

•化学与分析•

不同主产地黑顺片的指纹图谱研究

黄慧莲,刘科兰,邵峰,任刚,段锋,刘荣华*

(江西医学院现代中药制剂教育部重点实验室,南昌 330004)

[摘要] 目的:研究四川江油、陕西汉中及云南丽江等附子主产区黑顺片的高效液相色谱指纹图谱,为建立附子的行业质量标准提供依据。方法:利用 HPLC 方法,色谱条件 Alltima C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),柱温 35℃,流动相 40 mmol·L⁻¹ 醋酸铵(氨水调 pH 10.00)-乙腈梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长为 240 nm。对不同主产地的 22 批黑顺片进行研究,采用药典委员会颁布的中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 和聚类分析对指纹图谱进行了分析。结果:22 批黑顺片有 11 个共有峰,江油地区(道地产区)的黑顺片之间的相似度均大于 0.900,非道地产区与道地产区的相似度小于 0.900。结论:该方法精密度、重复性和稳定性良好,可结合黑顺片含量测定用于全面控制附子炮制品(黑顺片)的质量。

[关键词] 黑顺片;高效液相;指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)16-0044-06

[DOI] CNKI:11-3495/R.20110622.1304.005 **[网络出版时间]** 2011-06-22 13:04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110622.1304.005.html>

Studies on HPLC Fingerprint of Heishunpian from Different Origin

HUANG Hui-lian, LIU Ke-lan, SHAO Feng, REN Gang, DUAN Feng, LIU Rong-hua*

(Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the fingerprints of Heishunpian from Sichuan Jiangyou, Shanxi Hanzhong and Yunnan Lijiang by high performance liquid chromatographic and establish the method of standard quality for Radix Aconiti Lateralis Praeparata. **Method:** HPLC method was used to establish the fingerprints of 22 batches of Heishunpian. Alltima C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used, and ammonium acetate solution-acetonitrile as the mobile phase, with a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ and a detection wavelength at 240 nm. The obtained data was analyzed by computer aided similarity evaluation and cluster analysis software. **Result:** There were 11 common peaks in 22 habitats of Heishunpian. The similarity degree of the products produced in Jiangyou was found to be higher than 0.900. **Conclusion:** The method is accurate, repeatable and reliable, which can be used for their quality control.

[Key words] Heishunpian; HPLC; fingerprint

[收稿日期] 20110227(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30801520);国家中医药管理局中医药行业科研专项(200807020)

[通讯作者] *刘荣华,教授,理学博士,从事中药质量评价和中药活性物质基础研究, Tel: 0791-7119010, E-mail: rhliu@163.com

附子为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx 的子根,味辛、热,有毒,被誉为“回阳救逆第一药”。附子主要含有双酯型生物碱以及非生物碱类成分。具有强心、抗心律失常、抗衰老、抗肿瘤等作用^[1]。《中国药典》(2010年版)以3种双酯型生物碱的总和量以及3种单酯型生物碱的总和量来控制附子质量^[2],此方法不能全面反映附子生药及其炮

制品的质量。

本实验在有关文献^[3-6]的基础上,采用 HPLC 对四川、陕西、云南等不同主产区的 22 批黑顺片指纹图谱进行研究,利用相似度和聚类分析技术;结果表明,同一产地的附子药材在不同加工产地可能由于炮制方法的不同指纹图谱存在一定的差异,不同产地黑顺片的指纹图谱之间存在较大的差异,该方法为黑顺片行业标准建立提供了依据,为临床用药和

附子炮制研究提供了参考。

1 仪器与试剂

Agilent Technologies 1200 Series 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)。乌头碱(批号 110720-200410)、新乌头碱(批号 110799-200404)、次乌头碱(批号 110798-200404)对照品购自中国药品生物制品检定所。不同主产地的黑顺片来源见表 1。

