

# 岗梅根提取物的 HPLC 指纹图谱

黄艳萍\*, 袁萍

(广东食品药品职业学院, 广州 510520)

**[摘要]** 目的:研究建立岗梅根提取物的 HPLC 指纹图谱。方法:采用 Phenomenex Gemini C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温 25 °C,甲醇-0.5% 醋酸水溶液梯度洗脱,检测波长 254 nm,流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,洗脱时间 60 min。结果:在选定的色谱条件下,通过相似度分析软件确定了 10 个色谱峰构成岗梅根提取物的特征峰,10 批次岗梅根提取物指纹图谱相似度均在 0.9 以上。结论:该分析方法稳定可靠,可为岗梅根提取物的质量评价与控制提供了依据。

**[关键词]** 岗梅根; 提取物; 高效液相色谱; 指纹图谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)15-0062-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2014150062

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140609.1530.001.html>

**[网络出版时间]** 2014-06-09 15:30

## Fingerprint Analysis of Radix et Caulis Ilicis Asprellae Extract

HUANG Yan-ping\*, YUAN Ping

(Guangdong Food and Drug Vocational Collage, Guangzhou 510520, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the chromatographic fingerprint analysis for the quality control of Radix et Caulis Ilicis Asprellae extract. **Method:** HPLC Method was applied to establish the chromatographic fingerprint. The separation was performed on a phenomenex Gemini C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with a gradient elution composed of methanol and 0.5% acetic acid. The column temperature was set at 25 °C and the flow rate was 1 mL·min<sup>-1</sup>, the detective wavelength was at 254 nm. **Result:** Under the above chromatographic conditions, the characteristic peak of fingerprint chromatographic of crude material of Radix et Caulis Ilicis Asprellae extract was composed of 10 chromatographic peaks through similarity analysis. **Conclusion:** The fingerprint chromatographic set up by HPLC is stable and repeatable, which can be used for quality control.

**[Key words]** Radix et Caulis Ilicis Asprellae; extract; HPLC; fingerprint

岗梅根提取物是由冬青科植物梅叶冬青的根经过提取加工而成。岗梅根是我国南方民用中药,也是王老吉、广东凉茶、沙溪凉茶等的主要组成药材<sup>[1]</sup>。岗梅根性寒、味苦,具有清热解毒、生津止渴、利咽消肿、散瘀止痛之功效,用于治疗感冒发热、肺热咳嗽、热病津伤口渴、咽喉肿痛、跌打瘀痛等<sup>[1-3]</sup>。岗梅根的药源多为野生药材,随着野生资源日渐减少和该药材的广泛应用,对其质量控制尤为重要,但目前尚无岗梅根药材的质量控制标准。

将指纹图谱技术应用于岗梅根提取物的质量控制中,并应用国家药典委员会推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统的操作规范(版本 2004A)”分析不同批次岗梅根提取物的指纹图谱相似度,为岗梅根药材资源规范和质量评价提供科学依据。

### 1 仪器与试剂

2695 型高效液相色谱仪(包括 2996 二极管阵列检测器,Empower 色谱工作站,美国 Waters 公司),BP221D 型电子天平[赛多利斯科学仪器(北

**[收稿日期]** 20131108(003)

**[基金项目]** 广东省科技计划项目(2011B020301007);广东省中医药局重点项目(20113014)

**[通讯作者]** \*黄艳萍,硕士,高级实验师,从事天然药物化学及药用资源植物开发利用研究,E-mail:hypgz@126.com

京)有限公司],中药色谱指纹图谱相似度评价系统的操作规范(版本 2004A)(国家药典委员会推荐)。乙腈为色谱纯,磷酸为分析纯,蒸馏水为双蒸水,其他剂均为分析纯。10 批岗梅根提取物由广东省中药研究所提取制备,岗梅根药材经干燥后粉碎,称定重量,加 25 倍量的水浸泡 30 min,急火煮沸后改用小火保持微沸 2 小时(可少量多次补充水,使药液不至于煮干),放冷,经喷雾干燥,即得岗梅根提取物。产地为广东的从化、平远、蕉岭、罗定、五化、开平、恩平、丰顺、博罗、新丰。所有药材经广东省中药研究所主任中药师蔡岳文鉴定为冬青科植物梅叶冬青 *Ilex asprella* (Hook. f. et Arn.) Champ. ex Benth. 的根。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Phenomenex Gemini C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇(A)-0.1% 乙酸溶液(B)进行梯度洗脱(0 ~ 18 min, 91% A, 18 ~ 55 min, 85% A, 55 ~ 60 min, 73% A),流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>,检测波长 254 nm,柱温 25 °C,进样量 10 μL。

