

## · 论著 ·

## 啤酒花 HPLC 指纹图谱研究

董志敏<sup>1,2</sup>, 许月明<sup>2</sup>, 闻俊<sup>2</sup>, 蒋益萍<sup>2</sup>, 秦路平<sup>1,2,3</sup>, 辛海量<sup>2</sup> (1. 上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234; 2. 海军军医大学药学院, 上海 200433; 3. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053)

**[摘要]** 目的 建立啤酒花 HPLC 指纹图谱。方法 色谱柱: Diamonsil C<sub>18</sub> 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈-0.1%磷酸水, 梯度洗脱, 检测波长 358 nm, 柱压 10.2 MPa, 柱温 30℃, 进样量 10 μl, 流速 1.0 ml/min。结果 首次建立啤酒花 HPLC 指纹图谱共有模式, 对其 19 个共有峰进行标定, 并对其中的黄腐酚、类萹草酮、萹草酮、加萹草酮、类蛇麻酮、蛇麻酮、加蛇麻酮进行指认。26 批药材中有 5 批药材相似度低于或等于 0.9, 而该 5 批均为野生品种。结论 该方法高速有效, 可准确地对啤酒花栽培种、野生种进行区分, 为啤酒花的品质评价研究奠定基础。

**[关键词]** 啤酒花; 高效液相色谱; 指纹图谱

**[中图分类号]** R284.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1006-0111(2019)01-0042-05

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.01.010

Study on fingerprint of *Hupulus lupulus* by HPLC

DONG Zhimin<sup>1,2</sup>, XU Yueming<sup>2</sup>, WEN Jun<sup>2</sup>, JIANG Yiping<sup>2</sup>, QIN Luping<sup>1,2,3</sup>, XIN Hailiang<sup>2</sup> (1. College of Life and Environmental Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China; 2. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 3. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish fingerprint of *Hupulus lupulus* by HPLC. **Methods** Diamonsil C<sub>18</sub> column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used. The mobile phase consisted of acetonitrile and 0.1% phosphoric acid, in gradient elution mode, detection wavelength was 358 nm, column pressure at 10.2MPa, column temperature was 30 °C, injection volume of 10 μl and flow rate was 1.0 ml/min. **Results** A common mode of HPLC fingerprint of *Hupulus lupulus* was established. 19 common peaks were calibrated, xanthohumol, cohumulone, humulone, adhumulone, colupulone, lupulone and adlupulone for identification. Among the 26 batches of *Hupulus lupulus*, 5 batches of herbs had similarities of less than or equal 0.9, which were all wild varieties. **Conclusion** The method was fast, effective, accurate and reliably to distinguish the cultivation and wildness *Hupulus lupulus*, which provided reference for quality control of *Hupulus lupulus*.

**[Key words]** *Hupulus lupulus*; HPLC; fingerprint

啤酒花 *Humulus lupulus* L. 是桑科萹草属多年生草质蔓生藤本植物, 雌性球穗花序不仅作为酿造啤酒的重要添加原料, 也广泛作为药物应用, 具有止咳化痰、健胃、消食、安神、利尿之功效, 用于缓解食欲不振、腹胀、失眠、肺结核、瘰疬、浮肿、膀胱炎等症状<sup>[1]</sup>。在我国, 啤酒花被作为民族药(中药)收录于《哈萨克药物志》、《内蒙古植物药志》、《宁夏中药

志》、《新疆药用植物志》、《四川中药志》等, 为药食两用的新疆特色资源植物, 同时, 在黑龙江、山东等地也有啤酒花栽培<sup>[2]</sup>。目前在欧洲, 啤酒花提取物用于缓解更年期的潮热不适以及绝经后骨质疏松症<sup>[3]</sup>。据文献报道, 啤酒花含有木脂素、黄酮、多酚以及挥发性成分, 其中, 木脂素中的 α 酸、β 酸, 黄酮中的黄腐酚广受业界关注, 大量研究证明其具有抗骨质疏松作用<sup>[4-5]</sup>。综观啤酒花指纹图谱研究, 目前对啤酒花指纹图谱研究甚少, 要想对啤酒花进行系统的质量评价, 区分啤酒花栽培种与野生种, 须对啤酒花进行系统的指纹图谱研究。因此, 本实验采用 HPLC 指纹图谱, 研究了 26 批新疆不同产地、品种啤酒花的指纹图谱(表 1), 并对啤酒花中的 7 种主要成分进行了指认。本方法简单、方便、准确、高效, 可用于啤酒花的质量评价。

