

的效果。该方法数据处理过程简便快速,在定性对比多张色谱指纹图谱时具有优势,且与药材的道地性和生药学鉴定结果相结合,为药材质量的评价提供了更可靠的依据。

4.5 指纹图谱中蕴藏了很多特征的指纹信息,这些特征信息在中药的质量控制中将起着重要作用。为了阐明指纹图谱的内在本质,挖掘其中的特征指纹信息,本文利用 GC/MS 对 28 个样品进行了分析,确定了共有的 19 个特征指纹峰,并对样品中峰强度较高的特征峰进行了质谱鉴定,确定了其化学成分,为柴胡 GC 指纹图谱的分析比较提供了更全面的信息,为进一步的谱效结合研究奠定了基础。

4.6 气相色谱与质谱的联用为指纹图谱中各峰的归属提供了强有力的支持,但在组分复杂,成分较多(如芳香性植物药的挥发油)的情况下,色谱条件即使尽量优化也难以保证各个成分都得到良好的分离,峰的重叠和包埋往往影响到化学归属的准确。作为指纹图谱判断,不必要求“一步到位”,对潜在的化学归属的不准确性可以“模糊”对待,即能构成指纹特征即可,直至将来这种“模糊”被明朗,并对判断产生了关键性影响。

4.7 实验结果显示,气相色谱分离化合物有着很高的效率,质谱检测器可以提供更多的化合物的信息,提高指纹图谱的可信度,是 FID 检测器较好的补充。两者联用为药材的分析提供了全面可靠的依据,是指纹图谱研究必要的手段。

致谢:河北医科大学药学院生药教研室聂凤褪教授和邯郸市药品检验所孔增科主任药师帮助鉴定药材样品。

References:

- [1] Pan S L, Da Q Y. The classification and distribution of medicinal *Bupleurum* species in China — study on medicinal *Radix Bupleuri* in China [J]. *Res Med Plant* (药用植物研究), 1996, 19 (1): 1-17.
- [2] Pan S L, Li Y, Dai K M. Study on classification and chemical components of *Radix Bupleuri* in Yunnan province [J]. *Acta Acad Med Shanghai* (上海第一医学院学报), 1984, 11 (1): 1-13.
- [3] Xiao R, Zhang L T. Actuality and future of studies on fingerprints of TCM [J]. *J Hebei Med Univ* (河北医科大学学报), 2003, 24 (5): 310-313.
- [4] *Technical Requirement of the Fingerprint in injection of Chinese Materia Medica (Tentative Standard)* (中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行))[S]. 2001.
- [5] Li X Q, Sun X Y, He Z G, Bi K S. Studies on extraction methods of essential oil from *Bupleurum chinense* [J]. *Chin Pharm J* (中国药杂志), 2004, 39 (2): 103-105.

马钱子药材 HPLC 指纹图谱的研究

王月辉, 乔斌, 蒋建兰*, 元英进

(天津大学 化工学院制药工程系, 天津 300072)

摘要:目的 建立马钱子药材的 HPLC 指纹图谱分析方法,为马钱子的质量控制提供新方法。方法 以甲醇-水-浓盐酸(50:50:1)为提取溶剂,超声波震荡 30 min,制备马钱子药材样品溶液;采用 RP-HPLC(DAD)法,选用 Kromasil KR100-5 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),体积流量 1.0 mL/min,检测波长 254 nm,流动相为乙腈(B)-0.2%三乙胺-0.2%乙酸水溶液(A),线性梯度洗脱:0 min 时 8%:92%,30 min 时 17%:83%,60 min 时 60%:40%。结果 对 10 批马钱子药材进行测定,以土的宁为参照物,确定了马钱子药材指纹图谱中的 12 个共有峰;通过方法学考察,精密度、稳定性、重现性试验 RSD 均小于 3%;采用相似度作为指纹图谱的评判参数,计算了不同批次与对照指纹图谱之间的相似度,均大于 0.9,表明 10 批药材质量均一、稳定。结论 该方法适用于马钱子药材的质量控制。

