

不同产地珍珠母药材 HPLC 特征图谱的建立

王海波¹, 高会芹², 周永妍², 严辉³

(1.河南省食品药品检验所业务科,河南 郑州 450018;2.神威药业集团有限公司中药注射剂新药技术开发国家地方联合工程实验室,河北 石家庄 051430;3.南京中医药大学江苏省中药资源产业化过程协同创新中心/国家中医药管理局中药资源循环利用重点研究室,江苏 南京 210023)

摘要:目的 建立珍珠母药材 HPLC 特征图谱,提高其质量控制水平。方法 采用 HPLC 法测定,Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液(梯度洗脱),流速 0.5 mL/min,检测波长 254 nm,柱温为 30 ℃;以苯丙氨酸为参照物,运用国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》对测定的 10 批珍珠母药材数据进行处理分析。结果 建立了以 5 个特征峰为指标成分的珍珠母药材 HPLC 特征图谱,以苯丙氨酸色谱峰为参照,其他 4 个特征峰的相对保留时间分别为 0.703±0.006、0.814±0.005、0.881±0.001、1.403±0.008。结论 该方法经过方法学验证,可用于珍珠母药材的质量控制。

关键词:珍珠母;苯丙氨酸;相对保留时间;HPLC;特征图谱;质量控制

中图分类号:R284

文献标志码:A

文章编号:1672-0482(2020)02-0273-04

DOI:10.14148/j.issn.1672-0482.2020.0273

引文格式:王海波,高会芹,周永妍,等.不同产地珍珠母药材 HPLC 特征图谱的建立[J].南京中医药大学学报,2020,36(2):273-276.

HPLC Specific Chromatograms of *Margaritifera Concha* from Different Area

WANG Hai-bo¹, GAO Hui-qin², ZHOU Yong-yan², YAN Hui³

(1. Business Segment, Henan Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou, 450018, China; 2. State-Local Joint Engineering of New Drugs Development Technology for TCM Injection, Shineway Pharmaceutical Group Co., Ltd., Shijiazhuang, 051430, China; 3. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization/State Administration of Traditional Chinese Medicine Key Laboratory of Chinese Medicinal Resources Recycling Utilization, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the specific chromatograms of *Margaritifera concha* by HPLC, so as to improve its quality control. **METHODS** The analysis was performed on an Agilent ZORBAX SB-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with a gradient mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric acid at a flow rate of 0.5 mL/min. The detection wavelength was set at 254 nm and the column temperature was 30 ℃. Using phenylalanine as the reference solution, 10 batches of samples of *Margaritifera concha* were analyzed with the developed method, and similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine (2012 Version) was used for the quality assessment. **RESULTS** Five common peaks were found through the similarity evaluation system. With phenylalanine as the reference, the relative retention time of the other four peaks were 0.703±0.006, 0.814±0.005, 0.881±0.001, 1.403±0.008, respectively. **CONCLUSION** The method has been validated by methodology, and can be used for the quality control of *Margaritifera concha*.

KEYWORDS: *Margaritifera concha*; phenylalanine; relative retention time; HPLC; specific chromatogram; quality control

珍珠母基源为蚌科动物三角帆蚌 *Hyriopsis cumingii* (Lea)、褶纹冠蚌 *Cristaria plicata* (Leach)或珍珠贝科动物马氏珍珠贝 *Pteria martensii* (Dunker)的贝壳,珍珠母具有平肝潜阳、安神定惊、明目退翳的功效,用于头痛眩晕、惊悸失眠、目

赤翳障、视物昏花^[1]。珍珠母为药典收载的品种,主要成分为碳酸钙、贝壳硬蛋白及微量元素^[2-3]。2015版《中国药典》珍珠母项下检验项目仅包括性状、鉴别及酸不溶性灰分。赵希贤等^[4]利用凯式定氮法测定氮含量,用氨基酸测定仪测定氨基酸种类及含量,

收稿日期:2019-08-30

基金项目:国家现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-21)

第一作者:王海波,男,副主任药师,E-mail:haibowang99@163.com

通信作者:周永妍,女,工程师,主要从事中成药质量标准研究,E-mail:zhouyongyan33004@163.com

用于研究珍珠母水解提取氨基酸的工艺;李尚蓉等^[5]利用电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)法和电感耦合等离子体发射光谱(ICP-OES)对珍珠和珍珠母中24种微量元素进行了测定;陈红等^[6]用ICP-MS测定珍珠母等药材中15种稀土元素含量;韦正等^[7]采用EDTA滴定法对珍珠母等药材中碳酸钙含量进行测定;司玮等^[8]采用紫外分光光度法对珍珠母水解后样品中总氨基酸进行测定;朱智甲^[9]采用柱前衍生化法测定珍珠母中氨基酸含量。贝壳类中药一直缺少专属性的鉴别,本文收集了不同产地的珍珠母药材,探索采用HPLC法对其进行专属性鉴别,建立了珍珠母药材HPLC特征图谱,为更好地控制珍珠母药材质量提供了可靠的方法依据。

