

阳春砂仁 HPLC 指纹图谱的研究

黄月纯, 魏 刚

(广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405)

摘要:目的 建立阳春砂仁 HPLC 指纹图谱分析方法, 初步拟定广东省阳春产阳春砂仁甲醇提取物指纹特征图谱指标成分群, 为阳春砂仁药材内在质量评价积累数据。**方法** 采用 Nucleodur C₁₈ Gravity 色谱柱; 流动相为甲醇-2% 乙酸 (梯度洗脱); 检测波长为 260 nm; 柱温为 30 ℃; 体积流量 1.0 mL/min。**结果** 共标示出 20 个共有峰, 18 批阳春砂仁指纹图谱相似度较高。**结论** 方法准确可靠, 重现性好, 为阳春砂仁质量控制提供了参考。

关键词: 阳春砂仁; 指纹图谱; HPLC

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)08-1251-03

Methodology for HPLC fingerprint analysis on fruits of *Amomum villosum*

HUANG Yue-chun, WEI Gang

(The first Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Abstract: Objective To establish the method of fingerprint analysis on the fruits of *Amomum villosum* by HPLC and work out the characteristic fingerprint of methanol extracts in the fruits of *A. villosum* from Yangchun, Guangdong Province as index component which could be used for the accumulation of data to evaluate the inner quality of the fruits of *A. villosum*. **Methods** HPLC with Nucleodur C₁₈ Gravity column was used, the methanol-2% acetic acid (gradient elution) as a mobile phase, detection wavelength at 260 nm, column temperature was 30 ℃, and flow rate was 1.0 mL/min. **Results** Common peaks (20) were separated on HPLC fingerprint in *A. villosum*. The similarities of 18 batches of samples were higher. **Conclusion** The method is reliable and accurate, has a better reproducibility, and provides a reference for the quality control to the fruits of *A. villosum*.

Key words: the fruits of *Amomum villosum* Lour.; fingerprint; HPLC

砂仁为姜科植物阳春砂 *Amomum villosum* Lour.、绿壳砂 *Amomum villosum* Lour. var. *xanthioides* T. L. Wu et Senjen 或海南砂 *Amomum longiligulare* T. L. Wu 的干燥成熟果实, 具有化湿开胃、温脾止泻、理气安胎之功效, 既是药品, 亦作为食品使用。阳春砂主产于广东, 以广东省阳春市所产的阳春砂仁最著名, 素有道地药材之称。以往阳春砂仁质量研究重点集中在挥发油部位, 较少对水溶性成分进行研究。据报道阳春砂仁挥发油主要由醋酸龙脑脂、樟脑、冰片组成^[1], 孙氏等^[2]从阳春砂仁水溶性成分中分得槲皮苷和异槲皮苷等黄酮类有效成分。本文采用 HPLC 法拟建立广东省阳春市产的阳春砂仁甲醇提取物的特征指纹图谱, 为阳春砂仁药材的质量控制提供依据。

1 仪器与试药

高效液相色谱仪 (Agilent HP 1100), 光二极管

阵列检测器; 甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯; 18 批阳春砂仁产于广东省阳春市, 分别购于广东省阳春市药材公司、广东省药材公司等, 见表 1, 经笔者鉴定均系阳春砂 *Amomum villosum* Lour.; 槲皮苷对照品由中国药品生物制品检定所提供。

表 1 阳春砂仁药材来源

Table 1 Sources of fruits of *A. villosum*

编号	来源	编号	来源
1	广东省阳春市药材经营部	10	广东省阳春市粤西绿色工业有限公司
2	广东省阳春市合水镇药材店	11	广州市采芝林药店
3	广东省阳春市春城土特产经销部	12	广州清平药材市场
4	广东省阳春市药材经营部	13	广东省药材公司中药饮片厂
5	广东省阳春市药材经营部	14	广东省杏林药业公司
6	广东省阳春市药材经营部	15	广东致信药业中药饮片厂
7	广东省阳春市药材经营部	16	广东康美中药饮片厂
8	广东省阳春市阳明食品店	17	广东致信药业中药饮片厂
9	广东省阳春市粤西绿色工业有限公司	18	广东省杏林药业公司

收稿日期: 2006-11-10

基金项目: 广东省科技计划项目 (2005B33001038)

