

## 榄葱茶的 HPLC 指纹图谱分析

郭小媚<sup>1</sup>, 何文彬<sup>2</sup>, 刘广涛<sup>2</sup>, 王岩<sup>1\*</sup>

(1. 广东药学院, 广州 510006; 2. 广东台城制药股份有限公司, 广东 台山 529200)

**[摘要]** 目的:建立榄葱茶的指纹图谱。方法:采用 HPLC 法, Inertsil® RSOD-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇(A)-0.1% 磷酸溶液(B)进行梯度洗脱(0~15 min, 5%~15% A; 15~43 min, 15%~45% A; 43~55 min, 45%~62% A; 55~80 min, 62% A), 检测波长 273 nm, 柱温 25 °C, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 以没食子酸峰为参照峰。结果:指纹图谱中共有 15 个特征峰, 其中青果有 13 个特征峰, 紫苏叶有 2 个特征峰, 其中 2 号为没食子酸峰, 10 批样品图谱相似度均大于 0.99。结论:建立的指纹图谱稳定可行, 适用于榄葱茶的质量控制。

**[关键词]** 榄葱茶; 指纹图谱; 高效液相色谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)23-0071-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014230071

## HPLC Fingerprint Analysis of Lancong Tea

GUO Xiao-mei<sup>1</sup>, HE Wen-bin<sup>2</sup>, LIU Guang-tao<sup>2</sup>, WANG Yan<sup>1\*</sup>

**[收稿日期]** 20140327(006)

**[第一作者]** 郭小媚, 在读硕士, 从事中药制剂研究与开发, E-mail:105304430@qq.com

**[通讯作者]** \* 王岩, 博士, 教授, E-mail:gdpuwy@126.com, Tel:020-39352169

(7.15%)及对称二甲基脲(5.12%)。在 SFE 中分别为异蒿属(甲)酮(12.15%), 2-苄醇(11.38%)及反-罗勒烯(7.03%)。

由表 1 可知, 两种提取方法所得的艾叶挥发油主要成分基本相似, 不同点在于 SPME 法所得艾叶挥发油所含组分较 SFE 多 12 个, 分别为冰片、薄荷醇、侧柏醇及 3-己烯-1-醇等以及多出的两种未鉴别组分, 故无论从所得挥发油组分的丰富性和层次性上来看, 固相微萃取技术对于艾叶挥发油的提取较超临界流体萃取均具、有明显的优势。

### 4 讨论

本研究中仅出现于 SPME 中的有冰片、薄荷醇、侧柏醇等 12 种组分, 具有抗菌消炎、抗癌抗肿瘤、促进透皮吸收以及改善区域微循环等药理作用<sup>[6-9]</sup>, 由此角度分析, SPME 法对南阳艾叶挥发性成分生理活性的反应更加全面。

不仅如此, SPME 的优势还体现在其他方面, 如采样方式的扩展, 装置便于携带、操作简单, 无需溶剂的进样, 分析响应速度快等, 未来的发展前景非常广阔, 尤其适于即时、准确的分析药物主要成分, 从

根本上把控药材的质量, 为医院药房、药材进出口的即时检验提供更准确详细的数据支撑。

### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010:82.
- [2] 刘向前, 陈素珍, 倪娜. 湖南产艾叶挥发油成分的 GC-MS 研究[J]. 中药材, 2005, 12(12):1069.
- [3] 姚发业, 邱琴, 刘廷礼, 等. 艾叶挥发油的化学成分[J]. 分析测试学报, 2001, 20(3):42.
- [4] 姜平川, 李嘉, 梁江昌. 广西产艾叶挥发油成分 GC-MS 研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(12):25.
- [5] 兰美兵, 余永莉, 卢巍, 等. 甘肃产艾叶挥发油的化学成分及遗传毒性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(13):252.
- [6] 江光池, 杨胜华, 冯旭军, 等. 龙脑和异龙脑的抗炎作用[J]. 华西药学杂志, 1990, 5(3):190.
- [7] 蒋继宏, 李晓储, 高雪芹, 等. 侧柏挥发油成分及抗肿瘤活性的研究[J]. 林业科学研究, 2006, 19(3):311.
- [8] 梁庆. 薄荷醇的促透作用及其机制研究[D]. 广州: 广东药学院, 2009.