**[基金项目]** 国家自然科学基金(U1603283)

**[作者简介]** 董志敏, 硕士研究生, Tel: 18701881925, Email: dongzhiminedu@163.com

**[通讯作者]** 秦路平, 博士, 教授, 研究方向: 中药资源与品质评价, Tel: (021)81871309, Email: qinmmu@126.com; 辛海量, 博士, 副教授, 研究方向: 中药资源、中药(抗骨质疏松)药理学, Tel: (021)81871300, Email: hailiangxin@163.com

表1 啤酒花样品产地来源及相似度

编号	产地	品种	东经(°)	北纬(°)	相似度
S1	焉耆县	栽培	86.503	42.009	0.963
S2	布尔津县	野生	86.828	47.742	0.834
S3	阜康 222 团	栽培-扎一品种	87.860	44.350	0.922
S4	吉木萨尔县	栽培	88.970	44.082	0.976
S5	新疆沙雅县	栽培	82.787	41.231	0.987
S6	裕民县	栽培	83.061	46.232	0.993
S7	吉木萨尔县红旗农场 1	栽培	88.823	44.373	0.988
S8	昌吉共青团-栽培	栽培	87.440	44.250	0.962
S9	和布克赛尔县	栽培	85.758	46.798	0.961
S10	阿勒泰市桦林公园	野生	88.128	47.870	0.869
S11	阿勒泰市云母二矿	野生	88.220	48.009	0.900
S12	阜康 222 团	栽培-马可波罗品种	87.860	44.350	0.972
S13	博乐市小营盘	野生	81.024	44.977	0.687
S14	塔城市	野生	83.019	47.032	0.643
S15	吉木乃县	栽培	85.900	47.440	0.920
S16	阜康 222 团	栽培-萨斯特品种	87.860	44.350	0.981
S17	吉木萨尔县红旗农场 2	栽培	88.822	44.383	0.981
S18	沙湾县	栽培	85.673	44.350	0.908
S19	哈密市	栽培	94.090	42.560	0.991
S20	昌吉市	栽培	87.320	44.030	0.979
S21	阜康 222 团	栽培-萨斯特品种	87.860	44.350	0.981
S22	喀什	栽培	78.579	39.798	0.965
S23	霍尔果斯	栽培	80.426	44.196	0.984
S24	昌吉军户农场	栽培-扎一品种	87.050	44.020	0.943
S25	玛纳斯县中华路	栽培	86.340	44.030	0.984
S26	奇台	栽培	89.630	44.010	0.938

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

岛津 LC-20AD 高效液相色谱仪(配有四元梯度系统, PDA 检测器); 色谱柱 Diamonsil C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); LC-solution 色谱工作站。AG285 型电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司)。DL-1000B 智能超声波清洗机(上海之信仪器有限公司)。

### 1.2 试剂

黄腐酚(CAS: 6754-58-1, 纯度 ≥ 98%, 上海历鼎生物技术有限公司); 啤酒花浸膏 ICE-3(美国酿造化学家协会); 包含类萜草酮、萜草酮、加萜草酮、类蛇麻酮、蛇麻酮、加蛇麻酮。色谱乙腈(Damas-beta 有限公司), 色谱甲醇(Damas-beta 有限公司), 分析磷酸(国药集团化学试剂有限公司)。

### 1.3 药材

啤酒花样品由王果平于 2017 年采集于新疆

不同地方(表 1), 并经海军军医大学药学院生药学教研室辛海量副教授鉴定, 密封存放于干燥阴凉处。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱 Diamonsil C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.1% 磷酸水(A)-乙腈(B), 梯度洗脱(0~10 min, 20%~25% B; 10~12 min, 25%~75% B; 12~30 min, 75%~78% B; 30~40 min, 78%~81% B; 40~42 min, 81%~83% B; 42~60 min, 83%~90% B); 流速 1.0 ml/min; 柱压 10.2 MPa, 柱温 30℃; 检测波长 358 nm; 进样量 10 μl。

