

川白芷 HPLC 指纹图谱研究*

□钟世红 马逾英** 贾敏如 蒋桂华 高颖 古锐

(成都中医药大学药学院 成都 611730)

摘要:目的:为川白芷药材质量研究提供新的评价方法和依据。方法:对样品进行 HPLC 测定,采用主成分分析、聚类分析及相似度评价等多种方法进行评价,并对川白芷规范化种植中不同试验项目样品进行了指纹图谱的比较。结果:熏硫和未熏硫样品的指纹图谱存在较大差异,分别建立了熏硫和未熏硫川白芷药材的指纹图谱。结论:本文所建立的指纹图谱较全面地反映了川白芷香豆素类成分的特征,可作为川白芷质量评价的方法,并可用于区分川白芷是否熏硫。

关键词:川白芷 指纹图谱 HPLC 质量评价

白芷始载于《神农本草经》,为常用的解表、止痛药。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%^[1]。目前川白芷的产地加工方法主要为硫磺烟熏法,但大量实验证实熏硫后其香豆素及挥发油类成分大大降低^[2-5]。本文对川白芷药材指纹图谱进行了研究。结果表明,建立的方法稳定、可靠、重现性好,为川白芷药材及其制剂指纹图谱的研究打下基础,同时为川白芷药材 GAP 研究提供理论依据和质量保证。

一、仪器与试剂

Waters2695 高效液相色谱仪,Waters 2996 检测器(二极管阵列 PDA),Empower pro 工作站;电子天平 BP121S(北京 Sartorius 天平有限公司)

欧前胡素、异欧前胡素(中国药品生物制品检定所提供,批号分别为 0826-9401、0827-200105);水合

氧化前胡素和 5-甲氧基-8-羟基-补骨脂内酯均由川白芷 GAP 课题组自川白芷中分得,已经光谱学鉴定,由归一化法测得纯度分别为 99.78%和 98.46%。甲醇、乙腈、四氢呋喃为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

川白芷药材共 25 批,自采或购买,均由成都中医药大学贾敏如教授鉴定,为杭白芷(*Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. var. *formosana* (Boiss.) Shan et Yuan)的干燥根,来源见表 1。

二、实验方法

1. 供试品溶液制备

取样品粉末 2.0g(过 20 目筛),精密称定,置索氏提取器中,加入甲醇 85 ml,加热回流提取 6 h,滤过,置 100 ml 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得供试品溶液。

2. 对照品溶液制备

取水合氧化前胡素、欧前胡素、5-甲氧基-8-羟

收稿日期:2005-09-16

修回日期:2005-10-20

* 科学技术部 863 计划项目(2001BA701A40-3):白芷配方颗粒质量标准的规范化研究,负责人:马逾英。

** 联系人:马逾英,Tel: 028-80863196, E-mail: ma-yuying@126.com。

基-补骨脂内酯及异欧前胡素对照品适量,置同一 50 ml 量瓶中,加甲醇制成含以上对照品各 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、 $0.33 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 和 $0.15 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的混合溶液。

3. 色谱条件

流动相:A、水,B、四氢呋喃,C、甲醇,流动相比比例见表 2。

色谱柱:迪马 Diamonil C18($5 \mu\text{m}$, $250 \times 4.6 \text{ mm}$)

波长:320nm

柱温:35℃

流速: $1.0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

4. 检测方法的稳定性、精密度、重现性考查

(1) 精密度实验与稳定性实验。

取同一供试品溶液,精密吸取 $10 \mu\text{l}$,在 0~24h 每隔 4h 进样一次。测得各峰保留时间 RSD 为 0.15~1.14%, 主要色谱峰面积 RSD 为 0.55~2.89%, 表明本方法精密度良好,供试品溶液在 24h 内稳定。

