



紫金砂药材的指纹图谱研究

卢金清, 王琴*, 许家琦, 何冬黎, 阮小云, 胡晓燕

(湖北中医药大学, 湖北 武汉 430065)

[摘要] 目的:建立紫金砂药材的高效液相指纹图谱方法。方法:采用 Kromasil 100A C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),以乙腈-水为流动相梯度洗脱,流速为 1 mL · min⁻¹,检测波长为 254 nm。以异欧前胡素为参照物,对 10 批紫金砂药材进行指纹图谱分析。结果:建立了紫金砂的 HPLC 指纹图谱共有模式,标定了 8 个共有峰,10 批药材的相似度均 >0.9。结论:该方法简便、准确、重复性好,为紫金砂药材的品质评价和质量控制标准的制定提供科学依据。

[关键词] 紫金砂;HPLC;指纹图谱

紫金砂是伞形科当归属植物拐芹 *Angelica polymorpha* Maxim. 的干燥根。其性味苦、寒,归肺、脾、胃经。为我国湖北神农架地区常用中草药,治疗胃痛疗效确切,在神农架地区和土家族中享有盛誉。民间主要用其治疗感冒鼻塞、胃痛、风湿关节痛及腹痛等^[1]。紫金砂中主要含有香豆素、挥发油、黄酮、生物碱等化学成分。目前尚未有紫金砂指纹图谱的相关研究报道,本实验采用 HPLC 对紫金砂进行了指纹图谱的研究,为其质量控制提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

高效液相色谱仪 DIONEX-ULTIMATE 3000, Kromasil 100A C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);UP520H 超声波清洗机(熊猫集团南京电子计量有限公司);电子天平(Storsorius BSI 型, d = 0.01 mg, 北京赛多利斯天平有限公司)。

1.2 试剂

对照品异欧前胡素(自制,经过 HPLC 峰面积归一化法测定纯度为 98.68%),对照品没药烷吉酮(自制,经过 HPLC 峰面积归一化法测定纯度为 99.04%),样品紫金砂 10 批次药材采自神农架地区,由中国科学院武汉植物园赵子恩教授鉴定为伞形科植物当归属植物拐芹 *A. polymorpha* 的根,药材来源见

表 1。甲醇为分析纯,乙腈为色谱纯,水为蒸馏水。

表 1 紫金砂药材来源

Table 1 Origins of Zijinsha

| No. | 采集时间 | 采集地点 |
|--------|--------|--------|
| 080801 | 2008-8 | 神农架红坪镇 |
| 080802 | 2008-8 | 神农架红坪镇 |
| 080803 | 2008-8 | 神农架红坪镇 |
| 080804 | 2008-8 | 神农架红坪镇 |
| 080805 | 2008-8 | 神农架板仓 |
| 090801 | 2009-8 | 神农架红坪镇 |
| 090802 | 2009-8 | 神农架红坪镇 |
| 090803 | 2009-8 | 神农架木鱼镇 |
| 090804 | 2009-8 | 神农架木鱼镇 |
| 090905 | 2009-8 | 神农架板仓 |

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Kromasil 100A C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);以乙腈-水为流动相梯度洗脱;流速 1 mL · min⁻¹;柱温 25 °C;检测波长 254 nm;进样量 10 μL;分析时间 60 min。梯度洗脱程序见表 2。

表 2 梯度洗脱程序

Table 2 The gradient elution procedure

| t/min | 流动相 A-水/% | 流动相 B-乙腈/% |
|-------|-----------|------------|
| 0~5 | 78 | 22 |
| 5~10 | 78~57 | 22~43 |
| 10~25 | 57 | 43 |
| 25~35 | 57~35 | 43~65 |
| 35~40 | 35 | 65 |
| 40~45 | 35~0 | 65~100 |
| 45~60 | 0 | 100 |

[稿件编号] 20110705007

[基金项目] 湖北省教育厅项目(2009Z001)

[通信作者] * 卢金清, 教授, 主要从事中药及其制剂有效成分的研究, Tel: (027) 68890109, E-mail: ljqs9169@sohu.com

[作者简介] 王琴, 硕士研究生, Tel: 13407191812, E-mail: Cynthia.16@163.com



2.2 对照品溶液的制备

精密称定异欧前胡素对照品适量,加甲醇制成质量浓度为 $45 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液,用微孔滤膜($0.45 \mu\text{m}$)过滤,即为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

精密称定紫金砂粉末(40目)0.25 g,置于50 mL量瓶中,加入甲醇20 mL,超声处理45 min,取出,放冷,用甲醇稀释至刻度,摇匀,过滤,取续滤液,用微孔滤膜($0.45 \mu\text{m}$)过滤,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验

