

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.22.021

基于 HPLC 指纹图谱建立医院紫草药材验收标准*

于典¹, 黄磊^{1△}, 华国栋², 何婷¹, 巩颖¹, 杨维¹

(1. 北京中医药大学东方医院药学部, 北京 100078; 2. 北京中医药大学东直门医院药学部, 北京 100700)
摘要:目的 建立紫草药材的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱, 为该药材的验收提供参考。方法 色谱柱为 Shimadzu VP-ODS C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.3% 磷酸水溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 274 nm, 柱温为 25 ℃, 进样量为 10 μL。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012.0 版)进行相似度评价。结果 建立了紫草药材的 HPLC 指纹图谱, 共确定 14 个共有峰, 去氧紫草素色谱峰为对照峰, 供试品指纹图谱与对照指纹图谱的相似度多在 0.7 以上。结论 所建立的紫草药材 HPLC 指纹图谱方法分离效果好, 结果准确、高效, 可为医院紫草药材的验收提供参考。

关键词: 紫草; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 相似度; 验收标准

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)22-0085-03

Establishment of Acceptance Criteria of Arnebiae Radix in a Hospital Based on HPLC Fingerprint

YU Dian¹, HUANG Lei¹, HUA Guodong², HE Ting¹, GONG Ying¹, YANG Wei¹

(1. Department of Pharmacy, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, China 100078; 2. Department of Pharmacy, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, China 100700)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography(HPLC) fingerprint of Arnebiae Radix, and to provide a reference for the acceptance of Arnebiae Radix. **Methods** The chromatographic column was Shimadzu VP-ODS C₁₈ column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.3% phosphoric acid solution(gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 274 nm, the column temperature was 25 ℃ and the injection volume was 10 μL. The *Similarity Evaluation System of Chromatographic Fingerprints of Traditional Chinese Medicine*(Version 2012.0) was used for the similarity evaluation. **Results** The HPLC fingerprint of Arnebiae Radix was established, and 14 common peaks were determined. The chromatographic peak of deoxyshikonin was taken as the control peak. The similarity between the test fingerprint and the control fingerprint was more than 0.7. **Conclusion** The established HPLC fingerprint method has a good separation effect, accurate and efficient results, which can provide a reference for the acceptance of Arnebiae Radix in the hospital.

Key words: Arnebiae Radix; HPLC; fingerprint; similarity; acceptance criteria

对中药功效的深入研究发现, 单一的活性成分或指标性成分均难以反映中药的真伪和质量^[1]。通用现代的分析技术分析中药和中药复方, 能为鉴别中药材的真伪和质量提供有效参考^[2], 其中建立指纹图谱是评价药品质量的关键环节和基础^[3]。指纹图谱的参照物质多选择药材中易获取的主要活性成分或指标性成分, 以考察药材图谱稳定性及辅助辨别图谱重复性。若临床药效未能取得确切关联, 则指纹图谱的参照物将起到辨别和评价药材图谱特征的引导作用^[4]。萘醌类、苯醌类、黄酮类、生物碱类及多糖类物质是药用紫草的主要活性成分, 其中萘醌类化合物的抗癌作用和较强的脂溶性特征是当前紫草研究的热点, 左旋紫草素、乙酰紫草素、去氧紫草素、 β - β' -二甲基丙烯酰紫草素、 β -羟基异戊酰紫草素、去氢阿卡宁和 β -羟基异戊酰阿卡宁等物质也均是紫草的主要物质成分^[5]。本研究选取左旋紫草素、乙

酰紫草素、去氧紫草素、 β - β' -二甲基丙烯酰紫草素为参照物, 建立了紫草药材的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters e2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); BSA124S 型分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司, 精度为 0.000 1 g)。

1.2 试剂

左旋紫草素对照品(中国食品药品检定研究院, 批号为 110769-200506, 含量 $\geq 95\%$); 乙酰紫草素对照品(上海士锋生物技术有限公司, 批号为 15062715, 含量 $\geq 98\%$); 去氧紫草素对照品(北京迈瑞达科技有限公司, 批号为 19072541, 含量 $\geq 98\%$); β - β' -二甲基丙烯酰紫草素对照品(上海源叶生物科技有限公司, 批号

