

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.02.002

山楂药材黄酮类成分毛细管电泳指纹图谱研究

陈宝龙¹, 郑朝华², 陈玉英²

(1. 河南省正骨研究院, 河南 洛阳 471002; 2. 中国药科大学分析化学教研室, 江苏 南京 210009)

摘要:目的 控制山楂药材的质量。方法 采用毛细管电泳法建立山楂药材黄酮类成分的指纹图谱。分析柱为毛细管柱(50 cm × 50 μm), 缓冲液为 NaH₂PO₄ - Na₂B₄O₇ - SDS(浓度分别为 20, 40, 40 mmol/L, pH = 4.50), 胶束电泳毛细管色谱(MECC)模式, 检测波长为 210 nm。结果 精密度和重复性试验中, 峰面积大于 10% 共有峰相对峰面积的 RSD 均小于 5%, 符合《中药注射剂色谱指纹图谱实验研究技术指南(试行)》中相关要求。结论 该方法可用于控制山楂药材的质量。

关键词: 山楂药材; 黄酮; 指纹图谱; 毛细管电泳法; 质量控制

中图分类号: R932; R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)02-0004-03

Study on Capillary Electrophoresis Fingerprint of Flavonoids in *Crataegus Pinnatifida*

CHEN Baolong¹, ZHENG Zhaohua², CHEN Yuying²

(1. Institute of Traditional Chinese Orthopedics and Traumatology of Henan Province, Luoyang, Henan, China 471002; 2. Department of Analytical Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu, China 210009)

Abstract: **Objective** To control the quality of *Crataegus pinnatifida*. **Methods** The fingerprint of flavonoids in *Crataegus pinnatifida* was established by capillary electrophoresis(CE). The analytical column was capillary column(50 cm × 50 μm), the buffer was NaH₂PO₄ - Na₂B₄O₇ - SDS (20, 40, 40 mmol/L, pH = 4.50) with micellar electrophoresis capillary chromatography(MECC) mode, and the detection wavelength was 210 nm. **Results** In precision and repeatability tests, the peak area with over 10 percent of common peaks was calculated to have the relative peak area with the RSD of less than 5%, which met the relevant requirements in the Technical Guidelines for Experimental Research of Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine Injection(Trial Implementation). **Conclusion** The method can be used for the quality control of *Crataegus pinnatifida*.

Key words: *Crataegus pinnatifida*; flavonoid; fingerprinting; capillary electrophoresis; quality control

中药山楂有行气散瘀功效^[1], 临床治疗关节扭伤和红肿热痛效果良好^[2-3]。山楂所含山楂总黄酮在体内均能抑制血小板聚集, 山楂叶醇提物(主要为黄酮类成

分)对模型小鼠有抗炎镇痛作用, 黄酮类代表成分金丝桃苷和芦丁有显著的抗炎镇痛作用^[4-7]。山楂在我国分布广泛, 成分及含量不尽相同, 药效也有差异。为控制药

第一作者: 陈宝龙, 男, 硕士研究生, 副研究员, 研究方向为中药质量标准和制剂开发, (电子信箱)cb10002@126.com。

正益肾、除湿祛毒的辨证施治原则, 并结合临床应用化裁而来的经验方。方中大黄活性成分主要为蒽醌类化合物^[7], 本研究中测定大黄素含量时曾考虑测定浸膏中游离蒽醌含量, 结果大黄素含量较低。故采用 2015 年版《中国药典(一部)》中大黄含量测定项下总蒽醌含量测定方法。曾采用甲醇 - 0.1% 磷酸(90:10, V/V)作为流动相, 结果供试品中的大黄素与杂峰分离度小于 1.5, 影响检测结果, 反复测试后选择流动相为甲醇 - 0.1% 磷酸溶液(85:15, V/V)。黄芪多糖具有促进抗体生成和免疫反应等作用, 其水溶性好, 一般采用水煎法提取。藏红花为贵重药材, 故在浸膏烘干后直接粉碎加入, 避免活性成分损失。

本研究中以大黄素和黄芪多糖为主要考察指标, 同时加入了浸膏得率作为辅助考察指标, 这样既保留了传统中药汤剂的提取方法, 又利用现在药学技术, 体现了中药的整体复方功效。因此, 确定以浸膏得率、大黄素含量和黄芪多糖含量 3 种指标的综合评分来优选最佳工艺, 以保证制剂质量的稳定性。综合上述因素, 按现代药

剂学技术优化制备工艺条件, 集成为宝肾方胶囊, 以期使该制剂高效、低毒, 并减少不良反应。

参考文献:

