

白亮独活的 HPLC 指纹图谱

高必兴, 兰志琼, 邓晶晶*, 吴婷婷, 满孝奎, 卢先明

(成都中医药大学药学院, 中药资源系统研究与开发利用省部共建
国家重点实验室培育基地, 中药材标准化教育部重点实验室, 成都 611137)

[摘要] **目的:**建立白亮独活的 HPLC 指纹图谱分析方法并测定药材中佛手柑内酯及欧前胡素含量,为该药材的质量评价提供参考。**方法:**收集 10 批白亮独活样品,采用 HPLC 建立指纹图谱方法,流动相水-甲醇梯度洗脱,检测波长为 302 nm。利用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004A 版软件进行指纹图谱分析。**结果:**10 批白亮独活的 HPLC 指纹图谱相似度均 >0.89,标定了 11 个共有峰。样品中佛手柑内酯、欧前胡素平均质量分数分别为 0.117% 和 0.709%。**结论:**该方法简单、重复性好,可用于白亮独活的品种鉴别和质量评价。

[关键词] 白亮独活; 康定独活; 佛手柑内酯; 欧前胡素

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)08-0061-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015080061

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150225.1607.004.html>

[网络出版时间] 2015-02-25 16:07

HPLC Fingerprint of *Heracleum candicans* Roots GAO Bi-xing, LAN Zhi-qiong, DENG Jing-jing*, WU Ting-ting, MAN Xiao-kui, LU Xian-ming (State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Co-founded by Sichuan Province and Ministry of Science and Technology, Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an effective quality evaluation method of *Heracleum candicans* roots and determine contents of two active ingredients of bergapten and imperatorin in this medicinal herb. **Method:** Ten batches of *H. candicans* roots were collected, HPLC fingerprint was performed in a gradient mode of water-methanol, detection wavelength of 302 nm. Similarity was evaluated with similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of tradition Chinese medicine (2004A) issued by state pharmacopoeia committee. **Result:** HPCL fingerprint similarity among 10 batches of *H. candicans* roots were more than 0.89 and 11 characteristic common peaks were demarcated. Contents of bergapten and imperatorin in samples were 0.117% and 0.709%. **Conclusion:** This method is simple and reproducible that can be used for identification and quality evaluation of *H. candicans* roots.

[Key words] *Heracleum candicans* roots; *H. souliei*; bergapten; imperatorin

白亮独活别名为臧当归、白羌活,主产于四川等地,具有杀虫、止血、愈疮痍、治麻风的功效,主治各种炎症、麻风、痈疽疔疮^[1],临床疗效确切。目前关于白亮独活的研究主要集中于化学成分分析^[2-4],从白亮独活根中分离出了 10 种香豆素类成分,经分

析大部分成分为线性呋喃香豆素类物质。但该药材难以从性状进行鉴别,本实验旨在通过建立简便、快速的 HPLC 指纹图谱以达到鉴别白亮独活的目的,测定该药材中 2 种活性成分含量,为完善白亮独活质量标准及其临床用药的安全性、有效性提供参考。

[收稿日期] 20140803(003)

[基金项目] 四川省藏药标准制定项目(301-377)

[第一作者] 高必兴,在读硕士,从事中药品种质量与资源开发研究,Tel:18011401594,E-mail:595353410@qq.com

[通讯作者] *邓晶晶,硕士,实验师,从事中药品种质量与资源开发的教学与研究,Tel:028-61800231,E-mail:dengjingjing-82@126.com

1 材料

BP121S 型 1/1 万和 BP211D 型 1/10 万型电子分析天平(德国赛多利斯股份公司),1200 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司)。佛手柑内酯对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号 MUST-14032211,纯度 $\geq 98\%$),欧前胡素对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110826-201214,纯度 99.5%),甲醇为色谱纯,水为乐百氏纯净水,其余试剂均为分析纯。白亮独活采于四川省甘孜州,经成都中医药大学药学院卢先明教授鉴定为伞形科植物白亮独活 *Heracleum candicans* 的干燥根。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 Diamonil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μ m),流动相水(A)-甲醇(B)梯度洗脱(0~5 min,35% B;5~60 min,35%~95% B;60~65 min,95% B),柱温 30 $^{\circ}$ C,流速 1 mL \cdot min⁻¹,检测波长 302 nm,进样量 20 μ L。见图 1。

