

怀牛膝 HPLC 指纹图谱研究*

郑晓珂, 董三丽, 冯卫生, 吕鹏飞
(河南中医学院, 河南 郑州 450008)

摘要: 目的: 建立可供鉴别怀牛膝药材的 HPLC 指纹图谱。方法: 采用高效液相色谱梯度洗脱法, 选用 Shim-pack VP-ODS (150×4.6mm) 色谱柱; 流动相: 甲醇-水梯度洗脱, 采用梯度洗脱程序; 流速: 0.8ml/min, 运行时间 45min; 检测波长为 280nm。结果: 确定了怀牛膝药材有 13 个共有峰。结论: 本法可以作为怀牛膝药材质量控制的方法之一。

关键词: 怀牛膝; 指纹图谱; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2004)04-0006-03

怀牛膝是一种常用中药, 来源于苋科多年生草本植物怀牛膝(*Achyranthes bidentata* Bl.) 的干燥根, 冬季茎叶枯萎时采挖。具有补肝肾, 强筋骨, 活血逐瘀, 引血下行之功效, 用于腰膝酸痛, 筋骨无力, 经闭瘀瘕等证^[1]。除东北外, 全国普遍分布, 因主产于河南省古怀庆府, 故称为怀牛膝。怀牛膝的化学成分研究表明, 其化学成分主要有四类: 多糖类、皂苷类、植物甾酮类及黄酮类。植物甾酮类的主要成分为蜕皮甾酮, 皂苷类以齐墩果酸三萜皂苷类为主^[2]。目前, 药典对于怀牛膝的质量控制仅限于显微鉴别和齐墩果酸的薄层鉴别^[3], 不能系统、完整地反映怀牛膝的内在质量, 我们在系统研究怀牛膝质量标准的基础上, 根据国家药品监督管理局颁发的“中药注射剂色谱指纹图谱实验研究技术指南(试行)”要求, 建立了怀牛膝的 HPLC 指纹图谱, 可以作为控制怀牛膝药材内在质量的方法之一。

1 仪器与试剂

岛津 LC-10ATvp 型高效液相色谱仪, SPD-10Avp 可见-紫外检测器及浙江大学 N-2000 双通道色谱工作站。怀牛膝采于河南省武陟县大封乡驾部二村, 共 10 批(见表 1), 由河南中医学院生药学科陈随清教授鉴定为怀牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl. 的干燥根。对照品蜕皮甾酮(ecdysterone) 由河南中医学院药物分析学科梁生旺教授提供, 甲醇为色谱纯, 水为双蒸水。

2 色谱条件

色谱柱: Shim-pack VP-ODS(150×4.6mm) 柱; 检测波长: 280nm; 柱温: 25℃; 流速: 0.8ml/min; 流动相: 甲醇-水梯度洗脱, 0min: 甲醇-水(40:60), 20min: 甲醇-水(90:10); 运行时间: 45min。

3 测定方法

3.1 供试品溶液的制备 取过 40 目筛怀牛膝药材粉末约 5g, 精密称定, 置 100ml 具塞锥形瓶中, 精密量取甲醇 50ml, 加入锥形瓶中, 振摇, 密塞, 称定重量, 超声提取 1h, 放冷, 加甲醇补足损失的重量, 摇匀, 0.45μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液。

3.2 对照品溶液的制备 精密称取蜕皮甾酮对照品适量, 加甲醇制成 1mg/ml 的溶液, 摇匀, 即得。

表 1 怀牛膝药材

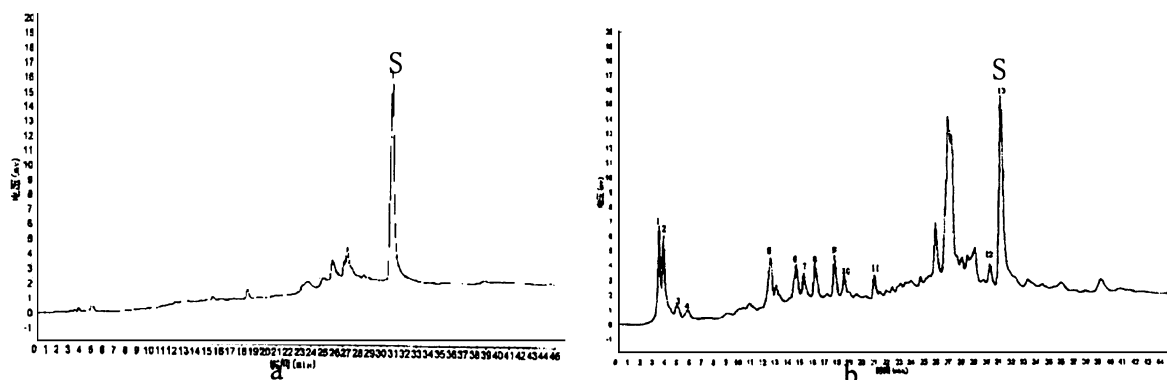
编号	产地	品种
1	河南省武陟县大封乡驾部二村	追* 1
2	河南省武陟县大封乡驾部二村	追 9
3	河南省武陟县大封乡驾部二村	追 15
4	河南省武陟县大封乡驾部二村	底* 4
5	河南省武陟县大封乡驾部二村	底 6
6	河南省武陟县大封乡驾部二村	底 14
7	河南省武陟县大封乡驾部二村	底 15
8	河南省武陟县大封乡驾部二村	底 18
9	河南省武陟县大封乡驾部二村	底 19
10	河南省武陟县大封乡驾部二村	底 26

