

人工规范化种植防风药材的 指纹图谱研究

□王喜军* 曹 玲 孙 晖 (黑龙江中医药大学 哈尔滨 150040)

摘 要:用 HPLC 方法,使用 Kromasil C₁₈ 色谱柱 (4.6mm × 200mm, 5μm), 甲醇 - 水梯度洗脱,检测波长为 254nm,流速为 1.0ml · min⁻¹ 进行了防风的指纹图谱的研究和建立。在上述条件下,实现了防风全成分的有效分离,所建立的指纹图谱能够体现防风药材成分的整体特点,同时能够实现种植防风与野生防风的有效鉴别,可作为防风药材质量控制及分类评价的依据。

关键词:防风 指纹图谱 HPLC 质量评价 升麻苷

中药成分复杂,而且临床上使用强调整体性,单纯测定少数几种有效成分或指标成分难以控制其内在质量。因此,应逐步建立尽可能全面反映整体成分特征的指纹图谱,体现整体性和综合作用,更好地评价药材质量。

防风伞形科植物 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk 未抽花茎的干燥根,具有发汗解表、祛风除湿、止痛的功用。我们利用

HPLC 法,建立了防风药材的色谱指纹谱,为防风药材质量及其制剂质量与控制提供整体的深入的评价依据。

一、材料及设备

1. 仪器设备

Waters 高效液相色谱仪 (Waters 2690 Controller, Waters 2690 Pump, Waters 2996 Photodiode Array Detector); H66MC 型超声震荡仪。

2. 药品及试剂

甲醇、乙腈为色谱醇,水为重蒸水,其余试剂为分析纯。对照品升麻苷 (prim - o - glucosyl - cimifugin) 由中国中医研究院中药研究所肖永庆博士提供,纯度为 98% 以上。

3. 样品来源

样品由黑龙江省泰康、赵光、拜泉、海伦、龙江、黑龙江中医药大学药用植物园提供的栽培防风;泰康县及大庆的野生防风为

收稿日期:2003-07-28

* 联系人:王喜军,教授,博士生导师,本刊编委,黑龙江中医药大学副校长,黑龙江省中药材 GAP 研究中心主任, Tel: 0451-82110818, E-mail: xijunw@sina.com。

[World Science and Technology / Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica] 33

课题组自采；商品防风购自哈尔滨市药材总公司，产地为泰康县。上述样品经王喜军教授鉴定为伞形科植物 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk。

二、方法与结果

1. 色谱条件及选择

(1) 色谱条件。

色谱柱：Kromasil C₁₈ 色谱柱 (4.6mm × 200mm, 5μm) 及其 C₁₈ 保护柱；流动相：(A 甲醇)-B(水)梯度洗脱，15% ~ 30% A (0 ~ 2min)，30% ~ 45% A (2 ~ 20min)，45% ~ 60% A (20 ~ 25min)，60% ~ 90% A (25 ~ 50min)，90% ~ 100% A (50 ~ 55min)，100% A (55 ~ 60min)；柱温：40℃；流速：1ml/min；检测波长 254nm；进样量：10μl。

(2) 色谱条件的选择。

色谱柱的选择：选用中科院大连物化所 Kromasil C₁₈ 色谱柱 (4.6mm × 200mm, 5μm)、Waters Symmetry Shield RP₁₈ 色谱柱 (3.9mm × 150mm, 5μm)、岛津公司 Shim-pack VP-ODS 色谱柱 (4.6mm × 200mm, 5μm) 三种色谱柱进行试验，结果大连物化所 Kromasil C₁₈ 色谱柱出峰较多，峰形较好，使各峰相互分离较好，故本实验选用 Kromasil C₁₈ 色谱柱及其保护柱。

