

天台乌药的指纹图谱研究

余翠琴, 陈方亮, 黄瑞平, 陈青华, 徐仙娥*

(台州恩泽医疗中心 台州市中心医院, 浙江 台州 318000)

摘要:目的 采用 RP-HPLC 对不同批次的天台乌药药材进行指纹图谱研究。方法 色谱柱为 Symmetry C₁₈, 流动相为乙腈-水梯度洗脱, 检测波长为 235 nm, 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温 25 ℃。结果 建立的指纹图谱共确定了 12 个共有峰, 多数峰可以达到良好分离, 所建立的乌药药材指纹图谱的分析方法有良好的重现性。结论 用该方法建立的指纹图谱可以作为乌药药材品种鉴别的主要依据之一。

关键词: 乌药; 指纹图谱; 高效液相色谱

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)10-1727-02

乌药为樟科山胡椒属植物乌药 *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm. 的膨大块根。产于浙江、江西、福建、安徽、湖南、广东、广西、台湾等省区, 越南、菲律宾也有分布^[1]。习惯以浙江天台所产者品质最佳, 故称“天台乌药”或“台乌药”。乌药为传统常用中药, 是重要的温胃理气止痛药, 具有温中散寒功效。临床上常与多种中药配伍, 治疗胃寒气滞、胸闷脘痛、呃逆、气厥头痛以及一切气痛等病症^[2]。乌药主要含有挥发油、异喹啉生物碱、呋喃倍半萜及内酯等化学成分, 其特征成分是呋喃倍半萜及内酯类成分, 乌药呋喃倍半萜组分中, 以乌药醚内酯和乌药内酯的量较高。中药材指纹图谱是近年来被国际公认的控制中药或天然药物质量的有效方法, 其优点在于可全面反映中药复杂的化学成分及其相对比例^[3-5], 具有精密、稳定、重现性好等特点^[6]。本实验采用高效液相色谱法对乌药指纹图谱进行了研究, 为乌药的药材鉴别提供依据。

1 仪器与试药

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 紫外检测器, Empower 色谱工作站)(浙江省科学仪器有限公司); Mettler AE 200-S 电子天平(浙江省科学器材进口有限责任公司); 0412-1 离心机(上海手术器械厂); HS-3120 超声提取仪器。

天台乌药(浙江省天台山乌药生物工程有限公司); 乌药醚内酯对照品(中国药品生物制品检定所); 正己烷、乙醇为分析纯, 甲醇、乙腈为色谱纯, 水为双重蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 Symmetry C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-水梯度洗脱(35: 65) 0 min → 5 min, 35% A → 25 min, 55% A → 33 min, 63% A → 40 min, 62% A → 60 min, 100% A; 检测波长 235 nm; 柱温 25 ℃, 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μL。

2.2 供试品溶液的制备: 取乌药样品磨成粉末, 分别准确称取 2 份样品粉末, 记为 A、B, A 约 1 g, B 约 0.5 g。A 份粉末用正己烷定容至 10 mL, 超声提取 1 h, 然后离心 10 min, 取其上清液蒸干后加甲醇 1.5 mL 复溶; B 份粉末用 75% 乙醇定容至 10 mL, 超声提取 1 h, 离心 10 min 后取上清液。分别吸取 A 溶液 1 mL, B 上清液 0.1 mL 混匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过即为供试品溶液。

2.3 乌药醚内酯对照品色谱峰: 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, 进样, 测定, 记录 80 min 色谱图。见图 1。

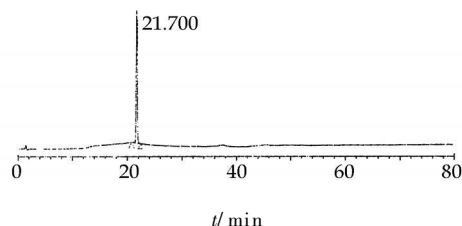


图1 乌药醚内酯色谱图

Fig 1 Chromatogram of aggregata ether lactone

2.4 方法学考察

2.4.1 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, 见图 2。以乌药醚内酯峰(5 号峰)为参照峰, 计算各共有峰相对保留时间的 RSD 为 2.31%, 相对峰面积的 RSD 为 3.15%。

①收稿日期: 2010-04-12

基金项目: 台州市科技计划项目(061ky25)

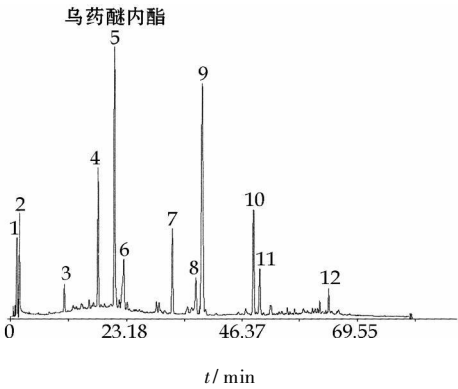


图 2 乌药药材 HPLC 色谱图

Fig 2 HPLC Chromatogram of *Linderæ Radix*

2.4.2 稳定性试验: 取同一批乌药的供试品溶液, 每 8 h 测 1 次指纹图谱, 重复 6 次, 结果各共有峰相对保留时间的 RSD 为 2.53%, 相对峰面积的 RSD 为 3.47%, 表明样品在 24 h 内稳定性良好。

