

广西产中华芦荟指纹图谱研究^{*}

何玲¹, 甄丹丹^{2**}, 莫缓恒^{3**}, 何柳艳³, 张森², 甄汉深²

(1. 广西中医药大学第一附属医院, 广西南宁 530003; 2. 广西中医药大学, 广西南宁 530001; 3. 广西卫生职业技术学院, 广西南宁 530023)

摘要: 本文旨在建立广西产中华芦荟的 HPLC 指纹图谱。研究以广西产中华芦荟为实验对象, 采用 HPLC 指纹图谱分析法对广西不同产地的中华芦荟进行指纹图谱分析。结果 10 批中华芦荟药材指纹图谱相似度较好, 各批药材指纹图谱间的相似度平均值在 0.9 以上; HPLC 指纹图谱标定 8 个共有峰。本法 HPLC 指纹图谱的建立, 初步为广西产中华芦荟的质量标准制定提供参考。

关键词: 中华芦荟 广西 HPLC 指纹图谱 质量标准

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-7378(2019)04-0288-09

0 引言

广西产中华芦荟(*Aloe vera* L. var. *chinensis*)^[1]属于单子叶植物百合科(Liliaceae)芦荟属多年生常绿肉质植物, 又称油葱。芦荟属植物具有杀菌、抑制或延缓人体衰老等作用, 使用价值高, 广泛应用于医药、化妆品、保健食品等方面。目前对芦荟的研究主要集中在芦荟的抑菌作用、药理作用和活性成分方面^[1-12], 未见有广西产中华芦荟指纹图谱研究的公开报道。而指纹图谱在中药材应用, 笔者曾有一定的研究^[13-14], 因此本文以广西产中华芦荟为研究对象, 采用 HPLC 指纹图谱分析法进行研究, 为今后中华芦

荟的质量标准研究提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

仪器: 高效液相色谱仪(Alliance e2695, 美国沃特世); 色谱柱(Phenomenon C₁₈, 5 μm, 4.6 mm × 250 mm); 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Millipore Simplicity-185 超纯水仪(美国密里博公司)。

试剂: 乙腈, 冰乙酸(色谱纯), 水(超纯水), 其余试剂均为分析纯。芦荟大黄素(批号: 110795-201007, 供含量测定用, 中国食品药品检定研究院)。

^{*} 2018 年广西一流学科建设项目重点课题(2018XK052), 广西壮族自治区卫生厅中医药科技专项(GZBZ14-07), 壮瑶药协同创新中心项目(桂教科研[2013]20 号), 广西壮瑶药重点实验室项目(桂科基字[2014]32 号), 广西重点学科壮药项目(桂教科研[2013]16 号)和广西八桂学者中药创新理论与药效研究项目(J13162)资助。

【作者简介】

何玲(1983—), 女, 主管药师, 主要从事医院药学工作。

【**通信作者】

甄丹丹(1983—), 女, 助理研究员, 主要从事中医药教学、科研和管理工, E-mail: 8zhen@163.com; 莫缓恒(1973—), 女, 讲师, 主要从事中医药教学和科研工作, E-mail: 2918239@163.com。

【引用本文】

DOI: 10.13657/j.cnki.gxkxyxb.20191210.005

何玲, 甄丹丹, 莫缓恒, 等. 广西产中华芦荟指纹图谱研究[J]. 广西科学院学报, 2019, 35(4): 288-296.

HE L, ZHEN D D, MO H H, et al. Study on the fingerprint of *Aloe vera* L. var. *chinensis* from Guangxi [J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2019, 35(4): 288-296.

样品: 本实验所用中华芦荟药材为 10 批, 经广西一心药业马利飞副主任药师鉴定, 均为百合科芦荟属中华芦荟 *Aloe vera* L. var. *chinesis* 的叶, 样品药材来源见表 1。样品于 60℃ 以下烘干, 粉碎成粗粉备用。

1.2 方法

1.2.1 色谱柱的选择

为得到分离效能更好的图谱, 本实验分别考察 Thermo C₁₈ (5 μm, 250 mm×4.6 mm) 色谱柱, Agilent WondaSil C₁₈-WR (5 μm, 250 mm×4.6 mm) 色谱柱和 Phenomenon C₁₈ (5 μm, 250 mm×4.6 mm) 色谱柱。结果如图 1~3 所示, Phenomenon C₁₈ (5 μm, 250 mm×4.6 mm) 色谱柱分离出来的色谱峰比较丰富, 且分离效果比较好。

表 1 中华芦荟药材供试样品编号与产地

Table 1 Number and origin of test samples of *Aloe vera* L. var. *chinesis*

编号 Number	采收时间 Collecting time	产地 Place of origin
1	2014.02	广西隆安县 Long'an County, Guangxi
2	2014.04	广西南宁 Nanning, Guangxi
3	2014.05	广西武鸣县 Wuming County, Guangxi
4	2014.06	广西梧州 Wuzhou, Guangxi
5	2014.08	广西玉林 Yulin, Guangxi
6	2014.09	广西浦北县 Pubei County, Guangxi
7	2014.10	广西防城港 Fangchenggang, Guangxi
8	2014.11	广西东兴 Dongxing, Guangxi
9	2014.12	广西中医药大学植物园 Botanical Garden of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine
10	2015.01	广西药用植物园 Guangxi Medicinal Herb Garden

