

不同产地柴胡药材 GC-MS 指纹图谱研究

肖蓉^{1,2}, 张志斐¹, 韩学静³, 李德强¹, 张兰桐^{1*}

(1. 河北医科大学药学院 药物分析教研室, 河北 石家庄 050017; 2. 北京联合伟华药业有限公司, 北京 100176; 3. 河北省药品检验所, 河北 石家庄 050011)

摘要:目的 对不同产地柴胡药材的挥发油成分进行 GC-MS 指纹图谱比较研究。方法 利用 GC 色谱指纹图谱的方法, 以道地产区河北省主产的 7 批北柴胡药材为基准, 对比不同产地柴胡药材的色谱指纹图谱。色谱条件: HP-1 非极性柱, 进样口温度 250 ℃, 检测器(FID)温度 270 ℃, 程序升温 50~270 ℃, 体积流量为 0.9 mL/min, 分流比为 10:1。质谱条件: 电离方式为 EI, 离子源温度 300 ℃, 电子能量 70 eV。结果 从 7 批道地产区柴胡药材挥发油 GC 指纹图谱中提取 19 个共有峰, 用质谱分析鉴定出其成分, 并对不同产地药材进行相似度的比较。结论 柴胡挥发油气相色谱指纹图谱中各成分均得到了较好的分离, 可作为柴胡药材质量评价的专属性的指纹图谱, 并以此评价不同产地柴胡的品质。

关键词:柴胡药材; 挥发油; 气质联用; 指纹图谱

中图分类号: R282.7

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2006)08-1248-05

GC-MS Fingerprints of *Radix Bupleuri* from various habitatsXIAO Rong^{1,2}, ZHANG Zhi-fei¹, HAN Xue-jing³, LI De-qiang¹, ZHANG Lan-tong¹

(1. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. Beijing United-Wealth Medicament Limited Company, Beijing 100176, China; 3. Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract: Objective To apply GC-MS fingerprint to the comparison of volatile oils in *Radix Bupleuri* collected from different habitats. **Methods** The samples from various habitats were compared by application of GC fingerprinting. GC Methods were optimized in order to get high quality GC profile. The GC system consisted of Agilent 6890 and FID. The analysis was performed on an HP-1 column. The temperatures of sample vent and FID were 250 ℃ and 270 ℃, respectively. The column temperature was sequentially elevated from 50 ℃ to 270 ℃ at 3.5 ℃/min. The carrier gas was N₂, and its flow rate was 0.9 mL/min. The refractive ratio of distillation was 10:1. MS condition: ionization mode was EI; source temperature was 300 ℃, and electron energy was 70 eV. **Results** The GC fingerprints were established and the 19 common peaks were found and identified with GC-MS in volatile oil of seven batches of *Radix Bupleuri*. The comparison on similarity degree of the crude drugs from various habitats has been carried on. **Conclusion** A good fingerprint of *Radix Bupleuri* has been described. The method is simple and accurate with good reproducibility. The GC fingerprinting with specificity can be applied to estimate and control the quality of *Radix Bupleuri*.

Key words: *Radix Bupleuri*; volatile oil; GC-MS; fingerprints

柴胡为伞形科柴胡属植物的干燥根, 具有解表和里、舒肝解郁、升提中气之功能, 其主要有效成分为挥发油、皂苷等, 为中医治疗少阳症的首选要药, 是河北道地药材之一。《中国药典》2005 年版仅规定北柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 和狭叶柴胡 *B. scorzonifolium* Willd. (习称南柴胡、红柴胡) 为正品。然而由于我国柴胡属植物品种众多, 除海南外,

全国各地均有分布^[1], 且以当地所产柴胡作为习惯用药的现象较为普遍, 这就导致了柴胡及其制剂质量的不稳定性, 从而影响其疗效。柴胡属植物的根多含有挥发油, 药理学研究表明柴胡挥发油具有解热、抗炎、抗肝损伤等作用, 在临床广泛应用于外感发热, 柴胡注射液就有较好的退热、解表效果^[2], 文献报道的柴胡挥发油成分分析较多, 但目前还未有系

收稿日期: 2005-12-10

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目(303453)

