

· 化学与分析 ·

安徽道地药材牡丹皮高效毛细管电泳指纹图谱研究

谷巍,巢建国*,刘训红,孔昭琰
(南京中医药大学药学院,南京 210046)

[摘要] 目的:建立安徽道地药材牡丹皮高效毛细管电泳指纹图谱,为牡丹皮质量控制提供依据。方法:采用 64.5 cm × 75 μm 石英毛细管柱作为分离通道,以 30 mmol·L⁻¹ 硼砂(5% 甲醇,pH 9.4)溶液为运行缓冲液,分离电压为 20 kV,检测波长 212 nm,柱温 25 °C 的高效毛细管电泳条件,对安徽产牡丹皮进行分析,以丹皮酚和没食子酸为参照物,测定其指纹图谱,并作聚类分析和相似度评价。结果:初步建立了以 9 个共有峰为特征指纹信息的牡丹皮高效毛细管电泳指纹图谱,牡丹皮成分与产地分布有着密切的关系。结论:该方法准确可靠,重现性好,操作简便,可作为牡丹皮内在质量评价的依据。

[关键词] 牡丹皮;丹皮酚;没食子酸;高效毛细管电泳;指纹图谱

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)17-0058-04

High Performance Capillary Electrophoresis Fingerprint of Anhui Moutan Cortex

GU Wei, CHAO Jian-guo*, LIU Xun-hong, KONG Zhao-yan
(College of Pharmacy, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To develop high performance capillary electrophoresis (HPCE) fingerprints of Anhui Moutan Cortex and to provide the scientific basis for quality control of Moutan Cortex. **Method:** Electrophoresis was performed on a fused silica capillary column (64.5 cm × 75 μm). The running buffer was composed of 30 mmol·L⁻¹ borax (5% MeOH, pH 9.4). The separation voltage was 20 kV and the temperature was 25 °C. The detection wavelength was 212 nm. Pieces of Moutan Cortex from different habitats were analyzed and the chromatographic fingerprints were determined by HPCE. The data were analyzed by hierarchical cluster and fingerprint similarity evaluation, with paeonol and gallic acid as reference. **Result:** The mutual mode of Moutan Cortex HPCE fingerprint was set up with 9 common peaks. Components of Moutan Cortex were closely related to their producing areas. **Conclusion:** The method is reliable, accurate, simple and quick, which can be used to control the quality of Moutan Cortex.

[Key words] Moutan Cortex; paeonol; gallic acid; high performance capillary electrophoresis (HPCE); fingerprint

牡丹皮(Moutan Cortex)为毛茛科植物牡丹

Paeonia suffruticosa Andr. 的干燥根皮。其味苦、辛,微寒,具有清热凉血、活血化瘀的功效^[1]。安徽为牡丹皮的主产区,尤以铜陵、南陵产的风丹奉为道地药材,在海内外享有盛誉。丹皮酚为牡丹皮中最主要的有效成分,具有镇痛、抗炎、解热等作用^[2]。目前,有关牡丹皮指纹图谱研究均采用高效液相色谱法(HPLC),但高效毛细管电泳法(HPCE)具有柱效高,所需样品少,运行成本低,抗污染能力强等特点

[收稿日期] 2011-03-18

[基金项目] 国家“十一·五”科技支撑计划项目(2006BAI09B05);江苏省中药炮制重点实验室开放式课题(ZYPZ007);江苏省“青蓝工程”项目(2008)

[通讯作者] *巢建国, Tel: 025-85811524, E-mail: jgchao1016@yahoo.com.cn

而优于 HPLC^[2-4]。本文以丹皮酚和没食子酸为参照物,以安徽产牡丹皮为研究对象,首次建立牡丹皮的高效毛细管电泳指纹图谱,为牡丹皮的内在质量控制和 GAP 生产提供科学依据。

1 仪器与试剂

Agilent G1600 AX 型高效毛细管电泳仪(包括惠普化学工作站, DAD 检测器, 自动进样器); Rotavapor R-3 BUCHI 型旋转蒸发仪; AG 285 电子天平; PHS-3C 型 pH 计(上海康仪仪器有限公司); KQ-500E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

丹皮酚对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110708-200506),没食子酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110831-200805)。所有试剂均为分析纯,实验用水为超纯水。