作者简介: 黄月纯 (1968-), 女, 硕士, 广东人, 副主任中药师, 硕士研究生导师, 主要从事中药质量标准及指纹图谱研究。

Tel: (020) 36591724 E-mail: huangyuechun@163.com

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱为 Nucleodur C₁₈ Gravity (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇 (A)-2%乙酸溶液 (B),梯度洗脱:0~5 min 甲醇为 5%,5~30 min 甲醇由 5% 升为 30%,30~40 min,甲醇由 30% 升为 50%,40~60 min 甲醇由 50% 升为 100%,60~67 min 甲醇为 100%,67~70 min 甲醇为 100% 降为 5%;检测波长为 260 nm;柱温为 30 ℃;体积流量为 1.0 mL/min;分析时间为 70 min;进样量为 10 μL。

2.2 供试品溶液的制备:精密称取砂仁粉末约 1 g,加甲醇 20 mL,超声处理 3 次,每次 40 min,滤过,合并滤液,蒸干,残渣加甲醇微热使溶解并定容至 5 mL。

2.3 方法学考察

2.3.1 色谱图:取供试品溶液 10 μL,进样分析,当甲醇比例达到 100% (60 min) 后,保留 30 min,结果

65 min 以后没有出峰,提示 65 min 内成分出峰完全。

2.3.2 精密度试验:取供试品溶液 10 μL,连续进样 5 次。20 个共有峰相对保留时间的 RSD<2%,相对峰面积的 RSD<3%,提示精密度良好。

2.3.3 稳定性试验:取供试品溶液 10 μL,分别在 0、3、6、12、18、24 h 进样 6 次。20 个共有峰相对保留时间的 RSD<2%,相对峰面积的 RSD<3%,提示 24 h 内供试品溶液稳定性较好。

2.3.4 重现性试验:取同一批次砂仁粉末 5 份,分别制备供试品溶液,进样分析。结果表明:20 个共有峰相对保留时间的 RSD<2%,相对峰面积的 RSD<3%,提示重现性良好。

2.4 样品检测:取供试品溶液 10 μL,依法进样分析,结果 18 批样品共标出 20 个共有峰,见表 2,经槲皮苷对照品对照,峰 13 为槲皮苷峰,17 号样品的 HPLC 指纹图谱见图 1。

2.5 指纹图谱的建立与分析

表 2 阳春砂仁药材 HPLC 指纹图谱分析结果

Table 2 Results of HPLC fingerprint of fruits of *A. villosum*

样品号	共有峰峰面积质量分数/%																				共有峰
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13	峰 14	峰 15	峰 16	峰 17	峰 18	峰 19	峰 20	
1	29.838	2.319	2.877	6.213	2.635	3.676	0.557	10.573	0.691	21.732	0.555	1.181	3.343	0.411	1.645	0.942	2.257	1.203	1.129	2.126	95.903
2	20.188	5.224	2.037	2.846	1.540	4.031	2.179	10.116	1.339	22.160	2.346	1.452	3.779	0.618	1.401	0.792	4.928	1.462	1.442	1.891	91.771
3	15.930	2.878	1.556	8.409	3.104	7.155	0.997	3.307	1.029	19.854	2.284	2.174	6.851	1.393	1.928	1.239	3.737	2.160	1.820	1.381	89.186
4	13.864	2.140	3.264	8.192	2.413	4.206	0.934	3.255	2.637	20.975	5.550	2.388	6.363	1.567	1.573	0.980	3.282	2.266	1.645	0.928	88.423
5	15.123	1.371	3.010	3.543	2.362	4.551	0.537	10.179	1.025	20.050	1.556	1.472	6.359	1.006	5.056	1.746	5.009	2.868	1.611	1.530	89.963
6	18.460	2.473	2.814	9.458	1.820	2.500	0.983	5.352	1.528	24.189	1.536	2.101	4.548	0.917	1.580	0.926	3.172	2.129	1.742	1.592	89.819
7	15.987	2.490	2.768	6.786	1.801	6.199	0.991	9.524	1.269	24.223	2.265	1.806	4.789	0.908	1.195	0.541	2.965	2.024	1.360	1.273	91.163
8	15.549	2.180	2.593	8.185	1.409	4.919	0.989	4.623	1.196	28.818	2.573	2.203	5.790	0.990	2.126	0.887	4.259	2.142	2.012	2.567	96.008
9	15.208	2.338	2.027	5.120	0.591	3.579	1.695	2.809	1.125	33.435	4.499	0.946	2.358	0.523	1.040	0.561	2.696	1.501	1.151	1.996	85.199