(* 追: 追加肥料; 底: 底肥; 编号为不同时期追加肥料)

3.3 测定法 分别精密吸取对照品溶液 5μl 及供试品溶液各 20μl, 注入高效液相色谱仪, 记录 45min 的色谱图, 即得(见图 1)。供试品色谱中, 以对照品蜕皮甾酮对应的色谱峰(S) 的相对保留时间和峰面积

收稿日期: 2003-10-31

基金项目: 国家“九五”科技攻关资助项目(99-929-01-06A); 河南省杰出青年科学基金资助项目(0212001200)



a 对照品 b 怀牛膝药材 S 蜕皮甾酮

图 1 怀牛膝 HPLC 指纹图谱

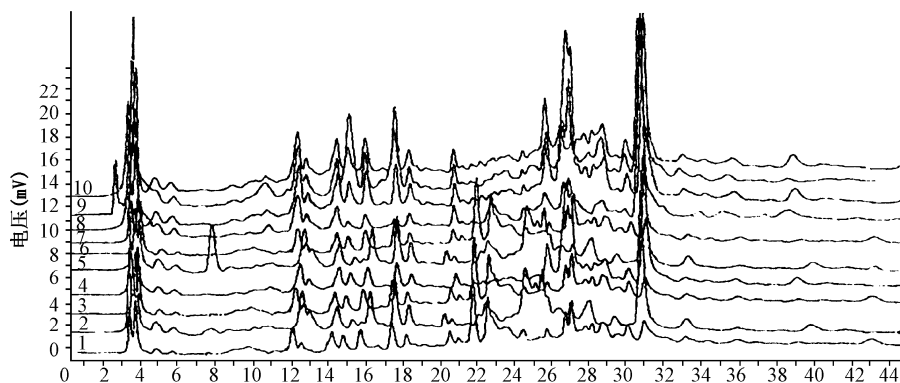


图 2 10 批怀牛膝 HPLC 指纹图谱

为 1, 计算各指纹峰的相对保留时间及峰面积比值。

4 方法学考察

4.1 稳定性试验 取同一份供试品溶液(怀牛膝药材 10), 分别在 0.1 2.4 8.16 24 48h 检测。结果表明, 峰面积占总峰面积 2% 以上的峰, 其色谱峰的相对保留时间和峰面积的比值基本没有明显变化 (RSD 均在 3% 以内), 样品溶液基本稳定。

4.2 精密度试验 取同一份供试品溶液(怀牛膝药材 10), 连续进样 5 次, 考察色谱峰的相对保留时间、峰面积比值的一致性。结果表明, 峰面积占总峰面积 2% 以上的峰, 其色谱峰的相对保留时间和峰面积的比值基本没有明显变化 (RSD 均在 3% 以内), 符合指纹图谱技术要求。

4.3 重复性试验 取怀牛膝药材 10 供试品 5 份, 依法测定, 考察色谱峰的相对保留时间、峰面积比值的一致性。结果表明, 峰面积占总峰面积 2% 以上的峰, 其色谱峰的相对保留时间和峰面积的比值基本没有明显变化 (RSD 均在 3% 以内), 符合指纹图谱技术要求。

5 实验结果

按上述方法检测 10 批怀牛膝药材的指纹图谱, 见图 2。45min 内有 13 个色谱峰是 10 批怀牛膝共有

的, 因此, 确定它们为共有指纹峰。

供试品色谱中, 以对照品蜕皮甾酮对应的色谱峰(S)的相对保留时间和峰面积为 1, 计算 10 批怀牛膝药材指纹图谱中 13 个共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积。见表 2。

表 2 共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积

共有峰编号	相对保留时间	相对峰面积
1	0.110~ 0.113	0.138~ 1.182
2	0.124~ 0.126	0.113~ 1.576
3	0.158~ 0.162	0.044~ 0.423
4	0.185~ 0.189	0.036~ 0.292
5	0.401~ 0.406	0.168~ 0.655
6	0.469~ 0.475	0.132~ 0.787
7	0.488~ 0.493	0.072~ 0.485
8	0.517~ 0.522	0.124~ 0.570
9	0.566~ 0.570	0.132~ 0.683
10	0.595~ 0.599	0.087~ 0.294
11	0.673~ 0.676	0.060~ 0.278
12	0.971~ 0.975	0.067~ 0.466
13(S)	1	1

