

川芎多波长叠加指纹图谱初步研究^{*}

王涛^{1,2,3}, 张慧⁴, 古咸杰^{1,2}, 叶坤浩^{1,2}, 赵丹^{1,2}, 戴维^{1,2}, 陈杰^{1,2**}

(1. 绵阳市农业科学研究院中药材研究所, 绵阳 621023; 2. 国家中药材现代农业产业体系绵阳综合试验站, 绵阳 621023;
3. 四川大学华西药学院, 成都 610041; 4. 绵阳市农业科学研究院生物技术中心, 绵阳 621023)

摘要 目的: 采用反相高效液相色谱法对川芎多波长叠加指纹图谱进行研究。**方法:** 采用 Poroshell 120 EC-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 100 mm, 2.7 μm), 以 0.1% 磷酸水溶液 (A)–乙腈 (B) 为流动相梯度洗脱 (0~20 min, 10% → 32% 的 B; 20~25 min, 32% → 46% 的 B; 25~36 min, 46% → 55% 的 B; 36~60 min, 55% → 80% 的 B; 60~63 min, 80% → 10% 的 B; 63~70 min, 10% 的 B), 流速 0.8 mL · min⁻¹, 柱温 35 °C, 检测波长 230、260、290、320 nm。运用波长叠加技术建立指纹图谱。**结果:** 多波长叠加指纹图谱体现了川芎 230、260、290、320 nm 特征吸收波长的指纹信息, 标定了 22 个共有峰, 16 个不同来源的川芎样品与指纹图谱之间具有良好的相似性, 相似度均在 0.94 以上。**结论:** 建立了川芎多波长叠加指纹图谱, 该指纹图谱信息更加丰富全面, 可用于川芎的质量控制。

关键词: 川芎; 高效液相色谱; 多波长叠加; 特征图谱

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2017) 09-1648-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.09.15

Preliminary study on the multi-wavelength overlapping HPLC fingerprint of Chuanxiong Rhizoma^{*}

WANG Tao^{1,2,3}, ZHANG Hui⁴, GU Xian-jie^{1,2}, YE Kun-hao^{1,2},
ZHAO Dan^{1,2}, DAI Wei^{1,2}, CHEN Jie^{1,2**}

(1. Mianyang Academy of Agricultural Sciences, Institute of Chinese Medicinal Materials, Mianyang 621023, China;
2. Chinese Materia Medica of China Agriculture Research System, Comprehensive Experimental Station of Mianyang, Mianyang 621023, China; 3. Sichuan University, West China School of Pharmacy, Chengdu 610041, China;
4. Mianyang Academy of Agricultural Sciences, Biotechnology Center, Mianyang 621023, China)

Abstract Objective: To study and establish the multi-wavelength overlapping HPLC fingerprint of Chuanxiong Rhizoma. **Methods:** The separation was performed on an Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ column (4.6 mm × 100 mm, 2.7 μm) and the mobile phase was composed of 0.1% phosphoric acid (A)–acetonitrile (B) with gradient elution (0–20 min, 10% → 32% B; 20–25 min, 32% → 46% B; 25–36 min, 46% → 55% B; 36–60 min, 55% → 80% B; 60–63 min, 80% → 10% B; 63–70 min, 10% B) at a flow rate of 0.8 mL · min⁻¹. The column

^{*} 国家中药材产业技术体系专项资金项目 (CARS-21)

^{**} 通信作者 Tel: 13508128532; E-mail: cj7055@sina.com

第一作者 Tel: 18180167006; E-mail: wangtaotjau@hotmail.com

temperature was maintained at 35 °C and the detection wavelength was set at 230, 260, 290 and 320 nm. The fingerprint was established by using of multi-wavelength overlapping technique. **Results:** The multi-wavelength overlapping HPLC fingerprint revealed information at 230, 260, 290 and 320 nm, and 22 common peaks were identified. 16 samples from different sources were with similarities all above 0.94. **Conclusion:** The multi-wavelength overlapping fingerprint of Chuanxiong Rhizoma was established boasting abundant information, which could be used in quality control of Chuanxiong Rhizoma.