(2) 重复性实验。

取同一批供试品粉末 2.0g (过 20 目筛)6 份,按供试品制备方法分别制得各供试品溶液。精密吸取各供试品溶液 $10 \mu\text{l}$,注入高效液相色谱仪,测得各峰保留时间 RSD 为 0.08~1.36%, 主要色谱峰面积 RSD 为 0.50~2.45%, 表明本方法重现性良好。

三、结果分析

1. 样品指纹图谱主成分分析

采用中南大学梁逸曾教授编写的“计算机辅助相似度评价系统”,对以上样品进行主成分分析,结果见图 1。

由图 1 可以看出,熏硫样品(圈内所示,15~25 号)的投影非常集中。

2. 样品指纹图谱聚类分析

表 1 样品来源(均为 2004 年样品)

样品编号	样品分类	采集地点及相关信息	加工方法
1		四川省遂宁市中脊村(7月2日)	晒干
2		四川省遂宁市三洲村(7月2日)	晒干
3	不同采收期	四川省遂宁市中脊村(7月12日)	晒干
4		四川省遂宁市三洲村(7月12日)	晒干
5		四川省遂宁市中脊村(7月22日)	晒干
6		四川省遂宁市三洲村(7月22日)	晒干
7		四川省遂宁市中脊村(8月1日)	晒干
8		四川省遂宁市三洲村(8月1日)	晒干
9	不同加工方法	四川省遂宁市中脊村	切片晒干
10			拌石灰
11		四川省射洪县柳树镇魏家营村	晒干
12	不同产地	四川省蓬溪县红江镇红江村	晒干
13		四川省南充市阆家镇和光村	晒干
14			熏硫
15		四川省遂宁市中脊村	熏硫
16		四川省遂宁市三洲村	熏硫
17		一等品	熏硫
18	不同商品等级	四川省遂宁市三洲村	二等品 熏硫
19		三等品 熏硫	
20		一等品 熏硫	
21		四川省遂宁市中脊村	二等品 熏硫
22		三等品 熏硫	
23		一等品 熏硫	
24		成都市荷花池药材市场	二等品 熏硫
25			三等品 熏硫

表 2 流动相比比例

梯度条件	A	B	C
0min	60%	8%	32%
5min	60%	8%	32%
55min	20%	16%	64%
60min	20%	16%	64%

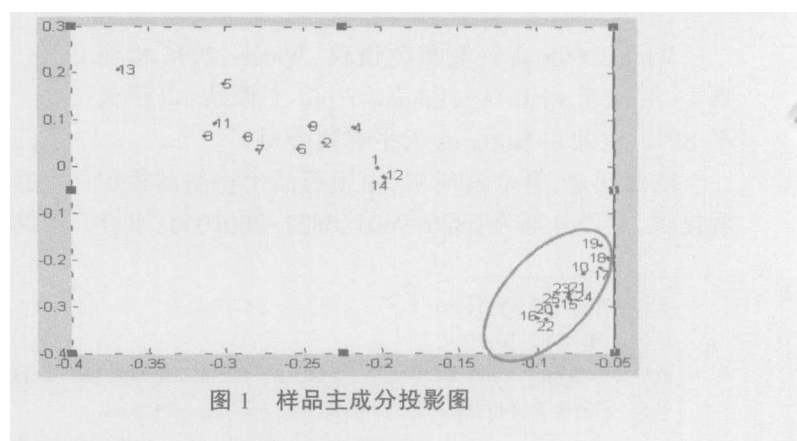


图 1 样品主成分投影图

使用 SPSS11.5 对川白芷样本的峰面积变量进行系统聚类(Hierarchical Cluster),结果见图 2。

从图 2 可以看出,熏硫样品(15~25 号)单独聚为一类。

3. 川白芷指纹图谱的建立

由于川白芷熏硫前后指纹图谱存在较大差异,遂分别建立熏硫与未熏硫样品的指纹图谱。

对 12 批未熏硫川白芷样品的指纹图谱进行比较和编号,确定 12 个峰作为共有峰组成其指纹图谱,见图 3。

对 12 批熏硫川白芷样品的指纹图谱进行比较和编号,确定 10 个峰作为共有峰组成其指纹图谱,见图 4。

经与对照品色谱图(图 5)相对照,确认了未熏硫川白芷指纹图谱中的第 5、10、11、12 号色谱峰;熏硫川白芷指纹图谱中的第 4、8、9、10 号色谱峰分别对应为水合氧化前胡素、欧前胡素、5-甲氧基-8-羟基-补骨脂内酯及异欧前胡素。

