

乌药药材水提液的 HPLC 指纹图谱研究

刘正清¹, 杨华¹, 易跃能^{2*}

(1. 湖南汉森制药股份有限公司, 湖南 益阳 413000;

2. 湖南省消化道药物工程技术研究中心, 长沙 410013)

[摘要] 目的: 建立乌药水提液的 HPLC 指纹图谱。方法: 采用水加热回流的方法制备供试品溶液, 以乙腈-0.1% 甲酸水溶液梯度洗脱, 检测波长 280 nm, 建立乌药水提液的 HPLC 指纹图谱, 对不同产地和不同采收期的乌药药材进行相似度评价、主成分分析和聚类分析。结果: 方法学考察结果良好, 确立了 15 个共有峰, 17 批样品指纹图谱中各共有峰的相对保留时间的相对标准偏差 (RSD) 均小于 2%。结论: 该方法稳定性、重复性好, 建立的指纹图谱可为乌药的质量评价提供依据。

[关键词] 乌药; 指纹图谱; 水提液; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0127-03

[DOI] CNKI:11-3495/R.20120411.0913.005 **[网络出版时间]** 2012-04-11 9:14

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120411.0914.005.html>

HPLC Fingerprint Investigation on Water Extract from *Lindera aggregata*

LIU Zheng-qing¹, YANG Hua¹, YI Yue-neng^{2*}

(1. Hunan Hansen Pharmaceutical Co. Ltd, Yiyang 413000, China;

2. Hunan Engineering and Technology Research Center for Gastroenterological Drugs, Changsha 410013, China)

[Abstract] **Objective:** To establish HPLC fingerprints of water extract from *Lindera aggregata*. **Method:** The sample solution was prepared by boiling water and HPLC was employed to separate ingredients by gradient elution with mixture of acetonitrile and 0.1% formic acid and detected at 280 nm. The fingerprint data were analyzed by similarity evaluation, principal component analysis, and cluster analysis. **Result:** Fifteen common peaks were defined in different fingerprints. The relative standard deviation (RSD) values of the relative retention time of 15 common peaks were small than 2%. **Conclusion:** The fingerprints established could be used for the quality control of *L. aggregata* with high stability and good reproducibility.

[Key words] *Lindera aggregata*; fingerprints; water extract; HPLC

乌药为樟科植物乌药的干燥块根, 具有活血化瘀、行气止痛等功效, 主要用于寒凝气滞、胸腹胀痛、气逆喘急、膀胱虚冷等症^[1-2], 主产于浙江、湖南、安徽、广东、广西等地^[3]。乌药中主要含有挥发油、异喹啉类生物碱及呋喃倍半萜三大类成分^[4-8], 共同

构成了乌药的化学特征。整理以往文献发现, 早期乌药的质量研究主要集中在乌药内酯或乌药甙内酯等脂溶性成分的含量测定^[9-10], 后来发现乌药中异喹啉类生物碱如去甲异波尔定 (norisobolidine)、新木姜子碱 (laurolicisine)、牛心果碱 (reticuline) 等水溶性成分也具有一定药理活性^[11]。近年逐渐将乌药生物碱纳入质量研究体系, 且《中国药典》2010 年版乌药质量标准增加了去甲异波尔定含量测定。文献多以乙醚等有机溶剂对乌药药材进行前处理, 而传统中药多以水煎剂应用于临床, 因此本文采用水提取工艺对乌药进行前处理, 从而建立乌药水提液的指纹图谱, 为乌药药材采用相关水提工艺所制备制剂的质量标准建立和评价提供依据。

[收稿日期] 20120112(007)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划项目 (2009CB523002)

[第一作者] 刘正清, 本科, 工程师, 从事生产质量管理, Tel: 0737-6351079, E-mail: manager@hansenz.com

[通讯作者] * 易跃能, 博士, 副主任药师, 从事中药新药开发, Tel: 0731-82650388, E-mail: yiyueneng@163.com

1 材料

1.1 仪器 美国安捷伦公司 1100 型液相色谱仪 (美国安捷伦公司 1100, 包括四元泵、自动进样器、柱温箱、检测器、工作站)、KQ-250DB 型数控超声波清洗仪 (昆山市超声仪器有限公司)。METTLER 200 型电子天平。BP211D 型电子分析天平 (Sartorius Co.), DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司)。

1.2 试剂 甲醇等为分析纯, 水为超纯水, 乙腈、甲酸为色谱纯。去甲异波尔定对照品由上海中药标准化研究中心提供, 纯度 >98%。分别从乌药药材主产区浙江、江西和湖南等产地采集不同生长期的乌药样品, 由上海中药标准化研究中心的副研究员吴立宏博士鉴定为樟科山胡椒属植物乌药 *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm 的块根。样品的产地及采集时间等信息见表 1。药材采集后阴干后粉碎。