### 2.2 对照品溶液的制备

精密称取黄腐酚 26.46 mg, 置于 100 ml 容量瓶, 加甲醇稀释至刻度线, 摇匀, 得黄腐酚对照品储备液; 精密称取啤酒花浸膏(ICE-3) 466.27 mg 置于

100 ml 容量瓶,加甲醇稀释至刻度线,摇匀,得类萹草酮、萹草酮、加萹草酮、类蛇麻酮、蛇麻酮、加蛇麻酮对照品储备液。分别取上述对照品储备液适量,稀释适当倍数,过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜,得对照品溶液。

### 2.3 供试品溶液的制备

分别取 26 个不同产地的啤酒花,依次粉碎存放于 26 个存放袋中,置于阴凉处,分别等量称取 0.5 g 粉末,置于 26 个具塞锥形瓶中,加入 50% 乙醇 20 ml,称重,超声处理 30 min,凉至室温,再称重,用 50% 乙醇补足损失重量,滤除残渣,过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜,即得。

## 2.4 方法学考察

### 2.4.1 精密度试验

取同一供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件,连续进样 6 次,进行测定。结果显示,各共有峰相对保留时间  $\text{RSD}<1\%$ ,相对峰面积  $\text{RSD}<3\%$ ,表明该方法精密度良好。

### 2.4.2 重复性试验

分别取同一批啤酒花样品适量,共 6 份,精密称重,按照“2.3”项方法制备供试品溶液,按照“2.1”项色谱条件进行分析。结果表明,各共有峰相对保留时间  $\text{RSD}<1\%$ ,相对峰面积  $\text{RSD}<5\%$ ,表明该方法重复性良好。

### 2.4.3 稳定性试验

取同一批啤酒花样品适量,按照“2.1”项色谱条件分别于 0、2、4、8、12、24 h 进行分析。结果表明,各共有峰相对保留时间  $\text{RSD}<1\%$ ,相对峰面积  $\text{RSD}<5\%$ ,表明供试品在 24 h 内稳定性良好。

## 2.5 样品测定

取 26 批啤酒花样品,分别按“2.3”项制备供试品,按“2.1”项色谱条件进行测定,结果得到 19 个共有峰,并对其中的黄腐酚、类萹草酮、萹草酮、加萹草酮、类蛇麻酮、蛇麻酮、加蛇麻酮进行指认,对照品及啤酒花样品 HPLC 图谱如图 1 所示。

