

- 药, 2002, 33(2): 175-177.
- [4] Komori T. Glycosides from *Dioscorea bulbifera* [J]. *Toxicol*, 1997, 35(10): 1531-1535.
- [5] 刘金英, 徐有明, 李双来, 等. 佛手山药组织培养的研究 [J]. 植物研究, 2006, 26(3): 323-328.
- [6] 王 忠. 植物生理学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [7] 任 华, 王永清, 秦红玫. 玫瑰天竺葵组培快繁技术的研究 [J]. 湖南农业科学, 2007, 1: 32-34.
- [8] 蒋泽平, 梁珍海, 李荣锦, 等. 光叶楮组织培养快速繁殖技术的研究 [J]. 江苏林业科技, 2006, 33(6): 10-13.

小叶黑柴胡药材的HPLC指纹图谱研究

刘鄂湖^{1,2}, 蔡光明^{1*}, 朱海升¹, 黄鹤慧¹, 周 伟^{1,2}, 熊晗辉^{1,2}

(1. 解放军302医院全军中药研究所, 北京 100039; 2. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410004)

摘要:目的 建立小叶黑柴胡药材的HPLC指纹图谱。方法 以Kromasil C₁₈为色谱柱, 流动相为乙腈-水梯度洗脱, 体积流量1.0 mL/min, 检测波长260 nm。结果 建立了小叶黑柴胡药材的HPLC指纹图谱, 确定了14个共有峰, 共有峰相对保留时间的RSD为0.02%~1.49%, 相对峰面积的RSD为6.12%~58.75%, 10批样品的相似度均大于0.9。结论 本方法简单可靠, 可用于小叶黑柴胡药材的质量控制。

关键词:小叶黑柴胡; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 相似度评价

中图分类号:R282.7 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2008)10-1560-03

HPLC Fingerprint of *Bupleurum smithii* var. *parvifolia*

LIU E-hu^{1,2}, CAI Guang-ming¹, ZHU Hai-sheng¹, HUANG He-hui¹, ZHOU Wei^{1,2}, XIONG Han-hui^{1,2}

(1. 302 Hospital of PLA & PLA Institute of Chinese Materia Medica, Beijing 100039, China; 2. School of Pharmacy, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410004, China)

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint of *Bupleurum smithii* var. *parvifolia*.

Methods Kromasil C₁₈ column was used, with acetonitrile and water as the mobile phase in gradient mode, the flow rate was 1.0 mL/min, and the detection wavelength was 260 nm. **Results** The HPLC fingerprint of *B. smithii* var. *parvifolia* was established; There were 14 common peaks in the fingerprint of ten samples. The RSD of the relative retention time of the common peaks was 0.02%—1.49% and the RSD of the relative peak area was 6.12%—58.75%. The similarity of ten batches of samples was over 0.9. **Conclusion** The method is simple, reliable, and can be used for the quality control of *B. smithii* var. *parvifolia*.

Key words: *Bupleurum smithii* Wolff var. *parvifolia* Shan et Y. Li; HPLC; fingerprint; similarity evaluation

小叶黑柴胡 *Bupleurum smithii* Wolff var. *parvifolia* Shan et Y. Li 主要分布于我国的青海、宁夏、西藏等地, 并作柴胡药用, 在青海为商品柴胡的主流品种, 具有解热、抗炎、镇痛、保肝和增强免疫的作用^[1], 入药部位主要为干燥地上部分, 其化学成分主要包括黄酮及其苷类(如槲皮素、芦丁等)、木脂素类、香豆素类、少量皂苷类等。由于受气候、生态环境的影响, 不同生长地区的小叶黑柴胡药材中所含的成分差别较大, 如果只针对其中某个特定有效成

分或指标成分进行定性、定量分析, 不能够有效的控制药材质量。为进一步开发利用小叶黑柴胡这一丰富资源, 笔者采用高效液相色谱法建立了小叶黑柴胡药材的指纹图谱, 并对10批小叶黑柴胡药材进行了相似度评价, 为药材的质量控制提供了更为科学有效的方法。

