

北豆根的 HPLC 指纹图谱研究

李艳荣, 王领弟, 张晓峰, 潘海峰*

(承德医学院河北省中药研究与开发重点实验室, 河北 承德 067000)

[摘要] 目的: 建立同时测定承德产及其他主产区北豆根中蝙蝠葛苏林碱和蝙蝠葛碱的含量及其 HPLC-UV 指纹图谱。方法: 采用 ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 乙腈和 0.5% 甲酸水溶剂系统梯度洗脱, 检测波长为 268 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL。结果: 蝙蝠葛苏林碱和蝙蝠葛碱的线性范围分别为 0.072 ~ 2.29 g·L⁻¹ ($r = 0.9996$), 0.053 ~ 1.70 g·L⁻¹ ($r = 0.9999$); 平均回收率分别为 98.7% (RSD 1.5%), 100.6% (RSD 1.9%); 确立了承德产北豆根的指纹图谱共有 9 个共有峰, 其他主产区的指纹图谱共有 13 个共有峰。指纹图谱方法重复性、精密性良好, 承德产 5 批北豆根(原药材)除 2 号样品为 0.404 外其他样品均 > 0.9; 其他主产区 12 批北豆根(饮片)除 9 号样品为 0.716 外其他样品均 > 0.9。结论: 方法重复性好, 专属性强, 为北豆根药材的质量控制提供科学依据。

[关键词] 北豆根; 蝙蝠葛苏林碱; 蝙蝠葛碱; 高效液相色谱法; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0127-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120704.1742.026.html>

[网络出版时间] 2012-07-04 17:42

Research on HPLC Fingerprint of *Rahizoma Menisperm*

LI Yan-rong, WANG Ling-di, ZHANG Xiao-feng, PAN Hai-feng*

(Chengde Medical College, Hebei Key Laboratory of Study and Exploitation
of Chinese Medicine, Chengde 067000, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a RP-HPLC method for the quantitative analysis of daurisoline and dauricine, and establish an HPLC-UV fingerprint of *Rahizoma Menisperm*. **Method:** The alkaloids were separated on a ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with gradient elution using acetonitrile and H₂O-formic acid (100:0.5) solvent system and detected at 268 nm. Flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and 10 μL was injected every time. **Result:** The linear range of daurisoline and dauricine was 0.072-2.29 mg·mL⁻¹ ($r = 0.9996$), 0.053-1.70 mg·mL⁻¹ ($r = 0.9999$), respectively. The average recovery rates of daurisoline and dauricine were 98.7% (RSD 1.5%), 100.6% (RSD 1.9%), respectively. In the fingerprint, 9 common peaks of *Rahizoma Menisperm* from Chengde and 13 common peaks of *Rahizoma Menisperm* from other production areas were confirmed. The accuracy and reproducibility of the method of fingerprint were good. The results of similarity analysis were above 0.9 except No. 2 was 0.404 of *Rahizoma Menisperm* from Chengde and No. 9 was 0.716 from other production areas. **Conclusion:** The method can be used scientifically to evaluate the quality of the *Rahizoma Menisperm* qualitatively and quantitatively.

[Key words] *Rahizoma Menisperm*; daurisoline; dauricine; HPLC; fingerprint

北豆根(*Rahizoma Menisperm*)是防己科植物蝙蝠葛 *Menispermum dauricum* DC. 的根茎, 性寒, 味苦,

[收稿日期] 20110930(006)

[基金项目] 2010 年承德市科学技术研究与发展计划项目(20101312)

[第一作者] 李艳荣, 理学硕士, 讲师, 从事中药质量研究与质量控制, Tel: 0314-2291186, E-mail: liyanrong00001@163.com

[通讯作者] * 潘海峰, 承德医学院副主任医师, 理学硕士, 从事中药制剂、分析及中药新药研究, Tel: 0314-2291186, Fax: 0314-2291186, E-mail: phf2301@163.com

