

- [5] SONG J Y, WANG Z C, SONG C Q. Quantitative analysis of arctiin and arctigenin of *Arctium lappa* L. from different areas by HPLC [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2004, 15(11): 737-739.
- [6] 雷海民, 毕葳, 李强, 等. 不同产地牛蒡子药材 RP-HPLC 指纹图谱研究[J]. 中药材, 2006, 29(11): 1166-1168.
- [7] OU Z M, CHEN X Y, YING G Q. Determination of arctiin in Lingqiaojiedu pills by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27(13): 1204-1206.
- [8] DUAN X Y, ZHANG H, ZHANG M Y. Optimizing decoction process for Compound Niubangzi Buccal tablets and studies on the content changes of arctiin [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27(6): 499-501.
- [9] QIAO F X, CAI H, TU P F. Auzlity Evaluation of crude and processed Fructus Arctii by quantitative analysis of multi-components by single marker [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理), 2015, 26(4): 535-541.
- [10] SHAO J, GUO M, YU X H, et al. Determination of total lignanoids and arctinin in different parts of *Arctium lappa* L [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(6): 506-508.

收稿日期: 2016-01-24

山慈菇 HPLC 指纹图谱质量评价

吕林锋, 蒋永海, 朱希, 钟宁远(绍兴市食品药品检验研究院, 浙江 绍兴 312017)

摘要:目的 建立山慈菇(冰球子)的 HPLC 指纹图谱,为山慈菇(冰球子)药材的质量评价提供科学依据。方法 采用 Agilent 1200 Topsisil™(拓谱)C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 乙腈和水为流动相, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 224 nm, 柱温为 30 °C。结果 10 批山慈菇(冰球子)药材 HPLC 指纹图谱共检出 7 个分离度良好的共有指纹峰。样品中参照物 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯的含量有明显差别。结论 该法简便、快速,可作为山慈菇(冰球子)的质量评价的有力手段。

关键词: 山慈菇(冰球子); 指纹图谱; 质量评价; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1; R971.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)10-1276-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.10.013

Study on HPLC Fingerprints of *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus*

LYU Linfeng, JIANG Yonghai, ZHU Xi, ZHONG Ningyuan(*Shaoxing Institute for Food and Drug Control, Shaoxing 312017, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the HPLC fingerprints of chemical constituents in *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus* and provide the basis for the quality evaluate of it. **METHODS** The chromatographic separation was performed on an Agilent 1200 Topsisil™ C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm) column, and the mobile phase was consisted of acetonitrile and water with gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the detection wavelength was 224 nm, and the column temperature was 30 °C. **RESULTS** There were 7 common peaks in the HPLC fingerprints of 10 batches of *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus*, and the 7 characteristic peaks showed obvious difference in *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus* from different habitats. Significant difference was observed in the militarine content among the samples. **CONCLUSION** The HPLC fingerprints method is simple, rapid and feasible in the quality control of *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus*.

KEY WORDS: *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus*; fingerprints; quality evaluation; HPLC

山慈菇为兰科植物杜鹃兰 *Gremastra appendiculata* (D. Don) Makino、独蒜兰 *Pleione bulbocodoides*(Franch.) Rolfe 或云南独蒜兰 *Pleione yunnanensis* Rolfe 的干燥假鳞茎。前者习称“毛慈菇”,后二者习称“冰球子”为中国药典收载的常用中药,其味甘、微辛、性凉,归肝、脾经,具

有清热解毒、化痰散结的功效,主要用于痈肿疗毒、瘰疬,蛇虫咬伤等症。根据文献调研结果^[1-9],独蒜兰中发现了二氢菲及菲类化合物、联苄类化合物等;云南独蒜兰中发现了二氢菲类化合物和二苯基衍生物(联苄类化合物)。菲类化合物和联苄类化合物是山慈菇药材中的主要特征性成分,