1 仪器与试剂

HP1100 高效液相色谱仪、四元泵、二极管阵列检测器、HP 色谱工作站(美国安捷伦公司), KQ—

收稿日期: 2008-01-02

作者简介: 刘鄂湖(1981—), 男, 湖南娄底人, 硕士研究生, 主要从事中药新药研究与开发工作。 Tel: (010)66933324

E-mail: shenqian01@163.com

* 通讯作者 蔡光明 Tel: (010)66933323 E-mail: cgm1004@vip.sina.com

500B型超声波清洗器(江苏昆山)。甲醇、乙腈为色谱纯,醋酸为分析纯,水为超纯水,小叶黑柴胡药材10批,来源及采收时间见表1,经解放军302医院全军中药研究所肖小河教授鉴定为小叶黑柴胡 *B. smithii* var. *parvifolia*。芦丁、槲皮素对照品购于中国药品生物制品检定所,批号分别为080-9303、081-9003。

表1 小叶黑柴胡药材来源

Table 1 Original resources of crude drug

样品编号	产地	采收时间	样品编号	产地	采收时间
1	青海省海宴县	2005-07	6	青海省祁连县	2005-07
2	青海省海宴县	2005-08	7	青海省祁连县	2005-08
3	青海省海宴县	2005-09	8	青海省门源县	2005-07
4	青海省刚察县	2005-08	9	青海省门源县	2005-08
5	青海省刚察县	2005-09	10	青海省门源县	2005-09

2 实验方法

2.1 色谱条件:色谱柱为Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈(A)-纯化水(B),梯度洗脱:0~40 min, 95%~40% B; 40~60 min, 40%~10% B;体积流量:1.0 mL/min;检测波长:260 nm;柱温:室温。

2.2 对照品溶液的制备:精密称取芦丁、槲皮素对照品适量,用甲醇溶解并稀释成质量浓度分别为0.100与0.196 mg/mL的溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备:精密称取药材粗粉1 g,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇溶液25 mL,称定质量,超声处理30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足缺失的质量,摇匀,微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液即得。

2.4 测定法:精密吸取对照品溶液与供试品溶液各10 μL,注入液相色谱仪,考察120 min药材的色谱分离情况,记录60 min色谱图。色谱图见图1。

3 方法学考察

3.1 精密度试验:取同一份药材供试品溶液在相同色谱条件下连续进样5次,考察色谱峰保留时间和峰面积的一致性,结果其共有峰的相对保留时间和相对峰面积RSD均小于2.0%,说明仪器精密度良好。

3.2 稳定性试验:取同一份药材供试品溶液,在相同色谱条件下分别在0、2、4、8、16、24 h进样,HPLC检测,其共有峰的相对保留时间和相对峰面积RSD均小于2.3%,表明样品24 h内稳定性较好。

3.3 重现性试验:精密称取同一批药材粗粉5份,按照供试品溶液的处理方法平行制得5份供试品溶

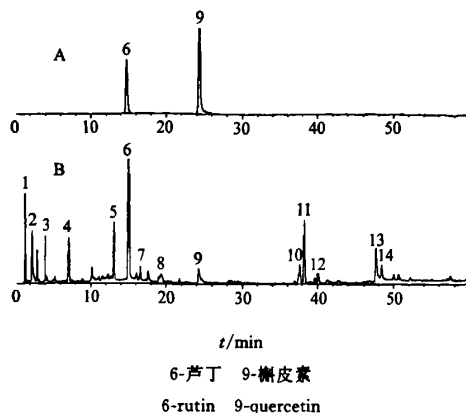


图1 对照品(A)和样品(B)HPLC 色图谱

Fig. 1 HPLC Chromatogram of reference substance (A) and sample (B)

液。HPLC检测,其共有峰的相对保留时间RSD小于1.9%,相对峰面积RSD小于2.8%,表明方法重现性良好。

4 HPLC 指纹图谱的建立与相似度分析

4.1 共有峰确认:采用中药色谱指纹图谱相信用度评价系统软件(2004A)对上述10批药材样品图谱进行指纹峰辨认和相似度分析,以样品1图谱作为参照谱,多点校正后进行自动匹配^[2]。自动匹配结果显示,10批药材样品色谱图共有峰为14个,其中第6号峰即15 min左右的色谱峰为芦丁对照品峰,第9号峰即24 min左右的色谱峰为槲皮素对照品峰。根据10批黑柴胡样品色谱分析结果,选定色谱图中芦丁色谱峰为参照峰(s),设其保留时间和峰面积分别为1,其他各共有峰的保留时间和峰面积分别与参照峰的保留时间和峰面积相比,计算各样品指纹图谱中共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果分别见表2、3。