Keywords: Chuanxiong Rhizoma; HPLC; multi-wavelength overlapping; characteristic chromatogram

中药川芎为伞形科(Umbelliferae)藁本属(*Ligusticum*)多年生草本植物川芎(*Ligusticum chuanxiong* Hort.)的根茎,主产于四川、云南、贵州、甘肃等地也有栽培^[1]。川芎具有活血行气、祛风止痛等功效,常用于胸痹心痛、胸胁刺痛、月经不调等的治疗^[2]。现代化学和药理研究表明,川芎的化学成分主要包括挥发油、酚酸类、生物碱类和内酯类等^[3-6]。

中药指纹图谱具有完整性、特异性和再现性的特点,已在中药质量控制和模式识别研究中得到了广泛应用^[7-8]。由于中药化学成分复杂,单波长检测下建立的指纹图谱很难全面反映化学成分的信息。多波长融合技术根据多种主要成分在不同检测波长下的最大或较大吸收绘制成若干色谱图,利用信息融合将各色谱图以最大峰面积覆盖融合,使其成为一张可以同时反映多个波长信息的图谱,该图谱信息更全面^[9-10]。基于多波长融合技术的川芎^[11]及其制剂^[12]指纹图谱研究已得到了应用,结果表明利用该技术建立的指纹图谱重复性良好,可区分药材来源,为川芎及其制剂质量控制提供了依据。但是该技术数据处理难度较大,尚未开发出专业软件,科研普及程度不高。

波长叠加技术常用于波谱学和色谱学定量分析中,其核心在于将不同检测波长下的信号值累加,用此技术所得的图谱不仅信息更加全面,而且还能与各化学成分形成良好的线性关系,为成分定量提供了条件,该技术在钨^[13]、乙醇^[14]和槲皮素^[15]等含量测定中表现良好。据此本文提出了多波长叠加指纹图谱的新方法,并在川芎分析中得到了良好的效果,该方法可为川芎的生药学研究、质量控制和评价提供科学依据。

1 试药与仪器

1.1 饮片和试剂

16个川芎购自国内各药店,具体来源见表1。为验证指纹图谱可靠性和专一性,同时随机采购2个来源的藁本和2个来源的当归作为外类群。所购药材样品均由贵州大学刘金亮副研究员鉴定,川芎为植物川芎*Ligusticum chuanxiong* Hort.的干燥根茎,藁本为植物藁本*L. sinense* Oliv.的干燥根茎和根,当归为植物当归*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels的干燥根。分析前40 °C烘干至恒重,粉碎过50目筛,保存于-20 °C的冰箱中。乙腈(色谱纯, Fisher Scientific, USA);磷酸(分析纯,成都市科龙化工试剂厂);超纯水(Millipore, USA)自制。

1.2 仪器

LC-20A高效液相色谱仪,配备DGU-20A3在线脱气机、SPD-20A紫外检测器、LC-20AB高压输液泵、CTO-10AS柱温箱和SIL-20A自动进样器(Shimadzu Corporation, Japan);KQ-300GDV恒温数控超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司);BT124s电子天平(Sartorius, Germany);中草药粉碎机(天津泰斯特仪器公司)等。安捷伦Poroshell 120 EC-C₁₈色谱柱(4.6 mm × 100 mm, 2.7 μm),安捷伦Eclipse XDB-C₁₈保护柱(4.6 mm × 12.5 mm, 5 μm)。

2 方法与结果

2.1 供试液的制备

精密称定样品0.5 g,加入70%甲醇水溶液10 mL,水浴超声(300 W、40 kHz)提取30 min,补重,摇匀,静置,上清液过0.2 μm滤膜至进样瓶。

