

桔梗的 HPLC-ELSD 指纹图谱研究

李文庭¹, 祝明^{2*}, 马临科², 程勇³

(1. 浙江中医药大学药学院, 杭州 310053; 2. 浙江省食品药品检验所, 杭州 310004; 3. 浙江天草生物制品有限公司, 浙江安吉 313300)

[摘要] 目的:建立桔梗高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)指纹图谱的分析方法,研究不同产地桔梗药材的质量。方法:采用 HPLC-ELSD, Welch Materials XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 甲酸溶液, 梯度洗脱, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, ELSD 检测器漂移管温度 50 °C, 氮气流速 1.2 L·min⁻¹。结果:建立了 12 批桔梗的 HPLC-ELSD 指纹图谱, 共找到 16 个共有峰, 并确定了桔梗皂苷 E, 桔梗皂苷 D3 和桔梗皂苷 D。结论:该方法具有良好的重复性和稳定性, 为有效控制桔梗药材的质量提供了依据。

[关键词] 桔梗; 指纹图谱; 高效液相色谱-蒸发光检测法; 桔梗皂苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)22-0050-04

Fingerprint Analysis of Platycodonis Radix by HPLC-ELSD

LI Wen-ting¹, ZHU Ming^{2*}, MA Lin-ke², CHENG Yong³

(1. College of Pharmacy, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China;
2. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China;
3. Zhejiang Skyherb Ingredients Co., Ltd, Anji 313300, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method of fingerprint analysis for Platycodonis Radix by high performance liquid chromatography-evaporative light-scattering detector (HPLC-ELSD). **Method:** HPLC was performed on a Welch Materials XB-C₁₈ analytical column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with gradient elution of

[收稿日期] 20110525(006)

[第一作者] 李文庭, 硕士研究生, 从事中药有效成分及质量标准研究, Tel: 0571-86459414, E-mail: liwenting05@163.com

[通讯作者] * 祝明, 主任中药师, 研究生导师, 从事中药有效成分及质量标准研究, Tel: 0571-86459425, E-mail: zhumingd@hotmail.com

表 1 马钱苷含量测定 mg·g⁻¹

No	批号	马钱苷
1	100820	2.27
2	101120	1.89
3	101123	1.81
4	101125	1.90
5	110506	1.24
6	110519	1.71

中马钱苷含量控制方法, 重复性和准确性好, 经对多批中试产品检验, 结果表明可以有效的控制益髓生血颗粒的质量。

[参考文献]

[1] 柴立民, 陈惠民, 吴志奎. 益髓生血方对珠蛋白生成障

碍性贫血患者红系特异反式作用因子基因表达的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2011, 34(3):197.

[2] 冯筠, 毛春芹, 苏丹, 等. 三棱颗粒的质量标准研究 [J]. 中成药, 2007, 29(5):707.

[3] 施钧瀚, 牛晓静, 孙明明. 慢肝康丸的质量标准研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(16):42.

[4] 单玉荣. HPLC 法测定六味地黄口服液口中马钱苷的含量 [J]. 现代中药研究与实践, 2006, 20(6):44.

[5] 赵洪芝, 孟宪生, 叶挺祥, 等. 双波长融合 HPLC 测定六味地黄丸中马钱苷、丹皮酚的含量 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(19):2182.

[责任编辑 蔡仲德]

acetonitrile-0.1% formic acid at the flow rate of $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ with ELSD detector. The column temperature was maintained at $30 \text{ }^\circ\text{C}$, the temperature of drift tube was set at $50 \text{ }^\circ\text{C}$, and the gas flow (N_2) was set at $1.2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$.

Result: The HPLC-ELSD chromatographic fingerprint of chemical constituents was established from the 12 batches of *Platycodonis Radix* and it had 16 characteristic common peaks. **Conclusion:** The developed method is repeatable and stable, which is helpful to control the quality of *Platycodonis Radix*.