分析结果显示,14个共有峰相对保留时间重现性较好,RSD为0.02%~1.49%;相对峰面积差异较大,其RSD为6.12%~58.75%。

4.2 相似度评价:将10批药材图谱数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件,自动匹配后生成对照图谱,以此作为小叶黑柴胡药材的对照指纹图谱,进行谱峰差异性评价和整体相似性评价。结果10批样品图谱相对于对照指纹图谱的相似度分别为0.926、0.948、0.947、0.927、0.943、0.935、0.959、0.903、0.934、0.957。10批样品的相似度计算结果均大于0.9,说明此产地的药材有较好的一致性。生成的共有模式对照指纹图谱见图2(其中S1~S10为10批药材图谱,R为生成的对照指纹图谱)。

表2 10批黑柴胡药材指纹图谱共有峰的相对保留时间

Table 2 Relative retention time of common peaks in fingerprint of ten batches of samples

批次	相对保留时间													
	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5	峰6	峰7	峰8	峰9	峰10	峰11	峰12	峰13	峰14
1	0.087	0.153	0.269	0.492	0.866	1.000	1.101	1.298	1.605	2.480	2.589	2.642	3.139	3.187
2	0.086	0.149	0.265	0.488	0.864	1.000	1.102	1.297	1.609	2.488	2.530	2.650	3.141	3.192
3	0.087	0.150	0.266	0.484	0.866	1.000	1.102	1.293	1.610	2.489	2.531	2.650	3.145	3.199
4	0.088	0.152	0.269	0.488	0.867	1.000	1.102	1.293	1.610	2.488	2.530	2.650	3.144	3.193
5	0.086	0.149	0.265	0.479	0.867	1.000	1.103	1.290	1.612	2.498	2.540	2.661	3.158	3.210
6	0.086	0.149	0.264	0.476	0.871	1.000	1.104	1.290	1.612	2.502	2.544	2.665	3.164	3.215
7	0.086	0.147	0.263	0.471	0.867	1.000	1.105	1.289	1.614	2.502	2.545	2.665	3.167	3.218
8	0.086	0.149	0.263	0.470	0.867	1.000	1.104	1.287	1.612	2.502	2.544	2.666	3.169	3.219
9	0.086	0.148	0.263	0.468	0.867	1.000	1.104	1.287	1.614	2.506	2.549	2.670	3.176	3.225
10	0.086	0.148	0.262	0.470	0.867	1.000	1.104	1.288	1.614	2.503	2.545	2.666	3.170	3.219

表3 10批小叶黑柴胡药材指纹图谱共有峰的相对峰面积

Table 3 Relative peak areas of common peaks in fingerprint of ten batches of samples

批次	相对峰面积													
	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5	峰6	峰7	峰8	峰9	峰10	峰11	峰12	峰13	峰14
1	0.348	0.216	0.079	0.194	0.398	1.000	0.092	0.095	0.108	0.263	0.589	0.127	0.100	0.210
2	0.356	0.245	0.078	0.204	0.392	1.000	0.086	0.091	0.108	0.272	0.612	0.131	0.118	0.231
3	0.369	0.229	0.078	0.199	0.393	1.000	0.093	0.089	0.108	0.269	0.607	0.128	0.107	0.184
4	0.331	0.240	0.115	0.208	0.399	1.000	0.086	0.096	0.121	0.273	0.616	0.130	0.115	0.211
5	0.352	0.234	0.082	0.217	0.397	1.000	0.082	0.090	0.123	0.272	0.617	0.130	0.510	0.232
6	0.380	0.238	0.091	0.284	0.405	1.000	0.080	0.088	0.105	0.279	0.634	0.135	0.550	0.255
7	0.336	0.220	0.073	0.281	0.398	1.000	0.085	0.083	0.094	0.272	0.624	0.130	0.599	0.261
8	0.311	0.284	0.093	0.279	0.280	1.000	0.087	0.111	0.149	0.180	0.431	0.069	0.330	0.146
9	0.327	0.255	0.101	0.278	0.280	1.000	0.089	0.113	0.150	0.178	0.428	0.068	0.349	0.149
10	0.322	0.310	0.096	0.284	0.282	1.000	0.088	0.122	0.182	0.180	0.431	0.069	0.338	0.144

