

## 川乌 HPLC 指纹图谱的研究

林华<sup>1\*</sup>, 邓广海<sup>2</sup>

(1. 广东省中医院 药学部, 广州 510120; 2. 广州中医药大学, 广州 510405)

[摘要] 目的: 建立不同产地川乌药材的高效液相指纹图谱。方法: 实验以 Phenomenex Gemini-NX C<sub>18</sub> 为色谱柱, 流动相 乙腈-0.2% 乙酸 (浓氨水调 pH 10.00), 采用梯度洗脱, 流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 35℃, 检测波长 235 nm, 洗脱时间 75 min。结果: 建立了川乌药材 HPLC 指纹图谱共有模式, 标定了 12 个共有峰, 鉴别出 6 个色谱峰的归属, 指纹图谱的相似度基本都在 92% 以上, 通过系统聚类分析, 10 批不同产地川乌药材可分为 3 类。结论: 川乌指纹图谱的特征性及专属性强, 可结合含量测定用于全面控制川乌的质量。

[关键词] 川乌; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 聚类分析

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)03-0073-04

## HPLC Fingerprint of Radix Aconiti

LIN Hua<sup>1\*</sup>, DENG Guang-hai<sup>2</sup>

(1. Department of Pharmacy, Guangdong Provincial Hospital of

Traditional Chinese Medicine Guangdong, Guangzhou 510120, China;

2. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for HPLC-fingerprint of Radix Aconiti from different areas.

**Method:** The fingerprint for Radix Aconiti from different areas was established by HPLC. Gemini-NX C<sub>18</sub> column was used at 35℃ with acetonitrile-0.2% acetic acid (adjusted to pH 10.0 with ammonia water) as mobile phase by gradient eluting, the flow rate was set at 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, detection wavelength was set at 235 nm and eluting period was 75 min. **Result:** HPLC-fingerprint of *R. aconiti* from different areas was established, which contained 12 common peaks, and six peaks in the fingerprint were identified, most of the similarities were over 92%, 10 batches of *R. aconiti* from different areas were classified into three groups based on hierarchical cluster. **Conclusion:** Fingerprint established was characteristic and specific, combined with the determination it could be used for the quality control of Radix Aconiti.

[Key words] Radix Aconiti; HPLC; chromatographic fingerprint; clustering analysis

川乌为毛茛科植物乌头 *Aconitum camichaeli* De-bx 的干燥母根<sup>[1]</sup>, 主要分布于四川、陕西、云南、甘肃等省, 以四川、陕西的产量最大<sup>[2]</sup>。川乌主要含有生物碱类成分, 以二帖类双酯型生物碱含量较高, 该类成分毒性强烈, 且用药剂量与中毒剂量接近, 使用不

当容易出现中毒或死亡现象<sup>[3]</sup>。文献报道表明, 不同产地川乌所含的新乌头碱、乌头碱和次乌头碱等双酯型生物碱的含量差异较大<sup>[4]</sup>, 因此, 有必要制定一种有效的方法来保证其药材有效性和安全性。本文采用高效液相色谱法建立了川乌药材的指纹图谱, 并对其共有峰进行归属鉴别, 划分出单酯型和双酯型生物碱的特征区, 同时对其指纹图谱进行相似度评价和聚类分析, 以期为川乌的质量控制提供一定依据。

### 1 材料

1.1 仪器 Agilent-1100 高效液相色谱仪 (DAD 检

[收稿日期] 20100911(001)

[基金项目] 广东省科技厅资助项目 (2009B03081300)

[通讯作者] \* 林华, 主任中药师, 硕士, 研究方向: 中药质量鉴定和品质评价, Tel: 13560234573, E-mail: 1h33895380@163.com

测器、自动进样器、在线脱气、四元泵)、KQ-300VDB 型数控超声波清洗器、A4DL 型自动纯水蒸馏器、BS210S 型电子天平。

**1.2 试药** 乌头碱(批号 0720-9807)、新乌头碱(批号 799-9403)、次乌头碱(批号 110798-200404)等对照品均购买于中国药品生物制品检定所, 苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱等对照品均由上海尚谊化工科技有限公司提供。川乌药材分别采集于四川、陕西、云南等地(表 1), 经广州中医药大学中药鉴定教研室黄海波副教授鉴定为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 的干燥母根; 乙腈、甲醇均为色谱纯(美国 Burdick & Jackson 公司), 其他试剂均为分析纯, 水为超纯水。

