

明显损失,具有简单、快速、完全、污染小、试剂用量少、易于控制等优点。

采用 AAS 与 AFS 相结合,充分利用两法的优势,可能是目前最适于中药中痕量有害元素分析的方法。经对国家标准参考物质杨树叶中铅、镉、砷、汞的测定,结果准确度满意,标准参考物质的测定结果与其标准值,符合程度良好。文中研究可为中药材及中成药中痕量有害元素的分析测定提供参考。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国国家药典委员会. 中国药典 [S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005. 附录 IXB.
- [2] 陈家春, 贾敏如. 中、美、英、日和欧洲药典中植物药重金属和农药残留量的限量规定及分析 [J]. 华西药学期刊, 2005, 20 (6): 525 - 527.

收稿日期: 2007 - 04

羌活的 HPLC 指纹图谱

刘志刚¹, 李发美²

(1. 贵阳学院, 贵州 贵阳 550005; 2. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 建立羌活的 HPLC 指纹图谱, 评价不同来源羌活药材的内在质量。方法 采用 HPLC 梯度洗脱的方法, 用“相似度评价软件”处理分析。结果 固定产地羌活样品的相似度均在 0.90 以上, 其余样品的相似度均小于 0.80, 不同来源的羌活药材的内在质量差别较大。结论 方法的精密度、重复性和稳定性良好, 可用于羌活的真伪鉴别和质量评价。

关键词: 羌活; 高效液相色谱; 指纹图谱

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1006 - 0103 (2008) 01 - 0089 - 03

Fingerprints analysis of *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang by HPLC

LU Zhi-gang¹, LI Fa-mei²

(1. Guiyang University, Guiyang 550005, China; 2. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To develop the fingerprint of *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang by high-performance liquid chromatography and evaluate the inner qualities of samples from different habitats. **METHODS** HPLC gradient elution was applied to establish the chromatographic fingerprint and “Computer Similarity Evaluation System” was used in data analysis. **RESULTS** By using similarity calculation, the similarities of the samples from determining habitats were above 0.90 while others were less than 0.80. There were notable differences in inner qualities of the samples from different habitats. **CONCLUSION** This chromatographic fingerprint method had good precision, stability, and repeatability, and can be used for identification and quality evaluation of *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang.

Key words: *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang; HPLC; Fingerprint analysis

CLC number: R917

Document code: A

Article ID: 1006 - 0103 (2008) 01 - 0089 - 03

羌活为伞形科植物羌活 *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang 或宽叶羌活 *Notopterygium forbesii* Boiss. 的干燥根茎及根^[1], 主产于四川阿坝藏族自治州、甘肃、青海等省区。羌活具有解热镇痛、抗炎及抗过敏等作用^[2], 主要活性成分为挥发油和香豆素类^[3,4]。由于受气候、生态环境的影响, 不同生长地区羌活药材中所含化学成分有一定差异, 如果只针对单一有效成分或指标成分进行定性、定量分析, 难以全面反映药材的整体特征。目前, 指纹图谱已成为鉴别和评价中药质量的手段之一。文献^[5]报道了羌活中挥发油的 GC 指纹图谱, 鉴于羌活广

泛用于中药注射液中, 而挥发油类成分难以进入水提液中。为此, 建立了羌活药材的 HPLC 指纹图谱, 采用国家药典委员会“相似度评价软件”分析评估不同来源药材的内在质量。

1 实验部分

1.1 仪器和材料

1100 型高效液相色谱仪包括四元泵、在线脱气机、柱温箱、自动进样器、DAD 检测器 (美国 Agilent)。尿苷对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 111520 - 200201); 紫花前胡苷对照品 (自制,

基金项目: 国家科技攻关计划课题 (2001BA701A56) 子课题

作者简介: 刘志刚 (1976 -), 男, 讲师, 硕士, 从事药物分析教学与相关研究工作。E-mail: zhi_gang_liu@163.com

经光谱及色谱法检测,纯度为 98.0%);甲醇为色谱纯;磷酸、氢氧化钠为分析纯;水为重蒸水;收集羌活药材共 14 批,经沈阳药科大学孙启时教授鉴定为 *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang 的根茎。

1.2 方法与结果

1.2.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (200 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相 A 相为甲醇, B 相为 0.2% 磷酸水溶液 (10% 的氢氧化钠溶液调 pH3.5), 梯度洗脱程序: 0~16 min, 流动相 A 由 0~20%, 流动相 B 由 100%~80%; 16~60 min, 流动相 A 由 20%~65%, 流动相 B 由 80%~35%, 维持 5 min; 流速 1.0 ml·min⁻¹, 检测波长 254 nm, 进样量 20 μl。

1.2.2 溶液的制备 精密称取 0.5 g 60 干燥的羌活药材粉末, 加水回流提取 (15 ml ×3, 每次 1 h), 滤过, 合并滤液, 以重蒸水定容于 50 ml 量瓶中, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 即得供试品溶液。取紫花前胡苷对照品适量, 精密称定, 加少量甲醇溶解并用重蒸水制成 20 μg·ml⁻¹ 的对照品溶液。

