

毛鸡骨草药材的 HPLC 指纹图谱

黄平*, 李文静, 何碧婷

(广西中医药研究院, 广西中药标准研究重点实验室, 南宁 530022)

[摘要] 目的: 建立毛鸡骨草药材的指纹图谱, 为控制和评价药材质量提供依据。方法: 用高效液相色谱法, Lichrospher C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.1% 三氟乙酸(35:65), 流速 0.8 mL·min⁻¹, 检测波长 272 nm, 柱温室温。测定 10 批毛鸡骨草药材的指纹图谱, 并进行相似度比较。结果: 建立了毛鸡骨草药材的 HPLC 指纹图谱, 确定 9 个共有峰, 利用对照品指认其中 4 个峰。10 批毛鸡骨草药材的相似度 > 0.98。结论: 建立的方法快速、准确, 为评价毛鸡骨草药材的质量提供参考。

[关键词] 毛鸡骨草; 质量控制; 高效液相色谱; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)01-0066-04

[doi] 10.11653/syfy2014010066

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20131017.1133.002.html>

[网络出版时间] 2013-10-17 11:33

HPLC Fingerprint of *Abrus mollis*

HUANG Ping*, LI Wen-jing, HE Bi-ting

(Guangxi Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Sciences, Guangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards, Nanning 530022, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC fingerprint analysis method for the quality control of *Abrus mollis*. **Method:** A HPLC method was adopted. Chromatographic assay was performed on a Lichrospher C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) at room temperature with methanol-0.1% TFA (35:65) as the mobile phase. The flow rate was 0.8 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was set at 272 nm. 10 batches samples of *A. mollis* were determined for similarity comparison. **Result:** A HPLC fingerprint analysis method of *A. mollis* was established. 9 common peaks were assigned, and 4 peaks of them were confirmed by comparing with reference standards. Similarity of 10 batches of *A. mollis* was more than 0.98. **Conclusion:** This method was rapid, accurate and reproducible, it could provide a reference for quality evaluation and control of *A. mollis*.

[Key words] *Abrus mollis*; HPLC; quality control; fingerprint chromatogram

豆科相思属植物毛鸡骨草又名毛相思子、大叶鸡骨草, 主要分布于广西、广东、海南、福建等地。在广西、广东民间, 毛鸡骨草较普遍地被用作《中国药典》收载品种鸡骨草 *A. cantoniensis* 的替代品, 用于治疗肝炎和保健食疗。毛鸡骨草也是一些制药企业

生产鸡骨草胶囊、鸡骨草冲剂等中成药的主要原料, 年需求量很大。近年研究发现毛鸡骨草有抗乙型肝炎病毒作用^[1-2], 并含有黄酮、生物碱、三萜、甾醇和脂肪酸类化合物^[3-7], 其中相思子碱和黄酮类化合物是主要活性成分^[8-10]。本文采用 HPLC 分析不同产地的毛鸡骨草药材并构建了指纹特征图谱, 为毛鸡骨草药材质量标准研究提供依据。

1 材料

Agilent 1200 型高效液相色谱仪, 包括二极管阵列检测器、ChemStation 色谱工作站(德国安捷伦公司), SPD-6A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司)、

[收稿日期] 20130508(006)

[基金项目] 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科能 05112001-3A5)

[通讯作者] * 黄平, 研究员, 从事中草药化学及质量标准研究, E-mail: hping1208@yahoo.com.cn

LC-6A 型检测器(日本岛津公司)、威玛龙色谱工作站(威玛龙公司),B2200S 型超声波清洗器(必能信超声上海有限公司),XS205 型梅特勒-托利多分析天平。

甲醇为 MERCK 公司色谱纯,三氟乙酸为上海国药集团化学试剂有限公司分析纯,水为娃哈哈纯净水。相思子碱对照品购自美国 SIGMA-ALDRICH 公司(货号 434249,纯度 99%),芹菜素-6,8-C-二葡萄糖苷、异夏佛塔苷对照品为广西中医药研究院自制(纯度 >99%,并经 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC 和 MS 鉴定结构);夏佛塔苷对照品为中国药科大学汪豪教授赠送。

毛鸡骨草药材分别采购自玉林、崇左、来宾、贵港、南宁、海南、珠海等地市,其中 6 号毛鸡骨草药材为玉林制药有限公司 GAP 生产基地赠送。全部样品经广西中医药研究院中药所方鼎研究员鉴定为 *Abrus mollis* Hance(表 1)。