有清热解毒、祛风止痛之功效^[1],广泛分布于东北、河北、陕西、山东等地。现代药理研究表明,北豆根中总生物碱有效部位具有良好的抗炎、抑菌、抗心律失常及抑制肿瘤细胞增殖的作用^[2],其中蝙蝠葛苏林碱和蝙蝠葛碱是主要的生物碱类有效成分^[3],蝙蝠葛苏林碱能使血小板黏附性降低^[4],蝙蝠葛碱对人白血病细胞株 HL260 和 K562 的生长具抑制作用^[5]等。2010 年版《中国药典》仅以显微鉴别和薄层色谱鉴别作为北豆根药材的质量控制指标,无含量测定项。为有效控制北豆根的质量,本文利用 RP-HPLC 梯度洗脱法,试图建立同时测定蝙蝠葛苏林碱和蝙蝠葛碱含量的方法。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪 (Agilent DAD 检测器,四元泵,自动进样器,Agilent Chemstation 工作站),AG245 电子分析天平,北豆根药材(见表 1,其中 1~5 号样品为北豆根原药材,6~17 号样品为北豆根饮片)由河北民族师范学院生物系董建新教授进行了鉴定;蝙蝠葛苏林碱(批号 110120,供含量测定用)购于上海融禾医药科技有限公司,蝙蝠葛碱(批号 111867-201001,供含量测定用)购于中国药品生物制品检定所,乙腈为色谱纯,氯仿、甲酸均为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

表 1 北豆根样品来源

No.	来源	采集时间	No.	来源	采集时间
1	河北承德平泉县	2010-10	10	河北省(饮片)	2010-10
2	河北承德滦平县	2010-10	11	东北某省(饮片)	2010-10
3	河北承德宽城县	2010-09	12	东北某省(饮片)	2010-09
4	河北承德丰宁县	2010-10	13	东北某省(饮片)	2010-09
5	河北承德隆化县	2010-09	14	甘肃省(饮片)	2010-09
6	河北省(饮片)	2010-10	15	陕西省(饮片)	2010-10
7	河北省(饮片)	2010-10	16	内蒙古(饮片)	2010-10
8	河北省(饮片)	2010-09	17	宁夏省(饮片)	2010-09
9	河北省(饮片)	2010-10			

2 方法

2.1 色谱条件 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm)。流动相 A 0.5% 甲酸水溶液, B 乙腈。洗脱梯度 (0~45~60~90~92~100 min, 10%~37%~60%~81%~100% B), 检测波长 268 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备 对照品溶液的制备:精密称取蝙蝠葛苏林碱和蝙蝠葛碱对照品适量至 10 mL 量瓶

中,用甲醇制成质量浓度为 2.29 g·L⁻¹ 的蝙蝠葛苏林碱和 1.70 g·L⁻¹ 蝙蝠葛碱的混合储备液。取上述储备液适量至 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度分别为 0.575, 0.425 g·L⁻¹ 的蝙蝠葛苏林碱和蝙蝠葛碱的混合对照品溶液。

供试品溶液的制备:取北豆根细粉约 2 g,精密称定,置具塞三角瓶中,加入氯仿 80 mL,称重,超声 30 min,过滤,滤液蒸干。残渣用甲醇溶解并定容至 5 mL 量瓶,溶液过 0.45 μm 微孔滤膜作为供试品溶液。

2.3 北豆根药材中 2 种生物碱类成分的含量测定

2.3.1 线性关系考察 以 2.29, 1.70 g·L⁻¹ 的蝙蝠葛苏林碱和蝙蝠葛碱的混合储备溶液为 1 号溶液,然后采用倍比稀释法制成系列浓度的溶液,得 2, 3, 4, 5, 6 号混合对照品溶液。(蝙蝠葛苏林碱的质量浓度分别为 1.15, 0.575, 0.286, 0.143, 0.072 g·L⁻¹; 蝙蝠葛碱的质量浓度分别为 0.852, 0.425, 0.212, 0.106, 0.053 g·L⁻¹)。在 2.1 的色谱条件下,取 10 μL 注入液相色谱仪,记录色谱峰面积,以峰面积 (A) 为纵坐标,对照品浓度 (C) 为横坐标,进行线性回归,回归方程 $A_{\text{蝙蝠葛苏林碱}} = 1.42 \times 10^3 C - 69.30$ ($r = 0.9996$); $A_{\text{蝙蝠葛碱}} = 1.91 \times 10^3 C - 10.90$ ($r = 0.9999$)。蝙蝠葛苏林碱的线性范围为 0.072 ~ 2.29 g·L⁻¹, 蝙蝠葛碱的线性范围为 0.053 ~ 1.70 g·L⁻¹。