[**Key words**] *Platycodonis Radix*; fingerprint; HPLC-ELSD; platycodins

桔梗为桔梗科植物桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. 的干燥根,味苦、辛,性平,归肺经,有宣肺、利咽、祛痰、排脓之功效,用于咳嗽痰多,胸闷不畅,咽痛音哑,肺痈吐脓等症^[1],是临床常用中药。现代药理学研究表明,桔梗具有抗炎、祛痰、镇咳、抗溃疡、降血压、扩张血管、解热镇痛镇静、降血糖、抗胆碱、促进胆汁分泌、抗过敏及增强人体免疫力等作用^[2]。桔梗中主要有效成分为皂苷类,已发现的皂苷类成分近 40 种^[3]。近年来由于中药指纹图谱能全面反映中药整体质量,已成为控制中药质量的有效手段。本实验首次采用 HPLC-ELSD 法,结合桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 D3、桔梗皂苷 D 对照品为参照,建立不同产地 12 批桔梗样品特征指纹图谱。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Agilent-1200 系列高效液相色谱仪(G1322A 脱气机、G1313A 自动进样仪、G1316A 柱温箱)和 Agilent Chemstation 工作站, Alltech ELSD3300 检测器, METTLER AE240 型电子天平。

1.2 试药 桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 D3、桔梗皂苷 D 对照品,由韩国 B&C Biopharm 公司提供。桔梗药材(浙江天草生物制品有限公司)8 批,其中 1~3 批来自山东泗水,4~5 批来自浙江磐安,6~8 批来自吉林通化,4 批浙江省药品检验所检品,来自安徽太和,经本所郭增喜副主任中药师鉴定,为桔梗 *P. grandiflorum*。

乙腈为色谱纯,水为注射用水,甲醇为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Welch Materials XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸溶液(B),梯度洗脱 0~15 min, 20%~23% A, 15~24 min, 23%~25% A, 24~54 min 25%~26.5% A, 54~64 min, 26.5%~33% A, 64~80 min, 33%~90% A;流速 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$,进样量 20 μL。

2.2 混合对照品溶液的制备 分别精密称取桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 D3、桔梗皂苷 D 对照品适量,加 50% 甲醇制成 $485.6, 381.8, 386.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取桔梗药材,粉碎,过二号筛,精密称取 2 g,置于锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 50 mL,超声提取 30 min,过滤,精密吸取 25 mL,蒸干,50% 甲醇定容至 5 mL 量瓶,过 $0.45 \text{ } \mu\text{m}$ 微孔滤膜,进样 20 μL。

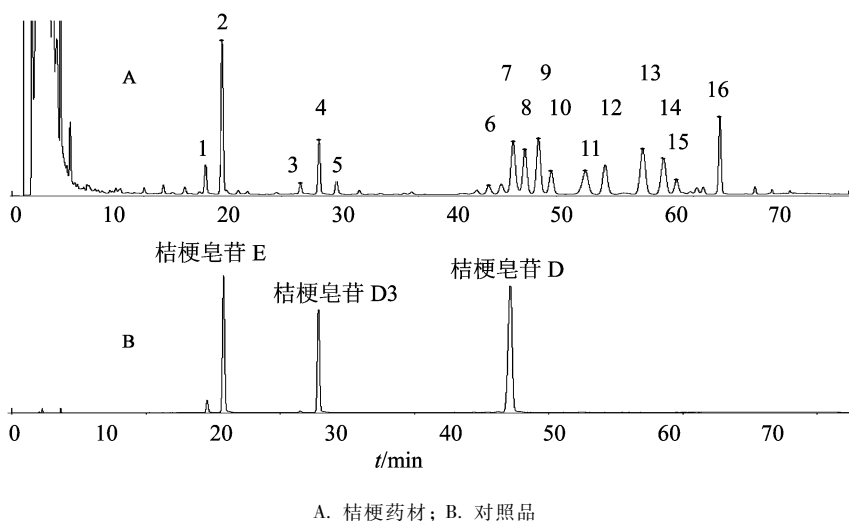
2.4 精密度 取同一批次桔梗样品,按 2.1 项下条件连续进样 6 次,结果各共有峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 均 < 3%,表明精密度良好。

2.5 稳定性 取同一批次下桔梗样品,条件分别在 0, 1.5, 3, 6, 9, 12, 18, 24 h 内进样,结果各共有峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 均 < 3%,试验结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.6 重复性 取同一批次桔梗药材 6 份,依 2.3 项下方法分别制备供试品溶液,条件测定,结果各共有峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 均 < 3%,结果表明重复性良好。