作者简介: 肖蓉(1980—), 女, 湖北麻城人, 河北医科大学药学院硕士研究生, 主要从事中药开发与指纹图谱研究。

E-mail: xr2000_80@163.com

* 通讯作者 张兰桐 Tel: (0311) 86266419 E-mail: zhanglantong@263.net

统、全面的挥发油指纹图谱的报道。本研究对不同产地柴胡药材的挥发油成分进行了系统的指纹图谱研究,在此基础上对不同产地柴胡进行了相关的图谱分析,为评价不同产地柴胡的质量提供客观的依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器与试剂:HP—6890 型气相色谱仪,氢焰离子化检测器;HP—6890/5973N 气-质联用系统(美国安捷伦公司)。己醛对照品(丰特斯公司,质量分数大于 98%),正己醇(色谱标准,中外合资绿色特种化学品有限公司,质量分数大于 99%), α -蒎烯对照品(供定量测定用,批号 897-200001)由中国药品生物制品检定所提供,其他试剂均为分析纯。

1.2 样品:不同产地柴胡药材样品来源见表 1,经河北医科大学药学院生药学教研室聂凤褪教授和邯郸市药品检验所孔增科主任药师鉴定。将收集的 28 个不同产地不同品种的柴胡药材样品(其中 1~7 号

样品为道地北柴胡)切成小段,置烘箱内,于 60 ℃ 烘干 4 h,取出,粉碎,过 20 目筛,备用。

2 实验方法

2.1 实验条件:气相色谱条件:色谱柱:HP-1 柱(Crosslinked dimethyl polysiloxane, 50 m × 320 μ m × 0.25 μ m);柱温:50 ℃,以 3.5 ℃/min 升至 270 ℃;载气:N₂, 0.90 mL/min;分流比为 10:1;进样口温度:250 ℃;检测器(FID)温度:270 ℃;进样量:1 μ L。以己醛的色谱峰为对照。质谱分析条件:在相同色谱条件下,电离方式为 EI,离子源温度 300 ℃,电子能量 70 eV;采集方式:扫描,扫描质量范围 0~800 mAU;载气为 He。

2.2 对照品溶液的制备:取己醛对照品适量,精密称定,加正己烷制成 3.50 mg/mL 的溶液,作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备:取柴胡药材适量,过 20 目筛,取约 200 g,精密称定,置 5 000 mL 圆底烧瓶中,加 8 倍量水浸润 20 h,与挥发油提取器连接,于挥发油提取器水层上方精密加取正己烷 3 mL,回流提取 6 h,分取正己烷层,用无水硫酸钠脱水并滤过置 5 mL 量瓶中,用正己烷洗涤并定容,摇匀,即得供试品溶液(密封冷藏)。

2.4 测定方法:分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 1 μ L,注入气相色谱仪,测定并记录色谱图,以己醛峰为参照物峰,计算各峰的相对保留时间和相对峰面积值。

2.5 方法学考察^[3,4]

2.5.1 空白与对照试验:精密吸取空白溶剂正己烷、供试品溶液及对照品溶液各 1 μ L,注入气相色谱仪,记录 60 min 内的色谱峰,并进行基线补偿。基线补偿后基线平稳,且确定 10 min 以前的色谱峰为正己烷的溶剂峰,在相关数据的计算时应排除在外。己醛对照峰与样品中的 2 号峰(11.3 min)对应。

2.5.2 稳定性试验:取 1 号样品药材粉末,精密称定,按 2.3 项下制备供试液,分别于 0、2、4、6、8、12、24、36、48 h 检测指纹图谱。结果表明,各主要色谱峰相对保留时间和峰面积占总峰面积 5% 以上峰的峰面积比值均无明显变化,其 RSD 均小于 3%,符合指纹图谱技术要求,稳定性良好。

2.5.3 精密度试验:取同一供试品溶液,重复进样 6 次,记录指纹图谱。结果表明,各主要色谱峰相对保留时间和峰面积占总峰面积 5% 以上峰的峰面积比值均无明显变化,其 RSD 均小于 3%,符合指纹图谱技术要求,精密度良好。

