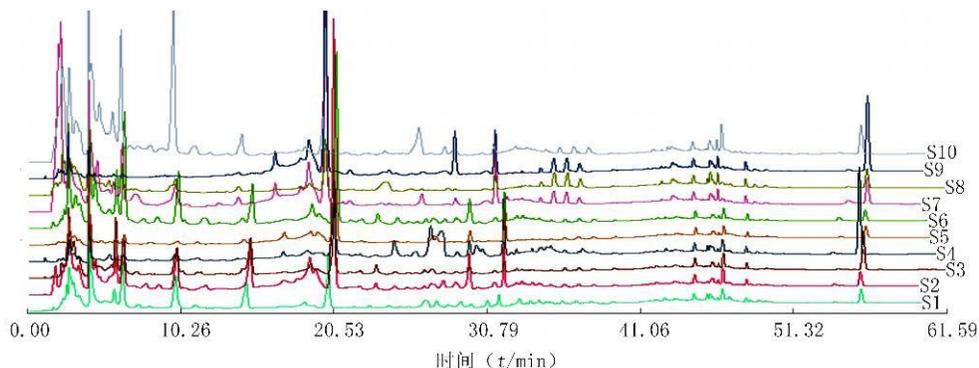


图 2 女贞子药材乙酸乙酯提取物的叠加指纹图谱

Figure 2 Overlapped fingerprint chromatogram of acetic ether extracts of *Ligustrum lucidum*

2.3 女贞子乙酸乙酯提取物供试品溶液制备 取女贞子粉碎至 60 目, 精密称取 1 g, 冷浸于 10 ml 75% 乙醇中超声 30 min, 放冷后再超声 30 min, 过滤, 挥干滤液, 用水混悬后用氯仿 10 ml 萃取 3 次, 再用乙酸乙酯 10 ml 萃取 3 次。取乙酸乙酯层, 挥干, 浸膏溶于 5 ml 甲醇中。取此溶液用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度实验 以 2 号女贞子样品提取液为供试液, 连续进样 3 次, 检测指纹图谱。选择保留时间为 20.747 min 的色谱峰为参照峰, 计算色谱图中共有指纹色谱峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明, 各共有指纹色谱峰的相对保留时间的 RSD 为 1.4% ~ 2.2% (n = 3), 相对峰面积的 RSD 为 1.6% ~ 2.9% (n = 3)。

2.4.2 稳定性实验 取 2 号女贞子供试液, 室温下分别在 0、6、12、18、24 h 进样, 检测指纹图谱。各共有指纹色谱峰的相对保留时间的 RSD 为 0.8% ~ 2.9%, 相对峰面积的 RSD 为 1.5% ~ 3.0% (n = 5)。结果表明, 女贞子供试液室温下 24 h 内稳定。

2.4.3 重复性实验 平行操作制备 3 份 2 号女贞子药材供试液, 分别进样, 检测指纹图谱。各共有指纹色谱峰的相对保留时间的 RSD 为 0.7% ~ 3.0%, 相对峰面积的 RSD 为 0.5% ~ 2.9% (n = 3)。

2.5 不同产地女贞子药材的 HPLC 指纹图谱 用相同方法对 10 个产地女贞子药材制成的供试液进行 HPLC 测定, 并进行分析得指纹图谱。通过叠加指纹图谱比较 10 批样品的色谱峰 (见图 2), 其中 10 个峰是共有的, 确定为共有指纹峰 (见图 3)。经过对照品鉴定, 2 号峰为红景天苷峰。

2.6 指纹图谱相似度的计算 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版》计算各批女贞子药材乙

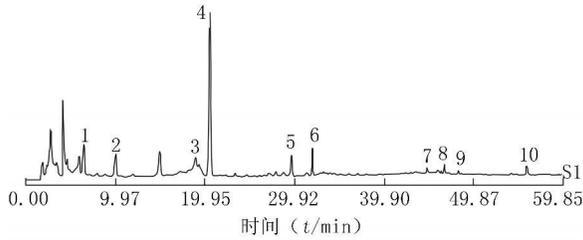


图3 女贞子药材乙酸乙酯提取物的共有指纹图谱
Figure 3 Coexisting fingerprint chromatogram of acetic ether extracts of *Ligustrum lucidum*

酸乙酯提取物指纹图谱相似度,以2号女贞子药材作为参照,计算结果见表2。

表2 女贞子药材乙酸乙酯提取物
指纹图谱相似度评价结果

Table 2 Similarity evaluation results of the fingerprint chromatogram of acetic ether extracts of *Ligustrum lucidum*

