

及变化情况确定 13 个共有峰和 8 个特征指标指纹峰。以 8 个指标成分峰作为评价指标,在精密度与稳定性试验中,其相对保留时间 RSD 均小于 0.05%,峰面积比值的 RSD 均小于 3%;在重现性试验中,其相对保留时间 RSD 均小于 0.05%,峰面积比值的 RSD 均小于 5%,方法的精密度、稳定性和重现性良好。通过平均矢量法计算共有模式,相关系数法与夹角余弦法进行相似度计算,10 批川芎挥发油指纹图谱与共有模式对照指纹图谱间相似性非常好。

目前,国内已有不少关于川芎中药材指纹图谱的研究文章报道,但大多是采用高效液相色谱进行指纹图谱的研究,同时也有采用 GC-MS 法进行川芎挥发油成分指纹图谱研究的文章报道,如杨光明等^[6]采用 GC-MS 和指纹图谱对川芎不同溶剂提取物、川芎与当归的石油醚提取物进行了比较;梁明金等^[7]报道了川芎有效部位的 GC-MS 研究和指纹图谱分析,实验对川芎有效部位共有峰进行了确定,并进行了方法学考察,但仅给出了相对保留时间的 RSD,没有给出相对峰面积的 RSD,也没有进行特征指纹峰的确定,只能对川芎药材进行鉴别,并不能评价川芎药材的内在质量。

在中药指纹图谱研究中,色谱-质谱法可以提供化合物的结构信息,比单一的色谱法有更好的专属性,能为中药的质量控制提供更为可靠的依据。本实验通过 GC-MS 法对川芎挥发油特征指纹图谱的研究,通过特征指纹峰的确定以及共有模式指纹图谱的建立,不仅可以对川芎药材进行有效的鉴别,而且能对川芎药材的内在质量进行评价,确认川芎药材质量的优劣问题。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol I. 2005.
- [2] Jiang J. Fingerprint is a new method of evaluation the quality of Chinese traditional medicine [J]. *J Hubei Coll Tradit Chin Med* (湖北中医学院学报), 2001, 3(4): 11.
- [3] Miao A D, Sun D J. Application of Microsoft Excel 2002 to calculate the similarity in fingerprints of Chinese herbs [J]. *Pharm Prog* (药学进展), 2003, 27(1): 52-54.
- [4] Wang X, Wang W Y. Approaching the study on the similarity analysis of HPLC fingerprints spectra for traditional Chinese medicines [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2003, 20(5): 360-366.
- [5] Zhang N P, Xiao X Y. Study on the establishing of reference fingerprint for traditional Chinese medicine [J]. *Chin Pharm Aff* (中国药事), 2003, 17(6): 347-350.
- [6] Yang G M, Cai B C. Studies on GC-MS and fingerprint of the components of *Chuanxiong* [J]. *Northwest Pharm J* (西北药学杂志), 2002, 17(4): 147-150.
- [7] Liang M J, He L C. Analysis of the components and fingerprint of effective part of *Ligusticum chuanxiong* Hort. by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chin Mass Spectro Soc* (质谱学报), 2004, 25(3): 150-154.

蜜远志与生远志水煎液的 HPLC 指纹图谱对比研究

田 徽^{1,2}, 王 建^{1*}, 夏厚林¹, 刘贤武¹, 吴晖晖¹, 赵海平¹

(1. 成都中医药大学药学院 中药教研室, 四川 成都 610075; 2. 绵阳师范学院生命科学与技术学院, 四川 绵阳 621000)

摘 要:目的 对比蜜远志与生远志水煎液的指纹图谱,探索生远志的毒性物质基础。方法 采用 HPLC 法测定了蜜远志与生远志水煎液指纹图谱,运用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版进行图谱分析。结果 蜜远志与生远志水煎液的指纹图谱出峰位置基本相同,但峰形高低具有一定差异。结论 生远志在蜜制过程中,其大类成分并无显著变化,但某些成分的量则存在差异。

关键词:蜜远志;生远志;指纹图谱;HPLC

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)08-1180-04

Comparison of HPLC fingerprints between honey-stir-roasted *Radix Polygalae* and water-decocted solution from crude *Radix Polygalae*

