

广西金花茶叶水提物 HPLC 指纹图谱研究

蒋艳芳¹, 莫建光², 苏琳³, 覃祖前⁴ (广西分析测试研究中心, 广西南宁 530022)

摘要 [目的] 建立广西金花茶叶水提物的高效液相色谱指纹图谱, 可为科学评价和有效控制其质量提供可靠的方法。[方法] 采用高效液相色谱法, 测定 10 批金花茶样品。色谱柱为 Ultimate XB-C₁₈ 5 μm (4.6 × 300 mm), 流动相为乙腈和浓度 0.5% 磷酸溶液, 梯度洗脱。[结果] 10 批金花茶样品得到的指纹图谱相似度都在 0.9 以上, 标示 20 个共有峰, 方法精密度、稳定性和重复性良好。[结论] 该方法所建立的指纹图谱特征性强, 为金花茶的鉴别和质量控制提供依据。

关键词 金花茶; 指纹图谱; 高效液相色谱

中图分类号 S567 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)35-13478-03

Study on the HPLC Fingerprints of Guangxi Golden Camellia Tea Water Extract

JIANG Yan-fang et al (Guangxi Analysis and Testing Center, Nanning, Guangxi 530022)

Abstract [Objective] To establish HPLC fingerprints of Guangxi golden camellia tea water extract, and provide reliable methods for scientific evaluation and effective control of its quality. [Method] Use HPLC to test 10 batches of golden camellia tea samples. The chromatographic column is Ultimate XB-C₁₈ 5 μm (4.6 × 300 mm), the mobile phase is acetonitrile and 0.5% phosphoric acid solution, gradient elution. [Result] Fingerprints of 10 batches of samples showed a similarity degree above 0.9, 20 common peaks were remarked, the method had higher precision, stability and repeatability. [Conclusion] The fingerprint spectra established by this method showed strong characteristics, provided a solid foundation for identification and quality control of golden camellia tea.

Key words Golden camellia tea; Fingerprint spectrum; HPLC

金花茶 (*Camellia*) 是山茶科山茶属金花茶组金花茶系植物, 为常绿灌木或小乔木, 产于我国广西境内北回归线以南地区, 具有极高的观赏价值和药用价值^[1-2], 是国家一级保护植物。金花茶化学成分复杂, 种类较多, 且由于产地的不同, 金花茶成分在不同程度上存在差异。目前, 还没有文献报道系统地金花茶成分进行鉴别。该研究将利用指纹图谱的优点, 首次对金花茶水提取物进行指纹图谱研究, 利用 HPLC 分析方法建立广西普通种金花茶水提取物的指纹图谱, 结合《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 版》研究版和评价版软件对图谱的相似度、影响因素作详细讨论。

1 材料与方 法

1.1 材料 以采自广西不同产地的金花茶鲜叶为样品, 经广西中医药研究院赖茂祥研究员鉴定为普通金花茶 (*Camellia*)。10 批次金花茶鲜叶其名称、产地、批号等见表 1。

表 1 中药名称、产地、批号、产地、采收时间

序号	批号	产地	采收时间
1	201104A	东兴市	2011-04
2	20110419	防城港	2011-04
3	201104B	防城港	2011-04
4	20110423	钦州市	2011-04
5	20110427	十万大山	2011-04
6	20110623	防城港	2011-06
7	201106C	那梭基地	2011-06
8	20110907	南宁市	2011-09
9	201109D	防城港	2011-09
10	201110E	防城港	2011-10

1.2 方 法

1.2.1 金花茶样品预处理。

1.2.1.1 金花茶叶水提取物。将金花茶鲜叶中的杂质及腐烂、病黄叶去除, 把挑好的金花茶鲜叶放入清洗池中, 清洗干净后剪成 1~2 cm 宽的小叶条, 至超声提取器中, 加入蒸馏水, 固液比为 1:20, 在 80 °C 下以 25 kHz 的功率浸提 2 h, 反复提取 2 次, 合并提取液, 浓缩, 过滤。经 120 °C 真空杀菌后, 装瓶, 得金花茶浸提液, 低温保存, 备用。

1.2.1.2 供试液的制备。取金花茶浸提液 20 ml, 慢慢加入 60 ml 无水乙醇, 边加边搅拌, 溶液中不断生成絮状沉淀, 放于 4 °C 冰箱内静置 24 h, 4 000 r/min 离心分离。取上清液进行旋转蒸发, 使得乙醇几乎挥发完全, 再加入 20 ml 无水乙醚进行萃取, 弃去上层乙醚层, 反复 3 次, 直至上层几乎无色, 下层溶液蒸干后用浓度 50% 甲醇定容 10 ml, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