表 1 毛鸡骨草药材来源

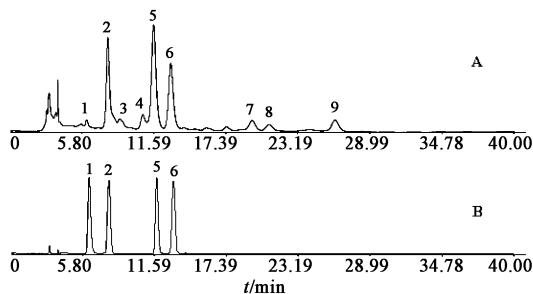
No.	产地	品种
1	海南澄迈县福山镇(野生)	毛鸡骨草
2	广西贺州市原生草药收购部	毛鸡骨草
3	广西贵港市绿之源中药饮片厂	毛鸡骨草
4	广东珠海市万应堂药店	毛鸡骨草
5	广西玉林市药材市场(野生)	毛鸡骨草
6	玉林制药 GAP 生产基地	毛鸡骨草
7	广西来宾市忻城县大塘镇(野生)	毛鸡骨草
8	广西崇左市扶绥县渠黎镇(野生)	毛鸡骨草
9	广西桂林市六合路药材市场	毛鸡骨草
10	广西梧州市蒙山县陈塘镇(野生)	毛鸡骨草

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Lichrospher C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.1% 三氟乙酸(35:65), 流速 0.8 mL·min⁻¹, 紫外检测波长 272 nm, 进样量 10 μL, 温度室温。此色谱条件下, 对照品溶液和 6 号供试品溶液的色谱图见图 1。

2.2 供试品溶液的制备 取经 20 目筛的毛鸡骨草药材粉末约 0.5 g, 精密称定, 置入 150 mL 锥形瓶, 精密加水 25 mL, 浸泡过夜。超声处理(80 W, 50 kHz)40 min, 放冷, 过滤, 精密吸取续滤液 3 mL, 加在已处理的 D101 型大孔吸附树脂柱(3 g, 湿法装柱)上。滤液反复过柱 5 次后, 用 6 mL 水洗脱, 弃水液, 再用 80% 乙醇 5 mL 洗脱, 收集醇洗脱液, 定容至 5 mL, 作为供试品溶液。

2.3 对照品溶液的制备 分别精密称取经五氧化



1. 相思子碱; 2, 6, 8-C-二葡萄糖芹菜素苷;
5. 异夏佛塔苷; 6. 夏佛塔苷; A. 供试品; B. 对照品

图 1 毛鸡骨草样品指纹对照 HPLC

二磷减压干燥 48 h 的相思子碱和黄酮对照品各 25.30 mg, 置入 5 mL 量瓶, 加流动相溶解, 制成 5.06 g·L⁻¹ 对照品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取编号为 6 的毛鸡骨草药材, 按 2.2 项下方法制备供试品, 精密吸取供试品溶液 10 μL, 连续进样 6 次, 按 2.1 项下色谱条件测定, 其相对应的色谱峰相对保留时间 RSD 均 < 0.2%, 主要峰的相对峰面积的 RSD 均 < 2%, 结果表明仪器的精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取 6 号的毛鸡骨草药材 6 份, 按 2.2 项下方法制备供试品, 按 2.1 项下色谱条件测定, 其相对应的色谱峰相对保留时间 RSD 均 < 0.3%, 主要峰的相对峰面积的 RSD 均 < 3%, 说明方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取 6 号的毛鸡骨草药材, 按 2.2 项下方法制备供试品, 依 2.1 项下的色谱条件分别在 0, 2, 4, 8, 10, 12, 24 h 进样, 对其中的共有色谱峰进行分析, 其相对应的色谱峰相对保留时间 RSD 均 < 0.4%, 主要峰的相对峰面积的 RSD 均 < 3%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5 毛鸡骨草指纹图谱的建立^[11]

2.5.1 指纹图谱的采集 精密称取 10 批毛鸡骨草药材粉末各 0.5 g, 分别按照 2.2 项方法制备供试品溶液, 依据 2.1 项下色谱条件, 进样 10 μL, 记录各批次毛鸡骨草药材 HPLC-UV 指纹图谱。