TIAN Hui^{1,2}, WANG Jian¹, XIA Hou-lin¹, LIU Xian-wu¹, WU Hui-hui¹, ZHAO Hai-ping¹

(1. Department of Chinese Materia Medica, College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China; 2. College of Life Science and Biotechnology, Mianyang Normal University, Mianyang 621000, China)

收稿日期:2006-10-10

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371778)

作者简介:田 徽(1980—),男,四川绵竹人,绵阳师范学院生命科学与技术学院任教,成都中医药大学 2003 级硕士研究生,研究方向为中药理论与应用。Tel:(0816)2200065 E-mail:tianhui1009@yahoo.com.cn

* 通讯作者 王 建 E-mail:wangjian-81@sina.com

Key words: honey-stir-roasted *Radix Polygala*; crude *Radix Polygala*; fingerprint; HPLC

远志常规用量可引起轻度恶心,若大剂量服用可引起恶心、呕吐、腹泻、溶血,并引起胃、十二指肠溃疡、胃炎、严重贫血或气血两虚等不良反应,而蜜制远志具有存效解毒的作用^[1]。为了临床更安全有效合理地应用远志,曾对远志的蜜制工艺进行了筛选,筛选出了相对安全有效的最优蜜制品(另见报道)。本次实验即在前期研究基础上,考察蜜远志与生远志的指纹图谱,拟从化学角度探索其解毒机制,并为建立蜂蜜炮制远志的 HPLC 指纹图谱测定方法以及质量控制标准提供科学依据。

1 仪器与材料

Waters 2995 高效液相色谱仪, DAD 检测器, Waters-Empower 工作站, Sartorius BP211D 电子分析天平。

生远志购自成都五块石中药材批发市场,经成都中医药大学鉴定教研室卢先明鉴定为远志 *Polygala tenuifolia* Willd. 的干燥根。蜜远志系生远志按照最优蜜制条件炮制而成,由本校炮制教研室提供(炮制方法另见报道)。乙腈为色谱纯,其他试剂为分析纯,水为超纯水。中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版(国家药典委员会),中药指纹图谱分析和管理系统(中国药品生物制品检定所)。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液制备:精密称取各样品粉末 2.0 g (过 3 号筛),加入 25 mL 水,称定质量,浸泡 1 h 后煎煮 1 h,放冷,补足质量,滤过,取续滤液适量,以 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,即得。

2.2 色谱条件:色谱柱为 Dikma 公司 Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈(A)-0.05%磷酸水溶液(B)梯度洗脱,0~45 min,16%A,45~50 min,16%A,50~55 min,33%A,55~70 min,44%A,70~90 min,48%A,90 min 以后,100%A;检测波长:350 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C;体积流量:1.0 mL/min;进样量:10 μ L;记录时间:100 min。

2.3 方法学考察

2.3.1 内参比峰的选择:采用保留时间在 19 min 左右对称性较好的峰作为内参比峰(S)。

2.3.2 重复性试验:取同一批蜜远志 5 份,制备供试品溶液,进样测定,考察主要共有色谱峰(归一化法峰面积>5%)的相对保留时间和相对峰面积。相对保留时间 RSD 分别为 0.076%、0.195%、0.107%、0.132%。相对峰面积 RSD 分别为 0.370%、2.023%、1.676%、1.100%。使用中药色谱

指纹图谱相似度评价系统计算整体相似度,其全谱图相似度结果为 1.000、0.9900、0.986、0.977、0.957, RSD 为 1.641%。结果表明主要共有色谱峰(归一化法峰面积>5%)的相对保留时间、相对峰面积 RSD 均小于 3%,符合指纹图谱要求^[2],其重复性试验结果良好。

2.3.3 精密度试验:取同一蜜远志供试品,连续进样 5 次,考察主要共有色谱峰(归一化法峰面积>5%)的相对保留时间和相对峰面积。相对保留时间 RSD 分别为 0.086%、0.149%、0.097%、0.203%。相对峰面积 RSD 分别为 2.416%、1.572%、2.242%、1.489%。使用中药色谱指纹图谱相似度评价系统计算整体相似度,其全谱图相似度结果为 1.000、0.965、0.979、0.993、0.993, RSD 为 1.413%。结果表明主要共有色谱峰(归一化法峰面积>5%)的相对保留时间和相对峰面积 RSD 均小于 3%,符合指纹图谱要求^[2]。