[责任编辑 顾雪竹]

(1. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;  
2. Guangdong Taicheng Pharmaceutical Co., Ltd, Taishan 529200 China)

[ **Abstract** ] **Objective:** To establish the HPLC fingerprint of Lancong tea. **Method:** HPLC was adopted in the fingerprint analysis, and the chromatographic conditions were as follows: InertsilR<sup>®</sup> RSOD-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column; mobile phase consisted of methanol (A) -0.1% phosphorous acid (B) solution for gradient elution 0-15 min, 5% -15% A; 15-43 min, 15% -45% A; 43-55 min, 45% -62% A; 55-80 min, 62% A. The detection wavelength of 273 nm; the column temperature of 20 °C. The flow rate of 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, gallic acid peak as the reference peak. **Result:** There were mainly 15 characteristic peaks in the fingerprints. Among these peaks, 13 peaks belonged to Canarii Fructus, 2 peaks belonged to Perillae Folium, and the 2<sup>nd</sup> one was gallic acid peak. The similarity of HPLC fingerprints of 10 batches of Lancong tea were more than 0.99. **Conclusion:** The fingerprint is stable and feasible, and can be used to control the quality of Lancong tea.

[ **Key words** ] Lancong tea; fingerprint; HPLC

榄葱茶收载于《卫生部药品标准中药成方制剂》第六册,由青果、生姜、紫苏叶和葱头组成,具有解表、平胃之功效,用于伤风感冒所致的发热、头痛、流涕、喷嚏、喉痒咽痛、胸腹胀满。现代药理研究表明<sup>[1-3]</sup>,该方中青果为常用清热利咽药物,紫苏叶有解表散寒、行气和胃之效,生姜为发散风寒,温中止呕,化痰解毒圣品,葱头所含挥发性物质有发汗、祛痰、利尿的作用。为了更好地控制榄葱茶的质量,本研究参考文献[4-6],采用高效液相色谱法建立其指纹图谱,为榄葱茶质量标准的提高提供依据。

## 1 仪器与试剂

1260 系列高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司),BP211D 型电子分析天平(北京赛多利斯仪器公司),没食子酸、迷迭香酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110831-200803,111871-201001),榄葱茶(广东台城制药股份有限公司,批号 20120201 ~ 20130103)。甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** InertsilR<sup>®</sup> RODS-3 C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇(A)-0.1 磷酸溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 15 min, 5% ~ 15% A; 15 ~ 43 min, 15% ~ 45% A; 43 ~ 55 min, 45% ~ 62% A; 55 ~ 80 min, 62% B),流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>,检测波长 273 nm,柱温 20 °C,进样量 10 μL。

**2.2 对照品溶液的制备** 分别精密称取没食子酸对照品 2.43 mg,迷迭香酸对照品 1.95 mg,加 75% 甲醇制成每 1 mL 分别含 0.048 6, 0.039 mg 的混合对照品溶液,即得。

**2.3 供试品溶液的制备** 取本品适量,混匀,精密

称定约 0.1 g,置具塞锥形瓶中,加入 75% 甲醇 25 mL,超声处理 30 min,取出,放冷,滤过,取续滤液,即得。

**2.4 阴性对照溶液的制备** 按处方比例分别称取缺青果、紫苏叶、生姜和葱头的其余药材,同法制成阴性样品,取 0.1 g,精密称定,按 2.3 项下方法制得缺青果、紫苏叶、生姜及葱头的阴性对照溶液。

### 2.5 指纹图谱方法学考察

**2.5.1 精密度试验** 精密吸取供试品溶液 10 μL,按上述色谱条件进行测定,连续进样 6 次。结果,以各共有峰的相对保留时间和相对峰面积计, RSD 均 < 1.5%,表明仪器精密度良好。

**2.5.2 重复性试验** 取同一批样品 6 份,每份 0.1 g,精密称定,按 2.3 项下方法平行制备供试品溶液,分别精密吸取 10 μL,进样测定并记录色谱图。计算 6 份供试品溶液中各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果 RSD 均 < 3.0%,说明本法重复性良好。

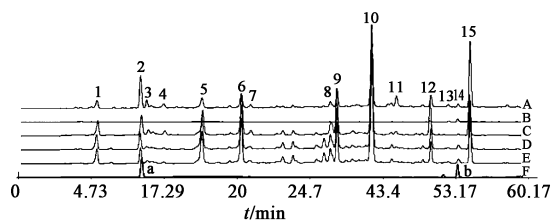
**2.5.3 稳定性试验** 取同一份供试品溶液,室温放置,分别于 0, 4, 8, 12, 24 h 进样分析,依法测定。计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果 RSD 均 < 2.0%,表明供试品溶液在室温放置 24 h 内稳定。

### 2.6 指纹图谱的建立

**2.6.1 样品测定** 取样品 10 批,分别按 2.3 项下方法制备供试品溶液,分别精密吸取 10 μL 注入液相色谱仪,按上述色谱条件进行测定,并记录 60 min 内的色谱图。将所得的 HPLC 图谱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,对比后确定共有特征峰为 15 个。

