

基于化学计量学的 RRLC 指纹图谱在川白芷硫熏前后质量控制和识别中的应用

张静¹, 邓瑞¹, 范刚¹, 周林¹, 罗维早², 郑海杰¹, 张艺¹ (1. 成都中医药大学民族医药学院, 成都 611137; 2. 重庆市中药研究院, 重庆 400065)

摘要: 目的 基于化学计量学的 RRLC 指纹图谱方法对川白芷硫熏前后进行质量控制和识别。方法 采用 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 100 mm, 1.8 μm); 以甲醇-水为流动相梯度洗脱, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 310 nm; 采用主成分分析、系统聚类分析等方法对川白芷硫熏前后进行质量控制和模式识别。结果 该方法可使川白芷中各成分得到较好的分离, 并根据检测结果确定了 23 个共有指纹峰。川白芷硫熏前后样品的指纹图谱存在较大差异。结论 基于化学计量学的 RRLC 指纹图谱可对川白芷药材硫熏前后进行质量控制和识别, 可为川白芷内在质量控制提供参考。

关键词: 川白芷; 高分离度快速液相色谱 (RRLC); 指纹图谱; 化学计量学

中图分类号: R282.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-2494(2011)06-0418-04

Quality Control and Discrimination of *Angelicae dahurica* Radix by RRLC Fingerprints Combined with Chemometrics Method

ZHANG Jing¹, DENG Rui¹, FAN Gang¹, ZHOU Lin¹, LUO Wei-zao², ZHEN Hai-jie¹, ZHANG Yi¹ (1. College of Ethnomedicine of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 2. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish RRLC fingerprints of *Angelica dahurica* var. *Formosana* before and after sulfuring for its quality control and discrimination. **METHODS** The analysis was carried out on a Agilent Zorbax SB-C₁₈ column (4.6 mm × 100 mm, 1.8 μm) with the mobile phases of methanol and water by gradient elution. The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹, and the UV detection wavelength was 310 nm. Principal component analysis and hierarchical cluster analysis were applied to study RRLC fingerprinting and chemical pattern reorganization. **RESULTS** The chemical constituents of *Angelica dahurica* var. *Formosana* were optimally separated among which 23 fingerprint peaks in common were confirmed. There was apparent difference between the fingerprints of the samples before and after sulfuring. **CONCLUSION** The developed RRLC fingerprints, combined with chemometrics, can accurately identify and validate *Angelica dahurica* var. *Formosana* before and after sulfuring. The research provides a theoretical basis for the quality control of *Angelica dahurica* var. *Formosana*.

KEY WORDS: *Angelica dahurica* var. *Formosana*; RRLC; fingerprints; chemometrics

白芷为常用中药,始载于东汉《神农本草经》,列为中品,为伞形科植物白芷 [*Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f.] 或杭白芷 [*Angelica dahuricae* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. var. *formosana* (Boiss.) Shan et Yuan] 的干燥根。白芷味辛、性温,具有解表散寒,祛风止痛,宣通鼻窍等功效。临床多用于感冒头痛,眉棱骨痛,鼻塞,鼻渊,牙痛,白带,疮疡肿痛^[1]。

川白芷为白芷商品药材的主流品种,约占全国商品白芷产量的 70%,在中药材市场中占有主导作

用。川白芷产地加工的干燥方法主要为硫熏干燥,文献报道白芷熏硫后其香豆素及挥发性成分大大降低^[2]。有关白芷的指纹图谱已有很多报道,目前多采用常规 HPLC-UV 法^[3],但这种方法具有耗时长,浪费试剂,增加污染等缺点,且采用指纹图谱快速对其熏硫前后质量评价研究尚未见报道。高分离度快速液相色谱 (RRLC) 是近几年推出的一种新的液相色谱技术,峰容量、分析效率、灵敏度和分辨率较常规 HPLC 有了很大的提高^[4],本实验应用 RRLC-UV 色谱法建立了川白芷指纹图谱,并结合化学计量学

