

[中药指纹图谱]

蟾酥药材 HPLC 指纹图谱研究

朱玲英¹, 钱大玮¹, 段金傲², 钱士辉¹, 李欣洁³
(1. 江苏省中医药研究院, 江苏 南京 210028; 2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210029; 3. 南京农业大学, 江苏 南京 210095)

关键词: 蟾酥; 指纹图谱; 高效液相法

摘要: 目的: 研究建立蟾酥 HPLC 指纹图谱分析方法, 为其质量控制和药材鉴别提供依据。方法: 利用高效液相色谱法, 采用反相 Alltima C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.5% 磷酸二氢钾溶液 (磷酸调节 pH 为 3.0) 和乙腈 (梯度洗脱); 检测波长: 296 nm; 柱温: 30 ℃; 流速: 1.0 mL/min。结果: 在选定的色谱条件下确定 10 个峰构成蟾酥药材的指纹特征, 各批次药材均具有上述特征, 但特征峰的相对含量分布差异导致色谱概貌存在一定差异。确定了蟾酥 HPLC 中酯蟾毒配基 (Resbufogenin)、华蟾酥毒基 (Cinobufagin)、蟾毒灵 (Bufalin)、去乙酰基蟾毒它灵 (Bufotalin) 以及华蟾毒精 (Cinobufotalin) 所对应的保留时间一致; 10 个批次指纹图谱相似度均大于 0.93。结论: 该方法准确、简单、稳定, 其色谱指纹图谱可用于蟾酥的鉴别和质量控制。

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1001-1528(2008)05-0625-04

HPLC fingerprint of *Venenum Bufonis*

ZHU Lingying¹, QIAN Dawei¹, DUAN Jin-ao², QIAN Shirhui¹, LIXin-jie³
(1. Jiangsu Provincial Academy of TCM, Nanjing 210028, China; 2. Nanjing University of TCM, Nanjing 210029, China; 3. Nanjing Agricultural University 210095, China)

KEY WORDS *Venenum Bufonis*; HPLC; fingerprint

ABSTRACT: **AM:** To establish HPLC fingerprint of *Venenum Bufonis* in an attempt to become a standard of quality control. **METHODS** The HPLC method was set up using Alltima C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase of acetonitrile-0.5% potassium dihydrogen phosphate solution of water; UV detection wavelength at 296 nm and column temperature at 30 ℃ with the flow rate of 1.0 mL/min; 20 μL of the injection volume. **RESULTS** In this chromatogram condition, 10 peaks were identified as the characteristic fingerprints of *Venenum Bufonis*. All samples showed the content differences among the samples. The retention times for resibufogenin, cinobufagin, bufalin, bufotalin and cinobufotalin in *Venenum Bufonis* were consistent with each other. The fingerprint showed good similarity up to 93% in samples from different habitats. **CONCLUSION:** The method is exact, simple and accurate, and can be used for the identification and quality control of *Venenum Bufonis*.

蟾酥为蟾蜍科动物中华大蟾蜍 (*Bufo bufo gargarizans* Cantor) 或黑眶蟾蜍 (*Bufo melanostictus* Schneider) 的耳后腺及皮肤腺分泌的白色浆液, 经加工干燥制成。其性味甘辛、温, 具有解毒、镇痛、开窍醒神以及抗肿瘤等作用^[1], 主治疮痈肿毒、咽喉肿痛、化脓性感染、慢性炎症、急救昏迷、心力衰竭等症^[2]。其活性成分主要有蟾毒配基、蟾蜍毒素、蟾酥碱等, 对镇痛、心血管系统及细胞毒有较好的作用^[3], 其中酯蟾毒配基、华蟾酥毒基及蟾毒灵等广泛运用于临床^[4]。

中药指纹图谱技术作为一种多组分复杂样品的有效质量控制方法, 能够反映出待测样品的整体性、特征性, 在中药的药材鉴别、生产工艺、药效部位筛选、质量控制等方面的研究中应用广泛^[5]。本试验采用高效液相色谱法, 研究并建立中药蟾酥的指纹图谱, 并对酯蟾毒配基、华蟾酥毒基、蟾毒灵、蟾酥它灵以及华蟾酥它灵用 HPLC 法进行了较系统的研究, 以期对蟾酥的质量控制建立有效的方法, 并为蟾酥的临床用药提供参考。

收稿日期: 2007-05-03
基金项目: 江苏省公益研究项目 BM2004525
作者简介: 朱玲英 (1953~), 女, 副主任技师, 研究方向: 中药分析, 电话: 025-85639640