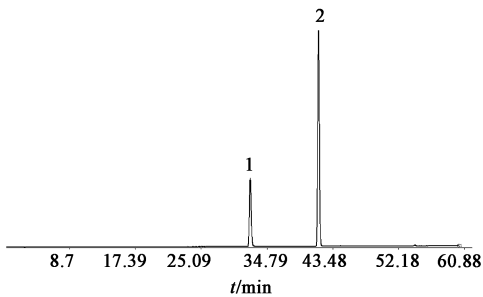


图 1 佛手柑内酯(1)欧前胡素(2)对照品 HPLC
Fig.1 HPLC chromatograms of bergapten (1) and imperatorin (2) reference substance

2.2 供试品溶液的制备 精密称取白亮独活粉末(过 3 号筛)0.5 g,置于 50 mL 锥形瓶中,加 80% 甲醇 30 mL,冷浸 30 min,称定质量,超声(200 W,40 kHz)30 min,取出,放冷,加 80% 甲醇补足减失的质量,取上清液过 0.45 μ m 微孔滤膜,即得。

2.3 对照品溶液的制备 分别精密称取佛手柑内酯、欧前胡素对照品 0.82,2.32 mg,置于同一 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,得质量浓度分别为 0.081,0.231 g \cdot L⁻¹ 的混合对照品溶液。

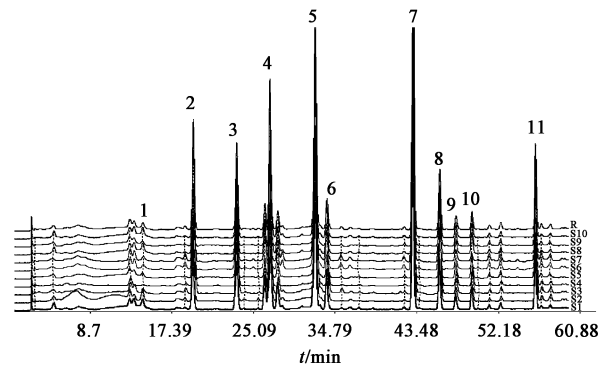
2.4 精密度试验 取同一供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件连续进样 5 次,计算各主要色谱峰相对保留时间及峰面积的 RSD 分别在 0.6%~0.8%,0.3%~0.7%,表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验 取同一供试品溶液分别于制备后 0,2,4,8,10,12,24 h 按 2.1 项下色谱条件测定,结果各主要色谱峰相对保留时间及峰面积的 RSD

分别在 0.4%~0.9% 和 0.2%~0.8%,说明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6 重复性试验 取同批次白亮独活样品 6 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,计算各主要色谱峰相对保留时间及峰面积的 RSD 分别在 0.4%~0.7% 和 0.5%~0.7%,表明该方法重复性良好。

2.7 指纹图谱的建立与评价 按 2.2 项下方法制备 10 批白亮独活供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,记录 65 min 内 HPLC 指纹图谱,采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004A 版软件进行指纹图谱分析,见图 2。



R. 对照谱
图 2 10 批白亮独活样品的 HPLC 指纹谱
Fig.2 HPLC fingerprint of 10 batches of *Heracleum candicans* roots

2.7.1 共有峰的标定 比较 10 批白亮独活 HPLC 指纹图谱给出的相关参数,去除部分分离度较差的色谱峰,确定了 11 个峰作为特征峰组成对照指纹图谱,与图 1 进行比对,确定 6,7 号峰分别为佛手柑内酯、欧前胡素。见图 2。

2.7.2 相似度评价 以峰面积相对较大的欧前胡素作为参照峰,计算各共有指纹峰的相对保留时间和峰面积比值。以共有模式为参照,计算样品与共有模式的相似度,见表 1,表明各样品的相似度较高。

2.8 欧前胡素和佛手柑内酯的含量测定

2.8.1 线性关系考察 精密吸取欧前胡素和佛手柑内酯混合对照品溶液 0.4,0.8,1.4,8,12,20 μ L,按 2.1 项下色谱条件测定,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程分别为 $Y = 3\,062.9X + 30.672$ ($R^2 = 0.999\,8$), $Y = 3\,042.4X - 7.411$ ($R^2 = 0.999\,6$),线性范围分别为 0.092 4~4.62,0.032 4~0.62 mg。