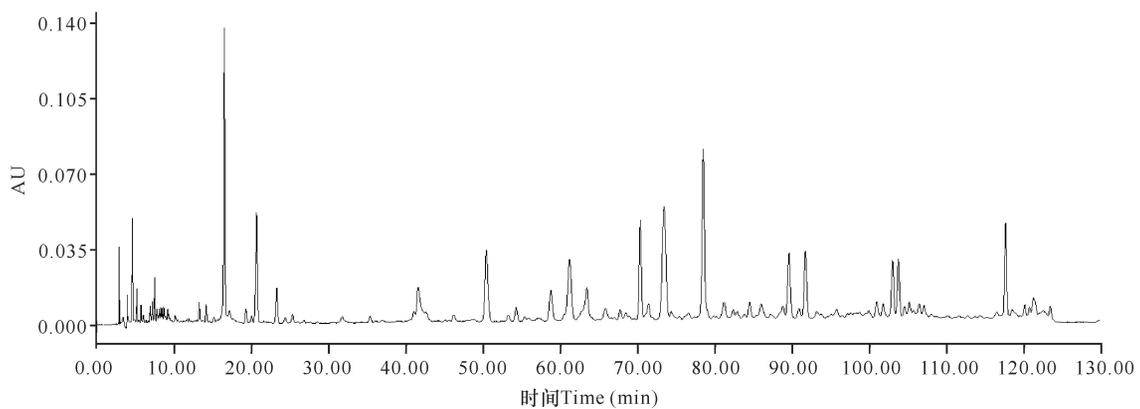


图 1 Phenomenon C₁₈ 色谱柱的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of Phenomenon C₁₈ column

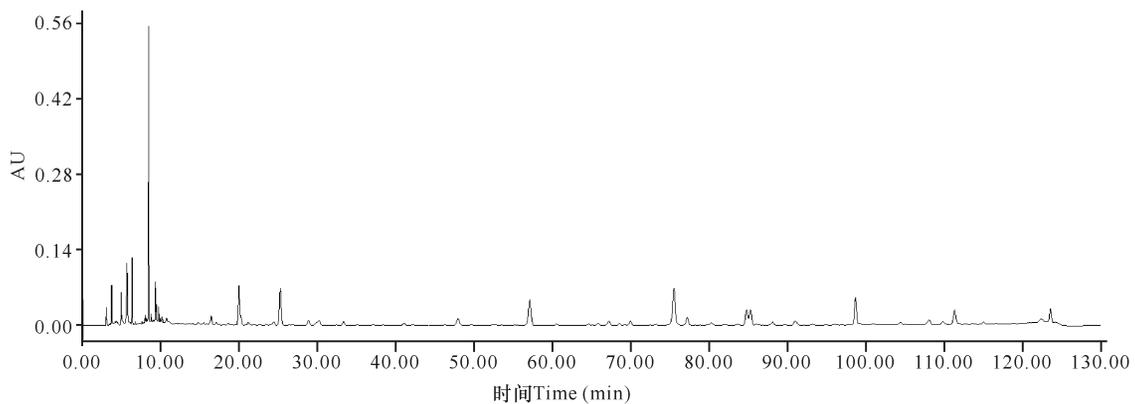
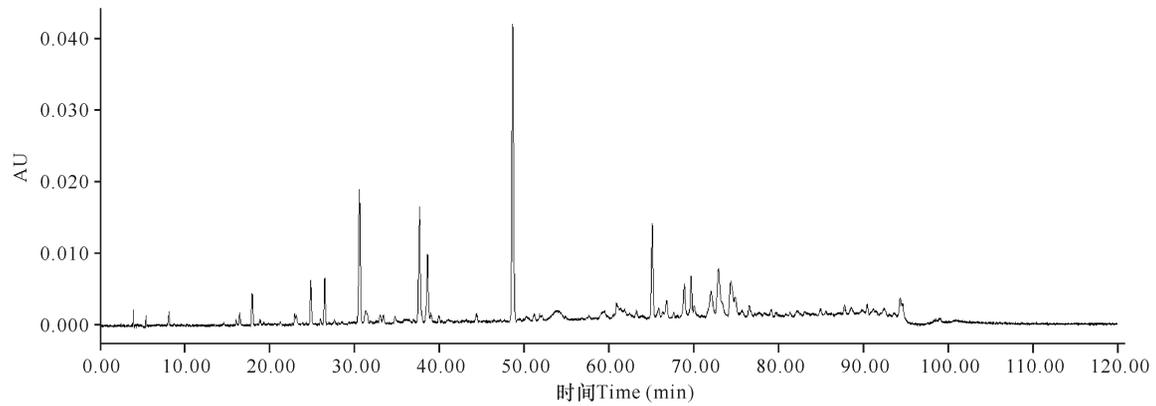


图 2 Thermo C₁₈ 色谱柱的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of Thermo C₁₈ column

图3 Agilent WondaSil C₁₈-WR 色谱柱的色谱图Fig. 3 Chromatogram of Agilent WondaSil C₁₈-WR column

1.2.2 流动相的选择

分别以甲醇-水、甲醇-0.1%冰醋酸、乙腈-水和乙腈-0.1%冰醋酸为流动相,对中华芦荟叶进行HPLC图谱考察,分析不同流动相系统的分离图谱。结果显示,以甲醇-水、甲醇-0.1%冰醋酸为流动相所得的色谱信息较少,甲醇-水流动相色谱图整体峰

形不均匀,甲醇-0.1%冰醋酸流动相色谱图几乎无峰,未能分离开有关物质。而乙腈-水流动相与乙腈-0.1%冰醋酸流动相的色谱图各有特点,但乙腈-0.1%冰醋酸流动相提供的峰相对集中。因此,确定流动相系统为乙腈-0.1%冰醋酸(图4~7)。

