

川芎的UPLC指纹图谱研究[△]

马天成^{1*}, 崔思娇¹, 张靓琦¹, 范旭航¹, 毕开顺², 贾英^{1#}(1.沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110016; 2.沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

中图分类号 R284.1; R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)15-1389-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.15.16

摘要 目的: 建立川芎的超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱。方法: 色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T3(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 流动相为甲醇-0.03%磷酸水(梯度洗脱), 检测波长为 274 nm, 流速为 0.35 ml/min, 柱温为 30 ℃。结果: 首次建立了川芎的 UPLC 指纹图谱共有模式, 标定了 18 个共有峰, 结合保留时间和紫外光谱分析, 指认了咖啡酸、香草醛、阿魏酸、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H、丁基苯酞、藁本内酯和丁烯基苯酞的峰位。14 批川芎药材中有 12 批的相似度在 0.900 以上。结论: 该方法快速、高效, 可用于川芎的质量评价。

关键词 川芎; 超高效液相色谱法; 指纹图谱

Study on UPLC Fingerprints of *Ligusticum chuanxiong*

MA Tian-cheng¹, CUI Si-jiao¹, ZHANG Liang-qi¹, FAN Xu-hang¹, BI Kai-shun, JIA Ying¹(1.School of TCM, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish UPLC fingerprint of *Ligusticum chuanxiong*. METHODS: The determination was performed on ACQUITY UPLC HSS T3(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) column with mobile phase consisted of methanol-0.03% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 0.35 ml/min. The detection wavelength was set at 274 nm, and column temperature was 30 ℃. RESULTS: The common mode of UPLC fingerprint of *L. chuanxiong* was set up firstly. There were 18 common peaks in the fingerprints. Caffeic acid, vanillin, ferulic acid, senkyunolide I, senkyunolide H, butylphthalide, ligustilide and butylidene-phthalide were identified by comparing the retention time and their ultraviolet spectra. The similarity of 14 batches of *L. chuanxiong* was more than 0.900, except for 2 batches of samples. CONCLUSION: The method is rapid and efficiency. It can be used for the quality evaluation of *L. chuanxiong*.

KEY WORDS *Ligusticum chuanxiong*; UPLC; Fingerprints

川芎是伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎, 为我国传统中药材, 应用历史悠久。它具有活血行气、祛风止痛之功效, 用于治疗胸痹心痛、胸肋刺痛、跌扑肿痛、月经不调、经闭痛经、症瘕腹痛、头痛、风湿痹痛等证^[1]。据文献^[2-3]报道, 川芎中含有苯酞类衍生物、生物碱和酚酸类等化学成分。目前, 有关川芎指纹图谱研究方法的文献报道^[4-6]存在操作时间较长、指认的共有峰数不足等缺点。而超高效液相色谱(UPLC)法具有分析速度快、分离度好、所需流动相少等优点, 适合建立中药指纹图谱^[7]。因此, 本试验采用 UPLC 法研究了 14 批不同产地川芎样品 75% 甲醇提取物的指纹图谱, 并对川芎中 8 种活性成分进行了定位。本方法快速、高效, 可用于川芎的质量评价。

1 材料

1.1 仪器

ACQUITY UPLC 仪, 包括四元高压梯度泵、真空脱气机、

△ 基金项目: 辽宁省教育厅高等学校科研项目(No.2009T097)

* 硕士研究生。研究方向: 中药药效物质基础与质量控制。电话: 024-23986296。E-mail: matiancheng2@126.com

通信作者: 副教授, 硕士研究生导师。研究方向: 中药药效物质基础与质量控制。电话: 024-23986296。E-mail: jiayingsyphu@yahoo.com.cn

自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、Empower 2 色谱工作站(美国 Waters 公司); BP210S 电子天平(德国 Sartorius 公司); AB135-S 十万分之一天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); KQ5200B 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

咖啡酸、香草醛、阿魏酸、丁基苯酞对照品(中国食品药品检定研究院, 批号分别为 110885-200102、100491-200901、110773-201012、101035-200901); 洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H、藁本内酯和丁烯基苯酞对照品(笔者自制, 经核磁共振光谱和质谱鉴定, 采用峰面积归一化法计算, 纯度均 > 98%); 甲醇(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 磷酸(色谱纯, 天津科密欧化学试剂有限公司); 水为娃哈哈纯净水, 其他试剂均为分析纯。

