

• 质量标准 •

RP-HPLC 指纹图谱鉴别不同品种白芷药材的研究

章 军, 王跃生*, 何希荣

(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 采用 RP-HPLC 法对不同品种白芷药材进行指纹图谱的鉴别研究。方法: 甲醇回流 30 min 提取, 色谱柱为 Zorbax(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, Agilent); 流动相为 A: 0.1% 冰醋酸乙腈, B: 0.1% 冰醋酸水, 梯度洗脱; 检测波长 312 nm; 柱温 30 °C; 流速 1.0 mL/min。结果: 相同品种白芷间相似度高(> 0.9), 方法重现性好。结论: RP-HPLC 指纹图谱可鉴别白芷和杭白芷。

[关键词] 白芷; 色谱指纹图谱; 鉴别

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)07-0001-04

Studies on Identification of Radix Angelicae Dahuricae by HPLC Fingerprint

ZHANG Jun, WANG Yue-sheng*, HE Xi-rong

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences; Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To Discriminate *Angelica dahurica* and *Angelica dahurica* var. *formosana* by reversed-phase HPLC method. **Methods:** Sample was extracted with Methyl alcohol for 0.5 h. Analysis was carried out at 30 °C on a Zorbax C₁₈ column(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) eluted with acetonitrile and water containing 0.1% glacial acetic acid in gradient mode. The flow rate was 1.0 mL/min, and the detection wavelength was 312 nm. **Result:** The similarity of the same species samples were higher than 0.9, but that of the different species was about 0.7. The method was repeatable. **Conclusion:** The method could discriminate *Angelica dahurica* and *Angelica dahurica* var. *formosana*.

[Key words] Radix Angelicae Aahurica; chromatographic fingerprint; identification

白芷为常用中药, 具有散风除湿、通窍止痛、消肿排脓的功效。白芷中主要成分为香豆素类化合物, 有欧前胡素、异欧前胡素等。白芷药材 HPLC 指纹图谱研究已有报道, 用于白芷的真伪和质量优劣鉴别^[1-3], 文献中不同产地的白芷和杭白芷相似度高(> 0.9), 无法区别鉴定, 本文采用二元梯度洗脱方法, 使不同品种的白芷均得到较好分离, 在此条件下, 9 个不同产地的杭白芷之间相似度高(> 0.9), 2 个不同产地的白芷之间相似度高(> 0.9), 但白芷和杭白芷的指纹图谱有明显区别, 相似度也很低(< 0.7), 可区别鉴定白芷和杭白芷。

1 仪器、试剂和材料

惠普 1100 高效液相色谱仪; 二极管阵列检测

器; HPChemStation for LC 3D Rev. A. 06.03 工作站; 仪器梯度滞后时间: 2.0 min。

欧前胡素、异欧前胡素对照品购于中国生物制品检定所。乙腈为色谱纯; 甲醇为优级纯; 水为高纯水。

白芷药材 4、11 号为伞形科植物白芷 *Angelica dahurica*(Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. 的干燥根, 其余为伞形科植物杭白芷 *Angelica dahurica*(Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. var. *formosana*(Boiss.) Shan et Yuan 的干燥根, 药材编号、品种、产地详见表 1。其药材均由中国中医科学院中药研究所主管药师何希荣鉴定。将各药材粉碎, 过 40 目筛。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Zorbax, SB-C₁₈ 柱, (4.6 mm × 250 mm, 5 μm, Agilent); 流动相: A: 0.1% 冰醋酸乙腈 B: 0.1% 冰醋酸水、流动相比例见表 2, 均为线性