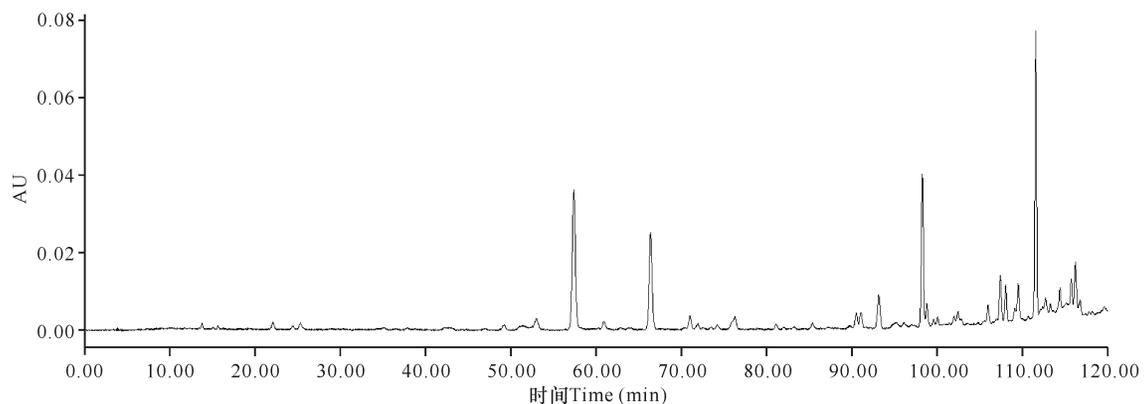


图4 甲醇-水流动相色谱图

Fig. 4 Chromatogram of methanol-water mobile phase

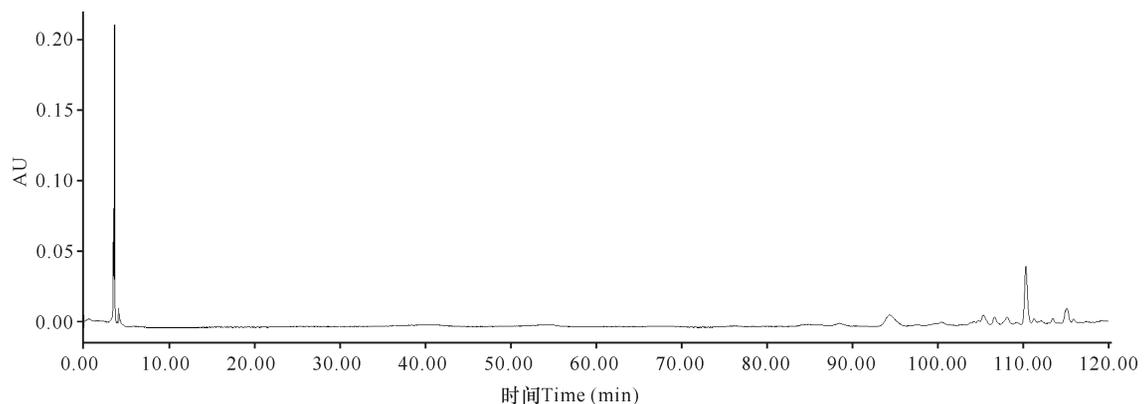


图5 甲醇-0.1%冰醋酸流动相色谱图

Fig. 5 Chromatogram of methanol-0.1% glacial acetic acid mobile phase

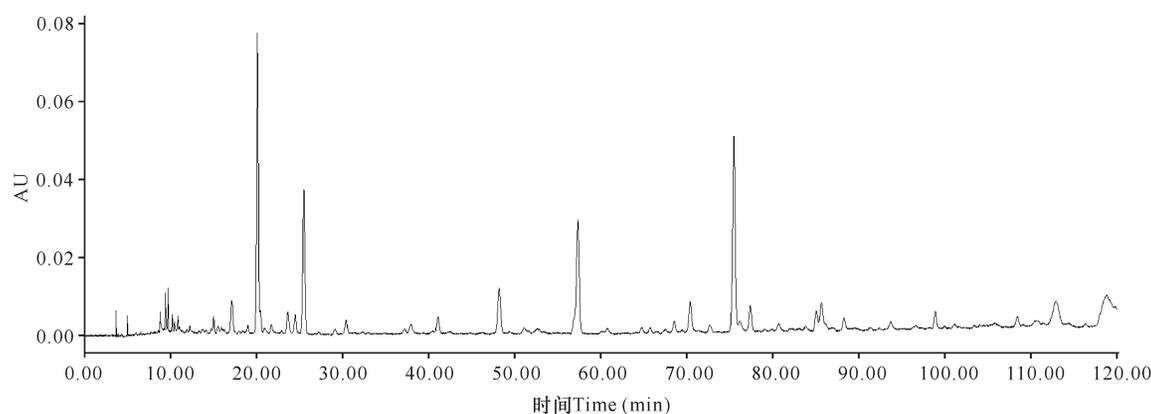


图6 乙腈-水流动相相色谱图

Fig. 6 Chromatogram of acetonitrile-water mobile phase

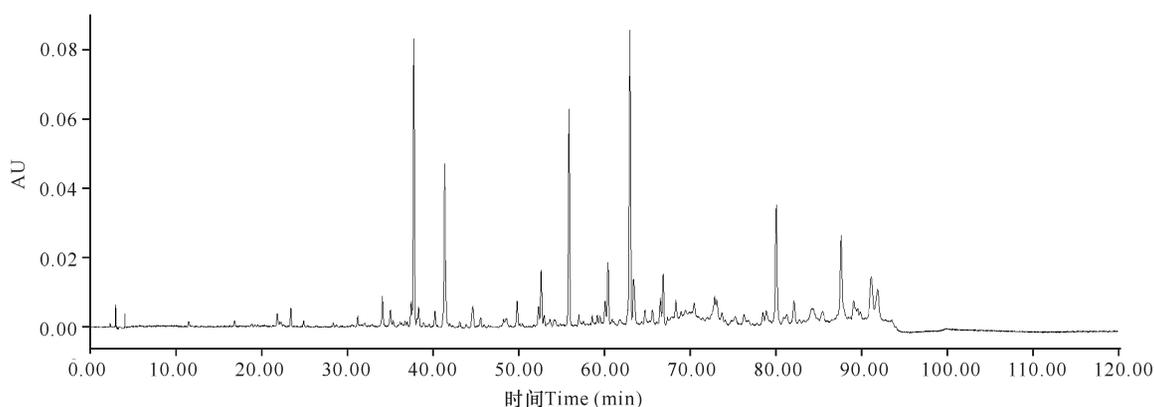


图7 乙腈-0.1%冰醋酸流动相相色谱图

Fig. 7 Chromatogram of acetonitrile-0.1% glacial acetic acid mobile phase

1.2.3 洗脱程序

采用乙腈-0.1%冰醋酸流动相,按不同时间和比例进行梯度洗脱。梯度洗脱流动相组成如表2所示。

表2 梯度洗脱流动相组成

Table 2 Composition of gradient elution mobile phase

时间 Time (min)	乙腈 Acetonitrile (%)	0.1%冰醋酸 0.1% glacial acetic acid (%)
0	7	93
10	25	75
30	25.5	74.5
50	26	74
60	28	72
65	36	64
75	39.5	60.5
85	47	53
120	95	5

1.2.4 检测波长的选择

本实验使用二极管阵列检测器(DAD),对样品进行190~400 nm全波长扫描,获得3D图(图8),并

