

小半夏汤 HPLC 指纹图谱的研究

张科卫, 梅 阳, 吕爱娟, 蔡 皓, 李 伟, 崔小兵, 吴 皓

(南京中医药大学, 江苏 南京 210029)

摘 要:目的 研究小半夏汤的高效液相色谱指纹图谱。方法 RP-HPLC 方法, 采用 Lichrospher C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 二元梯度洗脱, 检测波长为 254 nm, 以鸟嘌呤核苷为参照物。结果 共有 11 个共有峰, 通过与对照品的保留时间及紫外光谱比较, 1、2、3、5、6 号峰分别鉴定为是尿嘧啶、黄嘌呤、尿嘧啶核苷、次黄嘌呤核苷、鸟嘌呤核苷。相同色谱条件下测定了半夏药材的 HPLC 图谱, 其结果与小半夏汤有很好的相关性。结论 小半夏汤的指纹图谱特征性、专属性很强, 该方法稳定、可靠、重现性好, 可为小半夏汤的质量控制研究提供参考。

关键词:小半夏汤; 高效液相色谱; 指纹图谱

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)10-1493-03

HPLC Fingerprint of Xiaobanxia Decoction

ZHANG Ke-wei, MEI Yang, LU Ai-juan, CAI Hao, LI Wei, CUI Xiao-bing, WU Hao

(Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

Key words: Xiaobanxia Decoction HPLC; fingerprint

小半夏汤由半夏和生姜组成, 出自张仲景的《金匱要略》, 由于其止呕效果很好而被称为“呕家圣剂”, 为历代医家所推崇。目前国内外对其的研究主要集中在药理药效方面^[1]。中药复方的药效是依靠其所包含的多种化学成分发挥综合、协调的整体调节作用而达到抗病的目的, 色谱指纹图谱可以“框定”具某些特定疗效的植物药的质量, 也可以区别不同提取工艺生产的植物药产品^[2]。本研究采用高效液相色谱法进行了小半夏汤的指纹图谱研究, 为全面控制小半夏汤的质量提供了一种可借鉴的方法。

1 仪器、试剂与药品

Waters2690 型高效液相色谱仪, 996PDA 检测器, Millennium32 色谱管理系统; Sartorius BP211D 型电子天平; 乙腈为色谱纯, 水为亚沸蒸馏水(自制); 尿嘧啶, 黄嘌呤, 尿嘧啶核苷由 Sigma 公司提供, 鸟嘌呤核苷由中国科学院上海生化研究所提供, 次黄嘌呤核苷对照品由本实验室分离纯化制得, 经 UV、IR、MS、NMR 等结构测定; 所有对照品均经 HPLC 检测为单一成分, 质量分数达到 99% 以上; 小半夏汤制剂。由南京中医药大学中医药研究院提供; 半夏药材样品来源见表 1, 生姜药材样品(5 个) 购于菜市, 经南京中医药大学中药鉴定教研室王春根教授鉴定分别为天南星科植物半夏 *Pinelliaternata* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎及姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的新鲜根茎。

表 1 半夏样品来源

Table 1 Origins of *P. ternata* samples

样品号	产地	收集时间	样品号	产地	收集时间
1	贵州	2004-06	6	四川	2005-10
2	贵州	2006-01	7	江苏	2005-06
3	贵州	2006-02	8	江西	2006-04
4	四川	2004-07	9	湖北	2004-07
5	四川	2005-08			

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Lichrospher C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水, 梯度洗脱: 0~24 min 乙腈-水 (1: 99), 24~35 min 乙腈由 1% 升为 13%, 保持 15 min, 50~58 min 乙腈由 13% 升为 50%, 58~65 min 乙腈由 50% 降为 1% 再保持 15 min 至 80 min。体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 检测波长: 254 nm。

2.2 对照品溶液的制备: 分别精密称取经五氧化二磷干燥过夜的尿嘧啶、黄嘌呤、尿嘧啶核苷、次黄嘌呤核苷、鸟嘌呤核苷对照品适量, 各加水后制成 50 μg/mL 的溶液, 作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 小半夏汤供试品溶液的制备: 取小半夏汤,

收稿日期: 2007-01-21

基金项目: 南京中医药大学青年科技创新基金项目(05XZR08)

作者简介: 张科卫(1971-), 女, 助理研究员, 博士研究生, 主要从事中药炮制及复方研究。

Tel: (025)86798269 E-mail: kewe_31@163.com

加无水乙醇适量,使溶液含醇量达60%,放置,滤过,滤液于水浴上蒸干,残渣加水溶解,制成含生药2 g/mL的溶液,即得。

2.3.2 半夏供试品溶液的制备:取半夏药材适量,加水煎煮,浓缩,浓缩液照2.3.1项下处理,即得。

2.3.3 生姜供试品溶液的制备:取生姜药材适量,照2.3.2项下处理,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验:取同一小半夏汤供试品溶液,连续进样6次,测得共有峰11个,各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3%。