样品号	共有峰峰面积质量分数/%																				共有峰
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13	峰 14	峰 15	峰 16	峰 17	峰 18	峰 19	峰 20	
10	8.831	2.307	2.460	6.674	1.304	4.593	0.978	8.084	1.672	25.481	1.878	1.961	5.008	0.892	3.867	1.592	4.145	3.094	1.618	1.482	87.921
11	14.723	3.116	2.994	5.982	1.185	1.458	2.178	16.311	1.273	19.800	4.357	2.319	3.651	0.677	0.438	0.363	1.867	1.170	1.134	0.995	85.992
12	18.751	2.696	2.377	10.246	1.608	2.666	1.321	8.064	1.140	19.058	1.425	1.402	4.375	0.672	1.747	0.966	2.671	2.789	1.399	0.989	86.361
13	8.031	4.522	1.639	4.162	0.899	3.758	1.693	13.185	1.374	21.712	3.886	1.556	3.907	0.754	2.544	1.494	3.549	1.639	3.638	1.431	85.371
14	18.269	3.945	2.108	5.010	1.196	4.159	2.117	10.149	1.340	27.475	3.092	1.342	4.173	0.744	0.728	0.809	2.683	1.291	1.520	1.703	93.852
15	15.960	4.421	2.757	5.405	0.802	3.627	2.014	11.283	1.264	27.686	3.015	1.133	3.768	0.898	0.744	0.343	2.845	1.439	1.353	1.448	92.205
16	14.201	2.249	1.367	5.469	1.118	4.604	2.534	13.888	0.893	34.231	0.573	0.967	3.720	0.688	1.437	0.824	2.584	1.545	1.473	1.454	95.828
17	17.332	2.441	2.584	6.003	1.332	4.613	1.875	11.367	1.101	27.265	1.104	1.089	3.846	0.856	2.111	0.854	3.338	1.788	1.087	1.203	93.189
18	12.445	3.729	3.397	5.730	1.675	4.410	0.819	8.778	1.371	24.125	3.089	1.247	4.209	0.730	4.924	1.602	3.922	2.487	2.441	1.114	92.244

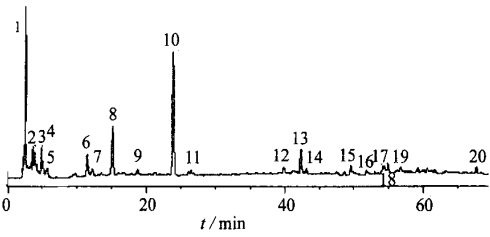


图 1 阳春砂仁药材的 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC Fingerprint of fruits of *A. villosum*

2.5.1 共有峰的确定:根据以上 18 批次结果表明,阳春砂仁甲醇提取物的 HPLC 色谱主要有 20 个共有峰,总共有峰峰面积平均值为 (90.58±3.59)%,可初步拟订为阳春砂仁甲醇提取物指标成分群。

2.5.2 指纹峰直观观察:将整个指纹图谱分为 4 区,即 I~IV 区。I 区(保留时间为 2.4~5.8 min):峰 1~5,Ⅱ区(保留时间为 11.0~27.0 min):峰 6~11,Ⅲ区(保留时间为 39.0~43.0 min):峰 12~14,

Ⅳ 区(保留时间约为 49.2~67.7 min):峰 15~20, 构成 5+6+3+6 的图谱结构,主要共有峰集中在 I、Ⅱ 区。I 区为一组排列较紧密的强吸收峰群,1 号峰最强,峰值比例大约为峰 1>峰 4>峰 2≈峰 3≈峰 5。Ⅱ 区为一组排列较疏,分离较佳的强吸收峰群,峰 10 最为突出,为共有峰的第一大峰,峰 10、8、6 相对比值较稳定,峰值比例大约为峰 10>峰 8>峰 6>峰 11≈峰 7≈峰 9。Ⅲ 区为一组峰值比例较稳定的 3 峰群,经对照品对照峰 13 为槲皮苷峰,峰值比例大约为峰 13>峰 12>峰 14。Ⅳ 区为一组分离度较差的弱峰群。