1.2.2 对照品溶液的制备。准密称取表儿茶素没食子酸酯 (ECG) 对照品 10 mg (精确至 0.000 1 g), 置于 10 ml 容量瓶中, 加浓度 50% 甲醇溶解至刻度, 摇匀, 即得 1 mg/ml 标准溶液。

1.2.3 色谱条件。色谱柱: Ultimate XB-C₁₈ 5 μm (4.6 × 300 mm); 流动相 A: 乙腈, 流动相 B: 浓度 0.5% 磷酸; 梯度洗脱程序为 0~20 min, A-B (10:90); 20~40 min, A-B (14:86); 40~85 min, A-B (21:79); 85~105 min, A-B (30:70); 105~115 min, A-B (30:70); 115~120 min, A-B (10:90); 120~130 min, A-B (10:90); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 292 nm; 进样量: 10 μl。

1.2.4 参照峰的确定。在金花茶水提取溶液中, 11 号表儿茶素没食子酸酯 (ECG) 峰与各峰分离较好, 峰高适中, 峰形尖锐, 保留时间适中。因此, 选取 ECG 作为参照峰进行相对保留时间和相对峰面积的计算, 符合指纹图谱的要求。

1.2.5 方 法 学 考 察。

1.2.5.1 精密度试验。取批号 201104A 的金花茶供试液,

作者简介 蒋艳芳 (1987-), 女, 广西桂林人, 助理工程师, 从事食品药品的分析检测工作。

收稿日期 2013-10-20

按“1.2.4”的色谱条件连续进样 6 次,测定,记录色谱图,以 ECG 色谱峰计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 *RSD*。试验结果显示,共有峰的相对保留时间、相对峰面积比值的 *RSD* 分别为 0~0.36% 和 1.05%~2.97%,表明仪器等整个系统的精密度良好,符合指纹图谱的要求。

1.2.5.2 重现性试验。取批号 201104A 的金花茶供试液,平行制备 6 份,按“1.2.4”的色谱条件依次检测,记录色谱图,以 ECG 色谱峰计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 *RSD*。试验结果显示,共有峰的相对保留时间、相对峰面积比值的 *RSD* 分别为 0~0.29% 和 0~2.95%,表明该方法重复性好,符合指纹图谱的要求。

1.2.5.3 稳定性试验。取批号 201104A 的金花茶供试液,按“1.2.4”的色谱条件,分别为 0、2、8、16、24、48 h 进样检测,记录色谱图,以 ECG 色谱峰计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 *RSD*。试验结果显示,共有峰的相对保留时间、相对峰面积比值的 *RSD* 分别为 0~2.24% 和 0~2.87%,

表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2 结果与分析

2.1 指纹图谱的建立及共有峰的标定 按“1.2.4”的色谱条件,分别记录 10 批金花茶叶水提取物供试液的 HPLC 指纹色谱图。前 15 min 色谱峰经多次改变流动相洗脱条件仍无法分离,认定为杂质峰和溶剂峰不予以区分。从 15~130 分的色谱图中确定 20 个共有峰构成金花茶水提取物的特征指纹图谱。其中,确认的已知成分为 11 号峰——表儿茶素没食子酸酯,其他共有峰为未知成分。表儿茶素没食子酸酯在色谱图中分离度好,峰形尖锐,保留时间适中,峰面积较大且稳定,故选择表儿茶素没食子酸酯为参照峰,标记为 S。以表儿茶素没食子酸酯色谱峰(S 峰)的保留时间和峰面积为 1,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积值,结果见表 2~3;共有峰指纹特征图谱见图 1,10 批次金花茶水提取物叠加指纹图谱见图 2。