药材编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	对照指纹图谱
1	1.000	0.910	0.476	0.920	0.953	0.870	0.791	0.878	0.964	0.751	0.930
2		1.000	0.484	0.885	0.974	0.742	0.817	0.834	0.908	0.918	0.945
3			1.000	0.849	0.882	0.809	0.866	0.897	0.803	0.925	0.894
4				1.000	0.992	0.794	0.823	0.954	0.917	0.890	0.903
5					1.000	0.848	0.818	0.850	0.869	0.919	0.923
6						1.000	0.975	0.991	0.893	0.828	0.802
7							1.000	0.975	0.918	0.821	0.887
8								1.000	0.791	0.965	0.855
9									1.000	0.832	0.988
10										1.000	0.852
对照指纹图谱											1.000

3 讨论

3.1 药材提取溶剂的选择 比较100%乙醇、75%乙醇、50%乙醇对女贞子的提取效果,根据HPLC进样后的各色谱峰绝对峰面积和总出峰数,判断100%乙醇和75%乙醇提取出峰数相当,而50%乙醇的提取出峰数较少。故选择75%乙醇作为提取溶剂。

3.2 色谱检测波长的选择 女贞子乙酸乙酯提取物的主要有效成分为红景天苷和裂环环烯醚萜苷类等,根据紫外全波长扫描谱图显示,在220 nm和254 nm处有较大的吸收。作者考察了供试品溶液在220 nm和254 nm时的色谱图,结果发现,220 nm下色谱峰数最多,而且也是红景天苷和裂环环烯醚萜苷类等的最大吸收波长^[4,6],故选用220 nm作为

检测波长。

3.3 样品处理 用氯仿萃取以除去三萜类化合物等低极性成分,避免对乙酸乙酯提取物色谱峰的干扰,氯仿有效部位群的HPLC指纹图谱,将另行发表。两个不同极性的有效部位群的指纹图谱能较全面反映女贞子活性成分多样性的特点。

3.4 不同产地女贞子乙酸乙酯提取物指纹图谱的比较 10个产地的女贞子乙酸乙酯提取物的指纹图谱中主要峰群的整体图貌基本一致,相似度计算结果表明,不同产地女贞子乙酸乙酯有效部位群的指纹图谱具有一定的相似度,但也有一定的地域差别性。

【参考文献】

[1] 黄婉,杨耀芳.女贞子及其有效成分的药理及临床研究进展[J].现代中西医结合杂志,2003,12(7):772-774.
Huang Wan, Yang Yaofang. Advance in pharmacology and clinical research on *Ligustrum lucidum* and its active ingredients[J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2003, 12(7): 772-774. Chinese.

[2] 胡敏,于德金.红景天苷对心血管系统作用的研究[J].国外医学心血管疾病分册,2003,30(5):298-300.
Hu Min, Yu Dejin. Research into effect of salidroside on cardiovascular system[J]. Foreign Med Sci Sec Cardiovasc Dis, 2003, 30(5): 298-300. Chinese.

[3] 李涛,郝武常,徐长根,等.HPLC-ELSD法测定不同产地女贞子中齐墩果酸与熊果酸的含量[J].中药材,2005,28(5):391-393.
Li Tao, Hao Wuchang, Xu Changgen, et al. Simultaneous determination of oleanolic and ursolic acid in the fruits of *Ligustrum lucidum* Ait. from different areas by HPLC-ELSD method[J]. Chin Tradit Herb Drug, 2005, 28(5): 391-393. Chinese.

[4] Shi Lifu, Ma Yan, Cai Zhen. Quantitative determination of salidroside and specnuezhenide in the fruits of *Ligustrum lucidum* Ait. by high performance liquid chromatography[J]. Biomed Chromatogr, 1998, 12: 27-30.

[5] 王丹,石力夫,胡晋红.柱层析预处理RP-HPLC法测定女贞子中红景天苷的含量[J].药学服务与研究,2006,6(2):118-120.
Wang Dan, Shi Lifu, Hu Jinhong. Determination of salidroside content in fructus *Ligustrum lucidum* Ait. by RP-HPLC method with column chromatography pretreatment[J]. Pharm Care Res, 2006, 6(2): 118-120. Chinese with abstract in English.

[6] 李阳,孙文基.女贞子中2种主要裂环环烯醚萜苷类成分的含量考察[J].中国中药杂志,2008,33(18):2099-2102.
Li Yang, Sun Wenji. Quantitative analysis of two major secoiridoid glucosides in fruits of *Ligustrum lucidum* [J]. China J Chin Materia Medica, 2008, 33(18): 2099-2102. Chinese with abstract in English.

[收稿日期] 2010-04-13

[修回日期] 2010-09-20

[本文编辑] 邢文荣 姚春芳