

# 夏天无高效液相色谱指纹图谱研究

马宏达<sup>①</sup> 赵庆春<sup>①</sup> 罗舟<sup>②</sup> 安晔<sup>①</sup> 郭涛<sup>①</sup>

**[摘要]** 目的 建立夏天无药材的高效液相指纹图谱,为夏天无的鉴别及质量控制提供依据。方法 采用高效液相色谱法,对不同产地的夏天无药材中的成分进行指纹图谱研究。结果 高效液相色谱指纹图谱中多数组分可以达到较好的分离,共得到 11 个共有峰,13 批样品的相似度较好。结论 本方法具有较好的稳定性、精密度和重复性,所建立的指纹图谱可用于夏天无药材的鉴定及质量评价。

**[关键词]** 夏天无; 高效液相色谱法; 指纹图谱

**[中图分类号]** R284.1; R927.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1008-9926(2011)05-0425-03

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1008-9926.2011.05.015

## A Study on High Performance Liquid Chromatography

### Fingerprint of *Rhizoma Corydalis Decumbentis*

MA Hong-da<sup>①</sup>, ZHAO Qing-chun<sup>①</sup>, LUO Zhou<sup>②</sup>, AN Ye<sup>①</sup>, GUO Tao<sup>①</sup>

<sup>①</sup>Department of Pharmacy, General Hospital of Shenyang Military Command, Shenyang 110016, China;

<sup>②</sup>Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

**[Abstract]** **Objective** To establish high performance liquid chromatography fingerprints of *Rhizoma Corydalis Decumbentis* so as to facilitate its identification and quality control. **Methods** The high performance liquid chromatography method was used to study the fingerprints of *Rhizoma Corydalis Decumbentis* collected from different places. **Results** The high performance liquid chromatography fingerprint profiles of *Rhizoma Corydalis Decumbentis* contained 11 common peaks of high resolution. **Conclusion** The high performance liquid chromatography method is stable, accurate and reproducible. The established fingerprint profile can be used for the identification and quality control of *Rhizoma Corydalis Decumbentis*.

**[Key words]** *Rhizoma Corydalis Decumbentis*; high performance liquid chromatography; fingerprints

夏天无为罂粟科植物伏生紫堇 *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers. 的干燥块茎。主产于江西,在湖南、浙江、江苏等地均有分布。为民间常用药材,具有活血、祛瘀、通络、行气等功效,用于中风偏瘫、半身不遂等的治疗。夏天无主要有效成分为生物碱类,2010 年版《中国药典》也将生物碱作为其定性和定量指标。主要含有原阿片碱(Pro)、延胡索乙素(THP)、巴马汀(Pal)等 20 余种叔胺类和季铵类生物碱<sup>[1,2]</sup>。但这些成分存在于罂粟科的多种植物中,并非夏天无特有成分,而且仅采用一种成分对药材进行定性与定量,不能全面的反映其内在质量。已有文献报道<sup>[3]</sup>,采用薄层色谱法建立夏天无药材的指纹图谱。高效液相色谱(high performance liquid

chromatography, HPLC) 法具有专属性强、灵敏度高等优点,已经越来越多的应用于中药材及中成药的质量研究,本文采用 HPLC 法,对夏天无药材进行了 HPLC 指纹图谱研究,建立了一种能较全面地反映药材质量,并进行质量控制的方法。

## 1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱系统(包括 Waters600 高压泵; Waters2996 紫外检测器; Waters 717 进样器)(美国沃特世公司); UV-2501PC 紫外检测器(日本 Shimadzu 公司); AS5150A 超声仪(奥特赛恩斯仪器有限公司); FD-1B-55 冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司); Waters DDA-U130-BN 真空泵(美国沃特世公司)。

原阿片碱、延胡索乙素、盐酸巴马汀对照品(均为中国药品生物制品检定所)。乙腈为色谱纯;水为重蒸馏水。其余试剂为分析纯。夏天无药材共 13 批

作者简介: 马宏达,博士,主管药师。研究方向: 药物制剂。Tel: (024) 28851751

作者单位: ① 110016 辽宁沈阳,沈阳军区总医院药剂科;

