

· 论著 ·

红参高效液相色谱指纹图谱研究

高燕霞¹, 苏娟², 金慧子¹ (1. 上海交通大学药学院, 上海 200240; 2. 第二军医大学药学院, 上海 200433)

[摘要] 目的 建立红参药材高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,为其质量评价提供依据。方法 Sharpsil-T C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);以乙腈-水为流动相梯度洗脱;柱温为 30 ℃;流速为 1.0 ml/min;检测波长为 203 nm。结果 以人参皂苷 Rb1 为参照峰,建立 10 批红参的对照指纹图谱,识别出 24 个共有峰,其相似度均大于 0.940。通过质谱推断、对照品比对确证了其中 11 个共有峰。结论 该方法操作简便、准确可靠、重复性较好,为红参药材的质量控制提供了有效手段。

[关键词] 红参; 高效液相色谱法; 指纹图谱

[中图分类号] R917

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2016)03-0249-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.03.014

Study on HPLC fingerprint of *Ginseng Radix et Rhizoma Rubra*

GAO Yanxia¹, SU Juan², JIN Huizi¹ (1. School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China; 2. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To establish the HPLC fingerprint of *Ginseng Radix et Rhizoma Rubra* for its quality control. **Methods** Sharpsil-T C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used with acetonitrile-water in gradient elution mode. The flow rate was 1.0 ml/min, the column temperature was maintained at 30 ℃, and the detective wavelength was 203 nm. **Results** 24 co-possessing peaks were selected as fingerprint peaks and the similarities between each of the ten areas and the standard chromatographic fingerprints of *Panax ginseng Rubra* were calculated while Rb1 peak selected as the reference peak. The similarity was more than 0.940. Eleven chemical compounds were identified by comparing the reference substance. **Conclusion** The method could be used for the quality control of *Panax ginseng Rubra* with good precision, stability, and reproducibility.

[Key words] *Ginseng Radix et Rhizoma Rubra*; HPLC; fingerprint

红参(*Ginseng Radix et Rhizoma Rubra*)为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的栽培品经蒸制后的干燥根和根茎。秋季采挖,洗净,蒸制后,干燥。其味甘,微苦,性温,归脾、肺、心、肾经,具大补元气、复脉固脱、益气摄血之功。用于体虚欲脱、肢冷脉微、气不摄血、崩漏下血^[1]。

红参主要含有皂苷类、糖类及氨基酸类等化学成分,人参皂苷是其主要活性成分。红参质量的不同会造成其成品质量的差异,为保证制剂质量的稳定性,有必要对红参药材进行指纹图谱研究。中药指纹图谱能从整体上表征复杂的化学物质,近年来已成为国内外广泛接受的质量评价模式^[2]。以往建立的红参 HPLC 指纹图谱^[3-5],药材提取率较低,色

谱峰分离度不高,未对共有峰的特征进行细致分析。笔者根据红参中人参皂苷类成分的性质,用 75% 乙醇回流提取药材,建立液相色谱紫外检测的指纹图谱分析方法;并采用液相色谱离子阱质谱技术对主要色谱峰进行指认,建立了适用于红参药材质量评价的指纹图谱方法。

1 仪器与材料

Agilent 1100 液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Agilent 1100 Series LC/MSD Trap XCT 电喷雾质谱检测器(美国 Agilent 公司);BP211D 电子天平(德国 Sartorius 公司);数显恒温水浴锅(上海梅香仪器有限公司)。

人参皂苷 Rg1、Re、Rb1、Rf、Rc、Rh1、Rd、(R) Rg3、(S)Rg3,均购于中国药品生物制品鉴定所;人参皂苷 Rh4 购于成都普菲德生物技术有限公司;人参皂苷 Rg6 和人参皂苷 Rk1 购于上海源叶生物科技有限公司;10 批红参药材(批号 130301、130302、130303、130304、130305、130306、130202、130203、

[基金项目] 上海市科学技术委员会产学研医合作项目(12DZ1970200)

[作者简介] 高燕霞,硕士研究生。研究方向:药物分析。Tel: 14782134521;E-mail: gyx0727@126.com

[通讯作者] 金慧子,博士,副教授,硕士生导师。研究方向:天然产物提取分离。Tel: 021-34205989;E-mail: kimhz@sju.edu.cn

W121002、W12070102)均由上海和黄药业有限公司提供,产地为辽宁抚顺;乙腈为色谱纯(美国 Fisher 公司),水为 Milli-Q 超纯水,甲醇、乙醇为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Sharpsil-T C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),以乙腈-水为流动相,按表 1 程序梯度洗脱;柱温 30 ℃;流速 1.0 ml/min;检测波长 203 nm;进样量为 20 μl。