[收稿日期] 2007-03-07

[通讯作者] * 王跃生, Tel: (010) 64030267

梯度; 检测波长: 312 nm; 柱温: 30 °C; 流速: 1.0 mL/min。在此条件下, 对照品和样品色谱图见图 1 2 3。

表 1 白芷药材品种及产地

药材号	品种	产地
1	<i>Angelica dahurica</i> var. <i>formosana</i>	浙江磐安
2	<i>Angelica dahurica</i> var. <i>formosana</i>	四川遂宁
3	<i>Angelica dahurica</i> var. <i>formosana</i>	中江县集凤
4	<i>Angelica dahurica</i>	崇州
5	<i>Angelica dahurica</i> var. <i>formosana</i>	成都(商品)
6	<i>Angelica dahurica</i> var. <i>formosana</i>	安岳
7	<i>Angelica dahurica</i> var. <i>formosana</i>	遂宁
8	<i>Angelica dahurica</i> var. <i>formosana</i>	重庆安南
9	<i>Angelica dahurica</i> var. <i>formosana</i>	北京同仁堂(商品)
10	<i>Angelica dahurica</i> var. <i>formosana</i>	安徽亳州
11	<i>Angelica dahurica</i>	湖南茶陵

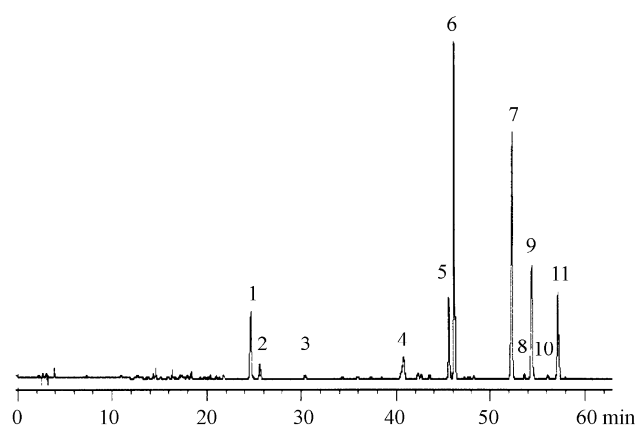


图 3 白芷药材指纹图谱

2.2 对照品溶液的制备 精密称取欧前胡素、异欧前胡素对照品适量, 置 1 mL 容量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀。

2.3 供试品溶液的制备 称取白芷药材粉末(40 目)约 4 g, 精密称定, 加甲醇 50 mL, 水浴(80 °C)回流 30 min, 冷却, 补足重量, 过微孔滤膜(0.45 μm), 取续滤液 5 μL 进样分析。

2.4 指纹图谱的方法学考察

2.4.1 精密度试验 取表 1 中 9 号白芷饮片, 制备供试品溶液, 连续进样 6 次, 检测指纹图谱。各共有指纹峰相对保留时间的 RSD < 1%, 相对保留峰面积的 RSD < 3%。

2.4.2 重复性试验 取 9 号白芷饮片, 平行制备 6 份供试品溶液, 检测指纹图谱。各共有指纹峰相对保留时间的 RSD < 1%, 相对保留峰面积的 RSD 均小于 4%。

2.4.3 稳定性试验 取 9 号白芷饮片, 制备供试品溶液, 在室温下分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 检测指纹图谱。各共有指纹峰相对保留时间的 RSD < 1%, 相对保留峰面积的 RSD < 3%。结果表明白芷供试品溶液在室温下 24 h 内稳定。

2.5 不同产地白芷药材的 HPLC 指纹图谱 2005 版药典收载白芷品种为白芷和杭白芷, 经试验发现白芷和杭白芷的指纹图谱明显不同, 可用指纹图谱区别鉴定。经计算白芷和杭白芷的相似度很低, 小于 0.7, 因此分别标定共有峰和计算相似度。

2.5.1 杭白芷的共有峰的标定和指纹图谱特征 对 9 个不同产地的杭白芷药材进行测定, 比较样品的色谱图并计算相对保留时间, 确定 11 个共有指纹峰。其中 2 号峰、6 号峰为未达基线分离的双峰, 其余为对称峰, 8 号峰为欧前胡素峰, 11 号峰为异欧前

