

多波长覆盖融合指纹图谱评价不同产地川芎药材差异性

孙立磊¹, 王帅^{1,2}, 包永睿^{1,2}, 孟宪生^{1,2*}

(1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600; 2. 辽宁省组分中药工程技术研究中心, 辽宁省现代中药研究工程实验室, 辽宁大连 116600)

[摘要] **目的:**建立 10 批不同产地川芎药材多波长覆盖融合指纹图谱,并对共有峰进行初步指认,通过指纹图谱比较不同产地川芎药材的差异性,为其质量控制和药材鉴别提供依据。**方法:**采用超高压液相色谱法建立不同产地川芎药材的指纹图谱;采用全时段多波长融合技术对 dif 数据进行多波长融合;采用 Spss 19.0 数据统计软件,对不同产地川芎药材的共有峰进行聚类分析,区别其差异;采用 Q-TOF-MS 法对指纹图谱中的共有峰进行指认。**结果:**建立了川芎药材的多波长融合指纹图谱,确定了 20 个共有峰并对其中的 8 个峰进行了指认,通过聚类分析和相似度评价可知云南川芎与其他产地的川芎相比存在着一定的差异性。**结论:**该指纹图谱重复性良好,能够区分不同产地川芎药材,可作为川芎药材质量评价的一种手段。

[关键词] 川芎; 超高压液相色谱指纹图谱; 多波长覆盖融合; 四级杆飞行时间质谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)05-0075-05

[doi] 10.13422/j.cnki.sjfx.2016050075

Difference of Chuanxiong Rhizoma from Different Regions Based on Multiple Wavelength Coverage Fusion Fingerprint

SUN Li-lei¹, WANG Shuai^{1,2}, BAO Yong-rui^{1,2}, MENG Xian-sheng^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China; 2. Component Medicine Engineering Research Center of Liaoning Province, Liaoning Province Modern Chinese Medicine Research Engineering Laboratory, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To set up the multi-wavelength fusion UPLC fingerprint of 10 batches of Chuanxiong Rhizoma from different regions, initially identify common peaks, and compare the Chuanxiong Rhizoma from different regions through fingerprints, and provide the basis for its quality control and medicinal material identification. **Method:** UPLC was used to set up the multi-wavelength fingerprints of Chuanxiong Rhizoma from different regions. SPSS 19.0 data statistics software was used to analyze the differences of Chuanxiong Rhizoma in different regions, and full time multiple wave length fusion technology was used for multiple wavelength fusion of dif date. Q-TOF method was used to identify the common peaks in fingerprints. **Result:** Fingerprints of multi-wavelength fusion of Chuanxiong Rhizoma were established; 20 common peaks were determined and 8 peaks of them were identified. By clustering analysis and similarity evaluation, it was found that Yunnan Chuanxiong Rhizoma had certain difference with other regions. **Conclusion:** The fingerprints were reproducible and can be able to distinguish the Chuanxiong Rhizoma from different regions. This method can be applied for quality control of Chuanxiong Rhizoma.

[Key words] Chuanxiong Rhizoma; UPLC fingerprint; multi-wavelength fusion; Q-TOF-MS

[收稿日期] 20150914(009)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09507005)

[第一作者] 孙立磊,在读硕士,从事药物分析研究,Tel:15542591319,E-mail:xstsl@163.com

[通讯作者] *孟宪生,博士,教授,从事中药药效物质和作用机制研究,Tel:0411-85890185,E-mail:mxsxvv@126.com

川芎^[1]主产于四川、湖北、甘肃、云南、贵州等地,具活血行气、祛风止痛之功效,主治胸痹心痛、胸胁刺痛、跌扑肿痛、月经不调、经闭痛经、癥瘕腹痛、头痛、风湿痹痛。川芎化学成分研究表明,其主要成分有酚酸、挥发油及生物碱。现代药理实验研究表明其具有抑菌、抗氧化、舒张血管、延缓衰老等作用,相关报道较多^[2-4]。