1 仪器与材料

1.1 仪器 Waters 2695高效液相色谱系统,二极管阵列检测器, Empower色谱工作站, 中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版, Mettler 万分之一, 十万分之一电子天平, MilliQ 纯水器。

1.2 材料 试剂: DikmaPure 乙腈为色谱纯, 甲醇为色谱纯 (江苏汉邦科技有限公司), 其它试剂均为分析纯。对照品: 酯蟾毒配基、蟾毒灵、去乙酰基蟾毒它灵以及华蟾毒精 (江苏省中医药研究院化学研究室提供, 含量均大于 98%), 华蟾酥毒基由中国药品生物制品检定所提供; 药材来源: 江苏安格药业有限公司提供 10 个样品。

2 实验方法

2.1 色谱条件 色谱柱: Alltima C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 检测波长: 296 nm; 柱温: 30 ℃; 流速: 1.0 mL/min 进样量: 20 μL; 流动相: (A) 0.5% 磷酸二氢钾溶液 (磷酸调节 pH 为 3.0) 和 (B) 乙腈, 梯度洗脱。

表 1 0.5% 磷酸二氢钾溶液 (A)-乙腈 (B) 梯度洗脱

时间 /min	流量 /mL/min	溶剂 A/%	溶剂 B/%
1	1.0	92	8
2	1.0	92	8
8	1.0	70	30
15	1.0	60	40
25	1.0	50	50
35	1.0	60	40
46	1.0	92	8
60	1.0	92	8

2.2 对照品溶液的制备 精密称取酯蟾毒配基、华蟾酥毒基、蟾毒灵、去乙酰基蟾毒它灵以及华蟾毒精对照品适量, 分别用甲醇溶解定容, 得对照品溶液, 浓度分别为酯蟾毒配基 0.082 mg/mL、华蟾酥毒基 0.5 mg/mL、蟾毒灵 1.249 mg/mL、去乙酰基蟾毒它灵 0.421 mg/mL 以及华蟾毒精 0.601 mg/mL。再各精密吸取 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 称取蟾酥细粉约 0.2 g 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 20 mL, 称重, 水浴回流提取 1 h, 放冷, 称重, 补足甲醇损失的重量, 摇匀, 静置, 取上清液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

3 结果与分析

3.1 图谱测定时间的确定 取样品溶液 20 μL, 注入高效

液相色谱仪, 按选定的梯度洗脱表, 记录 60 min 内色谱图, 结果表明 45 min 后无有意义峰出现, 故确定图谱记录时间为 60 min。

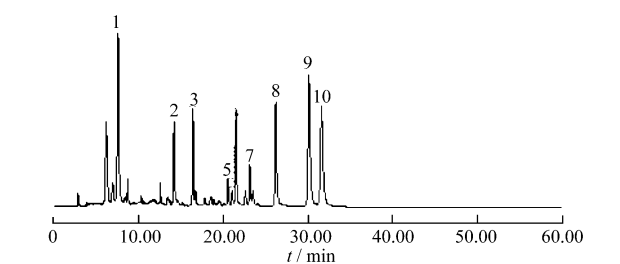


图 1 蟾酥药材指纹图

2 去乙酰基蟾毒它灵 5 华蟾酥毒基 8 蟾毒灵
9 华蟾毒精 10 酯蟾毒配基

3.2 稳定性试验 取 2 号样品细粉, 按供试品溶液制备方法制得供试品溶液, 分别在 0.1 4 8 12 h 不同时间点进样 20 μL 进行检测, 记录指纹图谱。计算相对保留时间和相对峰面积, 结果表明, 供试品的指纹图谱在 12 h 内基本稳定, 各共有色谱峰的相对保留时间的 RSD (%) 都小于 0.3, 相对峰面积的 RSD (%) 在 0.6~1.5 之间, 符合指纹图谱要求^[6]。

3.3 精密度试验 取 1 号样品细粉, 按供试品溶液制备方法制得供试品溶液, 连续重复进样 6 次, 每次进样 20 μL, 记录指纹图谱。计算相对保留时间和相对峰面积, 结果表明, 各共有色谱峰的相对保留时间的 RSD (%) 都小于 0.2, 相对峰面积的 RSD (%) 在 0.1~1.8 之间, 符合指纹图谱研究技术的要求^[6]。

3.4 重复性试验 取 3 号样品细粉 6 份, 按供试品溶液制备方法制得供试品溶液, 分别进样 20 μL, 记录指纹图谱。计算相对保留时间和相对峰面积, 结果表明, 各共有色谱峰的相对保留时间的 RSD (%) 都小于 0.1, 相对峰面积的 RSD (%) 在 0.3~2.8 之间, 符合指纹图谱研究技术的要求^[6]。

