

款冬花的高效毛细管电泳指纹图谱

王国艳, 郝增燕, 胡明勋, 张红芬, 陈安家*

(山西医科大学药学院, 太原 030001)

[摘要] 目的: 建立款冬花的高效毛细管电泳 (HPCE) 指纹图谱, 为款冬花的质量控制提供依据。方法: 采用未涂层毛细管柱 (75 $\mu\text{m} \times 57 \text{ cm}$, 有效长度 50 cm) 为分离通道, 以 30 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼砂 (含甲醇 25%, pH 8.8) 溶液为背景电解质, 分离电压 20 kV, 检测波长 214 nm, 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ 。结果: 测定了 15 批款冬花药材的高效毛细管电泳指纹图谱, 确定了 26 个共有峰并指认了 6 个峰。结论: 该方法操作简单、准确可靠, 为科学评价款冬花药材的质量提供依据。

[关键词] 款冬花; 毛细管电泳; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0097-03

[doi] 10.11653/syjf2013130097

Fingerprints of Flos Farfarae by High Performance Capillary Electrophoresis

WANG Guo-yan, HAO Zeng-yan, HU Ming-xun, ZHANG Hong-fen, CHEN An-jia*

(College of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

[Abstract] **Objective:** To develop high performance capillary electrophoresis (HPCE) fingerprints of Flos Farfarae and to provide the scientific basis for quality control of it. **Method:** Electrophoresis was performed on a 75 $\mu\text{m} \times 57 \text{ cm}$ (effective length is 50 cm) fused silica capillary. 30 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ sodium borate contained 25% methanol adjusted to pH 8.8 was applied as the background electrolyte. The running voltage was 20 kV, the detection wavelength was at 214 nm and the temperature was kept at 25 $^{\circ}\text{C}$. **Result:** The HPCE fingerprint established from the 15 batches of the Flos Farfarae showed 26 characteristic common peaks, among which 6 peaks were recognized. **Conclusion:** The method is reliable, accurate, simple and quick. It provides a reliable method for the scientific quality evaluation of Flos Farfarae.

[Key words] Flos Farfarae; capillary electrophoresis; fingerprints

款冬花为菊科植物款冬属植物款冬未开放的干燥头状花序, 又名冬花, 主产于山西、陕西、河南、河北、甘肃等地, 主要化学成分有三萜皂苷、倍半萜、黄酮、生物碱、苯二甲酸酯类、绿原酸、挥发油等^[1-4], 传统应用上款冬花具有润肺、止咳化痰等功效^[5], 始载于《本草纲目》, 为历版《中国药典》收载。目前报道的款冬花的质量控制方法主要为色谱法^[6-8],

尚未见其毛细管电泳指纹图谱的研究报道。高效毛细管电泳 (HPCE) 具有分辨率高、样品用量少、操作自动化、有机溶剂用量少及环境友好等优点, 特别适合化学成分复杂的中药材指纹图谱的建立^[9-14]。本文采用高效毛细管电泳建立了款冬花的指纹图谱, 为控制药材质量提供了参考。

1 材料

BECKMAN P/ACE MDQ 型高效毛细管电泳仪 (PDA 检测器), 熔融石英毛细管 (Beckman 公司), KQ-400KDB 型超声波清洗器。

硼砂、氢氧化钠、95% 乙醇、甲醇等均为分析纯, 水为 Milli-Q 超纯水。15 批款冬花药材来源分别为: (1) 河北安国; (2) 山西广灵; (3) 江西南昌; (4) 陕西西安; (郭杜大药房); (5) 山西太原; (远大大药房); (6) 河南郑州; (龙康大药房); (7) 甘肃兰州;

[收稿日期] 20120620(005)

[基金项目] 山西省归国人员基金项目(2010-53)

[第一作者] 王国艳, 硕士研究生, 从事药物分析及质量控制方法研究, Tel: 13466857308, E-mail: wgy124203@163.com

[通讯作者] * 陈安家, 教授, 理学博士, 从事药物分析研究, Tel: 15835108120, E-mail: chenanjia888@163.com

(8)河南安阳;(9)山西临县;(10)陕西西安(京隆大药房);(11)安徽合肥;(12)河北石家庄(聚仁堂);(13)河北石家庄(益源大药房);(14)安徽合肥(元生堂大药房);(15)河北承德;药材收集时间均为 2010 年 9 月,经山西医科大学药学院高建平教授鉴定为菊科植物款冬 *Tussilago farfare* L. 的干燥花蕾。

