

岗梅药材的 TLC 鉴别和 HPLC 指纹图谱

郑夏生¹, 袁玉贤², 徐晖¹, 詹若挺¹, 陈蔚文^{1*}, 韩正洲³

(1. 广州中医药大学中药资源科学与工程研究中心, 岭南中药资源教育部重点实验室, 广州 510006;
2. 广州中医药大学 中药学院, 广州 510006; 3. 华润三九医药股份有限公司, 广东 深圳 518029)

[摘要] 目的: 建立岗梅药材的 TLC 鉴别方法和 HPLC 指纹图谱。方法: TLC 鉴别采用 Merck 预制硅胶薄层板, 以三氯甲烷-甲醇-乙酸乙酯-水-甲酸(20:20:40:10:2)为展开剂, 10% 硫酸乙醇 105 °C 显色, 366 nm 紫外光下检视, HPLC 指纹图谱采用 Phenomenex Synergi Fusion C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 4 μm), 柱温 25 °C, 乙腈-0.05% 磷酸梯度洗脱, 流速 1 mL·min⁻¹, 203 nm 波长检测; 采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 A 版”进行相似度计算。结果: 岗梅与同属易混淆品毛冬青、铁冬青、满树星等的 TLC 图有较明显差异, 可相互区别。不同来源的岗梅相似度为 0.716 ~ 0.890, 各混淆品与岗梅共有模式的相似度均 < 0.630。结论: 建立的方法可用于岗梅药材的真伪鉴别, 为完善岗梅药材的质量标准提供了借鉴。

[关键词] 岗梅; 薄层色谱; 鉴别; 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(2013)21-0123-04

[doi] 10.11653/syfy2013210123

TLC Identification and HPLC Fingerprint of *Ilex asprella*

ZHENG Xia-sheng¹, YUAN Yu-xian², XU Hui¹, ZHAN Ruo-ting¹, CHEN Wei-wen^{1*}, HAN Zheng-zhou³

(1. Research Center of Chinese Herbal Resource Science and Engineering, Key Laboratory of Chinese Medicinal Resource from Lingnan, Guangzhou University of Chinese Medicine, Ministry of Education, Guangzhou 510006, China;

2. School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

3. China Resources Sanjiu Medical & Pharmaceutical Co. Ltd., Shenzhen 518029, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a specific TLC method and HPLC fingerprint for the quality evaluation of *Ilex asprella*. **Method:** TLC was performed with silica gel of Merck, using CHCl₃-methanol-EtOAc-water-formic acid (20:20:40:10:2) as the developing solvent system. After sprayed with 10% H₂SO₄ ethanolic solution, the plate was heated at 105 °C and then observed under UV light at 366 nm. HPLC was performed on a Phenomenex Synergi Fusion C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 4 μm) with the column temperature at 25 °C. The mobile phase consisting of 0.05% phosphoric acid and acetonitrile was used in gradient elution, with a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 203 nm. **Result:** *I. asprella* and its adulterants were differentiable for distinctive spots were observed on the TLC spectrum. The similarities of 15 bathes of *I. asprella* were between 0.716-0.890, while that of its adulterants were all below 0.630, calculated with Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM (Version 2004 A). **Conclusion:** Both the TLC method and HPLC fingerprint established in this study were suitable for discrimination among *I. asprella* and its adulterants, providing a reliable reference for qualitative evaluation of the medicinal material *I. asprella*.

[Key words] *Ilex asprella*; TLC; identification; HPLC; fingerprint

[收稿日期] 20130522(018)

[基金项目] 广东省科技计划项目(2012A030100006)

[第一作者] 郑夏生, 博士研究生, 从事创新中药与开发研究, Tel:020-39358171, E-mail: zheng. x. s1987@163.com

[通讯作者] * 陈蔚文, 博士, 教授, 从事创新中药与开发研究, Tel:020-39358268, E-mail: chenww@gzhtcm.edu.cn

岗梅是南方地区常用中药材之一,具有清热、生津、散瘀、解毒之功效,临床上主要用于治疗风热感冒、急慢性咽喉炎^[1]。此外,岗梅还是多种中成药以及王老吉、加多宝等凉茶饮料的主要原料^[2]。随着对岗梅药材需求量的急剧增加,其药材质量问题日益凸显,市场调查结果显示存在根与茎混用、与同属植物相混淆等现象。

岗梅原植物为冬青科 Aquifoliaceae 的 *Ilex asprella* (Hook. et Arn.) Champ. ex Benth., 2005 年和 2010 年版《中国药典》附录规定岗梅以根入药^[3-4],而《广东省中药材标准》(第一册)和《湖南省中药材标准》(2009 年版)^[5-6]规定以根和茎入药,标准的不统一以及标准偏于简单(仅有性状、显微和薄层鉴别),均影响了对岗梅药材的管理。因此,完善岗梅质量标准是非常必要的。本文利用 TLC 和 HPLC 岗梅药材进行质量评价,具有较好的实际意义。