**2.6.2 共有峰归属** 比较混合对照品溶液、缺青果、紫苏叶、生姜和葱头的阴性对照溶液及 10 批供试品溶液的色谱图,确定共有峰中属于青果的有 13 个,分别为 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,15 号峰,其中 2 号为没食子酸峰;属于紫苏叶的峰有 2 个,分别为 13,14 号峰,其中 14 号为迷迭香酸峰,见图 1。

**2.6.3 参照峰的选择** 由于没食子酸、迷迭香酸分别为青果和紫苏叶的主要有效成分,二者分离度均符合分析要求,但与迷迭香酸峰相比,没食子酸峰形更佳,且面积大小适中,故选择 2 号没食子酸为参照



A. 供试品;B. 缺青果阴性;C. 缺紫苏叶阴性;D. 缺生姜阴性;  
E. 缺葱头阴性;F. 混合对照;a. 没食子酸;b. 迷迭香酸

图 1 榄葱茶共有峰归属 HPLC

峰,对共有峰进行相对峰面积和相对保留时间的计算,计算结果见表 1,2。

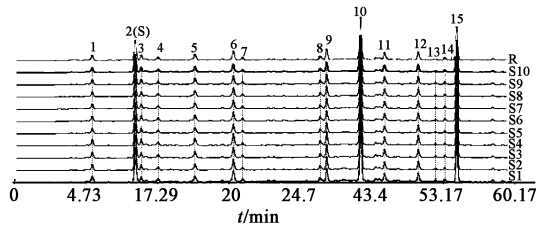
表 1 10 批样品共有峰相对保留时间 (以 2 号峰没食子酸为参照峰)

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	平均值	RSD/%
1	0.644	0.644	0.644	0.645	0.646	0.646	0.646	0.646	0.645	0.646	0.645	0.1
2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.0
3	1.045	1.046	1.045	1.044	1.053	1.053	1.053	1.053	1.053	1.053	1.050	0.4
4	1.187	1.187	1.186	1.186	1.189	1.190	1.190	1.190	1.190	1.190	1.189	0.2
5	1.496	1.496	1.495	1.495	1.494	1.495	1.495	1.495	1.495	1.495	1.495	0.0
6	1.814	1.815	1.813	1.812	1.811	1.810	1.810	1.810	1.811	1.811	1.812	0.1
7	1.891	1.892	1.891	1.889	1.887	1.886	1.886	1.886	1.887	1.887	1.888	0.1
8	2.533	2.536	2.533	2.531	2.530	2.528	2.527	2.528	2.529	2.529	2.530	0.1
9	2.588	2.591	2.589	2.586	2.582	2.580	2.579	2.579	2.580	2.581	2.584	0.2
10	2.870	2.873	2.870	2.867	2.863	2.860	2.859	2.860	2.861	2.862	2.865	0.2
11	3.070	3.073	3.070	3.067	3.060	3.056	3.056	3.056	3.058	3.058	3.062	0.2
12	3.350	3.353	3.350	3.346	3.338	3.335	3.334	3.334	3.336	3.336	3.341	0.2
13	3.489	3.492	3.489	3.486	3.484	3.481	3.480	3.480	3.481	3.482	3.484	0.1
14	3.569	3.573	3.569	3.565	3.560	3.558	3.556	3.556	3.557	3.558	3.562	0.2
15	3.669	3.670	3.670	3.666	3.655	3.653	3.651	3.651	3.653	3.653	3.659	0.2

表 2 10 批样品共有峰相对峰面积 (以 2 号峰没食子酸为参照峰)

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	平均值	RSD/%
1	0.233	0.236	0.237	0.257	0.233	0.233	0.233	0.233	0.232	0.233	0.236	3.2
2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.0
3	0.154	0.155	0.154	0.213	0.185	0.187	0.188	0.188	0.188	0.188	0.180	10.8
4	0.155	0.157	0.157	0.207	0.169	0.169	0.169	0.169	0.169	0.142	0.166	10.2
5	0.338	0.365	0.375	0.475	0.346	0.382	0.388	0.389	0.393	0.394	0.385	9.7
6	0.533	0.509	0.496	0.611	0.530	0.497	0.486	0.479	0.474	0.472	0.509	8.2
7	0.099	0.101	0.101	0.110	0.117	0.116	0.116	0.117	0.116	0.116	0.111	6.8
8	0.158	0.156	0.157	0.208	0.181	0.180	0.180	0.179	0.179	0.178	0.176	8.9
9	0.496	0.492	0.490	0.545	0.474	0.463	0.458	0.454	0.450	0.446	0.477	6.3
10	2.275	2.267	2.270	2.470	2.330	2.051	2.048	2.047	2.045	2.045	2.157	7.1
11	0.319	0.316	0.320	0.360	0.340	0.338	0.347	0.348	0.350	0.351	0.339	4.5
12	0.321	0.324	0.321	0.420	0.361	0.352	0.348	0.344	0.341	0.337	0.347	8.4
13	0.050	0.062	0.063	0.072	0.057	0.057	0.057	0.057	0.057	0.057	0.059	9.8
14	0.059	0.063	0.064	0.084	0.081	0.081	0.082	0.082	0.082	0.082	0.076	12.9
15	1.481	1.475	1.478	1.672	1.604	1.604	1.604	1.605	1.605	1.606	1.573	4.4