样品采自安徽铜陵、南陵、亳州(表 1),经南京中医药大学巢建国教授鉴定,为毛茛科植物牡丹 *P. suffruticosa* 的干燥根皮。

表 1 牡丹皮样品来源

No.	样品编号	产地
1	S ₁	铜陵钟鸣镇
2	S ₂	铜陵顺安镇
3	S ₃	南陵龙山村
4	S ₄	南陵铁山村
5	S ₅	南陵黄山村
6	S ₆	南陵丫山村
7	S ₇	南陵西山村
8	S ₈	南陵顺冲村
9	S ₉	亳州十八里镇
10	S ₁₀	亳州十九里镇

2 方法与结果

2.1 电泳条件 未涂渍标准熔融石英毛细管(64.5 cm × 75 μm, 有效长度 56 cm)(Agilent 科技有限公司),检测波长 212 nm,压力进样 50 mbar × 5 s,分离电压 20 kV,毛细管温度 25 ℃,运行缓冲液 30 mmol·L⁻¹ 硼砂(5% 甲醇, pH 9.4)。毛细管使用前以 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液,超纯水和运行缓冲液依次通过压力冲洗 2, 5, 5 min。上述试剂使用前均经 0.22 μm 滤膜滤过,并超声脱气。

2.2 对照品溶液制备 精密称取丹皮酚对照品和没食子酸对照品适量,分别用 70% 甲醇溶解制成浓度为丹皮酚 1.489 g·L⁻¹、没食子酸 0.483 g·L⁻¹ 的对照品储备液。

2.3 供试品溶液制备 精密称取样品粉末 0.5 g(过 60 目筛),置 50 mL 具塞三角锥形瓶中,加入 70% 甲醇溶液 25 mL,称重,超声提取 30 min,放冷,补足质量,滤过,浓缩至干,再用 70% 甲醇定容至 10 mL 量瓶中,过 0.22 μm 微孔滤膜,作为供试品溶液。

2.4 方法学考察

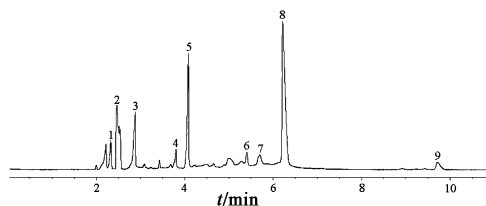
2.4.1 精密密度试验 取供试品(S₅)溶液,连续进样 5 次,测定主要共有峰的相对迁移时间和相对峰面积,以 8 号峰为参照峰,相对迁移时间 RSD 均 < 1.5%,相对峰面积 RSD 均 < 1.9%,表明供试品进样精密密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取供试品(S₅)溶液,分别在 1, 2, 4, 8, 16, 24 h 进样 6 次,以 8 号峰为参照峰,其共有峰的相对迁移时间 RSD 均 < 1.7%,相对峰面积 RSD 均 < 2.6%,说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.3 重现性试验 精密称取牡丹皮(S₅)样品 6 份,每份 0.5 g,分别按供试品液制备方法制成供试液进行测定,以 8 号峰为参照峰,其共有峰相对迁移时间 RSD 均 < 2.0%,相对峰面积 RSD 均 < 2.8%。

2.5 指纹图谱分析

2.5.1 指纹图谱的建立与共有指纹峰标定 将 10 个不同批次的供试品溶液按选定的测试条件进行检测,记录所有供试品 HPCE 色谱图。根据不同供试品测定结果所给出的峰数、峰值(积分值)和峰位(相对迁移时间)等相关参数,进行分析、比较,制定优化的指纹图谱。经对供试品 HPCE 色谱图的分析比较,标定 9 个共有峰作为牡丹皮指纹图谱的特征峰(图 1),3, 9 号峰分别鉴定为丹皮酚和没食子酸,并设定 8 号峰为参照峰。根据参照峰的迁移时间和峰面积数值,分别求出 10 个不同产地牡丹皮各共有峰与之相比的相对迁移时间 α 值和各共有峰的相对峰面积(表 2)。