2.4.2 稳定性试验:取同一小半夏汤供试品溶液,分别在0.2、5.0、7.5、10.0、12.5 h进样,测定,计算得各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3%,结果表明供试品溶液在12.5 h内

稳定。

2.4.3 重现性试验:取同一批号的小半夏汤样品6份,分别按供试品溶液的制备方法制备供试品并测定,计算其11个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD,结果均小于3%。

2.5 指纹图谱的建立

2.5.1 指纹图谱的制备:分别精密吸取对照品溶液与小半夏汤供试品溶液各10 μ L,注入液相色谱仪,进样,测定,记录80 min色谱图,即得。

2.5.2 共有峰的确定:测定了10批小半夏汤供试品溶液,比较其色谱图,以6号峰鸟嘌呤核苷峰为参比峰(S),计算各共有指纹峰的相对保留时间及相对峰面积比值。根据结果,确定11个共有色谱峰,相对保留时间和相对峰面积结果见表2、3,色谱图见图1。

表2 小半夏汤共有峰的相对保留时间

Table 2 Relative retention time of common peaks for fingerprint of Xiaobanxia Decoction

样 品	共有峰相对保留时间										
	1	2	3	4	5	6(S)	7	8	9	10	11
1	0.236	0.375	0.443	0.663	0.909	1.000	1.211	1.650	1.780	2.461	2.687
2	0.238	0.378	0.445	0.662	0.899	1.000	1.212	1.654	1.786	2.469	2.695
3	0.236	0.375	0.443	0.659	0.908	1.000	1.206	1.652	1.784	2.469	2.698
4	0.237	0.377	0.444	0.660	0.909	1.000	1.208	1.658	1.792	2.476	2.704
5	0.239	0.378	0.445	0.660	0.909	1.000	1.212	1.666	1.803	2.487	2.713
6	0.238	0.379	0.446	0.654	0.909	1.000	1.212	1.666	1.802	2.486	2.709
7	0.239	0.379	0.446	0.661	0.909	1.000	1.212	1.666	1.802	2.484	2.711
8	0.239	0.378	0.445	0.647	0.909	1.000	1.212	1.667	1.802	2.492	2.716
9	0.234	0.374	0.441	0.650	0.908	1.000	1.199	1.637	1.765	2.452	2.685
10	0.233	0.373	0.440	0.648	0.908	1.000	1.194	1.626	1.749	2.435	2.668
$\bar{x}$	0.237	0.377	0.444	0.656	0.908	1.000	1.208	1.654	1.786	2.471	2.699
RSD/%	0.90	0.58	0.46	0.93	0.34	0	0.53	0.83	1.01	0.72	0.56

表3 小半夏汤共有峰的相对峰面积值

Table 3 Relative peak area of common peaks for fingerprint of Xiao banxia Decoction

样 品	共有峰相对峰面积										
	1	2	3	4	5	6(S)	7	8	9	10	11
1	0.702	0.591	1.750	1.622	0.040	1.000	0.027	0.209	0.564	0.203	0.388
2	0.294	0.188	1.138	1.630	0.027	1.000	0.149	0.091	0.154	0.058	0.106
3	0.409	0.278	1.522	1.843	0.028	1.000	0.106	0.101	0.405	0.085	0.132
4	0.410	0.284	1.522	1.831	0.031	1.000	0.110	0.103	0.404	0.082	0.142
5	0.535	0.297	1.732	2.176	0.059	1.000	0.271	0.123	0.497	0.085	0.112
6	0.623	0.622	1.516	2.242	0.026	1.000	0.151	0.117	0.534	0.093	0.100
7	0.640	0.419	1.782	2.607	0.038	1.000	0.471	0.197	0.437	0.098	0.148
8	2.076	2.178	2.867	4.193	0.064	1.000	1.047	0.340	0.351	0.926	0.424
9	0.696	0.236	1.344	1.566	0.111	1.000	0.147	0.132	1.265	0.934	0.453
10	0.604	0.187	1.329	1.349	0.137	1.000	0.222	0.120	1.432	0.852	0.368

2.5.3 共有峰的归属:取对照品溶液各10 μ L,注入液相色谱仪,在上述色谱条件下分别进样,对比各吸收峰的紫外吸收光谱和相对保留时间可知,指纹谱中,1号峰为尿嘧啶(4.40 min),2号峰为黄嘌呤(7.07 min),3号峰为尿嘧啶核苷(8.36 min),5号峰为次黄嘌呤核苷(17.38 min),6号峰为鸟嘌呤核苷(19.14 min)。

2.6 制剂与药材之间的相关性研究:取半夏药材、生姜药材供试品溶液各10 μ L,注入液相色谱仪,在

上述色谱条件下分别进样,对比各吸收峰的紫外吸收光谱和相对保留时间可知,小半夏汤指纹图谱中的吸收峰均来自于半夏药材,制剂与药材之间存在很强的相关性。色谱图见图1。

3 讨论

3.1 核苷类成分的检测及确认:小半夏汤仅由半夏生姜两味药组成,半夏的水溶性成分中含有次黄嘌呤核苷和鸟嘌呤核苷^[3],而核苷又是一类生理活性很强的物质,因此推测小半夏汤中也可能含有核苷