表 1 10 批川乌药材来源

No.	采集地	采集时间	No.	采集地	采集时间
S1	四川(安县)	2009-07	S6	河南	2009-08
S2	四川(平武)	2009-07	S7	四川(西昌)	2009-07
S3	云南(曲靖)	2009-07	S8	四川(永丰)	2009-07
S4	贵州	2009-07	S9	陕西(城固)	2009-08
S5	四川(江油)	2009-07	S10	江西	2009-08

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱 Phenomenex Gemini-NX C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相乙腈 B-0.2% 乙酸(浓氨水调 pH 10.00) A, 梯度洗脱条件 0 ~ 15 min (24% ~ 31% B), 15 ~ 50 min (31% ~ 50% B), 50 ~ 75 min (50% ~ 78% B); 流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温 35 °C; 检测波长 235 nm。

**2.2 对照品的制备** 精密称取新乌头碱 5.02 mg、乌头碱 3.95 mg 及次乌头碱 3.04 mg 置于 10 mL 量瓶中, 精密称取苯甲酰新乌头原碱 1.02 mg、苯甲酰新乌头原碱 1.04 mg 及苯甲酰新乌头原碱 1.02 mg 置于 25 mL 量瓶中, 加入 0.05% 盐酸-甲醇液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

**2.3 供试品的制备** 称取川乌粉末(50 目) 1.0 g, 精密称定, 置于带塞锥形瓶中, 加入氨试液 1 mL, 搅拌均匀, 润湿 30 min, 加入 35 mL 乙醚, 冷浸 16 h, 滤过, 滤渣用 5 mL 的乙醚洗涤 3 次, 滤过, 合并滤液, 低温蒸干, 用 0.05% 盐酸-甲醇液溶解, 转移至 10 mL 量瓶中, 稀释至刻度, 摇匀, 即得。