2.2 色谱条件

色谱柱: Poroshell 120 EC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm ×

表 1 样品来源

Tab. 1 Sample Source

编号 (No.)	名称 (name)	来源 (source)
C1	川芎 (chuanxiong)	四川省雅安市, 怡仁堂大药房 (Yirentang Pharmacy, Ya'an City, Sichuan Province)
C2	川芎 (chuanxiong)	四川省成都市, 永顺堂大药房 (Yongshuntang Pharmacy, Chengdu City, Sichuan Province)
C3	川芎 (chuanxiong)	安徽亳州市, 金泉大药房 (Jinquan Pharmacy, Bozhou City, Anhui Province)
C4	川芎 (chuanxiong)	四川省成都市, 康泰药房 (Kangtai Pharmacy, Chengdu City, Sichuan Province)
C5	川芎 (chuanxiong)	甘肃省兰州市, 亚欣大药房 (Yaxin Pharmacy, Lanzhou City, Gansu Province)
C6	川芎 (chuanxiong)	四川省雅安市, 惠民堂大药房 (Huimintang Pharmacy, Ya'an City, Sichuan Province)
C7	川芎 (chuanxiong)	四川省雅安市, 百草堂大药房 (Baicaotang Pharmacy, Ya'an City, Sichuan Province)
C8	川芎 (chuanxiong)	四川省成都市, 成都中医药大学附属医院 (Affiliated Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu City, Sichuan Province)
C9	川芎 (chuanxiong)	四川省绵阳市, 太极大药房 (Taiji Pharmacy, Mianyang City, Sichuan Province)
C10	川芎 (chuanxiong)	四川省雅安市, 医药总公司 (Pharmaceutical corporation, Ya'an City, Sichuan Province)
C11	川芎 (chuanxiong)	四川省雅安市, 惠民堂大药房 (Huimintang Pharmacy, Ya'an City, Sichuan Province)
C12	川芎 (chuanxiong)	四川省绵阳市, 新宁药房 (Xinning Pharmacy, Mianyang City, Sichuan Province)
C13	川芎 (chuanxiong)	新疆乌鲁木齐市, 新特药店 (Xinte Pharmacy, Urumqi City, Xinjiang Province)
C14	川芎 (chuanxiong)	四川省乐山市, 名典药房 (Mingdian Pharmacy, Leshan City, Sichuan Province)
C15	川芎 (chuanxiong)	重庆市, 百家燕大药房 (Baijiayan Pharmacy, Chongqing City)
C16	川芎 (chuanxiong)	上海市, 晓通药房 (Xiaotong Pharmacy, Shanghai City)
G1	藁本 (ligusticum)	四川省雅安市, 惠民堂大药房 (Huimintang Pharmacy, Ya'an City, Sichuan Province)
G2	藁本 (ligusticum)	四川省雅安市, 百草堂大药房 (Baicaotang Pharmacy, Ya'an City, Sichuan Province)
D1	当归 (angelica)	四川省雅安市, 惠民堂大药房 (Huimintang Pharmacy, Ya'an City, Sichuan Province)
D2	当归 (angelica)	四川省雅安市, 百草堂大药房 (Baicaotang Pharmacy, Ya'an City, Sichuan Province)

100 mm, 2.7 μm) 接 Eclipse XDB-C₁₈ 保护柱 (4.6 mm $\times$ 12.5 mm, 5 μm)。检测波长为 230、260、290、320 nm, 总流速为 0.8 mL $\cdot$ min⁻¹, 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$ 。流动相: A 为 0.1% 磷酸水溶液, B 为乙腈。梯度洗脱程序: 0~20 min, 10% $\rightarrow$ 32% 的 B; 20~25 min, 32% $\rightarrow$ 46% 的 B; 25~36 min, 46% $\rightarrow$ 55% 的 B; 36~60 min, 55% $\rightarrow$ 80% 的 B; 60~63 min, 80% $\rightarrow$ 10% 的 B; 63~70 min, 10% 的 B。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取样品 C1 供试液, 按照上述色谱条件分析, 平行 6 次, 记录主要色谱峰的峰面积积分值, 以第 19 号共有峰为参照峰, 各共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.06%~0.25%, 相对峰面积的 RSD 为