1.3 药材

川芎样品来源于四川等地(详见表 1), 均经沈阳药科大学中药学院贾英副教授鉴定为真品, 密封存放于阴凉干燥处。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC HSS T3(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: 0.03% 磷酸水(A)-甲醇(B), 梯度洗脱(0~3 min, 20%~25% B; >3~7 min, 25%~58% B; >7~10 min, 58%~60% B; >10~15 min, 60%~65% B; >15~20 min,

表1 14批川芎样品来源及相似度结果

Tab 1 Origins of *L. chuanxiong*

编号	来源	相似度	编号	来源	相似度
1	四川都江堰1	0.996	8	湖北神农架	0.987
2	四川都江堰2	0.983	9	贵州	0.982
3	四川彭州1	0.995	10	沈阳天益堂药房	0.971
4	四川彭州2	0.996	11	沈阳南塔大药房	0.983
5	云南丽江	0.997	12	沈阳一致药店	0.975
6	云南楚雄	0.859	13	沈阳东北大药房	0.896
7	陕西汉中	0.994	14	沈阳四方药大药房	0.982

65%~80% B; >20~24 min, 80%~80% B); 流速: 0.35 ml/min; 柱温: 30 °C; 检测波长: 274 nm; 进样量: 2 μl。

2.2 对照品溶液的制备

取咖啡酸、香草醛、阿魏酸、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H、丁基苯酚、藁本内酯和丁烯基苯酚对照品各适量, 精密称定, 分别加甲醇溶解制成适当质量浓度的对照品贮备液。吸取上述对照品贮备液各适量, 置同一 10 ml 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得咖啡酸、香草醛、阿魏酸、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H、丁基苯酚、藁本内酯和丁烯基苯酚质量浓度分别为 6.624、3.828、353.6、162.8、37.63、83.5、1 084、142.8 μg/ml 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

分别取不同产地的川芎, 粉碎过 50 目筛, 取约 0.5 g 粉末, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 75% 甲醇 50 ml, 称定质量, 超声处理(功率: 250 W, 频率: 33 kHz) 30 min, 放冷至室温, 再称定质量, 用 75% 甲醇补足失质量, 摇匀, 静置, 取上清液, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一供试品溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 测定。结果表明, 各共有峰与内参比峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 5.0%, 表明本方法精密度良好, 符合指纹图谱技术要求。

2.4.2 重复性试验 分别取同一批川芎样品适量, 共 6 份, 精密称定, 分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 照“2.1”项下色谱条件进样分析。结果表明, 各共有峰与内参比峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 5.0%, 表明本方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一供试品溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件分别于 0、2、4、6、8、12 h 进样测定。结果表明, 各共有峰与内参比峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 5.0%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.5 样品测定

取 14 批川芎样品, 分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 照“2.1”项下色谱条件依次进样检测, 记录色谱图。结果, 共获得 18 个共有峰, 指认了其中 8 个, 分别为咖啡酸(3号峰)、香草醛(4号峰)、阿魏酸(5号峰)、洋川芎内酯 I(6号峰)、洋川芎内酯 H(7号峰)、丁基苯酚(11号峰)、藁本内酯(14号峰)和丁烯基苯酚(15号峰)。川芎的 UPLC 图见图 1。

2.6 川芎指纹图谱的建立

2.6.1 内参比峰的选择 在各批次样品的指纹图谱中, 14 号峰为川芎主要活性成分藁本内酯的色谱峰, 分离度良好, 保留时间适中, 峰面积较大且为共有峰, 故确定其为内参比峰。