**2.7 相似度分析** 将 10 批供试品溶液的色谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(国家药典委员会 2004 A 版)”软件进行数据处理,多点校正后色谱峰自动匹配,选择中位数法,生成榄葱茶的对照指纹图谱 R。计算相似度,10 批样品相似度分别为 0.994, 0.996, 0.996, 0.996, 1.000, 1.000, 1.000, 1.000, 0.999, 均 > 0.99, 数据见表 3, 对照指纹图谱 R 见图 2。



S1 ~ S10. 10 批样品; R. 对照指纹图谱

图 2 10 批样品 HPLC

**2.8 质量控制指标** 参照《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》的相关要求,确定榄葱茶的质量控制具体指标如下:(1)供试品图谱与对照指纹图谱 R 比较,其共有峰的相对保留时间差值不得大于  $\pm 10\%$ ; (2)非共有峰总面积不得大于总峰面积的 10%; (3)供试品图谱中各共有峰面积的比值与指纹图谱各共有峰面积的比值比较,10, 15 号峰的峰面积差值不得大于 20%, 2 号峰的峰面积差值不得大于 25%, 5, 6 号峰的峰面积差值不得大于 30%; (4)供试品图谱与对照指纹图谱经计算机模拟相似度评价软件计算,相似度应  $\geq 0.90$ 。

### 3 讨论

**3.1 供试品溶液制备的考察** 本研究以参照峰没食子酸的峰形及特征峰的数量为指标,比较了不同提取溶剂(乙醇、乙酸乙酯、甲醇)、不同提取方法(超声法、回流法)、不同体积分数的甲醇溶液(100%, 75%, 50%)、溶剂用量(50, 25, 10 mL)及超声时间(30, 45, 60 min)的分离效果。结果显示,采用 75% 甲醇超声提取时,参照峰及其他主要特征峰的数量与峰面积均理想,且分离度较好,而提取时间无明显影响。故采用 75% 甲醇超声 30 min 制备供

试品溶液。

**3.2 检测波长及流速的选择** 本研究将波长分别设为 216, 230, 240, 250, 260, 273, 330 nm, 分别考察了基线平稳程度、色谱峰的数目、峰形及信号响应强弱等因素,最终选择 273 nm 作为测定波长。同时还考察了不同流速(0.8, 1.0, 1.2 mL·min<sup>-1</sup>)及柱温(20, 25, 30 °C)的影响,综合比较峰形和分离度,结果流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 20 °C 时,峰形和分离度均较好。

**3.3 流动相的选择** 分别考察了不同流动相(乙腈-0.1% 磷酸溶液、甲醇-0.1% 磷酸溶液),结果显示,甲醇-0.1% 磷酸溶液分离效果较好,而用乙腈-0.1% 磷酸溶液时峰重叠、峰形较差。

方法学考察结果表明,指纹图谱色谱条件简便,特征峰稳定,重复性好,各项指标均符合《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》的相关要求。该指纹图谱的建立,提高了该制剂的质量标准,有利于成品质量的控制。本研究建立的对照指纹图谱包含了青果和紫苏叶的特征峰,可同时鉴定这两味药材。由于生姜和葱头在处方中仅占 3.7%, 比例较小,且所含成分在紫外波长范围吸收较弱,在不同溶剂、不同波长条件下均不能显示出其特征峰,故在榄葱茶对照指纹图谱中未能显示这两味药材的成分信息,该部分工作内容有待今后进一步的完善和提高。

### [参考文献]

- [1] 中国药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:183, 318, 93.
- [2] 何丽清, 傅延龄. 从经方应用看生姜的作用[J]. 辽宁中医杂志, 2008, 35(10):1558.
- [3] 马春颖, 刘岩, 王海泉. 大葱的食用与药用[J]. 食品研究与开发, 2003, 24(1):70.
- [4] 田吉. 地锦草高效液相色谱指纹图谱研究[D]. 呼和浩特:内蒙古民族大学, 2008.
- [5] 刘舜慧, 吴春敏. 反相高效液相色谱法测定青果颗粒中没食子酸的含量[J]. 海峡药学, 2008, 20(1):30.
- [6] 马红霞, 王岩, 周念, 等. 养精神玉汤乙酸乙酯部位的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药房, 2010, (47):4461.

[责任编辑 顾雪竹]