

不同产地乌药的 HPLC 指纹图谱研究

方玲^{1,3}, 陈方亮², 余翠琴², 金朱明^{1,3}, 黄瑞平^{2*}

1. 浙江康恩贝制药股份有限公司, 浙江 杭州 310052

2. 浙江省台州市中心医院, 浙江 台州 318000

3. 浙江省中药制药技术重点实验室, 浙江 杭州 310052

摘要: 目的 采用已建立的乌药 HPLC 指纹图谱检测方法, 对不同产地乌药进行鉴别研究。方法 以 Symmetry C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱, 乙腈-水为流动相进行梯度洗脱, 在 235 nm 波长下以乌药醚内酯为参照物测定了 6 个不同产地乌药的指纹图谱。按照乌药 HPLC 指纹图谱共有模式, 标定 6 个共有指纹峰, 并对不同产地乌药指纹图谱进行相似度比较。结果 台乌药和其他 5 个产地乌药的指纹图谱, 存在显著的差异。同时也对该指纹图谱检测方法进行了验证。结论 通过 HPLC 指纹图谱方法, 能够明显区别台乌药与其他产区的乌药, 该方法可作为台乌药真伪鉴别的有效方法。

关键词: 乌药; 指纹图谱; 鉴别应用; 相似度; HPLC

中图分类号: R286.022 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)02-0229-03

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.02.023

HPLC fingerprint analysis of *Linderae Radix* from different habitats

FANG Ling^{1,3}, CHEN Fang-liang², YU Cui-qin², JIN Zhu-ming^{1,3}, HUANG Rui-ping²

1. Zhejiang Conbaggrou Pharmaceutical, Hangzhou 310052, China

2. Zhejiang Taizhou Central Hospital, Taizhou 318000, China

3. Zhejiang Key Laboratory of Pharmaceutical Technology, Hangzhou 310052, China

Key words: *Linderae Radix*; fingerprint; identification and application; similarity; HPLC

乌药为樟科植物乌药 *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm. 的干燥块根, 具有行气止痛、温肾散寒的功效^[1]。乌药在国内许多地区均有分布, 其中以浙江天台所产的品质最佳, 故称为台乌药, 被认为是乌药的道地药材。对乌药资源调查结果表明, 由于道地乌药使用逐年增加, 而没有形成有效的保护和规范化、集约化的种植, 致使目前药材品质差异较大, 同时商品中混有不可用的老根和茎枝。此外, 乌药常被加工成厚度为 0.12~2 mm 的横切片, 通过表观性状难以对不同来源的乌药进行区分。为此, 本课题组针对市场流通的几种乌药药材进行了较为深入的质量鉴别研究, 以期生产、使用及其他研究工作提供科学依据, 以确保临床用药的安全有效。

本研究旨在通过 HPLC 指纹图谱法, 对 6 个不同产区的乌药进行质量分析, 通过指纹图谱相似度比较, 区分台乌药与其他产区乌药, 从而更科学地

评价乌药药材的质量。

1 材料与仪器

本研究共选取了安徽、广西、湖北、江西及金华出产的乌药与天台乌药共 6 批样品 (表 1)。

Waters 2695 高效液相色谱仪 (包括 2695 四元梯度泵, 在线脱气机, 自动进样器, 柱温箱, 2487

表 1 样品编号及来源

Table 1 Sample numbers and sources

编号	产地	采购时间
S1	天台	2009 年 12 月
S2	安徽	2009 年 11 月
S3	广西	2010 年 1 月
S4	湖北	2010 年 1 月
S5	江西	2009 年 11 月
S6	金华	2009 年 11 月

收稿日期: 2012-09-13

基金项目: 台州市科技计划基金资助项目 (06KY25)

