

制八角枫 HPLC 指纹图谱研究

余启荣,和芳\*,高柏丽,胡玉霞  
(北京创立科创医药技术开发有限公司,北京 100029)

[摘要] 目的:建立制八角枫高效液相指纹图谱。方法:采用高效液相色谱法,色谱柱采用 Alltech Apollo C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm,5 μm),以乙腈-缓冲液(缓冲液:0.2 g 庚烷磺酸钠、3.5 g 磷酸二氢钾定容至 1 000 mL)作为流动相梯度洗脱。结果:建立了制八角枫的 HPLC 指纹图谱,方法学考察符合指纹图谱技术要求。结论:该方法稳定、准确、可靠,为制八角枫质控指标的制定提供了科学依据。

[关键词] 制八角枫;高效液相色谱;指纹图谱

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)06-0117-04

HPLC Fingerprint Spectrum of Radix Alangii Preparata

YU Qi-rong, HE Fang\*, GAO Bai-li, HU Yu-xia  
(Beijing Supertrack Medical Technology Develop Ltd., Beijing 100029, China)

[Abstract] Objective: To establish the HPLC fingerprint of the pieces of Radix Alangii Preparata. Method: Using the high performance liquid chromatography, the chromatographic column was Alltech Apollo C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) and acetonitrile-buffer (buffer: 0.2 g heptane sulfonate, 3.5 g potassium dihydrogen phosphate volume to 1 000 mL) was selected as mobile phase gradient elution were adopted. Result: Established HPLC fingerprint of R Alangii Preparata, and the results of methodological studymet the technical requirements for fingerprinting. Conclusion: The method is stable, accurate, and reliable, to provide a scientific basis of quality control standard for the R. Alangii Preparata.

[Key words] Radix Alangii Preparata; HPLC; fingerprint

制八角枫为八角枫的炮制加工品,八角枫为八角枫科植物八角枫 *Alangium chinense* (Lour.) Harms 的干燥细根及须根<sup>[1]</sup>。为少数民族使用药,具有祛风通络,散瘀镇痛、麻醉及松弛肌肉等作用<sup>[2-3]</sup>。其须根及支根含生物碱、酸类、氨基酸、有机酸、树脂等,而其中的生物碱为八角枫碱,是松弛肌肉的主要活性成分,也是其毒性的主要来源<sup>[4]</sup>。本实验采用 HPLC,建立了制八角枫的 HPLC 指纹图谱,旨在完

善制八角枫质量标准。

1 仪器与试剂

岛津 LC-2010A 高效液相色谱仪, KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), Sartorius CP225D 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司), BL610 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。八角枫碱对照品(购自 Toronto Researd chemicals Inc, 批号 A637175, 供含量测定用), 乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯; 水为超纯过滤水; 制八角枫来源见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Alltech Apollo C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-缓冲液(缓冲液:0.2 g 庚烷磺酸钠、3.5 g 磷酸二氢钾定容至 1 000 mL)(B); 洗脱梯度:0 ~ 5 min, 100% B; 5 ~ 15 min,

[收稿日期] 20101217(001)  
[基金项目] 国家“十一·五”科技支撑计划项目(2007BA148B08-5)  
[第一作者] 余启荣,甘肃通渭人,主要从事新药研究工作, E-mail: longyuanren686@sina.com  
[通讯作者] \*和芳,主要从事药学研究及管理工作, E-mail: fanghe@vip.sina.com

表 1 制八角枫来源及药材产地

|      | 批号       | 产地 |      | 批号       | 产地 |
|------|----------|----|------|----------|----|
| A    | 20080701 | 云南 | H    | 20090601 | 云南 |
| B    | 20080702 | 云南 | I    | 20090602 | 云南 |
| C    | 20080703 | 云南 | J    | 20090603 | 云南 |
| D 自制 | 20081001 | 云南 | K 自制 | 20090604 | 贵州 |
| E    | 20081002 | 云南 | L    | 20090605 | 贵州 |
| F    | 20081003 | 云南 | M    | 20090701 | 四川 |
| G    | 20090501 | 云南 | N    | 20090702 | 四川 |