作者简介: 吕林锋,男,主管药师 Tel: (0575)88361692 E-mail: maolvgg@163.com

活性研究表明该类化合物具有一定的抗肿瘤细胞活性,可能是其具有抗肿瘤作用的主要活性成分^[10]。但由于该类化合物在山慈菇药材中数量较多,含量较低,极性小,并且结构不稳定,在光照等条件下容易改变,不适合作为 HPLC 含量测定的指标成分。根据前期对山慈菇不同来源品种的化学成分研究结果,发现 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯(militarine)为来源于独蒜兰和云南独蒜兰的山慈菇药材的主要成分,是山慈菇中另外一类主要成分,即丁二酸苄酯苷类成分,此类化合物具有延缓衰老,改善衰老小鼠的学习记忆能力的作用^[11-13]。因此选定这个化学成分为山慈菇药材含量测定的指标成分,以反映来源于独蒜兰和云南独蒜兰的山慈菇药材特征。对于山慈菇,中国药典仅只有性状、显微鉴别与 SO₂ 残留 3 项检查,尚无相关指标的定量标准。本实验采用 HPLC 建立山慈菇的特征指纹图谱 militarine 指标成分的含量测定方法,为山慈菇(冰球子)的质量评价提供参考依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent/1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司, 低压四元梯度泵、自动进样器、多波长紫外检测器、柱温箱, 安捷伦色谱工作站); 中药指纹图谱相似度软件(2004A 版)(浙江省食品药品检验研究院)。

1.2 试剂

乙腈为色谱纯(美国 Tedia 公司); 水为自制超纯水; 其余试剂均为分析纯。山慈菇(冰球子)对照药材(中国食品药品检定研究院, 批号: 121262-201104); militarine 对照品(上海同田生物技术股份有限公司, 批号: 15011621, 含量: 98%)。

1.3 药材

药材山慈菇样品经绍兴市食品药品检验中心蒋永海主任中药师鉴定为山慈菇(冰球子)*Pleione bulbocodioides*(Franch.)的干燥块茎, 10 批样品信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: TopsilTM(拓谱)C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 柱温 30 ℃; 流动相: 乙腈(A)-水(B), 梯度洗脱: 0~60 min, 20%→52%A, 60~70 min, 52%→

20%A; 检测波长: 224 nm; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 进样量 10 μL。

表 1 山慈菇样品及来源

Tab. 1 Origin of *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus*

序号	名称	批号	样品来源
S1	山慈菇(冰球子)	14020802	云南香格里拉藏南地区
S2	山慈菇(冰球子)	14020621	贵州
S3	山慈菇(冰球子)	140618	河北安国中药饮片有限公司
S4	山慈菇(冰球子)	140601	百草
S5	山慈菇(冰球子)	1411182	衢州南孔中药有限公司
S6	山慈菇(冰球子)	140728	杭州桐君堂医药药材有限公司
S7	山慈菇(冰球子)	140919	杭州桐君堂医药药材有限公司
S8	山慈菇(冰球子)	140226	杭州凯伦医药股份有限公司中药饮片厂
S9	山慈菇(冰球子)	14100704	浙江景岳堂药业有限公司
S10	山慈菇(冰球子)	141209	杭州华东中药饮片有限公司

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取在五氧化二磷干燥器中干燥至恒重的 militarine 对照品 9.60 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成每 1 mL 含 militarine 0.94 mg 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取山慈菇药材粉末(4 号筛)1 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入 70%甲醇 100 mL, 浸泡 1 h, 然后超声(功率 1 000 W, 频率 40 Hz) 处理 1 h, 用干燥滤器过滤。残渣用 70%甲醇淋洗后合并, 将滤液浓缩, 残渣用甲醇溶解并转移到 20 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过取续滤液, 即得。

2.3 系统适应性试验

分别取对照品溶液、供试品溶液各 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 记录色谱图。militarin 峰与其他成分峰分离度符合要求。militarine 对照品、山慈菇(冰球子)药材、指纹特征色谱峰见图 1。