1.2.3 精密度试验 取同一供试品溶液, 在“1.2.1 项条件下, 连续进样 5 次, 记录指纹图谱, 依据国家药典委员会制订的《中药注射剂色谱指纹图谱实验研究技术指南 (试行)》的要求, 以紫花前胡苷峰为参照峰, 计算指纹图谱中各共有峰的相对保留时间及相对峰面积, 结果各共有峰的相对保留时间的 RSD 均小于 3.0%, 单峰面积占总峰面积大于 10% 的共有峰的相对峰面积的 RSD 均小于 5.0%, 采用国家药典委员会“相似度评价软件”进行评价, 相似度均不小于 0.95, 符合指纹图谱要求。

1.2.4 重复性与稳定性试验 取同一批羌活药材

5 份, 分别制备供试品溶液, 在“1.2.1 项条件下测定指纹图谱, 结果各共有峰的相对保留时间的 RSD 均小于 3.0%, 单峰面积占总峰面积大于 10% 的共有峰的相对峰面积的 RSD 均小于 5.0%, 相似度均不小于 0.95, 符合指纹图谱要求。取同一供试品溶液, 分别在 0、3、8、12、24 h 按“1.2.1 项条件测定指纹图谱, 供试品溶液放置 16 h 内相对保留时间的 RSD 均小于 3.0%, 单峰面积占总峰面积大于 10% 的共有峰的相对峰面积的 RSD 均小于 5.0%, 但从 24 h 起, 色谱峰面积明显缩小, 有的峰缺失, 表明羌活供试品溶液可以稳定存放 16 h。

1.2.5 指纹图谱及技术参数 分别取不同来源的羌活药材, 按“1.2.2 项方法制备供试品溶液, 进样, 记录 75 min 的 HPLC 谱 (图 1), 根据结果建立了羌活药材的色谱指纹图谱共有模式, 标定了 17 个共有峰, 其中 7 号峰为绿原酸, 11 号峰为阿魏酸, 13 号峰为紫花前胡苷, 以 13 号峰紫花前胡苷为参照物, 计算 1~17 各共有峰的 k_r 分别为 0.09、0.19、0.22、0.31、0.33、0.41、0.56、0.59、0.73、0.79、0.89、0.91、1.00、1.15、1.22、1.30、1.64 min。

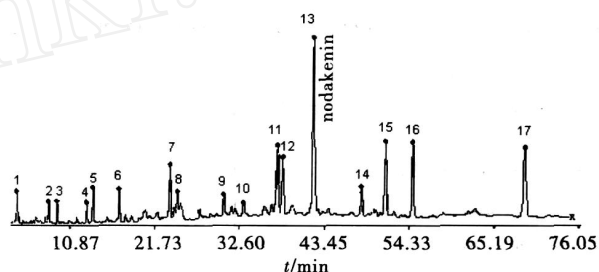


图 1 羌活药材色谱指纹图谱共有模式

Fig 1 Standard fingerprint chromatogram of *Notopterygium incisum*

表 1 不同来源羌活样品共有峰的相对保留时间

Table 1 Relative retention time of common peaking sin HPLC - FPS of *Notopterygium incisum* samples from different sources

Peak No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	0.09	0.09	0.10	0.09	0.09	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.09	0.09	0.09	0.09
2	0.19	0.19	0.19	0.19	0.20	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19	0.20	0.20	0.19	0.20
3	0.22	0.22	0.22	0.22	0.23	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.23	0.23	0.22	0.22
4	0.31	0.31	0.31	0.31	0.32	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.32	0.32	0.31	0.31
5	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.34	0.34	0.33	0.33
6	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.42	0.42	0.41	0.41
7	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56	0.57	0.57	0.56	0.56
8	0.59	0.59	0.59	0.58	0.58	0.59	0.59	0.59	0.59	0.59	0.60	0.60	0.58	0.59
9	0.73	0.73	0.73	0.73	0.72	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73	0.74	0.74	0.73	0.72
10	0.79	0.79	0.79	0.79	0.80	0.79	0.79	0.79	0.79	0.79	0.81	0.81	0.80	0.79
11	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	0.90	0.89	0.89	0.89
12	0.91	0.91	0.91	0.90	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	0.92	0.92	0.91	0.91
13	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
14	1.15	1.15	1.15	1.15	1.13	1.15	1.15	1.15	1.15	1.15	1.16	1.16	1.15	1.14
15	1.22	1.22	1.22	1.22	1.22	1.22	1.22	1.22	1.22	1.22	1.24	1.24	1.22	1.23
16	1.30	1.30	1.30	1.30	1.29	1.30	1.30	1.30	1.30	1.30	1.32	1.31	1.30	1.29
17	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64	1.66	1.65	1.65	1.64

1.2.6 指纹图谱相对保留时间和相对峰面积 以参照物紫花前胡苷 (13号峰)的 k_r 为 1,计算不同来源药材中各共有峰的 k_r 比值 (表 1)。以参照物紫

花前胡苷 (13号峰)的相对峰面积为 1,计算不同来源药材中各共有峰的相对峰面积比值 (表 2)。

表 2 不同来源羌活样品共有峰的相对峰面积

Table 2 Relative peak area of common peaks in HPLC - FPS of *Notopterygium incisum* samples from different sources