② 110016 辽宁沈阳,沈阳药科大学中药学院

(分别收购于江西、湖南、广东、江苏等地。经沈阳药科大学孙启时教授鉴定为药材夏天无 *Rhizoma Corydalis Decumbentis*)。药材来源见表 1。

表 1 药材样品来源

| 序号 | 来源   | 序号 | 来源   | 序号 | 来源   |
|----|------|----|------|----|------|
| 1  | 江西余江 | 6  | 江西上饶 | 11 | 江西上高 |
| 2  | 江西南昌 | 7  | 湖南   | 12 | 江西玉山 |
| 3  | 江西赣州 | 8  | 广东   | 13 | 福建福州 |
| 4  | 江西九江 | 9  | 安徽亳州 |    |      |
| 5  | 江苏   | 10 | 江西樟树 |    |      |

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱: Diamonsil ODS  $C_{18}$  ( $5\ \mu\text{m}$ ,  $250\ \text{mm} \times 4.6\ \text{mm}$ ); 流动相: 乙腈-水 (20:80, 含 0.2% 冰醋酸, 0.5% 三乙胺); 柱温:  $25^\circ\text{C}$ ; 流速:  $1.0\ \text{ml/min}$ ; 进样量:  $20\ \mu\text{l}$ ; 检测波长:  $282\ \text{nm}$ 。

**2.2 溶液的制备** (1) 对照品溶液 精密称取干燥至恒重的原阿片碱、延胡索乙素、盐酸巴马汀对照品适量, 加 50% 甲醇制成含原阿片碱  $18.96\ \mu\text{g/ml}$ , 延胡索乙素  $19.70\ \mu\text{g/ml}$ , 盐酸巴马汀  $18.24\ \mu\text{g/ml}$  的混合溶液, 即得。(2) 供试品溶液 取夏天无细粉约  $0.5\ \text{g}$  精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇  $50\ \text{ml}$ , 称定重量, 超声处理  $30\ \text{min}$ , 放冷, 再称定重量, 用 50% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 经  $0.45\ \mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

## 2.3 指纹图谱方法学考察

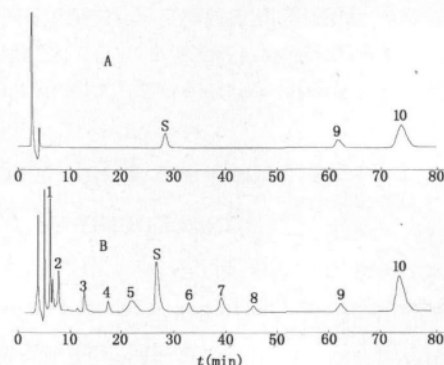
**2.3.1 稳定性试验** 取同一批 (13) 夏天无样品溶液, 分别于制备后的 0、4、8、16、24、48 h 检测指纹图谱。以原阿片碱的保留时间和峰面积为参照, 计算各共有峰与参比峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 2.43% 和 1.68%, 表明该供试品在 48 h 内稳定。

**2.3.2 精密度试验** 取同一批 (13) 夏天无供试品溶液, 在上述色谱条件下重复进样 6 次, 检测指纹图谱。试验结果表明, 以原阿片碱的保留时间和峰面积为参照, 计算各共有峰与参比峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 1.64% 和 1.15%, 表明仪器精密度良好。

**2.3.3 重复性试验** 取同一批 (13) 夏天无药材 5 份, 按照 2.2 项下, 制备供试品溶液, 检测指纹图谱。试验结果表明, 计算各共有峰与参比峰的相对保留时间和峰面积的 RSD 分别为 2.81% 和 2.06%,

表明该方法重复性良好。

**2.4 夏天无样品 HPLC 指纹图谱的建立** 取夏天无药材粉末  $0.5\ \text{g}$  精密称定, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液 (13), 分别进行测定, 记录色谱图。以原阿片碱为参比峰 (峰 S), 确定了 11 个共有峰, 并指认了其中 2 个色谱峰, 分别为延胡索乙素 (峰 9)、盐酸巴马汀 (峰 10), 见图 1。



