

# 不同产地红豆蔻 HPLC 指纹图谱研究

李明芳<sup>1</sup>, 黄燕琼<sup>2</sup>, 谭喜梅<sup>1</sup>, 秦华珍<sup>1</sup>, 谢 鹏<sup>1</sup>, 龙小琴<sup>1</sup>

(1. 广西中医药大学 药学院, 广西 南宁 530200; 2. 广西中医药大学 附属瑞康医院, 广西 南宁 530011)

**摘 要:**以 10 个不同产地的红豆蔻为试材, 采用 HPLC 法及国家药典委员会相似度评价软件, 研究了不同产地红豆蔻对其化学成分的影响, 以期建立不同产地红豆蔻的 HPLC 指纹图谱, 比较其化学成分的差异, 为红豆蔻的质量控制提供有效的方法。结果表明: 10 个产地红豆蔻中确立了 9 个共有峰, 不同产地的红豆蔻指纹图谱的相似度均大于 0.90, 并且从获得的分离度良好的共有峰可以看出它们化学成分分布稳定, 质量相似性较好, 但是成分的比例存在差异。同时, 该方法可用于红豆蔻药材的质量控制和评价。

**关键词:**红豆蔻; 产地; HPLC; 指纹图谱; 化学成分

**中图分类号:**S 567.1<sup>+</sup>3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)07-0121-06

红豆蔻初载于唐《药性本草》, 据 2015 版中国药典记载, 红豆蔻为姜科(Roxb)山姜属植物大高良姜(*Alpinia galangal* (L.) Wild.) 的干燥成熟果实<sup>[1]</sup>。红豆蔻味辛、性温, 归脾、肺经, 具有燥湿、温胃散寒、醒脾消食的功效, 可用于治疗脘腹冷痛, 食积胀满, 呕吐泄泻, 饮酒过多<sup>[2]</sup>。在我国, 红豆蔻主要分布于广东、广西, 部分产于云南、台湾<sup>[3-4]</sup>。由于产地影响着药材的质量, 不同产地的药材所含的化学成分及含量存在一定差异, 从而会造成药材品质的不稳定, 可能会给中药的临床疗效带来影响。课题组以红豆蔻为研究对象, 建立 HPLC 指纹图谱, 对不同产地红豆蔻的质量进行比较研究, 以期为确保其临床用药的疗效和药材质量的稳定提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试药材红豆蔻购于南宁生源中药饮片有限责任公司, 产地分别是广西南宁(S1)、武鸣(S2)、上思

(S3)、梧州(S4)、北海(S5)、龙州(S6)、融安(S7)、桂林(S8)、玉林(S9)、云南(S10)等 10 个不同产地, S1→S10 批号分别为: 130621、130606、130805、130910、130616、140918、140702、140706、130906、140720, 均经广西中医药大学中药鉴定学教研室田慧教授鉴定为《中国药典》2015 版收载的品种。

**仪器:**安捷伦 Agilent 1260 型高效液相色谱仪(DAD 检测器、四元泵、在线脱气装置、自动进样器), Chem. Station 工作站(Agilent 科技有限公司); BP211D 万分之一电子天平(德国赛多利斯生产); HH-4 数显恒温水浴锅(国华电器有限公司); SB25-12D 型超声清洗仪(宁波新芝生物科技公司)。

**试剂:**乙腈、甲醇为色谱纯(赛默飞世尔科技有限公司); 磷酸为优级纯; 水为超纯水(Milli-Q Synthesis 超纯水系统), 电阻率 $\geq 18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ , TOC $< 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 乙醇为分析纯。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 供试液的制备** 精密称取药材粉末 10 g, 加入 8 倍量 95%乙醇, 加热回流提取 2 h, 过滤, 滤渣再加入 5 倍量 95%乙醇提取 1.5 h, 过滤, 合并 2 次提取液, 减压浓缩, 水浴挥干。精密称定 10 mg 干膏, 用甲醇超声溶解定容至 10 mL 的容量瓶中, 摇匀, 并用 0.22  $\mu\text{m}$  的一次性针筒过滤器过滤, 即得。