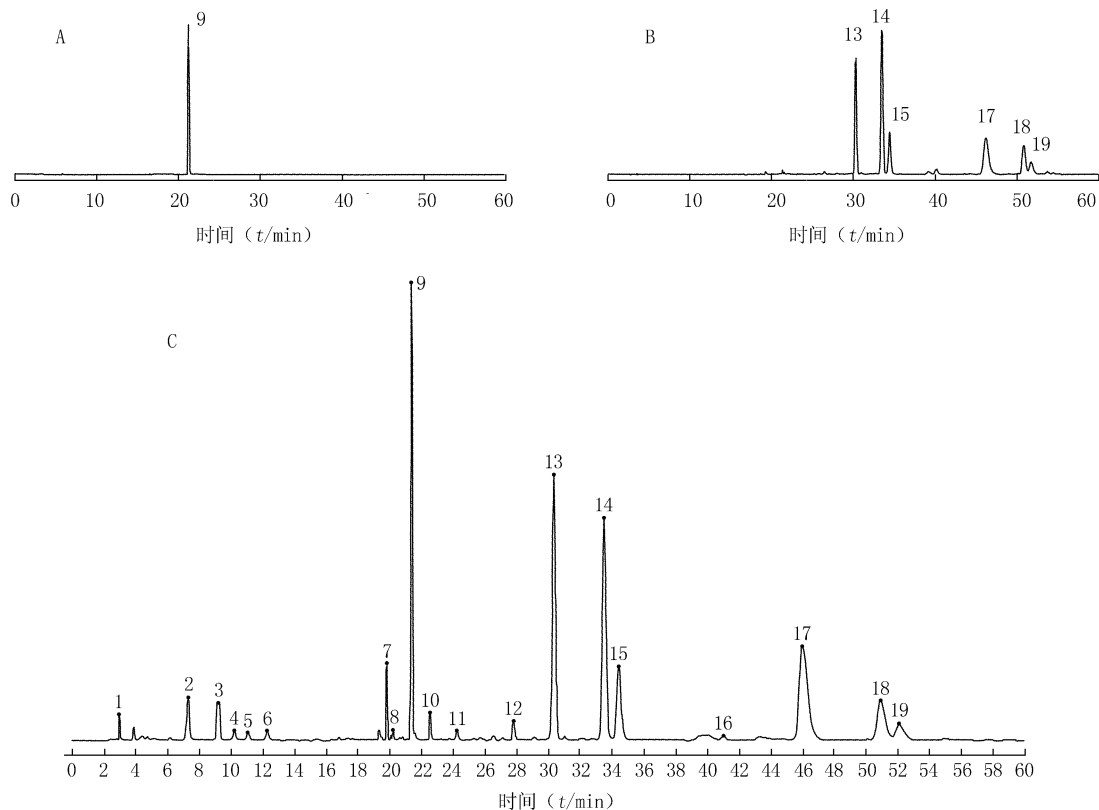


图 1 对照品及啤酒花样品 HPLC 图谱

A. 黄腐酚对照品; B. 啤酒花浸膏(ICE-3)对照品; C. 啤酒花样品; 9. 黄腐酚; 13. 类萹草酮; 14. 萹草酮; 15. 加萹草酮; 17. 类蛇麻酮; 18. 蛇麻酮; 19. 加蛇麻酮

## 2.6 啤酒花指纹图谱的建立

### 2.6.1 内参比峰的选择

在各批次的指纹图谱中,13 号峰为啤酒花中主要成分类萹草酮,保留时间适中,分离度良好,且面

积大,为共有峰,确定为内参比峰。

### 2.6.2 系统聚类分析

将 26 批啤酒花样品各色谱峰峰面积相对于称样量化处理,得到  $26 \times 19$  矩阵信息,用 SPSS 20

统计软件对其进行系统聚类分析,采用欧氏距离进行聚类分析,以化学距离为 2.5,可以将 26 个样品分为 5 类。聚类分析结果如图 2 所示。

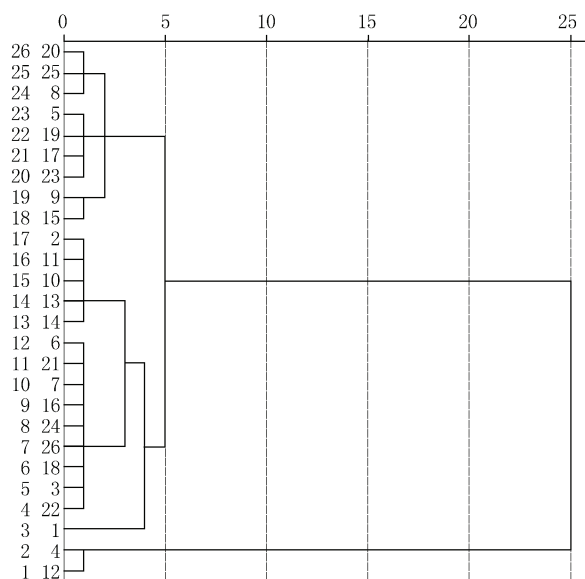


图 2 系统聚类分析树状图

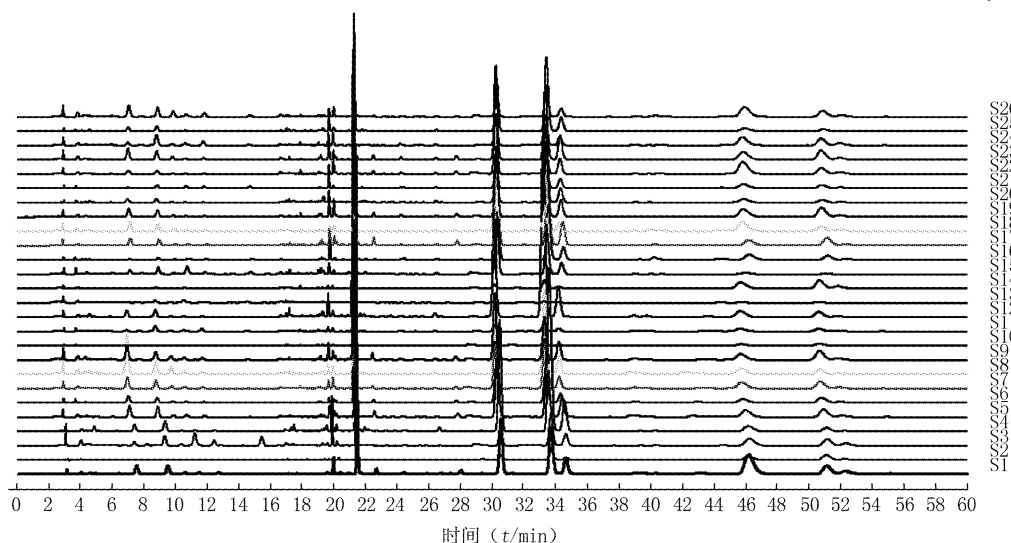


图 3 26 批不同产地啤酒花样品指纹图谱

由聚类分析树状图可以看出,26 批啤酒花样品以化学距离为 2.5,可分为 5 类。第一类又细分为 3 组,均为栽培种,第二类均为野生种,第三类均为栽培种,包含萨斯特和扎一品种;第四类为焉耆县的栽培种,第五类为栽培种,含有马可波罗栽培品种。由聚类分析结果可以看出,野生种和栽培种化学成分含量差异明显,野生种可以单独聚成一类,栽培种之间不同品种的化学成分含量差异较大,栽培种其不同的品种也可以单独聚类。在相似度评价中,相似度 $\leq 0.900$ 的 5 批啤酒花均为野