3. 丹皮酚; 9. 没食子酸

图 1 牡丹皮的 HPCE 指纹图谱

2.5.2 指纹图谱的聚类分析 选择牡丹皮 HPCE 指纹图谱中 9 个共有峰,用 SPSS 软件对 10 个不同

表 2 牡丹皮 HPCE 指纹图谱中共有峰的相对迁移时间 α 值和相对峰面积

峰号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	0.365	0.386	0.459	0.610	0.640	0.869	0.904	1	1.535
S ₁	0.063	0.122	0.280	0.011	0.193	0.343	0.232	1	0.122
S ₂	0.091	0.138	0.291	0.016	0.201	0.327	0.253	1	0.137
S ₃	0.079	0.164	0.234	0.104	0.524	0.114	0.184	1	0.032
S ₄	0.092	0.271	0.222	0.073	0.350	0.083	0.183	1	0.060
S ₅	0.157	0.239	0.260	0.056	0.476	0.180	0.237	1	0.156
S ₆	0.138	0.229	0.279	0.080	0.431	0.125	0.343	1	0.179
S ₇	0.099	0.164	0.265	0.073	0.500	0.094	0.187	1	0.037
S ₈	0.127	0.212	0.251	0.054	0.409	0.125	0.304	1	0.178
S ₉	0.313	0.362	0.122	0.121	0.426	0.328	0.543	1	0.372
S ₁₀	0.292	0.383	0.101	0.037	0.317	0.308	0.640	1	0.350

产地牡丹皮样品进行聚类分析,结果见图 2。从聚类结果可以看出:铜陵产牡丹皮先聚为一类,再与 6

个南陵产者聚为一大类;亳州产者聚为一类,与铜陵、南陵产者距离相对较远。

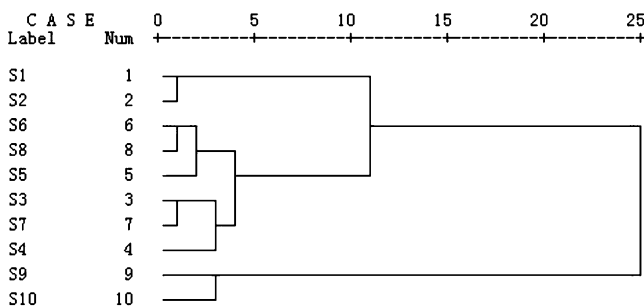


图 2 牡丹皮 HPCE 指纹图谱的聚类分析

2.5.3 相似度评价 以牡丹皮对照谱图 (R) 为基准,按以下公式计算[待测样品与对照谱图共有的峰数 $\times 2 /$ (待测样品与对照谱图峰数和)] $\times 100\%$, S₁ ~ S₁₀ 号样品色谱峰的重叠率依次为:92.41%, 90.33%, 93.33%, 89.72%, 87.50%, 82.35%, 89.50%, 95.78%, 90.31%, 91.50%。

将所有样品的色谱图导入国家药典委员会“中药指纹图谱相似度评价系统(2004A)”软件,经校正选峰,设定匹配模式,将色谱峰自动匹配,生成对照图谱,进行色谱峰差异性评价和整体相似性评价^[5](图 3)。各相似度值为:0.912 S₁, 0.893 S₂, 0.926 S₃, 0.952 S₄, 0.988 S₅, 0.959 S₆, 0.932 S₇, 0.947 S₈, 0.861 S₉, 0.837 S₁₀。

3 讨论

3.1 电泳条件的优化 毛细管电泳的分离效率主要取决于缓冲液的类型、酸度、浓度及电压、温度、检

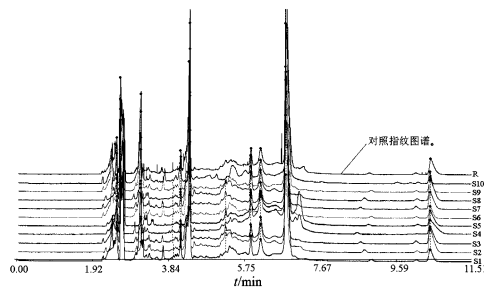


图 3 牡丹皮样品 HPCE 指纹图谱共有模式

测波长等因素^[5],本文针对以上影响因素考察了实验条件对分离的影响,进行了电泳条件的优化。

3.1.1 缓冲溶液浓度对分离的影响 缓冲溶液浓度是影响被测物迁移时间和分离度的一个重要因素。分别配置 30, 40, 50 mmol \cdot L⁻¹ 硼砂缓冲溶液进行试验,当缓冲溶液浓度为 30 mmol \cdot L⁻¹ 时,对照品迁移时间较短,分离度较理想。