*基金项目: 北京中医药大学 2018 年度基本科研业务费项目[2018-JYB22-JS160]。

第一作者: 于典, 女, 硕士, 中药师, 研究方向为中药调剂学, (电子信箱)1808604938@qq.com。

△通信作者: 黄磊, 男, 主管中药师, 研究方向为中药调剂学, (电话)010-67689952。

为 Y02A9H67135, 含量 $\geq 98\%$); 紫草(批号分别为 ZC-2020001 和 ZC2020002 的来自新疆哈密, 批号分别为 ZC-2020003 和 ZC-2020004 的来自新疆阿勒泰, 批号分别为 ZC-2020005 和 ZC-2020006 的来自新疆喀什, 批号分别为 ZC-2020007 和 ZC-2020008 的来自新疆乌鲁木齐, 批号分别为 ZC-2020009 和 ZC-2020010 的来自尼泊尔); 甲醇、乙腈均为色谱纯, 磷酸为分析纯, 水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Shimadzu VP-ODS C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-0.3% 磷酸水溶液(梯度洗脱, 洗脱程序见表 1); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 274 nm; 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 进样量: 10 μ L。

表 1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution program

时间(min)	流动相 A(%)	时间(min)	流动相 A(%)
0~15	25 $\rightarrow$ 45	50~55	90
15~30	45 $\rightarrow$ 60	55~60	90 $\rightarrow$ 25
30~50	60 $\rightarrow$ 90		

2.2 溶液制备

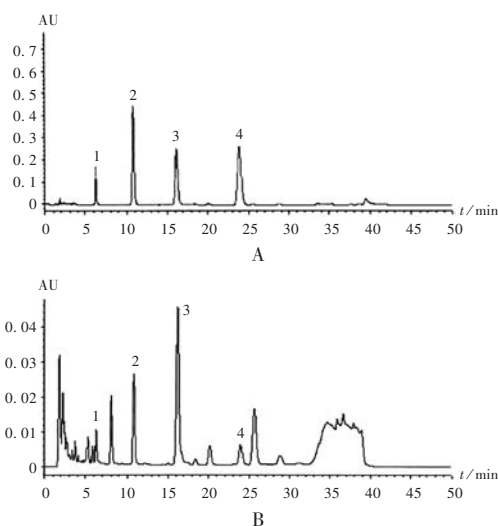
称取左旋紫草素对照品、乙酰紫草素对照品、去氧紫草素对照品、 β - β' -二甲基丙烯酰紫草素对照品各 10.00 mg, 精密称定, 分别置 10 mL 容量瓶中, 分别以流动相制成质量浓度为 0.7, 1.0, 1.5, 1.0 mg/mL 的对照品溶液; 各精密量取 1 mL, 置同一 100 mL 容量瓶中, 加流动相定容, 摇匀, 制成混合对照品溶液。取紫草样品粉末(过 60 目筛)0.5 g, 精密称定, 加入 6 倍量的乙醇溶液于具塞锥形瓶中, 室温下密封、遮光。冷浸提取后, 过滤, 并收集滤液, 制成浓缩、干燥的浸膏, 加 10 mL 甲醇使溶解, 冷却至室温, 作为供试品溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性试验: 精密量取 2.2 项下混合对照品溶液、供试品溶液各适量, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果供试品溶液色谱中, 在与混合对照品溶液色谱相应位置有吸收峰, 理论板数按左旋紫草素、乙酰紫草素、去氧紫草素、 β - β' -二甲基丙烯酰紫草素峰计均大于 3 000, 分离度均大于 1.5, 基线分离良好。详见图 1。

精密度试验: 取紫草药材样品, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定 6 次, 记录相对保留时间及色谱峰面积。结果的 RSD 均小于 1.1% ($n=6$), 表明方法精密度良好。

稳定性试验: 2.2 项供试品溶液, 室温下放置 0, 2, 4, 8, 12, 18, 24, 32, 40, 48 h 时按 2.1 项下色谱条件分别进样测定, 记录相对保留时间及色谱峰面积。结果的 RSD 均小于 2.1% ($n=10$), 表明供试品溶液室温