### 2.6.3 共有模式的建立

采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”对 26 批啤酒花样品的 HPLC 指纹图谱进行数据分析处理,将 S1 作为参照图谱,选取“时间窗宽度”为 0.1 min,以平均数的方法生成啤酒花共有模式的指纹对照图谱。计算不同样品与对照品的相似度如表 1 所示,啤酒花指纹图谱见图 3。

## 3 讨论

### 3.1 色谱条件的选择

啤酒花供试品的 HPLC 的 3D 图像显示,在 358 nm 检测波长下有较好吸收,基线平稳,各峰型较好,出峰数量也较多,因此选定检测波长为 358 nm。本研究考察了甲醇-0.1%磷酸水系统和乙腈-0.1%磷酸水系统,发现乙腈-0.1%磷酸水系统分离效果较好。故选定乙腈-0.1%磷酸水作为流动相进行梯度洗脱,能达到较好的分离。

### 3.2 系统聚类分析与指纹图谱相似度评价

生种啤酒花。经系统聚类和相似度评价分析可以得出,啤酒花化学成分含量与栽培品种和野生种的关系密切。

综上所述,本实验建立了啤酒花 HPLC 指纹图谱,可为今后控制啤酒花的质量提供理论依据。

### 【参考文献】

- [1] ZANOLI P, ZAVATTI M. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. [J]. J Ethnopharmacol, 2008, 116 (3):383-396.

(下转第 54 页)



90年代,有日本学者研究发现,黄芪多糖具有增强老龄鼠产生抗体的作用<sup>[9]</sup>。PAM作为白术的一个重要组成成分,具有毒性小、生物利用度高、药理作用明确等特点<sup>[10]</sup>,已经用于食品添加剂,并作为临床药物用于恢复期肿瘤患者或在化疗时辅助应用,目前已经证明其有明显的增强免疫作用。防风亦具有增强免疫作用,其有效部位为多糖,SPS具有增强免疫活性,能明显增加体外培养的巨噬细胞释放IL-1和IL-8,提高NK细胞和脾淋巴细胞的杀伤活性,促进IL-2对NK细胞的激活<sup>[11]</sup>;还有研究表明SPS呈剂量依赖性地提高小鼠特异性免疫和细胞免疫功能,还能促进小鼠脾淋巴细胞的增殖。