目前对川芎的研究多为单一波长,且产地多为四川境内。本文在药效实验研究基础上采用多波长覆盖融合技术建立川芎药材指纹图谱,并通过 Q-TOF-MS-MS 对 10 批不同产地的川芎药材中的主成分进行解析,同时标定了绿原酸、香草酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、阿魏酸松柏酯、川芎酚、蒿本内酯 8 种成分。

1 材料

阿魏酸对照品(批号 110807-201306)购自中国食品药品检定研究院,香草酸(批号 110807-201306),绿原酸(批号 140601),洋川芎内酯 I(批号 150213),洋川芎内酯 A(批号 140914)对照品均购自成都普菲的生物技术有限公司,纯度均 >99%;10 批川芎样品分别采自 S1 四川都江堰,S2 甘肃,S3 四川灌县,S4 广西,S5 四川广元,S6 贵州,S7 湖北,S8 四川彭县,S9 四川秦巴山,S10 云南。经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* 的干燥根茎。乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

UPLC 1290 型超高效液相色谱仪(包括 Agilent 1290 色谱工作站,含四元梯度泵、自动进样器、DAD 检测器),UPLC-Q-TOF-MS 均由美国安捷伦科技公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 50 mm,1.8 μm),流动相 0.1% 甲酸(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~10 min,12%~18% B;10~15 min,18%~45% B;15~17 min,45%~50% B;17~25 min,50% B),流速 0.17 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 254,275,295,325 nm,进样量 0.5 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取阿魏酸、香草酸、绿原酸、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A 适量,加甲醇制成质量浓度分别为 0.084 8,0.088 8,0.321 0,1.000 0,1.000 0 g·L⁻¹ 的溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取川芎药材粉末(过 40 目筛)2.0 g,精密称定,置于 100 mL 圆底烧瓶中,

加入甲醇 50 mL 回流提取 2 次,每次 1 h。滤过,合并 2 次滤液,浓缩,定容至 50 mL 量瓶中。经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,作为供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度考察 在 2.1 项色谱条件下,取 S8 供试品溶液,连续进样 6 次,以阿魏酸(6 号峰)为参照峰,考察各共有峰的相对保留时间及相对面积的 RSD。各共有峰的相对保留时间的 RSD 在 0.3%~2.9%,相对峰面积的 RSD 在 0.5%~2.3%,结果表明仪器的精密度良好。

2.3.2 稳定性考察 按 2.1 项下色谱条件,取 S8 供试品溶液,分别在 0,2,4,6,10,24 h 重复 6 次,结果各共有峰相对保留时间的 RSD 在 0.2%~2.0%,相对峰面积的 RSD 在 2.1%~3.0%,说明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.3 重复性考察 按 2.2.2 项下方法制备 6 份 S8 供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行测定。结果各共有峰相对保留时间的 RSD 在 0.3%~2.3%,相对峰面积的 RSD 在 0.3%~2.8%,说明方法重复性良好。

2.4 指纹图谱的建立 分别取 S1~S10 样品按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件分析,得到 10 批不同产地川芎药材的 UPLC 色谱图。分别从 Agilent1290 色谱工作站中导出 254,275,295,325 nm 的数据文件,进行全时段多波长融合^[5],得到同时反映 4 个波长信息的数据和指纹图谱,见图 1~3。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版),得到 10 批不同产地川芎 HPLC 指纹图谱,见图 4,以样品 S8 的色谱图作为参照图谱,采用多点校正后进行自动匹配,生成川芎药材指纹图谱共有模式 R,10 批样品有 20 个共有峰,将所得样品图谱与共有模式图谱比较,根据保留时间指认图谱中的 6 号峰为阿魏酸。