取同一批次样品(080801),按2.3项下制备供试品溶液,在2.1项的色谱条件下重复进样5次,记录色谱图,结果表明,各共有峰的相对保留时间和相对峰面积无显著差异,其RSD均小于3%,表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验

取同一批样品(080801)适量,按2.3项下制备供试品溶液,分别在0, 2, 4, 8, 16, 24, 36 h进样分析,结果表明,各共有峰的相对保留时间和相对峰面积无显著差异,其RSD均小于3%,表明该供试品在36 h内基本稳定。

2.4.3 重复性试验

取同一批次样品(080801)5份,按2.3项下制备供试品溶液,进样分析,记录色谱图,结果表明,各共有峰的相对保留时间和相对峰面积无显著差异,其RSD均小于3%,表明该法重复性良好。

2.5 指纹图谱的建立

精密吸取10批供试品溶液适量,在上述色谱条件下进行测定,分析色谱图。根据10批供试品测定结果给出的峰数、峰值(积分值)和峰位(相对保留时间)等相关参数,通过分析比较制定出优化的指纹图谱,见图1, 2。

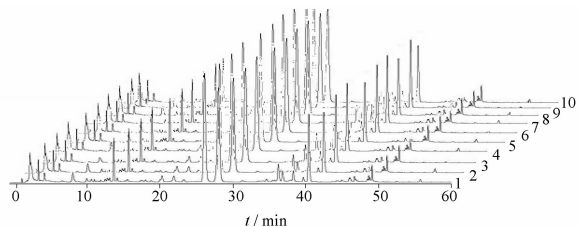


图2 10批次紫金砂药材指纹图谱

Fig. 2 Fingerprint of 10 batches of Zijinsha

2.6 指纹图谱的分析与评价

紫金砂高效液相色谱法可分离出近20个色谱峰,通过与参照物对照比较所有测定记录的色谱图,最终选取其中8个共有峰作为指纹图谱的特征峰。1~8号共有峰的保留时间(min)/峰面积依次为8.08/4.253, 13.69/9.102, 26.16/65.396, 28.05/65.925, 36.28/6.486, 36.84/3.748, 38.33/3.508, 40.46/25.605。

2.6.1 共有指纹峰的标定

根据10批次供试品的测定结果来标定共有指纹峰。紫金砂HPLC指纹图谱中,共有指纹峰有8个。与异欧前胡素参照物(为8号峰)相比,其他7个共有指纹峰相对保留时间依次为0.199, 0.338, 0.647, 0.693, 0.897, 0.911, 0.947。

2.6.2 共有指纹峰面积比

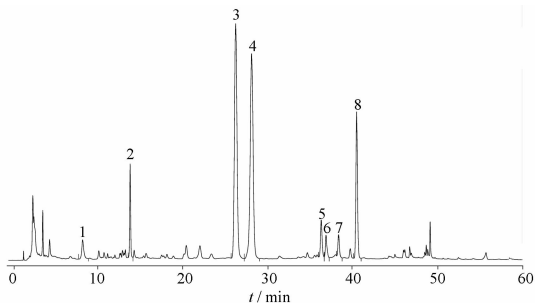
8个共有峰的总面积占整个峰面积的85%以上。

2.6.3 相似度评价

将所得的图谱数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价软件,经过选峰,设定其匹配模板,将谱峰进行自动匹配;设定标准模板,进行谱峰差异性评价和整体相似性评价;通过中药指纹图谱相似度计算软件得出紫金砂HPLC指纹图谱共有模式,经过与共有模式比较,湖北省神农架地区的10批紫金砂的共有峰的相对保留时间以及相对峰面积差别均较小。10批紫金砂药材的相似度大于0.90,说明10批次的相关性良好,见表3, 4。

3 讨论

本实验对供试品的制备及色谱条件进行了筛选。通过对不同提取溶媒、提取方法进行实验考察,结果表明甲醇提取率最高,超声法比回流法的提取效率高。按拟定的供试品制备方法操作,所得指纹图谱出峰数目多,因此选取甲醇超声提取作为制样方法。经实验比较,乙腈与水梯度洗脱,能使样品中色谱峰达到较好的分离且出峰最多;同时还对检测