表 1 流动相梯度洗脱条件

时间 (t/min)	乙腈 (%)	水 (%)	时间 (t/min)	乙腈 (%)	水 (%)
0	21	79	43	34	66
22	21	79	49	45	55
23	20	80	53	45	55
26	23	77	66	74	26
30	28	72	71	85	15
33	34	66	76	95	5

2.2 质谱条件 离子源:ESI;扫描方式:负离子扫描;喷雾气体:高纯度氮气(N₂),35 psi;载气:氮气,流速 12 L/min;碰撞气体:氮气;毛细管温度:350 ℃;HV 电压:3 500 V;扫描范围:200~1 500 m/z;碰撞能量:0.3~2 V。

2.3 对照品溶液的制备 取人参皂苷 Rg1、Re、Rf、Rb1、Rc、Rd、Rh4、Rg6、(R)Rg3、(S)Rg3 和 Rk1 对照品适量,精密称定,分别加甲醇配成适当质量浓度的对照品溶液;分别量取适量不同成分的对照品溶液制成混合对照品溶液,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.4 供试品溶液的制备 取红参药材粗粉 5.0 g,精密称定,置 100 ml 圆底烧瓶中,加 75% 乙醇 50 ml 浸泡 3 h 后于 85 ℃ 水浴加热回流 2.5 h,滤过,药渣加 75% 乙醇 50 ml 继续回流提取 2.5 h,合并 2 次滤液,滤液用乙醇定容于 100 ml 容量瓶,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 精密称定红参粗粉(批号 130301)5.0 g,按“2.4”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下条件连续进样 6 次,记录色谱图,以人参皂苷 Rb1 为参照峰,考察各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD。结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均<0.96%,相对峰面积的 RSD 均<2.97%,符合指纹图谱要求,表明仪器精密度良好。

2.5.2 重复性试验 精密称定红参粗粉 6 份(批号 130302),每份 5.0 g,按“2.4”项下方法分别制备成供试品溶液,按“2.1”项下条件进样分析,以人参皂苷 Rb1 为参照峰,结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均<1.15%,相对峰面积的 RSD 均<3.34%,符合指纹图谱要求,表明重复性良好。

2.5.3 稳定性试验 取“2.5.1”项下的供试品溶液,按“2.1”项下方法操作,分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样,测得其各共有峰相对保留时间 RSD 均<0.67%,相对峰面积的 RSD 均<3.58%,表明样品在 24 h 内稳定。

2.6 样品指纹图谱测定 取 10 批红参样品,按“2.4”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项下的色谱条件下依次进样检测,记录色谱图,共获得 24 个共有峰;通过质谱中分子离子峰和碎片离子峰的分子量匹配,结合标准品各峰保留时间定位对各峰进行指认,共指认 11 个色谱峰。混合对照品和红参样品色谱图见图 1。11 个色谱峰化学成分质谱归属结果见表 2。

2.7 特征指纹图谱的建立

2.7.1 参照峰的选择 在 10 批次红参 HPLC 色谱图中,人参皂苷 Rb1 的色谱峰(5 号峰)与相邻峰分离度良好,峰位居中,峰面积较大且为所有样品共有,因此将人参皂苷 Rb1 作为参照峰。

2.7.2 指纹图谱共有模式的建立 将 10 批次红参样品色谱图导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004A 版),建立了红参药材的指纹图谱共有模式图,结果见图 2。

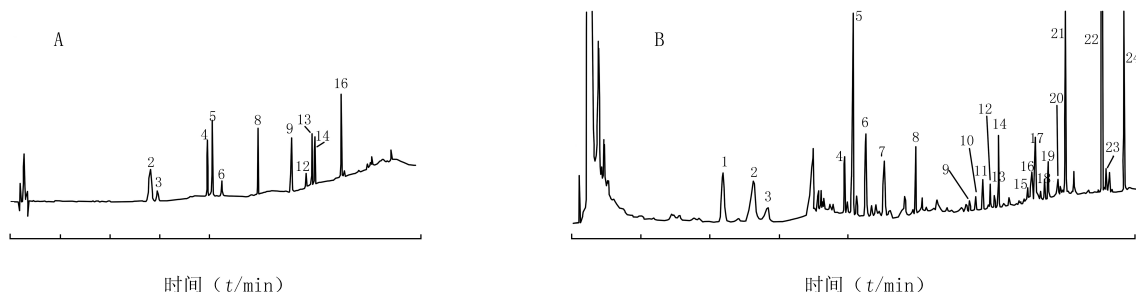


图 1 对照品(A)和红参样品(B)的 HPLC 色谱图

人参皂苷:2 .Rg1;3 .Re;4 .Rf;5 .Rb1;6 .Rc;8 .Rd;9 .Rg6;12 .Rh4;13 .(R)Rg3;14 .(S)Rg3;16 .Rk1

