

甘松药材高效液相色谱指纹图谱及甘松新酮含量测定*

买吾兰江·买提努尔¹,董婷霞²,詹华强²,阿吉艾克拜尔·艾萨¹

(1.中国科学院新疆理化技术研究所新疆特有药用资源利用重点实验室,乌鲁木齐 830011;2.香港科技大学生命科学部暨中药研发中心,香港)

摘要 目的 研究甘松药材的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,测定甘松新酮含量,以建立药材有效的质量评价方法。**方法** 通过建立 HPLC 指纹图谱和有效成分含量测定方法,对 10 批甘松药材进行分析。HPLC 色谱条件:色谱柱为 Phenomenex-C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:乙腈-水(60:40);流速:0.8 mL·min⁻¹;检测波长:250 nm;柱温:25 ℃。指纹图谱流动相为梯度洗脱。**结果** 得到分离度、重复性很好的甘松药材 HPLC 指纹图谱,对 10 批不同甘松药材的色谱指纹图谱进行相似度评价,不同产地甘松药材指纹图谱差异不大,但 4 个代表性峰含量有所区别。HPLC-DAD 法测定 10 批甘松样品中甘松新酮的含量,结果显示不同产地甘松药材中甘松新酮含量差异较大。**结论** 该方法简便、准确、重复性好,可作为甘松药材的质量控制方法。

关键词 甘松;甘松新酮;色谱法;高效液相;质量控制;指纹图谱

中图分类号 R286;R927.1

文献标识码 B

文章编号 1004-0781(2017)11-1298-05

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.11.022

Analysis of HPLC Fingerprints and Determination of Nardosinone of *Nardostachys Radix et Rhizoma* from *Nardostachys jatamansi* DC

MAIWULANJIANG Maitinuer¹, DONG Tingxia², ZHAN Huaqiang², HAJIAKBER Aisa¹ (1. Key Laboratory of Plant Resources and Chemistry of Arid Zone, Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China; 2. Division of Life Science and Centre for Chinese Medicine, the Hongkong University of Science and Technology, Hongkong, China)

ABSTRACT Objective To establish a method for quality evaluation of *Nardostachys Radix et Rhizoma* derived from *Nardostachys jatamansi* DC by determining the contents of nardosinone and establishing fingerprints. **Methods** HPLC fingerprint and content determination methods were established to evaluate ten batches of *Nardostachys Radix et Rhizoma* from *Nardostachys jatamansi* DC. For the determination of nardosinone, the samples were separated by Phenomenex-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with the mobile phase consisting of acetonitrile and water at the flow rate of 0.8 mL·min⁻¹, the detection wavelength was set at 250 nm, and column temperature was 25 ℃. The gradient mobile phase system was used for the fingerprints.

Results HPLC fingerprint of *Nardostachys Radix et Rhizoma* was established with good chromatography separation and repeatability, which could be used for quality control of *Nardostachys Radix et Rhizoma*. After similarity analysis, the results showed that there was no significantly difference between the HPLC fingerprints of samples from different origins, but the content of four major peaks were different. The amount of nardosinone from ten batches of *Nardostachys Radix et Rhizoma* was determined by HPLC-DAD, which showed that the contents of nardosinone from *Nardostachys jatamansi* DC were obviously different with each other. **Conclusion** The method is sensitive, repeatable and accurate. It can be used as a method of quality control for *Nardostachys Radix et Rhizoma*.

KEY WORDS *Nardostachys Radix et Rhizoma*; Nardosinone; Chromatography, high performance liquid; Quality control; Fingerprint

甘松为败酱科植物甘松(*Nardostachys jatamansi*

收稿日期 2016-09-03 修回日期 2016-10-15

基金项目 * 新疆理化技术研究所所长基金资助项目 (2015KY002)

作者简介 买吾兰江·买提努尔(1984-),男,维吾尔族,新疆和田人,副研究员,博士,主要从事中药、民族药质量标准研究。电话:0991-6631740,3838931, E-mail: mavlanjan@ms.xjb.ac.cn。

通信作者 阿吉艾克拜尔·艾萨,研究员,博士,研究方向:有机化学、民族药学。电话:0991-3835679,3838931, E-mail: haji@ms.xjb.ac.cn。

