

Identification of Argy Wormwood Leaf by HPLC Fingerprint

Yuanmin Wang, Hongmei Wu, Ye Yang, Jinzhong Tian, Xiangpei Wang*

Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang Guizhou
Email: wxp0123@126.com

Received: Jul. 13th, 2015; accepted: Jul. 30th, 2015; published: Aug. 7th, 2015

Copyright © 2015 by authors and Hans Publishers Inc.
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

The purpose of this study was to establish HPLC fingerprint method for identification of argy wormwood leaf. Adopting RP-HPLC method, a ultimate-C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column as the analytical column with mobile phase consisting of acetonitrile-0.05% phosphoric acid water, and gradient elution, under the flow rate of 0.60 mL/min at the wavelength of 290 nm, fingerprints of argy wormwood leaf and its adulterant were established, and then similarity comparison analysis was done. Finally we established the HPLC fingerprint's common pattern of argy wormwood leaf, and 43 common peaks were calibrated, whose similarity was high. There was a significant difference of HPLC fingerprint between argy wormwood leaf and its adulterant. The results showed that HPLC fingerprint was simple and convenient, with good repeatability and strong characteristics, which could be used to identify argy wormwood leaf medicine.

Keywords

Argy Wormwood Leaf, HPLC, Fingerprint, Identification

艾叶药材HPLC指纹图谱的鉴别研究

王远敏, 吴红梅, 杨 焱, 田锦忠, 王祥培*

贵阳中医学院, 贵州 贵阳
Email: wxp0123@126.com

收稿日期: 2015年7月13日; 录用日期: 2015年7月30日; 发布日期: 2015年8月7日

*通讯作者。

摘要

本文的目的是建立艾叶的HPLC指纹图谱鉴别方法,评价艾叶及其混淆品HPLC指纹图谱的相似性。采用RP-HPLC法,以Ultimate-C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)色谱柱为分析柱,流动相为乙腈-0.05%磷酸水,梯度洗脱,流速0.60 mL/min,290 nm波长下测定艾叶及其混淆品指纹图谱,并作相似度比较分析。结果建立了艾叶药材HPLC指纹图谱共有模式,有43个共有指纹峰被标定,且相似度较高,艾叶与其混淆品药材的HPLC指纹图谱有明显差异。实验结果表明HPLC指纹图谱具有方法简便,重复性好,特征性强的特点,可用于艾叶药材鉴别。

关键词

艾叶, HPLC, 指纹图谱, 鉴别

1. 引言

艾叶为菊科植物艾 *Artemisia argyi* Levl. et Vant. 的干燥叶,具有温经止血,散寒止痛,祛湿止痒的功效,用于治疗吐血,衄血,崩漏经多,妊娠下血少腹冷痛,经寒不调,宫冷不孕,外治皮肤瘙痒等症[1]。近年来,一些地区将同属植物野艾蒿 *A. lavandulaefolia* DC. 和北艾 *A. vulgaris* L. 的叶混作艾叶药材[2] [3]。艾蒿、野艾蒿与艾植物亲缘关系相近,其药材性状相似,难以分辨。目前关于艾叶及混淆品的鉴别研究有药材性状、显微、紫外光谱及红外光谱等[2]-[13],但这些鉴别方法对艾叶及其亲缘关系相近的混淆品,其专属性不够强。近年来,化学指纹图谱技术应用于中药材鉴别已有大量的研究报道,取得较为满意的药材识别效果。虽然有报道[14]对艾叶饮片进行 HPLC 指纹图谱研究,但存在建立的指纹图谱信息量不大,难以较为全面的表征成分复杂的艾叶药材,未能获得艾叶与其亲缘关系相近混淆品药材的鉴别效果。因此,本实验采用 HPLC 对 21 批艾叶及其混淆品进行指纹图谱鉴别研究,以期建立信息量大、专属性强的艾叶 HPLC 指纹图谱鉴别方法,为艾叶药材及其混淆品的鉴别提供参考依据。

2. 材料与仪器

2.1. 材料

艾叶药材样品共 16 份,经贵阳中医学院王祥培教授鉴定为菊科植物艾 *Artemisia argyi* Levl. et Van. 的干燥叶;艾叶混淆品 4 份,经贵阳中医学院王祥培教授鉴定为菊科植物野艾蒿 *A. lavandulaefolia* DC. 和北艾 *A. vulgaris* L. 的干燥叶;艾茎 1 份,经贵阳中医学院王祥培教授鉴定为菊科植物艾 *Artemisia argyi* Levl. et Van. 的干燥茎。具体来源见表 1。