3. 没药烷吉酮;8. 异欧前胡素。

图1 紫金砂药材指纹图谱

Fig. 1 Fingerprint of Zijinsha



表3 10批神农架产地紫金砂指纹图谱个共有峰的相对保留时间

Table 3 Relative retention time of common peaks for ten batches of Zijinsha grown in Shennongjia

| 峰号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 均值 | RSD/% |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 0.196 | 0.193 | 0.195 | 0.197 | 0.194 | 0.199 | 0.197 | 0.191 | 0.194 | 0.192 | 0.195 | 1.2 |
| 2 | 0.335 | 0.331 | 0.337 | 0.334 | 0.339 | 0.328 | 0.329 | 0.335 | 0.336 | 0.338 | 0.334 | 1.1 |
| 3 | 0.646 | 0.641 | 0.645 | 0.649 | 0.643 | 0.637 | 0.639 | 0.647 | 0.645 | 0.649 | 0.644 | 0.63 |
| 4 | 0.693 | 0.682 | 0.689 | 0.685 | 0.692 | 0.695 | 0.699 | 0.691 | 0.695 | 0.698 | 0.692 | 0.78 |
| 5 | 0.897 | 0.891 | 0.886 | 0.894 | 0.898 | 0.891 | 0.893 | 0.899 | 0.894 | 0.898 | 0.894 | 0.45 |
| 6 | 0.910 | 0.902 | 0.925 | 0.926 | 0.905 | 0.908 | 0.916 | 0.912 | 0.921 | 0.928 | 0.915 | 1.0 |
| 7 | 0.945 | 0.932 | 0.938 | 0.946 | 0.949 | 0.958 | 0.953 | 0.957 | 0.941 | 0.946 | 0.947 | 0.87 |
| 8(S) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |

表4 10批神农架产地紫金砂指纹图谱个共有峰的相对峰面积

Table 4 Relative peak areas of common peaks for ten batches of Zijinsha grown in Shennongjia

| 峰号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 均值 | RSD/% |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 0.163 | 0.158 | 0.165 | 0.168 | 0.169 | 0.164 | 0.166 | 0.162 | 0.165 | 0.169 | 0.165 | 2.1 |
| 2 | 0.352 | 0.345 | 0.354 | 0.356 | 0.354 | 0.359 | 0.358 | 0.348 | 0.352 | 0.359 | 0.354 | 1.3 |
| 3 | 2.543 | 2.539 | 2.545 | 2.547 | 2.548 | 2.542 | 2.545 | 2.543 | 2.549 | 2.551 | 2.545 | 0.14 |
| 4 | 2.571 | 2.564 | 2.576 | 2.579 | 2.579 | 2.568 | 2.574 | 2.571 | 2.576 | 2.578 | 2.573 | 0.19 |
| 5 | 0.251 | 0.246 | 0.253 | 0.256 | 0.258 | 0.255 | 0.257 | 0.251 | 0.253 | 0.259 | 0.254 | 1.5 |
| 6 | 0.142 | 0.139 | 0.144 | 0.146 | 0.148 | 0.142 | 0.145 | 0.141 | 0.143 | 0.148 | 0.144 | 2.1 |
| 7 | 0.134 | 0.131 | 0.136 | 0.138 | 0.139 | 0.134 | 0.136 | 0.133 | 0.136 | 0.139 | 0.136 | 1.9 |
| 8(S) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |

波长进行了选择,样品经甲醇溶解后,分别在210, 230,248,254,310 nm处检测,紫金砂含有的主要活性成分为异欧前胡素、欧前胡素等香豆素类物质以及没药烷吉酮等,为兼顾基线平稳,分离度高,异欧前胡素以及没药烷吉酮均有较强的吸收,因而选择254 nm作为检测波长;样品色谱图显示,在60 min后基本无特征峰出现,所以分析时间定为60 min。

经过相似度分析,表明湖北省神农架10批次紫金砂的相似度较高均在0.91~0.99,10批次紫金砂间的相关性良好,不同年份的紫金砂药材指纹图谱无显著性差异,证明10批紫金砂样品品质基本一致。

中药成分复杂,药效的发挥强调整体性,相对而言中药指纹图谱技术可以较全面地反映中药化学成分的种类与数量,进而反映中药的质量和中医用药所体现的整体疗效,因而随着现代分析技术的发展,中药指纹图谱技术已成为当今国际公认的控制中药质量的质控模式^[2-5]。紫金砂为我国神农架地区常用中草药,在神农架地区和土家族中享有盛誉,单以指标成分的定性、定量分析结果难以对其品质进行

