

广佛手药材 HPLC 指纹图谱的研究

张瑞芳,高幼衡*,崔红花,梁盛林

(广州中医药大学中药学院,广东 广州 510006)

摘要:目的 建立广佛手药材 HPLC 指纹图谱,以便比较完整地反映广佛手的内在化学信息,全面评价广佛手药材质量,与其他产地佛手进行鉴别。方法 应用 HPLC 法测定了 12 批佛手的指纹图谱,乙腈-0.5%冰醋酸为流动相进行梯度洗脱,检测波长 290 nm,体积流量 1.0 mL/min,柱温 30 ℃,收集 75 min。结果 建立了广佛手 HPLC 指纹图谱共有模式,并对不同产地药材进行了相似度比较。结论 该方法稳定可靠,信息量大,为广佛手药材鉴别和质量评价提供了依据。

关键词:广佛手;指纹图谱;HPLC

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)07-1075-03

Fingerprints of *Fructus Citri Sarcodactylis* from Guangdong by HPLC

ZHANG Rui-fang, GAO You-heng, CUI Hong-hua, LIANG Sheng-lin

(School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprints (HPLC-FPS) of *Fructus Citri Sarcodactylis* (FCS) from Guangdong for reflecting the internal chemical information, evaluating its internal quality of FCS and identifying them from different cultural areas. **Methods** The HPLC-FPS of 12 FCS samples were obtained. The HPLC separation was performed on a Kromasil C₁₈ analytical column by gradient eluting with acetonitrile-0.5% acetic acid at the flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was 30 ℃, the UV detection wavelength was 290 nm, and the collection time was 75 min. **Results** The mutual mode of HPLC fingerprints was set up and the similar degrees to the crude drugs from different cultural areas were compared. **Conclusion** The method is stable, reliable, and with full information which can be used as a quality control item for FCS from Guangdong.

Key words: *Fructus Citri Sarcodactylis* (FCS) from Guangdong; fingerprint; HPLC

佛手为芸香科植物佛手 *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle 的干燥果实。具有疏肝理气、和胃止痛的功效,主要用于治疗肝胃气滞、胸胁胀痛、胃脘痞满、食少呕吐等症^[1]。主产于广东、四川、浙江、福建等地,市场上流通品种主要有 3 种:广佛手(产地广东)、川佛手(产地四川)、金佛手(产地浙江)。不同产地佛手在性状特征、化学成分及药理作用上存在一定的差异,不同品种佛手质量优劣之争由来已久^[2~5],为保证临床用药的准确性和安全性,有必要建立全面评价药材质量的指纹图谱。《中国药典》2005 年版佛手项下,佛手鉴别是与对照药材对比进行薄层鉴别,目前,尚无文献报道佛手的 HPLC 指纹图谱研究。本实验针对广佛手药材,建立了其 HPLC 指纹图谱,运用相似度软件进行评价,并对广佛手药材对照图谱与川佛手、金佛手药材指纹图谱

进行初步研究,取得了满意的结果,为更好地控制佛手药材及制剂的质量提供依据。

1 仪器与试剂

DIONEX SUMMIT P680 高效液相色谱仪,四元梯度泵,DAD 检测器,CHROMELEON 数据处理软件系统;中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版(国家药典委员会)。

乙腈为色谱纯(Dikma);水为超纯水;其他试剂均为分析纯。

5,7-二甲氧基香豆素对照品(自制^[6],其结构经理化试验及波谱分析鉴定,HPLC 面积归一化法测得质量分数为 99.81%);10 批广佛手药材均来自广东德庆 GAP 基地,川佛手产地四川洪雅,金佛手产地浙江金华。以上药材均由广州中医药大学中药鉴定教研室黄海波副教授鉴定。

收稿日期:2006-11-20

基金项目:国家“十五”重大科技专项“创新药物和中药现代化”资助项目(2001BA701A38);广东省科技厅重点项目(2004B33001010)

