

毛鸡骨草种子的HPLC指纹图谱研究

雷朝天^{1*},唐哲²,甄汉深^{3#}(1.国药控股广西有限公司,南宁 545005;2.解放军第303医院,南宁 454150;3.广西中医药大学药学院,南宁 530001)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)30-4264-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.30.31

摘要 目的:建立毛鸡骨草种子的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱。方法:采用HPLC法。色谱柱为Inertsil ODS-3 C₁₈,流动相为乙腈-0.1%磷酸(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为270 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μl。以相思子碱为参照物,对10批次毛鸡骨草种子采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件进行相似度分析。结果:10批次毛鸡骨草种子有12个共有峰,相似度均>0.9。经验证,毛鸡骨草种子的指纹图谱与对照指纹图谱具有较好的一致性。结论:所建立的指纹图谱可为毛鸡骨草种子的鉴别和质量评价提供参考。

关键词 毛鸡骨草种子;高效液相色谱法;指纹图谱

Study on the HPLC Fingerprint of *Abrus mollis* Seed

LEI Chao-tian¹, TANG Zhe², ZHEN Han-shen³(1.Sinopharm Holding Guangxi Co., Ltd., Nanning 545005, China; 2.303 Hospital of People's Liberation Army, Nanning 454150, China; 3.College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the HPLC fingerprint of *Abrus mollis* seed. METHODS: HPLC was performed on the column of Inertsil ODS-3 C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric acid (gradient elution) at flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 270 nm, column temperature was 30 ℃ and volume injection was 10 μl. With the reference of abrine, 10 batches of *A. mollis* seed were analyzed, and similarity evaluation was performed by using chromatographic fingerprint of TCM. RESULTS: There were totally 12 common peaks, and the similarity was more than 0.9. According to the verification, the fingerprint of *A. mollis* seed has good consistency with the reference fingerprint. CONCLUSIONS: The established fingerprint can provide reference for the identification and quality evaluation of *A. mollis* seed.

KEYWORDS *Abrus mollis* seed; HPLC; Fingerprint

毛鸡骨草 *Abrus mollis* 为豆科植物相思子属毛鸡骨草去除荚果后的干燥全草^[1],产于福建、广东、海南、广西等地^[2]。其味甘苦、性凉,有清热利湿、舒肝止痛、消积解暑、活血散瘀之功效,可用于传染性肝炎、小儿疳积的治疗;外用可治烧伤、烫伤、疮疖^[3]。

目前,对毛鸡骨草主要以其叶为研究对象^[4-6],毛鸡骨草种子的指纹图谱研究未见公开报道。本研究中,笔者对毛鸡骨草种子的指纹图谱进行研究,在为建立其质量控制标准提供参考的同时,也为其药材采收加工和规范化种植提供试验依据。

1 材料

1.1 仪器

1100型高效液相色谱仪,包括二级管阵列检测器(美国Agilent公司);SB3200T型超声波清洗仪(上海必能信超声有限公司);BP211D型十万分之一电子分析天平(德国Sartorius公司)。

1.2 试剂

相思子碱对照品(美国Sigma公司,纯度:99.93%);乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯水。

1.3 药材

毛鸡骨草种子于各产地采集(详见表1),经广西一心医药有限责任公司马利飞副主任药师鉴定为真品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

- 版.北京:中国医药科技出版社,2010:286.
- [2] 谢培山.中国药典中药薄层色谱彩色图集[M].广州:广东科技出版社,1993:87.
- [3] 沈于兰,栾洁,丁晴.TLC及HPLC法检测白带丸中黄柏的质量[J].安徽医药,2013,17(1):38.

- [4] 姚民惠.补肾丸中枸杞子与关黄柏的TLC鉴别研究[J].中国中医药咨讯,2010,11(2):251.
- [5] 席桂同,陈述.复方黄连素片中盐酸小檗碱含量测定[J].世界中医药,2015,10(2):252.
- [6] 余华丽,王伟影,毛菊华,等.兽药小香勾中补骨脂素的定性鉴别与含量测定[J].中国药房,2015,26(6):815.