**1.2.2 HPLC 色谱条件** 色谱柱: phenomenex-C18 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相: 乙腈(B)-0.1%磷酸水溶液(A), 梯度洗脱(0 $\rightarrow$ 10 $\rightarrow$ 25 $\rightarrow$ 30 $\rightarrow$ 40 $\rightarrow$ 50 $\rightarrow$ 60 min, A 的体积百分数为: 80% $\rightarrow$ 60% $\rightarrow$ 55% $\rightarrow$

**第一作者简介:**李明芳(1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药活性成分与药性及效用。E-mail: 864110883@qq.com.

**责任作者:**秦华珍(1964-), 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 现主要从事中药药性与物质基础与效用研究等工作。E-mail: 937824429@qq.com.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(81360646); 广西教育厅高校科研资助项目(LX2014163); 硕士研究生科研创新资助项目(YJS2016010)。

**收稿日期:**2016-12-20

40%→30%→20%→0%);流速  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ;柱温  $30^\circ\text{C}$ ;进样量  $10 \mu\text{L}$ 。

1.2.3 方法学考察 精密度试验<sup>[6]</sup>:取同一个供试品溶液,按 1.2.2 项下色谱条件,连续进样 6 次,进样量  $10 \mu\text{L}$ ,记录 HPLC 色谱图,计算各色谱峰相对保留时间的 RSD 值和相对峰面积的 RSD 值。稳定性试验<sup>[6]</sup>:取新制备的供试品溶液,分别考察 0、2、4、6、12、24 h 内的稳定性,计算各色谱峰相对保留时间的 RSD 值和相对峰面积的 RSD 值。重复性试验<sup>[7]</sup>:取同一批号的样品 6 份,按照 1.2.1 项下方法制备并检测,各取供试品溶液  $10 \mu\text{L}$ ,按上述色谱条件进样分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 精密度试验结果

各色谱峰相对保留时间的 RSD 值为  $0.01\% \sim 0.09\%$ ,相对峰面积的 RSD 值为  $0.46\% \sim 2.96\%$ ,表明仪器的精密度良好。

### 2.2 稳定性试验结果

24 h 内同一份供试品溶液中各色谱峰相对保留时间的 RSD 值为  $0.028\% \sim 0.150\%$ ,相对峰面积的 RSD 值为  $0.24\% \sim 2.62\%$ ,表明样品溶液在 24 h 内