表 1 柴胡样品及来源

Table 1 Origins of *Radix Bupleuri* samples

样品名	样品来源	拉丁名
1	河北承德野生(北柴胡)	<i>Bupleurum chinense</i> DC.
2	河北武安市马家庄乡野生	
3	河北涉县野生 1	
4	河北涉县野生秋季现采	
5	河北涉县野生 2	
6	河北宽城县野生	
7	河北武安市馆陶乡野生	
8	河北涉县家种(银州柴胡)	<i>B. yinchowense</i> Shan et Y. Li
9	张家口阳原野生(黑柴胡)	<i>B. smithii</i> Wolff
10	宁夏家种(秦岭柴胡)	<i>B. longicaule</i> Call. ex DC. var. <i>giraldii</i> Wolff
11	山西北部野生(银州柴胡)	
12	山西南部野生(北柴胡)	
13	四川雅安(竹叶柴胡)	<i>B. marginatum</i> Wall. ex DC.
14	邯郸家种日本柴胡(阿尔泰柴胡)	<i>B. falcatum</i> L.
15	甘肃 5 月前采野生(小叶黑柴胡)	<i>B. smithii</i> Wolff var. <i>parvifolium</i> Shan et Y. Li
16	甘肃 6 月后采野生(锥叶柴胡)	<i>B. bicaule</i> Helm
17	青海 6 月后采野生(小叶黑柴胡)	
18	青海 5 月前采野生(小叶黑柴胡)	
19	安徽亳州(竹叶柴胡)	<i>B. marginatum</i> Wall. ex DC.
20	甘肃柴胡	<i>B. chinense</i> DC. f. <i>vanheurckii</i> (Muell.-Arg.) Shan et Y. Li
21	内蒙野生红柴胡(软苗)	<i>B. scorzonifolium</i> Wild
22	甘肃家种银柴胡	
23	山西硬柴胡	<i>B. chinense</i> DC. f. <i>vanheurckii</i> (Muell.-Arg.)
24	山西软硬苗柴胡(锥叶柴胡)	
25	河北安国家种	<i>B. chinense</i> DC. f. <i>vanheurckii</i> (Muell.-Arg.) Shan et Y. Li
26	四川家种	<i>B. sichuanense</i> S. L. Pan et Hsu
27	陕西汉中地区家种(北柴胡)	
28	张家口崇礼县亚湾子镇硬苗柴胡 (小叶黑柴胡)	

2.5.4 重现性试验:取 1 号样品药材粉末 6 份,精密称定,按 2.3 项下制备供试液,分别进样,记录指纹图谱。结果表明,各主要色谱峰相对保留时间和峰面积占总峰面积 5% 以上峰的峰面积比值均无明显变化,其 RSD 均小于 3%,符合指纹图谱技术要求,重现性良好。

3 结果

3.1 柴胡 GC 色谱指纹图谱和共有峰的建立:柴胡 GC 指纹图谱中可分离出 80 个左右主要峰,经比较 7 批道地北柴胡样品所有的记录和测定的色谱图后,从中选定 19 个共有峰作为构成柴胡指纹图谱的稳定的特征峰,标准指纹图谱见图 1。为易于辨认和分析,指纹图谱可分为 3 个区:10 min 之前为溶剂峰;保留时间 10~35 min (I 区),为主要特征区,出现 29 个特征峰,均基本达到基线分离,包括内参照峰己醛峰在内(2 号峰),大部分样品的指纹峰在此区域内均能重合,只是峰面积比值有所差别;保留时间 35~50 min (II 区)为指纹密集区,不同产地柴胡的指纹图谱在此区域内有很大的差异。保留时间 50~60min (III 区)主要为一些细小的指纹区,不同

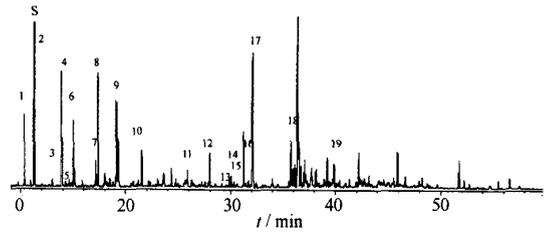


图 1 柴胡气相指纹图谱

Fig. 1 GC Fingerprint of *Radix Bupleuri*

产地柴胡的指纹图谱在此有不同程度的缺失。其中 2 号峰己醛峰为最强峰,作为内参照物,以其相对保留时间及峰面积为 1,计算各共有特征峰的相对保留时间及峰面积比值。

3.2 主要色谱峰的鉴定:在相同色谱条件下,利用 GC-MS (HP-6890/5973N 气-质联用仪)进行图谱的解析,其图谱与本研究结果一致。经分析,检出 80 多个峰,鉴定了 39 种化合物,占总组成的 81.68%,各峰的鉴定主要通过 NIST98 质谱数据库检索并与有关标准图谱资料核对鉴定^[5],并以面积归一化法测得挥发油各组分的质量分数,结果见表 2。