全面的评价,为确保紫金砂品质,本实验对湖北省神农架地区的紫金砂HPLC指纹图谱的构建进行了初步探讨,10批紫金砂药材各主要色谱峰相对保留时间基本一致,并且所含成分基本相同,符合指纹图谱的要求。从整体色谱图入手,选取其中8个较明显且分离度高的共有峰构成紫金砂药材的指纹图谱。实验证明,该方法稳定易行,为评价和控制紫金砂药材内在质量提供科学依据。

[参考文献]

[1] 陈昌彪,万定荣. 湖北省土家族常用植物药(伞形科)[J]. 中国民族民间医药杂志,2006,15(6): 354.
 [2] 任德全. 中药指纹图谱质控技术的意义与作用[J]. 中药新药与临床药理,2001,3:135
 [3] 屠鹏飞. 中药指纹图谱制度的方法学探讨[C]. 广州:国际色谱指纹图谱评价中药质量研讨会, 2001.
 [4] Lazarowych N J, Peter P. Use of fingerprinting and marker compounds for identification and standardization of botanical drugs: strategies for applying pharmaceutical HPLC analysis to herbal products[J]. Drug Inf J,1998, 32(2): 497.
 [5] Bauer R. Quality criteria and phytopharmaceutical; can acceptable drug standards be achieved[J]. Drug Inf J,1998, 32: 101.



Fingerprint of *Angelica polymorpha* by HPLC

LU Jinqing, WANG Qin*, XU Jiaqi, HE Dongli, RUAN Xiaoyun, HU Xiaoyan
(Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the HPLC fingerprint of *Angelica polymorpha*. **Method:** The 10 batches of *A. polymorpha* were measured by HPLC with isoimperatorin as a reference substance and the chromatographic experiments were performed on Kromasil 100A C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), eluted with acetonitrile and water as mobile phase in gradient mode. The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹ and the detection wavelength was 254 nm. **Result:** The common mode of the HPLC fingerprints were set up. There were 8 common peaks in the fingerprint of 10 samples, and the similarity of the 10 samples was more than 0.9. **Conclusion:** The method is simple, accurate and have a good reaptability. The quality of *A. polymorpha* can be controlled effectively by the HPLC fingerprint.

[Key words] *Angelica polymorpha*; HPLC; fingerprint

doi:10.4268/cjmm20120631

[责任编辑 孔晶晶]

2012 海峡两岸暨 CSNR 全国第十届中药及天然药物资源学术研讨会通知(第1轮)

2012 海峡两岸暨 CSNR 全国第十届中药及天然药物资源学术研讨会拟定于 2012 年 8 月 3-6 日在甘肃兰州市召开,会期 4 天。本届学术研讨会由 CSNR 天然药物资源专业委员会、中国药材 GAP 研究促进会(香港)、甘肃省人民政府主办,甘肃中医学院、兰州大得利生物化学制药有限公司、南京中医药大学承办。现在开始进行学术研讨会报名和学术论文征集工作。会议的具体事项将在第 2 轮通知中发出。欢迎踊跃报名参加本次会议!

一、时间

2012 年 8 月 3~6 日。研讨会报名及论文提交截止时间:2012 年 6 月 30 日。

二、地点

会议地点为甘肃省兰州市,专题调研及生产基地考察为甘肃省陇南和定西地区。

三、主题

政产学研结合,促进中药材规范化生产与中药资源科学利用和可持续发展——甘肃陇药发展及中医药文化产业论坛

四、交流研讨内容

①中药及天然药物资源调查与保护利用;②中药材规范化生产(GAP)与产业化发展;③中药及天然药物资源化学研究与综合利用;④中医药文化传播与产业化;⑤中药及天然药物资源学科建设与人才培养。

五、组织形式

1. 学术研讨会开幕式和大会特邀报告,届时将邀请我国中药及天然药物资源科学领域院士、著名专家和主管部门领导到会并作学术报告。2. 分会场学术交流(①中药资源调查与保护利用;②中药材规范化生产(GAP)与产业化发展;③中医药文化传播与产业化三个分会场)。3. 大会期间组织赴甘肃省陇南和定西地区中药材 GAP 基地考察。4. 会议期间将召开第五届中国自然资源学会天然药物资源专业委员会委员、第三届中国药材 GAP 研究促进会(香港)委员及《中国现代中药》编委会委员会议,请委员、委员单位准时参会,不另行文。

六、联系方式

江苏省南京仙林大学城仙林大道 138 号,南京中医药大学药学院 CSNR 天然药物资源专业委员会办公室;邮政编码:210046;电子信箱:tryw2010@126.com。联系人:单鸣秋;15951802806,严辉;13512537853。

详情请登录中国中药杂志网站 www.cjmm.com.cn 查询。