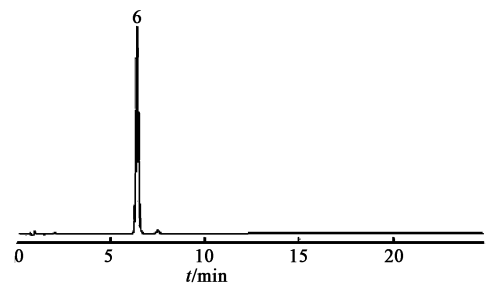
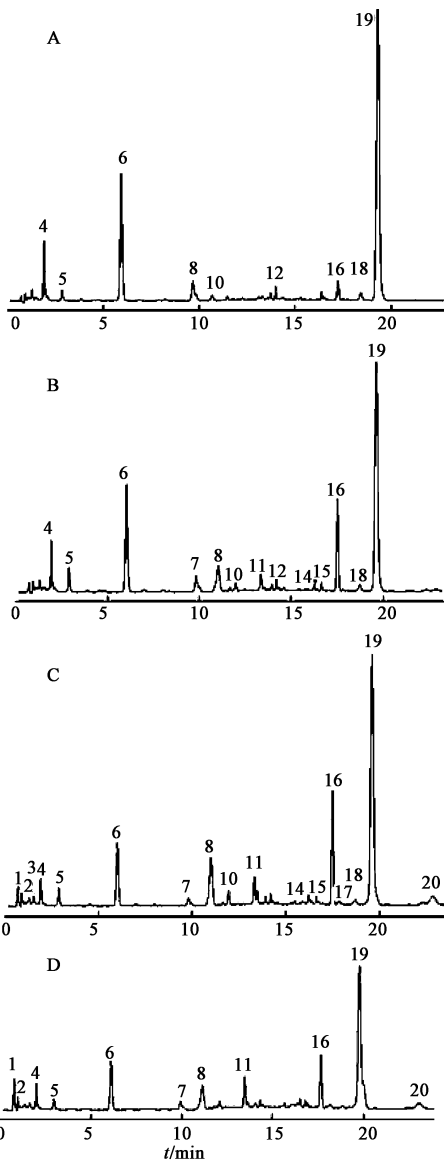


图 1 阿魏酸 UPLC

Fig. 1 UPLC chromatogram of ferulic acid

2.5 相似度评价分析 将对照指纹图谱及 10 批川芎样品图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系



A. 325 nm; B. 295 nm; C. 275 nm; D. 254 nm

图 2 川芎不同波长下的 UPLC

Fig. 2 Chuanxiong Rhizoma UPLC chromatogram under different wavelength

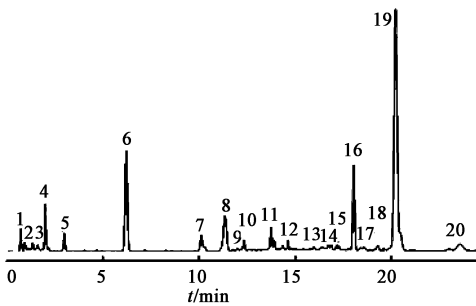


图 3 川芎药材多波长融合指纹谱

Fig. 3 Multi-wavelength fusion UPLC fingerprint of Chuanxiong Rhizoma

统”(2004A 版)软件,采用相关系数法考察对样品

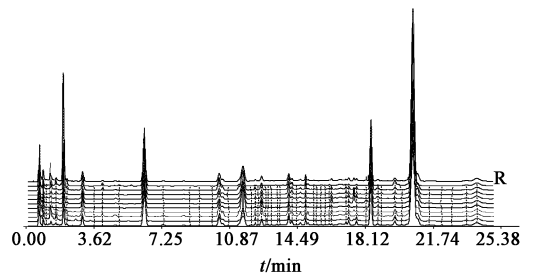


图 4 10 批川芎样品指纹谱共有模式色谱

Fig. 4 Fingerprint sample mode of 10 batches Chuanxiong Rhizoma

的相似度进行评价^[6],各样品图谱(S1 ~ S10)相对于对照图谱的相似度结果见表 1。除 S1 和 S10 外其他不同产地的川芎药材与对照指纹图谱相比相似度均 > 0.9。表明不同产地川芎药材相似性较好。

2.6 聚类分析 利用 SPSS 19.0 数据统计软件,对 10 批不同产地川芎药材的 20 个共有峰进行聚类分析结果见图 5。10 种产地的川芎药材可分为 3 类,广西、彭县、都江堰、广元、贵州为一类;灌县、甘肃、秦巴山、湖北为一类;云南为一类。结合相似度评价及聚类分析结果可知,除云南外其他个产地川芎药材差异不大。