- [1] 李 侠, 王俭勤, 陈红鹰, 等. 自拟宝肾方治疗慢性肾脏病 2-3 期患者的临床疗效观察[J]. 国外医学(医学地理分册), 2014, 35(2): 167-170.
- [2] 齐振强, 胡洪贞, 王祥生, 等. 大黄素治疗肾脏疾病的分子细胞机制研究进展[J]. 环球中医药, 2015, 8(9): 1145-1148.
- [3] 张 娜, 李林森. 藏红花药理作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2013, 36(5): 394-396.
- [4] 何文涓, 袁志坚, 何晓升, 等. 黄芪多糖的药理作用研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2012, 33(5): 692-694.
- [5] 秦 龙, 李 平, 李玉民, 等. 正交试验优选利胆排石胶囊的水煎提取制备工艺[J]. 中国药师, 2015, 18(5): 769-772.
- [6] 秦 龙, 李 平, 杨奇明, 等. 当归保肝胶囊的制备工艺研究[J]. 中国药师, 2016, 19(3): 480-483.
- [7] 雷 鹏, 李新中, 朱诗塔, 等. 煎煮方法对生大黄主要成分含量的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(4): 283-286.

(收稿日期: 2018-06-08)

材和制剂质量,保证药效,需对山楂中的化学成分物质群进行控制^[8]。本研究中依据《中药注射剂色谱指纹图谱实验研究技术指南(试行)》的要求,利用毛细管电泳(CE)技术建立山楂药材黄酮类成分的指纹图谱,考察该图谱用于控制山楂药材质量的可行性,并为其质量控制标准的建立进行有益探索。现报道如下。

1 仪器与试药

仪器:D/ACE5500型毛细管电泳仪[配有二极管阵列检测器(DAD)](美国Beckman公司);毛细管柱(河北永年光纤厂,总长57 cm,有效长度50 cm,内径50 μm ,未涂渍)。

试药:10批次山楂药材来自山东济南,经药物室李军研究员鉴定为蔷薇科植物山里红 *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br. 的干燥成熟果实;金丝桃苷对照品($\geq 95\%$)购于安徽DETLA天然有机化合物信息中心;十二烷基硫酸钠(SDS, Sigma公司);甲醇、乙腈为色谱纯,水为重蒸水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 检测条件

电泳模式:胶束电泳毛细管色谱(MECC)模式;缓冲液: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 - \text{SDS}$ (浓度分别为20, 40, 40 mmol/L, pH=4.50);毛细管柱处理:依次用重蒸水、0.1 mol/L 氢氧化钠、重蒸水冲洗毛细管柱各10 min,缓冲液冲洗5 min,平衡20 min,缓冲液冲洗5 min,高压进样6 s, 25 kV 电压分析样品60 min;检测波长:210 nm。

2.2 溶液制备

采用前期试验确定的黄酮类成分提取方法^[9],称取山楂药材样品粉末1.25 g,加10倍量95%乙醇,60 $^\circ\text{C}$ 、250 W 超声提取45 min,滤过,残渣加6倍量95%乙醇,同法超声提取,滤过,残渣加4倍量95%乙醇,再次同法超声提取,滤过,合并滤液,转至25 mL容量瓶中,加95%乙醇定容,摇匀;移取3 mL提取液,加热挥干溶剂,加1 mL缓冲液超声溶解,放置30 min,经0.45 μm 微孔滤膜滤过,作为供试品溶液。取对照品金丝桃苷适量,用缓冲液超声溶解,放置30 min后,经0.45 μm 微孔滤膜滤过,作为对照品溶液(质量浓度为25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

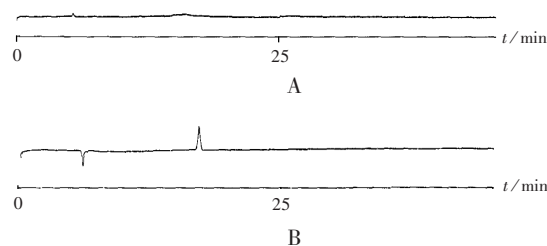
2.3 方法学考察

空白及对照品试验:分别取缓冲液、金丝桃苷对照品溶液,压力进样,记录色谱图。结果见图1。

参照物选择:经出峰时间和DAD比对,确认8号峰为金丝桃苷峰,其峰面积较大、峰形好、峰纯度高,故被选为参照物。

精密度试验:取供试品溶液(批次5),连续进样5次。结果峰面积百分比 $\geq 10\%$ 的共有峰相对峰面积的RSD为2.30% ($< 5\%$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:精密称取供试品(批次5)6份,照2.2项下方法制备供试品溶液,进样测定。结果峰面