2.3.4 稳定性试验:取同一蜜远志供试品,分别在 0、3、6、9、12、24 h 进样,考察主要共有色谱峰(归一化法峰面积>5%)的相对保留时间和相对峰面积。相对保留时间 RSD 分别为 0.099%、0.085%、0.032%、0.052%。相对峰面积 RSD 分别为 1.166%、1.934%、2.903%、1.779%。使用中药色谱指纹图谱相似度评价系统计算整体相似度,其全谱图相似度结果为 1.000、0.955、0.954、0.954、0.983、0.981, RSD 为 1.935%。结果表明主要共有色谱峰(归一化法峰面积>5%)的相对保留时间和相对峰面积 RSD 均小于 3%,符合指纹图谱要求^[2],说明常温下供试品溶液在 24 h 内保持稳定。

2.4 蜜远志水煎液 HPLC 指纹图谱的建立

2.4.1 共有指纹峰的标定:取 10 批蜜远志,制备供试品溶液,进样测定,指纹图谱见图 1。中药指纹图谱分析和管理系统生成色谱峰有 21 个,并生成蜜远志水煎液对照图谱,见图 2。

2.4.2 共有指纹峰的相对保留时间:计算 10 批蜜远志水煎液共有指纹峰的相对保留时间平均值,结果见表 1。

2.4.3 共有指纹峰的相对峰面积:按照指纹图谱技术要求^[2],对单峰面积占总峰面积 5%以上(保留时间在 30 min 以内)或 10%以上(保留时间大于 30 min)的色谱峰计算了峰面积比值,结果见表 2。

2.4.4 非共有峰面积:供试品的图谱与指纹图谱比较,非共有峰总面积均小于总峰面积的 10%。

表 1 蜜远志水煎液共有指纹峰的相对保留时间
Table 1 Relative retention time of common peaks for fingerprint of water-decocted solution from honey-stir-roasted *Radix Polygalae*

批号	相对保留时间									
	1	2	3	4	5	6	S	7	8	9
m1	0.076	0.245	0.336	0.479	0.557	0.698	1.000	1.066	1.284	1.607
m2	0.076	0.246	0.337	0.479	0.557	0.698	1.000	1.067	1.283	1.606
m3	0.076	0.245	0.337	0.479	0.557	0.698	1.000	1.066	1.284	1.606
m4	0.076	0.245	0.336	0.479	0.557	0.699	1.000	1.067	1.284	1.607
m5	0.076	0.245	0.337	0.480	0.557	0.699	1.000	1.066	1.284	1.604
m6	0.076	0.246	0.336	0.479	0.557	0.698	1.000	1.066	1.284	1.606
m7	0.076	0.245	0.336	0.478	0.557	0.698	1.000	1.066	1.283	1.606
m8	0.076	0.245	0.336	0.477	0.557	0.696	1.000	1.065	1.282	1.607
m9	0.076	0.245	0.336	0.479	0.557	0.698	1.000	1.066	1.282	1.605
m10	0.075	0.245	0.336	0.480	0.557	0.699	1.000	1.066	1.283	1.605
均值	0.076	0.245	0.336	0.479	0.557	0.698	1.000	1.066	1.283	1.606

批号	相对保留时间										
	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
m1	1.698	1.814	1.857	2.077	2.197	2.949	2.982	3.006	3.024	3.039	3.137
m2	1.696	1.812	1.856	2.075	2.195	2.945	2.978	3.001	3.019	3.034	3.132
m3	1.697	1.812	1.856	2.074	2.194	2.943	2.976	3.001	3.018	3.033	3.130
m4	1.697	1.812	1.856	2.075	2.194	2.942	2.975	2.999	3.017	3.031	3.128
m5	1.696	1.811	1.854	2.073	2.192	2.938	2.971	2.994	3.012	3.027	3.124
m6	1.697	1.812	1.855	2.074	2.193	2.941	2.974	2.998	3.016	3.030	3.129
m7	1.696	1.812	1.856	2.075	2.195	2.944	2.977	3.001	3.019	3.034	3.133
m8	1.696	1.812	1.856	2.075	2.196	2.945	2.978	3.002	3.020	3.035	3.134
m9	1.695	1.810	1.854	2.074	2.192	2.939	2.971	2.995	3.013	3.028	3.125
m10	1.696	1.811	1.854	2.074	2.193	2.940	2.973	2.997	3.015	3.029	3.128
均值	1.696	1.812	1.855	2.075	2.194	2.943	2.975	2.999	3.017	3.032	3.130