流动相的确定：选择多种流动相系统：

(1) 甲醇 - 0.2% 磷酸梯度洗脱；

(2) 甲醇 - 水梯度洗脱；

(3) 乙腈 - 水梯度洗脱。

结果以流动相(2)系统为佳，各色谱峰分离度好，保留时间适中，故选流动相(2)系统作为防风指纹图谱检测的流动相。

检测波长的选择：采用二极管阵列检测器，结合防风中所含色原酮、香豆素等成分的光谱图选择测定波长，结果在 230-260nm 波长范围内出现的色谱峰数目适中，各色谱峰相互之间分离度较好，以 254nm 图形最好，故检测波长定为 254nm。

2. 参照物的选择

升麻苷为指纹图谱中峰面积积分值较大、出峰时间较早、很稳定的一个峰，而且可以获得对照品，故选择升麻苷作为参照物。

3. 供试品溶液的制备

(1) 提取方法考察。

对加热回流 2 小时和超声 15 分钟及超声 30 分钟进行了比较，可看出防风药材加热回流及超声 30 分钟提取的比超声 15 分钟峰少，虽然加热回流提取色原酮类成分含量比超声提取高，但依据色谱出峰尽可能全成分的原则，超声 15 分钟提取效果好，而且提取方便，节省时间，故采用此法进行提取。

(2) 供试品溶液的制备。

精密称取防风粉末（过三号筛）0.5g，加甲醇 10ml，超声提取 15min，离心 15 min，取上清液用 C₁₈ ODS 预处理柱及微孔滤膜 (0.45μm) 滤过即为供试品溶液。

4. 方法学考察

(1) 精密度试验。

取同一批防风药材，制备供试

品溶液，连续进样 5 次，测定指纹图谱，测得相对保留时间差别在 0.002 ~ 0.048min 之间，≥5% 总峰面积的各共有峰相对峰面积的 RSD 在 0.37% ~ 1.79% 之间。各共有峰相对峰面积及相对保留时间的 RSD 小于 3%，表明进样的精密度良好。

(2) 重复性试验。

取同一批防风药材，制备供试品溶液，平行操作制备 5 份，分别测定指纹图谱，结果各共有峰相对保留时间差别在 0.002 ~ 0.024min 之间，≥5% 总峰面积的共有峰的相对峰面积 RSD 在 0.22% ~ 2.56% 之间。各共有峰相对峰面积、相对保留时间的 RSD 小于 3%，表明其重复性试验较好。

(3) 稳定性试验。

取同一批防风药材，制备供试品溶液，分别在 0h、2h、4h、6h、8h、10h 检测指纹图谱，结果各共有峰相对保留时间差别在 0.002 ~ 0.023min 之间，≥5% 总峰面积的共有峰其相对峰面积的 RSD 在 0.35% ~ 2.31% 之间，各共有峰相对峰面积、相对保留时间的 RSD 小于 3%，表明样品溶液在 10h 内稳定。

