

木蝴蝶药材 HPLC 指纹图谱研究

蔡 鹰^{1*}, 丁安伟²

(1. 解放军第四五四医院, 江苏 南京 210002; 2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 建立木蝴蝶药材的指纹图谱。方法: 采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC), 色谱条件为: Lichrospher C₁₈(250 mm × 4.6 mm Media 10 nm, 5 μm); 流动相: A: 1% 醋酸乙腈, B: 1% 醋酸水溶液。洗脱方法: (0~ 30) min, 乙腈% 为 10% ~ 25%; (30 ~ 50) min, 乙腈% 为 25% ~ 55%, 保持 5 min; 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温: 30 °C。结果: 测定了黄芩苷含量, 构建了木蝴蝶药材的指纹图谱, 对不同产地来源的木蝴蝶药材分类。结论: 该法准确, 重复性好, 可作为木蝴蝶药材的质控方法。

[关键词] 木蝴蝶; 黄芩苷; 高效液相色谱法; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)12-0006-03

Studies on HPLC Fingerprint of Semen Oroxyli

CAI Ying^{1*}, DING An-wei²

(1. 454 Hospital of the PLA, Nanjing 210002, China;

2. Nanjing Traditional Chinese Medicine University, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC fingerprint of Semen Oroxyli. **Methods:** The analysis was carried out on a Lichrospher C₁₈ column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) eluted with the mobile phase consisted of acetonitrile(A) and water(B) all containing 1% acetic acid in gradient mode. The gradient program was as follows: 0~ 30 min, A changed from 10% ~ 25%; (30~ 50) min, A changed from 25% to 55%; then the column kept for 5 min. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The wave length was 280 nm and temperature was 30 °C. **Result:** The fingerprint of Semen Oroxyli was established. **Conclusion:** The method is repeatable and can be used in quality control of Semen Oroxyli.

[Key words] Semen Oroxyli; HPLC fingerprint; balcalin

木蝴蝶为紫葳科植物木蝴蝶 *Oroxylum indicum* (L.) Vent. 的干燥成熟种子。始载于《滇南本草》, 为治疗咽喉疾病的常用中药。木蝴蝶药材质量标准 2005 版《中国药典》仅用薄层色谱法鉴别黄芩苷作为质控指标, 专属性差, 且无黄芩苷含量测定, 因此, 有必要对黄芩苷进行含量测定并建立指纹图谱对药材进行全面质量控制。

1 仪器与试剂

Waters 2695 高效液相色谱仪, Waters 2996 二极管阵列检测器, Waters Empower Pro 色谱工作站; 黄芩

苷(安徽 DELTA 天然有机化合物信息中心); 药材见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Lichrospher C₁₈ Media 10 nm 5 μm(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相: A: 1% 醋酸乙腈, B: 1% 醋酸水溶液。洗脱方法: (0~ 30) min, 乙腈% 为 10% ~ 25%; (30~ 50) min, 乙腈% 为 25% ~ 55%, 保持 5 min。流速: 1 mL·min⁻¹, 柱温: 30 °C。检测波长: 280 nm。

2.2 药材样品溶液制备 取干燥 4 h 剪碎的木蝴蝶药材 3 份, 约 0.5 g, 精密称定, 分别置 3 个 100 mL 锥形瓶中, 加入 50% 甲醇 50 mL, 称定重量, 超声提取 30 min, 冷却, 再称定重量, 用相同溶剂补足减失的重量, 摇匀, 静置 0.5 h, 滤过, 取续滤液, 即得。

[收稿日期] 2007-04-18

[通讯作者] * 蔡鹰, Tel: (025) 80865307; E-mail: caiying1967126.com

2.3 黄芩苷含量测定

2.3.1 黄芩苷工作曲线的制定 精密称取黄芩苷对照品 10.10 mg, 置 50 mL 容量瓶内, 加适量甲醇, 超声溶解, 用甲醇定容至刻度, 摇匀得浓度为 0.202 mg·mL⁻¹ 的黄芩苷甲醇溶液。以此作为对照品溶液。取黄芩苷对照品溶液 5, 15, 20, 25, 30 μL 进样, 以峰面积为纵坐标, 以进样量为横坐标, 得直线回归方程为: $Y = 339X - 39.7$, 黄芩苷线性关系范围在 (1.01~6.06) μg。 $r = 0.9999$ 。

