

广西产桑椹 HPLC 指纹图谱研究

耿旦¹, 马雯芳², 丘琴^{2,3}, 甄汉深^{2*}, 韦良宏¹, 蒋凌芳²

(1. 钦州市第一人民医院, 广西 钦州 535000; 2. 广西中医学院, 南宁 530001;
3. 成都中医药大学, 成都 611137)

[摘要] 目的: 采用 HPLC 建立广西产桑椹的指纹图谱。方法: 采用 Agilent Zobax C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱; 以乙腈(A)-0.1% 磷酸(B)为流动相进行梯度洗脱, 检测波长 360 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃。结果: 检测了广西不同来源 10 批桑椹药材, 标定了 10 个共有峰, 相似度较高, 建立的桑椹指纹图谱稳定性、重复性好。结论: 桑椹 HPLC 指纹图谱可用于桑椹药材的鉴别及质量控制。

[关键词] 桑椹; 指纹图谱; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)22-0054-03

Study on Chromatography Fingerprints of *Morus alba* by HPLC

GENG Dan¹, MA Wen-fang², QIU Qin^{2,3}, ZHEN Han-shen^{2*}, WEI Liang-hong¹, JIANG Ling-fang²

(1. First People's Hospital of Qinzhou, Qinzhou 535000, China;
2. Guangxi Traditional Chinese Medicine University, Nanning 530001, China;
3. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the chromatography fingerprint of *Morus alba* L. by HPLC. **Method:** The samples are separated on Agilent Zobax C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.1% phosphoric acid as the mobile phase, gradient eluent, at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ at 30 ℃, the UV detection is seted at 360 nm. **Result:** Ten samples of *M. alba* in different origin of Guangxi was detected and 10 peaks in the chromatogram are common, there is a high similarity, the reproducibility and stability is good. **Conclusion:** The HPLC fingerprint can be used for identification of *M. alba* as well as quality control.

[Key words] *Morus alba*; fingerprint; HPLC

桑椹为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥果穗^[1], 有补血滋阴, 生津润燥的功效。现代研究表明桑椹具有抗氧化^[2]、降血糖^[3]、抗疲劳^[4]、降血脂、抗动脉粥样硬化等^[5]药理作用。本文建立了广西产桑椹 HPLC 指纹图谱研究的方法, 可为桑椹药材的鉴别及质量控制提供科学实验依据。

1 材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪: 在线真空脱气机器(G-1322A), 高压四元泵(G-1311A), 标准自动进样器(G-1313A), 智能化柱温箱(G-1316A), 可变波长检测器(G-1313A), 二极管阵列检测器, Agilent1100 series 色谱工作站(美国安捷伦科技公司); 《中国色谱指纹图谱相似度评价系统》2004A 版(国家药典委员会); SB3200T 型超声波清洗机(上海能信超声有限公司); BP211D 电子分析天平(德国赛多利斯)。

芦丁对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 10080-200707, 供含量测定用), 乙腈为色谱纯(天津市四友生物医学技术有限公司), 其余试剂均为分析

[收稿日期] 2011-01-30

[基金项目] 广西卫生厅项目(Z2009238)

[第一作者] 耿旦, 副主任药师, 医院药学研究与管理, Tel: 0777-2861656, E-mail: GD686@163.com

[通讯作者] * 甄汉深, 教授, 从事中药与药学教学与科研, Tel: 0771-2918239, E-mail: 8zhen@163.com

纯,水为超纯水。10批不同来源的桑椹药材分别采自广西各地,经广西中医学院刘寿养副教授鉴定为桑科植物桑 *M. alba* L. 的干燥果穗,样品来源见表1。

表1 广西不同产地桑椹药材

No.	来源	No.	来源
1	南宁	6	灵山
2	玉林	7	柳州
3	平果	8	桂林
4	浦北	9	贵港
5	合浦	10	钦州

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Zobax C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱,以乙腈(A)-0.1%磷酸(B)为流动相进行梯度洗脱(0~15 min,10%~15% A;15~23 min,15%~27% A;23~32 min,27%~30% A;32~45 min,30%~60% A),检测波长360 nm,流速1.0 mL·min⁻¹,柱温30℃,运行时间45 min。

2.2 对照品溶液的制备 取芦丁对照品适量(0.26 mg),精密称定,置10 mL量瓶中,用适量甲醇溶液溶解并稀释到刻度,摇匀,通过孔径0.45 μm的微孔滤膜,滤液为0.026 g·L⁻¹的芦丁对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取桑椹药材干燥粉末1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入50%乙醇25 mL,超声30 min,放冷,用50%乙醇补足损失质量,用孔径为0.45 μm的微孔滤膜过滤,续滤液为供试品溶液。

2.4 方法学考察 参照《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》^[6],以1号桑椹药材为例进行了精密度、稳定性和重复性考察。

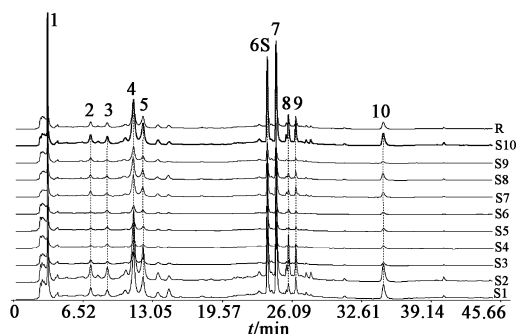
2.4.1 精密度试验 取同一供试品溶液,按2.3项下方法制备供试品溶液,连续进样6次,测得各共有峰的相对保留时间及相对峰面积的RSD分别为0.01%~0.69%和0.30%~1.2%,表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取同一供试品溶液,按2.1项下色谱条件测定,分别于0,2,4,8,16,24 h进样,记录指纹图谱,结果各共有峰的相对保留时间及相对峰面积的RSD分别为0.02%~1.1%和0.54%~2.9%,表明样品24 h内稳定。