2.4 指纹图谱方法学考察

2.4.1 仪器精密度试验 取同一供试品溶液(S3)1 份, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 重复进样 6 次, 按“2.1”项下色谱条件测定, 以参比峰的保留时间和峰面积为参照, 计算供试品溶液中各共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.008%~0.096%, 相对峰面积的 RSD 为 0.126%~2.62%, 表明仪器精密度良好。

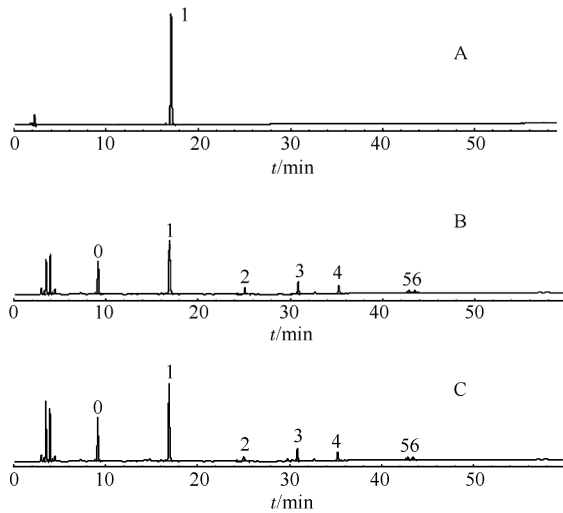


图1 高效色谱图
A-对照品; B-供试品溶液; C-特征指纹色谱峰; 1-militarine; 2~6-特征峰。

Fig.1 HPLC chromatograms
A-control; B-sample; C-characteristic fingerprint peaks; 1-militarine; 2-6-common peaks.

2.4.2 重复性试验 取同一供试品溶液(S3)6份,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定。以参比峰的保留时间和峰面积为参照,计算供试品溶液中各共有峰相对保留时间的RSD为0.026%~0.628%,相对峰面积的RSD为4.68%~28.9%,表明提取和检测方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一供试品溶液(S3)在0,4,12,24 h分别进样,按“2.1”项下色谱条件测定。以参比峰的保留时间和峰面积为参照,计算供试品溶液中各共有峰相对保留时间的RSD为0.018%~0.064%,相对峰面积的RSD为0.625%~16.5%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

表2 样品特征图谱与共有特征图谱R的相似度

Tab.2 The result of similarity between specific chromatogram and common specific chromatogram R

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照指纹图谱
S1	1.000	0.984	0.990	0.992	0.999	0.995	0.993	0.993	0.989	0.999	0.997
S2	0.984	1.000	0.995	0.993	0.982	0.989	0.995	0.993	0.988	0.989	0.995
S3	0.990	0.995	1.000	0.990	0.988	0.997	0.992	0.999	0.981	0.990	0.996
S4	0.992	0.993	0.990	1.000	0.987	0.989	0.997	0.988	0.998	0.996	0.997
S5	0.999	0.982	0.988	0.987	1.000	0.995	0.992	0.993	0.985	0.998	0.995
S6	0.995	0.989	0.997	0.989	0.995	1.000	0.992	0.999	0.981	0.994	0.996
S7	0.993	0.995	0.992	0.997	0.992	0.992	1.000	0.993	0.995	0.997	0.999
S8	0.993	0.993	0.999	0.988	0.993	0.999	0.993	1.000	0.980	0.992	0.997
S9	0.989	0.988	0.981	0.998	0.985	0.981	0.995	0.980	1.000	0.994	0.993
S10	0.999	0.989	0.990	0.996	0.998	0.994	0.997	0.992	0.994	1.000	0.999
对照指纹图谱	0.997	0.995	0.996	0.997	0.995	0.996	0.999	0.997	0.993	0.999	1.000