关键词:马钱子;指纹图谱;HPLC;质量控制

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)08-1252-04

HPLC Fingerprint of *Semen Strychni*

WANG Yue-hui, QIAO Bin, JIANG Jian-lan, YUAN Ying-jin

(Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Key words: *Semen Strychni*; fingerprint; HPLC; quality control

收稿日期:2005-12-12

作者简介:王月辉(1980—),女,天津人,硕士研究生,主要研究方向为中药指纹图谱研究。

*通讯作者 蒋建兰 Tel: (022) 27400388 E-mail: jiang0202@126.com

马钱子为马钱子科植物马钱 *Strychnos nux-vomica* L. 或云南马钱 *S. pierrana* A. W. Hill 的干燥成熟种子,其主要成分为生物碱^[1]。马钱子味苦、性寒,有毒。归肝、脾经,具有散热消痰、消肿利咽、消癌化痞、通痹止痛、接骨续伤、清热解毒的功效。临床上主要用于治疗各种风湿病,疗效卓越,为历代医家所推崇。近年来,随着对马钱子作用的认识越来越深,马钱子的应用也越来越广,用于诸多系统的各种疾病,并取得良好的效果^[2]。《中国药典》2005 年版一部对马钱子的质量控制是采用 HPLC 法测定其中马钱子碱和土的宁的量^[3]。众所周知,单一指标性成分的量测定往往难以反映中药整体质量,而指纹图谱具有整体性特点,能较全面反映中药品质,现已成为中药质量评价和控制研究的热点之一^[4]。WHO、FDA、英国草药典等均接受色谱指纹图谱的质控方法^[5]。目前 HPLC 是最基本、最适合绘制指纹图谱,用途最广的一种方法^[6]。所以本研究采用 RP-HPLC 方法建立了马钱子药材的指纹图谱,为从整体上控制马钱子药材质量提供了科学依据。

1 仪器与试剂

Finnigan Surveyor 型高效液相色谱仪,配置四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、DAD 检测器, Xcalibur 色谱工作站;甲醇、乙腈均为色谱纯,冰醋酸、浓盐酸、浓氨水、三乙胺均为分析纯;马钱子碱对照品购自中国药品生物制品检定所,批号:0706-200104;土的宁对照品购自中国药品生物制品检定所,批号:11070-200306;10 批马钱子药材样品由越南进口,其来源见表 1。采用《中国药典》(2005 年版一部)方法,经李霞老师鉴定为马钱子科植物马钱 *S. nux-vomica* L. 的干燥成熟种子。

表 1 马钱子样品来源

Table 1 Source of Semen Strychni samples

批 号	产 地	采收期
y302-1	越南莱州	2002-12
y302-2	越南老街	2002-12
y302-3	越南河江	2002-12
y302-4	越南莱州	2003-12
y302-5	越南老街	2003-12
y302-6	越南河江	2003-12
y302-7	越南莱州	2004-12
y302-8	越南老街	2004-12
y302-9	越南河江	2004-12
y302-10	越南高平	2004-12

2 方法与结果

2.1 色谱条件的选择

2.1.1 流动相:分别比较了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-水-三乙胺、乙腈-水-三乙胺、甲醇-水-乙酸-三乙胺、

乙腈-水-醋酸-三乙胺,等度洗脱和梯度洗脱的效果,结果表明乙腈-水-乙酸-三乙胺梯度洗脱分离效果较好,色谱峰较多,保留时间适中。采用乙腈(B):0.2%三乙胺-0.2%醋酸(A)线性梯度洗脱:0 min 时 8%:92%,30 min 时 17%:83%,60 min 时 60%:40%。体积流量:1.0 mL/min;柱温:30℃。

2.1.2 色谱柱:分别比较了 Kromasil KR100-5 C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);依利特 SinoChrom ODS-BP (250 mm×4.6 mm, 5 μm);Thermo ODS-2 HYPERSIL (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,其中以 Kromasil KR100-5 C₁₈ 色谱柱所得图谱色谱峰最多,分离度最好。故选用 Kromasil KR100-5 C₁₈ 色谱柱。