4. 样品指纹图谱的相似度计算

应用“计算机辅助相似度评价系统”分别计算川白芷药材未熏硫、熏硫样品各自指纹图谱间的相似性,以相关系数进行评价,结果见表 3、表 4。

相似度计算结果表明,未熏硫、熏硫样品两类样品各自相似度均在 0.90 以上(14 号样品除外)。

5. 不同产地样品(未熏硫)指纹图谱分析

计算不同产地川白芷药材指纹图谱间的相似性,以相关系数进行评价,见表 5。

比较相似度计算结果,不同产地川白芷样品指纹图谱相似度有一定差异,遂宁市、射洪县和蓬溪县 3 个产地的样品相似度较高,南充样品相似度较低,见图 6。

6. 不同采收期样品(未熏硫)指纹图谱分析

对两个产地不同采收期川白芷样品共

有峰及总峰面积进行比较,见表 6、表 7。

由以上比较结果可知,共有峰及总峰面积在农历入伏前后 10d 达到最大值,测定结果支持了入伏采挖川白芷的传统生产经验。

7. 不同加工方法样品指纹图谱分析

对不同加工方法川白芷样品总峰面积进行比较,见表 8。

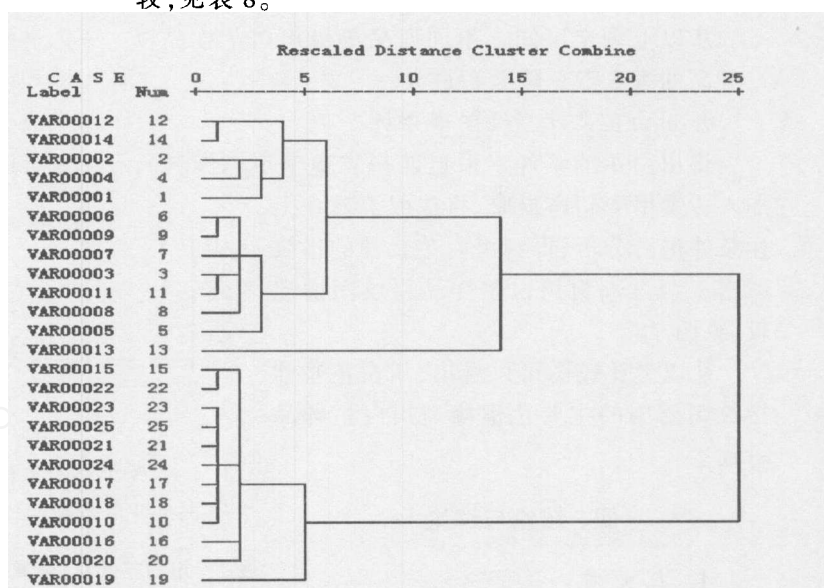


图 2 样品聚类分析图

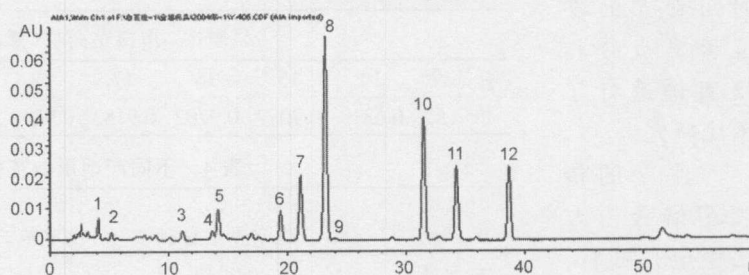


图 3 川白芷(未熏硫)指纹图谱

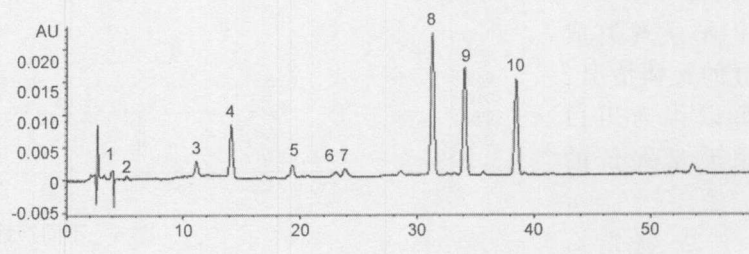


图 4 川白芷(熏硫)指纹图谱

由测定结果可知,不同加工方法川白芷样品以自然晒干样品的总峰面积最高,切片晒干次之,拌石灰和熏硫加工样品总峰面积大幅度降低。

8. 不同商品等级川白芷样品(熏硫)指纹图谱分析