2.5 指纹图谱的建立和相似性评价

2.5.1 山慈菇(冰球子)药材特征图谱的建立及对照指纹图谱的生成 按“2.1”项下色谱条件,对10批山慈菇(冰球子)供试品进样分析,记录色谱图见图2。利用“中药指纹图谱相似度评价系统(2004A版)”软件,采用自动匹配法生成共有特征图谱并分析各样品之间共有峰和相似度,确定共有峰。结果发现10批供试品共有7个共有峰。各特征图谱与共有特征图谱R相似度见表2;通过保留时间定性可知16.91 min时为militarine的色谱峰(峰号1),色谱峰峰形较好,且含量较高,可作为参照峰,标定不同产地山慈菇(冰球子)的指纹图谱特征,将militarine定为参照峰,设其相对保留时间和相对峰面积为1,计算各共有峰对它的相对保留时间和相对峰面积,结果见表3~4。

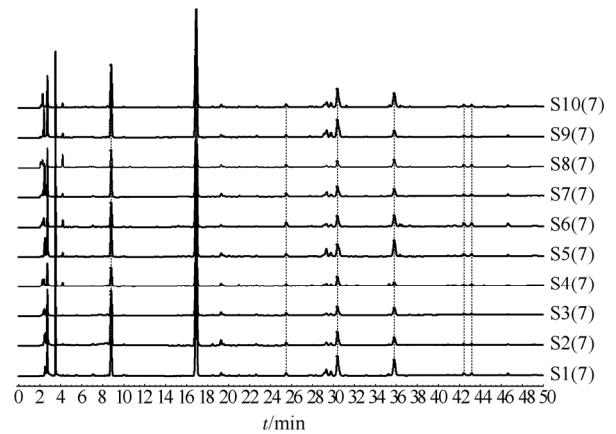


图2 山慈菇(冰球子)特征图谱
Fig.2 Specific chromatogram of Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus

表 3 山慈菇冰球子特征图谱共有峰相对保留时间

Tab. 3 Relative retention time of common peaks of *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus* specific chromatogram

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	RSD/%
0	0.521	0.522	0.520	0.519	0.522	0.521	0.521	0.520	0.520	0.520	0.186
1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
2	1.509	1.508	1.507	1.510	1.514	1.506	1.507	1.511	1.511	1.509	0.159
3	1.797	1.798	1.795	1.795	1.801	1.793	1.797	1.793	1.796	1.799	0.142
4	2.117	2.120	2.116	2.113	2.120	2.111	2.117	2.113	2.115	2.120	0.152
5	2.510	2.514	2.509	2.507	2.516	2.505	2.511	2.507	2.509	2.514	0.142
6	2.554	2.557	2.553	2.549	2.558	2.548	2.553	2.550	2.553	2.556	0.131

表 4 山慈菇冰球子特征图谱共有峰相对峰面积

Tab. 4 Relative peak area of common peaks of *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus* specific chromatogram

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	RSD/%
0	0.274	0.292	0.209	0.309	0.292	0.220	0.342	0.230	0.381	0.317	19.2
1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.0
2	0.030	0.020	0.031	0.034	0.039	0.058	0.050	0.039	0.023	0.027	33.7
3	0.236	0.109	0.124	0.236	0.206	0.155	0.171	0.119	0.260	0.222	30.1
4	0.214	0.073	0.125	0.086	0.255	0.185	0.135	0.169	0.096	0.187	39.0
5	0.026	0.008	0.016	0.022	0.031	0.046	0.031	0.037	0.023	0.026	40.0
6	0.023	0.007	0.015	0.022	0.028	0.045	0.026	0.034	0.018	0.019	44.4

由表 3~4 可知, 10 种山慈菇(冰球子)共有峰平均相对保留时间的 RSD 较小(0.1%~0.2%), 而各特征峰相对峰面积的 RSD 相差比较大, 说明山慈菇(冰球子)作为野生品种成分种类相近, 但含量差别比较明显, 因此有必要建立相应指纹图谱和特征峰的含量测定, 提升山慈菇的质量标准。

