

生长时期施肥种类对柴胡 HPLC 指纹图谱影响分析

刘伟, 范婷(河南中医学院 分析测试中心, 郑州 450008)

摘要: 目的 建立柴胡 HPLC-PDA 指纹图谱分析方法。方法 采用高效液相色谱法, 色谱柱为 SunFire™C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1%磷酸梯度洗脱, 检测波长为 210 nm, 柱温 30 ℃。结果 建立了柴胡的 HPLC-PDA 指纹图谱, 确定了 15 个共有峰, 不同施肥柴胡样品指纹图谱与对照指纹图谱相似度均在 0.90 以上, 可以用于柴胡药材的定性鉴别。结论 此方法简单、准确、重复性好, 为柴胡的质量控制提供了有效的方法。

关键词: 柴胡; 高效液相色谱法; 指纹图谱

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2009)07-0553-03

Effect of HPLC Fingerprint of Radix Bupleuri with Different Fertilizers at Different Growth Stages

LIU Wei, FAN Ting(Center of Analysis and Measurement, Henan College of TCM, Zhengzhou 450008, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method of fingerprint analysis on *Radix Bupleuri* by HPLC-PDA. **METHODS** The HPLC method was used with a SunFire™ C₁₈ column (250 m × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid and the detective wavelength was set at 210 nm with the column temperature of 30 ℃. **RESULTS** Establishing the fingerprint of *Radix Bupleuri*, 15 common peaks were found in the HPLC fingerprint of *Radix Bupleuri* and good similarities with correlation coefficients higher than 0.90 were found in fingerprints between the herbs and standard fingerprint, which can be utilized for the identification of *Radix Bupleuri*. **CONCLUSION** The method is accurate, simple, and could be used for quality control of *Radix Bupleuri*.

KEY WORDS: *Radix Bupleuri*; HPLC; fingerprint

柴胡为伞形科植物柴胡 *Bupleurum Chinese DC.* 的干燥根, 是临床及制剂常用中药, 具有和解表里, 疏肝, 升阳之功效, 用于感冒发热, 寒热往来等症。柴胡的供应长期以来主要依赖于野生资源, 但过度的采挖、保护措施的缺乏, 导致柴胡野生资源严重匮乏, 因此栽种人工柴胡成为大势所趋。但在种植柴胡实施过程中由于技术力量薄弱, 药农对 GAP 要求知之甚少, 管理粗放等因素, 使得提高种植柴胡的质量成为目前亟待研究的课题, 本试验采用 HPLC-PDA 比较不同施肥柴胡指纹图谱的变化以及差别, 考察不同生长期的施肥方法对其质量的影响, 作为优选柴胡施肥方案的参考指标^[1-2]。

1 仪器与试剂

Dionex Summit 高效液相色谱仪(美国戴安公司); METTLER AE240 电子分析天平(德国梅特勒-托利多公司); BS210S 型电子天平(北京赛多利斯天平公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山

市超声仪器有限公司)。

柴胡皂苷 a 对照品(批号: 110777-200303, 中国药品生物制品检定所); 柴胡皂苷 d (批号: 111778-200402, 中国药品生物制品检定所); 乙腈为色谱纯; 水为双蒸水; 其余所用试剂均为分析纯。样品种类: m1, m2, m4, m5, m6, m7, mk, mi1, mi2, mi3, mi4, mi5, mi6, mi7, b1, b2, b3, b4, b5, b6, b7, bk, bi1, bi2, bi3, bi4, bi5, bi6, bi7, s1, s2, s3, s4, s5, s6, s7, sk, si1, si2, si3, si4, si5, si6, si7。注: 苗期用 m 表示, 苗期重复施肥用 mi 表示; 拔节期用 b 表示, 拔节期重复施肥用 bi 表示; 三期同施用 s 表示, 三期重复施肥用 si 表示; 1, 2, 3... 分别代表施肥种类: N、P、K、NP、NK、PK、NPK; k 为空白对照。试验所用柴胡样品采自: 河南省洛阳市嵩县顺势药业柴胡种植基地, 以上样品经河南中医学院药学院董诚明副教授鉴定为柴胡 *Bupleurum*

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAI06A10-1)

作者简介: 刘伟, 男, 教授 Tel: (0371)65575838 E-mail: hnliuwei2088@sina.com

Chinese DC.的干燥根。

2 色谱条件

色谱柱: SunFire™ C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 记录时间: 110 min; 柱温: 30 °C; 检测波长: 210 nm; 流动相: 按表 1 梯度洗脱。

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Composition and gradient of the mobile phases