**2.2 供试品溶液的制备** 精密称取岗梅根提取物 0.5 g,置 25 mL 量瓶中,加入 50% 甲醇 20 mL,浸泡 1 h,超声处理(功率 160 W,频率 40 kHz)30 min,放至室温,加 50% 甲醇至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。

### 2.3 方法学考察

**2.3.1 稳定性试验** 精密吸取同一供试品溶液(S2 号)各 10 μL,分别于 0, 5, 10, 15, 20, 24 h 进样测定。结果各共有峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 均 < 3%,表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

**2.3.2 精密度试验** 精密吸取同一供试品溶液(S2 号)各 10 μL,分别连续 6 次进样测定。结果各共有峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 均 < 3%,表明精密性良好。

**2.3.3 重复性试验** 取同一样品(S2 号),按 2.2 项下方法分别制备供试品溶液 6 份,进样测定。结果各共有峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 均 < 3%,表明方法重复性良好。

**2.4 岗梅根提取物样品 HPLC 指纹图谱测定** 分别将 10 批不同产地的岗梅根提取物按 2.2 项下方法制备,按 2.1 项下的色谱条件测定。将测定所得的色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统的操作规范(版本 2004A)”,以样品 S2 为参照图谱,得到岗梅根提取物的共有模式色谱图,见图

1,2。确定了 10 个峰为共有特征色谱峰,其中,峰 5 分离度较好,且峰形对称,所以选为内参比峰。以其为基准计算各共有峰的相对保留时间及相对峰面积见表 1,2。

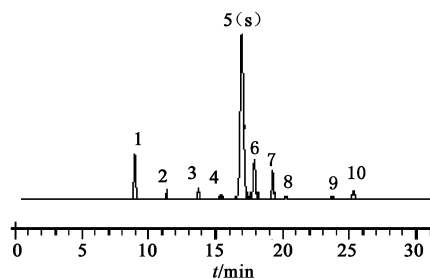


图 1 岗梅根提取物指纹谱特征峰

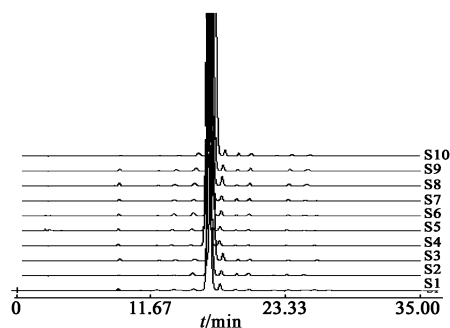


图 2 10 批岗梅根提取物指纹谱的叠加

**2.5 相似度评价** 将指纹图谱测定数据导入国家药典委员会“中药指纹图谱相似度评价系统(2004A)”软件,经校正,将谱图自动匹配,然后生成对照图谱(平均数),进行谱峰差异性评价和整体相似性评价。通过中药指纹图谱相似度软件计算得出岗梅根提取物 HPLC 指纹谱共有图谱;与共有图谱比较,10 批岗梅根提取物的相似度分别是 0.915, 0.921, 0.908, 0.919, 0.924, 0.987, 0.986, 0.989, 0.987, 0.981。10 批岗梅根提取物相似度均在 0.9 以上,可确定 10 批岗梅根提取物化学成分组成较为相似,品质也较为一致。

**2.6 10 不同产地岗梅根提取物系统聚类分析** 本次实验从 10 批不同产地岗梅根提取物指纹图谱中获得 10 个共有特征峰,以这 10 个共有特征峰的相对峰面积为原始数据,得到 10 × 10 阶数据矩阵,应用 SPSS 17.0 统计分析软件,选用组间对比进行聚类,用余弦法计算样品相似性程度,聚类结果见图 3。从树状聚类图中看到,可将 10 批供试品分为 4 类。第 1 类为 S2, S6, S7, S10;第 2 类为 S3, S8;第 3 类为 S1, S9;第 4 类为 S4, S5。