2.5.2 militarine 含量测定 分别取 militarine 对照品溶液和供试品溶液 10 μ L, 按“2.1”项下色谱条件, 按外标法以峰面积计算含量, 结果表明 S1~S10 中 militarine 含量分别为 2.7%, 3.8%, 2.1%, 1.3%, 2.4%, 2.3%, 2.0%, 1.6%, 2.5%, 2.9%。结果表明, 不同产地的山慈菇(冰球子)含量差别较大, 需要收集更多不同产地的样品进行含量测定, 以确定含量的限度范围。

3 讨论

本实验收集了不同产地 10 批山慈菇(冰球子), 采用 HPLC 建立了山慈菇(冰球子)药材的 HPLC 指纹图谱, 可以反映山慈菇(冰球子)的特异性与整体性, 为山慈菇(冰球子)的质量控制提供更有力的参考依据。

在用中药色谱指纹图谱相似度评价系统对不同产地的山慈菇(冰球子)药材进行分析的过程中相似程度较高, 相似度数值均>0.980, 指纹图谱中相对保留时间的 RSD 值差异不大, 但相对峰面积

的 RSD 值相差较大, 这可能与野生环境、生长年限等因素有比较大的关系^[14]。

REFERENCES

- [1] CUI B S, SONG J, LI S, et al. Determination of dactylorhin A and militarine in three varieties of *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus* by HPLC [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2013, 38(24): 4347-4350.
- [2] YOU C, SONG X J, SHI C J, et al. Effects of different culture media on seed germination of *Pleione bulbocodioides* (Franch.) Rolfe [J]. *J Anhui Agr Sci*(安徽农业科学), 2011, 39(26): 16006-16007, 16012.
- [3] YANG Z N, GUI Y, YU Z W, et al. Quality evaluation of *Cremastra appendiculata* based on hierarchical clustering analysis (HCA) and principal components analysis (PCA) [J]. *Guangdong Agri Sci*(广东农业科学), 2012, 39(17): 90-92.
- [4] LIU B, PANG H M, WU G H, et al. Study on mutagenicity of anticarcinogenic Chinese medicinal herbs [J]. *J Norman Bethune Univ Med Sci*(白求恩医科大学学报), 1999, 25(1): 11-13.
- [5] XUE Z, LI S, WANG S J, et al. Studies on chemical constituents from the corm of *Cremastra appendiculata* [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2005, 30(7): 511-513.
- [6] BING Q Z, ZHANG B G. The botanical identification of *Shancigu* in Chinese ancient literature [J]. *J Sys Evol*(植物分类学报), 2008, 46(5): 785-792.
- [7] LIU X Q, YUAN Q Y, GUO Y Q. A new bibenzyl derivative from *Pleione bulbocodioides* [J]. *Chin Chem Lett*(中国化学快报: 英文版), 2008, 19(5): 559-561.
- [8] DONG H L, WANG C L, LI Y, et al. Complete assignments of 1H and 13C-NMR data of three new dihydrophenanthrofurans from *Pleione yunnanensis* [J]. *Magn Reson*

- Chem, 2010, 48(7): 256-260.
- [9] LI Q, CHEN Y Z, XIN H L. Research progress of Shancigu on chemical composition and pharmacological effects [J]. J Pharm Pract(药学实践杂志), 2014, 32(4): 250-253, 260.
- [10] DONG H L, WANG C L, GUO S X, et al. New bibenzyl derivatives from the tubers of *Pleione yunnanensis*. [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2009, 57(5): 513-515.
- [11] ZHANG D, LIU G T, SHI J G, et al. Effects of *Coeloglossum viride* var. *bracteatum* extract on memory deficits and pathological changes in senescent mice [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2006, 98(1): 55-60.
- [12] ZHANG D, LIU G, SHI J, et al. *Coeloglossum viride* var. *bracteatum* extract attenuates *D*-galactose and NaNO_2 induced memory impairment in mice [J]. J Ethnopharmacol, 2006, 104(1/2): 250-256.
- [13] LIU X Q. Studies on the chemical constituents and their anti-tumor activity of *Pleione bulbocodioides* [D]. Tianjin. Tianjin University, 2007.
- [14] ZHANG R P, HE Y, SHI S L, et al. Evaluation of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. from different habitats by HPLC fingerprint and principal component analysis [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 38(11): 1338-1344.