3.5 样品指纹图谱测定 分别取不同批次蟾酥样品 10 个, 按供试品溶液的制备方法获得供试品溶液, 进样 20 μL, 记录 HPLC 色谱图。结果见图 1, 图 2。峰 2 为去乙酰基蟾毒它灵 (Bufotalin), 峰 5 为华蟾酥毒基 (Cinobufagin), 峰 8 为蟾毒灵 (Bufalin), 峰 9 为华蟾毒精 (Cinobufotalin), 峰 10 为酯蟾毒配基 (Resbufogenin)。10 批样品共有峰相对保留时间见表 1, 10 批样品共有峰相对峰面积见表 2。

表 1 样品相对保留时间

编号	1 号峰	2 号峰	3 号峰	4 号峰	5 号峰	6 号峰	7 号峰	8 号峰	9 号峰	10 号峰
1	0.243 6	0.458 3	0.528 3	0.661 7	0.674 9	0.691 2	0.738 5	0.839 1	0.956 3	1.000 0
2	0.243 2	0.457 8	0.527 9	0.661 1	0.674 3	0.690 7	0.738 1	0.839 0	0.956 3	1.000 0
3	0.244 5	0.459 5	0.530 0	0.664 0	0.677 1	0.693 6	0.741 2	0.842 3	0.959 9	1.000 0
4	0.242 0	0.449 7	0.519 8	0.650 4	0.666 5	0.680 3	0.732 5	0.829 0	0.953 4	1.000 0
5	1.242 2	0.449 7	0.519 8	0.650 3	0.666 3	0.680 1	0.732 2	0.828 8	0.953 1	1.000 0
6	0.241 7	0.450 0	0.520 2	0.651 0	0.666 8	0.680 8	0.732 5	0.829 5	0.953 2	1.000 0
7	0.242 4	0.450 6	0.520 7	0.651 8	0.667 4	0.681 4	0.733 3	0.830 1	0.953 8	1.000 0
8	0.241 6	0.449 8	0.519 9	0.650 8	0.666 6	0.680 5	0.732 3	0.829 2	0.953 2	1.000 0
9	0.243 2	0.458 0	0.528 3	0.661 6	0.674 8	0.691 2	0.738 7	0.839 5	0.956 6	1.000 0
10	0.240 9	0.449 0	0.519 2	0.649 8	0.665 7	0.679 6	0.731 4	0.828 3	0.952 7	1.000 0

表 2 样品相对峰面积

编号	1号峰	2号峰	3号峰	4号峰	5号峰	6号峰	7号峰	8号峰	9号峰	10号峰
1	0.984 1	0.252 8	0.354 8	0.122 3	0.034 7	0.438 2	0.146 8	0.608 0	1.070 3	1.000 0
2	2.392 2	0.519 5	0.968 8	0.378 6	0.087 7	0.919 0	0.810 5	0.913 4	2.038 0	1.000 0
3	0.382 3	0.085 8	0.099 3	0.030 9	0.023 4	0.167 3	0.023 3	0.392 8	0.632 4	1.000 0
4	0.516 0	0.098 6	0.234 8	0.130 0	0.028 7	0.184 7	0.086 4	0.423 0	0.627 8	1.000 0
5	0.874 1	0.258 4	0.343 5	0.120 8	0.063 5	0.435 3	0.163 5	0.598 0	1.021 4	1.000 0
6	2.261 2	0.569 5	0.803 0	0.377 6	0.132 9	0.941 2	0.617 2	0.925 0	1.989 8	1.000 0
7	0.354 1	0.076 7	0.096 4	0.028 3	0.035 9	0.158 7	0.016 9	0.389 1	0.604 9	1.000 0
8	0.908 5	0.305 7	0.330 7	0.123 0	0.067 5	0.447 7	0.163 8	0.613 8	1.023 1	1.000 0
9	0.971 1	0.272 7	0.339 1	0.121 8	0.036 3	0.440 0	0.185 1	0.608 4	1.059 7	1.000 0
10	4.037 3	0.624 7	4.429 3	1.333 5	0.174 9	1.136 2	1.598 7	1.455 4	3.001 7	1.000 0