1 材料

共收集 15 批岗梅药材,其中 8 批为市售药材,7 批为自行采摘样品。同属易混淆品种毛冬青 *I. pubescens*、铁冬青(救必应) *I. rotunda* 和满树星 *I. aculeolata* 亦为自行采摘。各样品均经广州中医药大学中药资源科学与工程研究中心詹若挺研究员鉴定。岗梅对照药材购自广东省药检所(批号 121152-201103)。

戴安 Ultimate 3000 型 HPLC 系统(美国赛默飞世尔科技有限公司),TLC-VISUALIZAR(瑞士 CAMAM 公司),10 cm × 20 cm 硅胶 GF₂₅₄ 预制薄层板(德国默克公司),KQ-700DE 型超声仪(江苏昆山市超声仪器有限公司),Milli-Q 型超纯水仪(德国默克公司),色谱纯乙腈(德国默克公司),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

2.1.1 TLC 供试品溶液的制备 样品经 60 °C 干燥过夜,粉碎,过二号筛。取样品粉末 0.5 g,置于具塞锥形瓶中,加 70% 乙醇 50 mL,超声(280 W)提取 30 min,滤过,取 10 mL 滤液于 70 °C 水浴蒸干。残渣加水 20 mL 溶解,用水饱和正丁醇萃取 2 次,每次 25 mL,取正丁醇层,合并正丁醇层。然后用氨水 20 mL 洗涤 1 次,取正丁醇层,于 70 °C 水浴蒸干,残渣用甲醇 1 mL 使溶解,即得。

2.1.2 HPLC 供试品溶液的制备 取样品粉末 1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 乙

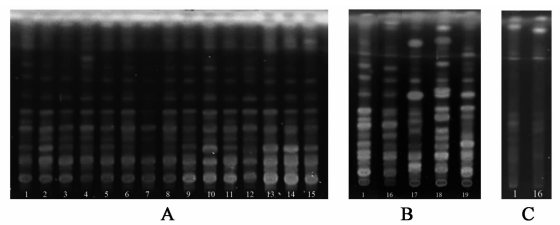
醇 25 mL,称定质量。超声提取 30 min,冷却后称重,用 70% 乙醇补足减失的质量。滤过,取 10 mL 滤液于 70 °C 水浴蒸干。残渣用甲醇溶解并定容至 2 mL,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

2.2 色谱条件

2.2.1 TLC 条件 吸取各供试品溶液 5 μL,点于同一块预制薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-乙酸乙酯-水-甲酸(20:20:40:10:2,4 °C 放置过夜,取下层)为展开剂,展开,展距约 8 cm。取出晾干,喷以 10% 硫酸-乙醇,105 °C 烘烤至斑点显色清晰,于 366 nm 紫外光灯下检视。

2.2.2 HPLC 条件 Phenomenex Synergi Fusion C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,4 μm),流动相乙腈 A-0.05% 磷酸水溶液 B 梯度洗脱,(0 ~ 30 min,5% ~ 30% A;30 ~ 40 min,30% ~ 43% A;40 ~ 50 min,43% ~ 50% A;50 ~ 60 min,50% ~ 85% A;60 ~ 70 min,85% ~ 95% A;70 ~ 80 min,95% A),流速 1 mL·min⁻¹,进样量 10 μL,检测波长 203 nm。

2.3 岗梅及其同属混淆品的 TLC 鉴别 吸取岗梅及其混淆品的供试品溶液各 5 μL,按 2.2.1 项下色谱条件进行层析,TLC 图谱见图 1。该色谱条件下得到的斑点信息丰富,且分离效果较理想。从色谱行为判断,岗梅根与茎较相似,但斑点亮度有差异,显色前茎在 Rf 0.74 和 Rf 0.96 处及溶剂前沿均有明显的红色斑点,而根没有相应的斑点,可作为茎的特征斑点(图 1C);其他同属易混淆品与岗梅差别较大,主要表现在色谱图的中上部,毛冬青在 Rf 0.37 和 Rf 0.89 处分别有浅红色和亮蓝色斑点,救必应在 Rf 0.26 和 Rf 0.35 处分别有暗红色和蓝色斑点,而在岗梅图谱相应的位置上没有相同颜色的斑点。满树星与岗梅相比,在 Rf 0.33 和 Rf 0.65 没有明显的黄绿色斑点。提示该 TLC 体系可用于岗梅与同属易混淆品种的鉴别。



A. 15 批岗梅药材;B. 岗梅及其混伪品;C. 岗梅根与茎(显色前)

图 1 岗梅及其同属混淆品的 TLC 图(紫外 366 nm)