3.3 不同产地柴胡 GC 指纹图谱的比较:应用相同

表 2 柴胡挥发油化学成分鉴定

Table 2 Chemical Constituents of volatile oils extracted from *Radix Bupleuri* samples

编号	t/min	化合物名称	质量分数/%	编号	t/min	化合物名称	质量分数/%
1	10.322	戊醇	2.07	21	35.766	十二醛	1.48
2	11.276	己醛	17.82	22	36.157	4,5-二甲基,2,3,6,7,8,8a,8b-八氢亚联苯基	1.29
3	13.896	1-己醇	7.13	23	36.420	与 25 同分异构体	1.86
4	15.029	庚醛	4.78	24	36.517	反式-6-十三烯-4 炔	3.82
5	17.155	反式-2-庚烯醛	0.84	25	36.697	顺式-6-十三烯-4 炔	0.73
6	17.379	α-蒎烯	2.55	26	37.078	雪松烯	1.26
7	18.000	庚醇	0.94	27	37.140	二氢化-5-己基-2(3H)呋喃酮	1.63
8	19.124	β-蒎烯	3.06	28	39.228	germacrene D	0.50
9	19.240	2-戊基呋喃	6.85	29	39.871	(R)-1-甲基-4-(1,2,2-三甲基环戊基)苯	1.26
10	21.546	反式-2-辛烯醛	1.41	30	42.228	(-)-Spathulenol	1.16
11	21.753	苯乙酮	3.92	31	45.902	反式-7-十五烯-5 炔	0.49
12	23.637	(反,反)2,4-辛二烯醛	1.04	32	47.372	4-苯乙烯吡嗪	1.39
13	24.074	十一烷	2.78	33	51.741	石竹烯	0.43
14	25.841	反式-2-壬烯醛	1.19	34	52.199	(顺)-(-)-3-羟基-1,9-十七二烯-4,6-二炔	0.28
15	27.993	(反,反)2,4-壬二烯醛	0.90	35	52.691	葎草烯-(vl)	0.20
16	29.847	4a-羟基-八氢化萘	0.51	36	54.660	与 34 同分异构体	0.26
17	30.019	顺式-2-癸烯醛	0.45	37	55.491	5,8,11-十七三炔酸甲酯	0.24
18	31.256	(反,顺)2,4-癸二烯醛	0.86	38	57.517	与 34 同分异构体	0.63
19	32.121	(反,反)2,4-癸二烯醛	3.21	39	59.860	1H-2-丁基-3-己基-茚并	0.17
20	33.972	2-十一烯醛	0.29				

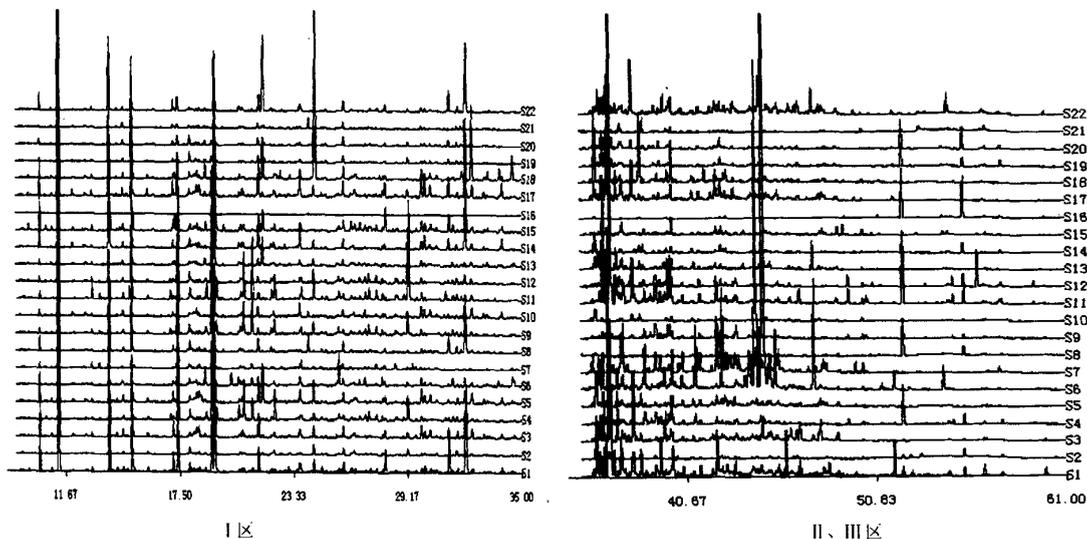
条件分析不同产地柴胡药材,并与道地药材指纹图谱对比,见图 2。从图中可以看出不同产地柴胡药材与道地药材指纹图谱相比,既有很好的相关性,又有一定的差异,从而导致其质量及疗效的差异。