表 2 10 批次金花茶水提取物指纹图谱相对峰保留时间结果

峰号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均值
1	0.524 9	0.544 5	0.566 7	0.571 9	0.553 0	0.565 7	0.534 7	0.535 1	0.536 2	0.536 0	0.546 9
2	0.588 8	0.606 7	0.592 4	0.587 1	0.587 0	0.587 1	0.584 9	0.551 7	0.564 9	0.576 8	0.582 7
3	0.627 9	0.646 2	0.616 0	0.609 0	0.615 6	0.612 9	0.607 4	0.613 0	0.608 0	0.605 5	0.616 2
4	0.745 2	0.759 5	0.767 5	0.769 2	0.761 0	0.763 7	0.729 7	0.716 1	0.716 7	0.728 9	0.745 8
5	0.822 4	0.832 1	0.829 8	0.827 5	0.831 4	0.828 8	0.803 7	0.790 0	0.823 6	0.803 3	0.819 3
6	0.838 1	0.846 1	0.842 7	0.845 5	0.861 3	0.839 7	0.821 3	0.817 9	0.848 6	0.844 6	0.840 6
7	0.857 4	0.867 3	0.862 6	0.862 5	0.873 0	0.862 3	0.844 9	0.850 4	0.867 5	0.869 8	0.861 8
8	0.884 5	0.888 5	0.883 7	0.882 1	0.882 8	0.882 2	0.869 7	0.868 1	0.914 5	0.900 1	0.885 6
9	0.924 0	0.931 8	0.933 1	0.934 5	0.931 4	0.932 5	0.939 1	0.936 8	0.937 4	0.924 5	0.932 5
10	0.964 0	0.968 8	0.978 7	0.981 3	0.975 2	0.977 7	0.957 2	0.948 4	0.949 5	0.957 1	0.965 8
S	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0
12	1.040 1	1.041 6	1.049 8	1.051 8	1.048 0	1.050 0	1.051 3	1.047 9	1.049 5	1.051 2	1.048 1
13	1.085 4	1.087 8	1.104 1	1.108 7	1.100 3	1.104 2	1.095 8	1.088 1	1.090 0	1.095 2	1.096 0
14	1.187 0	1.196 7	1.238 0	1.248 9	1.227 2	1.237 0	1.200 6	1.178 1	1.182 5	1.198 5	1.209 4
15	1.243 9	1.244 7	1.279 4	1.288 2	1.271 8	1.279 7	1.254 1	1.293 2	1.202 1	1.210 2	1.256 7
16	1.295 7	1.292 8	1.328 9	1.335 6	1.320 4	1.328 2	1.307 1	1.335 3	1.297 6	1.306 2	1.314 8
17	1.346 5	1.355 2	1.404 4	1.416 4	1.392 4	1.403 6	1.375 3	1.350 9	1.452 6	1.458 8	1.395 6
18	1.514 4	1.552 1	1.635 2	1.661 1	1.616 4	1.636 4	1.627 9	1.585 4	1.593 8	1.622 7	1.604 5
19	1.586 2	1.622 5	1.711 7	1.732 4	1.691 7	1.713 6	1.727 5	1.713 6	1.723 0	1.739 0	1.696 1
20	1.617 3	1.676 9	1.746 5	1.775 1	1.726 9	1.748 8	1.776 1	1.761 1	1.770 6	1.774 6	1.737 4

表 3 10 批次金花茶水提取物指纹图谱相对峰保留时间

峰号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均值
1	0.168 9	0.177 7	0.182 6	0.213 4	0.196 7	0.178 7	0.390 0	0.192 0	1.186 4	1.214 0	0.410 0
2	0.205 0	0.180 6	0.312 8	0.347 2	0.296 8	0.351 7	0.094 5	0.165 5	0.138 5	0.162 4	0.225 5
3	0.219 9	0.205 7	0.231 2	0.241 8	0.217 4	0.215 8	0.197 3	0.182 4	0.180 8	0.193 2	0.208 5
4	0.778 1	0.645 0	0.812 1	0.927 5	0.739 6	0.835 0	0.680 4	0.774 3	2.222 7	1.898 0	1.031 3
5	0.191 3	0.199 3	0.410 6	0.429 0	0.544 5	0.445 7	0.191 0	0.161 1	0.219 7	0.541 7	0.333 4
6	0.337 5	0.336 2	0.082 1	0.074 8	0.131 3	0.126 9	0.191 0	0.231 7	0.395 2	0.504 1	0.241 1
7	0.134 6	0.158 8	0.168 6	0.081 0	0.044 1	0.132 4	0.374 4	0.288 0	0.518 7	0.378 2	0.227 9
8	0.542 0	0.455 7	0.515 9	0.509 9	0.467 6	0.498 8	0.484 0	0.598 9	0.264 9	0.281 8	0.461 9
9	0.209 0	0.141 2	0.171 8	0.201 8	0.229 8	0.195 7	0.144 5	0.172 5	0.290 2	0.367 3	0.212 4
10	0.245 1	0.231 7	0.232 2	0.247 5	0.225 0	0.218 3	0.221 0	0.243 8	0.334 7	0.321 2	0.252 1
S	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0