重点考查250 nm、260 nm、280 nm、300 nm、310 nm波长处色谱图。结果显示色谱峰波长为260 nm和280 nm,其分离度和对照品(56 min的峰)出峰相对较好,但280 nm对照品的峰相对高点,最终确定280 nm为本指纹图谱实验的检查波长(图9)。

1.2.5 柱温和流速的选择

柱温25℃与柱温30℃条件下的色谱图总体相差不大,但25℃条件下的色谱图峰形整体好于30℃条件下的色谱图,且基于对色谱柱和仪器的保护,所以选择25℃为检测温度。另外,在其他色谱条件相同情况下,1.0 mL/min流速的色谱图较0.8 mL/min流速的分离效果差,因此选用0.8 mL/min流速。

1.2.6 指纹图谱条件的确定

根据上述考察,确定指纹图谱条件:色谱柱为Phenomenon C₁₈(5 μm, 250 mm×4.6 mm),流动相系统如表2所示,检测波长为280 nm,柱温25℃,进样量20 μL,流速0.8 mL/min,理论塔板数大于5 000,分离度大于1.5。

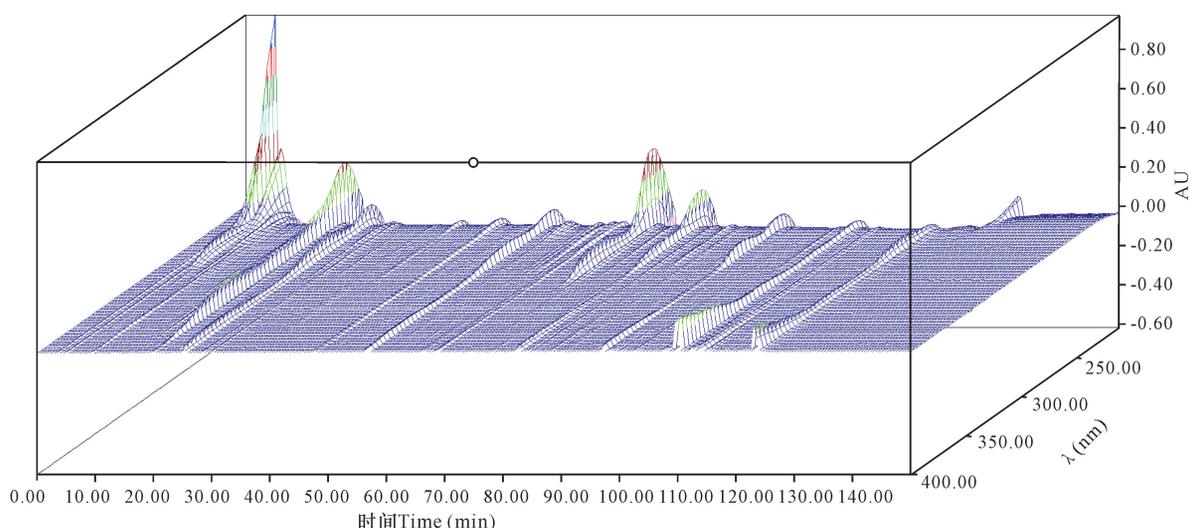


图8 中华芦荟样品全波长扫描 3D 色谱图

Fig. 8 Full wavelength scanning 3D chromatogram of *Aloe vera* L. var. *chinensis* sample

1.3 供试品分析

1.3.1 供试品溶液的制备

取中华芦荟药材粉末约 2 g,精密称定,置 50 mL 锤形瓶中,加入 30 mL 乙酸乙酯溶液,摇匀,于超声波清洗器中超声提取 45 min,冷却,过滤,置于水浴(98~100℃)挥干溶剂,加 5 mL 甲醇溶解,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得供试品溶液。