Peak No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	0.12	0.17	0.16	0.10	0.16	0.12	0.12	0.12	0.12	0.11	0.32	0.41	0.21	0.13
2	0.09	0.09	0.13	0.06	0.09	0.06	0.07	0.06	0.06	0.05	0.11	0.23	0.11	0.09
3	0.06	0.08	0.11	0.06	0.08	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.18	0.05	0.12	0.13
4	0.07	0.09	0.11	0.08	0.12	0.06	0.06	0.06	0.05	0.05	0.13	0.20	0.15	0.11
5	0.11	0.22	0.30	0.11	0.16	0.11	0.11	0.11	0.13	0.10	0.08	0.33	0.17	0.16
6	0.12	0.10	0.11	0.10	0.17	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.14	0.29	0.16	0.17
7	0.25	0.27	0.45	0.21	0.23	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.31	0.61	0.33	0.32
8	0.30	0.39	0.51	0.38	0.35	0.32	0.33	0.31	0.32	0.31	0.61	0.21	0.41	0.39
9	0.12	0.12	0.17	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.11	0.18	0.11	0.17
10	0.09	0.14	0.13	0.12	0.09	0.10	0.09	0.10	0.09	0.17	0.07	0.41	0.10	0.21
11	0.41	0.57	0.56	0.45	0.59	0.43	0.42	0.41	0.43	0.44	0.31	0.20	0.49	0.51
12	0.29	0.58	0.34	0.29	0.26	0.31	0.30	0.30	0.31	0.29	0.41	0.11	0.33	0.35
13	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
14	0.19	0.12	0.17	0.11	0.13	0.19	0.19	0.18	0.19	0.19	0.27	0.44	0.30	0.29
15	0.38	0.57	0.66	0.48	0.49	0.38	0.34	0.36	0.38	0.34	0.79	0.16	0.28	0.34
16	0.36	0.50	0.49	0.34	0.53	0.37	0.36	0.36	0.37	0.36	0.51	0.87	0.47	0.40
17	0.55	0.72	0.82	0.58	0.37	0.60	0.24	0.62	0.56	0.51	0.44	0.19	0.57	0.52

1.2.7 指纹图谱相似度评价 采用国家药典委员会“相似度评价软件”进行数据分析处理,以共有模式为参照谱,计算 1~14号样品的相似度,分别为 0.999、0.941、0.916、0.984、0.964、1.000、0.974、0.999、1.000、0.996、0.629、0.534、0.896、0.857。

2 讨论

实验比较了甲醇-水、乙腈-水系统,在“1.2.1 项的流动相及梯度洗脱条件下获得的色谱峰尖锐,分离度较好,色谱峰信息丰富。分别比较了 230、254、280、300 nm 等检测波长下获得的色谱图,在 254 nm 处检测的峰数目较多,分离度较好,指纹图谱整体特征较好,故选择在 254 nm 处检测。

分别比较了以乙醇、水为溶剂,提取样品后所得 HPLC 指纹图谱特征,结果水提取液所得色谱峰的峰数明显较多,指纹图谱整体特征体现的较好,加热回流提取 3 次的效率较高,且操作简便、快速。

羌活中主要的活性成分是挥发油,水提液中化学成分的相关报道很少。前期工作中,我们分离提取并鉴定了其中的绿原酸、阿魏酸和紫花前胡苷,在指纹图谱中紫花前胡苷峰面积较稳定,保留时间适中,可与其它色谱峰很好分离,故将其作为本指纹图谱检测标准的参照物。

通过对不同产地药材的指纹图谱研究发现,不同来源的羌活药材指纹图谱相似度差异较大,由表

1和表 2中所列数据可看出,共有峰的 k_r 和相对峰面积与共有模式比较,有明显差异,四川阿坝所产的羌活样品之间主要峰群的整体图貌基本一致,共有峰 k_r 和相对峰面积差异较小,相似度均较高,这与四川阿坝为羌活药材的传统主要产地一致。通过指纹图谱相似度、共有峰 k_r 及峰面积的计算,可明显区分不同产地的羌活药材,结合指标成分的定量测定结果,能更全面有效地控制中药材的质量。同时,为了保证中药制剂产品的质量,有必要相对固定原料药材产地,建立 GAP 种植基地,从源头上确保制剂产品的质量。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国国家药典委员会. 中国药典 [S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- [2] 中华人民共和国国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 (第五册) [M]. 上海: 科学技术出版社, 1997. 992 - 997.
- [3] 吉力. 羌活挥发油成分分析 [J]. 天然产物研究与开发, 1997, 9(1): 4 - 8.
- [4] Zhe - Ming G. Isolation of two new coumarin glycosides from *Notopterygium forbesii* and evaluation of a Chinese crude drug, Qiang - Huo, the underground parts of *N. incisum* and *N. forbesii*, by HPLC [J]. Chem Pharm Bull, 1990, 38(9): 2489 - 2502.
- [5] 杨秀伟. 宽叶羌活化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 1994, 29(3): 141 - 143.

收稿日期: 2007 - 04