

通塞脉微丸高效毛细管电泳指纹图谱的研究

李伟东^{1*}, 张志杰², 蔡宝昌^{1*}

(1. 南京中医药大学江苏省中药炮制重点实验室, 南京 210029;

2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立通塞脉微丸高效毛细管电泳指纹图谱。方法: 以 pH 9.18, 40 mmol·L⁻¹ 硼砂-10% 甲醇溶液为运行缓冲液, 采用未涂层弹性石英毛细管柱(75 μm ×56 cm, 有效长度 50.0 cm), 分离电压 25 kV; 进样压力 5 kPa, 进样 2.0 s; 毛细管温度 25 ; 二极管阵列检测, 检测波长 254 nm。结果: 以 10 个批次的通塞脉微丸为样品建立了通塞脉微丸的毛细管电泳指纹图谱, 确认共有指纹峰 16 个, 并确定了甘草苷、甘草素、甘草酸单铵盐、肉桂酸、绿原酸、阿魏酸的峰。结论: 此方法简单、快速、高效, 为通塞脉微丸的全面质量控制提供了科学依据。

[关键词] 通塞脉微丸; 指纹图谱; 高效毛细管电泳

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)17-0053-04

Research on HPCE Fingerprint of Tongsaimai Pellet

LI Wei-dong¹, ZHANG Zhi-jie², CAI Bao-chang^{1*}

(1. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Key Laboratory of Chinese Medicine Processing,

Nanjing 210029, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of

Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] Objective: To establish an HPCE method for determining the fingerprint of Tongsaimai pellet. **Method:** The buffer was composed of 40 mmol·L⁻¹ borax (pH 9.18) -methanol (90/10). CE was performed on a 75 μm ×56 cm (effective length is 50.0 cm) fused silica capillary. Separation voltage was 25 kV, sampling pressure was 5 kPa, sampling time was 2.0 s, the temperature was maintained at 25 , and detected at 254 nm. **Result:** Based on the fingerprints of 10 batches Tongsaimai pellet, an average electropherogram was used as the standard fingerprint, among which there were 16 characteristic peaks. **Conclusion:** The fingerprint analysis can be used for assessing the quality consistency of Tongsaimai pellet from batch to batch.

[Key words] Tongsaimai pellet; fingerprint; HPCE

通塞脉微丸是以黄芪、当归、金银花、玄参、石斛、甘草等 6 味药材精制而成的复方制剂, 具有清热养阴、活血化瘀的功效, 用于血栓闭塞性脉管炎、静脉血栓形成、动脉硬化性闭塞症、脑血栓形成及其后遗症等。微丸中主要含黄酮、酚酸类等成分^[1], 李伟东等^[2]用高效液相法(HPLC)对通塞脉微丸的指纹

图谱进行了研究。但由于高效毛细管电泳(HPCE)技术具有高效、快捷、微量、成本低、可自动化等特点, 对于成分复杂的中药, 特别是对带电离子的分析尤为有用。2010 年版《中国药典》也将 HPCE 法收录为法定的检验方法^[3]。因此, 本文利用毛细管电泳区带电泳(CZE)法, 以 10 批通塞脉微丸为样品建立通塞脉微丸毛细管电泳指纹图谱, 为通塞脉微丸的全面质量控制提供了一种简单、快速、环保、高效的新方法。

1 仪器与试剂

Agilent 毛细管电泳仪/二极管阵列检测器

[收稿日期] 20100918(007)

[基金项目] 国家 863 重大研究计划项目(2003AA2Z3247); 江苏省科技厅科技攻关重大项目(BK2001209)

[通讯作者] * 蔡宝昌, Tel: 025-86798281, E-mail: bccai@

126.com

(DAD) /自动进样装置。HP Chemstation 色谱工作站。YXJ-2 型高速离心机(常州国华电子器械有限责任公司); 75 μm 空心石英毛细管(河北永年锐沣色谱器件有限公司)。

通塞脉微丸(10 批次, 批号 031006, 031016, 031025, 031028, 031106, 031112, 031120, 031208, 031210, 031216, 分别记为 S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9 和 S10) 及通塞脉微丸阴性制剂, 由南京中医药大学中医药研究院制备。对照品甘草苷、甘草素、甘草酸单铵盐、肉桂酸、绿原酸、阿魏酸(自制), 经 UV, IR, MS, NMR 等结构测定, HPLC 检测为单一成分, 纯度均在 99% 以上。甲醇, 江苏汉邦科技有限公司, 色谱纯; 硼砂($\text{NaB}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), 南京化学试剂一厂, AR 级; 纯净水, 杭州娃哈哈集团有限公司。

2 方法与结果

2.1 电泳条件 未涂层石英毛细管柱(56 cm \times 75 μm , 有效长度 50 cm)。缓冲液运行电压 25 kV; 毛细管温度 25 $^{\circ}\text{C}$ 进样; 检测波长 254 nm; 灵敏度 0.020 AUFS; 以 pH 9.18, 40 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼砂-10% 甲醇溶液为背景电解质; 压力进样 50 kPa, 2 s。