2.3.2 精密度试验 用 0.202 mg·mL⁻¹ 的黄芩苷甲醇对照品溶液连续进样 5 次, 每次 5 μL, 结果峰面积 RSD 为 1.7%。

2.3.3 重复性试验 精密称取 12 号样品 0.5 g, 加 50% 甲醇 50 mL, 照 2.2 方法制备样品, 平行 5 份, 进样 10 μL。结果测得黄芩苷含量的 RSD 为 2.4%。

2.3.4 稳定性试验 取 0.202 mg·mL⁻¹ 的黄芩苷甲醇对照品溶液, 分别于 0, 2, 4, 6, 8 h 进样, 每次 5 μL, 测定峰面积计算含量, $RSD\% = 0.9$, 说明样品稳定性好。

2.3.5 加样回收试验 称取 11 号样品药材 0.2 g (黄芩苷含 14.7 mg·g⁻¹), 2.02 mg·mL⁻¹ 的黄芩苷对照品溶液 1 mL, 加 50% 甲醇至 50 mL, 照 2.2 方法制备样品。结果见表 1。

表 1 加样回收试验

| 取样量 (g) | 黄芩苷含量 (mg) | 黄芩苷添加量 (mg) | 实测量 (mg) | 黄芩苷回收率 (%) | 平均回收率 (%) | RSD (%) |
|---------|------------|-------------|----------|------------|-----------|---------|
| 0.212 | 3.116 | 2.02 | 5.162 | 101.3 | | |
| 0.215 | 3.161 | 2.02 | 5.187 | 102.5 | | |
| 0.191 | 2.808 | 2.02 | 5.098 | 98.1 | 99.66 | 2.21 |
| 0.199 | 2.925 | 2.02 | 5.120 | 99.2 | | |
| 0.208 | 3.058 | 2.02 | 5.080 | 97.2 | | |

2.3.6 样品含量测定 精密吸取上述 13 个样品供试液 10 μL, 依次注入 HPLC 仪, 进行色谱分析, 所得到的数据见表 2 所示。

2.4 指纹图谱方法学考察

2.4.1 精密度试验 取 12 号样品供试液, 进样 6 次, 每次 10 μL, 比较不同色谱峰的相对保留时间, 相对峰面积 RSD 分别为 0.1%~1.3%, 0.3%~2.6%。表明该方法精密度好, 符合指纹谱检测要求。

2.4.2 重复性试验 取 12 号样品药材 5 份, 按 2.2 样品溶液制备方法, 制备药材供试液 5 份, 分别进样, 进样量均为 10 μL, 比较不同色谱峰的相对保留

表 2 各木蝴蝶药材样品中黄芩苷含量测定

| 样品序列 | 产地 | 黄芩苷含量 (%) |
|------|------|-----------|
| 1 | 云南石屏 | 2.63 |
| 2 | 云南石屏 | 1.93 |
| 3 | 云南石屏 | 1.87 |
| 4 | 江西丰城 | 4.11 |
| 5 | 云南石屏 | 2.25 |
| 6 | 云南石屏 | 2.67 |
| 7 | 云南石屏 | 2.85 |
| 8 | 云南石屏 | 1.68 |
| 9 | 海南乐东 | 1.42 |
| 10 | 云南石屏 | 2.13 |
| 11 | 海南乐东 | 1.43 |
| 12 | 江西丰城 | 3.61 |
| 13 | 江西丰城 | 4.35 |

时间, 相对峰面积 RSD 分别为 0.2%~1.8%, 0.3%~2.8%。表明该方法重复性好, 符合指纹谱检测要求。

2.4.3 稳定性试验 取 12 号样品供试液, 分别在 0, 6, 12, 24, 48 h 进样, 每次进样量 10 μL, 比较不同色谱峰的相对保留时间, 相对峰面积 RSD 分别为 0.4%~1.2%, 0.7%~2.2%。表明该方法稳定性好, 符合指纹谱检测要求。

2.5 HPLC 指纹谱构建

2.5.1 13 批药材指纹谱及其相似度评价 用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版(国家药典委员会) 5 点校正, 中位数法, 结果表明, 相似度较好, > 0.95。

2.5.2 共有指纹峰标定^[1] 根据 13 批次供试品测定结果, 木蝴蝶药材高效液相色谱可分离出约 30 多个色谱峰, 经相似度计算比较, 选取其中 6 个共有峰为指纹图谱的特征峰, 其保留时间分别为: 20.0, 26.3, 30.4, 33.0, 43.7, 50.0 min, 峰面积分别为: 276, 6150, 425, 8200, 4923, 2408。与黄芩苷峰 (33.0 min) 相比, 其他 5 个共有峰相对保留时间为 0.608, 0.800, 0.922, 1.325, 1.513。