2.5.3 指纹峰相似度分析:采用国家药典委员会中药指纹图谱相似度软件 2004A 计算均值相似度,结果见表 3。表明不同批次的阳春砂仁相似度较高。

表 3 阳春砂仁药材指纹图谱相似度结果

Table 3 Similarity of HPLC fingerprint of fruits of *A. villosum*

编号	相似度	编号	相似度
1	0.937	10	0.947
2	0.977	11	0.954
3	0.950	12	0.967
4	0.960	13	0.943
5	0.962	14	0.994
6	0.979	15	0.993
7	0.994	16	0.975
8	0.980	17	0.995
9	0.945	18	0.986

3 讨论

试验用甲醇-水,甲醇-2%醋酸,甲醇-0.05% 磷酸的梯度洗脱作为流动相,结果甲醇-2%醋酸系统分离效果较好。用不同的检测波长检测及用光二极管阵列检测器分析,在 260 nm 波长处指纹峰较多,响应值均较大,而且基线较平稳,故选择 260 nm 作为指纹图谱检测波长。

供试品溶液的制备采用不同含水量的甲醇溶液

作为提取溶剂,结果含一定量水的甲醇液对极性较大的组分提取效果较好,但供试品溶液杂质较多,较黏稠,不利于浓缩。经试验用甲醇提取杂质较少,提取 3 次,可基本提取完全,提取的药液可浓缩后进一步,某些相对质量分数较小的组分能在指纹图谱中显示出来,体现阳春砂仁的总体指纹特征面貌。通过比较回流提取及超声处理方法,超声处理方法简便,提取效果较好。通过比较样品直接用甲醇提取及先用石油醚(60~90℃)去脂后再用甲醇提取的方法,结果石油醚(60~90℃)去脂对指纹峰基本无影响,为操作方便,采用样品直接用甲醇提取的方法。

本试验测定了 18 批阳春砂仁的甲醇提取物,共有 20 个主要特征峰,总共有峰峰面积平均值为(90.58±3.59)%,各批样品间主要共有峰的相对保留时间较稳定,峰值比例较稳定,以 20 个共有峰作为指标,精密度、稳定性、重现性试验良好,因此可初步拟订为阳春砂仁的甲醇提取物成分指标成分群。相似度分析结果表明,广东省阳春市产的 18 批阳春砂仁 HPLC 指纹图谱相似度较高,达到 0.943~0.995,表明阳春砂仁甲醇提取物的 HPLC 图谱,具有指纹图谱的特征意义,为阳春砂仁药材的质量亦积累了一些的数据,具有一定的参考意义。

本研究初步建立了阳春砂仁 HPLC 指纹图谱研究方法,对不同品种的砂仁(阳春砂、绿壳砂、海南砂)、不同产地及不同采收时期砂仁 HPLC 指纹图谱特征性的区别,还有待于进一步的深入研究。

References:

- [1] Yu J G, Sun L, Zhou L D, et al. Studies on the chemical constituents of *Fructus Amomi* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1997, 22(4): 231-232.
- [2] Sun L, Yu J G, Zhou L D, et al. Two flavone glycosides from Chinese traditional medicine *Amomum villosum* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2002, 27(1): 36-38.

HPLC 法测定鱼腥草不同生长季节、不同药用部位中黄酮类成分

黄琴伟¹, 张文婷², 赵维良^{2*}

(1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江省药品检验所, 浙江 杭州 310004)

摘要:目的 以芦丁、金丝桃苷、槲皮苷为指标成分,建立了 RP-HPLC 法对鱼腥草中黄酮类成分进行定量测定,并考察鱼腥草不同生长季节、不同药用部位黄酮类成分的量。方法 利用高效液相色谱法梯度洗脱。色谱条件:

收稿日期:2006-12-21

作者简介:黄琴伟(1983—),女,浙江省温州市人,浙江中医药大学药理学硕士。Tel: (0571) 86459414 E-mail: qingwei-h@163.com

* 通讯作者 赵维良