表 2 蜜远志水煎液共有指纹峰的相对峰面积
Table 2 Relative areas of common peaks for fingerprint of water-decocted solution from honey-stir-roasted *Radix Polygalae*

峰号	保留时间	峰面积	相对峰面积											准许误差范围
			m1	m2	m3	m4	m5	m6	m7	m8	m9	m10	均值	
2	<30 min	5%~10%	0.380	0.336	0.376	0.397	0.485	0.386	0.435	0.408	0.425	0.418	0.405	0.283~0.526(±30%)
5	<30 min	5%~10%	0.328	0.377	0.425	0.301	0.321	0.261	0.302	0.458	0.388	0.445	0.361	0.252~0.469(±30%)
S	<30 min	>20%	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
15~19	>30 min	10%~20%	0.721	0.826	0.879	0.797	0.798	0.819	0.846	0.969	0.844	0.706	0.820	0.615~1.025(±25%)

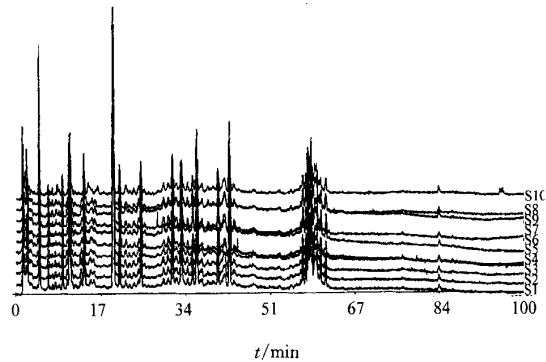


图 1 蜜远志水煎液的指纹图谱
Fig. 1 Fingerprints of water-decocted solution from honey-stir-roasted *Radix Polygalae*

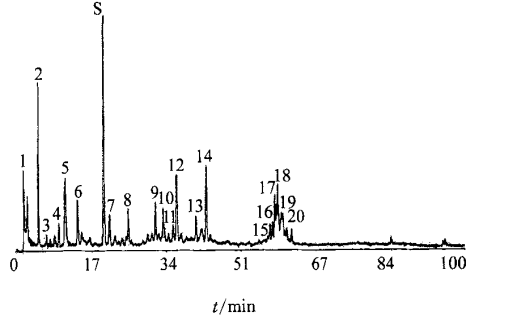


图 2 蜜远志共有峰标定
Fig. 2 Common peaks of honey-stir-roasted *Radix Polygalae*

为 0.965、0.985、0.979、0.970、0.966、0.956、0.987、0.981、0.954、0.999,RSD 为 1.473%。测定 10 批蜜远志样品的相似度均大于 0.95,计算结果均

2.4.5 相似度的比较:使用中药色谱指纹图谱相似度评价系统计算整体相似度,其全谱图相似度结果

符合指纹图谱研究的技术要求^[2],表明该蜜制方法准确稳定,故将其作为蜜远志的指纹图谱测定方法。

2.5 蜜远志水煎液与生远志水煎液指纹图谱的比较:取生远志药材 5 份,制备供试品溶液,测定其 HPLC 指纹图谱,见图 3;生成生远志水煎液对照图谱,见图 4。计算各样品与对照图谱相似度,结果为 0.985、0.953、0.988、0.959、0.952,RSD 为 1.813%。

以蜜远志水煎液对照图谱作为参照图谱,计算各生远志水煎液图谱与它的相似度,结果为 0.941、0.930、0.938、0.917、0.914,RSD 为 1.287%。生远志水煎液与蜜远志水煎液对照图谱比较见图 5。可见生远志各样品水煎液图谱与蜜远志水煎