表 1 黑顺片的产地及加工地

No.	编号	药材产地	加工地	加工时间
1	江油-1	四川省江油市	四川江油中坝附子科技发展有限公司	2009-08
2	江油-2	四川省江油市	四川省江油市太平镇河西村二大队	2009-08
3	江油-3	四川省江油市	四川省江油市太平镇河西村三大队	2009-08
4	江油-4	四川省江油市	四川省江油市彰明镇	2009-08
5	江油-5	四川省江油市	四川省江油市彰明镇	2007-08
6	江油-6	四川省江油市	四川省江油市彰明镇	2008-08
7	江油-7	四川省江油市	四川省江油市太平镇河西村	2009-08
8	江油-8	四川省江油市	四川新荷花中药饮片有限公司	2009-08
9	江油-9	四川省江油市	四川省江油市彰明镇供销社加工厂	2009-08
10	江油-10	四川省江油市	四川省江油市彰明镇供销社加工厂	2009-08
11	江油-11	四川省江油市	四川省江油市彰明镇曙光村二组	2009-09
12	江油-12	四川省江油市	四川省江油市彰明镇曙光村三组	2009-08
13	江油-13	四川省江油市	四川省江油市彰明镇曙光村四组	2009-09
14	江油-14	四川省江油市	四川省江油市太平镇合江村四组	2009-08
15	江油-16	四川省江油市	四川省江油市太平镇合江村四组	2009-08
16	江油-17	四川省江油市	四川省江油市太平镇合江村四组	2009-08
17	江油-18	四川省江油市	江油市外贸医药保健品有限公司	2009-08
18	江油-19	四川省江油市	四川省中药饮片有限责任公司	2009-09
19	汉中-1	陕西省汉中市	四川省江油市太平镇河西乡五大队	2009-08
20	汉中-2	陕西省汉中市	四川省江油市太平镇河西乡	2009-08
21	云南-1	云南省丽江市	四川省江油市彰明附子加工厂	2009-09
22	云南-2	云南省丽江市	四川省江油市彰明附子加工厂	2009-08

2 方法

2.1 色谱条件 Alltime C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm 5 μm), Alltime C₁₈ 保护柱(4.6 mm × 7.5 mm 5 μm);流动相 40 mmol·L⁻¹ 醋酸铵(氨水调 pH 10.00) (A) -乙腈 (B) 梯度洗脱, 0 ~ 15 min (85% ~ 60% A), 15 ~ 60 min (60% ~ 40% A), 60 ~ 65 min (40% ~ 32% A);流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 240 nm, 柱温 35 °C, 进样量 20 μL, 记录 65 min 的色谱图。

2.2 对照品溶液制备 分别精密称定乌头碱对照

品 2.2 mg、新乌头碱对照品 1.7 mg、次乌头碱对照品 2.0 mg 置 1 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备 分别取各产地不同黑顺片适量,粉碎,过 3 号筛,分别取 10 g 精密称定,置 150 mL 具塞锥形瓶中,加 25% 氨水 5 mL 浸润 1 h,加入 100 mL 氨水饱和乙醚,密塞,超声(工作频率 60 kHz)提取 10 min,放置过夜,滤纸过滤,用 60 mL 氨水饱和乙醚洗涤 3 次药渣,过滤,合并滤液和洗涤液

至 150 mL 烧杯中,室温挥干乙醚,以甲醇溶解残渣,置于 2 mL 量瓶中,并用甲醇定容至刻度,摇匀,HPLC 分析前用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液备用。

3 结果

3.1 精密性考察 取同一供试品溶液在上述色谱条件下重复进样 6 次,记录指纹图谱。将所得数据采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)”软件进行处理,相似度高于 0.994;共有峰的相对保留时间的 RSD < 0.4%,相对峰面积的 RSD < 3.6%。

3.2 重复性考察 取同一药材粉末 6 份,每份 10 g,按 2.3 项下操作制备供试品溶液,在上述色谱条件下进样,记录指纹图谱。将所得数据采用 3.1 项下相同软件进行处理,相似度高于 0.941;共有峰的相对保留时间的 RSD < 0.7%,相对峰面积的 RSD < 3.8%。

3.3 稳定性考察 取同一供试品溶液,在放置 0,

2,4,8,12,24 h 后用上述色谱条件进样,记录指纹图谱。将所得数据采用 3.1 项下相同软件进行处理,相似度高于 0.93;共有峰的相对保留时间的 RSD < 1.4%,相对峰面积的 RSD < 4.0%;供试品在 24 h 内稳定。