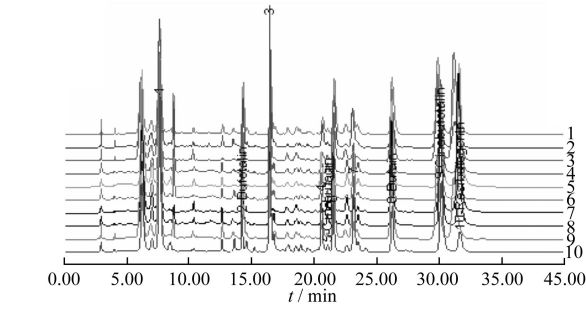


图 2 蟾酥 1~10批药材指纹叠加图谱

3.6 UV 图谱比较测定 利用 DAD 检测器的特点,对 5 个已知成分进行 UV 分析,对照品色谱与样品色谱相对应的峰 UV 图谱一致,说明样品的分离效果较好。见图 3、4。

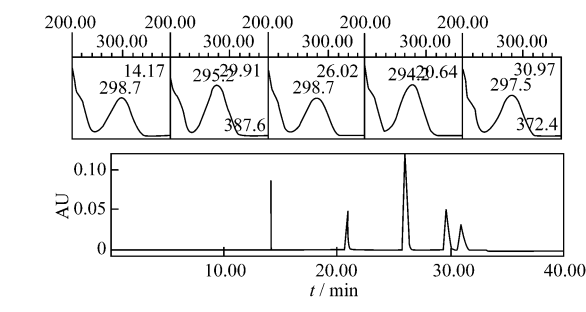


图 3 蟾酥对照品对应的 UV 吸收光谱图

表 3 样品指纹图谱相似度分析结果

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
相似度	0.960	0.999	0.947	0.941	0.962	0.997	0.949	0.935	0.998	0.999

以甲醇提取液出峰数较多且各活性成分得率略高,故选择甲醇作提取溶剂。对选用不同浓度甲醇(40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%)做溶剂试验,结果表明样品用甲醇 100% 为溶剂,提取比较完全。在提取方法上,用甲醇作溶剂,对比回流提取与超声提取两种提取方法,从主要色谱峰的积分面积可知回流提取的效率明显高于超声提取,因此选择采用回流提取法。

4.2 流动相的选择 采用乙腈-0.5% 磷酸二氢钾溶液(50:50)等度流动相,甲醇-水,乙腈-水,乙腈-甲醇,甲醇-0.5% 磷酸二氢钾溶液以及乙腈-0.5% 磷酸二氢钾溶液等多种不同流动相、不同梯度的流动相体系^[7-11],最终确定以本实验

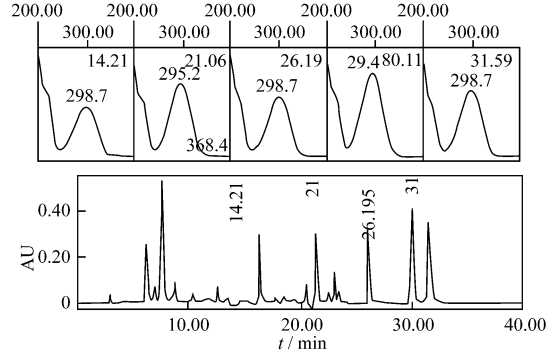


图 4 蟾酥药材中主要成分对应的 UV 吸收光谱图

3.7 相似度计算 运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 2004A 版对 10 批蟾酥药材的指纹图谱进行相似度分析,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,选定上述 10 个共有峰进行谱峰匹配,通过中位数计算得出蟾酥样品指纹图谱的共有模式,并以此共有模式为标准,进行整体相似度评价,相似度评价结果均大于 0.93 说明这 10 批蟾酥药材的化学成分一致性较好。结果见表 3。

4 讨论

4.1 提取溶剂与提取方法的选择 在供试品溶液制备上,采用乙醇、乙醚、甲醇、氯仿、丙酮等多种溶剂进行回流提取,

现在采用的乙腈-0.5% 磷酸二氢钾溶液(8:92)梯度洗脱各成分分离效果最佳。

4.3 检测波长的选择 在 200~400 nm 范围内进行光谱扫描,提取脂蟾毒配基等的色谱峰的光谱图,在 296 nm 和 299 nm 处有最大吸收,根据药典要求,故选取 296 nm 作为蟾酥指纹图谱的检测波长,以提高检测的灵敏度,提高了分析方法的准确性和可靠性。

4.4 共有峰的确定 对不同供试品所得指纹图谱进行分析,选择稳定性较好,吸收强,特征明显的色谱峰为共有峰共标定了 10 个峰。其中峰 2 为去乙酰基蟾毒它灵,峰 5 为华蟾酥毒基,峰 8 为蟾毒灵,峰 9 为华蟾毒精,峰 10 为酯蟾毒