三、HPLC 指纹图谱及技术参数

1. 指纹图谱及共有指纹峰的标定

对不同产地的样品进行测定，防风所含成分的色谱峰在 60 min 之内洗脱完全（图 1），分析比较不同产地防风样品的色谱图。

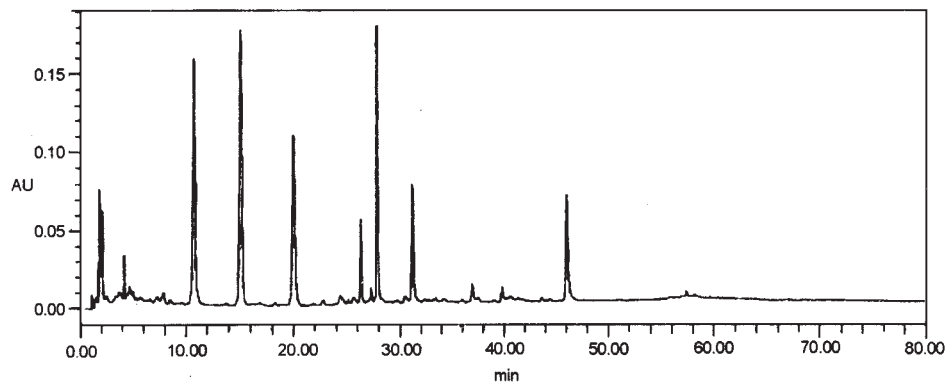


图1 防风药材 HPLC 色谱图

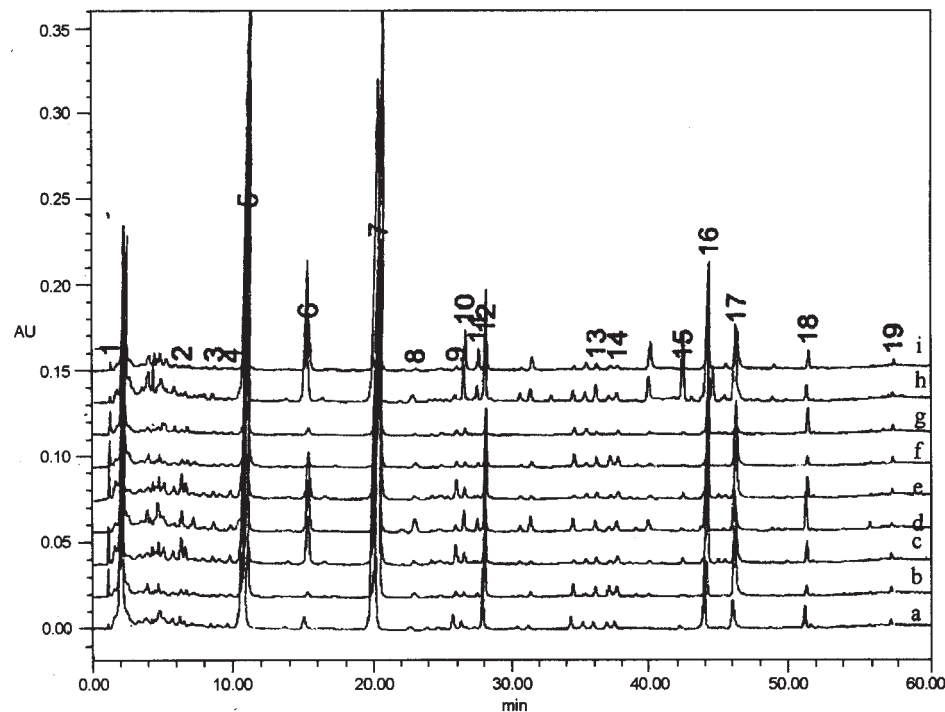


图2 不同产地的防风药材的 HPLC 指纹图谱

a- 赵光产 b- 海伦产 c- 拜泉产 d- 大庆产野生 e- 龙江产
f- 黑龙江中医药大学药用植物园产 g- 泰康产 h- 商品防风 i- 产泰康野生

同时,对各色谱图的色谱峰的紫外光谱图进行比较,其中19个色谱峰的保留时间和紫外光谱均一致。因此,确定它们为共有指纹峰,见图2。

2. 技术参数

根据《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》,以参照物峰(S)的相对保留时间和相对峰面积为1,计算各共有峰的相对保

留时间和相对峰面积。不同产地防风供试品溶液检测共有峰有19个,以升麻苷色谱峰(S峰)作为参照物,以其保留时间和峰面积积分值为1,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。

19个共有峰的相对保留时间分别为: 1.(0.097 ± 0.004) 2.(0.579 ± 0.004) 3.(0.79 ± 0.003) 4.(0.901 ± 0.004) 5.(S)(1) 6.(1.399 ± 0.006) 7.(1.837 ± 0.016) 8.(2.088 ± 0.022) 9.(2.319 ± 0.038) 10.(2.393 ± 0.041) 11.(2.477 ± 0.056) 12.(2.53 ± 0.047) 13.(3.265 ± 0.071) 14.(3.407 ± 0.070) 15.(3.836 ± 0.087) 16.(3.99 ± 0.085) 17.(4.18 ± 0.090) 18.(4.752 ± 0.011) 19.(5.208 ± 0.118)