3.4 不同主产地黑顺片 HPLC 指纹图谱研究

3.4.1 不同主产地黑顺片的 HPLC 指纹图谱的建立 根据《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》和《中药指纹图谱研究技术》^[7] 要求,按 2.1 项下方法测定 22 批不同规格的黑顺片的供试品。见图 1。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件生成黑顺片共有模式的对照指纹图谱,得到 11 个共有峰,见图 2。通过与对照品图谱比对,指认 6 号峰为新乌头碱、8 号峰为乌头碱、10 号峰为次乌头碱。但 4 号峰的峰面积最大且峰形最稳定故以其为参照峰(s),计算各共有峰的相对保留时间,22 批黑顺片的相对保留时间的 RSD < 3%,符合指纹图谱的要求。

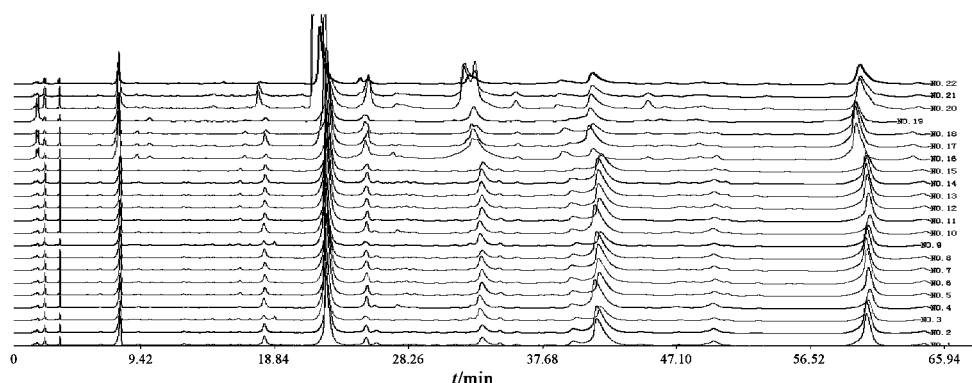
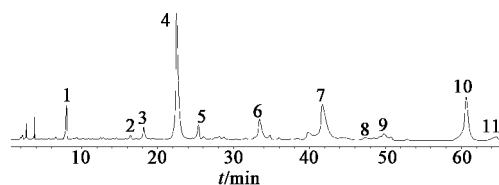


图 1 22 批黑顺片的 HPLC 指纹图谱



6. 新乌头碱; 8. 乌头碱; 10. 次乌头碱

图 2 黑顺片的对照指纹图谱

3.4.2 共有峰和非共有峰面积 “中药注射剂指纹图谱研究的技术要求”规定,中药材的供试品图谱中各共有峰面积的比值与指纹图谱各共有峰面积的比值比较,单峰面积占总峰面积大于或等于 20% 的共有峰,其差值不得大于 $\pm 20\%$;单峰面积占总峰面积大于或等于 10%,而小于 20% 的共有峰,其差值不得大于 $\pm 25\%$;单峰面积占总峰面积小于 10% 的共

有峰,峰面积比值不作要求,但必须标定相对保留时间。黑顺片指纹图谱中 4 号峰占总峰面积的百分比为 24.65%,其差值小于 $\pm 20\%$;7,10 号峰占总峰面积的百分比为 16%,15%;其他峰的单峰面积占总峰面积的百分比均小于 10%。以 4 号峰为参照峰(s),计算其他各共有指纹峰的相对峰面积,见表 2;统计各批非共有峰面积占总峰面积比值, No. 21 的非共有峰面积百分比为 20.2%,其他批次黑顺片非共有峰面积百分比在 3.45%~9.53%,符合指纹图谱研究规定小于 10% 的检测要求,结果见表 3。