6 讨论

6.1 供试品提取方法的考察 文献报道^[4], 以蜕皮

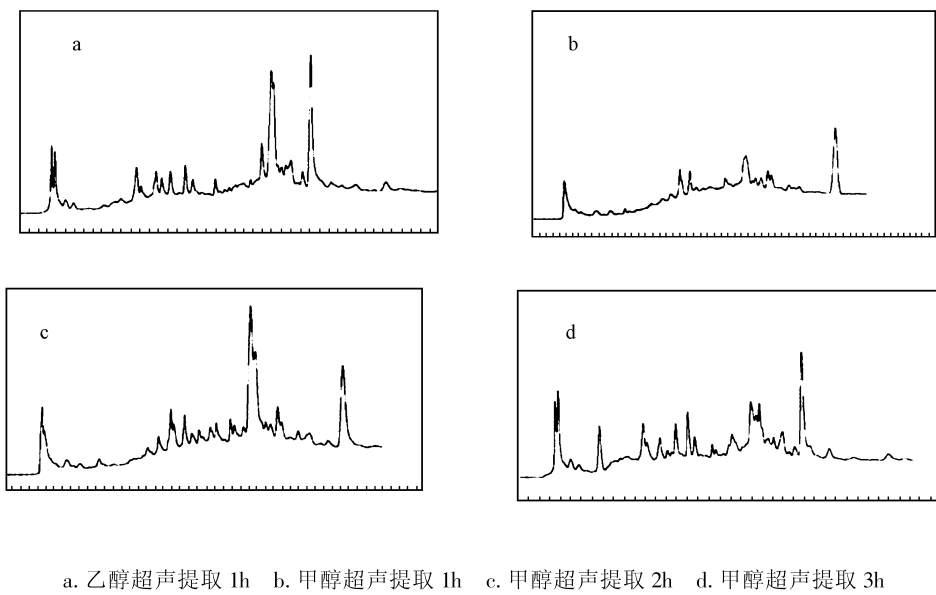


图 3 不同提取方法牛膝药材色谱图

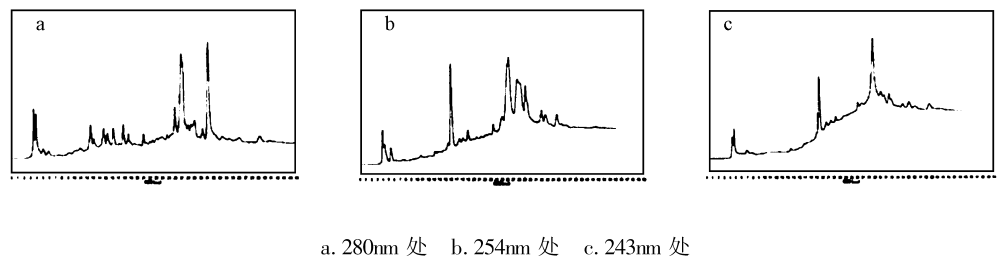


图 4 不同检测波长处牛膝药材色谱图

甾酮为指标,牛膝用乙醇回流提取6h与用乙醇超声提取40min没有明显差异,故本文选用超声提取法。在文献报道的基础上,考察了超声提取溶剂和提取时间,结果甲醇超声提取1h所得色谱图中色谱峰明显多于用乙醇超声提取1h所得色谱峰;用甲醇超声提取2h、3h和提取1h色谱峰个数和峰面积没有明显差异,最后选定供试品提取方法为甲醇超声提取1h,所得色谱图峰数最多,且操作简单。色谱图见图3。

6.2 流动相的确定 由于怀牛膝药材的成分复杂,选择单一流动相无法达到很好地分离,而采用梯度洗脱可以在整个分析时间段(45min)内,各色谱峰峰形尖锐,分离效果好,并能尽可能多地对组分进行很好地分离。试验中我们先后考察了不同组成、不同比例流动相以及不同洗脱梯度的分离效果。结果表明,现在所采用的流动相分离效果较好。

6.3 检测波长的选择 在怀牛膝紫外吸收图谱中,243nm、254nm、280nm处有较大吸收,分别在这三个波长处测定了怀牛膝的指纹图谱,结果以280nm为检测波长时,基线平稳,色谱图峰数较多,且各色谱峰峰形尖锐,分离效果好。色谱图见图4。

6.4 该法重复性、稳定性和精密度试验的RSD值 均在3%以内,表明该法稳定可靠、重现性好,可以作为牛膝质量控制标准的方法之一。

参考文献:

- [1] 郑虎占,董泽宏,余靖. 中药现代研究与应用(第二卷)[M]. 北京: 学院出版社, 1997. 1055.
- [2] 孟大利,李锐. 中药牛膝化学成分和药理活性的研究进展[J]. 中国药物化学杂志, 2001, 11(2): 120-123.
- [3] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 化学工业出版社, 2000. 54.
- [4] 张英,韦异,粟晖. 超声提取-反相高效液相色谱法测定牛膝中蜕皮甾酮[J]. 光谱实验室, 2002, 19(5): 668-671.