续表 3

峰号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均值
12	0.318 5	0.384 3	0.341 5	0.296 0	0.335 7	0.339 1	0.321 5	0.286 0	0.377 7	0.369 7	0.337 0
13	0.442 2	0.478 2	0.559 9	0.565 3	0.640 2	0.624 4	0.465 6	0.514 7	0.771 5	0.738 8	0.580 1
14	0.093 7	0.108 4	0.091 5	0.117 4	0.094 0	0.108 5	0.105 0	0.101 0	0.082 9	0.224 0	0.112 6
15	0.074 1	0.085 4	0.102 3	0.100 0	0.069 5	0.108 3	0.055 3	0.061 2	0.073 0	0.066 7	0.079 6
16	0.093 7	0.107 6	0.070 2	0.074 0	0.069 1	0.072 0	0.158 1	0.076 9	0.041 6	0.078 4	0.084 2
17	0.073 7	0.110 7	0.057 7	0.065 8	0.054 5	0.066 1	0.069 6	0.086 4	0.235 1	0.190 6	0.101 0
18	0.166 3	0.180 7	0.157 1	0.156 5	0.164 0	0.166 9	0.150 4	0.156 5	0.488 0	0.509 2	0.229 6
19	0.697 0	0.751 6	0.639 1	0.644 1	0.701 2	0.687 1	0.727 3	0.661 1	1.305 3	1.379 7	0.819 3
20	0.116 0	0.150 9	0.098 9	0.097 2	0.094 1	0.137 9	0.140 4	0.109 9	0.338 9	0.330 3	0.161 4

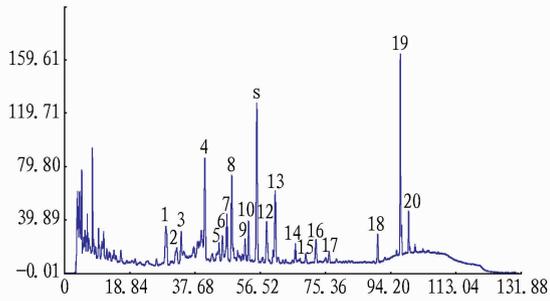


图 1 金花茶供试液 HPLC 指纹图谱

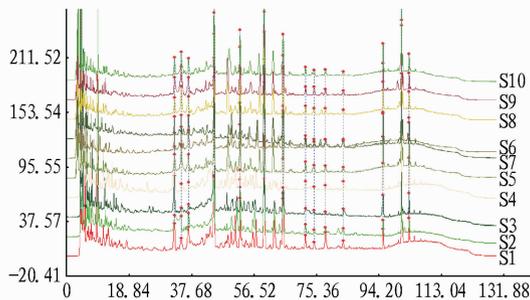


图 2 10 批次金花茶水提取物指纹图谱叠加图

2.2 指纹图谱相似度评价 将 10 批次金花茶水提取样品的信号转换为数据值后,采用中药色谱指纹图谱相似度软件 2004 版(国家药典委员会)进行数据处理^[3-4]。将 10 批次供试品的色谱图进行校正匹配并比较,生成可全面反映多个色谱图特征的对照图谱(图 2),并以此模式为基准,计算每个色谱图与之比较的相似度。由表 4 可知,10 批次金花茶样品指纹图谱的相似度都达到 0.9 以上,说明广西不同产地的金花茶都具有很好的相似性。

3 讨论

采用 HPLC 建立一个分离、分析金花茶水提取物的方法。

表 4 10 批次金花茶水提取物指纹图谱相似度

序号	批号	产地	相似度
1	201104A	东兴市	0.903
2	20110419	防城港	0.936
3	201104B	防城港	0.942
4	20110423	钦州市	0.936
5	20110427	十万大山	0.923
6	20110623	防城港	0.939
7	201106C	那梭基地	0.930
8	20110907	南宁市	0.946
9	201109D	防城港	0.961
10	201110E	防城港	0.950

该方法分离效果好,重现性高,操作简便。在方法学考察中,对仪器的精密度、提取溶液的稳定性、方法的重现性等试验数据进行处理。结果表明,相似度和 *RSD* 均符合国家药监局颁发的《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》中的要求。

在进行色谱条件优化后,测定 10 批次提取液色谱图。所得谱图分离效果好,相应值高,且整体谱图匀称。该研究确定了 20 个共有峰。采用中药色谱指纹图谱相似度软件进行处理,确定了 10 个样品之间的相似关系。根据不同基地不同采收期采集的 10 批次样品相似度分析,建立了金花茶水提取物的高效液相色谱法指纹图谱,为金花茶水提取物的质量控制提供合理的科学依据。

参考文献

- [1] 苏琳,莫建光,韦英亮,等.金花茶叶皂苷类成分研究[J].中草药,2012,43(5):877-879.
- [2] 秦小明,林华娟,宁恩创,等.金花茶叶水提取物的抗氧化活性研究[J].食品科技,2008,33(2):189-191.
- [3] 卢婉妃,徐佳丹,许闪闪,等.蝉花 HPLC 指纹图谱的研究[J].浙江中医药大学学报,2013,37(5):601-605.
- [4] 周浓,庞婕,胡文帅,等.甘肃道地药材掌叶大黄药材的 HPLC 指纹图谱研究[J].南京中医药大学学报,2013,29(2):187-191.