对不同商品等级川白芷样品共有峰面积进行比较,见表9。

从以上测定可知,不同商品等级川白芷样品以三等品的香豆素总峰面积最大。

9. 川白芷浆汁指纹图谱分析

将川白芷的浆汁(采自四川省遂宁市三洲村),加入适量甲醇超声提取,将提取溶液在上述条件进行分析,得到川白芷浆汁的指纹图谱,与三洲村川白芷样品指纹图谱比较,见图7。

从以上比较图可以看出,川白芷浆汁指纹图谱中的主要色谱峰与川白芷样品一致。

四、结论与讨论

1. 本文首次采用 HPLC 法对川白芷的香豆素类成分指纹图谱进行了系统研究

建立的指纹图谱分析方法稳定,可靠,重现性好,能全面、直观地反映出香豆素类成分的整体情况,可以作为川白芷质量评价的方法。

2. 将川白芷样品分为未

熏硫与熏硫两个化学类群

由主成分分析、聚类分析结果可知,川白芷样品熏硫前后有较大差异,因此将川白芷样品分为未熏硫与熏硫两类,分别建立各自的指纹图谱。比较两类样品指纹图谱,熏硫样品各色谱峰面积均有较大幅度的降低,其中未熏硫样品指纹图谱中的4、7、8号峰在熏硫后改变很大:熏硫后4、7号峰消失了,原本为最强峰的8号峰几乎消失,7号峰的缺失及8号峰面积的大幅度降低,应该是造成熏硫后样品香豆素类成分含量骤减的主要原因。以上3个色谱峰的差异可以作为判断川白芷药材是否熏硫的依据。

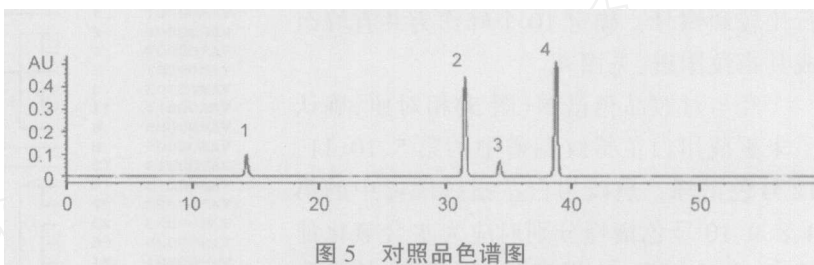


图5 对照品色谱图

(峰1:水合氧化前胡素, $t=14.225$;峰2: 欧前胡素, $t=31.528$;
峰3:5-甲氧基-8-羟基-补骨脂内酯, $t=34.227$;峰4:异欧前胡素, $t=38.678$)