1. 左旋紫草素 2. 乙酰紫草素 3. 去氧紫草素
4. β - β' -二甲基丙烯酰紫草素

A. 混合对照溶液 B. 供试品溶液

图 1 高效液相色谱图

1. *L*-shikonin 2. acetylshikonin 3. deoxyshikonin
4. β - β' -dimethylacryl shikonin

A. Mixed reference solution B. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

下 48 h 内稳定。

重复性试验: 取同一批次紫草药材样品 6 份, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录相对保留时间及色谱峰面积。结果的 RSD 均小于 1.4% ($n=6$), 表明方法重复性良好。

耐用性试验: 使用不同型号的仪器、不同批次、不同柱温(28, 30, 32 $^{\circ}$ C)的色谱柱对同一批次紫草药材样品进行测定, 计算其相似度。结果表明, 在一定波动范围内, 各共有峰的分离度无明显差异, 说明指纹图谱测定方法的耐用性良好。

2.4 指纹图谱的建立与评价

2.4.1 紫草指纹图谱的建立

选择 10 批次紫草药材, 分别按上述建立的指纹图谱测定方法进行检测, 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012.0 版)拟合生成对照指纹图谱, 以峰面积 $>12.5\%$ 的 10 号峰(去氧紫草素)为对照峰, 0.5% $<$ 峰面积 $<12.5\%$ 的分别为第 1~9 号和第 11~14 号峰, 这 14 个峰的面积之和占共有峰总面积的 90%, 详见图 2。10 批药材对照指纹图谱见图 3。

2.4.2 相似度评价

采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012.0 版)建立共有模式, 对图谱数据的相关参数进行自动匹配, 生成对照图谱 S, 计算 10 批紫草药材提取物图谱与对照图谱间的相似度。结果多超过 0.7, 见表 2。

3 讨论

当前市场紫草品种良莠不齐, 2020 年版《中国药典

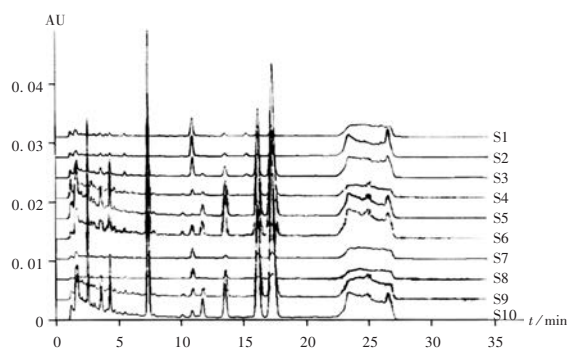


图2 10批药材叠加指纹图谱

Fig. 2 Superimposed HPLC fingerprints of 10 batches of Arenbiae Radix

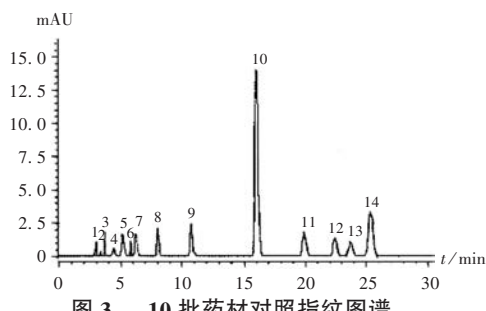


图3 10批药材对照指纹图谱

Fig. 3 Reference fingerprint of 10 batches of Arenbiae Radix

表2 10批不同产地紫草的HPLC指纹图谱相似度

Tab. 2 Similarity of HPLC fingerprints of 10 batches of Arnebiae Radix from different producing areas

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S
S1	1.000										
S2	0.983	1.000									
S3	0.732	0.777	1.000								
S4	0.728	0.760	0.979	1.000							
S5	0.667	0.666	0.901	0.946	1.000						
S6	0.867	0.839	0.573	0.586	0.587	1.000					
S7	0.867	0.839	0.573	0.586	0.587	0.787	1.000				
S8	0.992	0.984	0.722	0.718	0.659	0.859	0.859	1.000			
S9	0.980	0.985	0.801	0.794	0.703	0.832	0.832	0.974	1.000		
S10	0.986	0.994	0.770	0.762	0.672	0.840	0.84	0.986	0.990	1.000	
S	0.966	0.966	0.849	0.854	0.808	0.886	0.886	0.96	0.973	0.968	1.000