2.4.3 重现性试验: 平行操作制备 5 份乌药供试品溶液, 测定 HPLC 色谱图, 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%。

2.5 指纹图谱的测定: 取 10 批不同批次的天台乌药药材, 制备供试品溶液, 进样, 记录 80 min 内的色

谱图, 采用国家药典委员会编写的“ 中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”。采用批号 0902211 的天台乌药药材供试品色谱图作为相似度计算时的参照图谱, 对 10 批天台乌药药材指纹图谱采用平均数法生成对照图谱, 天台乌药药材指纹图谱及对照图谱见图 3。各批次药材的相似度见表 1。

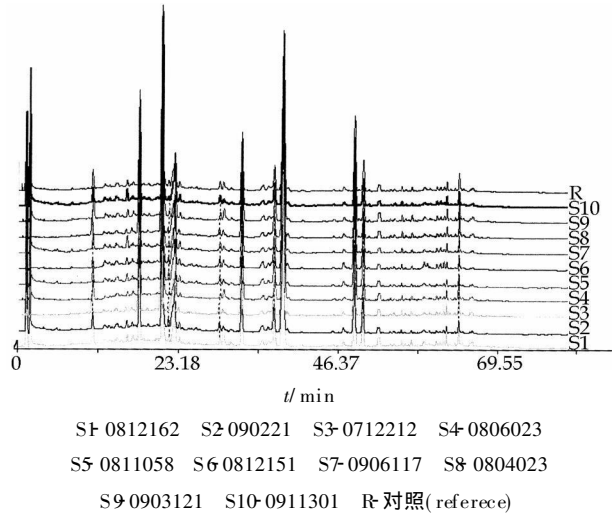


图 3 天台乌药药材指纹图谱

Fig 3 Fingerprint of *Linderæ Radix*

表 1 天台乌药药材指纹图谱相似度

Table 1 Similarity of *Linderæ Radix* fingerprint

样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
S1	1.000	0.975	0.966	0.996	0.970	0.960	0.977	0.961	0.997	0.979
S2	0.975	1.000	0.931	0.979	0.998	0.937	0.981	0.927	0.974	0.981
S3	0.966	0.931	1.000	0.964	0.927	0.942	0.923	0.995	0.963	0.925
S4	0.996	0.979	0.964	1.000	0.976	0.960	0.971	0.960	0.994	0.973
S5	0.970	0.998	0.927	0.976	1.000	0.933	0.979	0.927	0.973	0.975
S6	0.960	0.937	0.942	0.960	0.933	1.000	0.925	0.940	0.958	0.927
S7	0.977	0.981	0.923	0.971	0.979	0.925	1.000	0.922	0.979	0.996
S8	0.961	0.927	0.995	0.960	0.927	0.940	0.922	1.000	0.963	0.919
S9	0.997	0.974	0.963	0.994	0.973	0.958	0.979	0.963	1.000	0.976
S10	0.979	0.981	0.925	0.973	0.975	0.927	0.996	0.919	0.976	1.000
对照	0.995	0.986	0.969	0.995	0.984	0.966	0.983	0.967	0.995	0.983

3 讨论

通过对提取方法(超声、热回流提取) 的考察, 发现超声与热回流提取效率相当, 超声提取较热回流提取操作方便, 故选用超声提取。对不同提取溶剂(甲醇、正己烷、75% 乙醇水溶液) 进行考察, 单用 75% 乙醇提取水溶性成分过大, 单用正己烷提取出峰数量不够多, 因此选用正己烷提取并用甲醇复溶后与 75% 乙醇水溶液提取液以 10: 1 混匀的方法制备供试品溶液, 此方法色谱图信息量最多, 成分量最高。对不同提取时间(30、60、70 min) 进行了考察, 发现超声提取 60 min, 成分数量及量最高。故供试品溶液的制备方法确定为分别用正己烷与 75% 乙醇水溶液超声提取 60 min 后将提取液以 10: 1 混匀。本实验对检测波长进行了选择, 通过比

较发现检测波长为 235 nm 时, 色谱图所包含的信息量最大、成分量高, 且各色谱峰分离较好, 基线平稳, 因此选用 235 nm 检测波长检测色谱图。

参考文献:

[1] 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.

[2] Wang C, Dai Y, Yang J, et al. Treatment with total alkaloids from *Radix Linderæ* reduces inflammation and joint destruction in type II collagen induced model for rheumatoid arthritis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2007, 111(2): 322.

[3] 谢培山. 色谱指纹图谱分析是中药质量控制的可行政策 [J]. 中药新药与临床药理, 2001, 12(3): 141-151.

[4] 崔洋, 王巧, 张兰桐, 等. 河北道地药材连翘的高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2010, 41(2): 297-301.

[5] 逢楠楠, 毕开顺, 闫宝庆, 等. 羌活高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 818-821.

[6] 罗文, 刘斌, 王伟, 等. 山楂药材 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(1): 39-42.