1.3.2 对照品溶液的配制

精密称定中华芦荟对照品 5 mg,置 25 mL 容量瓶中,加甲醇溶解,定容至刻度,摇匀。

1.3.3 精密度试验

按 1.3.1 节供试品溶液制备方法配制供试品溶液,按 1.2.6 节的色谱条件下连续进样 6 针,记录色谱图。计算样品保留时间和峰面积的精密度。计算结果相对标准偏差(RSD)符合要求(RSD = 0.111%~0.827%, $n=8$)。

1.3.4 重复性试验

取同一产地中华芦荟样品粉末 6 份,各约 2 g,精密称定,按 1.3.1 节方法制备供试品溶液,并按 1.2.6 节的色谱条件测定,结果保留时间和峰面积的相对标准偏差(RSD)值均符合要求(RSD 为 0.122%~0.881%, $n=8$)。

1.3.5 稳定性试验

取中华芦荟 1 份,约 5 g,按 1.3.1 节下供试品溶液配制方法配制,并按 1.2.6 节的色谱条件测定,记

录图谱。分别在 0 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h 检测图谱,考察样品的稳定性。结果,各色谱峰的相对保留时间 RSD 为 0.023%~0.51%,相对峰面积的相对标准偏差(RSD)为 0.84%~4.6%,说明稳定性符合要求。

1.3.6 空白试验

按 1.2.6 节的色谱条件测定,以提取溶液为供试品,记录图谱。结果表明提取溶剂及流动相中没有杂质干扰(图 10)。

1.3.7 参照色谱峰的建立

依照中国药典和指纹图谱研究的有关规定,制定指纹图谱必须设立参照物。主要根据供试品中所含化学成分的性质,选择合适的对照品作为参照物。按 1.2.6 节的色谱条件取对照品溶液和供试品溶液分别进样,结果如图 11~12 所示,其中 S 为参照色谱峰,表明 4 号峰为芦荟大黄素。

1.4 各批广西产中华芦荟的指纹图谱的采集

取 10 批芦荟按 1.3.1 节供试品溶液制备方法配制供试品溶液,按 1.2.6 节的色谱条件测定,分别记录各色谱图。采用中国药典颁布的指纹图谱相似度评价(2012.1 版本)软件对中华芦荟 10 批不同产地进行匹配(以平均数,设定时间宽度为 0.1 min,系统自动匹配),以 1 号药材样品作为参照图谱,4 号峰作为参照色谱峰,进行共有指纹峰的标定。

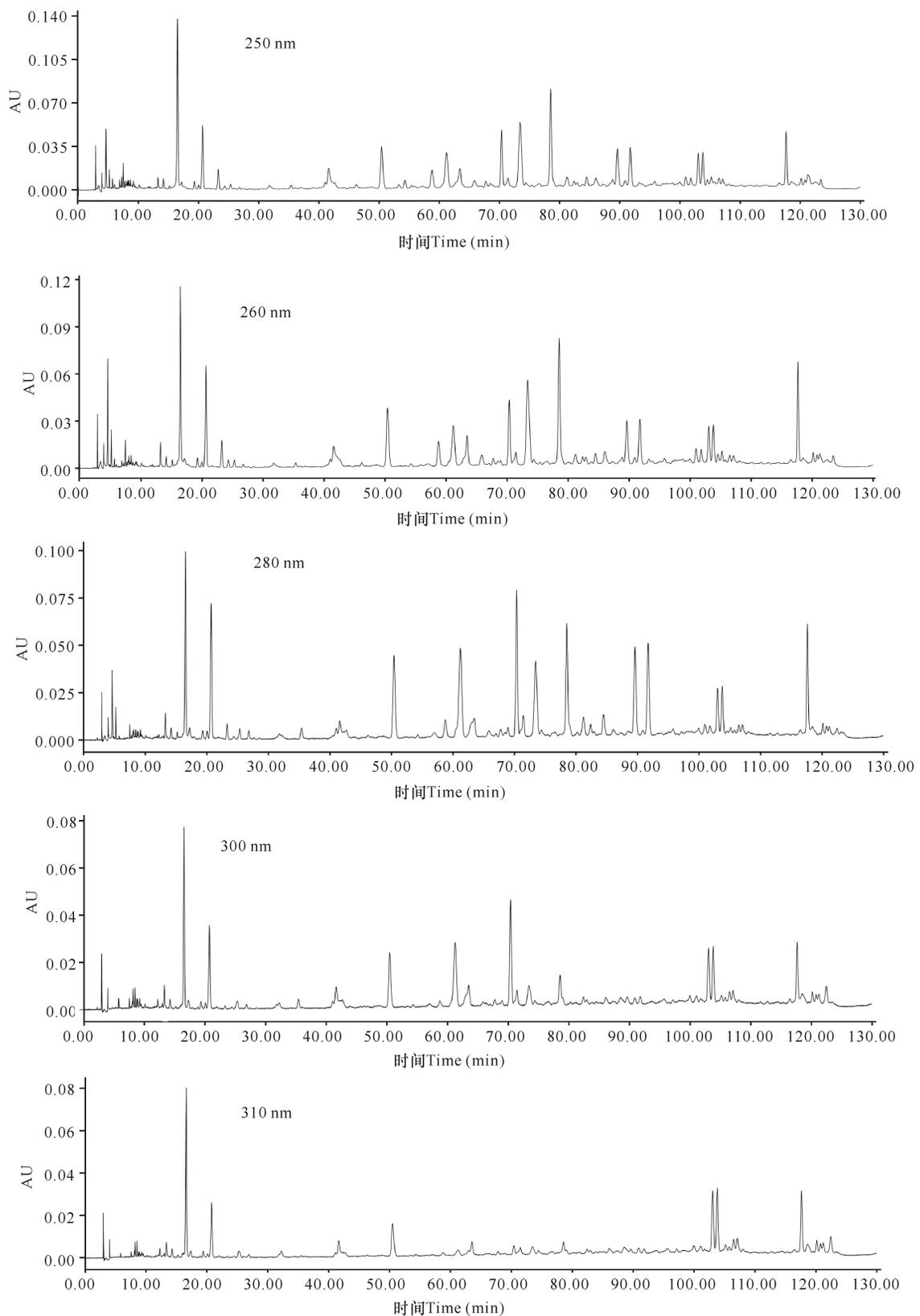


图9 中华芦荟样品各波长下色谱图

Fig. 9 Chromatogram of *Aloe vera* L. var. *chinesis* samples at different wavelengths