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划地方专项课题 (2007BAI40B05)

作者简介: 张静,女,博士,讲师 研究方向: 中药及民族药质量评价研究 Tel: (028) 61800274 E-mail: zhangjingtcm@yahoo.cn

方法对川白芷药材硫熏前后进行快速质量控制和识别的方法,为川白芷内在质量控制提供参考。

1 仪器与试剂

Agilent 1200SL 型快速高分离液相色谱仪(美国),VWD-SL 型检测器,HP ChemStation 化学工作站;SHIMADZU AUW220D 型分析天平。

甲醇(色谱纯),水为超纯水;水合氧化前胡素、佛手柑内酯、氧化前胡素、欧前胡素、Cnidilin 和 S-1 ~ S-27 异欧前胡素为自制,纯度 >99%。27 批川白芷药材采自四川省遂宁市、南充市、安岳县和达州市等地,经成都中医药大学张艺研究员鉴定为 *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hofm.) Benth. et Hook. f. var. *Formosana* (Boiss.) Shan et Yuan 的干燥根。其中样品 S1 ~ S16 加工方法为日光下晒干,S17 ~ S27 加工方法为熏硫。熏硫为产地农户加工,熏硫方法为:采收后湿白芷,燃硫磺熏硫。其中 S5 与 S19、S7 与 S23、S8 与 S22、S13 与 S24、S15 与 S26、S16 与 S27 分别为同一批药材的晒干和熏硫的样品,见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Zorbax SB - C₁₈ (4.6 mm × 100 mm 1.8 μm);流动相为 A(甲醇)-B(纯水)梯度洗脱: 0 ~ 6 min 45% ~ 50% A; 6 ~ 9 min 50% ~ 58% A; 9 ~ 11 min 58% ~ 64% A; 11 ~ 12 min 64% ~ 70% A; 12 ~ 18 min 70% ~ 80% A。检测波长 310 nm,流速 1.0 mL · min⁻¹,柱温 25 °C,进样量 2 μL。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取水合氧化前胡素、佛手柑内酯、氧化前胡素、欧前胡素、Cnidilin、蛇床子素和异欧前胡素对照品适量,置 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,即为各对照品贮备液: 水合氧化前胡素 0.045 6 mg · mL⁻¹、佛手柑内酯 0.064 8 mg · mL⁻¹、氧化前胡素 0.046 5 mg · mL⁻¹、欧前胡素 0.187 4 mg · mL⁻¹、Cnidilin 0.350 0 mg · mL⁻¹和异欧前胡素 0.282 0 mg · mL⁻¹。

2.3 供试品溶液的制备

取川白芷药材粉末(60 目) 1.0 g 精密称定,置具塞三角瓶中,加甲醇 30 mL,超声提取 60 min,冷却,补足重量,过微孔滤膜(0.22 μm),取续滤液,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度实验 取 S2 号供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件,连续进样 6 次,记录色谱图,计算其各共有峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD 均小于 3%,表明精密度良好,符合对指纹图谱的要求。