A. 缓冲液 B. 金丝桃苷对照品溶液

图1 空白及对照品试验色谱图

积百分比 $\geq 10\%$ 的共有峰相对峰面积的RSD为2.42% ($< 5\%$),表明方法重复性较好。

稳定性试验:取同一供试品溶液(批次5),分别在室温下放置0, 4, 8, 12, 16 h时进样。结果峰面积百分比 $\geq 10\%$ 的共有峰相对峰面积的RSD为2.32% ($< 5\%$),表明供试品溶液在室温下放置16 h内稳定。

2.4 毛细管柱处理

新毛细管柱用1 mol/L 盐酸、重蒸水、1 mol/L 氢氧化钠、重蒸水交替冲洗处理,充满氮气保存待用;每天试验开始前用1 mol/L 氢氧化钠冲洗5 min,重蒸水冲洗10 min,缓冲液冲洗30 min;试验结束前用1 mol/L 氢氧化钠冲洗20 min,重蒸水冲20 min,充满氮气,保存待用。

2.5 指纹图谱的建立及分析

指纹图谱的建立:根据10批次山楂药材样品的CE检测结果所给出的相关参数,比较图谱可知,有16个共有峰,其中,金丝桃苷峰(8号峰)峰面积较大,纯度高,被选为参照峰。在共有峰中只有15号峰的峰面积大于总峰面积的10%,因此只考虑15号峰的峰面积比值,其余各共有峰均按其相对保留时间进行定性。山楂药材样品的CE指纹图谱见图2。10批次山楂药材样品中黄酮类成分CE指纹图谱共有峰(1~16号峰)的相对保留时间比分别为0.566, 0.585, 0.637, 0.674, 0.742, 0.769, 0.861, 1.000(s), 1.079, 1.177, 1.248, 1.500, 1.532, 1.605, 1.683, 2.317。指纹图谱峰面积百分比 $\geq 10\%$ 的共有峰(峰15)的相对峰面积见表1。

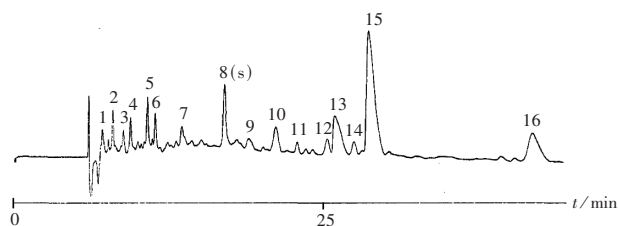


图2 山楂药材黄酮类成分的CE指纹图谱

指纹图谱全谱相似度比较与分析:根据《中药注射剂色谱指纹图谱实验研究技术指南(试行)》的要求,采用计算机辅助相似性评价系统,比较10批次山楂药

表1 10批次山楂药材样品中峰15的相对峰面积

批次	峰15	8(s)	批次	峰15	8(s)
1	6.220	1.000	7	4.999	1.000
2	5.875	1.000	8	6.303	1.000
3	6.704	1.000	9	6.389	1.000
4	5.751	1.000	10	5.570	1.000
5	5.673	1.000	$\bar{X}$	6.017	1.000
6	5.685	1.000			

注:峰面积比允许范围为4.814~7.220。

材样品黄酮类成分CE指纹图谱全谱相似度。技术参数见表2。

表2 10批次山楂药材样品的相似度评价技术参数

批次	相关系数		相合系数	
	中位数	$\bar{X}$	中位数	$\bar{X}$
1	0.817 2	0.809 5	0.838 3	0.809 6
2	0.836 1	0.817 1	0.852 1	0.827 8
3	0.830 4	0.810 1	0.847 1	0.821 8
4	0.536 9	0.501 8	0.544 9	0.510 1
5	0.477 2	0.493 9	0.521 4	0.505 5
6	0.667 1	0.591 0	0.675 8	0.625 5
7	0.825 0	0.863 1	0.820 2	0.804 6
8	0.816 9	0.810 1	0.813 0	0.809 2
9	0.469 9	0.458 3	0.495 0	0.714 2
10	0.698 4	0.674 0	0.427 6	0.671 8