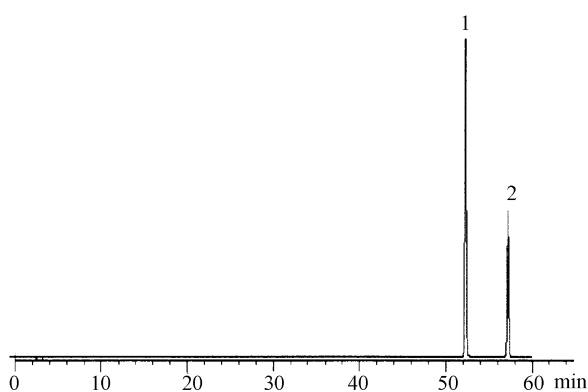


图 1 欧前胡素、异欧前胡素对照品色谱图

1 欧前胡素; 2 异欧前胡素

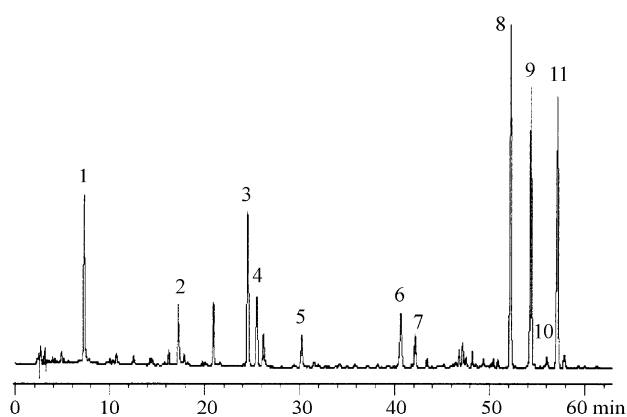


图 2 杭白芷药材指纹图谱

表 2 流动相比例表

时间(min)	A(%)	B(%)	流速(mL/min)
0	11	89	1.0
8	15	85	1.0
13	25	75	1.0
36	35	65	1.0
44	52	48	1.0
60	65	35	1.0

胡素峰。以欧前胡素峰(8号峰)为参照物(指定为S峰),计算各共有指纹峰的保留时间的比值,9个药材的平均比保留时间见表3, RSD < 0.36%。比保留峰面积 RSD < 66%。不同产地杭白芷药材指纹图谱中,药材指纹峰占总峰面积 10% 以上的共有峰有 3 个,分别为 8 号峰、9 号峰和 11 号峰,杭白芷药材指纹图谱见图 2。

表 3 9 批杭白芷药材指纹图谱的保留时间比值

峰编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
保留时间均值	0.140	0.331	0.471	0.489	0.580	0.780	0.809	1.000	1.041	1.073	1.094
RSD%	0.36	0.24	0.11	0.14	0.14	0.06	0.04	0.00	0.00	0.04	0.00

2.5.2 杭白芷的指纹图谱相似度计算^[2] 将 9 个杭白芷样品色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A)”,选取“时间窗”宽度为 0.5 min,经校准后,软件生成“对照谱图”。再将对照谱图和 9 批样品色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 B)”软件即可计算出样品与对照谱图的相似度数据,结果见表 5。

2.5.3 白芷的共有峰的标定和指纹图谱特征 对 2 个不同产地的白芷药材进行测定,比较样品的色谱图并计算相对保留时间,确定 11 个共有指纹峰。其中 4 号峰为未达基线分离的双峰,其余为对称峰,7 号峰为欧前胡素峰,11 号峰为异欧前胡素峰。以欧前胡素峰(7 号峰)为参照物(指定为 S 峰),计算各共有指纹峰的相对保留时间的比值,2 个药材的平均比保留时间见表 4, RSD < 0.27%。比保留峰面积 RSD < 40%。不同产地白芷药材指纹图谱中,药材指纹峰占总峰面积 10% 以上的共有峰有 5 个,分别为 5, 6, 7, 9 和 11 号峰。白芷药材指纹图谱见图 3。