3.4 共有模式的生成及相似度计算:以 7 批道地药材作为共有模式的研究对象,将其实验数据导入中

药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版软件,设定参照图谱,将谱峰自动匹配,通过软件得出道地柴胡药材指纹图谱的共有模式(即对照图谱),各样品与该共有模式比较,其相似度结果见表 3。

4 讨论

4.1 为使该方法可行,建立中药样品的指纹图谱应



S1~S22-样品 7~28 (表 1)

S1~S22-Sample No. 7~28 (same as Table 1)

图 2 不同产地柴胡气相指纹图谱

Fig. 2 GC Fingerprints of *Radix Bupleuri* samples from various sources

表 3 与共有模式比较的相似度结果

Table 3 Similarities among samples of *Radix Bupleuri* compared with mutual mode

样品号	相似度	样品号	相似度
1	0.994	15	0.684
2	0.975	16	0.972
3	0.978	17	0.582
4	0.986	18	0.834
5	0.992	19	0.986
6	0.989	20	0.990
7	0.918	21	0.986
8	0.806	22	0.056
9	0.990	23	0.985
10	0.738	24	0.968
11	0.983	25	0.941
12	0.926	26	0.911
13	0.504	27	0.925
14	0.948	28	0.929

体现以下 3 个原则:指纹谱信息量大,指纹谱稳定性好,指纹信息特征。根据这 3 个要求笔者对柴胡挥发油指纹图谱的建立条件进行了优化选择。在色谱条件的优化中,分别考察了极性柱和非极性柱,柱温 50、70、90 °C 和不同的程序升温等条件,结果以石英毛细管非极性柱和程序升温的方法较为理想,色谱峰形较好,且较稳定,在 60 min 内可使样品全部色谱峰流出,且大部分得到基线分离。

4.2 通过系列方法学考察建立了柴胡 GC 色谱指纹图谱的共有模式,方法简单,可操作性强,可用于柴胡药材的鉴别与品质评价,且指纹图谱提供的信息较为丰富,可作为与混伪品区别的标准模式,以避

免同科属近缘种的伪充,为中药标准指纹谱库的建立提供基础。

4.3 柴胡 GC 色谱指纹图谱的分析、比较和辨认是建立在有大量样品的基础上,寻找出可以构成柴胡挥发油指纹的特征峰,以便抓住主要特征,而不是选出所有的峰,这样更有利于色谱指纹图谱的“整体性”和“模糊性”的评价。不同产地各样品之间均具有相应的主成分峰,其主要差别在于各峰面积比值不同,还有个别样品出现严重的峰缺失,这些差别可以用相似度值来进行评价。从表 3 中可以看出,22 号样品甘肃家种柴胡的相似度很低,其指纹峰有严重的峰缺失现象,32 min 以前基本没有峰,与标准样品差别较大;而相似度在 0.90 以下的样品大多是不同种属的柴胡,它们与道地北柴胡在质量上有一定的差别,比如 15、17、18 号样品均属于小叶黑柴胡,13 号样品为来自四川的春柴胡,还有 10 号样品宁夏的秦岭柴胡,其相似度均较低,这与药材本身的种属有很大关系。由于道地北柴胡来源较为固定,且与标准样品图谱比较,整体性更强,故各样品之间相似度较高,整体面貌非常相似,而日本引种的三岛柴胡从指纹图谱相似度上分析更接近道地北柴胡。从指纹图谱的峰差异及整体性评价可以看出,不同产地之间药材既有较好的相关性,又有区别。因此要保证药材质量稳定,固定药材的产区是主要手段之一。