*通信作者 黄瑞平, 主任中药师, 主要研究方向为中药制剂。E-mail: Huangrui@126.com

紫外检测器, Empower 色谱工作站); Mettler AE200 电子分析天平 [梅特勒-托利多(上海)有限公司]; 0412—1 型台式离心机(上海手术器械厂); HS2060 型超声波清洗器(HENGAO T&D)。天台乌药由台州医药有限公司提供, 其他均购自各产地, 经台州中心医院中药房黄瑞平主任药师鉴定为樟科山胡椒属植物乌药 *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm. 的干燥块根; 乌药醚内酯对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 1568-200201); 甲醇、乙腈为色谱纯; 水为双重蒸馏水; 其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[2]

色谱柱为 Symmetry C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-水(B)。按照程序梯度洗脱: 0~5 min, 35% A; 5~25 min, 55% A; 25~33 min, 63% A; 33~40 min, 62% A; 40~60 min, 100% A。检测波长 235 nm; 柱温 25 °C, 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液的制备 取乌药样品磨成粉末, 分别准确称取 A、B 样品粉末。A 1.0 g, B 0.5 g。A 粉末用正己烷定容至 10 mL, 超声提取 1 h, 离心 10 min, 取其上清液, 蒸干后加甲醇 1.5 mL 复溶; B 粉末用 75%乙醇定容至 10 mL, 超声提取 1 h, 离心 10 min, 取上清液。分别吸取 A 溶液 1 mL、B 上清液 0.1 mL 混匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取乌药醚内酯对照品 3 mg, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制得 0.3 mg/mL 对照品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取同一份乌药供试品溶液, 连续进样 6 次, 记录 80 min 图谱。以乌药醚内酯峰(2 号峰)为参照峰, 计算各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 2.31%, 相对峰面积的 RSD 均小于 3.15%。

2.3.2 稳定性试验 取同一批乌药的供试品溶液, 每 8 h 测定 1 次, 重复 6 次, 结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 2.53%, 相对峰面积的 RSD 均小于 3.47%。

2.3.3 重复性试验 平行制备同一批 5 份乌药供试品溶液, 测定, 结果各共有峰相对保留时间的 RSD 为 2.48%, 相对峰面积的 RSD 值为 3.09%。

2.4 指纹图谱分析

分别取不同产地乌药 S1~S6 制成供试品溶液, 2 号峰为乌药主要指标成分乌药醚内酯酸, 将其作为参比峰, 其色谱峰对参比峰的相对保留时间定性, 得到 6 个共有峰(图 1、表 2), 计算各共有峰与参比峰的峰面积比值(表 3), 每个样品的非共有峰面积占总峰面积的比值均小于 20%, 符合指纹图谱要求。

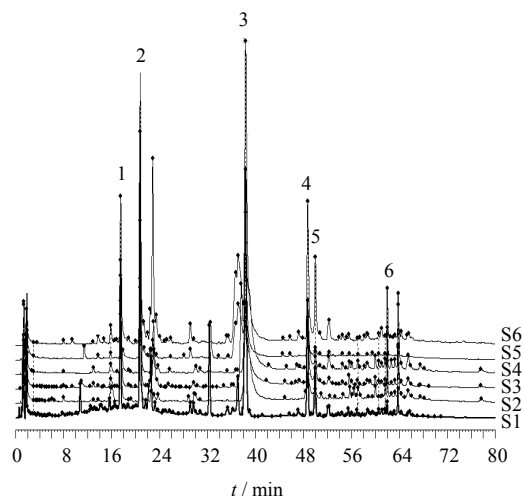


图 1 不同产地乌药指纹图谱比较

Fig. 1 Fingerprint comparison of *Linderae Radix* from different habitats

从图 1、表 2 和表 3 可知, 不同产地乌药指纹图谱存在较大的差异, 其共有峰相对保留时间基本一致, 峰面积比值存在显著差异, 表明不同产地的乌药质量之间存在较大差别。

2.5 乌药指纹图谱相似度评价

分别将 6 个不同产地样品的色谱数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)软件, 考察色谱峰相似度的一致性, 进行相似度评价, 具体数据见表 4。不同来源的 6 份乌药样品指纹图谱中主要峰群的整体图貌基本一致, 虽然不同产地的乌药样品中各成分的量有较大差别, 但特征指纹峰的相对保留时间一致, 通过相似度计算结果表明, 6 个品种中, 其他 5 个产地样品与天台乌药相比, 相似度大多数在 0.77 以下, 仅金华产乌药相似度达到 0.843。通过指纹图谱的对比, 不同产地的乌药相似度较差异明显。同时也验证了该指纹图谱检测方法能很好地鉴别天台乌药。