相对峰面积分别为: 1.(0.019 ± 0.013) 2.(0.024 ± 0.011) 3.(0.011 ± 0.007) 4.(0.008 ± 0.004) 5.(S)(1) 6.(0.273 ± 0.404) 7.(1.074 ± 0.313) 8.(0.025 ± 0.017) 9.(0.021 ± 0.008) 10.(0.073 ± 0.09) 11.(0.028 ± 0.033) 12.(0.172 ± 0.229) 13.(0.027 ± 0.028) 14.(0.023 ± 0.008) 15.(0.026 ± 0.059) 16.(0.208 ± 0.168) 17.(0.191 ± 0.148) 18.(0.049 ± 0.027) 19.(0.018 ± 0.02) 其中5(S) 7号峰的单峰面积占总峰面积10%以上。

对指纹图谱的整体相似度进

表 1 相似性结果

样品	相似性	样品	相似性
1	0.994	7	0.955
2	0.995	8	0.997
3	0.988	9	0.956
4	0.970	均值	0.979
5	0.989	SD	0.017
6	0.966		

行评价分析, 色谱峰的匹配根据样品的相对保留时间, 结合样品指纹图谱的谱峰形状特点进行的。以 9 批样品色谱峰峰面积均值为相似度评价标准模板, 各批样品相似度见表 1。按此结果, 防风药材要求其指纹图谱的相似性为 0.979 ± 0.017 。

四、讨 论

1. 防风药材指纹图谱间的相似性

采用 3D-HPLC 方法建立了防风药材的稳定色谱图, 并对其保留时间及紫外光谱分析, 确定 19 个共有峰, 并用 Excel 办公软件, 采用向量夹角余弦法计算了指纹图谱之间的相似度。向量夹角余弦法是将中药指纹图谱数据视为多维空间中的向量, 使指纹谱的相似性问题转化为多维空间中的两个向量间的相似性问题。在定量计算两张色谱指纹图谱相似度方面具有优势, 能够定量评价指纹图谱间的相似性。由于所用药材为黑龙江省规范化种植的样品或野生样品, 商品防风也产于黑龙江省泰康县, 产地集中, 自然影响因素的无序性较低, 因此, 指纹图谱间的相似性会

达到 0.95 以上。

2. 野生与种植防风的差别

对种植防风、野生防风、商品防风的测定结果可看出, 野生防风、商品防风的图谱中各共有峰的比例相似, 而种植防风则与野生防风差别明显, 具有专属性的特征。该鉴别点主要在 6 号峰上, 野生防风、商品防风的相对峰面积在 0.203 ~ 0.561 之间, 而种植防风在 0.014 ~ 0.098 之间, 可以据此对药材是种植还是野生进行初步判定, 认为 6 号峰的相对峰面积 > 0.2 即可能是野生防风; 相对峰面积 < 0.1 则可能是种植防风。从而实现了指纹图谱既可控制药材内在质量, 又可对种植防风和野生防风进行分类评价。

3. 提取试剂

已知色原酮类与香豆素类成分是防风的两类重要活性物质, 其中色原酮类成分的含量较高, 且大多以苷的形式存在, 故在提取时既要考虑极性较大的色原酮类成分, 又要考虑极性较小的香豆素类成分。因此, 实验中用对这两类成分提取较好的甲醇为提取溶剂。为了最大程度的保留原有成分, 并保证分析的顺利进行, 样品预处理时使用了 C_{18} ODS 预处理柱, 目的是除去在 C_{18} ODS 柱上死吸附的成分。并且对使用 C_{18} ODS 预处理柱前后的色谱图进行了比较, 证明共有峰的成分未受影响。

4. 参照物的选定

鉴于指纹图谱的目的是甄别原料和药品的真伪, 我们认为选定防风含量较大的色原酮类化合

物 (0.5% 以上) 为检验对象能够起到指纹鉴别的作用。升麻苷是防风中含有的一种色原酮类化合物, 也是中国药品生物制品检定所确认的色原酮类标准物质, 因而被选定为本指纹图谱技术要求的参照物。

参考文献

1 潘馨, 郭素华. 三七指纹图谱的研究. 海峡药学, 2002, 14(5): 47 ~ 48.
2 杨光明, 蔡宝昌等. 川芎药材指纹图谱研究与产地比较. 南京中医药大学学报, 2002, 18(3): 172 ~ 173.
3 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行). 中成药, 2000, 22(10): 671 ~ 675.
4 李江. 防风的化学成分和药理研究概况. 北京中医, 1998 (5): 47 ~ 48.