4.4 用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版软件进行指纹图谱相似度的计算,获得了较满意

的效果。该方法数据处理过程简便快速,在定性对比多张色谱指纹图谱时具有优势,且与药材的道地性和生药学鉴定结果相结合,为药材质量的评价提供了更可靠的依据。

4.5 指纹图谱中蕴藏了很多特征的指纹信息,这些特征信息在中药的质量控制中将起着重要作用。为了阐明指纹图谱的内在本质,挖掘其中的特征指纹信息,本文利用 GC/MS 对 28 个样品进行了分析,确定了共有的 19 个特征指纹峰,并对样品中峰强度较高的特征峰进行了质谱鉴定,确定了其化学成分,为柴胡 GC 指纹图谱的分析比较提供了更全面的信息,为进一步的谱效结合研究奠定了基础。

4.6 气相色谱与质谱的联用为指纹图谱中各峰的归属提供了强有力的支持,但在组分复杂,成分较多(如芳香性植物药的挥发油)的情况下,色谱条件即使尽量优化也难以保证各个成分都得到良好的分离,峰的重叠和包埋往往影响到化学归属的准确。作为指纹图谱判断,不必要求“一步到位”,对潜在的化学归属的不准确性可以“模糊”对待,即能构成指纹特征即可,直至将来这种“模糊”被明朗,并对判断产生了关键性影响。

4.7 实验结果显示,气相色谱分离化合物有着很高的效率,质谱检测器可以提供更多的化合物的信息,提高指纹图谱的可信度,是 FID 检测器较好的补充。两者联用为药材的分析提供了全面可靠的依据,是指纹图谱研究必要的手段。

致谢:河北医科大学药学院生药学教研室聂凤祺教授和邯郸市药品检验所孔增科主任药师帮助鉴定药材样品。

References:

- [1] Pan S L, Da Q Y. The classification and distribution of medicinal *Bupleurum* species in China — study on medicinal *Radix Bupleuri* in China [J]. *Res Med Plant* (药用植物研究), 1996, 19 (1): 1-17.
- [2] Pan S L, Li Y, Dai K M. Study on classification and chemical components of *Radix Bupleuri* in Yunnan province [J]. *Acta Acad Med Shanghai* (上海第一医学院学报), 1984, 11 (1): 1-13.
- [3] Xiao R, Zhang L T. Actuality and future of studies on fingerprints of TCM [J]. *J Hebei Med Univ* (河北医科大学学报), 2003, 24 (5): 310-313.
- [4] *Technical Requirement of the Fingerprint in injection of Chinese Materia Medica (Tentative Standard)* (中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行))[S]. 2001.
- [5] Li X Q, Sun X Y, He Z G, Bi K S. Studies on extraction methods of essential oil from *Bupleurum chinense* [J]. *Chin Pharm J* (中国药杂志), 2004, 39 (2): 103-105.

马钱子药材 HPLC 指纹图谱的研究

王月辉, 乔斌, 蒋建兰*, 元英进

(天津大学 化工学院制药工程系, 天津 300072)

摘要:目的 建立马钱子药材的 HPLC 指纹图谱分析方法,为马钱子的质量控制提供新方法。方法 以甲醇-水-浓盐酸(50:50:1)为提取溶剂,超声波震荡 30 min,制备马钱子药材样品溶液;采用 RP-HPLC(DAD)法,选用 Kromasil KR100-5 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),体积流量 1.0 mL/min,检测波长 254 nm,流动相为乙腈(B)-0.2%三乙胺-0.2%乙酸水溶液(A),线性梯度洗脱:0 min 时 8%:92%,30 min 时 17%:83%,60 min 时 60%:40%。结果 对 10 批马钱子药材进行测定,以土的宁为参照物,确定了马钱子药材指纹图谱中的 12 个共有峰;通过方法学考察,精密性、稳定性、重现性试验 RSD 均小于 3%;采用相似度作为指纹图谱的评判参数,计算了不同批次与对照指纹图谱之间的相似度,均大于 0.9,表明 10 批药材质量均一、稳定。结论 该方法适用于马钱子药材的质量控制。

关键词:马钱子;指纹图谱;HPLC;质量控制

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)08-1252-04

HPLC Fingerprint of *Semen Strychni*

WANG Yue-hui, QIAO Bin, JIANG Jian-lan, YUAN Ying-jin

(Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Key words: *Semen Strychni*; fingerprint; HPLC; quality control

收稿日期:2005-12-12

作者简介:王月辉(1980—),女,天津人,硕士研究生,主要研究方向为中药指纹图谱研究。

*通讯作者 蒋建兰 Tel:(022) 27400388 E-mail:jiang0202@126.com