对照品芦丁(批号 100080-200306)、金丝桃苷(批号 111521-200303)、槲皮素(批号 100081-200406)、绿原酸(批号 110753-200212)、山柰素(批号 110861-200002)均购自中国药品生物制品检定所,山柰酚(批号 A0129)购自成都曼斯特生物科技有限公司。

2 方法和结果

2.1 样品溶液的制备 对照品溶液的制备:精密称取对照品适量,甲醇溶解并定容,摇匀,制成每 1 mL 各含 1 mg 金丝桃苷、槲皮素、绿原酸、山柰素对照品的混合溶液,备用。

供试品溶液的制备:精确称取款冬花粉(过 50 目筛) 1 g,置具塞三角瓶中,精密加入 95% 乙醇 20 mL,密塞,称重,超声振荡 1 h(100 Hz),称重,加 95% 乙醇补足失重,过滤。取续滤液 5 mL,蒸干,用 2 mL 甲醇溶解,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液。

2.2 电泳条件 未涂层毛细管柱(75 μm \times 57 cm,有效长度 50 cm);缓冲液为含有 25% 甲醇的 30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼砂溶液(pH 8.8),分离电压 20 kV,检测波长 214 nm,温度 25 $^{\circ}\text{C}$,进样条件 0.5 psi,5 s。每天进样前分别用 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠、纯净水和缓冲液各冲洗 3 min。所有溶液进毛细管柱前都需用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,并对其作超声脱气处理。

2.3 系统适用性试验 将供试品溶液与加入绿原酸对照品的供试液分别压力进样,对比峰面积,发现加入绿原酸后 20 号峰明显增高,面积增加,与其相邻组分分离较好且峰形对称,因此选 20 号峰为参照物峰。

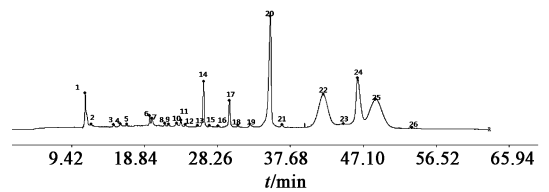
2.3.1 精密度考察 按 2.1 供试品溶液制备方法所述方法制备 2 号款冬花溶液连续进样 5 次,按 2.2 所述电泳条件测定,记录电泳图。计算各指纹峰的相对峰面积 RSD 均 < 9.5%,相对迁移时间 RSD 均 < 4.0%,表明进样精密度良好,符合指纹图谱的检测要求。

2.3.2 重复性考察 按 2.1 供试品溶液制备方法所述方法制备 2 号款冬花药材供试液 5 份,按 2.2 所述电泳条件测定,记录电泳图。计算各指纹峰的

相对峰面积 RSD 均 < 10%,相对迁移时间 RSD 均 < 2.2%,表明本方法的重复性符合指纹图谱的检测要求。

2.3.3 稳定性考察 按 2.2 所述电泳条件测定,将 2 号款冬花药材的供试液在 24 h 内间断进样 5 次,记录电泳图。计算各指纹峰的相对峰面积 RSD 均 < 10%,相对迁移时间 RSD 均 < 3.0%,表明样品在 24 h 内稳定。

2.4 款冬花 HPCE 指纹图谱的建立 将 15 个不同产地或不同商家的款冬花药材按 2.1 所述方法制备供试液,并分别按照 2.2 所述电泳条件测定,记录电泳图。通过对 15 个供试液进行比较,以各峰出现的共有率为选择 HPCE 指纹峰的依据,确定款冬花药材中的共有指纹峰为 26 个,以 20 号峰(绿原酸)为参照,运用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版软件”进行分析,将实验数据导入中药指纹图谱相似度评价软件,设定参照图谱,将色谱峰自动匹配,然后生成款冬花药材共有模式的对照指纹图谱(R)(图 1);各指纹图谱及生成对照图谱见图 2,并计算其相似度,结果见表 1。



13. 山柰素;14. 芦丁;18. 山柰酚;
19. 金丝桃苷;20. 绿原酸;23. 槲皮素

图 1 款冬花药材的对照图谱

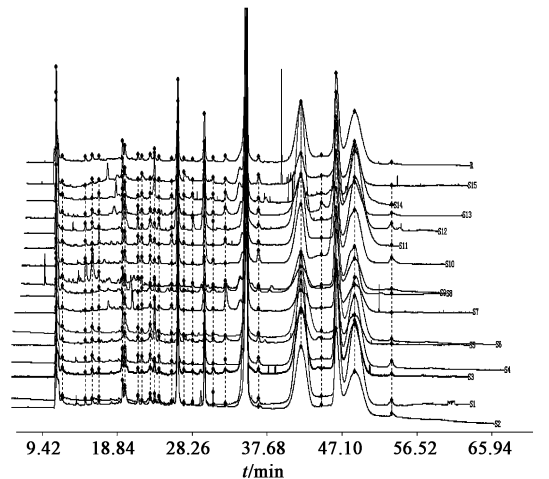


图 2 15 批款冬花药材指纹图谱及生成的对照图谱(R)