1 材料

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(安捷伦1260型,美国安捷伦公司;Shimadzu LC-20AT型,日本岛津公司; Dionex Ultimate 3000型,美国 Thermo Fisher 公司)。超声波清洗器(KH3200E型,昆山禾创超声仪器有限公司),分析天平(CPA225D型,德国赛多利斯),高速多功能粉碎机(RHP200型,永康市荣浩工贸有限公司),药典检验筛(浙江上虞市华丰五金仪器有限公司)。

色谱纯乙腈,超纯水,其他试剂为分析纯。对照品色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸(批号:140624-201506)均购自中国食品药品检定研究院。

1.2 样品

经原河北省药品检验研究院孙宝惠主任中药师鉴定,自珍珠母主产地和市场收集的10批珍珠母药材均为正品,样品来源见表1。

表1 珍珠母样品信息表

序号	产地	收集时间
ZZM-01	浙江诸暨	201803
ZZM-02	湖南邵阳	201803
ZZM-03	湖南衡阳	201803
ZZM-04	浙江绍兴	201803
ZZM-05	安徽蚌埠	201803
ZZM-06	浙江宁波	201803
ZZM-07	浙江诸暨	201804
ZZM-08	广西南宁	201804
ZZM-09	广西玉林	201804
ZZM-10	广西柳州	201804

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

取色氨酸、酪氨酸及苯丙氨酸对照品适量,精密称定,加1 mol/L硫酸制成浓度分别为15 μg/mL的溶液,作为混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

取珍珠母粉末(过3号筛)约5.0 g,置耐酸容器中,精密加入6 mol/L的H₂SO₄溶液25 mL,待气泡消失,加热回流4 h,趁热过滤,滤渣、容器用少量热水反复洗涤,洗液与滤液合并至100 mL量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,用微孔滤膜过滤,即得。

2.3 色谱分析条件

Agilent ZORBAX SB-C₁₈型色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);A相为乙腈,B相为0.1%磷酸水溶液,梯度洗脱程序:0~40 min,0~11%A;40~50 min,11%~15%A。流速0.5 mL/min;检测波长为254 nm;柱温30℃,进样量10 μL。

2.4 方法学考察

2.4.1 特征图谱测定方法的建立 取10批珍珠母样品,按“2.2”项下方法制备,按“2.3”项下色谱条件进样分析,色谱图见图1。根据10批珍珠母特征图谱分析及数据计算,结果确定5个共有峰,见图2。

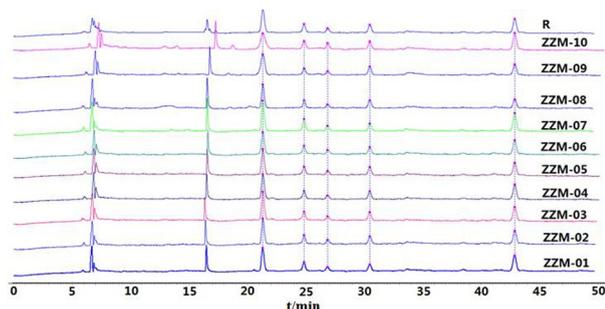
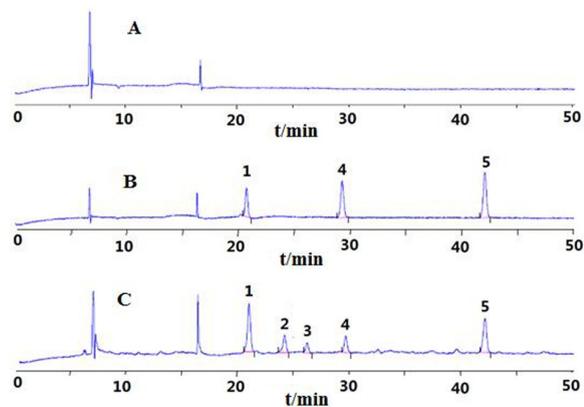


图1 不同批次珍珠母的特征图谱



注:A.空白溶液;B.混合对照品溶液;C.供试品溶液;

1.酪氨酸;4.苯丙氨酸;5.色氨酸

图2 珍珠母特征图谱特征峰标定

2.4.2 精密度试验 取珍珠母样品(ZZM-01)1份,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按照“2.3”项下