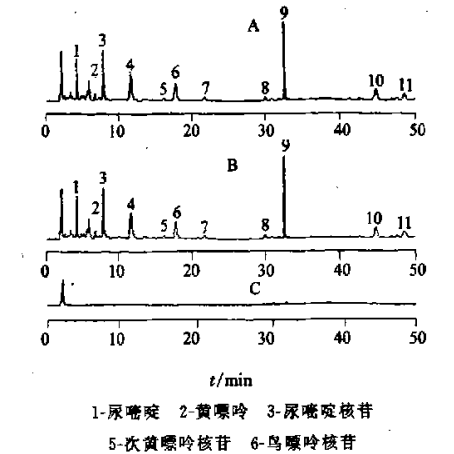


图 1 小半夏汤(A)、半夏药材(B)和生姜药材(C)的 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC Fingerprint of Xiaobanxia Decoction (A), *Rhizoma Pinelliae* (B), and *Rhizoma Zingiber Recens* (C)

类成分,于是采用 HPLC-PDA 法对该方成分进行检测。同时,为确认小半夏汤中上述 5 种核苷类成分的存在,采用了甲醇-水(2:98)、乙腈-0.2%三乙胺(磷酸调 pH 3.5)(1:50)的色谱系统,并经紫外区全波长扫描,结果发现在这两种洗脱条件下,供试品溶液中该 5 种成分的保留时间及紫外光谱与各相对应的对照品完全一致。

3.2 参照物的选择:由于鸟嘌呤核苷的量相对较高(其面积占总峰面积的 5%以上),保留时间在整个色谱图中处的位置又比较恰当。因此,本实验以鸟嘌呤核苷为参照物。

3.3 色谱条件的选择

3.3.1 色谱柱的选择:比较了不同品牌的色谱柱对各峰分离度的影响,结果 Intersil、Kromasil 及 Lichrospher 等都能使各成分得到较好分离,考虑到汉邦公司的 Lichrospher 色谱柱价廉易得,适用范围广,故使用该品牌色谱柱进行试验。

3.3.2 流动相的选择:比较了甲醇-水、甲醇-水-醋酸、甲醇-水-磷酸、甲醇-水-磷酸盐、乙腈-水、乙腈-水-醋酸、乙腈-水-三乙胺系统对出峰的数目及各峰分离度的影响,结果发现,使用乙腈-水、甲醇-水、乙腈-水-三乙胺系统,调整梯度洗脱程序,都能使各峰达到良好的分离;由于乙腈-水系统操作简单,出峰较多,因此本实验采用乙腈-水系统进行程序洗脱。

3.3 本实验中所得 10 批小半夏汤中所含各成分的量存在较大差异,各成分之间量上并不成恒定的比例关系。原因可能在于不同批次间所用原料药材的产地、采收季节、炮制加工及制剂制备过程中工艺的些微差异有关。在本实验对收集的 9 批半夏药材进行的研究中发现其所含成分的量上确实存在很大差异。

3.4 本实验采用梯度洗脱,在对溶剂和供试品溶液分别在该色谱条件下进行研究时发现,供试品溶液中的成分峰基本都集中在 50 min 之前,50 min 以后的峰大都是溶剂梯度峰,因此本实验出具的色谱图均为 50 min 的色谱图。

References:

- [1] Chen D, Wu C F, Huang Li, et al. Effect of Xiaobanxia Tang on small intestinal transit in mice [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2003, 19(2), 6~8.
- [2] Sticher O. Quality of ginkgo preparation [J]. *Planta Med*, 1993, 59, 2~11.
- [3] Wu H, Li W, Zhang K W, et al. Distinctive compound in rhizome of *Pinellia ternata* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28(9), 836~839.

鼻通喷雾剂的质量标准研究

张 何¹, 史公良², 张景云¹, 韩 健¹, 何晓明¹, 崔培红¹, 赵余庆^{3*}

(1. 辽宁中医药大学职业技术学院, 辽宁 沈阳 110101; 2. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 沈阳 110032;

3. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 建立鼻通喷雾剂的质量标准。方法 对制剂中细辛、菊花和冰片采用薄层色谱法进行定性鉴别;采用 HPLC 法测定制剂中欧前胡素。结果 薄层色谱法能检出细辛、菊花和冰片;欧前胡素在 0.0723 2~0.361 6 μg 与峰面积具有良好的线性关系,平均回收率为 98.59%,RSD 为 1.04%。结论 建立的方法简便、准确、可靠,重现性好,可作为该制剂的质量标准。

收稿日期:2007-02-21

基金项目:辽宁省科学计划项目(2002226)

* 通讯作者 赵余庆 Tel: (024) 23986522 E-mail: zyzq4885@126.com