表2 川白芷药材(未熏硫)指纹图谱相似度计算结果

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12	13
相似度	0.9712	0.9850	0.9960	0.9798	0.9953	0.9957	0.9937	0.9910	0.9910	0.9937	0.9848	0.9721

表3 川白芷药材(熏硫)指纹图谱相似度计算结果

样品号	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
相似度	0.6319	0.9087	0.9702	0.9183	0.9468	0.9411	0.9336	0.9772	0.9487	0.9852	0.9700	0.9783

表4 不同产地川白芷样品指纹图谱相似度计算结果

样品号及产地	5 遂宁市中脊村	6 遂宁市三洲村	11 射洪县	12 蓬溪县	13 南充市
相似度	0.9938	0.9870	0.9923	0.9849	0.9110



图6 不同产地川白芷指纹图谱比较

(从下到上依次为遂宁市中脊村、遂宁市三洲村、射洪县、蓬溪县及南充市样品。)

值得一提的是,14号样品为熏硫中途取出样品,熏硫时间不足5h,而产地加工熏硫时间一般为一昼夜。此样品与其余熏硫样品相似度较低,而在投影图及聚类分析中与未熏硫样品较为接近;反映了香豆素类成分的损失量受熏硫时间影响较大。

3. 对川白芷规范化种植中不同试验项目样品进行了指纹图谱的比较

对川白芷规范化种植中不同产地、不同采收期、不同加工方法、不同商品等级的样品进行了分析。

指纹图谱测定的总峰面积比较结果与川白芷GAP课题组前期的香豆素含测结果(包括3种香豆素及总香豆素含量测定)结论一致,为川白芷规范化

种植提供了科学依据,进一步完善了川白芷质量评价工作。

不同商品等级的川白芷样品总峰面积比较结果以根条细小的样品(三等品)最大,表明根条细小的样品香豆素类成分含量较高,与传统商品等级的划分不一致,建议制定川白芷商品等级标准时结合其内在质量进行评价。

4. 对川白芷浆汁指纹图谱进行了分析

结果表明,川白芷浆汁指纹图谱中的主要色谱峰与川白芷样品一致,说明香豆素类成分主要存在于分泌组织中。而分泌组织存在于皮部,根条细小的白芷样品实际上其皮部所占比例较大,因此浆汁分析结果也支持了根条细小的白芷香豆素含量较高的结论;同时提示了川白芷药材采收及加工干燥过程中应当防止根条皮部的破损,以保证药材质量。

表5 不同采收期样品共有峰及总峰面积比较结果(四川省遂宁市中脊村)

样品号及采收日期	1(7.2)	3(7.12)	5(7.22 入伏)	7(8.1)
共有峰总面积	2580462	3841092	3827228	3399351
总峰面积	2751371	4090564	4025060	3626986

(从下到上依次为遂宁市中脊村、遂宁市三洲村、射洪县、蓬溪县及南充市样品)

表6 不同采收期样品共有峰及总峰面积比较结果(四川省遂宁市三洲村)

样品号及采收日期	2(7.2)	4(7.12)	6(7.22 入伏)	8(8.1)
共有峰总面积	2976771	2838026	3007974	3460288
总峰面积	3175391	3127807	3202087	3788059

表7 不同加工方法川白芷样品总峰面积比较结果

样品号及加工方法	5(自然晒干)	9(切片晒干)	10(拌石灰)	15(熏硫晒干)
总峰面积	4025060	3017426	1067013	1326418

表8 不同商品等级川白芷样品总峰面积比较结果

样品号	17	18	19	20	21	22	23	24	25
等级	一等品	二等品	三等品	一等品	二等品	三等品	一等品	二等品	三等品
总峰面积	1205373	1045469	1362488	1778011	1315590	1735291	1281548	1187644	1380872