2.1.3 检测波长:采用二极管阵列检测器对检测波长进行了考察,分别提取在 220、254、275 nm 波长处的色谱图,结果在 254 nm 处各色谱峰均有较好的紫外吸收,色谱信息最为丰富,并且生物碱类化合物在此波长下大多有吸收,因此,选择该波长作为检测波长。

2.2 供试品溶液的制备

2.2.1 提取溶剂的考察:分别比较了甲醇-浓氨水(20:3)、浓氨水-氯仿(4:46)、甲醇-水(50:50)、甲醇-水-浓盐酸(50:50:1)对马钱子药材的提取效果。取马钱子药材 4 份,每份 1.35 g,分别加入 50 mL 的不同溶剂,超声提取 30 min,提取液滤过。用 HPLC 法测定马钱子碱和土的宁的量并对指纹图谱进行考察。结果表明甲醇-水-浓盐酸(50:50:1)提取溶液中马钱子碱和土的宁的量较高,指纹图谱中色谱峰最多。

2.2.2 提取方式的考察:分别比较了超声提取 30 min 和室温放置 24 h 对马钱子药材的提取效果。取马钱子药材 2 份,每份 1.35 g,分别加入甲醇-水-浓盐酸(50:50:1) 50 mL,在不同方式下提取,提取液滤过,采用 HPLC 法测定马钱子碱和土的宁的量并对指纹图谱进行考察。结果表明超声提取 30 min 溶液中土的宁和马钱子碱的量较高,指纹图谱中色谱峰较多。根据以上试验结果,最终确定以甲醇-水-浓盐酸(50:50:1)为提取溶剂,超声提取 30 min。

2.2.3 供试品溶液的制备:取本品粉末 1.5 g,精密称定,置具塞容量瓶中,加甲醇-水-浓盐酸(50:50:1) 50 mL,超声提取 30 min,冷却后补足损失质量,取上清液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,作为供试品溶液。

2.3 参照物溶液的制备:分别取真空干燥 3 h 的马

钱子碱和土的宁对照品适量,精密称定,加甲醇超声溶解分别制成 0.26 和 0.24 mg/mL 的参照物溶液,按一定比例混合后进样测定。

2.4 指纹图谱测定:在上述确定的色谱条件下,进样 10 μ L,记录 60 min 的色谱图。对 10 批不同马钱子药材进行了测定,通过比较不同样品色谱峰,确定了 12 个共有峰,见图 1 和 2,其中 S 峰为土的宁的吸收峰,7 号峰为马钱子碱的吸收峰。相对保留时间和峰面积见表 2 和 3。

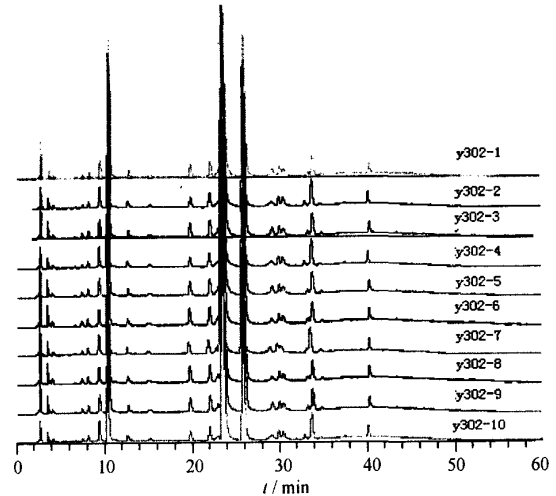


图 1 10 批马钱子药材 HPLC 指纹图谱
Fig. 1 HPLC Fingerprints of ten batches of *Semen Strychni*