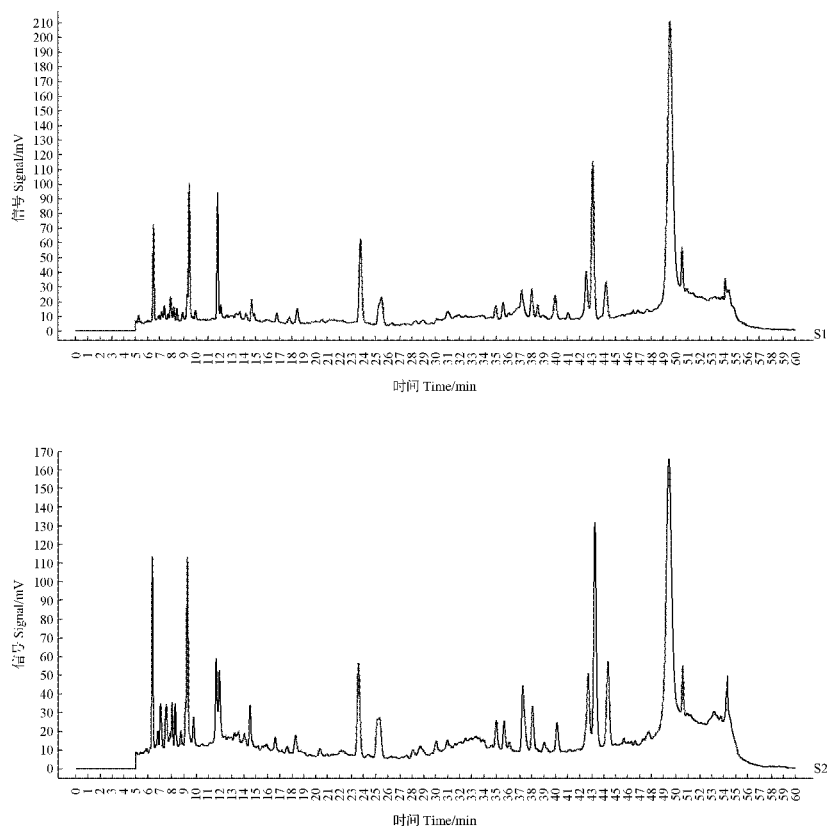
具有良好的稳定性。

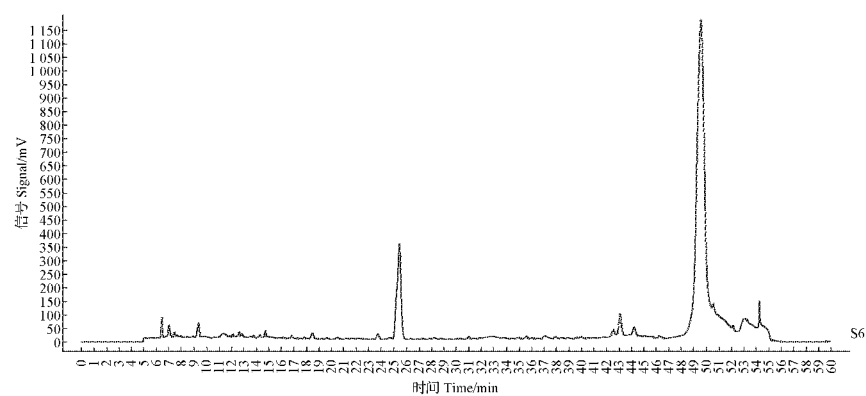
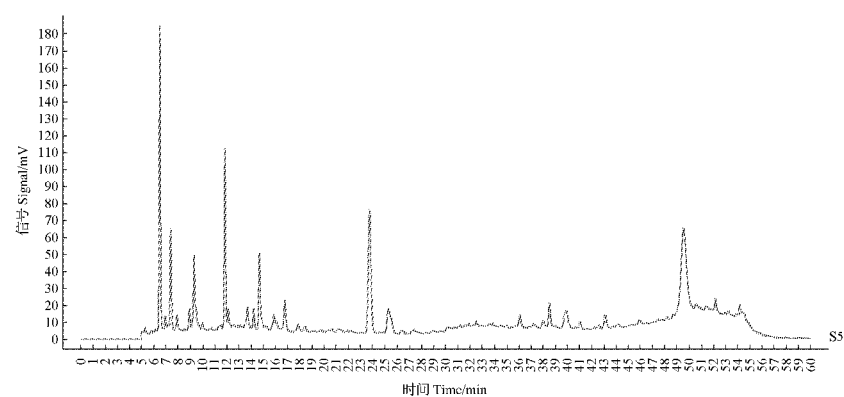
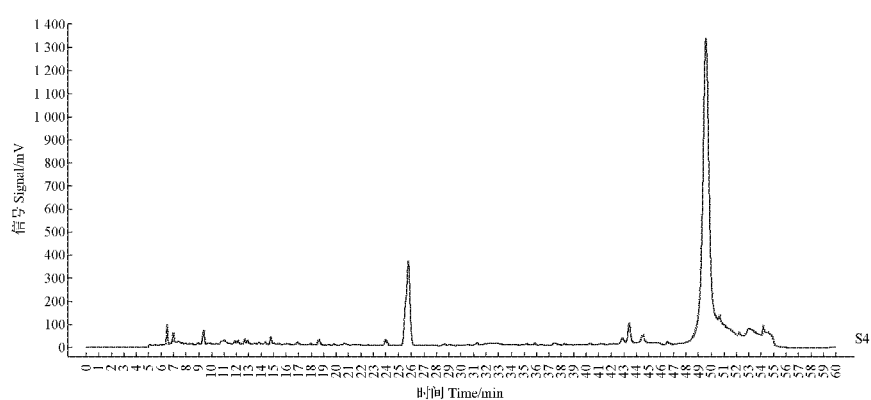
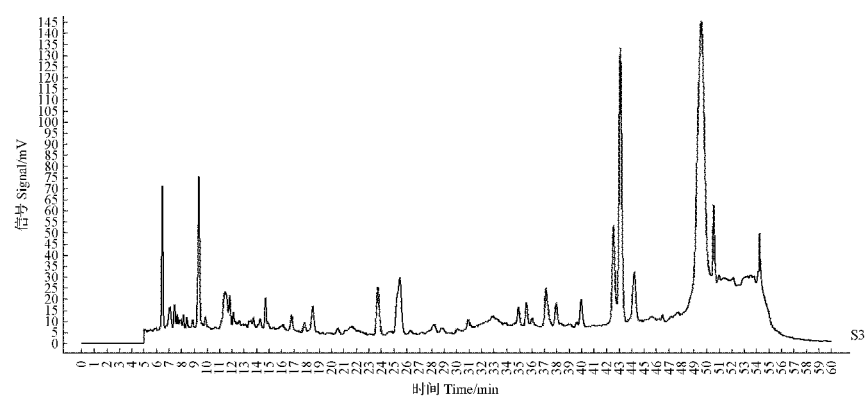
### 2.3 重复性试验结果