表 1 川白芷样品来源

Tab. 1 Sources of *Angelica dahurica* var. *Formosana* samples

Sample	Collecting site	Processing method	Acquisition date
S-1	Suining Yongxingzhen Suizaimencun	Dryness under sun	1908-07-18
S-2	Suining Yongxingzhen Zhongjicun	Dryness under sun	1908-07-18
S-3	Suining Xinqiaozhen Xiaobacun	Dryness under sun	1908-07-18
S-4	Suining Longpinzhen Dazhuanwancun	Dryness under sun	1908-07-18
S-5	Suining Laocixiang Jinpencun	Dryness under sun	1908-07-18
S-6	Suining Xiaohezhoucun	Dryness under sun	1908-07-19
S-7	Nanchong Yonganzhen Qianjincun	Dryness under sun	1908-07-19
S-8	Nanchong Qinlincun	Dryness under sun	1908-07-19
S-9	Suining Pengxixian Baitubacun	Dryness under sun	1908-07-20
S-10	Suining Pengxixian Yongyicun	Dryness under sun	1908-07-20
S-11	Anyue Lijiazhen Wubaocun	Dryness under sun	1908-07-25
S-12	Anyue Lijiazhen Wenjiabacun	Dryness under sun	1908-07-25
S-13	Anyue Lijiazhen Xuatangcun	Dryness under sun	1908-07-25
S-14	Dazhou Maliuzhen Shibancun	Dryness under sun	1908-07-26
S-15	Dazhou Maliuzhen Jinjipaicun	Dryness under sun	1908-07-26
S-16	Dazhou Maliuzhen Mifangcun	Dryness under sun	1908-07-26
S-17	Suining Xinqiaozhen Hongjiangcun	Dryness by sulfur	1908-07-18
S-18	Suining Longping Dingjueyuancun	Dryness by sulfur	1908-07-18
S-19	Suining Laocixiang Jinpencun	Dryness by sulfur	1908-07-18
S-20	Suining Laocixiang Huangjiaocun	Dryness by sulfur	1908-07-18
S-21	Suining Pengxixian Sunjiangcun	Dryness by sulfur	1908-07-20
S-22	Nanchong Qinlincun	Dryness by sulfur	1908-07-19
S-23	Nanchong Yonganzhen Qianjincun	Dryness by sulfur	1908-07-19
S-24	Anyue Lijiazhen Xuatangcun	Dryness by sulfur	1908-07-25
S-25	Anyue Xinlongzhen Shanguancun	Dryness by sulfur	1908-07-25
S-26	Dazhou Maliuzhen Jinjipaicun	Dryness by sulfur	1908-07-26
S-27	Dazhou Maliuzhen Mifangcun	Dryness by sulfur	1908-07-26

2.4.2 稳定性实验 取 S2 号供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件,在室温下分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样,共 6 次,记录色谱图,计算其各共有峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD 均小于 3%,表明 24 h 内供试品溶液的成分稳定,符合对指纹图谱的要求。

2.4.3 重复性实验 精密称取 6 份 S2 号供试品粉末(60 目),每份 1.0 g,按“2.3”项下制备方法平行得到 6 份供试品溶液。按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图,计算其各共有峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD 均小于 3%,表明实验重复性良好,符合对指纹图谱的要求。

2.5 样品测定及指纹图谱色谱峰的归属、比较

取 27 批川白芷供试品,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项下条件依次进样检测,记录色谱图。见图 1,其中图 1B 与图 1C 为同一批次的熏硫前后的川白芷样品。

2.6 相似度评价

将所得的 27 批川白芷的 RRLC 图谱以 AIA 格式依次导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 年版》软件,以 S-2 号药材(GAP 基地)谱图作为参照谱进行指纹匹配,确定了 23 个共有峰,建立了川白芷药材指纹图谱的共有模式并进行了相似度计算,见表 2。