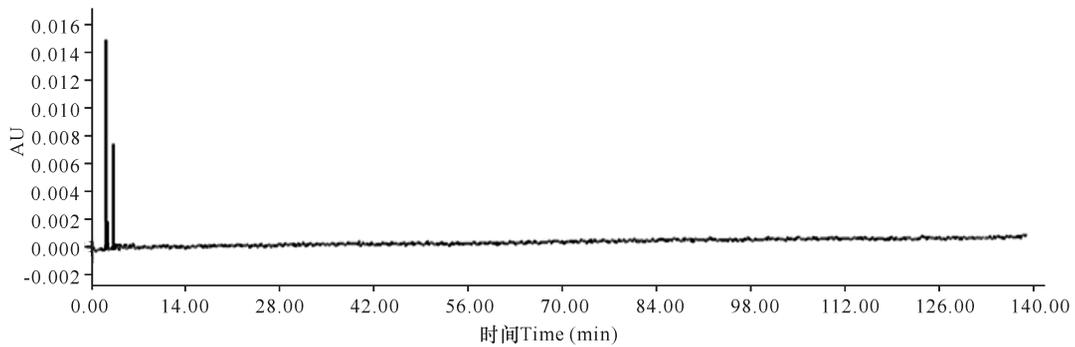


图 10 空白溶剂色谱图

Fig. 10 Chromatogram of blank solvent

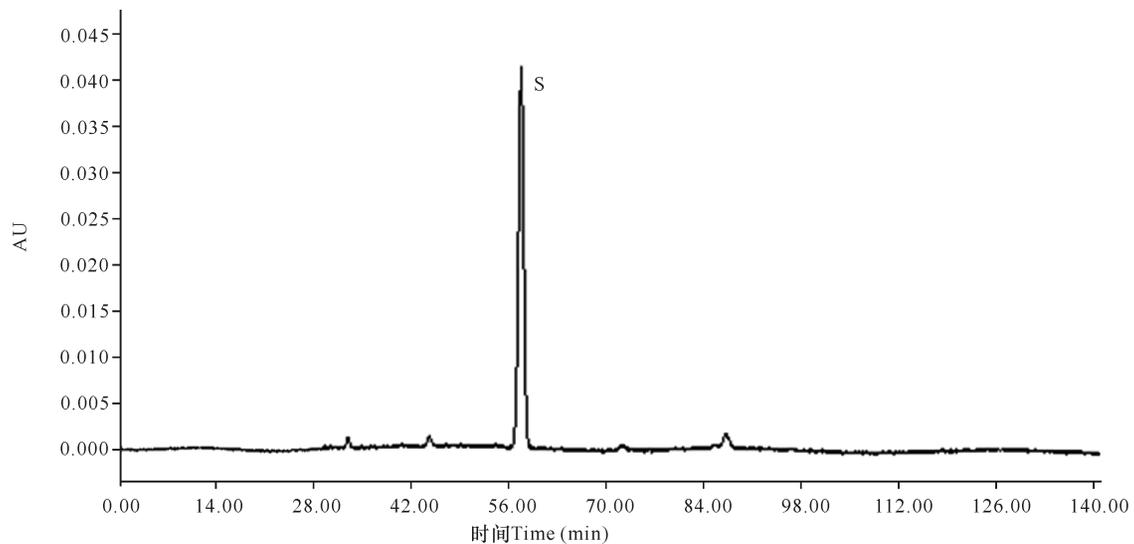


图 11 中华芦荟对照品(芦荟大黄素)色谱峰

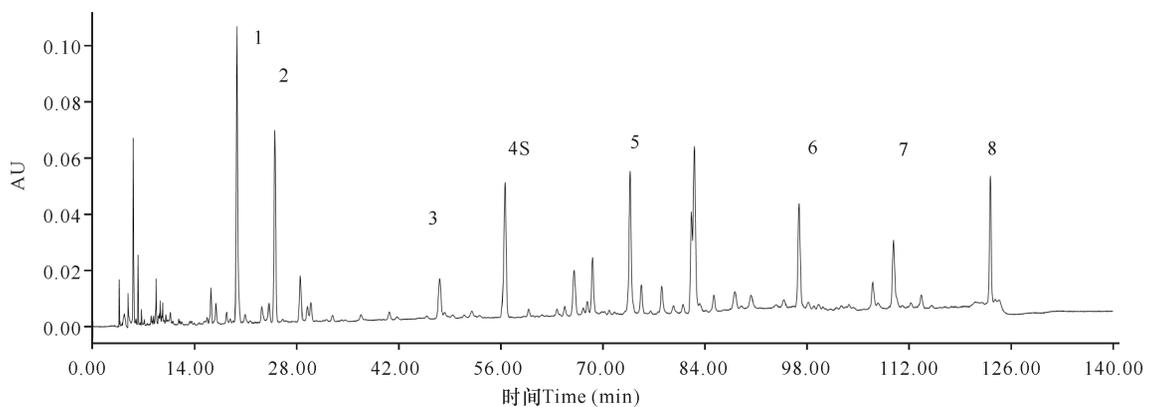
Fig. 11 Chromatogram peak of *Aloe vera* L. var. *chinensis* reference substance (Aloe emodin)