2.4 岗梅的 HPLC 指纹图谱

2.4.1 参照峰的确立 取 15 批岗梅样品,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.2 项下色

谱条件进样分析,记录色谱图(见图 2),选择分离度较好、峰形稳定的 10 个峰为共有峰,其中 3 号峰为

主峰。以 3 号峰为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。

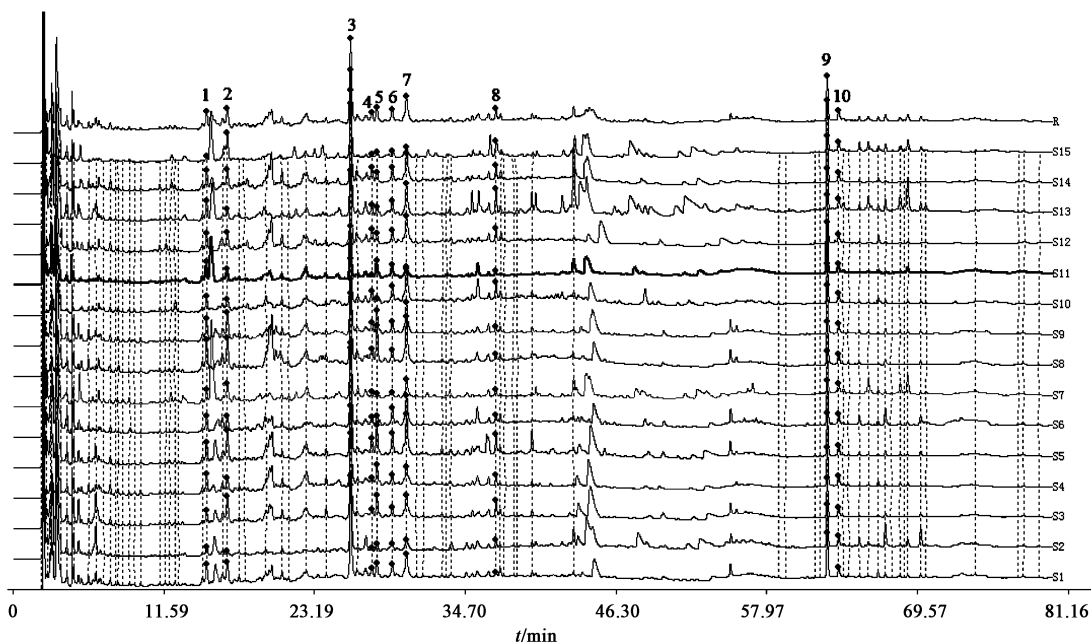


图 2 15 批岗梅的 HPLC 指纹图谱和对照图谱(R)

2.4.2 方法学考察

2.4.2.1 精密性 取同一供试品(第 10 批)溶液,按 2.2.2 项下色谱条件连续进样 6 次,各共有峰的相对峰面积的 RSD 在 0.25% ~ 1.9%,相对保留时间的 RSD 0.015% ~ 0.15%,表明仪器精密性良好。

2.4.2.2 重复性 平行取同一批号样品(第 12 批)6 份,按 2.1.2 项下方法制备,按 2.2.2 项下色谱条件进样分析,各共有峰的相对峰面积的 RSD 1.2% ~ 2.8%,相对保留时间的 RSD 0.017% ~ 0.15%,表明方法重复性良好。

2.4.2.3 稳定性 取同一供试品(第 2 批)溶液,按 2.2.2 项下色谱条件分别于 0,6,12,24,36,48 h 进样分析,各共有峰的相对峰面积的 RSD 1.7% ~ 3.0%,相对保留时间的 RSD 0.004 0% ~ 0.11%,表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.4.3 岗梅 HPLC 对照指纹图谱的建立 利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 2004 A 版”对 15 批岗梅样品的 HPLC 色谱数据进行分析,经多点校正后,生成对照指纹图谱,并以其为模板计算各样品的相似度(见图 3,表 1)。

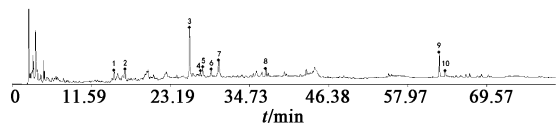


图 3 岗梅对照指纹图谱

15 批岗梅样品的相似度为 0.716 ~ 0.890,色谱行为基本一致。可见各样品不论是市售药材还是自行采摘样品,其化学成分无明显差异。

表 1 各批次岗梅样品与对照指纹图谱的相似度

No.	样品	采集地点	相似度
1	岗梅对照药材	药检所	0.847
2	市售岗梅	广东韶关	0.729
3	市售岗梅	广东清远	0.869
4	市售岗梅	广东电白	0.786
5	市售岗梅	广东	0.890
6	市售岗梅	广东	0.845
7	市售岗梅	福建	0.716
8	市售岗梅	四川成都	0.774
9	岗梅根	广东梅州	0.767
10	岗梅根	广东梅州	0.747
11	岗梅根	广东从化	0.851
12	岗梅根	广东从化	0.758
13	岗梅根	广东揭阳	0.791
14	岗梅根	广东梅州	0.760
15	岗梅根	广东广州	0.749
16	岗梅茎	广东从化	0.518
17	铁冬青茎皮	广东从化	0.394
18	毛冬青根	广东清远	0.630
19	满树星根	广东梅州	0.486