2.7 指纹图谱的建立与分析 按所建立的测定条件对 12 批桔梗药材样品进行测定。其典型的 HPLC 色谱指纹图谱有 16 个主要的共有峰,经对照品比对,确定 2 号峰对应为桔梗皂苷 E, 4 号峰对应为桔梗皂苷 D3, 7 号峰对应为桔梗皂苷 D,本实验选择 4 号峰为参照峰 S,此峰为所有桔梗样品所共有,然后分别求出各特征峰的保留时间之比。按色谱条件测定,结果见图 1,表 1。

2.8 样品的测定 取 12 批桔梗药材,按照依 2.3 项下方法分别制备供试品溶液,在所建立的测定条件下测定,记录色谱图,见图 2。指纹图谱相似度分析采用国家药典委员会中药指纹图谱相似度软件计算均值相似度,以 12 批桔梗药材测定结果拟定桔梗 HPLC-ELSD 指纹图谱的共有模式,并以此共有模式为对照,计算各批次桔梗药材的相似度,见表 2。



A. 桔梗药材; B. 对照品

图 1 桔梗和对照品的 HPLC

表 1 不同批次桔梗共有峰相对保留时间

峰号	批次												平均值	RSD/%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	0.392 5	0.393 3	0.392 9	0.392 2	0.392 3	0.392 1	0.392 7	0.391 6	0.392 5	0.394 7	0.393 1	0.393 9	0.392 8	0.22
2	0.424 8	0.425 5	0.425 1	0.424 5	0.424 5	0.424 6	0.425 0	0.424 2	0.424 9	0.427 1	0.425 7	0.426 6	0.425 2	0.21
3	0.579 3	0.580 3	0.580 5	0.579 4	0.579 1	0.579 8	0.580 5	0.579 6	0.580 2	0.582 2	0.581 3	0.570 3	0.579 4	0.52
4	0.615 8	0.616 4	0.616 5	0.615 3	0.615 6	0.616 6	0.617 3	0.616 1	0.617 0	0.619 1	0.618 1	0.617 8	0.616 8	0.18
5	0.650 7	0.651 1	0.651 0	0.649 6	0.650 6	0.651 6	0.652 1	0.650 8	0.651 8	0.653 4	0.651 9	0.652 1	0.651 4	0.15
6	0.950 9	0.950 0	0.953 3	0.954 1	0.950 9	0.952 7	0.952 9	0.950 9	0.952 2	0.952 0	0.951 4	0.951 3	0.951 9	0.13
7	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.00
8	1.024 5	1.022 6	1.024 0	1.024 0	1.023 3	1.023 3	1.025 5	1.023 5	1.022 4	1.022 8	1.023 4	1.022 5	1.023 5	0.09
9	1.050 2	1.048 9	1.050 3	1.050 2	1.049 8	1.050 2	1.052 0	1.050 3	1.050 3	1.049 4	1.049 7	1.049 2	1.050 0	0.07
10	1.076 2	1.074 8	1.074 8	1.075 6	1.076 2	1.076 4	1.076 7	1.076 2	1.074 9	1.074 4	1.074 6	1.073 7	1.075 4	0.09
11	1.145 7	1.144 1	1.144 7	1.137 0	1.145 7	1.140 5	1.141 8	1.140 4	1.143 7	1.143 2	1.144 5	1.142 0	1.142 8	0.22
12	1.182 4	1.180 6	1.181 5	1.182 5	1.182 1	1.183 2	1.182 0	1.181 4	1.181 5	1.180 7	1.181 3	1.181 2	1.181 7	0.06
13	1.255 7	1.254 1	1.255 1	1.255 4	1.255 7	1.258 3	1.257 0	1.257 8	1.256 0	1.256 7	1.257 3	1.253 1	1.256 0	0.12
14	1.297 0	1.294 3	1.295 4	1.296 2	1.298 5	1.298 5	1.298 3	1.298 6	1.297 5	1.297 0	1.297 9	1.294 5	1.297 0	0.12
15	1.321 1	1.319 6	1.321 2	1.321 3	1.323 4	1.324 0	1.324 7	1.322 8	1.323 5	1.323 9	1.324 2	1.321 6	1.322 6	0.12
16	1.403 8	1.404 9	1.407 0	1.406 2	1.407 1	1.409 3	1.409 2	1.406 4	1.409 8	1.410 6	1.413 5	1.411 9	1.408 3	0.21