2.2. 仪器与试剂

Agilent1100 型高效液相色谱仪(美国安捷伦),配有二极管阵列(DAD)检测器,四元泵溶剂洗脱系统,柱温箱,自动进样器;分析天平(型号:AL204-IC/万, METTLER TOLEDO 仪器有限公司);超声波清洗机(型号:HS-10260T,天津市恒奥科技发展有限公司);数显恒温水浴锅(型号:HH-6,常州澳华仪器有限公司)。《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版》(国家药典委员会 2004A 版),甲醇、乙腈为色谱纯(美国 TEDIA),其余试剂均为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

Table 1. Similarity between the leaves and the confusion product
表 1. 艾叶与混淆品的相似度

No.	样品	品种	部位	来源	相似度
S1	艾叶	<i>A. argyi</i> Levl. et Van.	叶	贵州开阳上坝	0.963
S2	艾叶	<i>A. argyi</i> Levl. et Van.	叶	云南保山一心堂药房	0.982
S3	艾叶	<i>A. argyi</i> Levl. et Van.	叶	贵州贵阳芝林大药房	0.986
S4	艾叶	<i>A. argyi</i> Levl. et Van.	叶	河南郑州济仁堂药房	0.967
S5	艾叶	<i>A. argyi</i> Levl. et Van.	叶	河南郑州仝禧堂药房	0.993
S6	艾叶	<i>A. argyi</i> Levl. et Van.	叶	湖南长沙青苹果健康药房	0.994
S7	艾叶	<i>A. argyi</i> Levl. et Van.	叶	贵州贵阳万东桥药市	0.984
S8	艾叶	<i>A. argyi</i> Levl. et Van.	叶	重庆华博健康药房	0.976
S9	艾叶	<i>A. argyi</i> Levl. et Van.	叶	贵州贵阳花果园药市	0.988
S10	艾叶	<i>A. argyi</i> Levl. et Van.	叶	河南郑州张仲景大药房	0.992
S11	艾叶	<i>A. argyi</i> Levl. et Van.	叶	贵州贵阳北京同仁堂药房	0.994
S12	艾叶	<i>A. argyi</i> Levl. et Van.	叶	重庆桐君阁大药房	0.996
S13	艾叶	<i>A. argyi</i> Levl. et Van.	叶	四川成都太极大药房	0.994
S14	艾叶	<i>A. argyi</i> Levl. et Van.	叶	重庆万和大药房①	0.995
S15	艾叶	<i>A. argyi</i> Levl. et Van.	叶	重庆万和大药房②	0.992
S16	艾叶	<i>A. argyi</i> Levl. et Van.	叶	重庆科渝大药房	0.901
A	艾叶	<i>A. argyi</i> Levl. et Van.	茎	贵州开阳上坝	0.549
B	艾叶混淆品	<i>A. lavandulaefolia</i> DC.	叶	贵州贵阳乌当区水田	0.541
C	艾叶混淆品	<i>A. lavandulaefolia</i> DC.	叶	贵州剑河革东镇大皆道村	0.436
D	艾叶混淆品	<i>A. vulgaris</i> L.	叶	贵州剑河岑松镇屯州村	0.229
E	艾叶混淆品	<i>A. vulgaris</i> L.	叶	贵州剑河革东镇麻栗村	0.528

3. 方法与结果

3.1. 色谱条件

Ultimate-C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相: 乙腈(A)-0.05% 磷酸水溶液(B) 进行线性梯度洗脱(0~8 min, 1%~15% A; 8~18 min, 15%~20% A; 18~36 min, 20%~23% A; 36~45 min, 23%~28% A; 45~60 min, 28%~45% A; 60~80 min, 45%~50% A; 80~90 min, 50%~75% A; 90~100 min, 75%~95% A; 100~110 min, 95%~100% A; 110~120 min, 100% A); 柱温 25℃; 检测波长 290 nm; 流速 0.60 mL/min; 分析运行时间 120 min; 进样量 5 μL。

3.2. 供试品溶液制备

取艾叶样品粉末 1.0 g, 精密称定, 置于 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 超声提取两次, 每次 1 h, 滤过, 合并滤液, 置蒸发皿中于 60℃ 水浴挥干, 残渣用甲醇溶解并定容至 10 mL, 摇均, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

3.3. 精密度试验

取贵州开阳上坝的艾叶样品粉末,精密称定,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下的色谱条件连续进样 6 次,结果显示各共有峰的相对峰面积和相对保留时间的 RSD 分别在 0.12%~2.77% 和 0.03%~1.17% 之间,表明仪器精密度良好,符合指纹图谱要求。