## 3 讨论

考察了 Lidrospher C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250

表 1 10 批岗梅根提取物指纹图谱相对保留时间的测定

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	均值	RSD/%
1	0.528	0.531	0.531	0.529	0.529	0.527	0.522	0.525	0.529	0.529	0.528	0.521
2	0.677	0.676	0.677	0.677	0.665	0.676	0.677	0.676	0.678	0.676	0.676	0.555
3	0.823	0.824	0.826	0.825	0.826	0.826	0.825	0.822	0.825	0.826	0.825	0.170
4	0.913	0.915	0.916	0.917	0.917	0.917	0.917	0.919	0.922	0.913	0.917	0.292
5	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	1.068	1.065	1.067	1.066	1.068	1.067	1.067	1.068	1.068	1.068	1.067	0.097
7	1.130	1.132	1.131	1.131	1.132	1.132	1.132	1.133	1.133	1.132	1.132	0.081
8	1.194	1.194	1.195	1.195	1.193	1.194	1.195	1.194	1.196	1.195	1.195	0.071
9	1.394	1.395	1.396	1.394	1.395	1.396	1.394	1.395	1.395	1.395	1.395	0.053
10	1.512	1.511	1.513	1.513	1.512	1.513	1.512	1.514	1.513	1.513	1.513	0.056

表 2 10 批岗梅根提取物指纹图谱相对峰面积的测定

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	均值	RSD/%
1	0.215	0.215	0.214	0.217	0.227	0.211	0.221	0.221	0.215	0.215	0.211	26.734
2	0.017	0.013	0.016	0.012	0.012	0.013	0.016	0.011	0.017	0.013	0.012	35.789
3	0.023	0.029	0.023	0.033	0.034	0.021	0.028	0.035	0.023	0.029	0.027	22.898
4	0.005	0.005	0.004	0.007	0.005	0.002	0.004	0.002	0.005	0.005	0.004	35.136
5	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	0.495	0.396	0.419	0.513	0.625	0.321	0.314	0.328	0.495	0.396	0.421	28.259
7	0.113	0.114	0.213	0.126	0.115	0.115	0.118	0.114	0.113	0.114	0.126	24.354
8	0.034	0.032	0.038	0.036	0.045	0.038	0.034	0.036	0.034	0.032	0.031	39.887
9	0.010	0.009	0.015	0.010	0.009	0.014	0.009	0.013	0.010	0.009	0.011	21.425
10	0.048	0.039	0.034	0.021	0.025	0.037	0.034	0.032	0.048	0.039	0.033	24.498

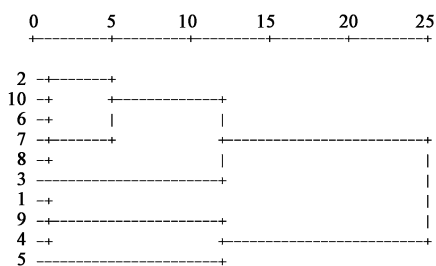


图 3 10 批岗梅根提取物指纹谱聚类分析

mm, 5  $\mu$ m), SHIMADZU Shim-pack VP-ODS 色谱柱 (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m), phenomenex Gemini C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m), 比较分离度、出峰数、峰形和柱效。结果表明使用 phenomenex Gemini C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m) 可以得到较好的分离, 特征色谱峰最多。

考察了甲醇-水、甲醇-磷酸溶液和乙腈-磷酸溶液等多组流动相系统, 以不同的比例和不同的梯度进行洗脱。结果以甲醇-0.1% 磷酸溶液的梯度洗脱为佳, 色谱图在 254 nm 的各色谱峰分离效果及形状较好。

采用二极管阵列检测器做全波长扫描, 考察不

同吸收波长图谱, 重点考察了 202, 230, 254, 260, 270, 280, 365 nm 处的谱图特征。结果表明, 254 nm 处各成分具有较好的紫外吸收, 色谱信息最为丰富, 基线平稳。

通过对 10 批样品的指纹图谱分析, 初步构建了岗梅根提取物对照指纹图谱; 10 批样品指纹图谱相似度均 > 0.90, 说明 10 批样品有比较好的一致性, 因此建议在对岗梅根提取物质量进行评价时, HPLC 指纹图谱相似度应达到 0.90 以上, 所建立的色谱指纹图谱具有较好的稳定性和可控性, 可用于岗梅根提取物的质量监控。

[参考文献]

[1] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药材标准[S]. 广州: 广东科技出版社, 2004: 111.  
[2] 刘淑淑, 陈华萍, 李卫群, 等. 岗梅根乙醇提取物的抗炎作用[J]. 中药材, 2004, 27(7): 519.  
[3] 张军, 林雪颖, 李文周, 等. 岗梅总皂苷的提取工艺研究[J]. 今日药学, 2008, 18(4): 60.

[责任编辑 顾雪竹]