**2.4 测定方法** 精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 按照 2.1 色谱条件记录 75 min 色谱图, 见图 1。

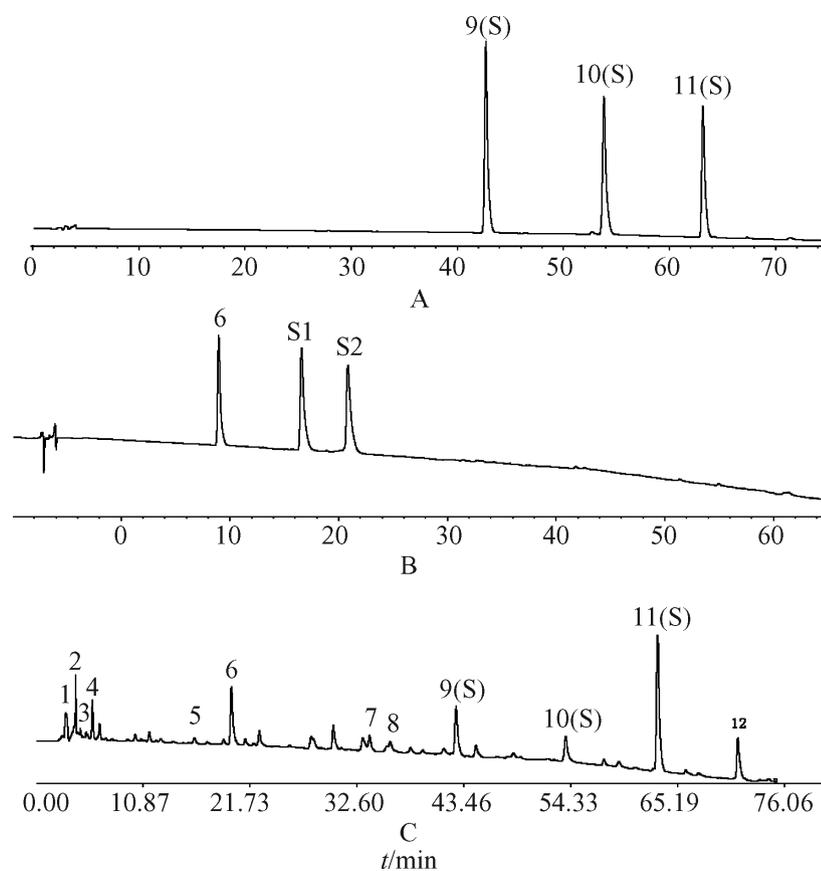


图 1 川乌 HPLC 指纹图谱

A、B. 混合对照品; C. 生成指纹图谱; 9(S). 新乌头碱; 10(S). 乌头碱; 11(S). 次乌头碱; 6. 苯甲酰新乌头原碱; S1. 苯甲酰乌头原碱; S2. 苯甲酰次乌头原碱

## 2.5 方法学考察

**2.5.1 精密度考察** 精密吸取同一供试品溶液, 按上述色谱条件重复进样 5 次, 结果 12 个共有峰的相对保留时间的 RSD 均小于 0.9%, 相对峰面积的 RSD 均小于 2.5%, 符合指纹图谱技术要求。

**2.5.2 稳定性考察** 分别取同一份供试品溶液, 按照 2.3 项下的方法进行提取, 采用上述液相色谱条件, 在 0, 4, 8, 16, 24 h 进样 10 μL 测定, 结果 12 个共有峰的相对保留时间的 RSD 均小于 0.87%, 相对峰面积的 RSD 均小于 2.52%, 说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.5.3 重复性考察** 取同一批川乌药材样品 5 份, 按 2.3 项下供试品溶液制备方法操作, 依上述测定条件分别进样, 结果 12 个共有峰的相对保留时间的 RSD 均小于 0.80%, 相对峰面积的 RSD 均小于 2.46%, 符合指纹图谱技术规定。

## 2.6 川乌指纹图谱的建立

**2.6.1 共有峰及特征区的标定** 采用相对保留时间标定共有指纹峰, 结果 10 批川乌标定了 12 个共有峰, 占总峰面积的 73.6%。经对照品的 HPLC 图谱定位, 鉴定出 6 个色谱峰, 6, 9, 10, 11 号峰分别为苯甲酰新乌头原碱、新乌头碱、乌头碱、次乌头碱。另外样品 S1 ~ S8 中含有苯甲酰乌头原碱, 样品 S2 ~ S8 中含有苯甲酰次乌头原碱。根据酯键多少初步

划分为 3 个区: 区(无酯型), 0 ~19.862 min; 区(单酯型), 19.862 ~42.678 min; 区(二酯型以上), 42.678 ~75 min, 见图 2。

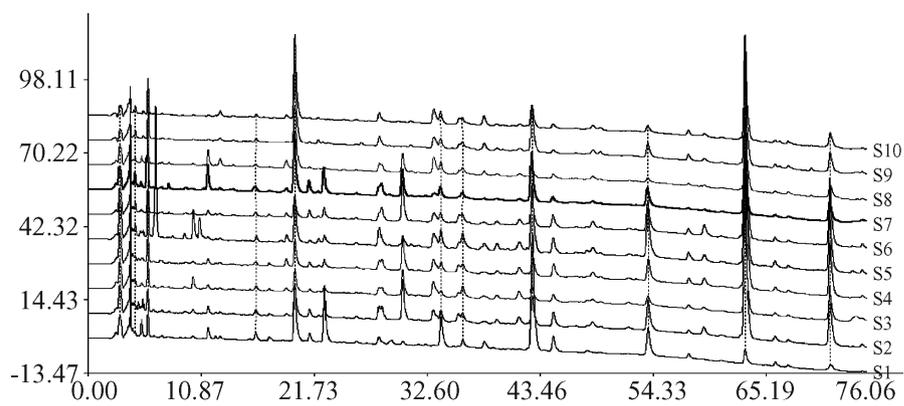


图 2 10 批不同产地川乌的 HPLC 指纹图谱图

**2.6.2** 共有峰相对保留时间和相对面积 供试品色谱图中以 11 号(次乌头碱)为参照峰,其相对保留时间和峰面积为 1,计算各共有指纹图谱的相对保留时间及峰面积比值。结果 9 号峰占总峰面积的 23.21%, 11 和 6 号峰分别占总峰面积的 19.18% 和 14.76%, 其他单峰面积均小于 10%。结果见表 2, 3。