作者简介:张瑞芳(1980-),女,广州中医药大学 2003 级硕士研究生,从事中药质量标准及活性成分研究。

E-mail: zhangrui芳80@yahoo.com.cn

* 通讯作者 高幼衡 Tel:(020)39358083 E-mail: gaoyouheng@yahoo.com.cn

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱 Kromasil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 A 为乙腈, B 为 0.5% 醋酸水溶液, 梯度洗脱 75 min, 0~3 min, A (5%); 3~8 min, B (5%~10%); 8~48 min, B (10%~27%); 48~63 min, B (27%~55%); 63~68 min, B (55%~100%); 68~75 min, B (100%)。检测波长 290 nm, 柱温 30 ℃, 体积流量 1 mL/min, 进样量 20 μL。

2.2 供试品溶液的制备: 各药材低温干燥后, 粉碎, 使全部通过 80 目筛。取药材粉末 1.5 g, 置具塞三角瓶中, 加甲醇超声处理, 35 mL/次, 共 3 次, 滤过合并滤液, 水浴蒸干, 残渣用甲醇溶解并定容到 10 mL, 过 4.5 μm 微孔滤膜。

2.3 对照品溶液的配制: 精密称取 5,7-二甲氧基香豆素对照品 2.3 mg, 用 10 mL 甲醇溶解定容即得。

2.4 精密度试验: 取同一供试品溶液, 连续进样 5 次, 测得各主要共有峰保留时间的 RSD 为 0.07%~0.62%, 表明仪器精密度良好。

2.5 重现性试验: 取同一样品 5 份, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 分别进样, 测得各主要共有色谱峰保留时间 RSD 为 0.09%~0.27%, 表明方法重现性良好。

2.6 稳定性试验: 取同一供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、16、24 h 进样, 测得各共有色谱峰保留时间 RSD 为 0.08%~1.21%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 样品指纹图谱测定: 分别各取供试品, 置自动进样器中, 进样量 20 μL, 按 2.1 项下的色谱条件操作, 记录色谱图, 即得。对照品及广佛手药材 HPLC

指纹图谱, 见图 1。HPLC 指纹图谱见图 2。

2.8 广佛手药材指纹图谱分析与评价

2.8.1 广佛手药材共有指纹峰的标定: 采用相对保留时间标定共有指纹峰。将 10 批广佛手药材的指纹图谱进行匹配后, 有 21 个共有峰, 以 5,7-二甲氧基香豆素对照品对应的色谱峰保留时间为 1, 计算各色谱峰的相对保留时间, 各共有峰相对保留时间见表 1。

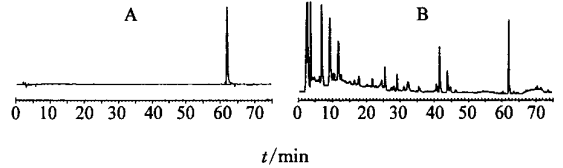
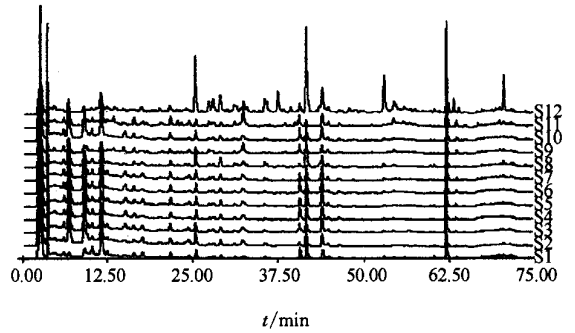


图 1 5,7-二甲氧基香豆素对照品(A)和广佛手药材(B)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatogram of 5,7-dimethoxycoumarin reference substance (A) and FCS from Guangdong (B)



S1~S10-广佛手 S11-金佛手 S12-川佛手
S1—S10-FCS from Guangdong S11-FCS from Zhejiang
S12-FCS from Sichuan

图 2 12 批佛手的 HPLC 指纹图谱
Fig. 2 HPLC-FPS of 12 batches of samples

表 1 广佛手药材指纹图谱共有峰相对保留时间

Table 1 Relative retention time of common peaks in samples' fingerprints of FCS from Guangdong