3 讨论

CE是利用不同物质处于高电场且充满溶液的毛细管中迁移速率不同实现彼此分离,具有柱效高、分离快、适用样品范围广、样品使用量少的优点,在许多领域已成为重要的分析手段。中药有效成分多、含量低的特点适合采用CE方法进行质量控制。在本研究中,分析条件的选择和优化是关键。

介质选择:山楂药材中要考察的有效部位为黄酮类成分,根据其结构大多含有邻位酚羟基的特点,并参考文献[10-12],选择硼砂水溶液作为基本电解质,以利用硼砂与邻位酚羟基的络合作用使不同成分淌度差异拉大,使分离度增加,提高CE的选择性。

对照品选择:在已知山楂黄酮类成分中,金丝桃苷含量高,故以金丝桃苷作为对照品。

分析样品溶液制备:CE是一种高灵敏度的分析方法,为符合MECC的分析要求,使分析样品在进样前与缓冲液中的组分形成稳定的胶束包裹物,同时消除分析过程中分析样品溶液时产生的扰动,提高分离效率,分析样品溶液采用缓冲液制备。

检测波长选择:对供试品溶液进行190~800 nm紫外-可见吸收光谱扫描和DAD成分检测,因210 nm波长处黄酮类成分有显著吸收,且检测到的峰多,分离度

较好,故选定210 nm为CE测定波长。

CE分析模式选择:为获得最佳的山楂药材CE指纹图谱,先后考察了MECC相CZE(毛细管区带电泳)和pH梯度法3种CE分析模式。结果显示,采用缓冲液制备的供试品溶液在MECC模式得到的CE图谱较另两种模式图谱出峰多,峰之间的分离度相对较好,基线相对较平稳,故选用MECC分析模式。

参照物选择:由加入一定量金丝桃苷对照品的供试品溶液的CE图谱确定8号峰为金丝桃苷峰,其峰面积大、峰形好、峰纯度高,故被选为参照物。

测定条件优化:为获得最佳的山楂药材CE指纹图谱,对CE分析条件的电压(10, 15, 20, 25, 30 kV)、进样方式(压力进样、电压进样)、缓冲液pH(通过加入 NaH_2PO_4 调控pH为4.0, 4.5, 5.0, 6.0)、缓冲液浓度(10:20:20, 10:20:40, 20:40:40, 20:40:30, mmol/L),有机添加剂(异丙醇、乙腈或不添加)进行了优化考察,通过比较图谱,确定了本研究中采用的测定条件。

综上所述,虽然山楂药材黄酮类成分CE指纹图谱研究未见报道,但本研究中成功建立的CE指纹图谱技术为山楂质量控制提供了参考。

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, 2015:31.
- [2] 王 强. 山楂治疗伤科疾病185例[J]. 实用中医药杂志, 2005, 21(6):343.
- [3] 赵惠民, 冯静芳, 黄煌渊, 等. 舒康贴膏治疗软组织损伤性疼痛的实验和临床研究[J]. 中国新药与临床杂志, 2000, 19(4): 286-288.
- [4] 王 璞, 孙广红, 张瑞芬, 等. 山楂叶提取物镇痛与抗炎作用实验研究[J]. 中医药学报, 2012, 40(1):38-39.
- [5] 王月刚, 陈素云. 山楂对心血管系统的药理作用研究[J]. 中医药信息, 2000, 17(6):29-30.
- [6] 杨利平, 王春霖, 王永利, 等. 山楂叶提取物对家兔血小板聚集和大鼠实验性心肌缺血的影响[J]. 中草药, 1993, 24(9): 482-483.
- [7] 黄 凯, 杨新波, 黄正明. 金丝桃苷药理作用研究进展[J]. 医药导报, 2009, 28(8):1046-1048.
- [8] 谢培山. 色谱指纹图谱分析是中药质量控制的可行策略[J]. 中药新药与临床药理, 2001, 12(3):141-151.
- [9] 陈宝龙, 郑朝华, 陈玉英, 等. 高效液相色谱法测定山楂中金丝桃苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(3):24.
- [10] 郑春英, 刘松梅, 李宏涛, 等. 毛细管电泳法同时检测刺五加叶中的芦丁和金丝桃苷含量[J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(10):783.
- [11] 王敬鹏, 吴远斌, 王 伟, 等. 毛细管电泳-化学发光法测定槐米中芦丁和槲皮素的含量[J]. 分析化学, 2009, 37(Z1):D015.
- [12] 曹 敏, 季一兵, 陈玉英. 栀子药材毛细管电泳指纹图谱的研究[J]. 中国药科大学学报, 2002, 33(4):284-286.

(收稿日期:2018-07-15)