100% ~ 95% B; 15 ~ 30 min, 95% ~ 86% B; 30 ~ 45 min, 86% ~ 100% B; 45 ~ 50 min, 100% B; 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温 30 ℃; 检测波长 259 nm; 理论板数按八角枫碱峰计算应不低于 5 000。

**2.2 对照品溶液的制备** 取八角枫碱对照品适量, 精密称定, 加含 5% 醋酸的 30% 甲醇溶液制成 0.1 g·L<sup>-1</sup> 的溶液, 即得。

**2.3 供试品溶液的制备** 取制八角枫于 60 ℃ 干燥 4 h, 粉碎, 取粉末(过四号筛)约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入含 5% 醋酸的 30% 甲醇溶液 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz)50 min, 放冷, 再称定质量, 用含 5% 醋酸的 30% 甲醇溶液补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 即得。

**2.4 测定** 在上述色谱条件下, 分别吸取对照品溶液、供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 得色谱图见图 1。

**2.5 方法学考察**<sup>[5-6]</sup>

**2.5.1 精密度试验** 取制八角枫(批号 20090501)供试品溶液, 连续进样 6 次, 以八角枫碱的保留时间和峰面积为参照, 对各主要共有色谱峰相对保留时间和相对峰面积进行统计。结果, 各主要共有色谱峰相对保留时间和相对峰面积均基本一致, RSD < 3%, 表明仪器精密密度良好。

**2.5.2 稳定性试验** 取制八角枫(批号 20090501)供试品溶液在室温下保存, 分别于 0, 1, 4, 8, 12, 24 h 测定, 以八角枫碱的保留时间和峰面积为参照, 对各主要共有色谱峰相对保留时间和相对峰面积进行统计。结果, 各主要共有色谱峰相对保留时间和相对峰面积均基本一致, RSD < 3%, 表明 24 h 内测定结果稳定。

**2.5.3 重复性试验** 取制八角枫(批号 20090501)于 60 ℃ 干燥 4 h, 粉碎, 取粉末(过四号筛)6 份, 每份约 0.5 g, 精密称定, 按 2.3 项下供试品溶液制备

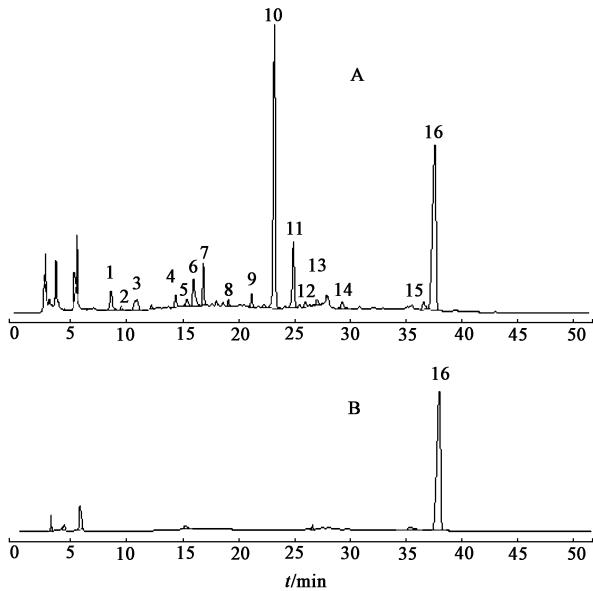


图 1 八角枫碱对照品及制八角枫 HPLC 图  
A. 样品; B. 对照品; 16. 八角枫碱

方法进行制备, 依次测定, 以八角枫碱的保留时间和峰面积为参照, 对各主要共有色谱峰相对保留时间和相对峰面积进行统计。结果, 各主要共有色谱峰相对保留时间和相对峰面积均基本一致, RSD < 3%, 表明重复性良好。