0.85%~2.53%, 说明方法精密度良好。

2.3.2 稳定性考察 取样品 C1 供试液, 按照上述色谱条件, 分别于制样后 0、2、4、6、8、12 h 进样测定, 记录主要色谱峰的峰面积积分值, 以第 19 号共有峰为参照峰, 各共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.70%~1.61%, 相对峰面积的 RSD 为 0.36%~1.84%, 说明方法稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 取样品 C1, 按上述方法平行制备 6 份供试液并上机检测, 记录主要色谱峰的峰面积积分值, 以第 19 号共有峰为参照峰, 各共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.55%~1.18%, 相对峰面积的 RSD 为 0.74%~2.84%, 说明方法重复性良好。

2.4 多波长叠加和指纹图谱构建

分别从 Shimadzu Labsolution 色谱工作站中导出不同检测波长下的 AIA 格式数据文件;使用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版软件转换为 TXT 格式;然后利用 EXCEL2013 对 TXT 格式数据中的检测信号值进行全时段多波长叠加,指纹图谱拟合采用平均数法并另存为 TXT 格式;最后将 TXT 格式文件导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版软件作图。以样品和指纹图谱全时段的检测信号值为变量,利用 SPSS23.0 进行数据处理,斯皮尔曼相关系数表示样品与指纹图谱的相似度。对保留时间在 0~55 min 内的色谱峰进行分

析,选择稳定性和重复性好、特征明显的色谱峰为共有峰。

根据上述方法所得的样品叠加图谱在峰数量和峰面积上都有所增加,能更加全面的反应川芎化学成分(图 1-A)。利用 16 个不同来源的川芎样品叠加图谱建立指纹图谱(图 1-B),样品图谱与指纹图谱的相似度在 0.940~0.995 之间(表 2),指纹图谱共标定 22 个共有峰。同时,川芎多波长叠加指纹图谱与其同属药材藁本和近缘种药材当归的相似度较低在 0.235~0.725 之间,表明该指纹图谱具有一定的鉴别作用,可作为川芎辨伪的手段。