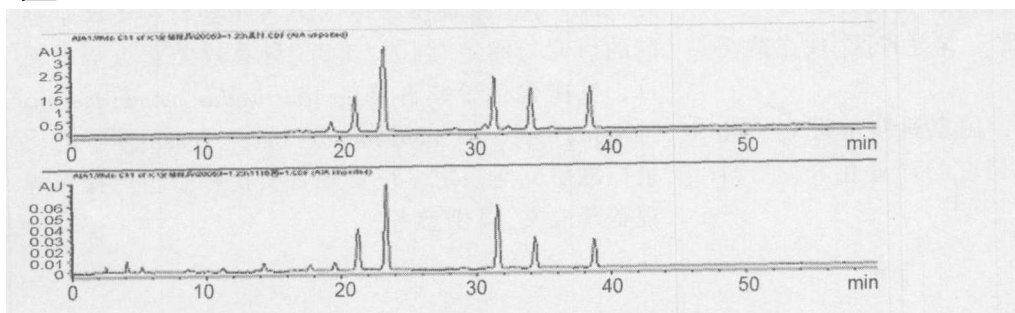


图7 川白芷浆汁与川白芷样品指纹图谱比较图

参考文献

- 王梦月,熊英,贾敏如,等.白芷的产销概况.华西药学杂志,2002,18(4):305-306.
- 李宏宇,戴跃进,谢成科.中药白芷熏硫前后香豆素成分含量比较.中国中药杂志,1991,16(1):27-28.
- 张玉芳,余红梅.熏硫对白芷香豆素类成分含量的影响研究.中国中药杂志,1997,22(9):536-538.
- 赵恒,周斌,孔英华,等.产地加工方法对白芷化学成分的影响.中药材,1996,19(3):134-136.
- 李宏宇,戴跃进,谢成科.川白芷的挥发油成分分析.华西药学杂志,1990,5(2):79-82.

(责任编辑:王 瑀)

Study of Radix Angelicae Anomaliae via HPLC Finger-printing

Zhong Shihong, Ma Yuying, Jia Minru, Jiang Guihua, Gao ying and Gu Rui

(School of Materia Medica, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611730)

Objective To provide the study of the quality of the medicinal plant Radix angelicae anomaliae with new method and basis of assessment. **Method** To test the samples of Radix angelicae anomaliae by HPLC and assess them by such methods as the analysis of main components, cluster analysis and similarity assessment and to compare via finger-print the samples used in different experiments in the cultivation of Radix angelicae anomaliae. **Result** There exist significant differences between the finger-printing of sulphured samples and that of unsulphured ones and as the result the finger-prints of sulphured and unsulphured samples of this medicinal plant are established respectively. **Conclusion** The finger-print mentioned in this article epitomizes the characteristics of coumarin family of Radix angelicae anomaliae and therefore this method can be used for the assessment of the quality of the medicinal plant and also for the distinction of whether the products of this plant are sulphured or not.

Key words Radix angelicae anomaliae, finger-print, HPLC, quality assessment

Study on Formulation of Normalized Operational Regulations for Production of Seeds of Astragalus Mongholicus

Zhang Liping, Shi Jin, Yang Chunqing, Li Xian'en and Ding Wanlong

*(Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences,
Chinese Peking Union Medical College, Beijing 100094)*

On the basis of consulting a large quantity of technical literatures, summing up experiences in the production areas and carrying out experiments on the identification of germplasm in resources, the prevention and control of plant diseases and insect pests and the processing of Astragalus mongholicus, investigations and studies are made on the principal problems existing in the production of the seeds of this medicinal plant and the operational regulations SOP for the production of its seeds are formulated.

Key Words Astragalus mongholicus, seed, SOP, normalized production

Study on Building-up and Sustainable Development of industry of Medicinal Plants in inland Salinized Areas of China

Jia Huixian, Lin Haiming and Xiao Wen

(Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070)

In china a large quantity of halophytes with strong adaptability of saline soils are distributed in the 9913 Km² of inland saline land, of which medicinal plants not only have their respectively special geographic units, ecological environment and unique chemical elements, but also are the volunteers for the improvement of inland salinized soils. On