**2.6.3** 指纹图谱相似度评价 采用国家药典委员会推荐的中药色谱指纹图谱相似度软件(2004A 版),对各产地供试品 HPLC 图进行处理,生产对照指纹图谱,同时计算出 10 批药材相似度分别为: 0.538, 0.970, 0.956, 0.962, 0.961, 0.955, 0.865,

表 2 不同产地川乌指纹图谱共有峰相对保留时间

供试品	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12
S1	0.048	0.064	0.072	0.091	0.255	0.314	0.537	0.570	0.676	0.852	1.000	1.129
S2	0.048	0.064	0.071	0.091	0.255	0.315	0.537	0.570	0.676	0.852	1.000	1.129
S3	0.048	0.064	0.071	0.091	0.256	0.315	0.537	0.554	0.676	0.852	1.000	1.129
S4	0.048	0.064	0.071	0.092	0.255	0.315	0.537	0.570	0.676	0.852	1.000	1.129
S5	0.048	0.064	0.071	0.091	0.256	0.315	0.537	0.570	0.676	0.852	1.000	1.129
S6	0.048	0.064	0.071	0.091	0.255	0.315	0.537	0.570	0.676	0.852	1.000	1.129
S7	0.048	0.064	0.071	0.091	0.254	0.314	0.536	0.570	0.675	0.852	1.000	1.129
S8	0.048	0.064	0.071	0.091	0.255	0.314	0.537	0.570	0.676	0.852	1.000	1.129
S9	0.048	0.064	0.072	0.091	0.256	0.315	0.537	0.570	0.676	0.852	1.000	1.129
S10	0.048	0.064	0.072	0.091	0.256	0.314	0.537	0.569	0.675	0.852	1.000	1.129

表 3 不同产地川乌指纹图谱共有峰相对峰面积

供试品	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12
S1	1.540	2.056	0.245	0.926	0.446	3.949	2.235	0.461	9.520	2.452	1.000	0.624
S2	0.151	0.177	0.023	0.069	0.025	0.153	0.060	0.057	0.173	0.202	1.000	0.345
S3	0.234	0.277	0.045	0.148	0.037	0.181	0.057	0.164	0.114	0.100	1.000	0.294
S4	0.155	0.163	0.020	0.076	0.015	0.132	0.052	0.101	0.121	0.143	1.000	0.316
S5	0.160	0.188	0.038	0.090	0.019	0.186	0.084	0.111	0.349	0.277	1.000	0.289
S6	0.111	0.115	0.032	0.072	0.018	0.088	0.045	0.092	0.167	0.165	1.000	0.331
S7	0.380	0.431	0.165	0.296	0.108	0.999	0.189	0.091	0.930	0.397	1.000	0.390
S8	0.206	0.270	0.075	0.190	0.026	0.664	0.132	0.115	0.104	0.056	1.000	0.181
S9	0.089	0.165	0.037	0.122	0.020	0.642	0.088	0.104	0.421	0.145	1.000	0.201
S10	0.098	0.184	0.039	0.133	0.022	0.703	0.117	0.123	0.203	0.072	1.000	0.159

0.928, 0.953, 0.930。结果表明,除了四川(安县)和四川(西昌)2 批的相似度分别为 53.8% 和 86.5% 外,其他各批供试品的相似度均大于 92%。

**2.6.4** 指纹图谱的聚类分析 将不同产地川乌药材的 HPLC 指纹图谱的 12 个共有峰与色谱峰 11(次乌头碱)的比值组成  $10 \times 12$  阶原始数据为矩阵,运用 SPSS 15.0 软件对其进行分析,采用最短距离法,

利用欧氏距离平方为样品测度。结果表明,10 批样品共可分为 3 类,其中样品 S2, S4, S6, S3, S5 聚为一类, S8, S10, S9, S7 聚为一类, S1 单独为一类。实验结果与相似度的评价相似,除了样品 S1(四川安县)外,其他样品间具有较好的相似性。结果见图 3。