3.4.3 不同产地黑顺片指纹图谱的相似度评价 利用 3.1 项下相同软件,以 No. 1 指纹图谱为参照图谱,利用中位数法,设定保留时间误差范围在 0.5

表2 黑顺片共有峰的相对峰面积

No.	相对保留值										
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11
1	0.18	0.04	0.07	1.00	0.14	0.26	0.80	0.09	0.08	0.58	0.09
2	0.20	0.01	0.11	1.00	0.05	0.27	0.86	0.10	0.02	0.21	0.04
3	0.16	0.02	0.06	1.00	0.09	0.24	0.45	0.03	0.06	0.74	0.06
4	1.16	0.03	0.06	1.00	0.10	0.25	0.25	0.04	0.06	0.64	0.06
5	1.21	0.04	0.12	1.00	0.09	0.24	1.21	0.13	0.11	0.64	0.07
6	0.22	0.03	0.12	1.00	0.06	0.28	0.88	0.19	0.03	0.53	0.07
7	0.19	0.02	0.11	1.00	0.09	0.17	0.89	0.17	0.02	0.73	0.05
8	0.11	0.02	0.06	1.00	0.06	0.22	0.39	0.03	0.09	0.41	0.04
9	0.14	0.02	0.10	1.00	0.11	0.23	0.81	0.09	0.16	0.37	0.03
10	0.12	0.02	0.08	1.00	0.10	0.25	0.65	0.05	0.12	0.55	0.07
11	0.13	0.02	0.08	1.00	0.10	0.22	0.68	0.06	0.03	0.60	0.06
12	0.12	0.02	0.08	1.00	0.10	0.23	0.80	0.05	0.10	0.57	0.06
13	0.12	0.02	0.08	1.00	0.11	0.22	0.67	0.05	0.11	0.53	0.05
14	0.11	0.03	0.08	1.00	0.11	0.20	0.67	0.05	0.09	0.44	0.06
15	0.28	0.05	0.06	1.00	0.37	1.10	0.32	0.09	0.07	0.86	0.07
16	0.15	0.01	0.06	1.00	0.11	0.21	0.30	0.03	0.05	0.44	0.03
17	0.21	0.03	0.05	1.00	0.22	0.29	0.21	0.09	0.05	0.86	0.06
18	0.13	0.06	0.07	1.00	0.06	0.54	0.65	0.11	0.19	0.78	0.12
19	0.13	0.03	0.03	1.00	0.08	0.30	0.45	0.06	0.10	0.74	0.04
20	0.17	0.04	0.04	1.00	0.10	0.32	0.49	0.08	0.06	0.49	0.04
21	0.06	0.01	0.03	1.00	0.09	0.16	0.08	0.01	0.01	0.16	0.01
22	0.07	0.01	0.03	1.00	0.07	0.25	0.08	0.01	0.01	0.16	0.01
平均	0.24	0.03	0.07	1.00	0.11	0.29	0.57	0.07	0.07	0.55	0.05

表3 22批黑顺片药材的非共有峰面积

No.	总面积	共有峰面积	非共有峰面积	相对比/%	No.	总面积	共有峰面积	非共有峰面积	相对比/%
1	16 277	14 857.1	1 419.9	8.72	12	25 570.1	23 772.9	1 797.1	7.03
2	34 991.2	31 708.9	3 282.3	9.31	13	25 579.2	23 666.4	1 930.8	7.54
3	18 116.3	16 950	1 166.3	6.43	14	16 774.3	15 174.8	1 599.5	9.53
4	13 980.3	13 164.5	815.8	5.83	15	29 200.8	27 243.1	1 957.7	6.71
5	18 267.9	16 892.3	1 375.6	7.53	16	35 064.9	32 174.4	2 890.5	8.24
6	13 358.2	12 344.3	1 013.9	7.5	17	18 579.9	17 235.2	1 344.7	7.23
7	21 806.9	20 240.6	1 566.3	7.18	18	11 503.2	10 455	1 048.2	9.11
8	16 688.4	16 112.3	576.1	3.45	19	16 360.1	14 918.2	1 441.9	8.86
9	22 185.1	20 934.5	1 250.6	5.63	20	19 359.9	17 993.2	1 366.9	7.06
10	22 928.8	20 993.4	1 935.4	8.44	21	72 742.2	58 030.9	14 711.3	20.2
11	25 325.2	23 163.2	2 162	8.53	22	47 041.9	43 071	3 970.9	8.44