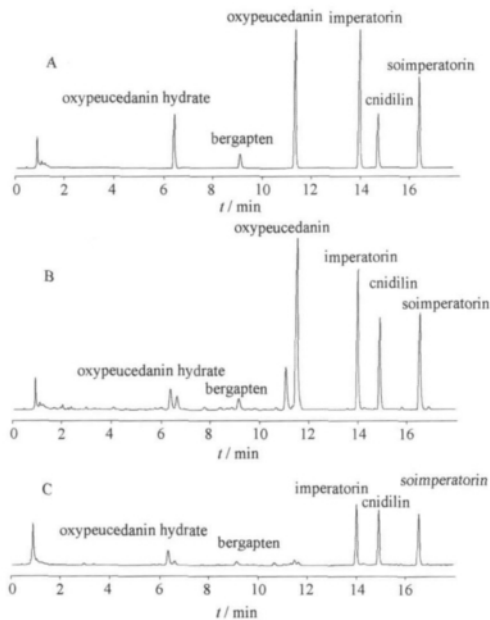


图 1 混合对照品(A)、未熏硫川白芷 S5(B)、熏硫川白芷 S19(C) 色谱图

Fig. 1 Chromatogram of the mixture of six reference substances (A); Typical fingerprint of *Angelica dahurica* var. *Formosana* (dried in the sun) (B); Typical fingerprint of *Angelica dahurica* var. *Formosana* (Dried by sulfuring) (C)

2.7 系统聚类分析

将 27 批不同产地样品的指纹图谱各色谱峰面积相对药材称样量之比,进行量化,得到 27 × 23 阶的数据矩阵,应用 SPSS 软件,将 27 批样品分为 2 大类。聚类谱系图见图 2。

2.8 主成分分析

应用“SIMCA-P”软件对其进行主成分投影。其结果中前两个贡献率较大的主成分作二维主成分投影图,由各产地样品的空间分布密集程度,分析其化学成分相近程度,见图 3。

3 讨论

3.1 RRLC 指纹图谱技术是鉴别和评价中药材质量的有力工具,近年来也广泛用于川白芷的质量控制和评价。本实验首次采用 RRLC 对川白芷的化学

表 2 川白芷相似度评价

Tab. 2 Similarity of fingerprints of *Angelica dahurica* var. *Formosana*

Sample	Similarity	Sample	Similarity
S1	0.974	S15	0.973
S2	0.939	S16	0.965
S3	0.975	S17	0.850
S4	0.945	S18	0.758
S5	0.963	S19	0.874
S6	0.978	S20	0.759
S7	0.961	S21	0.788
S8	0.979	S22	0.877
S9	0.968	S23	0.886
S10	0.983	S24	0.786
S11	0.966	S25	0.880
S12	0.965	S26	0.832
S13	0.977	S27	0.727
S14	0.961		