时间 /min	流速 / mL·min ⁻¹	B/(%乙腈)	A/(0.1%磷酸水溶液)
0	0.3	15	85
20	0.3	15	85
23	1	15	85
65	1	35	65
66	0.7	35	65
69	0.7	39	61
110	0.7	46	54

3 溶液制备

3.1 供试品溶液

取各柴胡干燥样品, 粉碎, 过 40 目筛, 在分别取不同施肥柴胡样品粉末各 1 g, 精密称定, 精密加入甲醇 30 mL, 超声提取 1 h(功率: 500 W, 频率: 40 kHz), 滤过, 用 10 mL 甲醇洗涤滤渣, 合并滤液并蒸干, 残渣加 10 mL 水溶解, 用水饱和和正丁醇振摇提取 3 次, 每次 10 mL, 合并正丁醇液并蒸干, 用甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中, 定容, 摇匀, 经微孔滤膜过滤器(0.45 μm)过滤, 作为供试品溶液。

3.2 对照品溶液

分别精密称取柴胡皂苷 a 对照品 1.46 mg, 柴胡皂苷 d 对照品 1.78 mg 分别置于 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 作为对照品溶液。

4 方法学考察

4.1 仪器精密度试验

精密吸取同一供试品溶液在相同色谱条件下连续进样 6 次, 采用国家药典委员会指纹图谱评价软件计算出相似度均在 0.99 以上, 共有峰的相对保留时间 RSD 值小于 1%, 相对峰面积 RSD 值小于 4%, 符合指纹图谱要求。

4.2 稳定性试验

取同一批供试品溶液, 在相同的条件下分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 测定结果, 采用国家药典委员会指纹图谱评价软件计算出相似度均在 0.99 以上, 共有峰的相对保留时间 RSD 值小于 1%, 相对峰面积 RSD 值小于 4%, 符合指纹图谱要求。

4.3 重复性试验

取同一批样品, 在相同条件下分别称取 6 份,

按照“3.1”项下方法制备, 在“2”项下色谱条件测定, 采用国家药典委员会指纹图谱评价软件计算出相似度均在 0.99 以上, 共有峰的相对保留时间 RSD 值小于 1%, 相对峰面积 RSD 值小于 4%, 表明整个试验的重复性良好。

5 指纹图谱的建立

取“3.1”项下制备好的供试品溶液, 精密吸取 8 μL 进样, 其中 13 号色谱峰为柴胡皂苷 a, 以它作为参照标示出不同施肥柴胡的 PDA 指纹图谱中 15 个共有峰作为可以构成指纹图谱稳定的特征峰, 样品色谱图见图 1, 将所得到的色谱图数据导入国家药典委员会指纹图谱评价系统, 1、2、3、9、10、11 号共有峰作为 marker 峰, 进行色谱峰匹配, 结果见图 2。44 批柴胡药材与对照指纹图谱相似度计算结果分别为: 0.963、0.943、0.978、0.940、0.900、0.912、0.933、0.963、0.966、0.939、0.958、0.938、0.970、0.902、0.907、0.976、0.964、0.964、0.984、0.915、0.986、0.949、0.908、0.911、0.987、0.981、0.974、0.921、0.981、0.976、0.963、0.970、0.988、0.989、0.966、0.905、0.964、0.922、0.981、0.912、0.957、0.955、0.907、0.976。

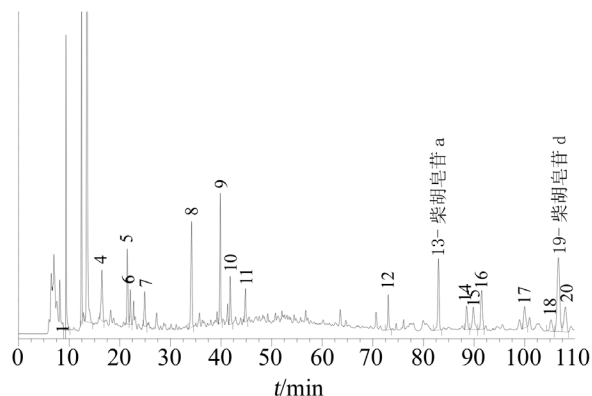


图 1 柴胡样品(m₁ 样品)HPLC-PDA 指纹图谱

Fig 1 HPLC-PDA fingerprint of Radix Bupleuri.(m₁)