* 主管药师。研究方向:中药学。E-mail: nnlctian@163.com
通信作者:教授。研究方向:中药学。电话:0771-3124407。
E-mail: 8zhen@163.com

(收稿日期:2015-06-06 修回日期:2015-07-28)
(编辑:张静)

表1 毛鸡骨草种子来源

Tab 1 Origins of *A. mollis* seed

编号	色谱图号	产地	编号	色谱图号	产地
1	s1	玉林	6	s6	横县
2	s2	百色	7	s7	崇左
3	s3	南宁老虎岭	8	s8	南宁四塘
4	s4	贵港	9	s9	武鸣
5	s5	钦州	10	s10	北海

色谱柱: Inertsil ODS-3 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.1%磷酸(B), 梯度洗脱(0~20 min, 5%→15% A; 20~35 min, 15%→35% A; 35~45 min, 35%→90% A; 45~50 min, 90% A); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 270 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取相思子碱对照品0.45 mg, 置于10 ml量瓶中, 用50%甲醇溶解并定容, 摇匀, 制得质量浓度为0.045 mg/ml的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密称取样品干燥粉末(将种子洗净, 于50 °C烘干, 粉碎, 过50目筛, 下同)1 g, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入50%甲醇20 ml, 超声(功率: 250 W, 频率: 40 kHz)提取60 min, 放冷, 用50%甲醇补足减失的质量, 经孔径为0.45 μm的微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取“2.2.1”项下对照品溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件连续进样6次测定, 记录峰面积。结果, 各共有峰相对保留时间的RSD为0.14%~0.78% (n=6), 相对峰面积的RSD为0.26%~0.85% (n=6), 表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取同一供试品溶液(编号: 1)适量, 分别于放置0、2、6、10、18、24 h时进样测定, 记录峰面积。结果, 各共有峰相对保留时间的RSD为0.33%~0.89% (n=6), 相对峰面积的RSD为0.15%~1.36% (n=6), 表明供试品溶液在24 h内基本稳定。

2.3.3 重复性试验 取同一批样品(编号: 1)适量, 共5份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 各共有峰相对保留时间的RSD为0.08%~0.79% (n=5), 相对峰面积的RSD为0.35%~1.54% (n=5), 表明本方法重复性良好。

2.4 指纹图谱的建立及共有峰的指认

2.4.1 指纹图谱的建立 取10批次毛鸡骨草种子适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 得特征指纹叠加图谱, 详见图1(注: R为对照品)。结果表明, 毛鸡骨草种子的指纹图谱具有较好的一致性。

2.4.2 毛鸡骨草种子对照图谱的生成 采用国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A版)对10批次毛鸡骨草种子进行对照图谱拟合。结果表明, 10批次毛鸡骨草种子共有的特征峰有12个。其中, 6号峰经对照为相思子碱, 因其峰信号强度和保留时间适中且与相邻峰分离较好, 在各不同产地样品中均稳定出现, 故选其为参照峰S, 详见图2。

2.4.3 相似度分析 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A版)软件对10批次毛鸡骨草种子的色谱峰进行比

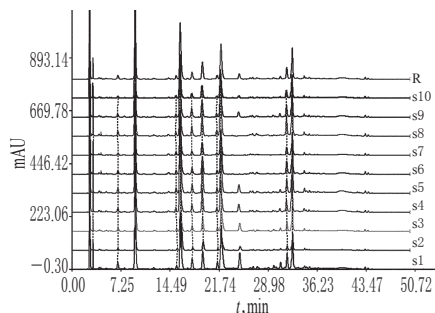


图1 10批次毛鸡骨草种子高效液相色谱叠加图

Fig 1 HPLC overlay graphs of 10 batches of *A. mollis* seed

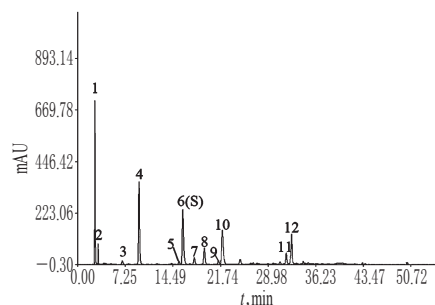


图2 10批次毛鸡骨草种子共有峰高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of the common peaks of 10 batches of *A. mollis* seed common peak