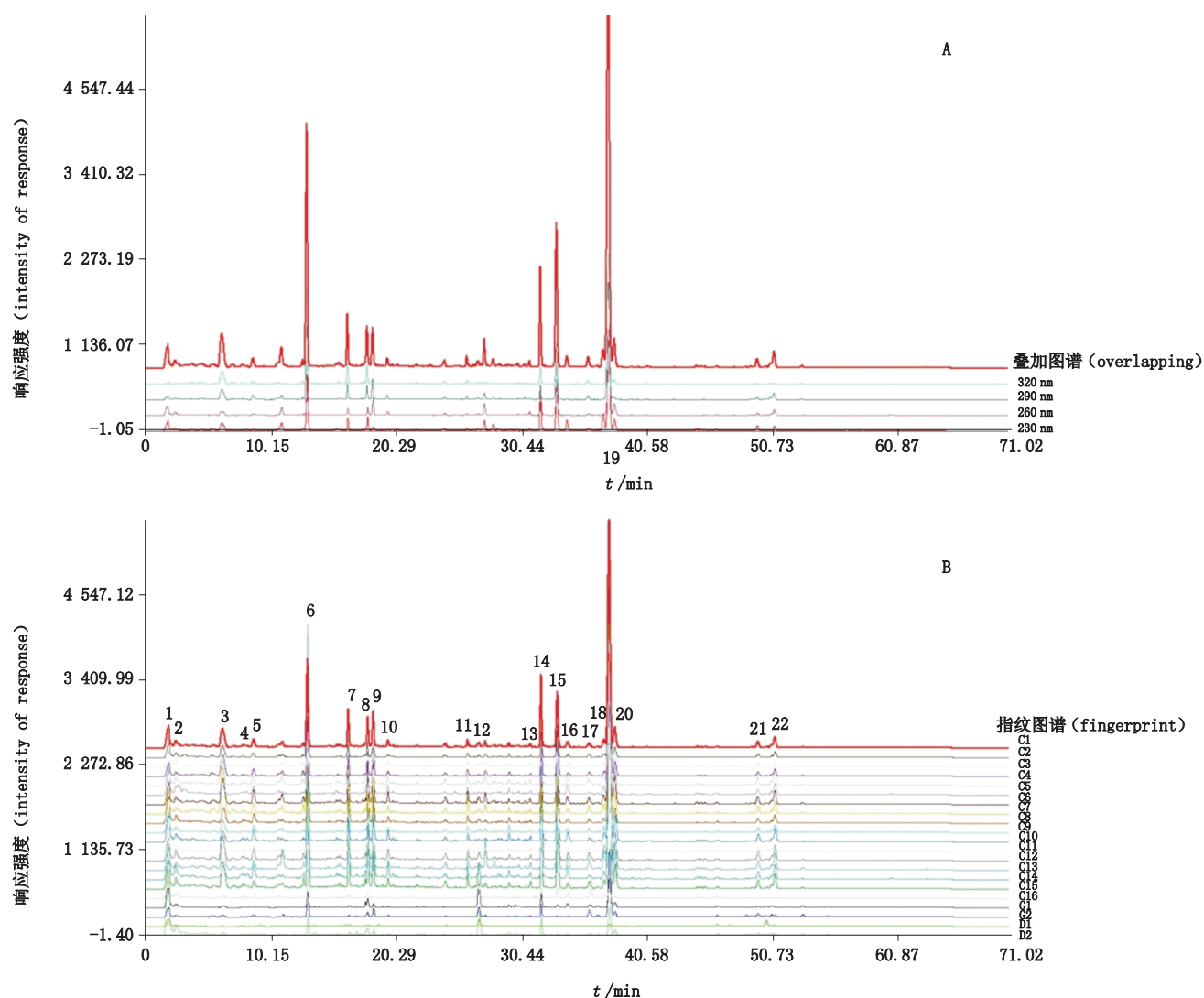


图1 样品色谱图(A)和多波长叠加指纹图谱(B)

Fig.1 HPLC chromatograms of samples (A) and multi-wavelength overlapping HPLC fingerprint (B)

表 2 样品图谱与指纹图谱的相似度

Tab. 2 Similarity evaluation result

编号 (No.)	相似度 (similarity)	编号 (No.)	相似度 (similarity)
C1	0.984	C11	0.963
C2	0.947	C12	0.949
C3	0.980	C13	0.987
C4	0.985	C14	0.953
C5	0.982	C15	0.970
C6	0.976	C16	0.940
C7	0.995	G1	0.450
C8	0.985	G2	0.725
C9	0.989	D1	0.235
C10	0.991	D2	0.436

2.5 主成分分析和聚类分析

以川芎、藁本和当归多波长叠加图谱全时段的检测信号值为原始数据,用 SPSS23.0 进行主成分分析,结果见表 3 和图 2。从表 3 可以看出前 2 个主成分特征值都大于 1,累积方差贡献率达到 93.134%,表明前 2 个主成分可以把川芎等 20 个样品化学特征的 93.134% 反映出来。图 2 为 20 个样品主成分分析得分图,结果表明样品明显集中在 2 个区域内,其中一个全部为川芎饮片样品,另一个为藁本和当归样品。也表明叠加图谱能反映川芎饮片真实的化学特征,对鉴别具有一定作用。

表 3 变量总体描述情况

Tab. 3 Overall description of variables

主成分 (PC)	特征值 (eigen values)	方差贡献率 (variance contributes)/%	累计方差贡献率 (contribution rate of accumulated variance)/%
1	17.334	82.541	82.541
2	2.225	10.593	93.134