依据目前指纹图谱研究技术要求的有关规定, 峰面积占指纹图谱色谱峰总峰面积 10% 以上的共有指纹峰尚需标定其与参照峰峰面积的比值, 2, 4, 5, 6 号峰峰面积超过总峰面积的 10%。规定其与黄芩苷相对峰面积比值分别为 (0.360~1.642), (0.305~

1.004), (0.240~ 0.383)。

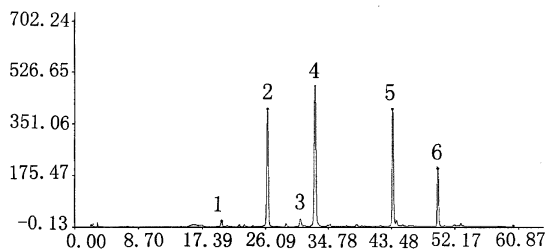
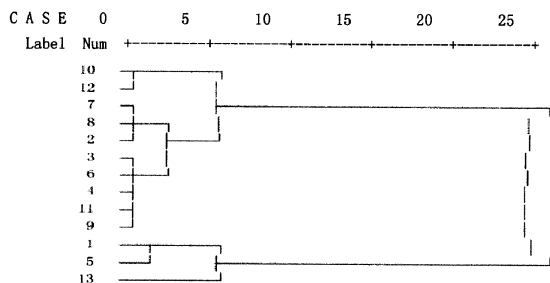


图 1 木蝴蝶指纹图谱共有模式

2.6 木蝴蝶 HPLC 指纹特征的模式分类研究^[2] 采用计算机图谱解析技术对 13 个样品的指纹图谱进行处理, 获得了量化指纹特征(HPLC 色谱峰峰面积数据)。将量化指纹特征作为变量输入计算机, 用 SPSS10.0 统计软件进行系统聚类分析。



S1-MHD13, S2-MHD1, S3-MHD2, S4-MHD3, S5-MHD4,
S6-MHD5, S7-MHD6, S8-MHD7, S9-MHD8, S10-MHD9,
S11-MHD10, S12-MHD11, S13-MHD12

图 2 13 批木蝴蝶 HPLC 指纹特征聚类谱系图

从上面的聚类分析结果可以看出, 系统将 13 个样品分为 2 大组, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 为一组, 其中 9, 11 为一小组, 产地海南乐东, 其余 8 个为一小组, 产地云南石屏, 4, 12, 13 为一组, 产地江西丰城, 计算机模式分类与产地分类完全相符, 从黄芩苷含量来看, 江西丰城产最高, 海南乐东产最低。从聚类分析结果看, 云南, 海南产样品关系更接近, 而与江西产样品关系相对疏远。

3 讨论

因为木蝴蝶药材中主要含有黄酮类成分, 极性较大, 所以选用水或甲醇做提取溶剂, 实验表明, 以对木蝴蝶中的主要有效成分黄芩苷的提取量的多少及出峰数目为指标来优选最佳溶剂, 在 0, 50%, 100% 甲醇浓度 3 个水平中以 50% 甲醇为最佳浓度, 这样也便于 HPLC 的测定。

因含黄酮类成份为主, 故使用 C₁₈ 反相柱, 由于汉邦柱价格适宜, 保留时间, 峰形, 分离度均可, 故选用。

用甲醇-醋酸, 乙腈-醋酸系统, 发现用乙腈-醋酸系统信息量相对较多, 峰形较好。将多种梯度比较, 定为文中的梯度洗脱条件。以黄芩苷计, 塔片数不低于 10 000, 保留时间为 33 min。

采用 PDA 检测器, 设定 230, 254, 280, 320 nm 4 个检测波长, 所获得的各主要色谱峰紫外吸收光谱在 280 nm 波长附近有明显吸收, 图谱具有较高的响应值及峰形, 基线干扰也小, 故选用 280 nm 为检测波长。

通过 13 批药材研究木蝴蝶的指纹特征, 由于木蝴蝶品种单一, 各药材间相似度较好, 13 批药材相似度计算相似度达 0.95 以上, 故据此制定了标准指纹谱。通过对 13 批木蝴蝶药材黄芩苷含量测定, 规定木蝴蝶药材中黄芩苷含量不得低于 1%, 本研究为木蝴蝶的质量评价优劣鉴定提供了科学, 可靠的依据, 补充了 2005 版《中国药典》中木蝴蝶药材质量标准规定。

[参考文献]

- [1] 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. 22-25.
- [2] 吴忠. 中药物质基础整体特征的表达: 中药色谱指纹特征的化学模式识别研究 [J]. 第一军医大学, 2004, 155-160.