2.4.4 岗梅及其混淆品的 HPLC 指纹图谱鉴别 分别取各混淆品,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.2 项下色谱条件进样分析,获得色谱图。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 B 版”软件将各混淆品的图谱与 15 批岗梅样品的对照图谱进行比较,计算相似度,结果见表 1、图 4。各混伪品与岗梅对照图谱的相似度为 0.394~0.630,均低于岗梅样品间的相似度,可与岗梅相区别。

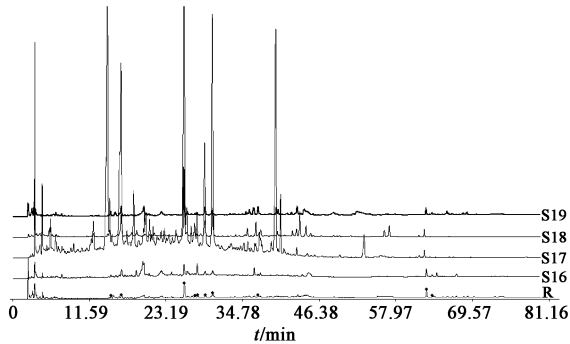


图 4 岗梅及其混伪品的 HPLC 图谱 (R 为对照图谱)

3 讨论

岗梅原植物与同属的多个物种,如毛冬青、铁冬青、满树星等,在形态上较为相似,容易相互混淆,有可能导致错误采收,加工成药材或饮片后直观鉴别更加困难^[7]。前人曾就岗梅及其同属植物鼠李叶冬青 *I. aculeolata* Nakai 的形态组织学与高效液相色谱法鉴别进行了报道^[8]。本实验则比较了岗梅与毛冬青、铁冬青、满树星的不同,所建立的 TLC 鉴别法和 HPLC 指纹图谱法均能有效地将它们区别开。TLC 法结果直观明了,无特殊的仪器要求,但样品前处理较繁琐,而 HPLC 法操作较简单,能够提供更丰富的样品化学组成的信息,可通过软件计算出精确的相似度,但需要专门的仪器。因此,在实际应用中,可根据需要选择合适的方法来鉴别。

色谱指纹图谱能较为全面地反映中药所包含的化学信息,在单味药材和复方制剂的质量控制方面有明显的优势和实用性。有学者建立了岗梅药材水

提液的 HPLC 指纹图谱^[9],但以水为溶媒作回流提取增加了淀粉等水溶性杂质的溶出,加大滤过难度,不利于实验操作;且易引起三萜皂苷的水解,影响实验结果的重复性。本实验考察了提取溶剂(0%, 30%, 50%, 70%, 90% 乙醇)和提取方式(超声提取和回流提取),发现以 70% 乙醇超声提取效果最佳。流动相考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-磷酸水溶液(0.05%, 0.1%, 0.2%),结果表明乙腈-磷酸水溶液分离效果较好,结合色谱柱的 pH 适用范围,选择了乙腈-0.05% 磷酸水溶液(梯度洗脱)。另外,全波长扫描(190~400 nm)结果提示供试品溶液在较高波长(300 nm 以上)基线较平直,但响应值偏低,且色谱峰信息较少,综合考虑后采用 203 nm 作为检识波长。

【参考文献】

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第 5 册[S]. 上海:上海科学技术出版社,1999:145.
- [2] 陈蔚文,徐鸿华. 岭南道地药材研究[M]. 广州:广东科技出版社,2007:291.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:化学工业出版社,2005:附录 23.
- [4] 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:附录 24.
- [5] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药材标准. 第 1 册[M]. 广州:广东科技出版社,2004:111.
- [6] 湖南省食品药品监督管理局. 湖南省中药材标准[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,2010:84.
- [7] 童家赟,黄琼林,马新业,等. 基于 ITS2 序列的秤星树等冬青属 8 种药用植物的分子鉴别[J]. 安徽农业科学,2012(5):2684.
- [8] 罗集鹏,毕培曦. 岗梅的形态组织学与高效液相色谱法鉴别[J]. 药物分析杂志,1995(3):3.
- [9] 卢进,任斌,陈孝. 广东岗梅药材的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 热带医学杂志,2011,11(5):550.

[责任编辑 顾雪竹]