较分析。结果, 10批次样品中的12个共有峰面积之和均占总峰面积90%以上; 相似度S1~S10分别为0.977、0.981、0.937、0.976、0.969、0.996、0.954、0.986、0.995、0.998, 表明10批次毛鸡骨草种子图谱相似度良好。各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的统计结果见表2、表3。

表2 10批次毛鸡骨草种子各共有峰相对保留时间

Tab 2 Relative retention time of the common peaks of the 10 batches of *A. mollis* seed

峰号	编号										RSD, %
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	0.16	0.16	0.16	0.17	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	1.96
2	0.19	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	1.59
3	0.42	0.42	0.43	0.42	0.43	0.42	0.43	0.43	0.42	0.42	1.22
4	0.58	0.58	0.59	0.59	0.59	0.59	0.58	0.59	0.58	0.58	0.90
5	0.96	0.96	0.99	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	0.99
6	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
7	1.11	1.10	1.11	1.11	1.11	1.11	1.11	1.11	1.11	1.11	0.29
8	1.21	1.20	1.20	1.21	1.21	1.21	1.20	1.21	1.21	1.21	0.40
9	1.34	1.34	1.33	1.33	1.34	1.34	1.34	1.35	1.34	1.34	0.42
10	1.38	1.37	1.38	1.38	1.38	1.38	1.38	1.38	1.38	1.38	0.23
11	1.99	1.97	1.98	1.99	1.98	1.98	1.99	1.99	1.99	1.98	0.35
12	2.03	2.02	2.03	2.04	2.04	2.04	2.03	2.04	2.04	2.03	0.34

3 讨论

笔者用二极管阵列检测器获得了毛鸡骨草种子的三维全波长指纹图谱, 结果显示在270 nm波长下得到的图谱信息较好。曾考察了甲醇-水、甲醇-0.1%磷酸、乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸等流动相。结果, 以乙腈-0.1%磷酸为流动相时, 采用文中所述梯度洗脱程序, 所得峰形好且分离度达到要求, 分析时间适合。还曾考察了毛鸡骨草种子的制备方法, 包括提取溶剂、溶剂倍数、提取方法、提取时间等。结果发现, 采用50%甲醇20 ml、超声提取60 min效果较好。

双波长HPLC法同时测定滋补肝肾丸中4种成分的含量

王玉娟^{1*},陶利¹,崔苏镇¹,梁竹¹,周金辉^{2#}(1.济南军区总医院药剂科,济南 250031;2.济宁医学院药学院,山东日照 276000)

中图分类号 R446.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)30-4266-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.30.32

摘要 目的:建立同时测定滋补肝肾丸中女贞苷、特女贞苷、异去甲蟾蜍内酯和蟾蜍内酯含量的方法。方法:采用双波长高效液相色谱法。色谱柱为Elite C₁₈,流动相为乙腈-0.5%醋酸溶液(梯度洗脱),流速为0.9 ml/min,柱温为25℃,检测波长0~30 min为224 nm,30~50 min为351 nm,进样量为20 μl。结果:女贞苷、特女贞苷、异去甲蟾蜍内酯和蟾蜍内酯质量浓度分别在6.75~135.00、6.54~130.80、4.90~98.00、6.42~128.40 μg/ml范围内与各自峰面积呈良好的线性关系($r=0.999\ 5$ 、 $0.999\ 8$ 、 $0.999\ 4$ 、 $0.999\ 6$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD≤1.25%;加样回收率为96.15%~99.96%,RSD<2%($n=6$)。结论:该方法快速、灵敏、准确,可用于滋补肝肾丸中女贞苷、特女贞苷、异去甲蟾蜍内酯和蟾蜍内酯的含量测定。