DC.)的干燥根及根茎。性温,味甘、辛,归脾胃经。具有理气止痛、开郁醒脾、安神等功效^[1],药用历史非常悠久,为中医、维吾尔医和藏医的常用药。藏药译名“榜贝”,维吾尔药译名为“松补力”。甘松主要分布在我国甘肃、青海、四川、西藏等高海拔地区,主产地为四川阿坝、红原、若尔盖等地区^[2]。挥发油是芳香性植物主要活性成分之一,并具有抗肿瘤、抗菌和神经活性等^[3-4]。甘松主要成分是挥发油和萜类^[5-9],研究表明,甘松挥发油具有镇静、抗癫痫、抗抑郁、促神经生长、改善认识能力、保护心肌细胞、降血压等多种药理活性^[10-14]。由于各产地地理环境、气候、土壤等生长

条件不同,以及采收药材时间不同,甘松药材在化学成分组成及含量上差异很大,因而直接影响到药材质量。因此,建立甘松药材质量评价体系,控制其质量,对于甘松在中医和维吾尔医安全应用具有重大意义。笔者在本研究采用高效液相色谱(HPLC)法对 10 个不同产地甘松进行系统研究,建立了甘松药材的色谱指纹图谱,并对甘松中甘松新酮进行含量测定,以期为甘松药材全面质量控制提供科学依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器 美国 Agilent 高效液相色谱仪(Agilent Technologies 1200 series,DAD 检测器);SB5200 型超声波清洗机(上海 Branson 公司);R200D 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司,感量:0.01 mg)。

1.2 试药 甘松新酮对照品购自中国食品药品检定研究院,高效液相色谱法检测,确定纯度大于 98%,批号:111832-201302。甘松药材,4 批购自香港药材市场,6 批分别采自青海、四川等地,所有样品均经香港科技大学生命科学部暨中药研发中心董婷霞博士鉴定,均为败酱科植物甘松(*Nardostachys jatamansi* DC.)的干燥根及根茎(表 1)。所有样品均保存于香港科技大学生命科学部。色谱级乙腈(Merck 公司,批号:1.00030.4008),Mill-Q 超纯水(Millipore 公司纯水器),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 甘松指纹图谱

2.1.1 对照品溶液的制备 取甘松新酮对照品适量,加甲醇制成 1.0 mg·mL⁻¹对照品储备液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取待测样品细粉约 1.0 g,精密称定,置 50 mL 离心管,加甲醇 15 mL,超声处理 30 min(240 W),提取 3 次;取出,移至离心管于 3 000 r·min⁻¹离心 10 min(*r*=10 cm)后,将上清液转移至 50 mL 量瓶,合并提取液,然后用甲醇定容至 50 mL,

摇匀,过孔径 0.45 μm 滤膜,滤液作为供试品溶液。

2.1.3 色谱条件 色谱柱为 Phenomenex C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相为乙腈(A)和水溶液(B);梯度洗脱:0~20 min,40%→60% A,20~60 min,60%→90% A;流速:0.8 mL·min⁻¹;柱温:25 ℃;进样量:20 μL;指纹图谱检测波长为 250 nm。

2.1.4 甘松指纹图谱实验的方法学验证

①精密度实验:取供试品溶液(产自青海玉树,批号:GSS-006),连续进样 6 次,测得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均<2%,表明精密度良好,符合指纹图谱的技术要求。

②稳定性实验:取供试品溶液(产自青海玉树,批号:GSS-006),分别在 0,4,8,12,16,20,24 h 进样,测得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 2%,表明稳定性良好,符合指纹图谱的技术要求。

③重复性实验:取同一批甘松样品(产自青海玉树,批号:GSS-006),精密称量 6 份,按“2.1.2”项制备供试品溶液,记录色谱图进行分析。结果测得各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 2%,而相对峰面积的 RSD 均小于 5%,表明重复性良好,符合指纹图谱的技术要求。