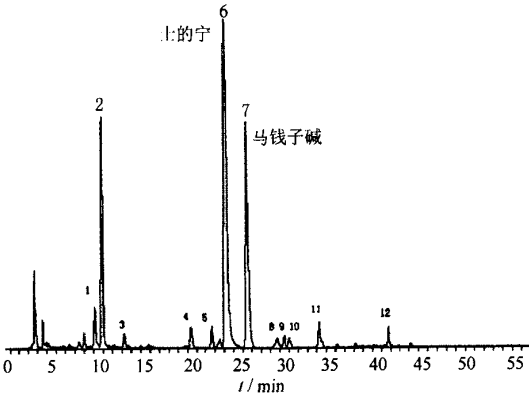


图 2 马钱子药材指纹图谱
Fig. 2 Fingerprint of *Semen Strychni*

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验:精密吸取马钱子样品 y302-1 供试品溶液 10 μ L,连续进样 5 次,记录色谱图,计算各峰相对保留时间、相对峰面积及 RSD。结果表明共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值分别在 0.081%~1.764%和 0.750%~2.654%,均小于 3%,符合指纹图谱技术要求。

2.5.2 稳定性试验:精密吸取马钱子样品 y302-1 供试品溶液 10 μ L,每 3 h 进样一次,连续进样 5 次,记录色谱图,计算各峰相对保留时间、相对峰面积及其 RSD。结果表明共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值分别在 0.158%~1.507%和 0.662%~2.222%,均小于 3%,表明供试品在 12 h 内稳定。

表 2 10 批马钱子药材指纹图谱共有峰的相对保留时间

Table 2 Relative retention time of common peaks for fingerprints of ten batches of *Semen Strychni*

批号	相对保留时间											
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12
y302-1	0.403	0.441	0.535	0.842	0.931	1.000	1.101	1.248	1.278	1.301	1.442	1.772
y302-2	0.401	0.444	0.532	0.843	0.932	1.000	1.096	1.251	1.279	1.302	1.444	1.769
y302-3	0.399	0.442	0.530	0.840	0.931	1.000	1.102	1.249	1.278	1.301	1.441	1.770
y302-4	0.407	0.439	0.536	0.841	0.934	1.000	1.098	1.248	1.279	1.299	1.439	1.771
y302-5	0.398	0.439	0.536	0.841	0.931	1.000	1.099	1.249	1.279	1.298	1.440	1.772
y302-6	0.404	0.441	0.533	0.840	0.930	1.000	1.099	1.248	1.278	1.304	1.439	1.773
y302-7	0.397	0.442	0.532	0.842	0.931	1.000	1.103	1.252	1.281	1.297	1.443	1.772
y302-8	0.399	0.443	0.531	0.841	0.929	1.000	1.104	1.249	1.280	1.301	1.439	1.771
y302-9	0.402	0.441	0.530	0.839	0.933	1.000	1.102	1.251	1.277	1.299	1.441	1.768
y302-10	0.401	0.442	0.534	0.844	0.931	1.000	1.101	1.250	1.282	1.302	1.442	1.769

2.5.3 重现性试验:取 5 份马钱子样品 y302-1,按照所确定的方法制备供试品溶液,分别进样,记录色谱图,计算各峰相对保留时间、相对峰面积及其 RSD。结果表明共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值分别在 0.193%~2.079%和 0.392%~2.735%,均小于 3%,指纹图谱分析重现性良好。

2.6 相似度评价:根据 10 批次马钱子药材的

HPLC 指纹图谱检测结果(峰面积),采用夹角余弦和相关系数这两种统计量对其相似度进行评价,并采用中位数矢量法来确定对照指纹图谱。10 批马钱子药材指纹图谱与参照图谱的相似度见表 4。结果表明 10 批马钱子药材来源质量均一、稳定。

3 结论

目前还未见关于马钱子药材指纹图谱研究的报

表 3 10 批马钱子药材指纹图谱共有峰的相对峰面积
Table 3 Relative peak areas of common peaks for fingerprints of ten batches of *Semen Strychni*