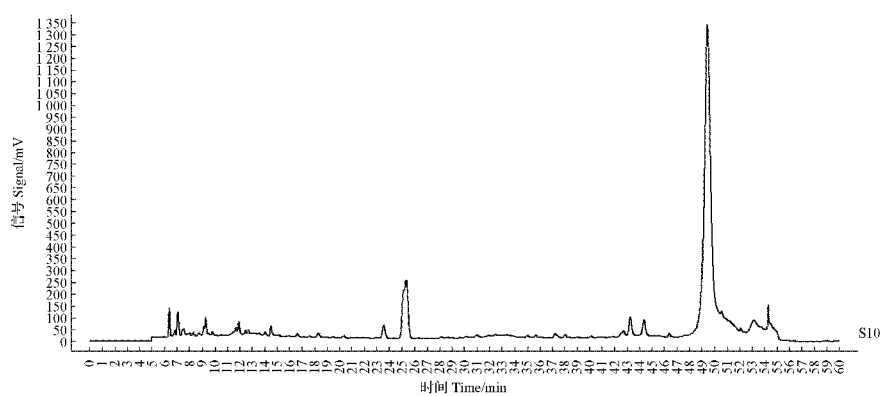
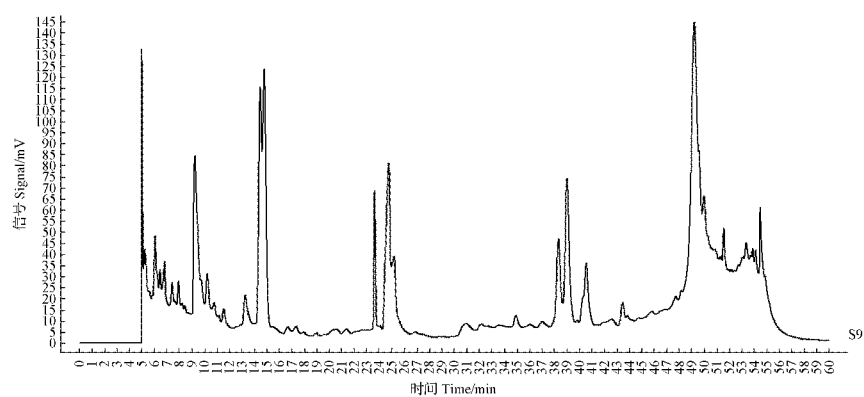
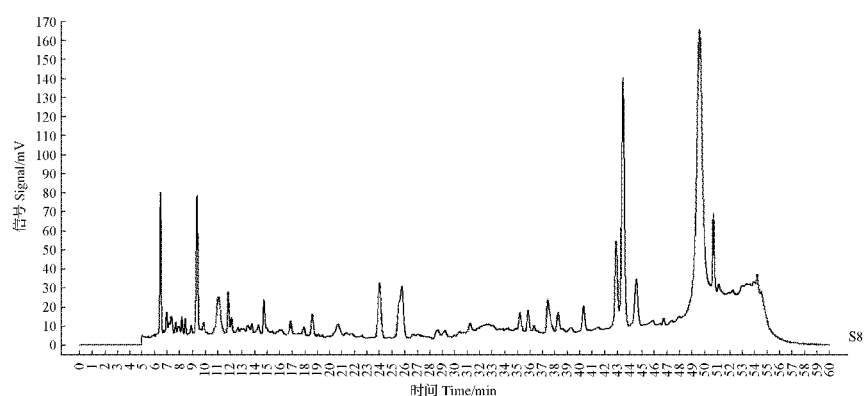
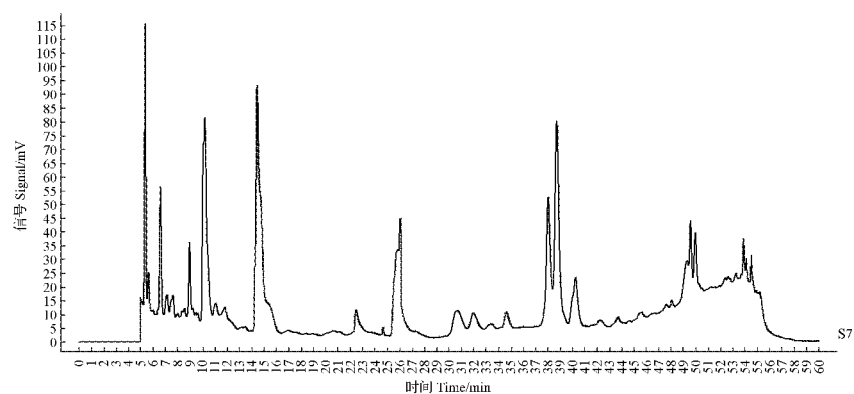
6 份样品中各色谱峰相对保留时间的 RSD 值为  $0.055\% \sim 0.390\%$ ,相对峰面积的 RSD 值为  $0.07\% \sim 1.67\%$ ,表明方法的重现性良好。