2.1.5 甘松 HPLC 指纹图谱的测定与分析

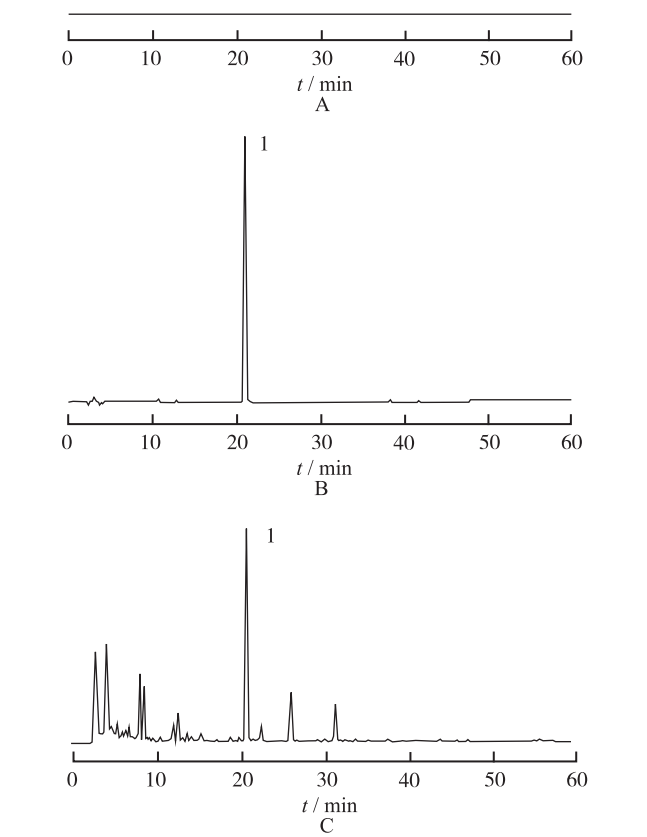
①样品指纹图谱测定:对来自 10 个产地的甘松样品进行测定,对照品和具代表性甘松药材的色谱图见图 1。比较 10 个甘松样本的色谱图,产地间的差别并不明显。虽然 10 批甘松药材都含有甘松新酮,但它们的量有所区分(图 2)。

②指纹图谱的相似度计算:采用国家药典委员会推荐的中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版对 10 批甘松药材的指纹图谱进行相似度分析。首先将各批次样品的测试数据导入相似性评价系统软件,选定图 2 中特征峰(峰 1,2,3,4)进行谱峰匹配,通过中位数矢量计算得出其共有图谱标准模板,然后进行各样品相似度

表 1 甘松样品来源
Tab.1 Sources of *Nardostachys jatamansi* DC.Samples

编号	样品批号	来源	采收(收集)时间	鉴定结果
1	GSC -001	香港黄泽记药材公司(产地四川)	201510	<i>Nardostachys jatamansi</i> DC.
2	GSC -002	香港永利行药材公司(产地四川)	201510	<i>Nardostachys jatamansi</i> DC.
3	GSC -003	香港曾福记药材公司(产地四川)	201509	<i>Nardostachys jatamansi</i> DC.
4	GSC -004	香港细庄药材公司(产地四川)	201510	<i>Nardostachys jatamansi</i> DC.
5	GSS -001	四川松潘	20151014	<i>Nardostachys jatamansi</i> DC.
6	GSS -002	四川阿坝	20151023	<i>Nardostachys jatamansi</i> DC.
7	GSS -003	四川红原	20151012	<i>Nardostachys jatamansi</i> DC.
8	GSS -004	四川南本达	20151006	<i>Nardostachys jatamansi</i> DC.
9	GSS -005	四川若尔盖	20151028	<i>Nardostachys jatamansi</i> DC.
10	GSS -006	青海玉树	20150926	<i>Nardostachys jatamansi</i> DC.

评价。通过相似度分析,发现甘松有些批次种间的图谱差异较大,GSS-004(产地:四川南本达)批药材的相似度比较低。10批甘松药材的相似度评价结果见表2。从表2可以看出,10批甘松的平均相似度为0.83,说明各产地的甘松样品色谱模式相似,其化学成分一致性好。



A.空白液;B.甘松新酮对照品;C.甘松(批号:GSS-006);1.甘松新酮

图1 空白液、对照品和代表性甘松(批号:GSS-006) HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of blank solution and nardosinone reference, *Nardostachys jatamansi* DC. (GSS-006)