2.6.2 系统聚类分析 将 14 批川芎样品各色谱峰峰面积相对

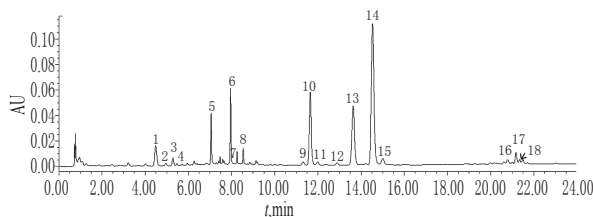


图1 川芎的 UPLC 图

Fig 1 UPLC chromatograms of *L. chuanxiong*

于称样量量化, 得到 14×18 矩阵; 应用 SPSS 16.0 统计软件对其进行系统聚类分析, 采用类间平均锁链法 (Between-groups linkage), 以夹角余弦 (Cosine) 作为样品相似性的测度, 可将 14 批川芎样品分为两大类。聚类分析结果见图 2。

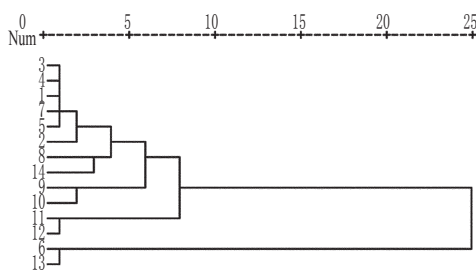


图2 川芎的聚类分析结果

Fig 2 Hierarchical clustering analysis of *L. chuanxiong*

2.6.3 共有模式的建立 结合聚类分析结果, 从 14 批川芎样品中选取第一大类的 12 批样品 (编号: 1~5、7~12、14) 的 UPLC 图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2009 版)。设定编号 1 的川芎样品 UPLC 图作为参照图谱, 自动匹配图谱峰, 利用中位数法生成对照图谱 R, 计算相似度, 得出川芎指纹图谱的共有模式, 详见图 3。

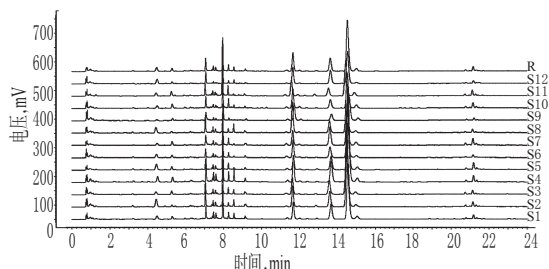


图3 12批川芎样品的 UPLC 指纹图谱

Fig 3 UPLC fingerprints for 12 batches of *L. chuanxiong*

2.6.4 相似度评价 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2009 版)对 14 批川芎样品的 UPLC 指纹图谱进行相似度评价, 结果见表 1。由表 1 可知, 相似度分析结果与系统聚类结果一致, 两种方法得到了相互验证。由相似度结果结合聚类分析和形态学鉴定结果判定, 相似度在 0.900 以上的样品可作为推荐品, 0.900 以下(编号: 6、13)的为非推荐品。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

通过对川芎供试品溶液进行全波长扫描发现, 大部分成分在 274 nm 波长下有较好吸收, 且基线平稳, 各色谱峰峰形较好, 出峰个数较多, 因此选定 274 nm 为指纹图谱检测波长。本试验考察了乙腈-水、乙腈-0.03% 磷酸水、甲醇-水和甲醇-0.03% 磷酸水等流动相系统, 最终选择甲醇-0.03% 磷酸水作为流动相梯度洗脱, 各色谱峰的峰形较好, 能达到基线分

鼠曲草饮片的RP-HPLC指纹图谱研究^Δ

赵颖^{1*}, 李文¹, 李鹏², 芮海波¹, 谈瑄忠^{1#} (1.南京市中医院, 南京 210001; 2.南京海昌中药集团有限公司, 南京 210061)

中图分类号 R284.1; R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)15-1391-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.15.17

摘要 目的: 建立鼠曲草饮片的反相-高效液相色谱(RP-HPLC)指纹图谱。方法: 以绿原酸和异鼠李素为内参照物, 色谱柱为YMC-Pack ODS-A(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为0.1%磷酸水溶液-乙腈(梯度洗脱), 流速为1.0 ml/min, 检测波长为320 nm, 柱温为35 ℃。结果: 在RP-HPLC指纹图谱中确立了20个共有峰, 建立了鼠曲草饮片的共有模式。10批鼠曲草饮片的相似度均大于0.900。结论: 该方法简便、准确、重复性好, 可为鼠曲草饮片的质量评价提供依据。