2.5 指纹峰的确证 将配制好的对照品储备液芦丁、山柰酚、金丝桃苷、槲皮素、山柰素,分别加入到样品溶液中进行,在选定的电泳条件下采集图谱,采

用同种物质具有相同迁移时间的原则与单独进样品溶液比较,同一迁移时间下峰面积明显增加,确定五个峰位分别为13号山奈素,14号芦丁,18号山奈酚,19号金丝桃苷,23号槲皮素。

表1 款冬花药材指纹图谱与对照图谱的相似度

样品来源	相似度	样品来源	相似度
安徽(合肥)	0.978	安徽(合肥元生堂药房)	0.996
河北(石家庄)	0.993	河北(石家庄益源药房)	0.976
山西(临县)	0.973	河南(安阳)	0.953
河南(郑州)	0.817	陕西(西安郭杜大药房)	0.963
江西(南昌)	0.894	山西(广灵)	0.976
山西(太原)	0.985	陕西(西安京隆药房)	0.983
河北(安国)	0.967	甘肃(兰州)	0.945
河北(承德)	0.894		

2.6 结果分析 从上述结果可以看出,所建立的款冬花药材指纹图谱的分离度较好,除来自河南龙康药房、江西南昌及河北承德的款冬花药材相似度过低外(受炮制方法影响),其余12批款冬花药材的指纹图谱相似度均>0.900。

3 讨论

3.1 提取条件的优化 在相同电泳条件下,对款冬花药材的提取方法、提取时间、提取溶剂及其体积等进行优化,结果表明,采用超声提取方式,使用20倍量的95%乙醇、提取时间为1h的提取效率最高,图谱特征性较强,分离效果好。

3.2 电泳条件的优化 缓冲液种类及浓度的考察:通过考察磷酸盐、硼砂及二者混合液做缓冲液系统,发现采用磷酸盐缓冲液时,峰分离良好,但电泳图谱信息量较少;采用磷酸盐与硼砂不同比例的混合液为缓冲液时,电泳图谱信息量较少;采用硼砂为缓冲液时,电泳图谱信息量最为丰富,峰形对称,且当浓度达到30 mmol·L⁻¹时,运行电流适宜,保留时间适当,各峰之间分离度较好。浓度低于30 mmol·L⁻¹时,保留时间在20 min之前出现的峰分离效果较差;浓度高于30 mmol·L⁻¹,随着硼砂浓度的增高,电流增大,焦耳热严重,且保留时间延长,在60 min内峰信息量较少,所以最终选择30 mmol·L⁻¹的硼砂缓冲液。

3.3 有机溶剂种类及含量对分离的影响 在毛细管电泳中,有机溶剂作为改性剂,可以改善分离。通

过考察不同类型有机溶剂添加剂对电泳谱图峰容量及分离的影响,最终选用含25%甲醇的30 mmol·L⁻¹硼砂水溶液为操作缓冲液。

3.4 pH对分离的影响 溶液的酸度直接影响内壁的Zeta电势。黄酮类化合物的酚羟基在弱碱性介质中可发生电离生成酚羟基阴离子而荷负电,碱性过强则可能引起色原酮母核发生裂解。选用硼砂缓冲体系,缓冲液的条件考察主要在pH 7.0~9.0弱碱性范围内进行;随着pH的增加,各电泳峰之间分离度增大,迁移时间也随之延长。结果表明,当pH 8.8时,各电泳峰之间分离良好且迁移时间适宜。

3.5 分离电压对分离的影响 提高分离电压可以缩短分析时间,本文考察了15~30 kV电压时各电泳峰的分离情况。结果发现分离电压为20 kV时谱峰容量大,峰形尖锐且分离时间较短,因此,选择20kV为分离操作电压。

3.6 波长的选择 采用二极管阵列检测器进行全波长扫描,结果在214 nm波长处各电泳峰均有较好的紫外吸收,峰信息最为丰富。因此,选择该波长作为检测波长。

[参考文献]