2.8.2 加样回收率试验 精密称取已知欧前胡素和佛手柑内酯含量的同批白亮独活样品 6 份,每份

表 1 10 批白亮独活样品相似度评价

Table 1 Similarity evaluation among 10 batches of *Heracleum candicans* roots

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1	0.942	0.925	0.893	0.926	0.899	0.899	0.910	0.926	1	0.930
S2	0.942	1	0.961	0.935	0.937	0.922	0.922	0.942	0.937	0.942	0.952
S3	0.925	0.961	1	0.982	0.974	0.965	0.965	0.925	0.974	0.925	0.983
S4	0.893	0.935	0.982	1	0.989	0.969	0.969	0.893	0.989	0.893	0.992
S5	0.926	0.937	0.974	0.989	1	0.979	0.979	0.926	0.982	0.926	0.996
S6	0.899	0.922	0.965	0.969	0.979	1	0.912	0.899	0.979	0.899	0.979
S7	0.899	0.922	0.965	0.969	0.979	0.922	1	0.899	0.979	0.899	0.979
S8	0.925	0.942	0.925	0.893	0.926	0.899	0.899	1	0.926	0.951	0.930
S9	0.926	0.937	0.974	0.989	0.893	0.979	0.979	0.926	1	0.926	0.996
S10	0.923	0.942	0.925	0.893	0.926	0.899	0.899	0.921	0.926	1	0.930
R	0.930	0.952	0.983	0.992	0.996	0.979	0.979	0.930	0.996	0.930	1

0.2 g,各精密加入佛手柑内酯和欧前胡素对照品适量,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,计算平均加样回收率分别为 99.57% 和 98.22%,RSD 分别为 1.2% 和 1.8%,表明该方法准确度较好。

2.8.3 样品测定 按 2.2 项下方法制备 10 批白亮独活供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定($n = 2$),计算佛手柑内酯和欧前胡素平均质量分数分别为 0.117% 和 0.709%,见表 2。

表 2 白亮独活样品产地及其活性成分的含量测定

Table 2 Habitats of *Heracleum candicans* roots and determination of its active ingredients %

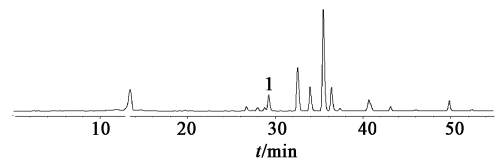
编号	产地	佛手柑内酯	欧前胡素
S1	四川省甘孜州道孚县八美乡	0.10	0.61
S2	四川省甘孜州炉霍县炉霍车站旁	0.11	0.72
S3	四川省甘孜州炉霍县斯木乡	0.11	0.69
S4	四川省甘孜州炉霍县宜木乡	0.11	0.87
S5	四川省甘孜州道孚县格西乡	0.10	0.71
S6	四川省甘孜州康定县塔公乡	0.13	0.74
S7	四川省甘孜州道孚县德加村	0.13	0.71
S8	四川省甘孜州理塘县赤尼乡	0.12	0.58
S9	四川省甘孜州炉霍县孔色乡	0.12	0.66
S10	四川省甘孜州道孚县龙灯乡	0.14	0.80

3 讨论

利用 DAD 检测器进行全波长扫描,结合色谱峰的个数、峰强度及基线综合考虑,最终选择 302 nm 作为检测波长。预试验比较了甲醇-水、乙腈-水 2 种溶剂系统,结果表明 2 种溶剂系统结果相差不大,出于成本考虑,选择了流动相甲醇-水作。供试品溶液的制备考察了提取方法(超声法、回流法)、提取

溶剂(甲醇、乙醇、三氯甲烷)、甲醇体积分数(20%,40%,60%,80%,100%)、料液比(1:20,1:40,1:60,1:80)、冷浸时间(30,60,90 min)、提取时间(30,60,90 min),以出峰个数及峰强度为判断依据,最终采用了 2.2 项下方法。

产地考察发现,伞形科独活属植物康定独活 *Heracleum souliei* 的干燥根通常混作白亮独活药用,从药材性状上很难区分这 2 种独活。采用本文建立的指纹图谱法进行鉴别,显示二者中佛手柑内酯差异不大,但康定独活中几乎不含欧前胡素,见图 3。说明建立白亮独活指纹图谱法能有效控制其质量,为保证其用药安全性提供参考。



1. 佛手柑内酯

图 3 康定独活 HPLC

Fig. 3 HPLC Chromatogram of *Heracleum souliei* roots

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 藏药卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:139-140.
- [2] 孙汉董,林中文,钮芳娣. 伞形科中药的研究——VII. 白亮独活根的化学成分(1)[J]. 云南植物研究,1984,6(1):99-102.
- [3] 林中文,陈一平,孙汉董,等. 白亮独活的香豆素成分[J]. 云南植物研究,1993,15(3):313-314.
- [4] Inoue A, Taniguch M, Shibano M, et al. Chemical studies on the root of *Heracleum candicans* Wall. (Patr 3)[J]. J Nat Med,2010,64(2):175-181.

[责任编辑 刘德文]