表2 红参药材指纹图谱化学成分质谱归属

峰号	保留时间 (t_R /min)	相对分子质量	分子离子峰 [M-H] ⁻	MS/MS (m/z)	鉴定的化合物
2	28.183	800	799.5	637.3, 475.3	人参皂苷 Rg1
3	29.62	946	945.5	637.4, 783.5, 475.3	人参皂苷 Re
4	39.624	800	799.4	637.3, 475.3, 391.2	人参皂苷 Rf
5	40.692	1 108	1 107.5	946.4, 783.5, 621.3	人参皂苷 Rb1
6	42.592	1 078	1 077.5	945.5, 783.5, 621.4	人参皂苷 Rc
8	49.843	946	945.5	783.4, 621.4, 459.3	人参皂苷 Rd
9	56.588	766	765.4	619.3, 457.5, 601.1	人参皂苷 Rg6
12	59.533	620	619.4	344.9, 571.8, 429.1	人参皂苷 Rh4
13	60.669	784	783.5	459.3, 537.2, 621.3	人参皂苷(R)Rg3
14	61.225	784	783.4	459.4, 621.3, 537.3	人参皂苷(S)Rg3
16	66.647	766	765.4	603.3	人参皂苷 Rk1

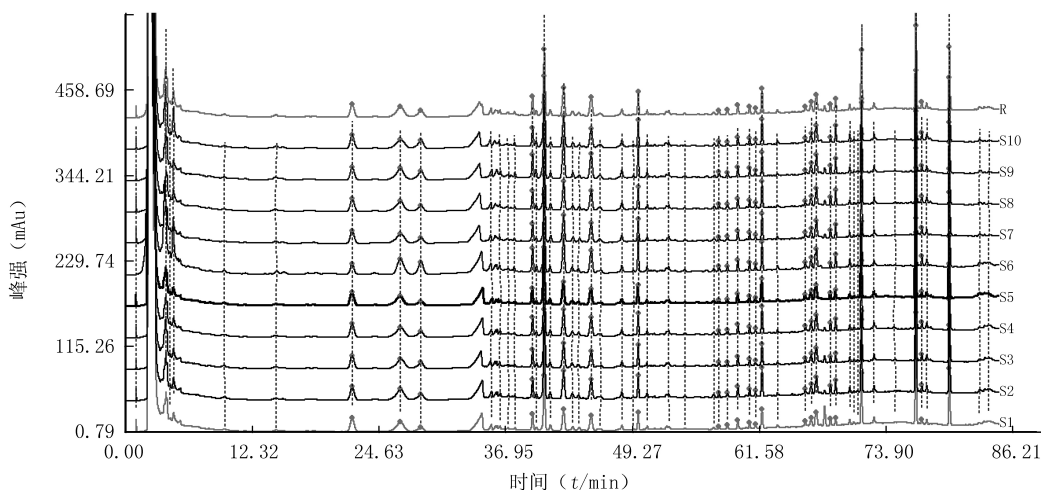


图2 10批红参药材的HPLC指纹图谱

2.7.3 指纹图谱相似度评价 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004A版),将10批红参药材指纹图谱数据导入,以第1批药材图谱作为参照谱进行指纹匹配,采用中位数法生成对照指纹图谱,然后将10批红参药材的指纹图谱与对照指纹图谱进行相似度计算,结果见表3。分析结果显示10批次的红参相似度均在0.940以上,表明各批次红参具有较高的相似度。

表3 10批红参药材的相似度结果

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.998	S6	0.945
S2	0.996	S7	0.999
S3	0.998	S8	0.975
S4	0.999	S9	1
S5	1	S10	1

3 讨论

3.1 提取条件的优化 在提取方法上,对药典方

法、回流提取法和超声提取法做了平行比较,结果表明药典方法虽然可以去除糖类成分的干扰,但是需经过索氏提取和超声等步骤,操作烦琐,且糖类成分在该研究条件下没有干扰;超声提取法虽然简单,但提取不完全;回流提取法操作简单方便,且通过比较不同提取溶剂和不同温度有利于优选条件,最后选择75%乙醇于85℃回流提取。

3.2 色谱条件的优化 在流动相的选择上,通过比较甲醇-水、乙腈-水和磷酸缓冲溶液,结果表明乙腈-水梯度洗脱效果较好;在色谱柱选择上,比较Waters SymmetryShield™ RP18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Sharspsil-T C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)和 Sharspsil-T C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 3种色谱柱,分析结果表明 Sharspsil-T C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)色谱柱各峰分离度更好,柱效更高。