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海人民出版社,1977:2301.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:312.
- [3] 刘玉峰,杨秀伟,武滨. 款冬花化学成分的研究[J]. 中国中药杂志,2007,32:2378.
- [4] Liu Y F, Yang X W, Wu. GC-MS analysis of essential oils constituents from the flower buds of *Tussilago farfara* L. [J]. J Chin Pharm Sci,2006,15:10.
- [5] 回连强,高双荣,刘婷,等. 款冬花及其总生物碱的肝脏毒性[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(4):238.
- [6] Wang Y M. Pharmacological studies of extracts of *Tussilago farfara* L. (II). Effects on the cardiovascular system[J]. Acta Pharm Sin,1979,14:268.
- [7] 张志伟,马致洁,秦雪梅,等. 不同产地款冬花中款冬酮的测定[J]. 中草药,2009,40(S1):284.
- [8] 吴笛,王峥涛,张勉. 高效液相色谱法同时测定款冬花中芦丁、异槲皮苷、绿原酸的含量[J]. 中国中药杂志,2010,35(20):2722.

五类新药苍术总萜醇的化学成分

肖增丽^{1,2}, 梁慧², 康晖², 冯汉林², 严启新^{2*}, 曾令杰^{1*}

(1. 广东药学院中药学院, 广州 510006; 2. 深圳海王药业有限公司, 广东深圳 518057)

[摘要] 目的: 对中药 5 类新药苍术总萜醇的化学组成进行研究。方法: 通过气相色谱-质谱联用技术对苍术总萜醇的化学成分进行分析、鉴定。结果: 从苍术总萜醇中鉴定出 20 个组分, 其中相对含量 >1% 的组分为茅术醇、 β -桉叶醇、 γ -桉叶醇、榄香醇和 2,3-Dihydro-1-oxo-phenalene, 且茅术醇和 β -桉叶醇两组分的相对含量之和为 87%。结论: 苍术总萜醇中茅术醇和 β -桉叶醇两组分含量最高。苍术总萜醇除含有倍半萜醇类成分外, 还含有倍半萜烯类成分。茅术醇是质子泵抑制剂, β -桉叶醇是组胺 H₂ 受体阻断剂, 两个倍半萜醇类化合物协同作用而抑制胃液分泌, 从而发挥抗溃疡的作用。

[关键词] 五类新药; 苍术; 总萜醇; 气相色谱-质谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0100-03

[doi] 10.11653/syfy2013130100

Chemical Components of Fifth Sort of New Drugs-Total Terpene Alcohols of *Atractylodes lances*

XIAO Zeng-li^{1,2}, LIANG Hui², KANG Hui², FENG Han-lin², YAN Qi-xin^{2*}, ZENG Ling-jie^{1*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Shenzhen Neptunus Pharmaceutical Co. Ltd, Shenzhen 518057, China)

[Abstract] **Objective:** To study chemical constituents of the fifth sort of new drugs-total terpene alcohols of *Atractylodes lances*. **Method:** Using GC-MS as the method, the chemical constituents were analyzed and identified. **Result:** Twenty components were identified from the total terpene alcohols of *A. lances*, and the relative contents >1% of the group were divided into hinesol, β -eudesmol, γ -eudesmol, rugby alcohol and 2, 3-Dihydro-1-oxo-phenalene, which hinesol and β -eudesmol were 87%. **Conclusion:** The total terpene alcohols of *A. lances* has the highest contents of hinesol and β -eudesmol, and in addition to sesquiterpene alcohol compositions, it also contains sesquiterpene alkene components.

[Key words] the fifth sort of new drugs; *Atractylodes lances*; total terpene alcohols; GC-MS

[收稿日期] 20110829(006)

[基金项目] 2008 年深圳市产学研公共技术平台项目; 2009 年深圳市南山区科技研发资金企业研发项目

[第一作者] 肖增丽, 硕士研究生, Tel: 18676758224, E-mail: xxmemory@126.com

[通讯作者] * 曾令杰, 教授, 博士, 从事中药质量标准研究, E-mail: zlj334477@yahoo.com.cn; * 严启新, 副研究员, 博士, E-mail: yanqixin2005@126.com

[9] 韩乐, 宋建平, 刘训红, 等. 地耳草 HPCE 指纹图谱的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10): 58.

[10] 全亚军. 高效毛细管电泳在中药分析中的应用[J]. 中国药物与临床, 2007, 7(1): 58.

[11] 解加扬, 张国欣. 中药色谱指纹图谱的应用进展[J]. 实用临床医药杂志, 2007, 11(1): 65.

[12] 王领弟, 李艳荣, 潘海峰, 等. 山楂叶指纹图谱研究

[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 74.

[13] 赵德玉, 毕桂宏. 中药指纹图谱的不同方法特点及应用[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(3): 601.

[14] 李喜凤, 邱天宝, 胡亚楠, 等. 高效毛细管电泳法测定蒲公英中阿魏酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(16): 27.

[责任编辑 顾雪竹]