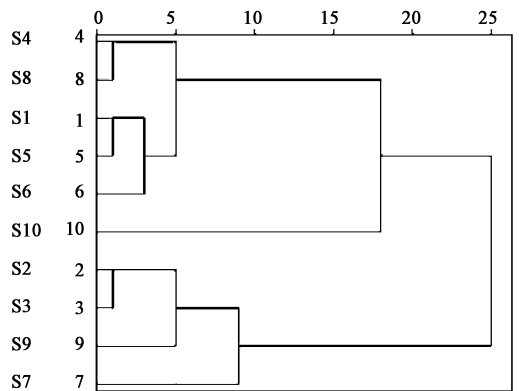


图 5 不同产地川芎药材的聚类分析

Fig. 5 Cluster analysis results of different regions Chuanxiong Rhizoma

2.7 采用液质联用技术推断川芎中主要化学成分

2.7.1 对照品、供试品制备方法及液相条件同上所述指纹图谱建立部分。

2.7.2 质谱条件的选择 电喷雾离子源 (ESI), 正/负离子模式检测,干燥气体流速 $13 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$,干燥气体温度 $225 \text{ }^\circ\text{C}$,毛细管电压 ($\text{ESI}^+/\text{ESI}^-$) $4\ 000 \text{ V}/3\ 500 \text{ V}$,雾化器压力 138 kPa ,Skimmer 65 V ,OCT1 RF $V_{\text{pp}} 750 \text{ V}$, $m/z 100 \sim 1\ 500$ 。

2.7.3 UPLC-Q-TOF-MS 对川芎药材中主要共有峰的鉴定 其中 4,5,6,8,16 号峰的质谱棒状图与绿

表 1 不同产地川芎药材相似度评价

Table 1 Similarity evaluation result of different regions Chuanxiong Rhizoma

批号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
S1	1	0.866	0.871	0.819	0.892	0.869	0.747	0.892	0.890	0.085
S2	0.866	1	0.960	0.974	0.901	0.951	0.908	0.901	0.887	0.100
S3	0.871	0.960	1	0.934	0.960	0.947	0.920	0.960	0.893	0.084
S4	0.819	0.974	0.934	1	0.860	0.907	0.897	0.860	0.868	0.080
S5	0.892	0.901	0.960	0.860	1	0.913	0.858	1	0.835	0.080
S6	0.869	0.951	0.947	0.907	0.913	1	0.889	0.913	0.858	0.137
S7	0.747	0.908	0.920	0.897	0.858	0.889	1	0.858	0.885	0.194
S8	0.892	0.901	0.960	0.86	1	0.913	0.858	1	0.835	0.080
S9	0.890	0.887	0.893	0.868	0.835	0.858	0.885	0.835	1	0.114
S10	0.085	0.100	0.084	0.080	0.080	0.137	0.194	0.080	0.114	1
R	0.875	0.977	0.990	0.951	0.943	0.955	0.937	0.943	0.918	0.113

原酸、香草酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I 和洋川芎内酯 A 对照品一致,故确定其分别为绿原酸、香草酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I 和洋川芎内酯 A。13 号峰 ESI⁻ 模式下得到 m/z 205 的离子峰,文献报道^[7] 川芎中存在相对分子质量 206 的川芎酚,故推测 13 号峰为川芎酚。15 号峰 ESI⁻ 模式下得到 m/z 193 的离子

峰、对 m/z 193 进行 MS² 分析,结果与阿魏酸一致,文献^[2] 报道阿魏酸松柏酯是由 2 个阿魏酸链接而成,故推测 15 号峰可能为阿魏酸松柏酯。19 号峰 ESI⁺ 模式下得到 m/z 191 的离子峰,文献^[8] 报道川芎中存在相对分子质量 190 的川芎酚,故推测 19 号峰为蒿本内酯。其详细数据结果见表 2。

