

江西大粒车前子不同炮制品 HPLC 指纹图谱研究

★ 刘荣华 马志林 邵峰 王玲 (江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室 南昌 330004)

摘要:目的:研究不同炮制方法对江西大粒车前子 HPLC 指纹图谱的影响。方法:采用 HPLC 法,对江西大粒车前子的微波炮制品、清炒品、盐炙品以及生品的水提液进行指纹图谱研究。结果:不同炮制品之间 HPLC 指纹图谱相似度和共有峰面积差异显著;微波炮制品指纹图谱总峰面积大于其它三种炮制品,其顺序依次为:微波品>清炒品>盐炙品>生品。表明不同炮制方法对化学成分有较大的影响,其中微波炮制品对化学成分影响最大。结论:不同炮制方法对江西大粒车前子 HPLC 指纹图谱存在较大的影响,因此,可以利用 HPLC 指纹图谱对大粒车前子炮制工艺进行控制。

关键词:江西大粒;车前子;高效液相;指纹图谱

中图分类号:R 460.6⁺2 **文献标识码:**A

车前子为车前科植物车前 *Plantago asiatica* L 和平车前 *Plantago depressa* Willd. 的干燥成熟种子,用于目赤肿痛、痰热咳嗽、水肿胀满、热淋涩痛、暑湿泄泻等。药理研究表明:其多糖具有缓泻的功能;车前子苷有镇咳作用,促使支气管及消化道的分泌,促进肠管和子宫的运动等功效;桃叶珊瑚苷具有清湿热、利小便、镇痛、降压、保肝护肝、抗肿瘤等作用^[1]。江西大粒车前为我国地道药材,但迄今为止还存在不同的炮制方法,其炮制品质量存在明显的差异。因此,本实验利用 HPLC 指纹图谱对各种不同炮制品质量进行分析,为车前子药材炮制方法的科学化、规范化提供理论依据。

1 材料与仪器

1.2 材料 药材:江西大粒车前子生品购自江中中药饮片厂,由刘荣华博士鉴定,凭证标本存于江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室标本室。

对照品:车前子苷购于江西中医学院江西省中药种质资源工程技术研究中心,自制,纯度≥95%。

试剂:乙腈(色谱纯,美国 TEDIA 公司),甲醇(色谱纯,山东禹王试剂公司),双蒸水(自制)。

1.1 仪器 Agilent 1200 高效液相色谱仪,紫外检测器(VWD)(Agilent 科技有限公司);HHS 型电热恒温水浴锅(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);111 型二两装高速中药粉碎机(浙江瑞安市永历制药机械有限公司);微波炉(Galanz-wp800T);SIGMA1-15 型台式高速离心机(德国 SIGMA 公司)。

2 实验方法

2.1 样品制备

2.1.1 车前子炮制 车前子炮制方法如下:(1)净制车前子:除去枝、梗等杂质;(2)清炒车前子:将净车前子,用文火炒至表面微黄;(3)盐车前子:取净车前子置热锅中,炒至有爆裂声时,喷洒盐水,炒干^[2];(4)微波车前子:取净车前子平铺于垫有称量纸的微波炉转盘上,确保其均匀平铺约 1 cm;

设置微波炉条件为:中低火、炮制时间为 3 分钟。

2.1.2 供试品制备 精密称取车前子药材生品、清炒品、盐炙品、微波炮制品各 10 g,用粉碎机粉碎 2 分钟,然后置于 150 ml 圆底烧瓶中,再加入 100 ml 水,摇匀。在 90 ℃ 下,水浴加热 30 分钟后,静置冷却,离心 10 分钟(转速 5 000 r/min),过滤,得滤液。将滤液过大孔树脂 HPD-500,水洗除糖,以 70% 乙醇洗脱,收集乙醇洗脱液 90 ℃ 水浴充分干燥;甲醇定溶于 5 ml 容量瓶中,用时经 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

2.1.3 车前子苷对照品溶液制备 精密称定车前子苷 0.5 mg,甲醇定溶于 2 ml 容量瓶中。

2.2 色谱条件

色谱柱:Hypersil ODS2 C₁₈, 4.6 μm × 200 mm, 5 μm(大连依利特公司);检测波长:288 nm,流速:1 ml/min,柱温:25 ℃,进样量:10 μl;流动相:水-乙腈,梯度洗脱,见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱条件

	Mobile phase		
	Time (min)	ACN (%)	H ₂ O (%)
The gradient mode	0	5	95
	17	17	83
	24	20	80
	41	32	68
	56	63	37
	63	63	37

2.3 方法学考察

2.3.1 空白试验 按以上色谱条件,吸取空白溶剂甲醇 10 μl 进样,检测得色谱图,结果显示为一条直线。表明空白溶剂无干扰现象。

2.3.2 稳定性实验 取车前子生品供试液,按以上色谱条件分别于 0.3、6、9、12 小时检测其指纹图谱。结果表明,各主要色谱峰的相对保留时间与相对峰面积比值的 RSD 值分别在 0.34% ~ 1.92% 与 1.43% ~ 3.84% 之间,说明样品在 12 小时内较稳定。

2.3.3 精密度实验 取微波炮制供试品溶液,按以上色谱条件连续进样 5 次。结果表明,各色谱峰的相对保留时间稳定,各主要色谱峰的相对保留时间与相对峰面积比值的相对标准偏差 *RSD* 值分别在 0.97% ~ 2.19% 与 2.31% ~ 4.92% 之间,说明仪器精密度较好。

2.3.4 重复性实验 取车前子盐炙品 5 份,分别按 2.1.2 法制备成供试品溶液,按以上色谱条件测定,结果表明,各色谱峰的相对保留时间稳定,各主要色谱峰的相对保留时间与相对峰面积比值的相对标准偏差 *RSD* 值分别在 0.78% ~ 1.83% 与 2.06% ~ 5.07% 之间,说明方法重现性较好。