图 12 中华芦荟样品色谱峰

Fig. 12 Chromatographic peak of *Aloe vera* L. var. *chinensis*

2 结果与分析

根据采集得到的 10 批中华芦荟叠加色谱图(图 13),以 1 号样品为参照图谱,采用国家药典颁布的指纹图谱相似度评价(2012.1 版本)软件,对中华芦荟 10 批不同产地进行自动匹配,建立中华芦荟药材共

有模式的对照指纹色谱图(图 14),10 批药材与对照品指纹图谱相似度经数理统计,平均值达 0.9 以上,与对照图谱有良好的相似性。匹配结果共标定数目 8 个共有指纹峰(图 13~14)。10 批中华芦荟的相对保留时间 RSD 为 0.246%~0.471%;相对峰面积 RSD 为 16.84%~47.36%。指纹图谱非共有峰面积

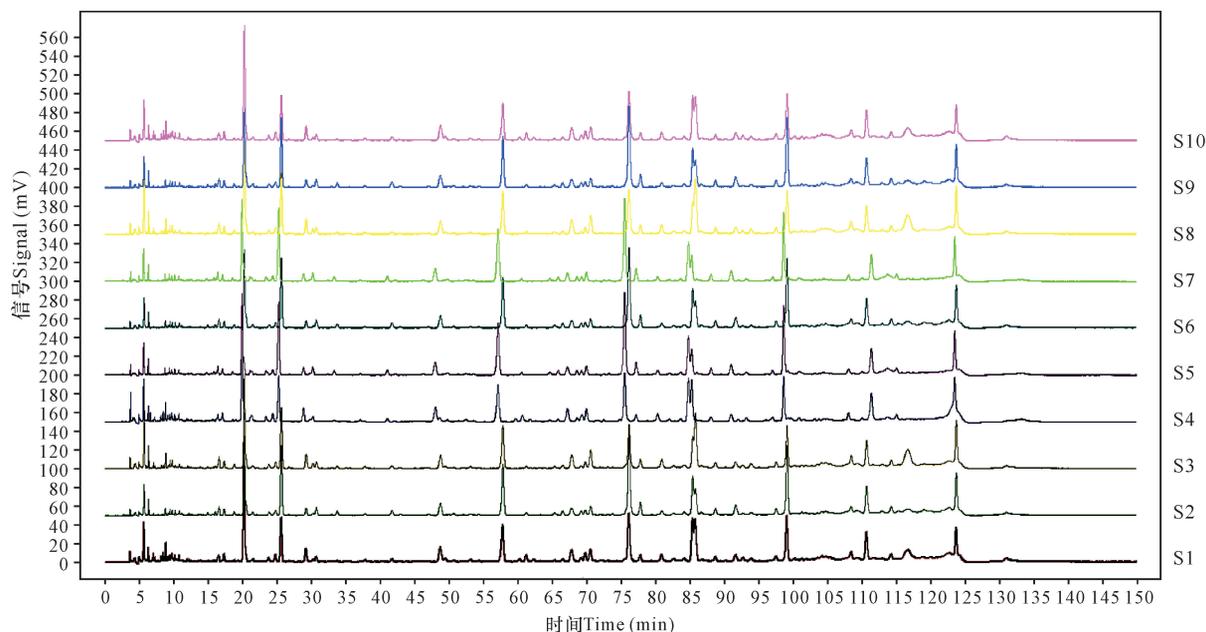


图 13 10批中华芦荟叠加色谱图

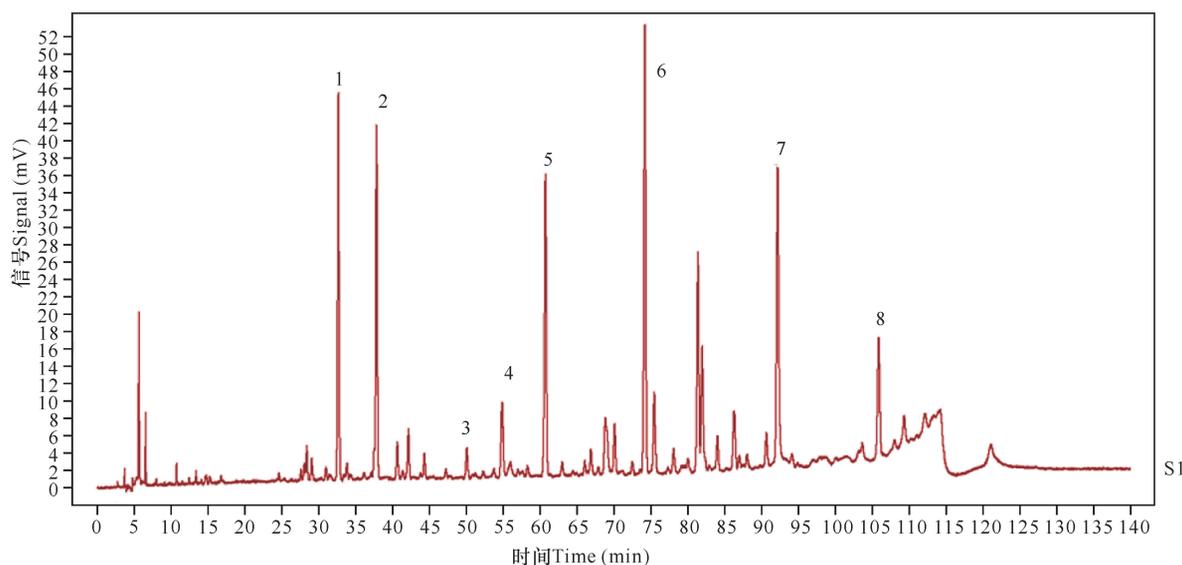
Fig. 13 chromatogram of 10 batches of *Aloe vera* L. var. *chinensis*