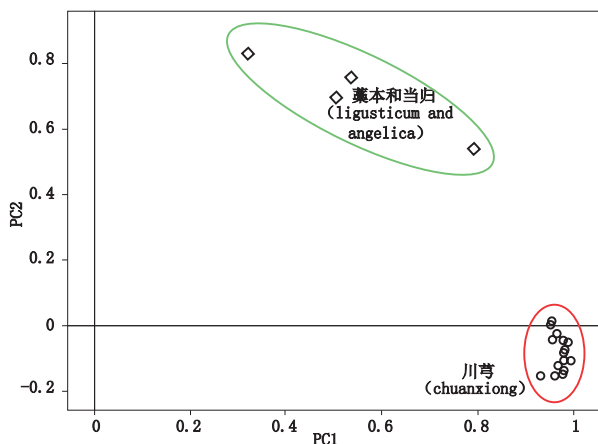


图 2 主成分分析得分图

Fig. 2 PCA score plot

以川芎多波长叠加图谱和指纹图谱 (R) 全时段的检测信号值为原始数据,导入 SPSS23.0 软件进行聚类分析。采用组间连接法,以余弦距离法作为样品间距离计算方法进行系统聚类分析,聚类结果见图 3。本结果与主成分分析结果有一致性,聚类树分成了 2 个主支,其中一支全部为川芎样品和指纹图谱,另一支为藁本和当归,川芎一支又进一步分成了若干次级分支。除四川作为川芎主产区外还有湖北、贵州、安徽、重庆等省,而本研究结果显示不同省份来源的川芎并未聚在一起,即川芎销售地与产地不一致,这也表明川芎的市场流通都是复杂多样的。

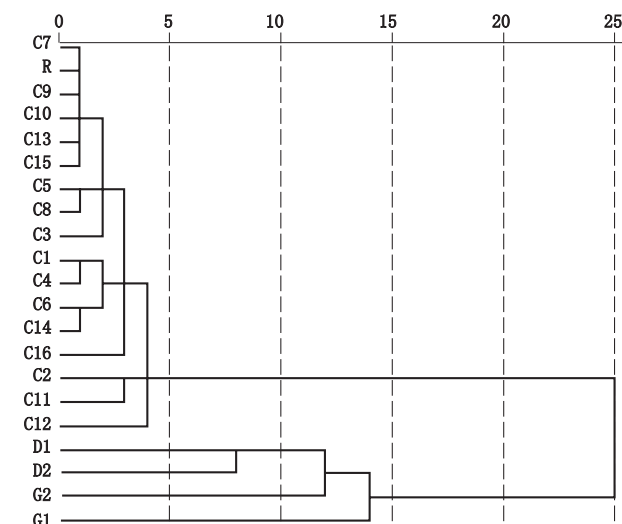


图 3 聚类分析图

Fig. 3 Cluster analysis results

3 结论

本研究利用波长叠加方法建立了川芎指纹图谱,并结合相似度分析、主成分分析和聚类分析对市售川芎进行研究,表明多波长叠加法在中药材指纹图谱的应用上是可行的、可靠的。但是由于该方法数据处理仍较繁琐,基于波长叠加技术的中药材指纹图谱专业软件亟待开发。

参考文献

- [1] 单人骅,余孟兰. 中国植物志. 第 55 卷第 2 分册 [M]. 北京: 科学出版社, 1985: 239
SHAN RH, SHE ML. Flora Reipublicae Popularis Sinica. Vol 55-2 [M]. Beijing: Science Press, 1985: 239
- [2] 中国药典 2015 版. 一部 [S]. 2015: 40
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 40
- [3] 常新亮,马云保,张雪梅,等. 川芎化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32 (15): 1533