S: 原阿片碱; 9: 延胡索乙素; 10: 盐酸巴马汀; A: 对照品; B: 样品

图 1 夏天无样品典型色谱指纹图谱

**2.5 夏天无样品聚类分析** 将各色谱峰面积相对于称样量量化, 应用“SPSS”软件对其进行系统聚类分析, 采用组间均联法 (between-group linkage), 以夹角余 (cosin) 作为样品相似度的测度。聚类分析将 13 批夏天无样品分为 2 类, 聚类分析结果见图 2。

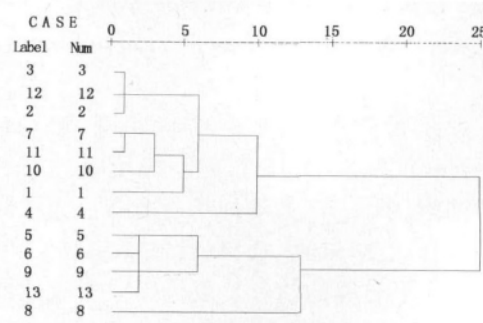


图 2 13 批夏天无样品的聚类分析结果

**2.6 夏天无样品共有模式建立** 结合聚类分析结果, 从 13 批夏天无药材中选取第 I 类的 8 个样品 (1、2、3、4、7、10、11、12 号样品), 采用国家药典委员会颁布的中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版, 通过色谱峰多点校正的方法对色谱峰进行自动匹配生成药材的色谱指纹图谱共有模式, 色谱图见图 3。

**2.7 各产地药材指纹图谱相似度评价** 采用国家药典委员会颁布的中药色谱指纹图谱相似度评价系统 B 版对上述 13 批药材的指纹图谱进行相似度的分析, 结果见表 2。分析结果表明, (下转 430 页)

LPS 药物前体的生物学效应做全面了解,为新型防治脓毒症药物的研发和药物靶点的寻找提供新的思路。

#### [参考文献]

- [1] 伏建峰,曹红卫,王宁等.黄芩抗 LPS 活性物质的分离提取与活性研究[J].第三军医大学学报,2008,30(5):382-385
- [2] 伏建峰,王宁,史清海等.黄芩药材中 2',5',6',7'-四羟基二氢黄酮醇的分离与鉴定[J].中国药房,2010,21(3):226-228
- [3] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408
- [4] Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference[J]. *Crit Care Med*, 2003, 31(4):1250-1256
- [5] Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, et al. Epidemiology of se-

vere sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care[J]. *Crit Care Med*, 2001, 29(7):1303-1310

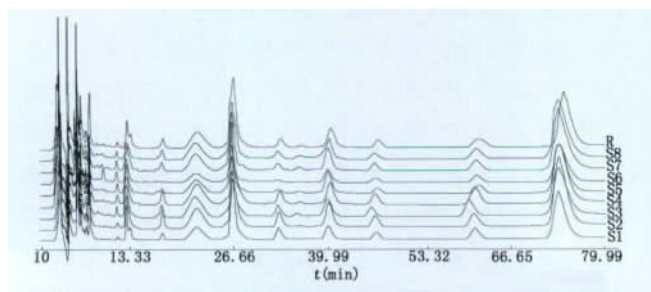
- [6] Martin GS, Mannino DM, Eaton S, et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000[J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(16):1546-1554
- [7] Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis[J]. *Nature*, 2002, 420(6917):885-891
- [8] Wu X, Qian G, Zhao Y, et al. LBP inhibitory peptide reduces endotoxin-induced macrophage activation and mortality[J]. *Inflamm Res*, 2005, 54(11):451-457
- [9] Lin WJ, Yeh WC. Implication of Toll-like receptor and tumor necrosis factor alpha signaling in septic shock[J]. *Shock*, 2005, 24(3):206-209