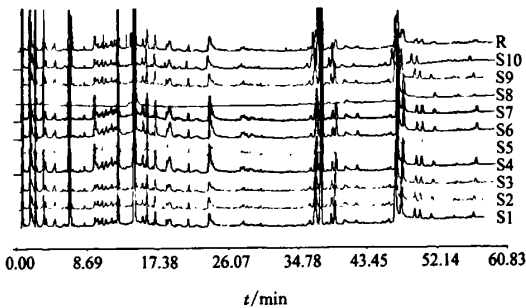


图2 10批小叶黑柴胡药材生成的对照指纹图谱模式

Fig. 2 HPLC Reference fingerprint mode produced by crude drug of ten batches of samples

5 讨论

5.1 流动相的选择:流动相条件优化时试验了3种流动相系统:甲醇-水、甲醇-0.1%醋酸、乙腈-水,并尝试了这3种流动相系统的多种梯度洗脱程序,结果表明以乙腈-水线性梯度洗脱时各色谱峰分离度和峰形都较好。因而选用乙腈-水线性梯度作为小叶黑柴胡药材的HPLC指纹图谱的流动相。

5.2 检测波长的选择:由于选用了二极管阵列检测器,比较了230、260、280、320、360 nm 5个不同波长下的色谱图,结果280、320、360 nm下色谱图灵敏度均较低,峰数目少,而230 nm色谱图的基线不平,故这些波长不宜作为指纹图谱检测波长,而260 nm下色谱图分离效果较好,峰形较理想,因而选择260

nm为指纹图谱检测波长。

5.3 参照物的选定:小叶黑柴胡药材中主要含黄酮类成分,亦是其有效成分,其中芦丁的量最高,且性质稳定,对照品易得,故选择芦丁作为参照物。

5.4 方法学研究:与样品测定结果表明,小叶黑柴胡药材指纹图谱特征峰的相对保留时间具有较好的重现性,可检测到小叶黑柴胡药材的特征成分的存在;由于受气候和生态环境等因素的影响,各指纹峰相对峰面积差异较大,反映了小叶黑柴胡药材的特征成分有差异,可据此评价小叶黑柴胡药材的质量。

5.5 指纹图谱具有整体性和模糊性的特点,当其用于中药鉴别时,提供的信息较用任何单一化学对照品作为鉴定的依据要丰富得多^[3]。本实验基于整体色谱的面貌辨认样品的真实性出发,通过匹配确定了14个特征峰,它们的峰位和大致的比例关系,作为一个整体,清楚地表达了指纹图谱鉴别的专属性。样品之间的差异没有影响到对小叶黑柴胡指纹图谱整体面貌的“共性特性”,不影响真实性的判断。

参考文献:

[1] 赵玉珍,陶上乘,王英华,等.小叶黑柴胡药理作用的进一步研究[J].中药材,1998,6(21):307-309.
 [2] 粟晓黎,林瑞超.中药侧柏叶黄酮成分指纹图谱分析方法的研究[J].药物分析杂志,2003,6(23):417-420.
 [3] 王倩,王建新,于治国,等.金银花药材高效液相色谱指纹图谱研究[J].中成药,2005,7(27):751-754.

小叶黑柴胡药材的HPLC指纹图谱研究

作者: [刘鄂湖](#), [蔡光明](#), [朱海升](#), [黄鹤慧](#), [周伟](#), [熊晗辉](#), [LIU E-hu](#), [CAI Guang-ming](#), [ZHU Hai-sheng](#), [HUANG He-hui](#), [ZHOU Wei](#), [XIONG Han-hui](#)

作者单位: [刘鄂湖, 周伟, 熊晗辉, LIU E-hu, ZHOU Wei, XIONG Han-hui \(解放军302医院全军中药研究所, 北京, 100039; 湖南中医药大学药学院, 湖南, 长沙, 410004\)](#), [蔡光明, 朱海升, 黄鹤慧, CAI Guang-ming, ZHU Hai-sheng, HUANG He-hui \(解放军302医院全军中药研究所, 北京, 100039\)](#)

刊名: [中草药](#) **ISTIC** **PKU**

英文刊名: [CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)

年, 卷(期): 2008, 39(10)