批号	相对峰面积											
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12
y302-1	0.043	0.329	0.016	0.036	0.000	1.000	0.518	0.014	0.020	0.012	0.055	0.000
y302-2	0.058	0.317	0.000	0.000	0.024	1.000	0.567	0.000	0.000	0.027	0.120	0.026
y302-3	0.092	0.347	0.035	0.047	0.030	1.000	0.429	0.023	0.000	0.012	0.030	0.026
y302-4	0.067	0.397	0.011	0.023	0.035	1.000	0.559	0.010	0.022	0.000	0.105	0.034
y302-5	0.046	0.333	0.000	0.033	0.036	1.000	0.399	0.015	0.000	0.013	0.082	0.035
y302-6	0.045	0.361	0.019	0.038	0.046	1.000	0.496	0.016	0.024	0.000	0.062	0.026
y302-7	0.044	0.377	0.027	0.052	0.058	1.000	0.580	0.032	0.022	0.026	0.079	0.042
y302-8	0.050	0.381	0.015	0.039	0.055	1.000	0.617	0.000	0.027	0.010	0.085	0.029
y302-9	0.044	0.377	0.000	0.037	0.055	1.000	0.538	0.000	0.000	0.000	0.093	0.000
y302-10	0.043	0.379	0.016	0.026	0.027	1.000	0.486	0.000	0.020	0.024	0.071	0.024

表 4 10 批马钱子药材指纹图谱与参照图谱的相似度
Table 4 Similarities of fingerprints of ten batches of *Semen Strychni*

样品	相似度	
	相关系数	夹角余弦
1	0.998	0.999
2	0.997	0.998
3	0.992	0.994
4	0.999	0.999
5	0.991	0.993
6	0.998	0.999
7	0.999	0.999
8	0.998	0.999
9	0.999	0.999
10	0.998	0.999

道,马钱子药材为剧毒药材,控制其质量尤为重要。本实验通过比较不同的样品制备方法,考察流动相、色谱柱、波长等色谱条件,建立了马钱子药材 HPLC 指纹图谱,通过方法学考察,表明该方法精密度、稳定性、重现性均符合指纹图谱技术要求。通过 10 批

马钱子药材指纹图谱的检测结果,确定了 12 个共有峰。评价了 10 批药材的相似度,均达 0.9 以上,可见药材来源质量均一、稳定。该指纹图谱方法的建立,为马钱子药材和相关制剂的全面质量控制研究提供了参考。

References:

[1] Yuan L M, Zi M, Versatile P A, et al. Two-phase solvent system for alkaloid separation by high-speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 927: 91-96.
[2] Ying S L, Meng J Y, et al. Clinic application of *Semen Strychni* [J]. *J Tianjin Univ Tradit Chin Med* (天津中医学院学报), 2003, 3 (22): 51.
[3] *Ch P* (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.
[4] Ren D Q. The significance and effect of quality control technology of Chinese medicinal [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2001, 24 (4): 235.
[5] World Health Organization. *Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines* [S]. Munich: WHO, Geneva, 1991.
[6] Cai B C, Pan Y, Yin W, et al. The application of fingerprint in TCM study [J]. *World Sci Technol* (世界科学技术), 2000, 2 (5): 9-14.

不同品种郁金的 SRAP 研究

李 敏¹, 王 琦², 付福友³

(1. 成都中医药大学 中药鉴定与药用植物教研室, 四川 成都 610075; 2. 广东省江门市药品检验所, 广东 江门 529000; 3. 西南农业大学生命科学院, 重庆 400716)

摘要:目的 用 SRAP 技术探讨郁金类药材原植物分类,并为郁金类药材的种质资源提供一定的依据。方法 对来源于姜科姜黄属的郁金类药材的 9 个样品进行了 SRAP 研究。结果 从上、下游各 10 个引物形成的 100 个引物组合中筛选出扩增产物条带信号强、重现性好、特征性好的 27 个引物组合,扩增,得到 847 条条带,其中多态性条带 397 条,平均每个引物组合产生 14.7 条多态性条带。结论 SRAP 技术可以很好地分析郁金原植物的种间关系。结合形态学资料,将 6 个郁金品种分为了 2 个组,一组花序从叶鞘抽出,包括黄丝郁金和黄白丝郁金,黄白丝郁金

收稿日期:2005-10-28
基金项目:四川省科技厅“郁金 GAP 研究”项目
作者简介:李 敏(1963—),女,四川省成都市人,成都中医药大学药学院中药鉴定与药用植物教研室,副教授、硕士生导师。研究方向为中药材品种质量和中药材 GAP 研究。Tel: 13320988022 Fax: (028) 87782078 E-mail: limin96@yahoo.com.cn