3.4. 稳定性试验

取贵州开阳上坝的艾叶样品粉末,精密称定,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下的色谱条件分别在 0, 6, 12, 18, 24, 36 h 进样检测,结果显示各共有峰的相对峰面积和相对保留时间的 RSD 分别在 0.08%~2.17% 和 0.07%~1.40% 之间,表明样品溶液在 36 h 内稳定。

3.5. 重复性试验

取贵州开阳上坝的艾叶样品粉末 6 份,精密称定,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下的色谱条件进样分析,结果显示各共有峰的相对峰面积和相对保留时间的 RSD 分别在 0.14%~2.77% 和 0.04%~1.28% 之间,表明该方法重复性良好。

3.6. 指纹图谱建立

取 16 批艾叶药材粉末,精密称定,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下的色谱条件对 16 批供试品溶液进行检测,测得所有供试品 HPLC 的色谱图;根据不同供试品测定结果的峰数目、峰值、峰位等相关参数进行比较、分析,制定优化的药材指纹图谱,结果见图 1, 图 2。取 4 批混淆品及 1 批艾茎药材粉末,按艾叶的方法制备供试品溶液,进样,获得 4 批混淆品及 1 批艾茎药材样品的指纹图谱,见图 3。

3.7. 指纹图谱分析

3.7.1. 艾叶药材共有指纹峰的确定

比较不同艾叶药材供试品溶液色谱图的相关参数,以保留时间约为 43.617 min 的 27 号峰作为参照峰 S,对各批次艾叶药材的指纹图谱进行考察,确定了 43 个共有峰,结果见图 1, 图 2。

3.7.2. 指纹图谱相似度评价

分别将收集的 16 批艾叶药材样品的色谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”,进行匹配,时间窗为 0.20,采用中位数法考察色谱峰相似度的一致性,结果见表 1。分别将 4 批混淆品及 1 批艾茎样品的色谱数据导入相似度评价软件,与 16 批艾叶样品的色谱峰相似度进行比较,结果见表 1。根据相似度评价结果,16 批艾叶药材样品的相似度大于 0.900,而混淆品及艾茎与艾叶比较却低于 0.550。

4. 讨论

本实验采用超声和回流提取结合以不同浓度的甲醇与乙醇进行提取考察,发现以甲醇作为溶剂进行超声提取的效率高且色谱峰多,提取 2 次,每次 1 h 后基本完全,故拟定本文的供试品溶液制备方法。

对乙腈-水、乙腈-0.10%醋酸水、甲醇-水、甲醇-0.10%醋酸水、甲醇-0.05%磷酸水系统、乙腈-0.05%磷酸水系统及甲醇:乙腈(1:1)-0.05%磷酸水等流动相系统进行考察,发现在乙腈-0.05%磷酸水系统条件下,供试品各峰的分度度较好,基线平稳。采用 DAD 多通道波长检测,发现在 290 nm 检测波长条件下,信息量丰富,特征峰较明显。考察 25℃、30℃、35℃ 时柱温条件对色谱峰分离度的影响,发现柱温升高时,峰的分度度降低且分析时间延长,故选择 25℃ 作为柱温。