由KCs分泌的一种被称为Filaggrin的分子是构成皮肤屏障功能的重要成分<sup>[12]</sup>。AD患者皮肤Filaggrin表达减少是导致皮肤屏障功能缺陷的重要原因,而皮肤屏障功能缺陷则使环境中的蛋白抗原、微生物和其他刺激原易于通过表皮层,进而刺激局部免疫细胞,触发I型和IV型变态反应,这是启动皮肤炎症的主要环节。为了进一步考察玉屏风各组分对皮肤的保护作用,笔者验证了其Filaggrin表达的影响(该蛋白表达上调可能促进真皮屏障功能的恢复)。

笔者对玉屏风散的多糖组分对皮肤角质形成细胞的免疫调节功能进行了研究,发现APS和TP都有明显的免疫调节作用,以后者的作用更为显著。TP可以抑制激活的皮肤角质形成细胞分泌炎症介质,促进Filaggrin的表达,并对炎症和免疫细胞的活化具有重要作用的NF- $\kappa$ B信号通路有明显的抑制作用。这些基础研究为进一步开发利用中药方剂玉屏风用于AD的治疗阐明了作用机制,打下了良

好的基础。

## 【参考文献】

- [1] LEUNG D Y, BIEBER T. Atopic dermatitis [J]. *Lancet*, 2003, 361(9352):151-160.
- [2] LEUNG D Y, BOGUNIEWICZ M, HOWELL M D, et al. New insights into atopic dermatitis [J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(5):651-657.
- [3] GITTLER J K, KRUEGER J G, GUTTMAN-YASSKY E. Atopic dermatitis results in intrinsic barrier and immune abnormalities: Implications for contact dermatitis [J]. *Allergy Clin Immunol*, 2013, 131(2):300-313.
- [4] 葛延全. 玉屏风散应用于皮肤疾病经验[J]. *内蒙古中医药*, 2001, 20(2):20.
- [5] 李雪娇. 特异性免疫治疗联合玉屏风颗粒治疗特应性皮炎的疗效观察[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2011, 49(7):144-146.
- [6] 韩莉. 玉屏风散配合西药治疗慢性湿疹60例[J]. *陕西中医*, 2015, 36(3):322-324.
- [7] 胡建农. 玉屏风胶囊合复方甘草酸苷片治疗慢性荨麻疹48例[J]. *现代中西医结合杂志*, 2013, 22(3):268-269.
- [8] 陈静,袁明勇,郑玲利,等. 黄芪的化学成分和药理作用研究[J]. *临床医药实践*, 2009, 18(11):2217-2219.
- [9] KAJIMURA K, TAKAGI Y, MIYANO K, et al. Polysaccharide of Astragali radix enhances IgM antibody production in aged mice[J]. *Biol Pharm Bull*, 1997, 20(11):1178-1182.
- [10] 曹岗,张晓炎,丛晓东,等. 白术多糖的研究进展[J]. *北京联合大学学报(自然科学版)*, 2009, 23(3):14-18.
- [11] 杨淳,田维毅. 防风多糖对巨噬细胞分泌细胞因子的影响[J]. *贵阳中医学院学报*, 2011, 33(4):31-33.
- [12] WEIDINGER S, ILLIG T, BAURECHT H, et al. Loss-of-function variations within the Filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 118(1):214-219.

【收稿日期】 2018-06-26 【修回日期】 2018-11-29

【本文编辑】 李睿旻

(上接第45页)

- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2005.
- [3] HEYERICK A, VERVARCKE S, DEYPERE H, et al. A first prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study on the use of a standardized hop extract to alleviate menopausal discomforts [J]. *Maturitas*, 2006, 54, (2):164-175.

- [4] MILLIGAN S R, KALITA J C, POCOCK V, et al. The endocrine activities of 8-prenylnaringenin and related hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85(12):4912-4915.
- [5] GERHAUSER C, ALT A, HEISS E, et al. Cancer chemopreventive activity of Xanthohumol, a natural product derived from hop [J]. *Mol Cancer Ther*, 2002, 1(11):959-969.

【收稿日期】 2018-05-21 【修回日期】 2018-10-08

【本文编辑】 李睿旻