3 讨论

本研究采用 HPLC 梯度洗脱的方法对乌药进行研究, 参考了相关文献的色谱条件, 在对不同来源

表2 乌药指纹图谱共有峰相对保留时间

Table 2 Relative retention time of common peaks in fingerprint of *Linderae Radix*

样品	共有峰相对保留时间					
	1	2 (R)	3	4	5	6
S1	0.843	1.000	1.769	2.348	2.410	3.075
S2	0.851	1.000	1.765	2.348	2.374	3.028
S3	0.851	1.000	1.766	2.327	2.386	3.033
S4	0.851	1.000	1.766	2.327	2.384	3.029
S5	0.851	1.000	1.789	2.329	2.388	3.033
S6	0.851	1.000	1.785	2.323	2.382	3.023
RSD	0.4%	0.0%	0.6%	0.5%	0.5%	0.6%

表3 乌药指纹图谱共有峰相对峰面积

Table 3 Peak areas of common peaks in fingerprint of *Linderae Radix*

样品	共有峰相对峰面积值					
	1	2 (R)	3	4	5	6
S1	0.721	1.000	0.928	0.612	0.404	0.068
S2	0.922	1.000	4.910	0.399	0.211	0.673
S3	0.872	1.000	3.144	0.912	0.452	0.315
S4	0.656	1.000	4.724	0.234	0.059	0.471
S5	0.305	1.000	1.674	0.218	0.096	0.151
S6	0.703	1.000	0.940	0.791	0.454	0.158
RSD	31.3%	0.0%	66.7%	55.1%	64.6%	75.2%

表4 相似度分析结果

Table 4 Results of similarity analysis

样品号	S1	S2	S3	S4	S5	S6
S1	1					
S2	0.650	1				
S3	0.523	0.871	1			
S4	0.738	0.987	0.876	1		
S5	0.762	0.781	0.729	0.765	1	
S6	0.843	0.828	0.841	0.834	0.867	1

的6份乌药药材进行色谱分析的基础上,采用已建立的HPLC指纹图谱分析方法^[2-4]进行分析。一方面通过图谱的直观比较,能够反映出各共有峰的有无及其大致比例,从而判断其质量一致性的情况;另一方面通过计算相对保留时间及相对峰面积,判断是否符合所建立的指纹图谱的技术参数。实验结果表明,该方法重复性好、可操作性强,可用于对乌药药材的定性鉴别。乌药醚内酯是乌药中主要有效成分之一,且量较高,因此本实验选用乌药醚内酯作为对照品,用来定性指认其色谱峰。不同产地乌药指纹图谱比较结果表明,指纹图谱检测方法能够保留大部分有效成分,比较直观地反映药材质量,是国际通用的药材质量鉴别方法^[5]。

乌药 HPLC 指纹图谱相似度评价表明,5个品

种中,除乌药样品S6与S1相似度较高外,样品S2~S4与S1的相似度均低于0.76,说明乌药的质量可能受到产地、气候和生态环境等因素的影响较大。建议在临床应用中根据具体适应症选用固定产地乌药药材。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 余翠琴, 陈方亮, 黄瑞平, 等. 天台乌药的指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2010, 41(10): 1727-1728.
- [3] 余翠琴, 陈方亮. 高效液相色谱法测定乌药中乌药醚内酯 [J]. 中草药, 2009, 40(6): 983-984.
- [4] 陈方亮, 余翠琴, 徐仙娥. 正交试验优选乌药的提取工艺 [J]. 中草药, 2009, 40(7): 1079-1081.
- [5] 高锦红. 红景天药材指纹图谱共有模式的建立及特征谱分析 [J]. 分析仪器, 2011(3): 65-68.