2.4.3 重复性试验 取同一批桑椹药材6份,精密称定,按2.3项下方法制备供试品溶液,按2.1项下

色谱条件测定,记录指纹图谱,测得各共有峰的相对保留时间及相对峰面积的RSD分别为0.04%~1.1%和0.54%~2.9%,表明实验方法重复性良好。

2.5 样品指纹图谱测定 取不同产地的桑椹药材10批,精密称定,按2.3项下方法制备供试品溶液,分别取芦丁对照品溶液和供试品溶液10 μL,注入高效液相色谱仪,记录10批桑椹药材的HPLC指纹图谱,采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004A版进行全谱的相似度及共有图谱的拟合。10批桑椹药材HPLC指纹图谱色谱叠加图见图1。

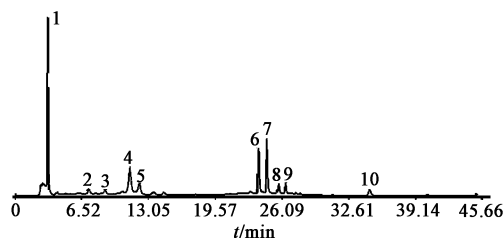


1~10. 共有峰

图1 10批桑椹药材色谱叠加

2.6 指纹图谱的分析与评价

2.6.1 特征峰的标定 根据10批不同来源的桑椹药材HPLC指纹图谱检测结果,利用“中药色谱指纹图谱相似度评价软件”生成桑椹药材共有模式的对照HPLC指纹图谱,共标定10个共有峰作为指纹图谱的特征峰,其中6号峰为芦丁的指纹峰,其出峰时间适中,峰高与峰面积较为适中,与相邻峰分离良好,故选定芦丁为桑椹指纹图谱的参照峰,其色谱峰为参照峰S,以其保留时间和峰面积为1,计算各共有峰的相对保留时间和峰面积比值。10批桑椹药材的指纹图谱见图2。



6. 芦丁

图2 桑椹药材指纹图谱共有模式

2.6.2 不同产地桑椹药材的指纹图谱相似度评价 通过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版A》软件,对10批广西不同产地

桑椹药材进行相似度评价,采用软件的平均数法,时间窗为 0.2 min,结果表明,广西不同产地的桑椹药材有较好的相似度,相关系数在 0.922 ~ 0.990,相似度结果见表 2。

表 2 桑椹药材 HPLC 指纹图谱相似度计算

No.	来源	相似度
1	南宁	0.957
2	玉林	0.987
3	平果	0.981
4	浦北	0.922
5	合浦	0.929
6	灵山	0.990
7	柳州	0.985
8	桂林	0.961
9	贵港	0.931
10	钦州	0.987

3 讨论

3.1 共有峰的标定 指纹图谱共有峰的标定,按照《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》,根据 10 批供试品的检测结果,采用相对保留时间标定指纹共有峰,色谱峰的相对保留时间根据参照峰的保留时间计算。本文借助了《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004 A 版软件自动匹配 10 批色谱图相关参数,标定了 10 批桑椹药材的共有指纹峰,避免人工判断的盲目性与误差。

3.2 色谱条件的优化 本文分别采用甲醇-水,乙腈-水,甲醇-0.1% 磷酸,乙腈-0.1% 磷酸洗脱系统对桑椹药材的 HPLC 图谱进行考察,结果表明甲醇-

水、乙腈-水、甲醇-0.1% 磷酸系统的色谱图,各峰无法分离,重叠,峰形较差,峰信息较少。乙腈-0.1% 磷酸系统分离效果较好,峰形好,出峰时间适中,故选择乙腈-0.1% 磷酸溶液系统。

3.3 供试品溶液制备条件优选 对提取溶剂(甲醇、乙醇及不同比例的醇和水)、提取方法(超声、回流、冷浸)、提取时间(30,45,60 min),药材与提取溶剂倍数(1:15,1:20,1:25)等进行了考察,确定了以上供试品溶液的制备方法。

本文仅测定了 10 个广西不同产地的桑椹药材样品,某种意义上未能代表桑椹药材的广泛性与统一性,应测定多个不同产地,不同采收时间的样品,以获取更多的信息,保证指纹图谱良好的特征性和代表性。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S].2010:211.
- [2] 杨小兰,毛新,张晓云.黑桑椹的营养成分和抗氧化作用的研究[J].食品科学,2006,27(2):248.
- [3] 费曜,朱丹平.桑类药材治疗糖尿病研究进展[J].今日药学,2009,19(5):114.
- [4] 张莉,李志西,杜双奎,等.桑椹醋减肥与抗疲劳作用的动物试验[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2007,35(7):227.
- [5] 杨小兰,毛立新,张晓云.黑桑椹对高脂血症大鼠的降脂作用研究[J].食品科学,2005,26(9):509.
- [6] 国家食品药品监督管理局.中药注射剂指纹图谱研究技术要求(暂行)[S].2004.

[责任编辑 蔡仲德]