### 2.4 HPLC 指纹图谱分析

根据 1.2.2 项下色谱条件依次进样分析,得到 10 个不同产地红豆蔻的 HPLC 指纹图谱(图 1)。采用国家药典委员会相似度评价软件进行相似度计算,根据以上供试品的检测结果及其相关参数,选择相似度评价软件中生成的共有指纹图谱作为对照指纹图谱(图 2)。从图 1 可以看出,10 个不同产地的红豆蔻的化学成分相对稳定,且部分含量较高;与图 2 的对照指纹图谱比较得出它们含有 9 个共有峰,由此说明不同产地红豆蔻的化学成分相似度较高,但还是存在差异的。根据以上供试品的检测结果,标定 9 个共有峰,以 5 号峰为内参照峰,并以 S5 药材相对应的色谱峰的峰面积为 1,根据参照峰的保留时间和峰面积计算各峰的相对保留时间(表 1)和相对峰面积值(表 2)。







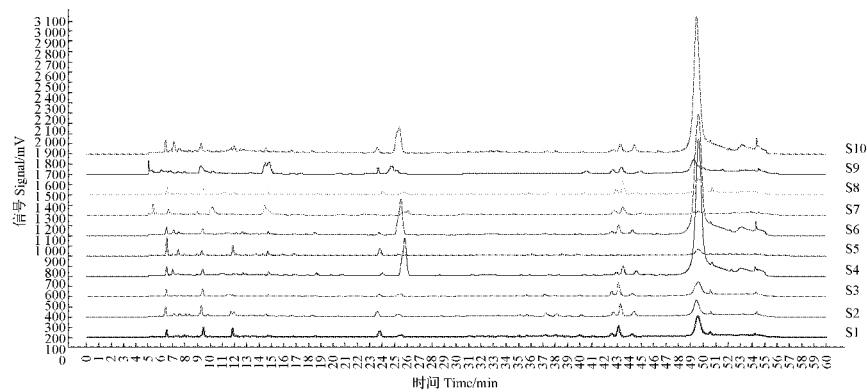


图 1 不同产地红豆蔻 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of *Alpinia galanga* Will. from different habitats