min 以内,对 22 批黑顺片的指纹图谱进行数据处理,相似度分析结果如表 4 所示。从结果可以看出,1~15 号样品 15 批江油产的药材相似度较高,均大

于 0.930,而与 16~18 号样品江油产地和 19 号、20 号样品汉中产地 21 号、22 号云南产地的药材差异较大。

表 4 22 批黑顺片相似度评价

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	1																					
2	0.982	1																				
3	0.931	0.973	1																			
4	0.942	0.982	0.931	1																		
5	0.985	0.998	0.972	0.985	1																	
6	0.983	0.965	0.973	0.982	0.998	1																
7	0.945	0.982	0.931	0.943	0.985	0.982	1															
8	0.933	0.982	0.931	0.954	0.985	0.982	0.951	1														
9	0.931	0.973	0.924	0.931	0.972	0.973	0.931	0.931	1													
10	0.96	0.973	0.939	0.96	0.977	0.973	0.96	0.96	0.939	1												
11	0.981	0.962	0.973	0.982	0.998	0.963	0.982	0.982	0.973	0.973	1											
12	0.988	0.997	0.97	0.988	0.999	0.997	0.988	0.988	0.97	0.971	0.997	1										
13	0.986	0.998	0.97	0.986	0.999	0.998	0.986	0.986	0.97	0.975	0.998	0.999	1									
14	0.985	0.998	0.972	0.985	0.974	0.998	0.985	0.985	0.972	0.977	0.998	0.999	0.999	1								
15	0.977	0.995	0.97	0.977	0.996	0.995	0.977	0.977	0.97	0.984	0.995	0.993	0.995	0.996	1							
16	0.556	0.622	0.663	0.556	0.616	0.622	0.556	0.556	0.663	0.63	0.622	0.605	0.612	0.616	0.629	1						
17	0.733	0.809	0.854	0.733	0.809	0.809	0.733	0.733	0.854	0.819	0.809	0.795	0.802	0.809	0.829	0.852	1					
18	0.619	0.67	0.713	0.619	0.671	0.67	0.619	0.619	0.713	0.684	0.67	0.66	0.666	0.671	0.688	0.937	0.926	1				
19	0.754	0.817	0.843	0.754	0.815	0.817	0.754	0.754	0.843	0.838	0.817	0.801	0.81	0.815	0.837	0.869	0.975	0.925	1			
20	0.076	0.078	0.058	0.076	0.086	0.078	0.076	0.076	0.058	0.082	0.078	0.073	0.086	0.086	0.086	0.159	0.122	0.141	0.138	1		
21	0.07	0.068	0.051	0.07	0.077	0.068	0.07	0.07	0.051	0.074	0.068	0.065	0.077	0.077	0.077	0.147	0.112	0.136	0.125	0.998	1	
22	0.655	0.697	0.721	0.655	0.701	0.697	0.655	0.655	0.721	0.719	0.697	0.69	0.696	0.701	0.721	0.821	0.915	0.938	0.898	0.122	0.123	1

3.4.4 不同产地黑顺片指纹图谱的聚类分析^[8]

分别对黑顺片指纹图谱的数据进行系统聚类分析，采用类内平均法和欧式距离平方方法作为样品的测度。进行欧式距离计算，计算 22 批黑顺片样本间的欧式距离，得到聚类分析图如图 3 所示。由 22 批不同产地的黑顺片指纹图谱可知，由于产地或者加工产地的不同，3 种双酯型生物碱的峰面积以及共有峰的峰面积不同，他们之间的相似度存在很大的差异。聚类分析结果与指纹图谱相似度结果相似，可以将 22 批黑顺片可以分为 3 类：1~15 号样品均产自江油地区并且它们之间的相似度均大于 0.900 可分为一类；19 号样品产自汉中地区，22 号样品产自云南地区以及 16、17、18 号样品产自江油地区的黑顺片与其他批次黑顺片的相似度在 0.70 左右，均小于 0.900，可分为一类；20 号样品产自汉中地区与 21 号样品产自云南地区分为一类，他们与其他批次黑顺片的相似度很低，在 0.07 左右。

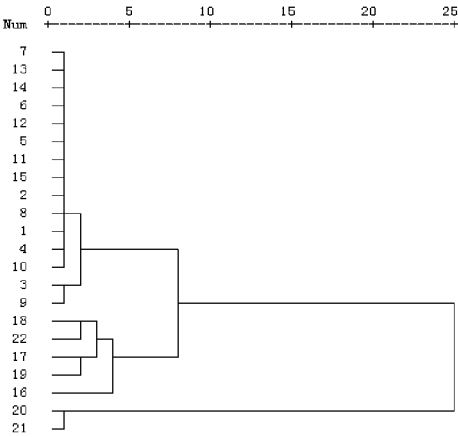


图 3 黑顺片聚类分析图

4 讨论

4.1 色谱条件优化 ①色谱柱的选择：文献报道大多采用碱性条件下，对附子及其炮制品中生物碱进行色谱分离检测，但对色谱柱要求较高，需使用耐碱色谱柱，实验中考察了 Ultimate™ XB-C₁₈ (4.6 mm ×