### 3 讨论

**3.1** 提取溶剂及方法的考察 川乌主要含有生物碱

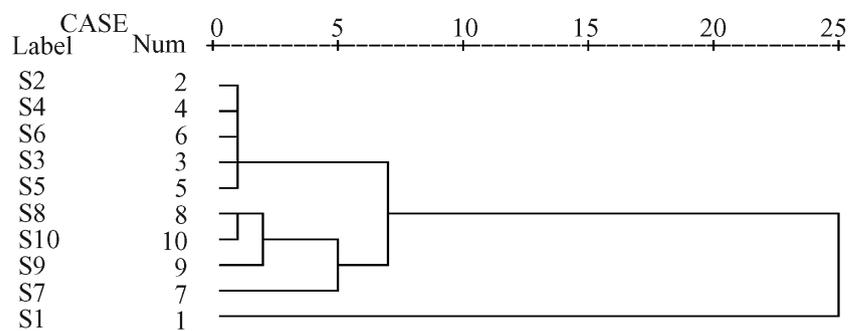


图 3 10 批川乌 HPLC 指纹图谱聚类分析图

类成分, 实验比较了乙醚、氯仿、乙酸乙酯-异丙醇(1:1)、乙醇、酸水等溶剂的提取效果, 结果提示, 乙醚的提取效果较好, 色谱峰的信息量丰富, 分离度高; 同时对提取方法(冷浸、超声、先冷浸后超声等)也进行了考察, 结果表明, 超声和冷浸法均没有明显的差别, 但冷浸法对样品的影响较小, 因此选择冷浸法。

**3.2 色谱柱的考察** 实验比较了 Dikma kromasil C<sub>18</sub>(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 和 Phenomenex Genimi-NX C<sub>18</sub>(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 等色谱柱, 结果表明, Phenomenex Genimi-NX C<sub>18</sub> 色谱柱的柱效较高, 对样品的分离度较好, 峰形尖锐, 因此选择 Phenomenex Genimi-NX C<sub>18</sub> 为色谱柱。

**3.3 流动相的优化** 实验对甲醇-乙酸铵缓冲溶液、乙腈-磷酸铵缓冲溶液、乙腈-乙酸铵缓冲溶液、乙腈-0.2% 乙酸(三乙胺调 pH 6.25) 等流动相进行考察, 同时对缓冲盐的 pH(5.3, 6.25, 8.0, 9.0, 9.2, 10.0) 也进行比较, 结果表明, 样品在强碱性(pH 10.0) 条件下色谱峰峰形对称, 分离度高, 峰展宽小, 水相中的磷酸铵和醋酸铵缓冲盐两者没有明显差异, 由于磷酸铵对色谱柱的损害较大, 故选择乙腈-

0.2% 乙酸(浓氨水调 pH 10.0) 为流动相。川乌中各成分极性差异较大, 因此选择梯度洗脱。

**3.4 检测波长的考察** 采用二极管阵列检测器于 200 ~ 400 nm 下进行波长扫描, 结果 230 ~ 240 nm 波长下色谱峰信息量丰富, 分离度较好, 而 230 nm 波长下色谱图基线漂移严重, 240 nm 波长下色谱峰数目相对减少, 235 nm 波长下出峰数目比较多, 同时可大大减少基线漂移现象, 因此选择 235 nm 为检测波长。

**3.5 指纹图谱评价** 本实验对不同产地川乌 HPLC 指纹图谱进行相似度和主要成分聚类分析, 结果表明, 除了四川(安县)外, 其他各批之间的相似度均较高, 说明各产区川乌质量具有一定的稳定性, 但是各批共有峰相对峰面积比值表明, 不同产地川乌成分的含量差异较大, 这可能是受环境因素的影响, 有必要对川乌的生长环境进行考察, 建立川乌的 GAP 基地, 从源头上保证川乌的质量。

#### [参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010: 26.
- [2] 赵国平, 戴慎. 中药大词典[M]. 上海: 科技出版社, 2006: 301.
- [3] 龚千峰. 中药炮制学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 293.
- [4] 张聿梅, 鲁静, 蒋渝, 等. 川乌和制川乌中单酯及双酯型生物碱成分的含量测定[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(7): 807.

[责任编辑 顾雪竹]