该研究建立了红参HPLC指纹图谱,通过相似

(下转第254页)

4 建立纯化水的仪器检测方法

纯化水的检查中,除了电导率使用仪器进行分析外,其余均为容量分析。随着分析化学的进步,仪器分析越来越普及,相对于容量分析,利用仪器检测更加方便快捷,省时省力。在结果的准确性和重现性上,仪器分析亦更胜一筹。

在纯化水的检查中,仪器分析可以扮演重要角色,譬如酸碱度可应用 pH 计进行快速测定,取代精确度不高、影响因素较多的变色法。在 2010 年版《中国药典》中规定,10 ml 纯化水样品中加入甲基红指示液 2 滴,不得显红色,加溴麝香草酚蓝指示液 5 滴,不得显蓝色。甲基红的变色范围是 pH 4.4~6.2, pH 值越低,红色越明显。溴麝香草酚蓝的变色范围是 pH 6.0~7.6,变色范围内随 pH 升高,由黄色转变为蓝色。实际测定中,我们以上海市居民饮用水为样品,以实验室自制的去离子水为对照,以《中国药典》中规定的甲基红和溴麝香草酚蓝指示液进行变色法测定,凭借肉眼观察溶液颜色变化。由于个体对颜色的敏感度差异,实验组 6 位成员所得色差结论不一,重复实验 3 次并采纳多数意见,确定样品在甲基红指示液加入后呈淡黄色,溴麝香草酚蓝指示液加入后呈淡绿色,与对照品相近,判定 pH 合格。

相较于烦琐且主观性较强的变色法,若以 pH 计测定,样品溶液的 pH 值可以精确至小数点后两位,且测量过程仅需数秒,结果更为客观可信。

5 结语

纯化水作为制药用水的一种,可用于配制诸多口服用药,并可进一步精制成为注射用水。纯化水

的快速检查是其制备中的重要环节,其效率和准确度至关重要。近几版《中国药典》中对纯化水的检查项目不断进行修订,但对每一检查项下的具体操作步骤和方法未进行过修改完善。笔者在进行野战制药用水制备的具体操作过程中,遇到了诸多不够明确的检查步骤和方法,给纯化水的检测带来困难。因而根据个人实际操作,并结合部分参考文献中的方法改进,汇成本文。为了保证药典的规范性、严谨性和先进性,纯化水的检查方法应结合分析化学的研究进展,不断修改及完善,确保检验结果的可靠及准确。

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2010 年版二部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:411-412.
- [2] 孙晶晶,柯云玲,邵益丹,等. 不同贮存条件对纯化水质量的影响[J]. 中国消毒学杂志,2014,31(4):353-356.
- [3] 梁 熠. 纯化水中亚硝酸盐检查商榷[J]. 中国药师,2012,15(1):126-127.
- [4] 邓雪玉,覃志高. 纯化水中氨检查商榷[J]. 中国药师,2012,15(3):434-435.
- [5] 史建勋,茅海琼. RFIC 法快速检查纯化水中 4 种阴离子[J]. 药物分析杂志,2011,31(1):135-137.
- [6] 庄华玲,李艳芳,吴国盛. 纯化水微生物限度检查方法的商榷[J]. 中国药师,2006,9(10):975.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2005 年版二部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2005:303.
- [8] 陈力奋,刘建国,屈晓萍,等. 用平皿法检测纯化水的微生物限度[J]. 海峡药学,2006,18(1):88-89.
- [9] 米海生. 纯化水系统的微生物控制[J]. 黑龙江科技信息,2012,26,14.

[收稿日期] 2015-01-15 [修回日期] 2015-05-15

[本文编辑] 顾文华

(上接第 251 页)

度计算分析可知各批次红参药材稳定性较高,可用于控制药材的质量,以保证制剂质量的稳定性,也为含红参制剂尤其是注射剂的指纹图谱研究提供参考依据。

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2010 年版一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:143.

- [2] 罗国安,王明义,曹 进,等. 建立我国现代中药质量标准体系的研究[J]. 世界科学技术-中药现代化,2002,4(4):5-11.
- [3] 刘唯芬,熊 英,幕善学,等. 红参 HPLC 指纹图谱研究[J]. 辽宁中医杂志,2009,36(7):1178-1179.
- [4] 蔡 萍,肖 娟,张水寒,等. 红参超微饮片的指纹图谱研究[J]. 中华中医药杂志,2011,26(7):1513-1515.
- [5] 郑 重,宋凤瑞,刘淑莹,等. 人参、红参皂苷类成分指纹图谱研究[J]. 质谱学报,2012,33(6):327-333.

[收稿日期] 2014-08-14 [修回日期] 2014-12-09

[本文编辑] 顾文华