2.5.2 共有峰的标定 综合分析 10 批样品的色谱图, 有 9 个峰是 10 批样品所共有, 且各批样品的共有峰面积占总峰面积(除去溶剂峰)均 > 90%, 因此确定这 9 个峰为共有指纹峰。通过与对照品色谱峰对比, 1 号峰为相思子碱, 2 号峰为芹菜素-6, 8-C-二葡萄糖苷, 5 号峰为异夏佛塔苷, 6 号峰为夏佛塔苷。其中 5 号峰分离度和对称性较好, 所以把 5 号峰作为参照峰(图 2)。

2.5.3 共有指纹峰相对保留时间及相对峰面积比值 以参照峰(S)的相对保留时间和峰面积为 1, 计算 10 批指纹图谱中 9 个共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积(表 2,3)。

2.5.4 指纹图谱相似度分析 采用国家药典委员会推荐的中药色谱指纹图谱相似度评价系统研究版(2004 A)进行数据处理,生成对照谱峰 R,并评价相似度(表 4)。

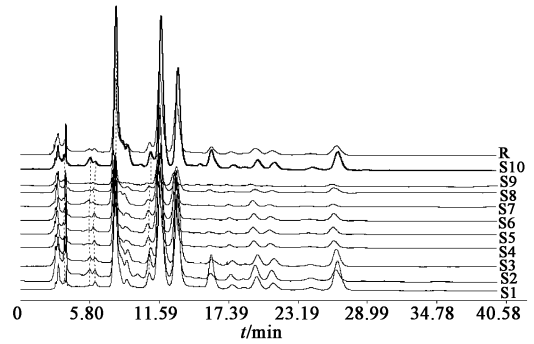


图 2 10 批毛鸡骨草指纹图谱

表 2 10 批毛鸡骨草药材指纹图谱共有峰相对保留时间

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	RSD/%
1	0.537	0.536	0.528	0.537	0.530	0.534	0.534	0.528	0.529	0.535	0.690
2	0.679	0.681	0.680	0.680	0.680	0.681	0.681	0.681	0.679	0.682	0.142
3	0.763	0.763	0.768	0.763	0.759	0.763	0.764	0.768	0.765	0.765	0.346
4	0.925	0.925	0.924	0.927	0.928	0.926	0.926	0.926	0.926	0.926	0.119
5	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
6	0.120	1.119	1.120	1.119	1.120	1.119	1.120	1.121	1.121	1.121	0.073
7	1.692	1.681	1.677	1.684	1.682	1.687	1.685	1.684	1.690	1.683	0.258
8	1.809	1.802	1.799	1.803	1.797	1.806	1.801	1.805	1.801	1.802	0.193
9	2.268	2.260	2.240	2.259	2.261	2.265	2.241	2.251	2.257	2.251	0.419

表 3 10 批毛鸡骨草药材指纹图谱共有峰相对峰面积

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	RSD/%
1	0.025	0.021	0.047	0.034	0.009	0.011	0.012	0.024	0.022	0.019	51.125
2	0.612	0.699	0.813	0.709	0.673	0.881	0.721	0.774	0.577	0.713	12.501
3	0.019	0.026	0.051	0.014	0.018	0.054	0.084	0.042	0.018	0.026	63.551
4	0.073	0.123	0.139	0.082	0.051	0.128	0.120	0.066	0.124	0.049	36.305
5	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.0000
6	0.654	0.664	0.638	0.688	0.694	0.650	0.639	0.715	0.618	0.712	4.9939
7	0.105	0.123	0.114	0.117	0.134	0.097	0.103	0.023	0.118	0.069	32.266
8	0.057	0.087	0.087	0.063	0.025	0.073	0.072	0.031	0.080	0.060	33.745
9	0.268	0.097	0.197	0.148	0.015	0.309	0.198	0.061	0.158	0.191	54.625

表 4 10 批毛鸡骨草药材相似度评价

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1.000	0.974	0.978	0.974	0.949	0.974	0.978	0.968	0.983	0.989	0.981
S2	0.974	1.000	0.991	0.990	0.979	0.990	0.991	0.988	0.993	0.985	0.995
S3	0.978	0.991	1.000	0.997	0.984	0.997	0.987	0.994	0.986	0.986	0.999
S4	0.974	0.990	0.997	1.000	0.991	1.000	0.980	0.992	0.982	0.980	0.997
S5	0.949	0.979	0.984	0.991	1.000	0.991	0.956	0.986	0.962	0.957	0.982
S6	0.974	0.990	0.997	1.000	0.991	1.000	0.980	0.992	0.982	0.980	0.997
S7	0.978	0.991	0.987	0.980	0.956	0.980	1.000	0.980	0.994	0.993	0.989
S8	0.968	0.988	0.994	0.992	0.986	0.992	0.980	1.000	0.978	0.982	0.994
S9	0.983	0.993	0.986	0.982	0.962	0.982	0.994	0.978	1.000	0.989	0.991
S10	0.989	0.985	0.986	0.980	0.957	0.980	0.993	0.982	0.989	1.000	0.989
R	0.981	0.995	0.999	0.997	0.982	0.997	0.989	0.994	0.991	0.989	1.000