样品	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13	峰 14	峰 15	峰 16	峰 17	峰 18	峰 19	峰 20	S
S1	0.036	0.043	0.099	0.111	0.149	0.167	0.188	0.265	0.351	0.395	0.412	0.442	0.453	0.470	0.502	0.573	0.655	0.671	0.708	0.722	1
S2	0.036	0.043	0.099	0.111	0.150	0.168	0.190	0.266	0.352	0.397	0.412	0.443	0.453	0.470	0.503	0.574	0.656	0.672	0.708	0.722	1
S3	0.036	0.043	0.100	0.112	0.150	0.167	0.189	0.266	0.352	0.396	0.412	0.443	0.452	0.469	0.503	0.574	0.656	0.672	0.708	0.722	1
S4	0.036	0.042	0.099	0.111	0.149	0.167	0.189	0.266	0.351	0.396	0.412	0.442	0.452	0.469	0.502	0.573	0.655	0.671	0.707	0.721	1
S5	0.036	0.043	0.098	0.110	0.148	0.166	0.188	0.264	0.350	0.394	0.410	0.442	0.452	0.469	0.520	0.573	0.655	0.671	0.708	0.722	1
S6	0.036	0.043	0.099	0.111	0.149	0.167	0.190	0.266	0.351	0.396	0.411	0.442	0.452	0.469	0.523	0.573	0.655	0.670	0.707	0.721	1
S7	0.036	0.043	0.099	0.111	0.149	0.167	0.189	0.266	0.351	0.395	0.411	0.442	0.450	0.468	0.522	0.572	0.655	0.670	0.706	0.720	1
S8	0.036	0.043	0.099	0.111	0.149	0.167	0.189	0.266	0.352	0.396	0.411	0.443	0.454	0.470	0.525	0.574	0.656	0.671	0.709	0.723	1
S9	0.036	0.043	0.099	0.111	0.149	0.167	0.189	0.266	0.351	0.395	0.411	0.442	0.452	0.469	0.520	0.573	0.655	0.671	0.707	0.721	1
S10	0.036	0.043	0.099	0.111	0.149	0.167	0.189	0.266	0.351	0.395	0.411	0.442	0.452	0.469	0.502	0.573	0.655	0.671	0.707	0.721	1
平均值	0.036	0.043	0.099	0.111	0.149	0.167	0.189	0.266	0.352	0.395	0.411	0.442	0.452	0.469	0.512	0.573	0.655	0.671	0.707	0.722	1
RSD/%	0.010	0.270	0.370	0.340	0.280	0.270	0.350	0.210	0.140	0.180	0.130	0.100	0.200	0.130	2.050	0.090	0.070	0.070	0.090	0.090	

2.8.2 共有指纹峰的相对峰面积:《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求》中有关技术要求规定, 色谱指纹图谱中单峰峰面积占总峰面积<10%, 峰面积

比值不作要求, 仅需要标定相对保留时间。广佛手药材指纹图谱中, 仅有一个共有峰(2 号峰)峰面积大于 20%, 其余均小于 10%, 由于 2 号峰为未完全分

离的几个峰的组合,且保留时间靠近死时间,可能与溶剂峰混合,不太稳定,故不做标定。

2.8.3 相似度计算:应用国家药典委员会发布的中药色谱指纹图谱相似度评价软件(2004A版),将10批广佛手样品实验数据导入,选择11.72、41.61及62.02 min(对照品峰)时的3个色谱峰进行多点校正,色谱峰自动匹配后,以平均值生成广佛手药材对照指纹图谱(广佛手药材共有模式),进行相似度计算。各样品与对照指纹图谱的相似度见表2。从表2可以看出,有6批药材与对照图谱相似度在0.99以上,其余样品的相似度均在0.94以上,说明10批广佛手药材各化学成分及量相近,质量稳定。