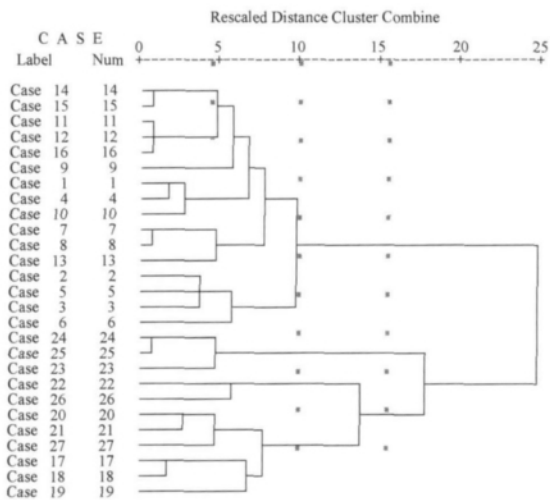


图 2 川白芷样品聚类分析图

Fig. 2 Sample cluster analysis diagram of *Angelica*

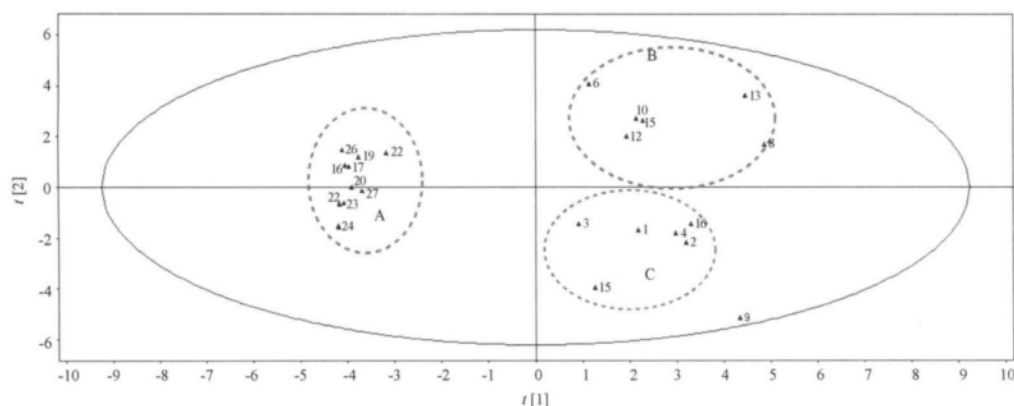


图3 川白芷样品主成分分析图

A - 熏硫后样品; B - 安岳、达州和南充产区未熏硫样品; C - 遂宁产区未熏硫样品

Fig.3 Principal component analysis diagram of Angelica samples

A - dried by sulfuring; B - Anyue, Dazhou and Nanchong origin; C - Suining origin

成分指纹图谱进行系统研究,所建立的 RRLC 法在保持复杂组分良好分离度的同时,将分析时间缩短至 18 min。

3.2 川白芷药材熏硫前后的化学成分差异明显,已有文献报道熏硫川白芷药材镇痛活性明显下降^[5],这可能和其熏硫后香豆素类成分损失有关。从图 1 看,熏硫后损失最大的为氧化前胡素、欧前胡素、异欧前胡素、水合氧化前胡素等依次降低。这可能是熏硫过程中,川白芷中氧化前胡素等香豆素成分内酯结构不稳定导致的。

3.3 从相似度评价结果可知,熏硫前川白芷样品的相似度均 > 0.900,熏硫后川白芷样品的相似度在 0.700 ~ 0.900 之间。样品聚类分析表明,欧式距离为 15 时,无论是同产地的熏硫前后样品,还是不同产地熏硫产地的样品,均能明显分开。

本实验建立的指纹图谱可准确、可靠的鉴别和评价川白芷的样品,结果表明,川白芷熏硫前后样品

之间指纹图谱存在一定差异,可通过主成分分析和系统聚类结果快速鉴别出熏硫前后的川白芷样品。因此,结合化学计量学的 RRLC 指纹图谱可对川白芷药材硫熏前后进行快速的质量控制和识别。

REFERENCES

- [1] Ch. P (2010) Vol I (中国药典 2010 年版·一部) [S]. 2005: 97-98.
- [2] WANG M Y, JIA M R, MA Y Y. Determination of coumarins content in radix *Angelicae dahuricae* by HPLC And UV [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2004, 27(11): 826-828.
- [3] WANG T T. Quality evaluation method of *Angelica dahurica* [D]. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University: 2006.
- [4] HUANG H Q, ZHANG X, XU Z X *et al*. Fast determination of saikosaponins in bupleurum by rapid resolution liquid chromatography with evaporative light scattering detection [J]. *J Pharm Biomed Anal* 2009 49(4): 1048-1054.
- [5] MA Y Y, GAO Y, ZHOU W L *et al*. Study on effect of mice analgesic action of *Angelicae dahurica* radix drying by sulfur [J]. *J West China Pharm* (华西药理学杂志), 2006 21(6): 616-617.

(收稿日期: 2010-10-12)

《中国药理学杂志》2011 年专栏征稿通知

为提高《中国药理学杂志》稿件的学术水平,为广大药学工作者提供一个展示的舞台,经《中国药理学杂志》主编扩大会议讨论通过,本刊 2011 年将组织如下专栏。

①儿科药物的研发与应用;②围孕期和妊娠期用药及安全性评价;③糖尿病治疗药物研发与应用的新进展;④调血脂创新药物的研发与应用;⑤抗肝炎病毒药物的研发与应用;⑥岛津杯药物分析优秀论文获奖论文选登。

具体征文内容及刊登时间敬请关注中国药理学杂志网站 www.zgyxzz.com.cn 及《中国药理学杂志》各期发表的征文通知。

[本刊讯]