A. blank (Methanol) solution; B. nardosinone reference; C. *Nardostachys jatamansi* DC. (GSS-006); 1. nardosinone

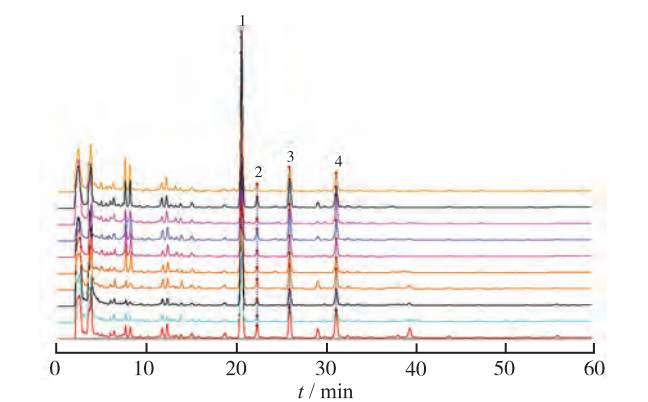
2.2 甘松新酮含量测定

2.2.1 供试品溶液的制备 取待测样品细粉约0.2 g,用甲醇提取,按“2.1.2”项方法制备供试品溶液。

2.2.2 色谱条件 Phenomenex C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);甘松新酮的流动相为乙腈-水(60:40);检测波长为250 nm;柱温:25℃;流速:0.8 mL·min⁻¹;进样量:20 μL。

2.2.3 线性关系考察 精密吸取“2.1.1”项对照品储备液,用甲醇稀释成6个浓度的甘松新酮对照品溶液,依上述色谱条件进样测定,以峰面积为纵坐标(Y),相

应浓度为横坐标(X,g·mL⁻¹),绘制标准曲线,得到回归方程:甘松新酮, $Y=38.576X-32.456,R^2=0.9994$;表明甘松新酮在5~100 g·mL⁻¹内线性关系良好。



1,2,3,4 为 10 批甘松样品指纹图谱共有峰;1.甘松新酮

图2 10 批甘松样品的叠加图谱

The peaks 1, 2, 3 and 4 were common peaks of fingerprints of *Nardostachys jatamansi* DC.; 1. Nardosinone

Fig.2 Overlapping HPLC of ten batches of *Nardostachys jatamansi* DC.

表2 10 批甘松样品指纹图谱相似度分析结果
Tab.2 Similarity analysis on the fingerprint of ten batches of *Nardostachys jatamansi* DC.

编号	样品批号	来源	相似度
1	GSC -001	香港黄泽记药材公司(产地四川)	0.942
2	GSC -002	香港永利行药材公司(产地四川)	0.852
3	GSC -003	香港曾福记药材公司(产地四川)	0.743
4	GSC -004	香港细庄药材公司(产地四川)	0.913
5	GSS -001	四川松潘	0.846
6	GSS -002	四川阿坝	0.804
7	GSS -003	四川红原	0.913
8	GSS -004	四川南本达	0.602
9	GSS -005	四川若尔盖	0.888
10	GSS -006	青海玉树	0.786

2.2.4 含量测定实验的方法学验证

①精密度实验:取对照品溶液,连续进样6次,测得甘松新酮峰面积RSD为0.82%,表明精密度良好。

②稳定性实验:取供试品溶液甘松GSS-006样品(用于计算甘松新酮含量),分别在0,4,8,12,16,20,24 h进样,记录甘松新酮的峰面积,结果RSD为1.61%,表明样品溶液在24 h内稳定。

③重复性实验:精密称取甘松GSS-006样品(用于计算甘松新酮含量)6份,按“2.2.1”项方法制备供试品

溶液,测定甘松新酮的含量,其 RSD 为 1.13%,表明此方法的重复性良好。

④加样回收率实验:精密称取同一批甘松药材粉末(批号:GSS-006)9 份,每份约 0.2 g,分别按低、中、高浓度加入对照品,按“2.1.2”项方法制备供试品溶液,测定甘松新酮的含量,计算回收率。结果见表 3,甘松新酮平均加样回收率符合 HPLC 的测定要求。

表 3 甘松新酮加样回收率实验结果

Tab.3 Results of recovery test of nardosinone								
称样量	原有量	加入量	测得量	加样回收率	平均值	RSD		
mg				%				
202.1	0.946 4	0.95	1.874 7	97.72	98.46	0.96		
200.3	0.949 8	0.95	1.882 1	98.14				
201.3	0.938 1	0.95	1.883 5	99.52				
200.9	0.952 4	1.90	2.840 1	99.35				
201.1	0.953 6	1.90	2.828 3	98.67				
201.8	0.948 0	1.90	2.843 4	99.76	99.26	0.56		
200.4	0.948 4	2.85	3.744 8	98.12				
202.1	0.948 1	2.85	3.749 2	98.28				
201.4	0.950 1	2.85	3.766 3	98.81				
				98.40				
				0.37				