(收稿日期:2011-02-09;修回日期:2011-04-16)

(本文编辑 金杨红)

(上接 426 页)

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。由相似度计算结果结合聚类分析和形态鉴定结果,相似度在 0.90 以上的可以认为该药材为推荐品,0.90 以下(5、6、8、9、13 号)的为该药材的一般品<sup>[4]</sup>。



R: 共有模式; S1 ~ S8 为 1、2、3、4、7、10、11、12 号样品

图 3 8 批药材 HPLC 图

表 2 样品的相似度计算结果

| 序号 | 来源   | 相似度   | 序号 | 来源   | 相似度   | 序号 | 来源   | 相似度   |
|----|------|-------|----|------|-------|----|------|-------|
| 1  | 江西余江 | 0.960 | 6  | 江西上饶 | 0.879 | 11 | 江西上高 | 0.972 |
| 2  | 江西南昌 | 0.981 | 7  | 湖南   | 0.970 | 12 | 江西玉山 | 0.978 |
| 3  | 江西赣州 | 0.987 | 8  | 广东   | 0.793 | 13 | 福建福州 | 0.841 |
| 4  | 江西九江 | 0.963 | 9  | 安徽亳州 | 0.824 |    |      |       |
| 5  | 江苏   | 0.892 | 10 | 江西樟树 | 0.973 |    |      |       |

### 3 讨论

**3.1 检测波长的选择** 采用 DAD 检测器在 200 ~ 400 nm 范围内进行紫外扫描,结果表明 282 nm 处的色谱图特征性强,具较好的代表性,因此选择 282 nm 作为 HPLC 的检测波长。

**3.2 流动相系统的选择** 试验考察了不同流动相对被测成分色谱行为的影响。当流动相为乙腈-水系统时,色谱峰具有更高的理论塔板数。结果显示,缓冲液

pH 值对分离的影响较大。某些成分的保留时间会随着 pH 的变化而前后波动,从而影响成分间的分离度。

**3.3 提取方法的选择** 在选择提取方法时,比较超声、索氏、水浴等 3 种提取方法。在相同提取溶剂和时间,的情况下,超声提取和水浴提取的组分含量略高于索氏提取。而相比水浴提取,超声提取具有温度低、操作便捷等优点。因此,本试验选择超声提取方法。

由于夏天无的临床药理作用并非仅来自原阿片碱一种活性成分的作用,而是多种生物碱活性成分的协同作用,所以仅测定单一活性成分不能全面反映药材的质量,因此,建立全面、系统的指纹图谱可以为夏天无及其制剂的质量评价和控制提供一个有效的参考方法<sup>[5,6]</sup>。本研究建立的夏天无药材的标准指纹图谱,能较为全面地反映夏天无药材的质量。

志谢 辽宁省博士科研启动基金课题, No. 20101133

#### [参考文献]

- [1] Liao J, Liang WZ, Tu GS. Isolation and Identification of Eleven Tertiary Alkaloids in *Coydalis decumbens* [J]. *J Chinese Pharmaceutica Sci*, 1995, 4(2):57-61
- [2] 朱大元,宋纯清,高耀良等.夏天无及其他十一种化学成分分离和结构鉴定[J]. *中草药*, 1980, 11(8):341-343
- [3] 魏凤环,张佳佳,张璐.夏天无 TLC 指纹图谱的研究[J]. *中药材*, 2006, 29(6):547-550
- [4] 逢楠楠,毕开顺,闫宝庆等.芫花高效液相色谱指纹图谱研究[J]. *中草药*, 2010, 41(5):818-821
- [5] 郑恒,魏日昉,陈香美.中药质量标准与中药指纹图谱[J]. *中国医院药学杂志*, 2003, 23(2):112-113
- [6] 吴玉田.中医药现代化与中药指纹图谱分析[J]. *中国中西医结合杂志*, 2002, 22(9):645-646

(收稿日期:2010-12-18;修回日期:2011-01-23)

(本文编辑 梁爱君)