图 14 共有模式建立对照指纹色谱图

Fig. 14 Establishment of reference fingerprint chromatogram in common mode

占比 4.03% ~ 8.84%; 共有峰的面积占比为 91.16% ~ 95.97%, 说明实验方法重现性较好。

3 结论

本实验以实验所得的条件(色谱柱为 Phenomenon C_{18} ($5\ \mu\text{m}$, $250\ \text{mm} \times 4.6\ \text{mm}$), 表 3 的流动相, 检测波长为 280 nm, 柱温为 25°C , 进样量 $20\ \mu\text{L}$, 流速 $0.8\ \text{mL}/\text{min}$, 理论塔板数大于 5 000, 分离度大于 1.5) 为指纹图谱色谱条件。采用《中国药典》颁布的

指纹图谱相似度评价(2012.1 版本)软件对中华芦荟 10 批不同产地进行匹配, 以 1 号药材样品作为参照图谱, 4 号峰作为参照色谱峰, 建立中华芦荟药材 HPLC 指纹图谱, 其相似度较好, 各批药材指纹图谱间的相似度平均在 0.9 以上。HPLC 指纹图谱标定 8 个共有峰。本法 HPLC 指纹图谱的建立, 可为今后广西产中华芦荟的质量标准制定提供参考。但本研究的芦荟仅仅是广西产的, 如要建立中华芦荟指纹图谱的质量标准, 尚需采集全国各产地的中华芦荟并进

行研究,这为进一步的研究提够参考。

参考文献

- [1] 丁晨,郭彬歆,徐琛. 中华芦荟多糖的提取精制和含量测定研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(28): 14008-14011.
- [2] 付小兰. 芦荟凝胶稳定化技术的研究现状[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(17): 4411, 4450.
- [3] 黄河,金茜,向文艺,等. 芦荟叶片中 Cu、Zn 元素含量的分析[J]. 南方园艺, 2019, 30(4): 5-7.
- [4] 张强,崔君,顾华,等. 化妆品中芦荟苷的测定及其稳定性的研究[J]. 日用化学工业, 2019, 49(3): 199-203.
- [5] 乐胜锋,王尉,王雅萱,等. 离子色谱-脉冲安培法测定芦荟多糖中 7 种单糖的含量[J]. 色谱, 2019, 37(3): 319-324.
- [6] 林奕云,郑家概,付强,等. UPLC-MS/MS 法测定植物饮料中芦荟苷含量[J]. 山东化工, 2019, 48(12): 66-68.
- [7] 文花,刘燕,董武,等. HPLC 法同时测定蒙药给喜古讷-6 中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量[J]. 中国民族医药杂志, 2019, 25(8): 41-43.
- [8] 吴旭. HPLC-MS/MS 法测定新复方芦荟胶囊中芦荟苷的含量[J]. 中国药物评价, 2018, 35(5): 366-338.
- [9] 庄志宏,吴剑坤,姜迪,等. HPLC 测定芙蓉散中芦荟大黄素和大黄酸的含量[J]. 首都食品与医药, 2019, 26(10): 174-175.
- [10] 王松,容艳芬,陈智国,等. HPLC 法测定复方芦荟维 U 片中芦荟苷含量[J]. 亚太传统医药, 2019, 13(7): 30-32.
- [11] 饶楠楠,张强,顾华,等. 高效液相色谱同时测定芦荟中 8 种蒽醌类物质的含量[J]. 分析试验室, 2018, 37(6): 720-725.
- [12] 李恒,刘冬云,唐孟秋,等. UPLC-ESI- MS 同时测定大鼠血浆中芦荟大黄素等 7 种成分的含量[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(24): 2865-2869.
- [13] 黄红泓,丘琴,甄丹丹,等. 不同产地龙利叶 HPLC 指纹图谱研究[J]. 广西师范大学学报: 自然科学版, 2019, 37(3): 142-147.
- [14] 周曙光,甄丹丹,陈明伟,等. 玉米苞叶 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 广西中医药, 2019, 42(2): 65-71.

Study on the Fingerprint of *Aloe vera* L. var. *chinensis* from Guangxi

HE Ling¹, ZHEN Dandan², MO Huanheng³, HE Liuyan³, ZHANG Miao², ZHEN Hanshen²

(1. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, 530003, China; 2. Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, 530001, China; 3. Guangxi Health College, Nanning, Guangxi, 530023, China)

Abstract: This article aims to establish an HPLC fingerprint of *Aloe vera* L. var. *chinensis* from Guangxi. Taking *Aloe vera* L. var. *chinensis* from Guangxi as the research object, HPLC fingerprint analysis method was used to analyze the fingerprint of *Aloe vera* L. var. *chinensis* from different areas in Guangxi. As a result, the fingerprints of the 10 batches of *Aloe vera* L. var. *chinensis* medicinal materials had good similarity, and the average value of similarity between the fingerprints of each batch of medicinal materials was above 0.9. Eight common peaks were identified by HPLC fingerprint. The establishment of the HPLC fingerprint with this method can provide a preliminary reference for the formulation of quality standards of *Aloe vera* L. var. *chinensis* in Guangxi.

Key word: *Aloe vera* L. var. *chinensis*, Guangxi, HPLC, fingerprints, quality standard

责任编辑:米慧芝