3.1.2 缓冲溶液 pH 的影响 缓冲液的 pH 直接影

响电渗流的方向和速度,同时影响组分的迁移时间和分离度。本文对缓冲液的 pH 进行了优化选择,以获得较好的分离条件,考察了 pH 5.2,5.6,9.0,9.4,9.8 的硼砂缓冲溶液($30\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)对分离的影响。当 $\text{pH} < 9.0$,丹皮酚的峰展宽明显;当 $\text{pH} 9.0 \sim 9.8$,丹皮酚、没食子酸能与附近成分完全分离,综合迁移时间和峰形,选择缓冲溶液 $\text{pH} 9.4$ 。

3.1.3 有机添加剂的影响 配置 $30\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼砂($\text{pH} 9.4$)缓冲溶液,其中分别加入 10% 甲醇、10% 乙醇、10% 异丙醇。乙醇、异丙醇添加剂没有改善对照品分离效率,相反使得丹皮酚与周围未知成分重叠,分离效果差。另外各峰的迁移时间变长,其中丹皮酚在含 10% 乙醇或 10% 异丙醇缓冲溶液条件下 15 min 内还未流出。甲醇添加剂能改善分离,故选择甲醇做有机添加剂。

3.1.4 甲醇浓度的影响 考察缓冲溶液 $30\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼砂($\text{pH} 9.4$)中不同甲醇体积分数(5%,10%,15%,20%)对分离的影响,发现甲醇体积分数 $> 10\%$ 时,2 种对照品的谱峰逐渐变宽,并且基线较高,而且峰形变得较差,迁移时间长。甲醇体积分数为 5%~10% 时,丹皮酚能与周围成分得到良好的分离。从迁移时间和分离效率来考虑,选择甲醇体积分数 5%。

3.1.5 运行电压的影响 在毛细管长度一定的前提下,分离电压决定电场的强度,而电场强度影响电渗流速度和带电物质的迁移速率,继而决定了分析物的迁移时间。实验考察了分离电压在 16~25 kV 的条件下对各组分迁移时间的影响。结果表明分离电压越高,组分的迁移时间越短,当分离电压为 20 kV 时,样品及对照品各待测组分仍然可以达到基线分离且节省时间,但当分离电压超过 25 kV 时基线噪音增大,故选择 20 kV 为分离电压。

3.1.6 运行温度的影响 运行温度影响电场的强

度,从而影响分析物的迁移时间。本文考察了运行温度 20~25 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下对各组分迁移时间的影响。实验结果表明运行温度越高,组分的迁移时间越短,当运行温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 时样品的各组分分离效果好,且分析时间缩短,故选择 25 $^{\circ}\text{C}$ 为运行温度。

3.1.7 检测波长的选择 采用二极管阵列检测器对检测波长进行考察,根据分析物的紫外吸收特征,在 212 nm 波长处,2 种对照品均有较好的吸收,故确定 212 nm 为本实验检测波长。

3.2 指纹图谱评价 本文以牡丹皮中所含药效成分丹皮酚和没食子酸作为参照物,建立了牡丹皮 HPCE 指纹图谱检测标准,方法学考察结果表明指纹图谱中各色谱峰的相对迁移时间和峰面积基本一致,相似度较高,重现性好,操作简便,符合指纹图谱研究的技术要求,可专属性地研究牡丹皮的品质。聚类分析表明牡丹皮成分与产地分布有密切的关系,采用的 10 批牡丹皮样品虽成分含量有差异,但色谱图基本一致,色谱峰的重叠率和相似度值均较高,说明安徽牡丹皮中群体成分较一致。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S]. 2010: 161.
- [2] 孔昭琰,胡煜雯,巢建国,等. 凤丹皮 HPLC 指纹图谱研究[J]. 南京中医药大学学报, 2011, 27(1): 66.
- [3] 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.
- [4] 崔洋,张兰桐,孔德志,等. 河北道地药材连翘的高效毛细管电泳指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(18): 2440.
- [5] 李俊松,宋建平,刘训红,等. 山茱萸饮片高效毛细管电泳指纹图谱研究[J]. 中草药, 2010, 41(12): 1981.

[责任编辑 蔡仲德]