表 2 川芎药材指纹图谱指纹峰推断

Table 2 Fingerprint points of Chuanxiong Rhizoma

峰号	保留时间/min	MS[M + H] ⁺	MS[M + Na] ⁺	MS[M - H] ⁻	推断化合物
4	2.291	-	-	353.088 5	绿原酸
5	3.333	-	-	167.035 4	香草酸
6	7.232	-	-	193.051 1	阿魏酸
8	12.115	-	247.094 1	-	洋川芎内酯 I
13	16.830	-	-	205.088 2	川芎酚
15	17.681	-	-	193.051 1	阿魏酸松柏酯
16	18.637	193.122 3	-	-	洋川芎内酯 A
19	21.066	191.107 1	-	-	蒿本内酯

3 讨论

由于中药成分比较复杂,单一波长很难反映全部成分信息,因此本文通过全时段多波长融合技术将现代分析检测手段与信息处理手段相结合,有效地融合了不同产地川芎药材的图谱信息,克服了传统方法信息不突出甚至缺失的缺点^[9]。

通过相似度评价和聚类分析结果可知除云南外其他产地川芎药材的相似度均较大,湖北、贵州、广西 4 个产地的川芎药材与主产地四川(都江堰、广元、秦巴山、彭县、灌县)相比主成分差别不大。由此可见川芎药材的质量具有一定的稳定性。为川芎的临床应

用提供了更多的选择。本文通过指纹图谱、相似度分析及聚类分析相结合评价川芎药材质量,结果更科学、更全面、更准确、对药材的质量鉴定有重大意义^[10]。

通过 Q-TOF-MS 对川芎药材进行了表征,共指认了 8 个共有峰,其中 5 个经对照品比对确定,3 个经查阅文献分析推测。其峰面积占总峰面积的 80%。使指纹图谱数据更加全面,进一步体现了指纹图谱反应中药材质量的特征性。

本文通过全时段多波长融合技术和 UPLC-MS 分析方法,建立了更全面的川芎药材指纹图谱,为川芎药材质量控制从单一成分的相对定量上升到多指

标成分的绝对定量提供参考,同时也为川芎药材药效物质基础的解析奠定基础。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:41.
[2] 李韶菁,张迎春,苏培渝,等. 阿魏酸松柏酯的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):229-231.
[3] 银玲,彭月,陈鸿平,等. 新老产地川芎中3种内酯成分的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(7):120-123.
[4] 林乔,赵爱国,陈建南,等. 蒿本内酯的镇痛抗炎作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(11):165-168.
[5] 姚东,孟宪生,王帅,等. 气滞胃痛颗粒全时段多波长融合指纹图谱研及多成分定量分析[J]. 中国中药杂志,2013,38(10):1513-1514.

[6] 甘秀海,梁志远,姜金仲,等. 冷水花药材的 HPLC 指纹图谱研究及指标成分含量测定[J]. 中药材,2015,38(2):275-278.
[7] 郝淑娟,张振学,田洋,等. 川芎化学成分研究[J]. 中国现代中药,2010,12(3):22-25.
[8] 李松林,林鸽,钟凯声,等. 应用 HPLC-DAD-MS 联用技术研究中药川芎指纹图谱[J]. 药学学报,2004,39(8):621-626.
[9] 唐爽,包永睿,孟宪生,等. 基于多波长覆盖融合指纹图谱的大川芎片主要成分研究[J]. 药学研究,2015,34(1):7-8.
[10] 韩永成,刘伟,陈宁,等. 不同产地金银花药材的 UPLC 指纹图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(2):67-69.

[责任编辑 顾雪竹]

《中国实验方剂学杂志》声明

本刊近期发现有某些网站使用类似本刊网站的域名,冒用本刊名义,骗取审稿费及版面费。

现本刊郑重声明:①<http://www.syfjxzz.com> 为本刊唯一域名,其他域名均非本刊。

②本刊不会以任何名义收取任何审稿费。

③投稿成功后,为确保稿件安全请与责任编辑电话联系。

对于假冒本刊名义、侵犯本刊权利的不正当行为,本刊将通过法律程序进行维权。