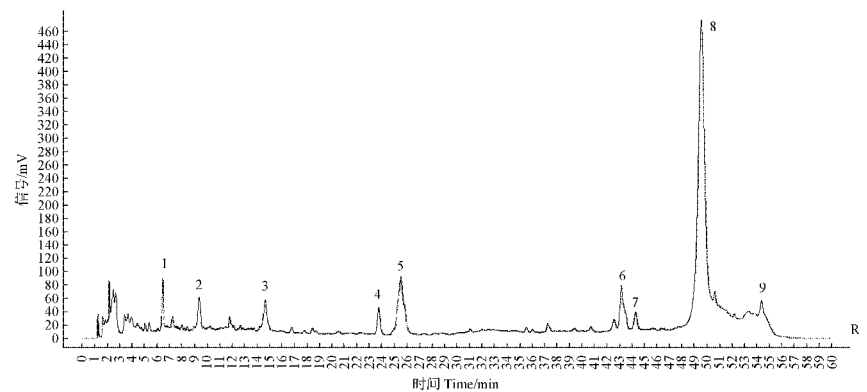


图 2 红豆蔻药材对照指纹图谱

Fig. 2 Compared fingerprints of *Alpinia galanga* Will. traditional Chinese medicine

表 1 不同产地红豆蔻各共有峰的相对保留时间

Table 1 Each common peak relative to theretention time of *Alpinia galanga* Will. from different habitats

峰号 No. of peak	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	相对标准偏差 RSD/ %
1	0.255	0.255	0.255	0.251	0.255	0.255	0.259	0.251	0.238	0.255	0.006
2	0.373	0.366	0.373	0.367	0.366	0.373	0.360	0.367	0.366	0.366	0.004
3	0.581	0.571	0.581	0.572	0.581	0.581	0.562	0.572	0.581	0.571	0.007
4	0.936	0.936	0.936	0.920	0.936	0.936	0.863	0.920	0.936	0.967	0.026
5	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
6	1.699	1.699	1.699	1.687	1.699	1.699	1.687	1.687	1.677	1.699	0.008
7	1.745	1.745	1.745	1.717	1.745	1.745	1.749	1.717	1.778	1.745	0.017
8	1.953	1.953	1.953	1.921	1.953	1.953	1.937	1.921	1.933	1.953	0.014
9	2.145	2.145	2.137	2.099	2.134	2.137	2.110	2.110	2.145	2.145	0.018

表 2 不同产地红豆蔻各共有峰的相对峰面积

Table 2 Each common peak relative to the peak area of *Alpinia galanga* Will. from different habitats

峰号 No. of peak	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.372	0.675	0.372	0.429	1.000	0.433	0.378	0.509	0.290	0.570
2	1.988	1.696	1.708	1.724	1.000	1.645	0.098	1.754	4.224	2.376
3	0.288	0.953	0.258	0.373	1.000	0.471	6.107	0.677	4.885	0.514
4	0.787	0.778	0.297	0.405	1.000	0.267	0.166	0.339	0.446	1.557
5	1.480	20.444	1.880	2.111	1.000	23.627	2.087	25.244	2.518	1.843
6	13.657	10.487	15.843	16.107	1.000	12.413	15.045	11.737	12.549	15.180
7	9.272	22.779	8.507	9.015	1.000	16.399	10.740	14.086	15.629	15.673
8	3.915	20.363	3.076	3.213	1.000	30.841	0.236	30.478	2.223	2.864
9	1.182	11.185	2.239	1.386	1.000	10.647	0.381	5.394	1.381	2.349