表 1 乌药药材来源

No.	采集地	采收时间	No.	采集地	采收时间
1	浙江衢州	2009-08-20	10	湖南桃江	2010-11-12
2	浙江衢州	2009-08-20	11	湖南桃江	2010-10-13
3	浙江衢州	2009-09-22	12	湖南高岭	2010-07-06
4	浙江衢州	2009-10-18	13	江西临川	2009-07-12
5	浙江衢州	2009-11-24	14	江西临川	2009-08-12
6	浙江衢州	2009-12-20	15	江西临川	2009-09-12
7	湖南桃江	2010-08-10	16	江西临川	2009-10-12
8	湖南桃江	2010-09-10	17	江西临川	2009-11-12
9	湖南桃江	2010-10-13			

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Venusil XBP C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 检测波长 280 nm, 柱温 30 °C, 以乙腈为流动相 A, 以含 0.1% 甲酸水溶液为流动相 B, 0~28 min, 5% A; 28 min 后 12% A, 线性梯度洗脱; 进样量 5 μL, 采样时间 55 min。理论板数按去甲异波尔定峰计算不低于 5 000。

2.2 供试品溶液制备 取本品粉末 (过三号筛) 约 1 g, 精密称定, 加水 20 mL, 称定质量, 加热回流提取 2 h, 放冷, 再称定质量, 用水补足缺失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 方法学研究

2.3.1 精密度试验 取同一样品的供试品液连续进样 6 次, 记录指纹图谱。结果表明, 各色谱峰的相对保留时间的 RSD < 1.5%、相对峰面积的 RSD < 2%。采用国家药典委员会推荐的“计算机辅助相似度评价系统”2004 版软件 (以下简称 04 版软件) 进行数据处理, 相似度 > 0.951。综合判断, 方法的

精密度良好, 符合指纹图谱的要求。

2.3.2 稳定性试验 取同一供试品液分别于 0, 2, 4, 6, 10, 15, 18, 24 h 检测指纹图谱。比较在不同时间测得的色谱图。结果表明, 各色谱峰的相对保留时间的 RSD < 2%、相对峰面积的 RSD < 2%。采用 2004 版软件进行数据处理, 相似度均 > 0.916。综合分析, 乌药水提液在常温下 24 h 内稳定。

2.3.3 重复性试验 取同一供试品 6 份, 每份 1 g, 精密称定, 按 2.2 的方法制备样品, 进行指纹图谱分析。结果表明, 各色谱峰的相对保留时间的 RSD < 1.8%、相对峰面积的 RSD < 2%。采用 2004 版软件进行数据处理, 相似度均 > 0.912。方法的重复性符合指纹图谱分析的要求。

2.4 指纹图谱建立 取 17 批乌药样品, 采用上述样品制备方法制备供试液, 进行 HPLC 指纹图谱测定, 得到相应的指纹图谱, 见图 1。在不同样品色谱图中发现有 15 个共有峰。因去甲异波尔定峰面积较大且较稳定, 故选定为参照峰。以去甲异波尔定色谱峰为参比峰, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 见表 2。

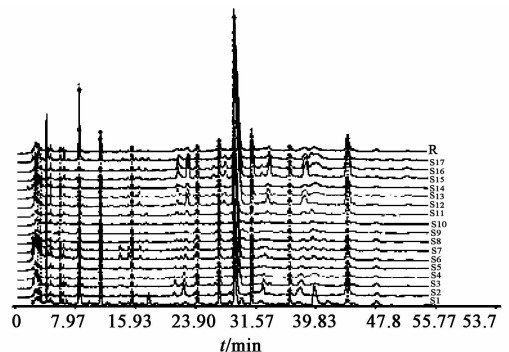
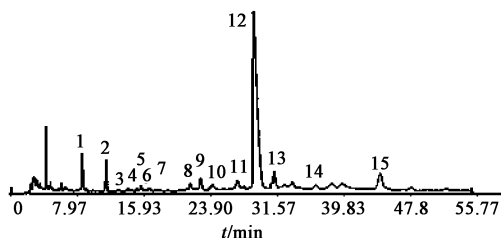


图 1 17 批乌药水提液的 HPLC 指纹图谱

表 2 17 批乌药药材共有峰相对保留时间和相对峰面积

峰号	相对保留时间		相对峰面积	
	均值	RSD/%	均值	RSD/%
1	0.292	0.44	0.138	31.06
2	0.391	0.58	0.105	17.82
3	0.45	1.38	0.01	1.69
4	0.518	0.67	0.011	1.28
5	0.535	0.81	0.024	2.27
6	0.554	0.77	0.007	0.57
7	0.571	0.47	0.013	0.94
8	0.737	1.11	0.022	1.01
9	0.781	1.18	0.045	3.86
10	0.83	0.91	0.028	3.17
11	0.931	1.13	0.07	9.20
12	1	-	1	-
13	1.079	0.76	0.078	6.04
14	1.259	1.91	0.025	2.47
15	1.518	1.96	0.109	9.12