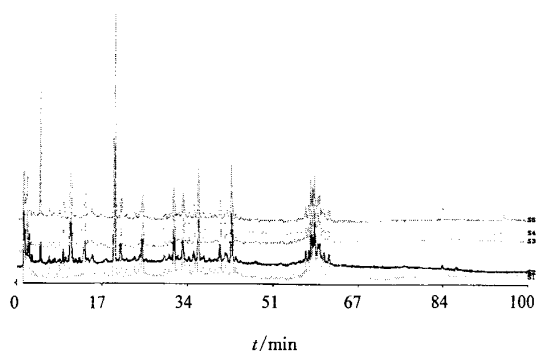


图 3 生远志水煎液的指纹图谱

Fig. 3 Fingerprints of water-decocted solution from crude *Radix Polygalae*

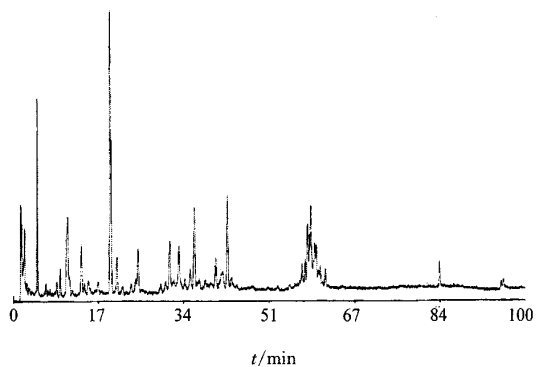


图 4 生远志水煎液的对照图谱

Fig. 4 Reference fingerprint of water-decocted solution from crude *Radix Polygalae*

液对照图谱的相似度均小于 0.95,表明二者水煎液具有一定的差异。解析二者图谱,其出峰位置基本相同,而峰形高低有一定差异。提示生远志经蜜制,其大类成分并无变化,其差异可能系各成分之间发生了转化而使其量不同。

3 讨论

远志系临床常用的安神化痰药,但又具有一定不良反应。本课题组曾对远志不同炮制品的急性毒

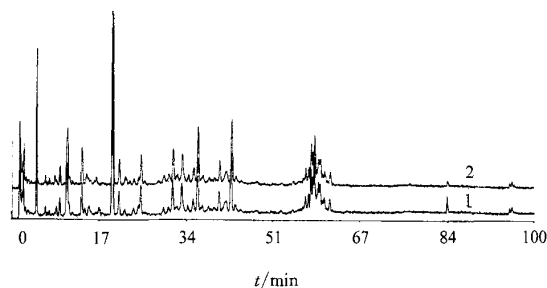


图 5 生远志(A)与蜜远志(B)水煎液对照图谱比较

Fig. 5 Comparison between reference fingerprint of water-decocted solution from crude *Radix Polygalae* (A) and that from honey-stir-roasted *Radix Polygalae* (B)

性及对胃肠运动影响进行研究。其结果显示,蜜远志的毒性和对胃肠道的不良反应最小,安全性能相对较高,且相关药效并未受到影响,表明蜜制远志的确达到了存效解毒作用^[3,4]。在确定出了相对安全性与有效性的最优蜜制工艺的基础上,为了更准确地探索生远志的毒性物质基础,本实验对蜜远志与生远志水煎液指纹图谱进行了对比研究。

通过解析生蜜远志水煎液指纹图谱提示:其中 2 号峰与 S 峰的变化较大。那么蜜制过程是否是通过影响 2 号峰与 S 峰相应物质的量变化进而降低远志毒性的呢?尚待深入考察。

通过对 10 批蜜远志的测定,制定了该种炮制方法的指纹图谱检测标准及相应的技术参数(10 批平均值),亦符合指纹图谱要求。本实验检测的蜜远志系用最优蜜制条件炮制而成的样品,故从化学角度为蜜远志炮制方法的质量控制提供了科学依据。

在计算蜜远志水煎液共有指纹峰的相对峰面积时,因为 15~19 号峰未能基线分离,故按指纹图谱要求^[2],计算了组峰的总峰面积作为峰面积,同时标定该组各峰的相对保留时间。

References:

- [1] Lei Z Q, Zhang T M. *Clinical Traditional Chinese Pharmacology* (中华临床中药学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1998.
- [2] *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.
- [3] Wang J, Guo J. Effects on mice's gastrointestinal motility of crude *Radix Polygalae* and compatibility of different *Glycyrrhizae Radix* [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2002, 18(5): 27-28.
- [4] Guo J, Wang J. Effects on mice's relieving cough and reducing sputum of crude *Radix Polygalae* and its processed product [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2003, 19(4): 29.