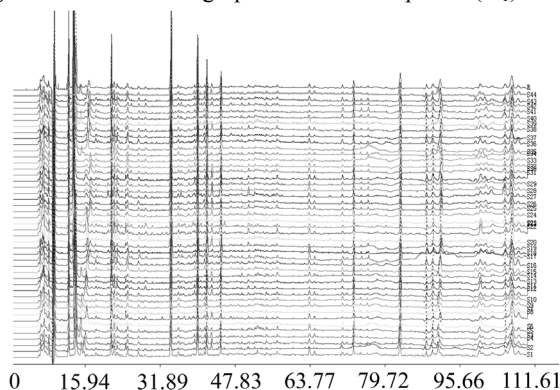


图 2 44 批样品的 HPLC-PDA 匹配色谱图

Fig 2 Matched chromatograms of 44 patches of sample

6 讨论

6.1 流动相的确定

本试验曾经选用多种流动相梯度洗脱。首先选用了甲醇-水不同比例的梯度洗脱,但是各组分分离效果均不理想而且基线飘移过大;后改用乙腈-水作为流动相,不同比例进行梯度洗脱,发现总体效果改善,但是还有个别组分分离度不够好,后在水中加入 0.1%的磷酸分离度有了进一步改善,最后确定流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液梯度洗脱。

6.2 检测波长的选择

本试验采用 PDA 检测器,在 200~400 nm 下采集其三维图谱,通过查看三维色谱图在所有波长下的峰数的多少、各组分分离的情况、各色谱峰的丰度,最后选定检测波长为 210 nm。

6.3 提取溶剂的考察

本试验曾采用甲醇、5%氨水甲醇、无水乙醇、95%乙醇作为提取溶剂,结果发现无水乙醇、95%乙醇作为提取溶剂所得的供试品溶液峰数相对较少;5%氨水甲醇作为溶剂的样品溶液所得的供试品溶液虽然使柴胡皂苷 a、d 的提取效率增高,但是在一定程度上抑制了其他组分的提取效率;而甲醇作为提取溶剂特征性明显、各组分分离的情况良好、各色谱峰的丰度适中,而且操作简单,因此决定采用甲醇作为提取溶剂。

6.4 提取方法的考察

本试验曾采用甲醇作为提取溶剂用超声波振

荡提取法和水浴加热回流提取法,发现两种提取方法所得图谱无明显差别。但是超声得到的图谱基线相对平稳一些,加之超声提取法操作简便,因此采用超声波振荡提取法。

6.5 柴胡指纹图谱的专属性

从不同施肥柴胡药材的 PDA 叠加对比图以及国家药典委员会指纹图谱评价软件整体观察发现:不同施肥柴胡指纹图谱的整体面貌具有一致性,各样品共有峰的相对保留时间严格一致,其相对保留时间的 RSD 值均小于 3%,说明不同施肥柴胡药材的化学组成一致性较好,不同施肥方法不会使柴胡化学成分发生变化。但从各样品共有峰的相对峰面积看却有较大差别,表明不同施肥方法对其化学成分的含量有较大影响,即对质量影响大。因此可用指纹图谱的方法,结合不同施肥柴胡药效成分含量的高低,来优选最佳施肥方法以控制柴胡质量。

REFERENCES

- [1] YU J D, YANG Q, WANG G L, et al. Determination of saikosaponins in saiko medicinal materials by HPLC and the study on fingerprint of sapon-ins [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med(中国中医药信息杂志), 2004, 11(2): 137-138.
- [2] XIAO R, WANG C Y, ZHANG Z F, et al. Studies on fingerprints of Bupleurum chinense from Hebei province with HPLC-UV [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2006, 29(2): 119-123.

收稿日期: 2008-06-16

含绿原酸的清热解毒类中药注射剂不良反应及其机理探讨

李钦, 张信岳, 陈国神* (浙江省医学科学院, 杭州 310013)

摘要: 目的 对 3 种含绿原酸的清热解毒类中药注射剂不良反应进行探讨。方法 收集国内外公开发表的有关报道, 对其不良反应进行归纳、分析、总结。结果 3 种中药注射剂均含有绿原酸成分, 但是绿原酸是否为致敏原, 以及所引起的不良反应是过敏反应还是类过敏反应, 学术界尚存在不同的看法。结论 正确评价绿原酸在中药注射剂不良反应中的地位并予以合理使用, 以及进一步区分过敏反应和类过敏反应是目前亟待解决的问题。

关键词: 绿原酸; 双黄连注射剂; 清开灵注射液; 鱼腥草注射液; 不良反应

中图分类号: R994.11

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2009)07-0555-04

Adverse Effect and Mechanism of Chlorogenic Acid in Clearing Heat and Detoxication Traditional Chinese Medicine Injections

作者简介: 李钦, 女, 硕士生, 研究实习员 Tel: (0571)88215600 E-mail: qindai_1981@sohu.com *通信作者: 陈国神, 男, 研究员
Tel: (0571) 88861093 E-mail: immtddscgs@ 163.com