2.2.5 甘松中甘松新酮的含量测定 对 10 批甘松样品,按供试品溶液制备项下方法制备样品溶液,按上述色谱条件分别在 250 nm 波长下测定甘松新酮的峰面积,根据其线性回归方程,计算甘松新酮的含量。结果见表 4。从结果可以看出,不同产地的甘松药材中甘松新酮含量介于 2.57~13.23 mg · g⁻¹。从表 4 中可以看出,不同甘松药材甘松新酮成分含量变化趋势明显不同。

表 4 10 批甘松样品甘松新酮的含量

Tab.4 Results of content determination of nardosinone in ten batches of <i>Nardostachys jatamansi</i> DC.			
编号	样品编号	来源	甘松新酮含量/ (mg · g ⁻¹)
1	GSC -001	黄泽记药材公司(产地四川)	13.23
2	GSC -002	永利行药材公司(产地四川)	4.63
3	GSC -003	曾福记药材公司(产地四川)	6.56
4	GSC -004	细庄药材行药材公司(产地四川)	10.61
5	GSS -001	四川松潘	3.25
6	GSS -002	四川阿坝	3.52
7	GSS -003	四川红原	8.44
8	GSS -004	四川南本达	2.57
9	GSS -005	四川若尔盖	7.40
10	GSS -006	青海玉树	4.70

3 讨论

根据对甘松化学成分的研究,甘松中含有萜类、黄

酮类、香豆素等化合物,其主要成分是萜类成分。甘松新酮是其中的一个萜类化合物,同属的其他植物尚未见到有甘松新酮的报道,因此可作为甘松药材的专属性化合物。并且其有促进神经生长、改善认知能力等生物活性,与其功效密切相关。

从表 4 可知,不同批次甘松药材中甘松新酮含量差异明显,10 批甘松药材中含量最高是从香港黄泽记药材公司购买的 GSC-001,产地为四川。由此可见,产地对甘松药材的质量影响大。

为了更加全面评价甘松药材的质量,笔者还进行了甘松药材的指纹图谱研究。首次将甘松新酮作为甘松指纹图谱的指标加以研究。采用平行实验考察以不同的提取溶剂(甲醇、乙醇、石油醚、丙酮、乙酸乙酯)超声提取。结果表明用甲醇提取的供试品溶液的色谱峰及分离度均优于其他有机溶剂提取的供试品。在比较不同波长(210,250,280,310,360 nm)时,发现甘松新酮在 250 nm 有最高吸收,且干扰峰少,同时其他代表性的色谱峰也可获得良好的分离效果。本实验研究的方法专属、操作简便、结果可靠、重复性好。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[M].北京:中国医药科技出版社,2015:86-87.

[2] 谢宗万.中药材品种论述(上册)[M].上海:上海科学技术出版社,1963:159-160.

[3] 廖泽勇,韦玮.竹柏果皮和果壳中挥发油成分及其抗肿瘤活性研究[J].医药导报,2015,34(5):609-612.

[4] 公衍玲,王宏波,金宏.郁金挥发油提取工艺及其抑菌活性研究[J].医药导报,2009,28(2):170-172.

[5] 韩泳平,向永臣,肖丹,等.甘松挥发性化学成分的研究[J].成都中医药大学学报,1999,22(3):43-44.

[6] ZHANG Y,LU Y,ZHANG L,et al.Terpenoids from the roots and rhizomes of *Nardostachys chinensis* [J].Nat Prod, 2005,68(7):1131-1133.

[7] TANITSU M A,TAKAYA Y,AKASAKA M,et al. Guaiane- and aristolane-type sesquiterpenoids of *Nardostachys chinensis* roots [J].Phytochemistry,2002,59(8):845-849.

[8] 罗仕德,张起凤.甘松醛:一个新的倍半萜过氧化物[J].天然产物研究与开发,1997,9(4):7-9.

[9] 张毅,徐丽珍,杨世林.甘松化学成分的研究[J].中草药,2006,37(2):181-183.

[10] 张文衡,陈虎彪.甘松属植物化学和药理学研究进展[J].中国野生植物资源,1999,18(3):11-14.

[11] LI P,MATSUNAGA K,YAMAMOTO K,et al.Nardosinone, a novel enhancer of nerve growth factor in neurite outgrowth from PC12D cells[J].Neurosci Lett,1999,273(1):53-56.

[12] LI P,YAMAKUNI T,MATSUNAGA K,et al. Nardosinone enhances nerve growth factor induced neurite outgrowth in a mitogen-activated protein kinase and protein kinase C-