3 讨论

3.1 测定方法的选择 有国内学者用 HPLC-UV 法以桔梗皂苷 D 为对照建立桔梗药材指纹图谱,检测波长为 210 nm^[4-6]。桔梗中主要活性成分为桔梗皂苷,由于桔梗皂苷无强发色基团,采用紫外检测器,检测波长接近截止波长,末端吸收干扰较大,响应值低。ELSD 检测器为通用型检测器,适合检测无紫外吸收或弱紫外吸收的物质成分。同时 2010 年版《中

国药典》桔梗项下对桔梗皂苷 D 的含量测定选用 HPLC-ELSD 法^[1],且未见文献报道用 HPLC-ELSD 建立桔梗的指纹图谱,故本文选择 HPLC-ELSD 法建立指纹图谱。

3.2 供试品溶液的制备 以水、不同比例的甲醇、乙醇,用回流、索氏提取、超声对提取方法进行比较。结果表明以 50% 甲醇超声处理 30 min,样品提取效果好,且操作简便。

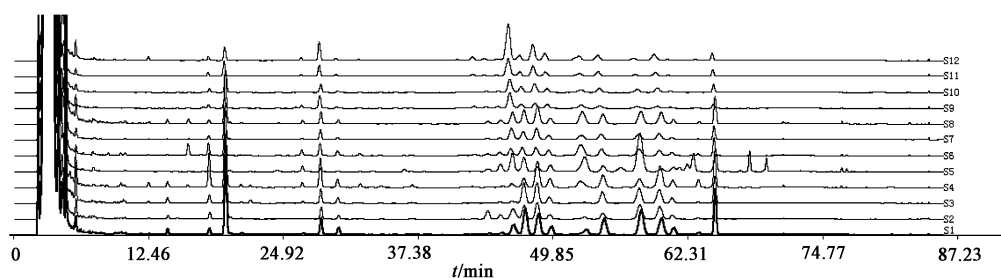


图2 桔梗 HPLC 指纹图谱

表2 不同产地桔梗指纹图谱相似度计算

批次	产地	相似度
1	山东泗水	0.902
2	山东泗水	0.917
3	山东泗水	0.863
4	浙江磐安	0.757
5	浙江磐安	0.963
6	吉林通化	0.962
7	吉林通化	0.890
8	吉林通化	0.930
9	安徽太和	0.926
10	安徽太和	0.919
11	安徽太和	0.948
12	安徽太和	0.932

3.3 色谱条件的选择 考察了甲醇-水、甲醇-0.1%甲酸、乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸等流动相,最终确定以乙腈-0.1%甲酸梯度洗脱。

3.4 ELSD 检测器参数的设定 根据仪器推荐的参数,在一定范围内经反复实验。最终确定 ELSD 检测器的参数为氮气流速 $1.2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$,漂移管温度为 $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

3.5 色谱柱考察 比较了 Welch XB- C_{18} , Kromasil KR100-5 C_{18} , Diamonsil C_{18} 及 Agilent Extend C_{18} , 结

果表明以上色谱柱均能使主要色谱峰得到较好分离。

本文用 HPLC-ELSD 法对不同产地 12 批桔梗进行指纹图谱分析,结果表明不同产地桔梗的指纹图谱较为吻合,除一批样品由于峰面积差异较大,相似度较低,其余样品相似度均在 0.85 以上。桔梗的有效成分桔梗皂苷在色谱图中能充分体现。本方法可操作性及专属性较强,可作为桔梗内在质量控制的评价方法。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S]. 2010: 259.
- [2] 舒雯,高山林. 桔梗研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2001, 20(2): 4.
- [3] 金在久. 桔梗的化学成分及药理和临床研究进展[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(2): 506.
- [4] 李喜凤,杜云锋,谢新年,等. 不同产地桔梗药材 HPLC 指纹图谱及桔梗皂苷 D 含量测定研究[J]. 中成药, 2010, 32(4): 529.
- [5] 杨海玲,张振凌,李俊雅,等. 河南省不同产区桔梗饮片 HPLC 指纹图谱研究[J]. 河南科技, 2010, 5: 66.
- [6] 李喜凤,杜云锋,谢新年,等. 不同采收期桔梗 HPLC 指纹图谱比较研究[J]. 中成药, 2010, 32(4): 353.

[责任编辑 蔡仲德]