250 mm 5 μ m), Alltima C₁₈ (4.6 mm $\times$ 250 mm 5 μ m), 结果表明在上述色谱条件下 Alltima C₁₈ (4.6 mm $\times$ 250 mm 5 μ m) 色谱柱分离度、峰形状、稳定性最好, 故最终选择此分析色谱柱。②流动相的选择: 试验中比较了乙腈-40 mmol $\cdot$ L⁻¹ 醋酸铵、甲醇-40 mmol $\cdot$ L⁻¹ 醋酸铵系统的洗脱效果, 并摸索了不同的洗脱程序。结果表明以乙腈-40 mmol $\cdot$ L⁻¹ 醋酸铵 (氨水调 pH 10.00) 梯度洗脱分离效果较好, 色谱峰分布均匀, 峰形好。③检测波长的选择: 利用紫外检测器对指纹图谱的波长进行了选择, 从 200 ~ 400 nm 选出 230, 234, 240 nm 吸光度较大的波长, 分析比较各波长下的指纹图谱, 发现 230, 240 nm 处各色谱峰响应较大, 峰形好, 色谱信息较为丰富, 且分离度好, 但在 240 nm 处的色谱图的基线平稳且色谱峰多。故选用 240 nm 为检测波长。

4.2 指纹图谱分析 22 批黑顺片指纹图谱中, 主要峰群的整体图貌基本一致, 11 个共有峰的相对保留时间 RSD < 2.8%, 但特征指纹峰的相对峰面积比值有较大差别。由此建立的指纹图谱基本反映了不同主产地黑顺片的内在化学特征。

4.3 聚类分析 1 ~ 18 号样品均产自江油地区但是由不同的加工产地加工而成。1 ~ 15 号样品之间的相似度均大于 0.900。16 ~ 18 号样品均产地江油地区, 加工地分别是四川省江油市太平镇合江村四组、江油市外贸医药保健品有限公司和四川省中药饮片有限责任公司, 他们与 1 ~ 15 号产地江油地区的黑顺片相似度差异较大并且没有聚为一类, 但却与 19 号产自陕西汉中及其 22 号产地云南地区的黑顺片相似度相似, 在 0.70 左右, 可以聚为一类。19, 20 号样品都是产自陕西汉中, 加工地分别是四川省

江油市太平镇河西乡五大队、四川省江油市太平镇河西乡, 两种样品之间相似度只有 0.138。21 号和 22 号样品都产自云南丽江, 加工地是四川省江油市彰明附子加工厂, 但是加工时间不一样, 分别是 2009 年 9 月份、2009 年 8 月份, 导致 2 种样品之间的相似度仅有 0.123。结果表明, 同一产地的附子药材在不同加工产地可能由于炮制方法和炮制时间的不同使黑顺片的指纹图谱存在差异。为保证附子炮制品的质量, 必须实行道地药材的 GAP 管理, 确定最优的炮制工艺, 以确保附子炮制品的低毒高效。

[参考文献]

- [1] 阎爱荣, 张宏. 附子的药理研究[J]. 中国药物与临床, 2008, 8(9): 745.
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2010.
- [3] 彭锐, 马鹏, 李隆云, 等. 不同产地川党参药材的 HPLC 指纹图谱[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(2): 183.
- [4] 王瑞, 孙毅坤, 王耘, 等. 附子生药的高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(5): 639.
- [5] 杨春燕, 丁黎. 附子的乙醚提取物和微波辅助水提物的指纹图谱研究[J]. 药学与临床研究, 2008, 16(4): 278.
- [6] 于永军. 川乌炮制前后的高效液相指纹图谱比较研究[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(11): 2456.
- [7] 周玉新, 雷海明. 中药指纹图谱研究技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 131.
- [8] 王文燕, 赵文强. 川芎药材的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究[J]. 中草药, 2009, 40(12): 1980.

[责任编辑 蔡仲德]