2.3.2 精密度试验 精密吸取 2.3.1 项下线性 3 号混合对照品溶液,重复进样 5 次,每次进样 10 μL,记录色谱峰面积,计算蝙蝠葛苏林碱和蝙蝠葛碱色谱峰的峰面积,其峰面积的 RSD 分别为 1.0%, 1.2%, 表明精密度良好。

2.3.3 重复性试验 精密称取取同一产地北豆根细粉(6 号样品) 2 g,按 2.2 项下方法,精密称定 5 份制备供试品溶液,平行测定,记录色谱峰面积,计算蝙蝠葛苏林碱和蝙蝠葛碱的含量(平均含量分别为 0.879 2, 0.121 8 mg·g⁻¹),并计算 RSD 分别为 1.3%, 1.1%, 表明方法的重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别在制备后 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样 10 μL,记录色谱峰面积,计算蝙蝠葛苏林碱和蝙蝠葛碱色谱峰峰面积的 RSD 分别为 1.0%, 1.2%, 说明样品在 12 h 内稳定。

2.3.5 加样回收率试验 精密称定已知蝙蝠葛苏林碱和蝙蝠葛碱含量的同一批北豆根药材(6 号样品) 6 份,每份约 1 g,分别加入 2 种对照品适量,按 2.2 项下的方法制备样品溶液,进行测定,以样品溶

液中绝对含量计算加样回收率,结果见表 2。

表 2 北豆根中蝙蝠葛苏林碱和蝙蝠葛碱回收率($n=6$)

测定成分	加入量 /mg	样品含量 /mg	测得量 /mg	平均回收率 /%	RSD /%
蝙蝠葛苏林碱	0.823 5	0.876 9	1.689	98.7	1.5
	0.823 5	0.879 6	1.698		
	0.823 5	0.868 7	1.669		
	0.823 5	0.862 1	1.701		
	0.823 5	0.864 7	1.679		
	0.823 5	0.873 2	1.674		
蝙蝠葛碱	0.125 0	0.122 1	0.247 7	100.6	1.9
	0.125 0	0.123 6	0.251 2		
	0.125 0	0.128 7	0.252 9		
	0.125 0	0.122 1	0.244 5		
	0.125 0	0.124 7	0.251 3		
	0.125 0	0.123 2	0.251 2		

2.3.6 样品含量测定 取各产地北豆根细粉 2 g, 精密称定,按 2.2 项下方法制备对照溶液和样品溶液,分别吸取 2 种溶液各 10 μ L,注入液相色谱仪,每份样品测 3 次,依次测定各批样品,计算蝙蝠葛苏林碱和蝙蝠葛碱的含量,结果见表 3。

表 3 北豆根中蝙蝠葛苏林碱和蝙蝠葛碱含量($n=3$) $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

No.	蝙蝠葛 苏林碱	蝙蝠 葛碱	No.	蝙蝠葛 苏林碱	蝙蝠 葛碱
1	0.135 9	0.668 3	10	4.188	0.562 1
2	0.180 0	0.707 2	11	1.272	0.546 1
3	5.061	3.359 0	12	1.236	0.719 8
4	1.011	2.938 0	13	5.376	1.326
5	5.360	1.322	14	2.380	0.420 5
6	0.879 5	0.122 8	15	2.698	0.742 2
7	1.680	0.274 6	16	3.752	1.838 0
8	1.197	0.707 1	17	2.386	2.293 0
9	1.522	0.739 9			

2.4 北豆根指纹图谱的建立与分析 采用国家药典委员会开发的中药色谱指纹图谱相似度评价系统研究版(2004A)。该软件具有生成对照图谱的功能,相似度计算方法为夹角余弦法,可支持多点校正。