表2 10批广佛手药材指纹图谱相似度

Table 2 Similarity of ten FCS samples from Guangdong

批号	相似度	批号	相似度
S1	0.980	S6	0.947
S2	0.993	S7	0.942
S3	0.997	S8	0.950
S4	0.996	S9	0.997
S5	0.996	S10	0.996

2.8.4 应用指纹图谱进行产地鉴别的初步研究:在相似度计算软件中导入系统生成的广佛手药材对照图谱及川佛手、浙佛手的指纹图谱,以广佛手对照指纹图谱为参照图谱,用“2.8.3”项下3个色谱峰校正后,自动匹配,计算二者与广佛手对照指纹图谱的相似度,计算结果为川佛手0.687,浙佛手0.928,与直观观察结果一致。

3 讨论

3.1 提取溶剂的选择:分别以甲醇、95%乙醇、醋酸乙酯为提取溶剂,采用超声提取,对不同提取时间,不同提取溶剂用量和提取次数进行了考察,实验表明,用甲醇超声取3次(35 mL/次,15 min/次),提取率高,所得图谱峰较多且分离度好。

3.2 色谱条件优化:试验中试用了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.5%冰醋酸水溶液、乙腈-0.2%磷酸水、乙腈-0.5%冰醋酸水溶液等多种流动相体系,实验表明,乙腈-0.5%冰醋酸水溶液分离效果最好,根据所得图谱,不断优化,最终确定了梯度洗脱条件。试验中记录了120 min色谱图,发现75 min后无色谱峰出现,故确定采集时间为75 min。

3.3 扫描波长的选择:取一份供试品溶液,用DAD检测器记录75 min内从190~800 nm全波段的三维图谱,比较各波长下的色谱图,最后确定在290 nm时,所得图谱信息量大且峰值分布合理。

3.4 采用HPLC梯度洗脱法主要对广佛手药材进行了指纹图谱的研究,实验证明,该方法可操作性强、重现性好,可作为佛手药材指纹图谱研究的基础。并且应用指纹图谱对3种产地佛手进行了初步研究,结果较理想,可为进一步鉴别不同产地的佛手提供依据。

3.5 指纹图谱相似度计算结果表明,广佛手药材之间相似度均大于0.940。初步产地鉴别研究结果表明,川佛手、金佛手与广佛手药材共有模式的相似度分别为0.687、0.928,与直接观察图谱判断结果一致,说明本实验所建立的广佛手指纹图谱具有特征性,可用于不同产地药材鉴别的研究。研究结果同时表明,不同产地药材中各成分的量差别较大,有必要对制剂原药材固定产地,以保证临床药效和用药安全。

3.6 本实验只测定了10批广佛手药材的指纹图谱,在此基础上建立的广佛手药材对照指纹图谱,得出了不同产地药材相似度差别较大的初步结论,有待于进一步测定更多批次的药材进行研究证实,确定不同产地佛手指纹图谱的相似度值范围,使应用HPLC指纹图谱鉴定和判断佛手药材质量的方法更加完善和科学。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. 2005.
- [2] Jin X L, Xu L S, Zhen X H. The chemical compounds in essential oil of bergamot [J]. *J Instrum Anal* (分析测试学报), 2000, 19(4): 71-72.
- [3] Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1977.
- [4] Editorial Board of China Herbal, State Administration of Traditional Chinese Medicine, China. *China Herbal* (中华本草) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1998.
- [5] Gao Y H, Huang H B, Xu H H. GC-MS Study on volatile constituent of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* of Guangdong [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(1): 883-884.
- [6] Gao Y H, Xu H H, Diao Y M, et al. Studies on chemical compounds of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle (1) [J]. *Tradit Chin Drug Res Pharmacol* (中药新药与临床药理), 2002, 13(5): 315-316.

更正:

《中草药》杂志2003年第34卷第7期“中药超微破壁粉碎技术与中医药现代化”一文由于作者自己的原因,将第二作者“于文强”误写为“丁文强”,应作者要求(附单位证明),该文第二作者由“丁文强”更正为“于文强”。