收稿日期: 2016-02-14

β -榄香烯聚合物胶束的制备工艺研究

袁子民¹, 高春华², 王静¹, 李学涛¹ (1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600; 2. 锦州医科大学药学院, 辽宁 锦州 121001)

摘要: 目的 优化 β -榄香烯纳米聚合物胶束的制备工艺。方法 以二硬脂酰磷脂酰乙醇胺聚-乙二醇(DSPE-PEG2000)为纳米聚合物胶束的载体材料, 采用薄膜水化法, 以包封率为考察指标, 通过正交试验考察 β -榄香烯与 DSPE-PEG2000 的质量比、水化时间、水化体积、PBS 缓冲液的 pH 值对制备工艺的影响。结果 在 β -ELE 与 DSPE-PEG2000 的质量比为 1 : 10, 水化体积为 5 mL, 水化时间为 30 min, 所用 PBS 缓冲液的 pH 值为 7.4 时, 所制得的纳米聚合物胶束形态规则, 大小较为均匀, 平均粒径为 56 nm, 平均包封率为 88.83%。结论 该制备工艺稳定可行, 重复性好, 可用于 β -榄香烯纳米聚合物胶束的制备。

关键词: β -榄香烯; 纳米聚合物胶束; 薄膜水化法

中图分类号: R943 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2016)10-1280-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.10.014

Preparation of β -elemene-loaded Nano Polymeric Micelles

YUAN Zimin¹, GAO Chunhua², WANG Jing¹, LI Xuetao¹ (1. School of Pharmacy, Liaoning University of TCM, Dalian 116600, China; 2. School of Pharmacy, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the preparation technology of β -elemene-loaded nano polymeric micelles. **METHODS** With poly(ethylene glycol-2000)-grafted distearoyl phosphatidylethanolamine(DSPE-PEG2000) as the carrier materials, thin film hydration method was used to prepare β -elemene-loaded nano polymeric micelles; With entrapment efficiency of β -elemene as index, orthogonal design was adopted to optimize effects of the ratio of β -elemene and DSPE-PEG2000, volume and time of hydration, pH of PBS. **RESULTS** In the optimal conditions, the mass ratio of β -elemene and DSPE-PEG2000 of 1 : 10, hydration volume of 5 mL, hydration time of 30 min, PBS buffer pH of 7.4, the prepared nanoparticles were round and regular in shape without adhesions, the average of particle size was 56 nm, the average of entrapment efficiency was 88.83%. **CONCLUSION** The preparation established in this optimization method is stable and feasible, and it could be used for the preparation of β -elemene-loaded nano polymeric micelles.

KEY WORDS: β -elemene; nano polymeric micelles; thin film hydration method

榄香烯是临床常用的中药广谱抗肿瘤药物, 以 β -榄香烯(β -elemene, β -ELE)计算, 含 β -、 γ -、 δ -榄香烯之和不得 < 85.0%。榄香烯及其脂质体注射

液和口服乳制剂^[1-2], 在脑胶质瘤治疗方面, 主要通过抗增殖和诱导凋亡作用, 取得了较好的治疗效果, 但也存在一定的不良反应^[3-5]。 β -ELE 由榄

基金项目: 辽宁省科学技术计划项目(2015020703)

作者简介: 袁子民, 男, 博士, 副教授 Tel: (0411)85890145

E-mail: yuanzmin@163.com