**2.6 同一产地制八角枫指纹图谱采集**

**2.6.1 同一产地 10 批制八角枫的测定** 取药材产地为云南的 10 批制八角枫于 60 ℃ 干燥 4 h, 粉碎, 取粉末(过四号筛)约 0.5 g, 精密称定, 按 2.3 项下供试品溶液制备方法进行制备, 按上述色谱条件依次进样测定, 以八角枫碱的保留时间和峰面积为参照, 分别对各共有色谱峰相对保留时间和相对峰面积进行统计, 结果见表 2, 3。

由表 1, 2 结果可以看出, 10 批制八角枫共有 11 个共有峰, 分别为 1, 3, 6, 7, 9 ~ 11, 13 ~ 16, 其中 16 号峰为八角枫碱。除上述色谱峰外, A, B, C, D, E, H, I, J 在 9.252 min 左右有共有峰, A, B, C, D, E, F, H, I, J 在 13.890, 14.972, 18.592 min 左右有共有峰, A, B, C, D, E, F 在 25.271 min 左右有共有峰。

**2.6.2 共有峰的确定及制八角枫指纹图谱共有模式的建立** 运用中药指纹图谱相似度评价系统 2004A 版对 10 批制八角枫的指纹图谱进行相似度分析, 以 S1 为参照图谱, 经过多点校正、自动匹配, 以中位数法, 生成对照图谱 R, 由匹配数据的输出结果得到共有峰共 11 个, 见图 2。

表 2 10 批制八角枫指纹图谱相对保留时间

| No    | A     | B     | C     | D     | E     | F     | G     | H     | I     | J     |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1     | 0.231 | 0.231 | 0.230 | 0.230 | 0.230 | 0.229 | 0.230 | 0.229 | 0.228 | 0.228 |
| 2     | 0.255 | 0.254 | 0.254 | 0.254 | 0.254 | —     | —     | 0.254 | 0.253 | 0.253 |
| 3     | 0.292 | 0.292 | 0.292 | 0.291 | 0.291 | 0.292 | 0.295 | 0.292 | 0.293 | 0.293 |
| 4     | 0.384 | 0.383 | 0.382 | 0.382 | 0.381 | 0.381 | —     | 0.381 | 0.379 | 0.379 |
| 5     | 0.410 | 0.411 | 0.412 | 0.411 | 0.411 | 0.411 | —     | 0.412 | 0.411 | 0.411 |
| 6     | 0.427 | 0.427 | 0.427 | 0.426 | 0.426 | 0.426 | 0.428 | 0.427 | 0.426 | 0.426 |
| 7     | 0.450 | 0.450 | 0.450 | 0.450 | 0.451 | 0.450 | 0.452 | 0.451 | 0.450 | 0.451 |
| 8     | 0.510 | 0.511 | 0.511 | 0.511 | 0.510 | 0.510 | —     | 0.511 | 0.510 | 0.509 |
| 9     | 0.565 | 0.565 | 0.564 | 0.564 | 0.564 | 0.564 | 0.566 | 0.565 | 0.565 | 0.564 |
| 10    | 0.619 | 0.619 | 0.619 | 0.619 | 0.619 | 0.618 | 0.619 | 0.617 | 0.617 | 0.616 |
| 11    | 0.664 | 0.663 | 0.664 | 0.664 | 0.663 | 0.663 | 0.664 | 0.662 | 0.661 | 0.660 |
| 12    | 0.692 | 0.692 | 0.693 | 0.693 | 0.693 | 0.692 | —     | —     | —     | —     |
| 13    | 0.719 | 0.720 | 0.719 | 0.720 | 0.720 | 0.720 | 0.722 | 0.721 | 0.720 | 0.720 |
| 14    | 0.780 | 0.779 | 0.779 | 0.779 | 0.778 | 0.779 | 0.780 | 0.778 | 0.776 | 0.776 |
| 15    | 0.973 | 0.974 | 0.974 | 0.974 | 0.974 | 0.974 | 0.977 | 0.976 | 0.975 | 0.975 |
| 16(S) | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