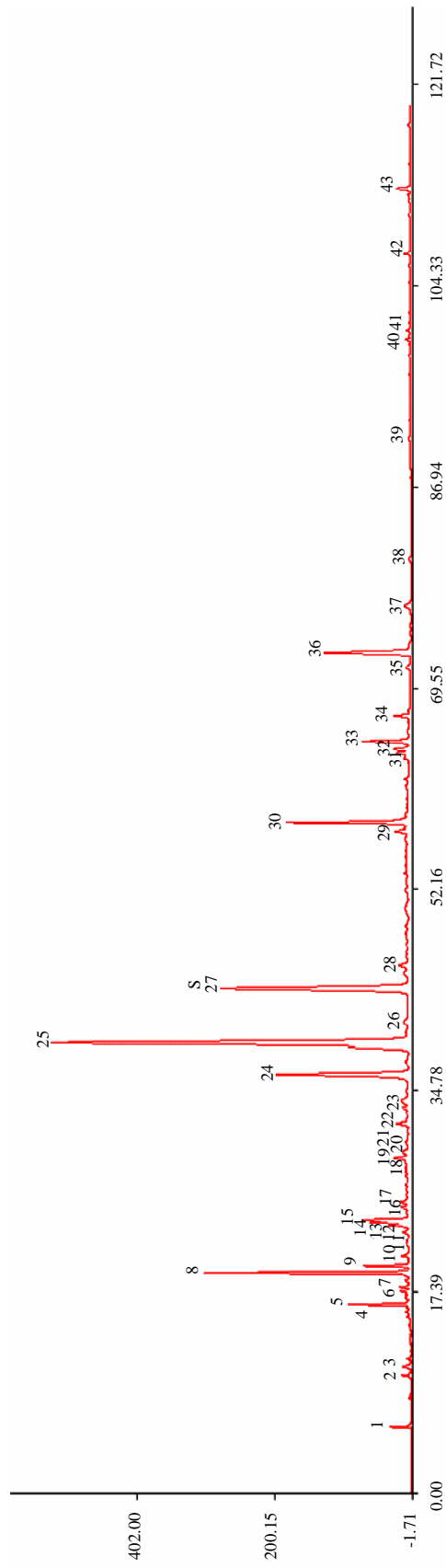


Figure 1. The HPLC fingerprint of argy wormwood leaf
图 1. 艾叶药材 HPLC 指纹图谱

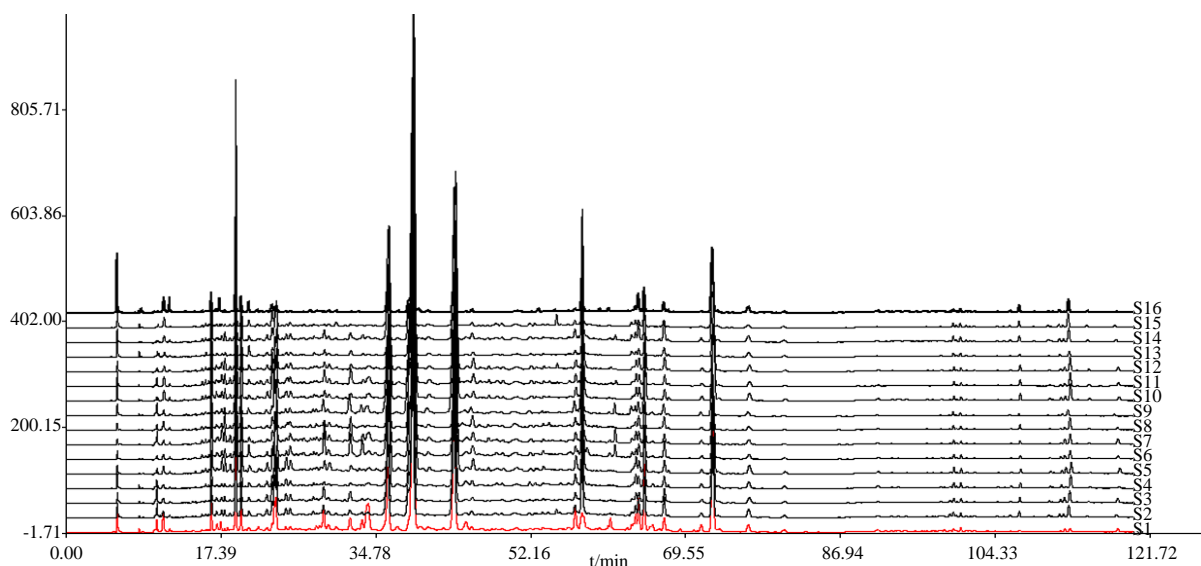
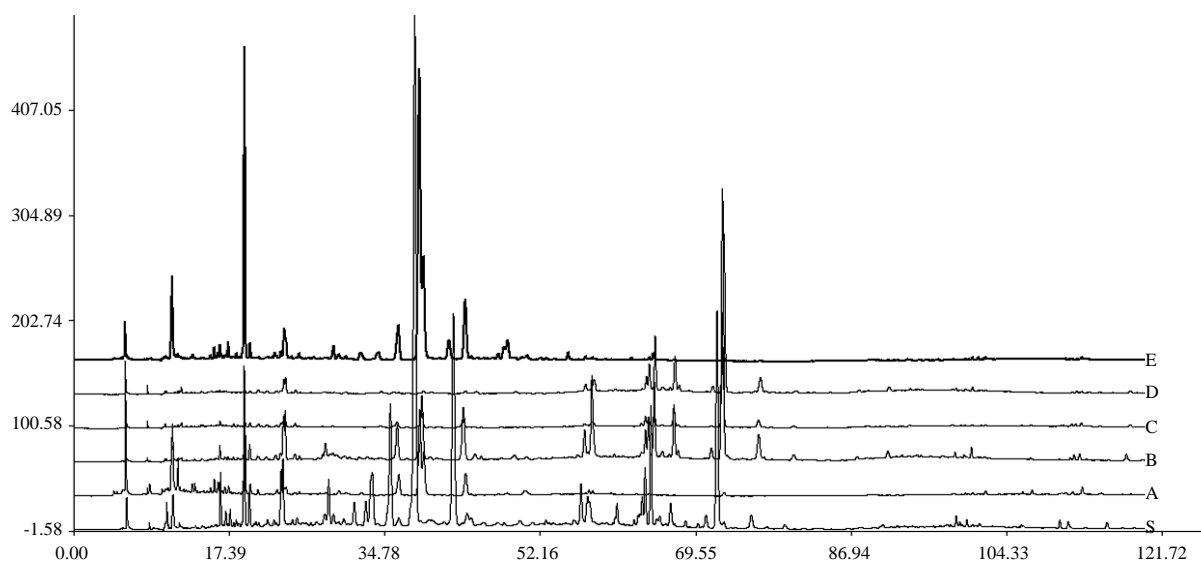