(一部)》对药用紫草的描述特征不鲜明,且在紫草指纹图谱方面尚未建立对应的质量规范标准。紫草的市场来源较复杂,实际流通的并非仅药典规定的新疆紫草和内蒙古紫草,还有更多不同的紫草品种无法通过《中国药典》的性状描述准确鉴别^[6]。不同的种植地点、采收期、贮藏条件、运输条件等均会对药材产生较大影响,导致现在市场紫草药材的质量难以控制^[7]。

为了规范新疆紫草市场,应建立有效的含量测定方法,保证紫草药材质量的有效性和安全性^[8]。指纹图谱为全面说明中药化学成分特点的一种新技术,可表征中药样本的特征成分^[9]。中药指纹图谱为综合性鉴别方法,其应用范围是鉴别真伪,评价中药的质量均匀性和

稳定性^[10-11]。采集药材组的指纹图谱,弄清中药材化学成分多样性和复杂性,是科学合理地控制中药材质量的有效途径^[12-13]。本研究结果显示,样品指纹图谱和对照药材指纹图谱中所含化学成分基本相同,但不同市场图谱中特征峰数量和各特征峰面积均存在较大差异,表明新疆紫草萘醌提取物在不同来源的组成相似,但含量差异大。

本研究中建立的紫草指纹图谱用于紫草药材的验收标准,即已明确该药材为紫草的前提下,用指纹图谱控制紫草的入院质量,目的是用于控制入院紫草药材的质量均一性及保证临床疗效的均一性。且本研究建立的指纹图谱虽仅选择了2个大类产区、5个小类产区,指纹图谱的色谱峰选择受到一定限制,但更细化的区分则有利于研究的深入开展。

参考文献

- [1] 朱佳依,王志光,张洪,等. 基于成分含量与抗肿瘤抗氧化作用相关性分析的不同产地薏苡仁质量评价研究[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(1): 1-5.
- [2] 柳娜,王雅莉,张旭东,等. 中药复方农药与中药复方肥料对当归质量的影响研究[J]. 中药材, 2019, 42(2): 267-270.
- [3] 何元,顾崇梅,郭华荣. 不同产地当归药材HPLC指纹图谱的建立及2种主成分含量测定[J]. 中兽医医药杂志, 2019, 38(6): 32-37.
- [4] 高菁. 娑罗子指纹图谱及有效成分七叶皂苷提取纯化工艺研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [5] 马冉. 新疆紫草药材的质量研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2014.
- [6] 廖梅. 基于UHPLC-QTRAP-MS/MS(MRM)技术的紫草中紫草素和紫草呋喃类成分特征轮廓谱的构建及其应用于紫草资源品质评价研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2016.
- [7] 赵胜男,刘素丽,徐杨璐,等. 红外光谱三级鉴别法联合高效液相色谱-质谱法研究不同采收期黄芩药材的质量[J]. 中国药房, 2019, 30(12): 1669-1674.
- [8] 李俊江,刘向娥,李季文,等. 紫草总色素 β -环糊精包合物的定性鉴别及左旋紫草素含量测定[J]. 中国药业, 2020, 29(3): 47-49.
- [9] 朱岩,戚进,余伯阳. “谱效整合指纹图谱技术”在中药物质基础方面的研究进展及思考[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2019, 21(8): 172-178.
- [10] 陆顺瑶,成秋香,许舜军,等. 应用赤芍对照提取物对赤芍样品的指纹图谱分析[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(4): 459-465.
- [11] 柳温曦. 中药牛黄及其代用品的真伪鉴别及牛黄药材及成药的质量控制方法研究[D]. 北京: 中国食品药品检定研究院, 2019.
- [12] 徐男,孙蓉,李元媛,等. 基于HPLC指纹图谱多成分定量结合化学计量学方法评价不同产地三棱药材的质量[J]. 中草药, 2019, 50(7): 1682-1689.
- [13] 李群三,陈景斌,顾和平,等. 基于InDel标记的国内绿豆品种遗传多样性分析及指纹图谱构建[J]. 植物遗传资源学报, 2019, 20(1): 126-132.

(收稿日期: 2020-01-04; 修回日期: 2021-05-10)