- CHANG XL, MA YB, ZHANG XM, *et al.* Studies on chemical constituents of rhizomes of *Ligusticum chuanxiong* [J]. China J Chin Mater Med, 2007, 32(15): 1533
- [4] 杨扬, 潘勤, 丁黎, 等. QNMR 法测定川芎药材中的有效成分 [J]. 华西药杂志, 2013, 28(2): 192
- YANG Y, PAN Q, DING L, *et al.* Determination of active principles in *Ligusticum chuanxiong* by QNMR [J]. West China J Pharm Sci, 2013, 28(2): 192
- [5] 徐晓芳, 孙东东, 李祥, 等. 川芎水提部位化学成分的 UPLC-ESI-Q-TOF-MS 分析 [J]. 南京中医药大学学报, 2013, 29(4): 382
- XU XF, SUN DD, LI X, *et al.* Analysis on chemical components from water extract of *Ligusticum chuanxiong* by UPLC-ESI-TOF-MS [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2013, 29(4): 382
- [6] 田璐, 闫海霞, 傅欣彤, 等. 一测多评法同时测定川芎当归饮片中多种化学成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34(5): 848
- TIAN L, YAN HX, FU XT, *et al.* Simultaneous determination of multiple components in decoction pieces of Chuanxiong Rhizoma and Angelicae Sinensis Radix by quantitative analysis of multi-components by single maker [J]. Chin J Pharm Anal, 2014, 34(5): 848
- [7] 梁逸曾, 王兵, 曾茂茂, 等. 色谱指纹图谱与中药质量控制 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2010, 12(1): 94
- LIANG YZ, WANG B, ZENG MM, *et al.* Chemometrics and modernization of traditional Chinese medicine [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med, 2010, 12(1): 94
- [8] 吴婉莹, 果德安. 中药整体质量控制标准体系构建的思路与方法 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(3): 351
- WU WY, GUO DA. Strategies for elaboration of comprehensive quality standard system on traditional Chinese medicine [J]. China J Chin Mater Med, 2014, 39(3): 351
- [9] 刘威, 李家春, 胡军华, 等. 桂枝水提液全时段双波长融合高效液相色谱指纹图谱研究及 6 个成分定量分析 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34(6): 1043
- LIU W, LI JC, HU JH, *et al.* Study on all-time double-wavelength fusion fingerprints of water extract of Cinnamomi Ramulus and quantitative analysis of six components by HPLC [J]. Chin J Pharm Anal, 2014, 34(6): 1043
- [10] 蓝国兴, 艾克武. 信息融合技术 [N]. 计算机世界, 1997, 5: 107
- LAN GX, AI KW. Information fusion technology [N]. China Computer World, 1997, 5: 107
- [11] 孙立磊, 王帅, 包永睿, 等. 多波长覆盖融合指纹图谱评价不同产地川芎药材差异性 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016(5): 75
- SUN LL, WANG S, BAO YR, *et al.* Difference of Chuanxiong Rhizoma from different regions based on multiple wavelength coverage fusion fingerprint [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2016, 22(5): 75
- [12] 唐爽, 包永睿, 孟宪生, 等. 基于多波长覆盖融合指纹图谱的大川芎片主要成分研究 [J]. 药学研究, 2015, 34(1): 7
- TANG S, BAO YR, MENG XS, *et al.* Study on the main components of the Dachuanxiong tablets based on multiple wavelength coverage fusion fingerprint [J]. J Pharm Res, 2015, 34(1): 7
- [13] 刘根起, 韩玲, 张小玲, 等. 三波长叠加分光光度法测定微量钯的研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2004, 24(11): 1422
- LIU GQ, HAN L, ZHANG XL, *et al.* Determination of microamounts of palladium by triple-wavelength overlapping spectrophotometry [J]. Spectrosc Spectral Anal, 2004, 24(11): 1422
- [14] 罗红群, 刘绍璞. 多波长叠加近红外吸收光谱法直接测定酒精饮料中的乙醇 [J]. 分析化学, 1998, 26(1): 97
- LUO HQ, LIU SP. Direct determination of ethanol in alcohol beverages by multi-wavelength overlapping near-infrared absorption spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 1998, 26(1): 97
- [15] 尚永辉, 李华, 孙家娟. 双波长叠加法测定样品中槲皮素含量 [J]. 分析科学学报, 2011, 27(4): 495
- SHANG YH, LI H, SUN JJ. Determination of quercetin by dual-wavelength overlapping spectrophotometry [J]. J Anal Sci, 2011, 27(4): 495

(本文于 2016 年 10 月 9 日收到)