表 4 2 批白芷药材指纹图谱的保留时间比值

峰编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
保留时间均值	0.471	0.490	0.581	0.779	0.872	0.883	1.000	1.026	1.041	1.074	1.094
RSD%	0.15	0.14	0.12	0.27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.00

2.5.4 白芷的指纹图谱相似度计算^[2] 计算方法同 2.5.2 结果见表 5。

2.5.5 白芷、杭白芷指纹图谱比较 杭白芷指纹图谱中 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 号峰分别和白芷指纹图谱中 1, 2, 3, 4, 7, 9, 10, 11 号峰对应。白芷指纹图谱中 5, 6, 8 号峰为杭白芷药材不具备的指纹峰,杭白芷指

纹图谱中 1, 2, 7 号峰为白芷药材不具备的指纹峰。

表 5 相似度计算结果

药材号	相似度
1	0.993
2	0.993
3	0.994
5	0.942
6	0.997
7	0.996
8	0.991
9	0.977
10	0.989
4	0.997
11	0.997

3 讨论

3.1 色谱条件的考察 考察了 Diamonsil, Kromasil, Zorbax 3 种不同品牌色谱柱,均为反相 C₁₈ 填料;(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);其中 Agilent Zorbax 色谱柱出峰快、分离度好,故选用。考察了甲醇-水-冰醋酸、乙腈-水-冰醋酸、乙腈-水 3 种流动相系统,其中乙腈-水-冰醋酸系统色谱峰分离度好,故选用。乙腈-水-冰醋酸系统中又考察了 0.1, 0.5, 1% 3 种冰醋酸浓度,发现不同冰醋酸浓度对色谱峰出峰顺序、分离度影响不大,但与不含冰醋酸的乙腈-水系统相比,色谱峰(尤其是强极性和极性成分)的分离度明显提高,考虑到低 pH 值对色谱柱的损害,选用 0.1% 冰醋酸。根据二极管阵列检测器检测结果,大部分成分在 254 nm 和 312 nm 时吸收值大,254 nm 下干扰强,基线不平稳;312 nm 下各色谱峰分离好、基线平稳,故采用 312 nm 为检测波长。有文献[1]采用等度洗脱,分离效果差,本试验采用梯度洗脱,使大部分色谱峰在 60 min 内得到基线分离,梯度结束后,运行 100% A 7 min,使残留在色谱柱上的杂质洗脱完全,再以起始浓度运行 10 min 平衡色谱柱,保证了色谱峰的重现性。

3.2 样品制备条件的考察 考察了乙酸乙酯、甲醇、无水乙醇、50% 乙醇,4 种提取溶剂,以色谱峰数量、面积、分离度各因素综合考察,最后选择以甲醇为提取溶剂。然后考察了冷浸 20 h、回流 1 h、超声 30 min 3 种提取方法,各样品色谱图基本一致,回流 1 h 样品峰面积最大,故采用回流提取方法。接着考察了不同提取浓度:12.5, 25, 50, 100 倍(溶剂 mL/药材 g),和不同提取时间:30 min, 1 h, 2 h, 3 h 的影响,结果各样品色谱图一致,且各主峰峰面积 RSD < 5%,视为无明显差异。本着供试品制备操作简便、

样品溶剂能适应色谱试验的需要的原则,采用高提取浓度(12.5倍)、小进样体积(5 μL 甲醇),以减小样品溶剂(甲醇)对流动相的影响,避免了将提取液蒸干、再用弱极性溶剂溶解的步骤,简化了制备方法并降低误差。

[参考文献]

[1] 邓捷圆,高广惠,孙晓军,等.不同产地白芷药材 HPLC

指纹图谱的研究[J].药学服务与研究,2004,4(4):335-338.

[2] 王婷婷,陈晓辉,胡庆庆,等.白芷质量的 HPLC 指纹图谱评价方法[J].药学学报,2006,41(8):747-751.

[3] 钟世红,马逾英,贾敏如,等.川白芷 HPLC 指纹图谱研究[J].世界科学技术—中医药现代化,2005,7(6):69-71.