色谱条件,连续进样 6 次,测定,记录色谱图。使用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》分析色谱图,结果色谱图相似度均为 1;以苯丙氨酸色谱峰为参照峰,各色谱峰相对保留时间 *RSD* 和相对峰面积 *RSD* 分别在 0.1%~0.3% 和 0.2%~1.1% 之间,说明精密度符合特征图谱分析方法的要求。

2.4.3 重复性试验 取珍珠母(ZZM-01)样品 6 份,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.3”分别进样并记录色谱图,考察本研究试验方法的重复性。使用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》分析色谱图,结果所得色谱图相似度均大于 0.999;以苯丙氨酸色谱峰为参照峰,各色谱峰相对保留时间 *RSD* 和相对峰面积 *RSD* 分别在 0.2%~0.3% 和 0.3%~1.5% 之间,表明该方法重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 取珍珠母(ZZM-01)样品 1 份,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.3”项下方法分别在 0、2、4、8、12、24 h 检测,记录色谱图,考察珍珠母供试品溶液的稳定性。使用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》分析色谱图,结果所得色谱图相似度均为 1;以苯丙氨酸色谱峰为参照峰,各色谱峰相对保留时间 *RSD* 和相对峰面积 *RSD* 分别在 0.1%~0.3% 和 0.5%~1.8% 之间,说明珍珠母样品在 24 h 内稳定。

2.4.5 耐用性试验 取珍珠母(ZZM-01)样品 1 份,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,在原色谱条件基础上,对 3 个不同厂家的高效液相色谱仪(Agilent 1260;Shimadzu LC-20AT;Ultimate 3000)、3 个不同品牌的色谱柱(Phenomenex Luna C₁₈、Welch Ultimate XB-C₁₈、Inertsil ODS-SP)分别进行了耐用性试验考察,结果显示,各色谱峰相对保留时间 *RSD* 均在 0~0.5% 之间,相对峰面积 *RSD* 在 0~1.5% 之间,色谱峰分离度受不同色谱条件影响不大,表明方法耐用性较好。因此该色谱方法可作为珍珠母特征图谱的色谱条件。

2.5 特征图谱的建立与评价分析^[10-14]

采用国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》,数据经多点校正,自动匹配生成珍珠母药材对照特征图谱,计算珍珠母药材特征图谱的共有模式与样品相似度。对照图谱由 10 批样品均值生成,计算 10 批样品的相似度,结果各批样品的相似度在 0.979~0.994 之间,均在 0.97 以

上。用相对保留时间标定特征峰,通过与对照色谱峰对比,确定 1 号色谱峰为酪氨酸,4 号色谱峰为苯丙氨酸,5 号色谱峰为色氨酸,见图 2。以 4 号色谱峰作为参照峰(S 峰),计算其他 4 个共有峰的相对峰面积,结果显示各峰相对峰面积 *RSD* 在 18.82~32.04 之间。特征图谱的相似度主要受各峰相对峰面积影响,而样品产地是影响相对峰面积的主要因素,各相对峰面积具体结果见表 2。

表 2 10 批珍珠母药材共有峰相对峰面积测定结果

样品批号	1 号峰	2 号峰	3 号峰	4 号峰	5 号峰
ZZM-01	2.403	0.671	0.377	1.000	1.259
ZZM-02	3.796	1.558	0.808	1.000	2.870
ZZM-03	3.066	0.619	0.368	1.000	0.973
ZZM-04	2.696	0.727	0.451	1.000	1.189
ZZM-05	3.215	1.065	0.612	1.000	2.204
ZZM-06	3.328	0.695	0.345	1.000	1.316
ZZM-07	4.495	1.528	0.660	1.000	2.598
ZZM-08	2.623	0.843	0.423	1.000	1.581
ZZM-09	3.340	1.332	0.572	1.000	2.568
ZZM-10	3.406	0.707	0.345	1.000	1.884
平均	3.237	0.974	0.496	1.000	1.844
<i>RSD</i> /%	18.82	37.93	32.04	0.00	36.84

2.6 珍珠母质量评价方法的确立

2.6.1 参照峰的选择 在各批次样品图谱中 4 号峰苯丙氨酸色谱峰保留时间居中,相邻的峰少,分离度较高,故以此为参照峰。

2.6.2 评价方法 供试品特征图谱中应包含 5 个特征峰,其中 4 号峰应与混合对照品溶液中苯丙氨酸峰保留时间相同,以该色谱峰为 S 峰,计算其他 4 个特征峰的相对保留时间,其相对保留时间均应在规定值的 ±5% 之内,规定值为:0.703(1 号峰)、0.814(2 号峰)、0.881(3 号峰)、1.403(5 号峰)。