关键词 鼠曲草; 指纹图谱; 反相-高效液相色谱法; 绿原酸; 异鼠李素

Study on RP-HPLC Fingerprints of *Gnaphalium affine* Decoction Pieces

ZHAO Ying¹, LI Wen¹, LI Peng², RUI Hai-bo¹, TAN Xuan-zhong¹ (1. Nanjing Hospital of TCM, Nanjing 210001, China; 2. Nanjing Haichang TCM Group Corporation, Nanjing 210061, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish RP-HPLC fingerprint of *Gnaphalium affine* decoction pieces. METHODS: Using chlorogenic acid and isorhamnetin as reference substance, the determination was performed on YMC-Pack ODS-A (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of 0.1% phosphate acid-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 320 nm, and the column temperature was 35 ℃. RESULTS: In RP-HPLC fingerprint, 20 common peaks were identified, and common model of *G. affine* tablets was established. The similarities of 10 batches were exceeded 0.9. CONCLUSION: The method is simple, accurate and reproducible, and it provide reference for quality control of *G. affine* decoction pieces.

KEY WORDS *Gnaphalium affine*; Fingerprint; RP-HPLC; Chlorogenic acid; Isorhamnetin

鼠曲草为菊科鼠曲草属植物鼠曲草 *Gnaphalium affine* Don的全草, 又名佛耳草、鼠耳、追风草, 性平, 味甘, 主要含有

黄酮、有机酸、三萜等成分^[1-3], 具有祛痰、止咳、平喘、祛风湿等功效, 可用于治疗咳嗽、痰喘和风湿痹痛等。全国各地均盛产

离。

3.2 样品提取条件的考察

采用单因素循环的方法, 分别考察了提取方式(超声, 回流)、提取溶剂(甲醇、75%甲醇、50%甲醇、25%甲醇)、溶剂量(50、100、150倍)、提取时间(20、30、40、50 min)对试验结果的影响, 以出峰个数和峰面积大小进行比较, 最终确定了文中的样品提取条件。

3.3 系统聚类分析与指纹图谱相似度评价

由聚类分析树状图可看出, 14批川芎样品被分成两大类、五小类。4批四川产道地药材(编号: 1~4)与云南丽江(编号: 5)、陕西汉中(编号: 7)非道地药材聚为第一小类, 说明四川产川芎道地药材之间的内在质量相对一致, 云南丽江和陕西汉中产川芎的质量也较好, 接近四川产道地川芎。其他产地的川芎(编号: 6、8、9)与市售统货(编号: 10~14)交织聚在其他四小类中, 说明市售统货质量一般。相似度低于0.900的2批

药材(编号: 6、13)被聚为一类, 表明系统聚类分析与指纹图谱相似度评价这两种方法的结果得到了相互验证。

综上, 本试验首次建立了川芎的UPLC指纹图谱, 可为今后有效控制川芎的质量提供依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 38.
- [2] 曹阳. 川芎质量评价方法的研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2004.
- [3] 常新亮, 马云保, 张雪梅, 等. 川芎化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(15): 1 533.
- [4] 王英婷, 韩勇. 川芎药材HPLC法指纹图谱的研究[J]. 中国药事, 2011, 25(10): 1 017.
- [5] 刘小丽, 石丽, 李华. 川芎药材HPLC指纹图谱及阿魏酸测定研究[J]. 中成药, 2011, 33(8): 1 289.
- [6] 宋金春, 胡传芹, 刘红, 等. 川芎高效液相指纹图谱的建立[J]. 中国药房, 2005, 16(9): 716.
- [4] 沈旭, 李清, 王振中, 等. 桃仁药材UPLC特征指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 718.

(收稿日期: 2012-05-14 修回日期: 2012-07-16)

^Δ 基金项目: 南京市科技发展计划资助项目(No. 201007005)

* 中药师, 硕士。研究方向: 中药饮片质量标准。电话: 025-52276123。E-mail: zhaoying12314@163.com

通信作者: 主任中药师。研究方向: 中药复方质量标准、药物经济学。电话: 025-52276121。E-mail: txz282@sohu.com