2.5 指纹图谱相似度计算 将 17 批乌药样品的 HPLC 指纹图谱导入国家药典委员会 2004 年版“计算机辅助相似度评价系统”软件中,进行数据分析,建立乌药水提液样品的共有模式,生成乌药药材水提液的标准指纹图谱(图 2)。采用上述软件进行相似度分析,所得 1~17 样品的相似性分析结果分别为 0.547,0.864,0.995,0.956,0.962,0.966,0.983,0.986,0.988,0.986,0.994,0.995,0.993,0.992,0.990,0.989,0.991。



12. 去甲异波尔定

图 2 乌药水提液的 HPLC

2.6 指纹图谱主成分分析 对 17 批乌药样品所得的指纹图谱进行积分,采用 SPSS 软件将共有峰面积进行主成分分析,湖南产的乌药大部分可以聚成一类,江西产的乌药也有相同的情况。有少部分湖南和江西的样品与浙江衢州产的乌药混聚在一起,另外两产地的乌药样品均与浙江的乌药样品有较高的相关性。

2.7 指纹图谱聚类分析 对 17 批乌药样品所得的指纹图谱进行积分,采用 SPSS 软件将共有峰面积进行聚类分析,结果见图 3。从聚类上观察,同一产地的样品大部分聚在一起,表明来源于不同产地和时间的乌药药材水溶性成分接近。

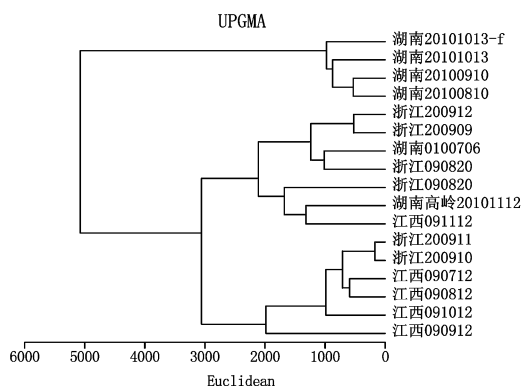


图 3 17 批乌药药材聚类分析

3 讨论

3.1 样品制备方法选择 乌药中异喹啉类生物碱成分在水中相对具有一定溶解性,选择以水为溶剂加热回流的方法制备乌药的供试品溶液,并与酸性

甲醇超声的制备方法相比较。结果水提液的色谱峰信息更加丰富,故选择水提加热回流法制备供试品。

3.2 检测波长选择 用 DAD 检测器记录从 200~400 nm 全波段的二维图谱,比较各波长下的 HPLC 图。采用 280 nm 进行测定时,乌药水提液样品所得图谱信息量大且峰值分布最为合理,故确定波长为 280 nm。

3.3 提取时间的考察 通过对加热回流 1,2,3 h 所得色谱图的观察发现,在 15~50 min,各成分的组成差异较小,而在 0~15 min,部分色谱峰会随回流时间的延长或温度的升高,其含量相对增加,所以选择加热回流 2 h,同时试验中注意避免温度过高。

3.4 指纹图谱分析 通过对不同产地和不同采集时间的样品进行相似度分析、主成分分析和聚类分析,得到了较好的结果。聚类分析表明来源于不同产地和时间的乌药药材水溶性成分接近。浙江衢州 2009 年 8 月采收的乌药相似度偏低,原因可能是采收运输过程发生少量霉变造成。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2010:71.
- [2] 聂子文,郭建生,陈君,等.乌药提取物对胃实寒模型大鼠 cAMP, cGMP, GAS, MTL 水平的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(20):162.
- [3] 张贵君.中药鉴定学[M].北京:科学出版社,2006:91.
- [4] 刘泽坤,陈海霞.三桠乌药叶片中挥发油成分及抑菌活性研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(22):164.
- [5] 杜志谦.乌药挥发油化学成分的 GC-MS 分析[J].中草药,2003,34(4):308.
- [6] 何桂霞,易海燕,郭建生.超临界 CO₂ 萃取和水蒸汽蒸馏法研究乌药中挥发性有机物[J].天然产物研究与开发,2010,22(5):816.
- [7] 俞桂新,中村憲夫,马超美,等.乌药中异喹啉类生物碱[J].中国天然药物,2005,3(5):272.
- [8] Gan L S, Zheng Y L, Mo J X, et al. Sesquiterpene lactones from the root tubers of *Lindera aggregata*[J]. J Nat Prod,2009,72(8):1497.
- [9] 蔡立红,俞桂新,王峥涛,等.高效液相色谱法测定乌药中乌药醚内酯的含量[J].中国中药杂志,2004,29(7):657.
- [10] 刘卉,程显隆,林瑞超.乌药的高效液相色谱特征图谱研究[J].中国医院药学杂志,2009,29(10):802.
- [11] 王婵,戴岳,俞桂新,等.乌药总生物碱对大鼠佐剂关节炎的影响及其机制研究[J].中药药理与临床,2006,22(3/4):63.

[责任编辑 邹晓翠]