采用国家药典委员会相似度评价软件进行相似度计算,其中 S4 和 S6 样品的相似度较高,其相似度大于 0.94,其余样品的相似度相对较低,但均大于 0.90。由表 1 可知,不同产地红豆蔻共有峰的相对保留时间基本一致。供试品色谱图中共有 9 个共有峰,从表 2 可以看出,S2、S6、S8 样品中 5、6、7 号峰和 8 号峰的峰面积明显高于其它几个产地的样品,S6 与 S8 的 8 号峰是所有样品中峰面积最大的。

### 3 结论与讨论

该试验采用 HPLC 色谱法对 10 个不同产地红豆蔻的质量进行比较研究,获得 HPLC 指纹图谱特征峰。采用相似度软件评价发现,10 个产地红豆蔻有 9 个共有峰,不同产地的红豆蔻指纹图谱的相似度均大于 0.90。红豆蔻指纹图谱中各共有峰在客观上有很大的相似性,但主要峰群的整体图貌及共有特征峰的相对含量有一定差异,可能表明其共有物成分的含量具有差异性,即:S2(武鸣)、S6(龙州)、S8(桂林)和 S9(玉林)产地的成分含量相对较高,其原因可能与药材的产地、生长环境、采收时间等有关。

该试验建立的红豆蔻 HPLC 指纹图谱方法为色谱柱:phenomenex-C18(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(B)-0.1%磷酸水溶液(A),采用梯度洗脱;检测波长:260 nm;流速:1.0 mL·min<sup>-1</sup>;柱温:30℃;进样量:10 μL。该分析方法稳定、可靠,可用于红豆蔻药材质量控制和评价。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药出版社,2015:153.
- [2] 赵应红,岩罕单. 康朗腊老师运用 15 种姜科植物举隅[J]. 云南中医中药杂志,2002,23(6):34-37.
- [3] 周桂荣. 中药园地:肉豆蔻、豆蔻、草豆蔻、红豆蔻辨误[J]. 安徽医药,2000(1):37.
- [4] 中华人民共和国卫生部药政管理局. 中国药品生物制品检定所. 中药材手册[M]. 北京:人民卫生出版社,1989:295.
- [5] 张静,周浓,祁俊生,等. HPLC 同时测定不同产地延胡索中的 6 种生物碱[J]. 华西药理学杂志,2016,31(4):415-419.
- [6] 彭梅,肖雄,唐健波,等. 铁包金的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 华西药理学杂志,2015,30(6):709-712.
- [7] 陈志辉,罗明,魏刚,等. 不同产地金钗石斛 HPLC 特征图谱的比较[J]. 广东药学院学报,2014(6):707-712.

## HPLC Fingerprinting of *Alpinia galanga* Will. From Different Habitats

LI Mingfang<sup>1</sup>, HUANG Yanqiong<sup>2</sup>, TAN Ximei<sup>1</sup>, QIN Huazhen<sup>1</sup>, XIE Peng<sup>1</sup>, LONG Xiaojin<sup>1</sup>

(1. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530200; 2. Ruikang Affiliated Hospital, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530011)

**Abstract:** *Alpinia galanga* Will. from 10 different habitats were used as test materials, the HPLC fingerprints of 10 batches of *Alpinia galanga* Will. were determined, and by National Pharmacopoeia Committee Similarity evaluation software was analyzed. In order to establish the HPLC fingerprint from different habitats, compared the chemical composition difference, to provide an effective method for quality control of *Alpinia galanga* Will. The results showed that there were 9 common peaks in 10 habitats of *Alpinia galanga* Will. It was found that the similarity of fingerprint in *Alpinia galanga* Will. from different areas was greater than 0.90, and the investigated might be shown that the constant distribution of chemical component in *Alpinia galanga* Will. The chemical component was stable and it was good at similarity about quality. Interestingly, the ratio of chemical component vary in different original habitats. Moreover, the method could be used to a supervise and control the quality of *Alpinia galanga* Will.

**Keywords:** *Alpinia galanga* Will. ; habitat; HPLC; fingerprints; chemical component