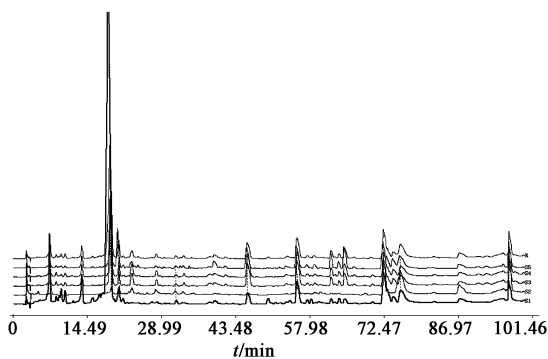
2.4.1 方法学考察 精密度试验:取同一北豆根样品粉末(6号),按 2.2 项下方法制备供试液,按 2.1

项下色谱条件,重复进样 5 次,以蝙蝠葛苏林碱的峰面积和保留时间计算各共有峰的相对峰面积和相对保留时间,测得 13 个共有峰相对峰面积和相对保留时间的 RSD 分别在 0.8% ~ 1.4% 和 1.3% ~ 1.8% 表明该方法符合指纹图谱的技术要求^[8]。

重复性试验:取同一北豆根样品粉末(6号)5份,精密称定,按 2.2 项下方法制备供试液,按 2.1 项下色谱条件分别进样,测得 13 个共有峰相对峰面积和相对保留时间的 RSD 分别在 0.7% ~ 1.6% 和 0.2% ~ 1.4%,符合指纹图谱的技术要求^[8]。

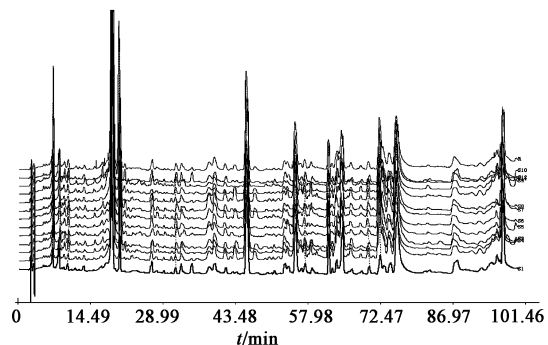
稳定性试验:取北豆根药材粉末(6号),精密称定,按 2.2 项下方法制备供试液,按 2.1 项下色谱条件,分别于 0,2,4,6,8,12 h 进样,测得 13 个共有峰相对峰面积和相对保留时间的 RSD 分别在 0.6% ~ 1.4% 和 0.7% ~ 1.6%,符合指纹图谱的技术要求^[8]。

2.4.2 样品指纹图谱的确定 对 5 批承德产北豆根(原药材)及 12 批其他主产区北豆根(饮片)进行测定,记录 100 min 色谱图,见图 1,2。



(S1 ~ S5 分别代表表 1 中 1 ~ 5 号样 R 为对照指纹图谱)

图 1 5 批承德产北豆根的色谱图

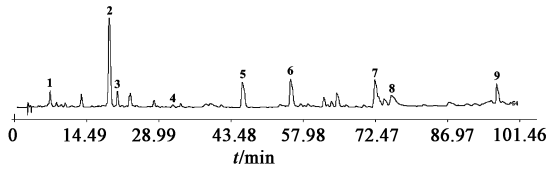


(S1 ~ S12 分别代表表 1 中 6 ~ 17 号样;R 为对照指纹图谱)

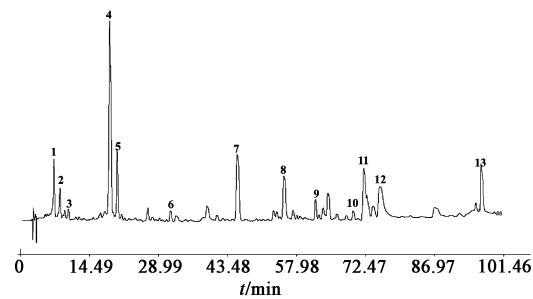
图 2 12 批其他主产区北豆根的色谱

2.4.3 共有峰的确定 对不同供试品所得图谱进行分析,选择稳定性好,吸收峰强,特征明显的色谱

峰为共有峰。承德产北豆根(原药材)标定 9 个共有峰(图 3),其他主产区北豆根(饮片)标定 13 个共有峰(图 4),在供试品图谱中选择峰面积较大、出峰时间适中且稳定的号蝙蝠葛苏林碱色谱峰作为参照峰。