3 讨论

3.1 珍珠母鉴别方法

《中国药典》采用显微鉴别方法对珍珠母进行鉴别,对人员经验要求非常高;杜鹤等^[15]采用 DNA 分子鉴定对珍珠母进行了鉴别研究,步骤较为繁琐;在宝石学上常采用 X 射线光谱法对珍珠进行鉴别。本文尝试建立了 HPLC 特征图谱的方法对珍珠母进行专属性鉴别,通过对 10 批珍珠母药材的分析,标定了 5 个共有特征峰,以对照特征图谱为参照,10 批次珍珠母药材的相似度均大于 0.97。本项目所建立的珍珠母 HPLC 特征图谱分析方法专属性强、重复性好,能较全面地反映珍珠母药材的内在质量,为

其质量控制提供了参考依据。

3.2 药材粉碎粒度考察

本实验考察了珍珠母药材的粉碎粒度(2号筛、3号筛、4号筛)对实验结果的影响,结果表明不同粉碎粒度对色谱峰个数无影响,3号筛所得色谱图响应值较高且与4号筛相差不大,因此粉碎粒度确定为过3号筛。

3.3 供试品溶液制备方法选择

珍珠母主要成分为碳酸钙、贝壳硬蛋白及微量元素,而贝壳硬蛋白可用酸水解得到氨基酸。实验中对提取溶剂(4、6、8 mol/L的HCl溶液,4、6、8 mol/L的H₂SO₄溶液),提取加热方式(电热套加热、水浴加热),回流时间(1、2、4、6、8 h)进行了考察,采用6 mol/L的H₂SO₄溶液电热套加热回流4 h所得的色谱图,色谱峰数最多,且各峰响应值最大,故最终确定了供试品溶液的制备方法。

3.4 检测波长的确定

取供试品溶液,注入液相色谱仪,采用二极管阵列检测器,获取190~400 nm的色谱图,比较发现,在254 nm波长处各色谱峰分离度较好,响应值较高,故最终确定检测波长为254 nm。

3.5 流动相的考察

本实验考察了4种不同的流动相(甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液),结果显示采用乙腈-0.1%磷酸水溶液进行洗脱,得到色谱峰较多,且分离度较好,最后选择乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相。

3.6 特征峰的指认

本研究建立了以5个特征峰为指标成分的珍珠母HPLC特征图谱,并对其中3个峰进行了峰归属,确定为色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸,其余2个色谱

峰还需进一步研究指认。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[M].北京:中国医药科技出版社,2015:232-233.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草[M].上海:上海科学技术出版社,1999:7999-8001.
- [3] 《中国药用动物志》协作组.中国药用动物志(第二册)[M].天津:天津科学技术出版社,1983:46.
- [4] 赵希贤,杨抒宁,彭澎,等.珍珠母水解提取氨基酸工艺的初步研究[J].北京中医药大学学报,2005,28(5):54-56.
- [5] 李尚蓉,张静娴,姚帅,等.珍珠和珍珠母的微量元素测定及其比较分析[J].世界中医药,2015,10(10):1594-1597.
- [6] 陈红,朱蓉,陈鸿平.电感耦合等离子体质谱法测定三种贝壳类药材中稀土元素含量[J].医药导报,2014,33(3):373-377.
- [7] 韦正,陈鸿平,陈林,等.石决明、牡蛎、珍珠母三味平肝潜阳药碳酸钙的含量测定及其比较研究[J].中药与临床,2012,3(4):10-13.
- [8] 司玮,阿如娜,李尚蓉,等.7种海洋矿物药的比较分析研究[J].中国中药杂志,2014,39(17):3321-3325.
- [9] 朱智甲.邻苯二甲醛柱前衍生反相高效液相色谱法测定珍珠母中氨基酸[J].理化检验-化学分册,2000,36(3):97-98.
- [10] 周永妍,高会芹,姜国志,等.独脚金药材HPLC-DAD特征图谱研究[J].药物分析杂志,2016,36(7):1225-1230.
- [11] 施之琪,付建武,李雪银,等.黄芪健胃膏高效液相特征图谱[J].中国医院药学杂志,2018,38(1):41-45.
- [12] 段吉平,姚宝林,杨建玲,等.当药HPLC特征图谱的探索[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(21):75-78.
- [13] 张锦,刘俊宏,赵珊,等.强力天麻杜仲胶囊的HPLC特征图谱[J].中成药,2016,38(9):1990-1993.
- [14] 邵士珺,吴雪卿,万华,等.乳癌术后方HPLC特征图谱研究[J].中国医药导报,2017,14(13):4-12.
- [15] 杜鹤,崔丽娜,姚辉,等.基于COI条形码序列的珍珠母及其混伪品的DNA分子鉴定[J].中国现代中药,2011,13(11):12-14.

(编辑:杨巍敏)