表 3 10 批制八角枫指纹图谱相对峰面积

| No    | A     | B     | C     | D     | E     | F     | G     | H     | I     | J     |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1     | 0.083 | 0.083 | 0.068 | 0.066 | 0.069 | 0.068 | 0.158 | 0.100 | 0.118 | 0.118 |
| 2     | 0.016 | 0.016 | 0.015 | 0.015 | 0.014 | —     | —     | 0.024 | 0.024 | 0.027 |
| 3     | 0.080 | 0.080 | 0.072 | 0.071 | 0.071 | 0.071 | 0.087 | 0.097 | 0.062 | 0.062 |
| 4     | 0.034 | 0.033 | 0.030 | 0.031 | 0.029 | 0.028 | —     | 0.035 | 0.021 | 0.018 |
| 5     | 0.029 | 0.028 | 0.020 | 0.024 | 0.022 | 0.019 | —     | 0.029 | 0.028 | 0.027 |
| 6     | 0.110 | 0.116 | 0.097 | 0.090 | 0.107 | 0.103 | 0.100 | 0.125 | 0.086 | 0.075 |
| 7     | 0.099 | 0.100 | 0.092 | 0.098 | 0.100 | 0.088 | 0.124 | 0.112 | 0.100 | 0.098 |
| 8     | 0.017 | 0.020 | 0.019 | 0.020 | 0.018 | 0.018 | —     | 0.035 | 0.025 | 0.021 |
| 9     | 0.036 | 0.037 | 0.036 | 0.036 | 0.032 | 0.033 | 0.062 | 0.052 | 0.041 | 0.040 |
| 10    | 0.967 | 0.956 | 0.947 | 0.945 | 0.911 | 0.899 | 1.424 | 1.077 | 1.402 | 1.398 |
| 11    | 0.224 | 0.222 | 0.218 | 0.217 | 0.218 | 0.219 | 0.235 | 0.200 | 0.259 | 0.261 |
| 12    | 0.018 | 0.018 | 0.017 | 0.018 | 0.018 | 0.019 | —     | —     | —     | —     |
| 13    | 0.027 | 0.031 | 0.018 | 0.019 | 0.019 | 0.019 | 0.061 | 0.035 | 0.041 | 0.091 |
| 14    | 0.042 | 0.037 | 0.031 | 0.040 | 0.026 | 0.025 | 0.051 | 0.029 | 0.036 | 0.054 |
| 15    | 0.037 | 0.017 | 0.016 | 0.016 | 0.029 | 0.029 | 0.053 | 0.037 | 0.045 | 0.033 |
| 16(S) | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