2. 蝙蝠葛苏林碱; 3. 蝙蝠葛碱
图 3 承德产北豆根药材的指纹图谱



4. 蝙蝠葛苏林碱; 5. 蝙蝠葛碱
图 4 其他主产区北豆根药材的指纹图谱

2.4.4 北豆根药材指纹图谱相似度检验 指纹图谱相似度评价采用国家药典委员会开发的中药色谱指纹图谱相似度评价系统研究版(2004A)进行计算。首先将色谱工作站数据导入中药指纹图谱相似度计算软件,以中位数法产生对照指纹图谱,分别计算不同批次的样品与对照图谱之间的相似度。相似度结果:承德产 5 批北豆根(原药材)除 2 号样品为 0.404 外其他样品均在 0.9 以上;其他主产区 12 批北豆根(饮片)除 9 号样品为 0.716 外其他样品均在 0.9 以上。

3 讨论

经二极管阵列检测器优化检测波长,结果 268 nm 下色谱峰数目较多,各色谱峰的表现丰度适中,故选 268 nm 为检测波长;比较了甲醇-水、乙腈-水以及甲醇、乙腈和甲酸水系统,结果表明乙腈-0.5% 甲酸水系统分离效果最佳,并同时对比色谱柱进行了

优化,结果用 ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱,乙腈-0.5% 甲酸水为流动相,268 nm 时各色谱峰峰形最好,分离度最佳。

指纹图谱相似度软件生成的匹配结果显示,承德产 5 批北豆根(原药材)的 9 个共有峰峰面积的 RSD 范围为 13.3% ~ 131.05%,其他主产区 12 批北豆根(饮片)13 个共有峰峰面积的 RSD 范围为 18.15% ~ 69.6%,承德产北豆根(原药材)在指纹图谱的色谱峰、共有峰个数上均比后者少,可能与北豆根药材的生长环境有关,或者与后者是经过炮制后的饮片有关,具体原因有待进一步研究。实验结果所显示的差异表现在临床上难免会产生疗效上的不同,为实现药材的质量稳定均一,建议对北豆根药材进行质量控制,以保证临床疗效。

含量测定结果表明承德产北豆根(原药材)蝙蝠葛苏林碱和蝙蝠葛碱的含量波动较大,其他主产区北豆根(饮片)含量虽有一定差异,但较前者要小,建议控制北豆根中 2 种生物碱类成分的含量。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S]. 2010:92.
- [2] 龚培力,杜佐华,曾繁典,等.北豆根酚性碱的抗心律失常作用[J].中药新药与临床药理,1995,6(3):13.
- [3] 刘威,张振秋,洪涛,等.HPLC 法测定北豆根中蝙蝠葛碱和蝙蝠葛苏林碱的含量[J].中药材,2005,28(9):783.
- [4] 李延忠,孙晓波,张殿文,等.北豆根化学成分及其药理作用研究进展[J].特产研究,1999(3):61.
- [5] 崔燎潘,毅生.粉防己碱和蝙蝠葛碱对人白血病细胞株 HL-60 和 K₅₆₂ 的生长抑制作用[J].中国药理学通报,1995,11(6):478.
- [6] 覃芳,李可强,汪琳.北豆根有效部位指纹图谱鉴别和含量分析方法的研究[J].上海中医药杂志,2009,43(1):91.
- [7] 于维萍,梁彤.北豆根饮片 HPLC 指纹图谱研究[J].齐鲁药事,2005,24(1):23.
- [8] 蔡宝昌,刘训红.常用中药材 HPLC 指纹图谱测定技术[M].北京:化学工业出版社,2005:8.

[责任编辑 顾雪竹]