2.6 3 种同属药用植物的图谱比较 利用 2.5 项下建立的毛鸡骨草药材指纹对照图谱,对采集到的 5 种鸡骨草(*A. cantoniensis*)药材和 5 种相思子(*A. precatorius*)药材也在相同实验条件下进行了分析比较,前者与毛鸡骨草的相似度为 0.22,后者为 0.34(图 3),说明 3 种药材所含化学成分是有差异的。这些差异也可成为鉴别它们的方法之一。

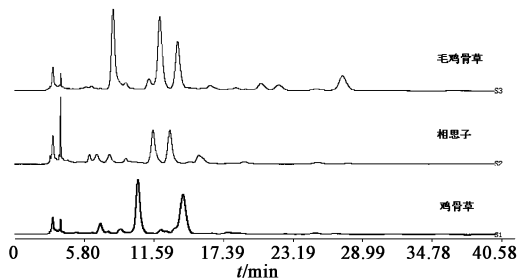


图 3 3 种同属药用植物的 HPLC 图谱比较

3 讨论

近些年来,民间有些人喜欢饮用鸡骨草叶子泡茶,一些草药摊铺和茶叶店也有鸡骨草叶摆卖。我们在市场调查时发现,商贩们虽然都称自己卖的是鸡骨草的叶子,而实际大多为毛鸡骨草或相思子的叶子。3 种药材虽为同科同属植物,但在植物形态和所含化学成分方面还是有差异的。通过指纹图谱的比较,可为鉴别这些药材提供更科学的依据。

本文所研究的 10 批不同产地的毛鸡骨草药材样品,它们指纹图谱的特征性和专属性很强,药材样品指纹图谱的相似度均 > 0.98 ,各批样品间共有指纹峰的相对保留时间比较吻合,但各批号共有峰的相对峰面积有一定波动,直观地说明不同产地毛鸡骨草药材化学成分种类相似,但含量的差别比较

明显,可能是产地和生长环境不同而导致存在差异。

[参考文献]

- [1] 陈晓白,王晓平,赵仕花. 毛鸡骨草含药血清体外抗乙型肝炎病毒作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(22):218.
- [2] 陈晓白,王晓平,韦敏. 毛鸡骨草醇提取液对 HepG2. 215 细胞乙型肝炎表面抗原及乙型肝炎 E 抗原的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(22):184.
- [3] 刘卓伟,阙兆麟,叶志文,等. 毛鸡骨草地上部分的化学成分[J]. 中国天然药物,2008,6(6):415.
- [4] 温晶,史海明,屠鹏飞. 毛鸡骨草的化学成分研究[J]. 中草药,2006,37(5):658.
- [5] Wen Jing, Shi Hai-Ming, Tu Peng-Fei. Chemical constituents of *Abrus mollis* Hance [J]. Biochem Syst Ecol, 2006, 34(2):177.
- [6] 卢文杰,田小雁,陈家源,等. 毛鸡骨草化学成分的研究[J]. 华西药学杂志,2003,18(6):406.
- [7] 卢文杰,陈家源,韦宏,等. 毛相思子中的异黄酮类成分[J]. 中草药,2004,35(12):1331.
- [8] 汪豪,熊丰,刘卓伟,等. 黄酮碳苷类化合物在制备治疗和预防肝炎药物中的应用:中国,101161668A[P]. 2008-04-16.
- [9] 钟正贤,李燕婧,陈学芬,等. 相思子碱的药理作用研究[J]. 中医药导报,2009,15(1):8.
- [10] 陈学芬,钟正贤,李燕婧,等. 海帕刺桐碱药理作用的研究[J]. 中国中医药科技,2009,16(5):372.
- [11] 罗国安,梁琼麟,王明义. 中药指纹图谱[M]. 北京:化学工业出版社,2009:47.

[责任编辑 顾雪竹]