Figure 2. The HPLC fingerprint of 16 batch argy wormwood leaf

图 2. 16 批艾叶药材 HPLC 指纹图谱



(S = 艾叶; A = 艾茎; B、C、D、E = 艾叶混淆品)

Figure 3. The HPLC fingerprint comparison chart of argy wormwood leaf and adulterants

图 3. 艾叶药材与混淆品的 HPLC 指纹图谱比较图

文献[1][3]通过叶片的形状及横切面细胞排列和厚壁组织的有无等特征进行艾叶药材的鉴别,但市场上收集的艾叶药材多破碎不完整,对于艾的同株植物其上部叶与下部叶的形态差异较大,且生态环境上的差异,导致不同产地的艾叶形态及显微组织构造多产生变异,并且破碎的艾叶药材不便于性状的观察,也不利于显微横切面的制作及观察,这些因素均增加艾叶药材性状及显微专属性特征鉴别的难度。而通过对收集到的艾叶药材及混淆品进行 HPLC 指纹图谱研究发现,各批次艾叶药材指纹图谱相似度均大于 0.900,有 43 个共有峰,而艾叶药材与非药用部位及亲缘关系相近的混淆品指纹图谱比较,相似度均低于 0.550,共有峰的个数均较少,差异明显,说明本文建立的 HPLC 指纹图谱,具有方法简便、信息丰富、特征性强等特点,可用于艾叶药材的鉴别,为控制和评价艾叶药材的整体质量提供参考。

参考文献 (References)

- [1] 国家药典委员会 (2010) 中华人民共和国药典(一部). 中国医药科技出版社, 北京, 82-83.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会 (1998) 中华本草(精选本). 上海科技出版社, 上海, 1864-1865.
- [3] 陈宗良, 张慧芳 (1999) 艾叶、野艾及细叶艾的比较鉴别. *中药材*, **22**, 235-237.
- [4] 潘炯光, 徐植灵, 吉力 (1992) 艾叶挥发油的化学研究. *中国中药杂志*, **17**, 741-744.
- [5] 梅全喜, 王剑, 田新村 (1995) 同一天中不同采集时间对艾叶挥发油含量的影响. *基层中药杂志*, **9**, 22.
- [6] 林锦明, 秦路平, 赵卫权, 等 (2000) 艾叶及其同属植物的差热分析鉴别及燃烧热比较. *第二军医大学学报*, **21**, 903-906.
- [7] 洪宗国, 易筠, 江丹, 等 (2009) 不同产地艾叶中鞣酸含量比较. *中南民族大学学报(自然科学版)*, **28**, 63-65.
- [8] 吴怀恩, 韦志英, 朱小勇, 等 (2008) 超临界 CO₂ 流体萃取法提取艾叶与五月艾挥发油成分的研究. *广西中医学报*, **11**, 31-34.
- [9] 江丹, 易筠, 杨梅, 等 (2009) 不同产地艾叶总黄酮含量比较. *中南民族大学学报(自然科学版)*, **28**, 55-56.
- [10] 江丹, 易筠, 杨梅, 等 (2009) 不同品种艾叶挥发油的化学成分分析. *中国医药生物技术*, **4**, 339-344.
- [11] 吴怀恩, 李耀华, 韦志英, 等 (2008) 广西五月艾、细叶艾与艾叶挥发油的比较研究. *中国医药导报*, **5**, 23-26.
- [12] 李玲, 吕磊, 董昕 (2012) 运用 GC-MS 对三种不同方法提取的艾叶挥发油成分的比较分析. *药学实践杂志*, **30**, 279-286.
- [13] 郭承军 (2001) 山东艾叶与野艾叶的挥发油比较研究. *中草药*, **32**, 500-501.
- [14] 于凤蕊, 孙立立, 周倩 (2012) 艾叶饮片 HPLC 指纹图谱研究. *中华中医药学刊*, **30**, 2432-2434.