被引用次数: 3次

参考文献(3条)

1. [赵玉珍, 陶上乘, 王英华](#) 小叶黑柴胡药理作用的进一步研究 1998(06)
2. [粟晓黎, 林瑞超](#) 中药侧柏叶黄酮成分指纹图谱分析方法的研究[期刊论文]-[药物分析杂志](#) 2003(06)
3. [王倩, 王建新, 于治国](#) 金银花药材高效液相色谱指纹图谱研究[期刊论文]-[中成药](#) 2005(07)

本文读者也读过(10条)

1. [胡淑婷, 奥海航, 王英华, 白洁](#) 小叶黑柴胡诱导人胃腺癌MGC-803细胞凋亡的实验研究[期刊论文]-[宁夏医学院学报](#)2007, 29(1)
2. [刘鄂湖, 蔡光明, 朱海升, 黄鹤慧, 周伟, 熊晗辉](#) 小叶黑柴胡药材HPLC指纹图谱研究[会议论文]-2006
3. [徐秀珍, 王英华, 伊桂兰](#) 小叶黑柴胡中甾醇类成分的定量分析[期刊论文]-[宁夏医学院学报](#)2000, 22(6)
4. [周伟, 蔡光明, 黄鹤慧, 何桂霞, 刘鄂湖, 朱海升, 熊晗晖, ZHOU Wei, CAI Guangming, HUANG Hehui, HE Guixia, LIU Ehu, ZHU Haisheng, XIONG Hanhui](#) 高效液相色谱法测定小叶黑柴胡中槲皮素与异鼠李素的含量[期刊论文]-[中国药房](#)2007, 18(9)
5. [黄鹤慧, 蔡光明, 金光洙, 刘鄂湖, 周伟, 熊晗晖, HUANG He-Hui, CAI Guang-Ming, JIN Guang-Zhu, LIU EHu, ZHOU Wei, XIONG Han-Hui](#) 高效液相色谱法测定青海小叶黑柴胡茎叶中芦丁的含量[期刊论文]-[解放军药学报](#) 2006, 22(6)
6. [詹雪晶, 蔡霏, 刘秀芳, 蔡光明, 刘荣华, 刘峰群, 张卓勇, ZHAN Xue-jing, CAI Pei, LIU Xiu-fang, CAI Guang-ming, LIU Rong-hua, LIU Feng-qun, ZHANG Zhuo-yong](#) 小叶黑柴胡茎叶总黄酮对ANIT所致肝内胆胆汁淤积大鼠的影响[期刊论文]-[中国药理学通报](#)2010, 26(6)
7. [周伟, 蔡光明, 何桂霞, 刘鄂湖, 杜方麓, ZHOU Wei, CAI Guang-Ming, HE Gui-Xia, LIU E-Hu, DU Fang-Lu](#) 小叶黑柴胡茎叶中的黄酮类成分[期刊论文]-[中国天然药物](#)2006, 4(5)
8. [胡双丰, HU Shuang-feng](#) 柴胡与其混淆品小叶黑柴胡及锥叶柴胡的鉴别[期刊论文]-[药学实践杂志](#)2006, 24(4)
9. [刘秀芳, 詹雪晶, 蔡光明, 张卓勇, 刘峰群, LIU Xiu-fang, ZHAN Xue-jing, CAI Guang-ming, ZHANG Zhuo-yong, LIU Feng-qun](#) 小叶黑柴胡茎叶总黄酮对小鼠免疫性肝损伤的影响[期刊论文]-[中南药学](#)2011, 09(2)
10. [李敏, 张娜, 黄丝郁](#)金HPLC指纹图谱初步研究[会议论文]-2008

引证文献(3条)

1. [李进, 陈涛, 王洋, 宋洁瑾, 马志平, 孟萌](#) 陇西产黄芪药材HPLC-DAD-ELSD指纹图谱的研究[期刊论文]-[中草药](#) 2009(5)
2. [陈佩, 翟宇, 贺凯, 王坤, 王英华](#) 宁夏栽培柴胡高效液相色谱指纹图谱的研究[期刊论文]-[宁夏医学杂志](#) 2011(2)
3. [何晋浙, 黄霄芸, 张安强, 孙培龙, 灵芝醇提生物活性物质的指纹图谱分析及质控评价](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2011(6)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200810037.aspx