**2.6.3 指纹图谱相似度评价** 使用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版进行相似度分析,结果 10 批制八角枫与相应对照图谱的相似度均大于 0.97,符合要求。

**2.7 不同产地制八角枫指纹图谱采集**

**2.7.1 不同产地制八角枫的测定** 取药材产地为贵州、四川、云南的制八角枫于 60 ℃干燥 4 h,粉碎,取粉末(过四号筛)约 0.5 g,精密称定,按 **2.3** 项下

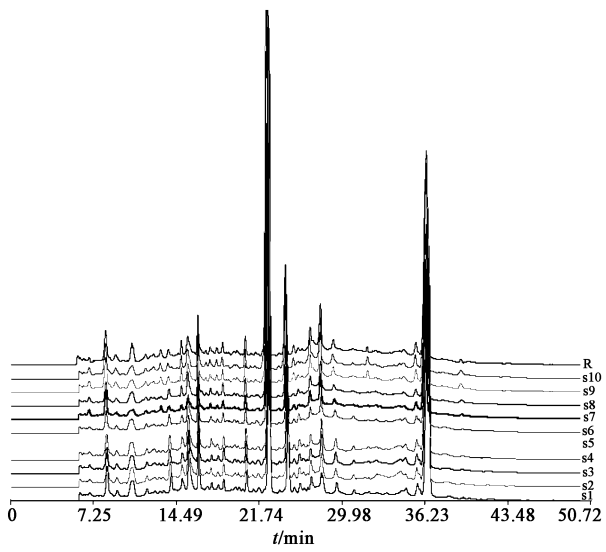


图 2 10 批制八角枫(药材产地:云南)指纹图谱  
R. 生成的对照图谱

供试品溶液制备方法进行制备,按上述色谱条件依次进样测定,见图 3。

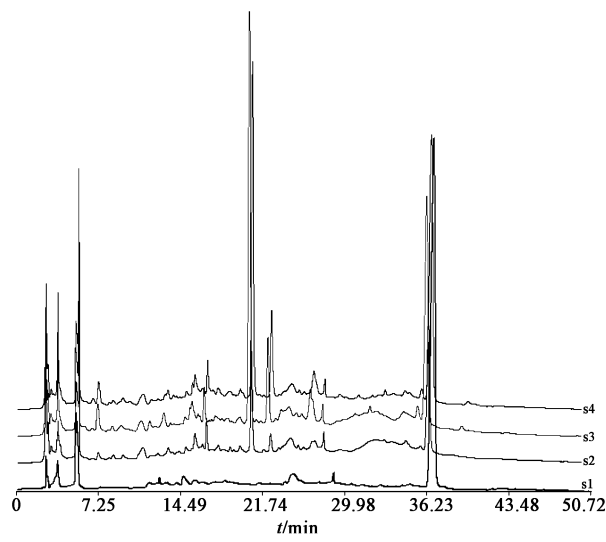


图 3 不同产地制八角枫指纹图谱  
S1. 八角枫碱对照品;S2. 制八角枫-贵州;  
S3. 制八角枫-四川;S4. 制八角枫-云南

**2.7.2 指纹图谱相似度评价** 使用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版进行相似度分析,结果贵州、四川、云南三地的制八角枫与相应对照图谱的相似度均大于 0.95,符合要求。

### 3 讨论

**3.1 流动相的选择** 比较了乙腈-缓冲液(缓冲液:0.2 g 庚烷磺酸钠、3.5 g 磷酸二氢钾定容至 1 000 mL)不同洗脱梯度对样品的分离情况,结果当乙腈-缓冲液(缓冲液:0.2 g 庚烷磺酸钠、3.5 g 磷酸二氢钾定容至 1000 mL)洗脱梯度为:0 ~ 5 min, 100% B;5 ~ 15 min, 100% ~ 95% B;15 ~ 30 min, 95% ~ 86% B;30 ~ 45 min, 86% ~ 100% B;45 ~ 50 min, 100% B 时,样品中各峰分离度好。

**3.2 检测波长的选择** 分别考察 240,259,270,300 nm 4 个检测波长下样品的分离图谱,以 259 nm 下的信息量较丰富,而且色谱峰的表现丰度高,基线平稳。

**3.3 色谱柱的选择** 分别考察了样品在 Alltech Apollo C<sub>18</sub> 柱、Alltech Alltima C<sub>18</sub> 柱、Agilent HP- C<sub>18</sub> 柱、Diamonsil C<sub>18</sub> 柱等不同品牌色谱柱的分离情况,结果色谱柱对样品中色谱峰的分离影响不大,色谱条件能在上述色谱柱上均能重现。

通过测定,云南产地的 10 批制八角枫和四川、贵州产地的制八角枫与生成的对照图谱比较相似度良好,均大于 0.95。各产地制八角枫各主要色谱峰相对保留时间基本一致,而且所含成分基本相同,符合指纹图谱的要求,但主要色谱峰的峰面积差异较大,可能与产地、加工炮制等因素有关,将进一步研究炮制对制八角枫化学成分的影响,以保证制八角枫质量的稳定性。

### [参考文献]

[1] 中国药典.一部[S].1977: 6.  
[2] 贾敏如,李星炜.中国民族药志要[M].北京:中国医药科技出版社,2005: 24.  
[3] 杨仓良.毒药本草[M].北京:中国中医药出版社,1993:172.  
[4] 全国中草药汇编.全国中草药汇编(上)[M].北京:人民卫生出版社,1982:14.  
[5] 谢培山.中药色谱指纹图谱[M].北京:人民卫生出版社,2004,11(18),175.  
[6] 周玉新.中药指纹图谱研究技术[M].北京:化学工业出版社,2002:8.

[责任编辑 蔡仲德]