(责任编辑: 刘维杰 郭 静)

引发严重感冒的
新型人类冠状病毒

荷兰阿姆斯特丹大学的研究人员近日宣布, 他们发现了一种与 SARS 病毒相似的新型人类冠状病毒——HCov - NL63。HCov - NL63 病毒是导致一种严重感冒的根源, 该病毒能使不满周岁的婴儿和自身免疫系统有问题的成年人出现急性呼吸道疾病。与 SARS 病毒相比, 新型冠状病毒引发的病症较轻, 不会导致肺炎。

据负责该项研究的病毒学专家本·贝克赫特介绍, 他们是在 2003 年 1 月对一名患有支气管炎和结膜炎的 7 个月大的女婴进行诊治时发现该病毒的。研究人员认为 HCov - NL63 很容易在人群中传播。据调查, 在 2003 年 1 月因患有不知名呼吸道疾病入院治疗的病人中, 7% 的病患感染了该病毒。(文 摘)

Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102)

This article summarizes the application of cell model system to the high – throughput screening assays and toxicity of drugs and presents the study on the *in vitro* metabolism of drugs by Caco – 2 cell model system. It also analyzes the prospects of studies on Chinese medicine by cell model system and generally discusses the possibilities in the application of cell model system to the screening, the identification of active components, the study of pharmacology and the analysis of metabolism of Chinese medicinal materials.

Key Words: cell model, high – throughput screening, Chinese medicine

**Study and Establishment of Fingerprint of Saposchnikovia Divarikat (Turcz) Schschk
Cultivated in Accordance with Standard Operation Procedures (SOP)**

Wang xijun, Cao Ling and Sun Hui

(Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040)

The establishment of a complete fingerprint for Chinese medicinal materials constitutes a step of utmost importance in the deep study and control of the effective constituents of Chinese medicinal materials. The authors of this article have studied and established a possibly complete fingerprint of saposchnikovia divarikata (Turcz) schschk by the method of HPLC and by means of Kromasil C18 column (4.6mm * 200mm, 5um) and methanol – water solvent programming, by which 254nm of wavelength and 1.0ml · min of current velocity are detected. Under such conditions as described above all the constituents of saposchnikovia divarika (Turcz) schischk have been effectively separated and the established fingerprint can afford to reflect all the characteristics of the plant's medicinal constituents and successfully identify its cultivated and wild varieties. Therefore it can be used as the basis for the quality control and classification assessment of this medicinal plant.

Key Words: Sapishnikovis divarikata (Turcz) Schischk, fingerprint, HPLC, quality evaluation, primo – glucosyl – cimifugin

**Exploration of Quality Control and Safety of Prepared Ultra – fine Slices of
Traditional Chinese Medicinal Plants**

Wang Wentao (Drug Control Office of Hunan Province, Changsha 410001)

The prepared ultra – fine slices of traditional Chinese medicinal plants turned out by high and new technologies is a kind of new slices which accord with the principles of diagnosis and treatment based on an overall analysis of diseases and patients' condition and also with the features of traditional prescription in TCM. In this article the characteristics of the prepared ultra – fine slices and the present situation of their research and development are described, the problems existing in the progress of their industrialization and the problems in their production, quality control and safety, which are necessary to be studied, as well as suggestions herefrom are put forward.

Key Words: prepared slices of traditional Chinese medicinal plants, ultra – fine powder, quality control, safety

Application of Modernized High and New Technologies to Analysis of Internal Chinese Medicine

Zhao Yuqing (Liaoning College of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032)

Yu Jingmou and Cui Jiongmo (School of Pharmacy of Yanbian University, Yanji 133000)