3 结果与讨论

3.1 车前子指纹图谱色谱测定及共有峰的标定^[3]

按以上色谱条件,分别测定车前子药材生品、清炒品、盐炙品、微波炮制品水提液的指纹图谱,从该组指纹图谱中,确定其中的 12 个色谱峰为共有峰。

3.2 共有峰相对保留时间及峰面积比较

表 2 车前子各供试品 HPLC 指纹图谱共有峰的相对保留时间

样品	Peak1	Peak2	Peak3	Peak4	Peak5	Peak6	Peak7	Peak8	Peak9	Peak10	Peak11	Peak12
生品	0.1082	0.1203	0.1322	0.2943	0.9941	1.1019	1.2002	1.9732	2.1294	2.2304	2.2836	2.5158
盐炙品	0.1074	0.1200	0.1298	0.2941	0.9990	1.1003	1.2011	1.9801	2.1287	2.2357	2.2892	2.5169
清炒品	0.1088	0.1219	0.1318	0.2947	1.0031	1.1102	1.2037	1.9805	2.1301	2.2369	2.2888	2.5207
微波品	0.1092	0.1231	0.1327	0.2985	1.0105	1.1173	1.2061	1.9834	2.1360	2.2401	2.2908	2.5194
平均值	0.1084	0.1213	0.1316	0.2954	1.0017	1.1074	1.2028	1.9793	2.1311	2.2358	2.2881	2.5182
<i>RSD</i> (%)	0.73	0.95	0.57	0.82	0.36	1.53	1.81	1.14	1.29	1.08	1.26	1.07

表 3 车前子各供试品 HPLC 指纹图谱共有峰的相对峰面积

样品	Peak1	Peak2	Peak3	Peak4	Peak5	Peak6	Peak7	Peak8	Peak9	Peak10	Peak11	Peak12
生品	0.1123	0.0342	0.0534	0.0599	1.4616	0.6229	0.0251	0.0184	0.0911	0.0585	0.0291	0.0334
盐炙品	0.1334	0.0459	0.0579	0.0721	1.5836	0.4237	0.0283	0.0206	0.1134	0.0687	0.0438	0.0407
清炒品	0.1699	0.0671	0.0639	0.0830	1.9824	0.2419	0.0335	0.0416	0.1734	0.0731	0.0550	0.0512
微波品	0.1587	0.0653	0.0621	0.0801	2.1842	0.4661	0.0351	0.0408	0.1896	0.0725	0.0533	0.0508

表 4 车前子各供试品 HPLC 指纹图谱共有峰的相对总峰面积

车前子样品	生品	盐炙品	清炒品	微波品
共有峰相对总峰面积	2.5999	2.8813	3.1178	3.4586

3.3 车前子指纹图谱相似度分析

以共有模式图谱为参照,通过《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件 2004A 版》计算得到四种供试品指纹图谱的相似度。结果见表 5。从表 5 可以看出,车前子不同炮制品水提液指纹图谱相似度差异很大,微波炮制品尤为明显,与其它炮制品及生品的相似度既然小于 0.2,这进一步表明不同炮制方法对车前子水提液化学成分有很大的影响。

表 5 四种炮制品相似度结果

样品名称	车前子生品	清炒品	盐炙品	微波品	对照指纹图谱
车前子生品	1.000	—	—	—	—
清炒品	0.894	1.000	—	—	—
盐炙品	0.936	0.967	1.000	—	—
微波品	0.153	0.050	0.092	1.000	—
对照指纹图谱	0.956	0.853	0.922	0.189	1.000

4 小结

根据所测定的四种供试品指纹图谱,选择车前子昔色谱峰为参照峰 S^[4],将其保留时间和峰面积设为 1,其它指纹峰保留时间和峰面积与其相比得相对保留时间和相对峰面积。据此,上述 12 个共有峰的相对保留时间与相对峰面积见表 2,表 3。

从表 3 可见,12 个共有峰中,5 号峰峰面积占各供试品指纹图谱总峰面积的 60% 以上,而且该峰在各供试品中变化最明显,微波炮制品中 5 号峰与其它炮制品及生品相比,明显增高,5 号峰峰面积顺为:微波品 > 炒炙品 > 盐炙品 > 生品。而生品中的第二大峰 6 号峰在炮制品中却明显降低,尤其是在炒炙品中,6 号峰几乎完全消失了,6 号峰峰面积顺为:生品 > 微波品 > 盐炙品 > 清炒品。除 5 号、6 号共有峰外,总面积的变化也比较大,依次为:微波 > 清炒品 > 盐炙品 > 生品,见表 4。表明,不同炮制方法,对车前子水提液化学成分有很大的影响。

中药炮制是中药饮片发挥疗效的重要手段,但由于很多药材的炮制只是凭经验,缺乏科学的指导,致使中药材炮制方法不规范。本研究针对江西道地药材大粒车前子不同炮制工艺,利用 HPLC 指纹图谱技术,通过对其共有峰及指纹图谱相似度分析,充分显示了不同炮制工艺条件下车前子的质量差异。这表明 HPLC 指纹图谱技术在中药炮制品质量控制方面具有优势。本研究旨在为中药材炮制工艺规范化提供科学依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中国药典(2005 版) I 部[S]. 北京:化学工业出版社,2005:46.
- [2] 杨培民. 车前子炮制程度的比较[J]. 中药材,1999,22(9):454-455.
- [3] 范志刚. 不同炮制方法对黄芩中黄芩苷含量的影响[J]. 中华医学研究与实践,2004,2(8):13-14.
- [4] 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)[S]. 中成药,2000,22(10):391.

(收稿日期:2007-11-16)