关键词 滋补肝肾丸;女贞苷;特女贞苷;异去甲蟾蜍内酯;蟾蜍内酯;双波长高效液相色谱法

Simultaneous Determination of the Contents of 4 Ingredients in Zibu Ganshen Pill by Dual-wavelength HPLC
WANG Yu-juan¹, TAO Li¹, CUI Su-zhen¹, LIANG Zhu¹, ZHOU Jin-hui²(1.Dept. of Pharmacy, the General Hospital of Jinan Military Command, Jinan 250031, China; 2.School of Pharmacy, Jining Medical University, Shandong Rizhao 276000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of the contents of ligustroflavone, specnuezhenide, demethylwedelolactone and wedelolactone in Zibu ganshen pill. METHODS: Dual-wavelength HPLC was performed on the column of Elite C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-0.5% acetic acid (gradient elution) at flow rate of 0.9 ml/min, column temperature was 25℃, detection wavelengths were 224 nm(0-30 min) and 351 nm (30-50 min), and the injection volume was 20 μl. RESULTS: The linear range was 6.75-135.00 μg/ml($r=0.999\ 5$) for ligustroflavone, 6.54-130.80 μg/ml($r=0.999\ 8$) for specnuezhenide, 4.90-98.00 μg/ml($r=0.999\ 4$) for demethylwedelolactone and 6.42-128.40 μg/ml($r=0.999\ 6$) for wedelolactone; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were no more than 1.25%; average recoveries were 96.15%-99.96% (RSD<2%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is rapid, sensitive and accurate, and can be used for the contents determination of ligustroflavone, specnuezhenide, demethylwedelolactone and wedelolactone in Zibu ganshen pill.

KEYWORDS Zibu ganshen pill; Ligustroflavone; Specnuezhenide; Demethylwedelolactone; Wedelolactone; Dual-wavelength HPLC

表3 10批次毛鸡骨草种子各共有峰相对峰面积

Tab 3 Relative peak areas of the 10 batches of *A. mollis* seed

峰号	编号										RSD, %
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	0.96	1.00	0.99	1.01	0.99	0.99	1.02	0.97	1.04	0.99	2.33
2	0.08	0.06	0.07	0.07	0.06	0.07	0.07	0.08	0.07	0.07	9.52
3	0.09	0.04	0.06	0.04	0.04	0.05	0.03	0.06	0.04	0.03	37.78
4	1.64	0.65	1.12	0.80	0.84	1.16	0.95	1.48	1.41	1.05	28.81
5	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05	0.04	11.58
6	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
7	0.18	0.08	0.12	0.10	0.10	0.11	0.09	0.14	0.15	0.11	25.83
8	0.29	0.28	0.29	0.29	0.29	0.29	0.30	0.29	0.29	0.29	1.63
9	0.10	0.04	0.06	0.04	0.04	0.06	0.04	0.08	0.05	0.04	37.61
10	1.02	0.47	0.67	0.51	0.52	0.82	0.68	1.03	0.84	0.66	27.88
11	0.23	0.12	0.15	0.13	0.14	0.20	0.18	0.26	0.18	0.15	26.01
12	0.54	0.43	0.45	0.42	0.44	0.46	0.46	0.49	0.48	0.47	7.41

* 药师。研究方向:药事管理与药物分析。E-mail: zhoujin-huilunwen1@163.com

通信作者:副教授,博士。研究方向:药物合成与药物分析。电话:0633-2983691。E-mail: zhoujinhuilunwen1@163.com

综上所述,本研究从10批次毛鸡骨草种子中确定了12个共有特征峰,相似度均>0.9;所建立的毛鸡骨草种子指纹图谱具有专属性,可为其鉴别和质量评价提供参考。

参考文献

- [1] 中国科学院植物志编委会.中国植物志[M].北京:北京科学出版社,1984:190.
- [2] 《中华本草》编委会.中华本草:第4卷[M].上海:上海科学技术出版社,1999:305.
- [3] 严永清,余传隆,黄泰康,等.中药辞海:第1卷[M].北京:中国医药科技出版社,1996:1114.
- [4] 温晶,史海明,屠鹏飞.毛鸡骨草的化学成分研究[J].中草药,2006,5(12):234.
- [5] 史海明,黄志勤,温晶,等.毛鸡骨草中新的异黄酮[J].中国天然药物,2006,1(12):35.
- [6] 陈晓白,莫志贤,甘耀坤,等.毛鸡骨草对高脂血症模型大鼠血脂和肝脂的影响[J].中国药房,2010,21(3):202.

(收稿日期:2015-04-29 修回日期:2015-07-31)

(编辑:张静)