配基,均依对照品的色谱峰确定。每个蟾酥样品均有 20 多个色谱峰,除已标定的色谱峰外,还有一些不太明显的共有峰及每批样品各自特有的色谱峰,可作为测定特定类型蟾酥的指标。

4.5 方法评价 目前蟾酥的研究多为含量测定,没有一篇关于指纹图谱的完整研究。本实验采用酯蟾毒配基、华蟾酥毒基、蟾毒灵、去乙酰基蟾毒它灵以及华蟾毒精对蟾酥指纹图谱进行了系统的研究。通过指纹图谱可以比较全面的反映蟾酥药材的化学成分以及各特征性有效成分间峰面积的相对比例,进而反映蟾酥药材的内在质量,为蟾酥药材判断真伪、评价优劣、考察稳定性和一致性提供依据。本实验中所建立的测定方法快速准确,灵敏度高,可作为蟾酥质量控制和应用的依据以及中药研究的方法学借鉴。

参考文献:

[1] 中国药典 2005年版一部 [S]. 2005: 265
[2] 谢 麟,长 青. 蟾酥的药理作用与制剂开发(上) [J]. 兽药与饲料添加剂, 2002 (7): 26-27.
[3] Yeh J Y, Huang W J, Kan S T, *et al* Effects of bufalin and cinobufagin on the proliferation of androgen dependent and inde-

pendent prostate cancer cells[J]. *Prostate*. 2003, 54(2): 112-24.
[4] 赵 强,孟凡静,刘安西. 蟾酥研究进展 [J]. 中草药, 2004, 35 (10): 1004-1007.
[5] 刘小瑜,吕圭源,俞景华. 指纹图谱在中药研究中的应用概况 [J]. 天津药学, 2006 18(1): 46-48.
[6] 国家药品监督管理局. 关于印发《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》的通知 [J]. 中成药, 2000 22(10): 671-675.
[7] 邝晓霞,莫翠华. 牙痛一粒丸中华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的含量测定 [J]. 中药材, 2003 26(10): 756-757.
[8] 刘东辉,李 军,黄意甜,等. 高效液相色谱法测定心可宁胶囊中华蟾酥毒基、脂蟾毒配基的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2005 11(6): 26-27.
[9] 丁冬梅,谭妙娟. HPLC 测定心力丸中华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的含量 [J]. 中成药, 2006 28(1): 149-150
[10] 苏永华,黄雪强,张大志,等. 华蟾素注射液中蟾毒内酯类成分含量检测 [J]. 中成药, 2003 25(1): 24-27.
[11] Song H, Guo T, Bi K, *et al* Determination of resibufogenin and cinobufagin in heart-protecting musk pill by HPLC [J]. *Biomol Chromatogr*. 2000 14(2): 130-132.

肿节风浸膏中的总黄酮和香豆素部位的谱图指纹差异研究

倪小兰², 徐国良¹, 肖兵华³, 付玉梅², 张启云¹, 陈 奇^{3*}

(1. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 江西南昌 330004; 2. 江中药业股份有限公司, 江西南昌 330096; 3. 江西中医学院, 江西南昌 330004)

关键词: 肿节风; 总黄酮; 香豆素; 指纹图谱

摘要: 目的: 比较大孔吸附树脂分离的肿节风浸膏中的总黄酮部位和香豆素部位的谱图指纹差异。方法: 采用指纹图谱技术, 建立了肿节风浸膏的指纹图谱。结果: 总黄酮部位与香豆素部位的特征指纹的峰数量和峰面积有差异。结论: 大孔吸附树脂能较好地分离药物的药效部位, 谱图指纹能较好地表征药效部位。

中图分类号: R284. 1 文献标识码: A 文章编号: 1001-1528(2008) 05-0628-03

Fingerprint differences between total flavonoids and coumarins of *Sarcandra glabra* extract

NI Xiaolan², XU Guoliang¹, XIAO Bin-hua³, FU Yumei², ZHANG Qiyun¹, CHEN Qi³
(1. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China; 2. Jiangzhong Pharmaceutical Co., Ltd Nanchang 330077, China; 3. Jiangxi College of TCM, Nanchang 330006, China)

KEY WORDS *Sarcandra glabra*; total flavonoids; coumarins; fingerprint chromatogram

ABSTRACT: AM: To compare the fingerprints difference between total flavonoids and coumarins of *Sarcandra*

收稿日期: 2007-04-12
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30260122); 江西省自然科学基金资助项目 (0640161)。
作者简介: 倪小兰 (1965~), 女, 副主任中药师, 研究方向: 中药质量控制。电话: 0791-8164162。
* 通讯作者: 陈 奇, 电话: 0791-6825769 E-mail: chnq606@263.net