新毛细管依次用 1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH, 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 及纯净水老化并冲洗 40 min, 每次进样前用 1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠冲洗毛细管 10 min, 用水冲洗 5 min, 电解质冲洗 5 min, 等待 3 min, 再用背景电解质冲洗 5 min。所有溶液在使用之前均用微孔滤膜(0.45 μm) 过滤, 并超声脱气。

2.2 样品溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取甘草苷、甘草素、肉桂酸、绿原酸、阿魏酸、甘草酸单铵盐标准品适量, 加 40 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 四氢硼钠缓冲液溶解, 使每 1 mL 中含甘草苷、甘草素、肉桂酸、绿原酸、阿魏酸约为 0.1 mg, 含甘草酸单铵盐约为 0.2 mg。

2.2.2 样品供试液的制备 取通塞脉微丸混匀, 研细, 取 0.50 g, 精密称定, 置于 25 mL 量瓶中, 加入约 20 mL 40 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 四氢硼钠缓冲液超声 30 min 使溶解, 待冷却至室温后, 加 40 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 四氢硼钠缓冲液定容, 摇匀。取出适量离心(5 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 5 min) 后, 取上清液备用。以上溶液均经 0.45 μm 的滤膜过滤后使用。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取同一供试品溶液, 按 2.1 项下的电泳条件分别连续进样 5 次, 以 9 号峰甘草素

为参照峰, 测定主要共有峰的相对迁移时间和相对峰面积, 结果相对迁移时间 RSD 均小于 1.6%, 相对峰面积 RSD 均小于 1.8%, 表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别在 0, 6, 12, 18, 24 h 进样, 以 9 号色谱峰为参照峰, 其共有峰的相对迁移时间 RSD 均小于 1.8%, 相对峰面积 RSD 均小于 3.0%, 表明 24 h 内样品稳定。

2.3.3 重复性试验 取同一批号通塞脉微丸样品 5 份, 分别按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 测定, 以 9 号色谱峰为参照峰, 其共有峰相对迁移时间 RSD 均小于 2.5%, 相对峰面积 RSD 均小于 3.0%。

2.4 通塞脉微丸 HPCE 指纹图谱及部分共有指纹峰的确认 根据 10 批次供试品的检测结果, 选择了各批样品共有的、迁移时间以及峰面积相对稳定的 16 个色谱峰作为通塞脉微丸指纹图谱的共有峰, 且所有成分在 20 min 内全部出峰。通塞脉微丸 HPCE 指纹图谱见图 1, 10 批样品叠加图谱见图 2。各共有峰相对迁移时间与相对峰面积的结果见表 1, 2。根据 10 批供试品的电泳图谱数据, 在共有指纹峰中 12、14 两个峰峰面积大于总峰面积的 10%; 计算各非共有峰的面积; 结果表明, 10 批供试品的非共有峰面积之和均小于总峰面积的 10%。

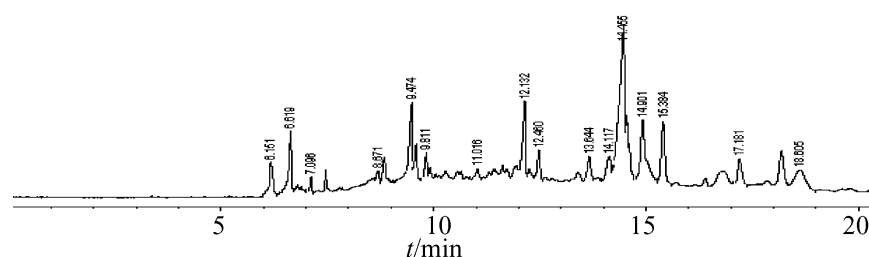


图 1 通塞脉微丸 HPCE 指纹图谱

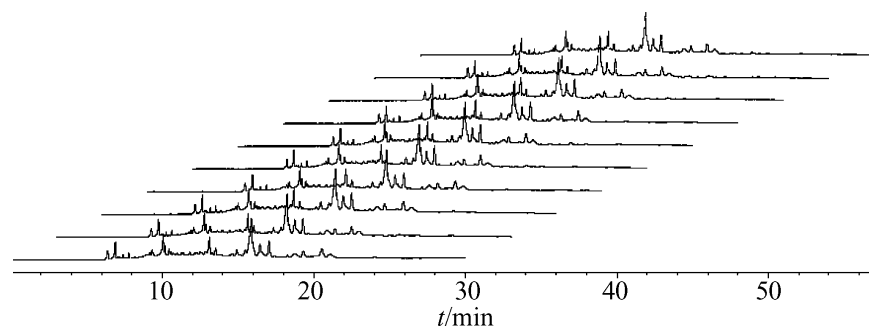


图 2 10 批通塞脉微丸的毛细管电泳指纹图谱

2.5 通塞脉微丸指纹图谱相似度评价 采用国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)》评价 10 批通塞脉微丸的指纹图谱, 以均值法生成对照指纹图谱, 建立共有模式, 测得各批次样品与共有模式间的相似度, 结果均在 0.900 以上, 说明工艺较稳定, 见表 3。

表 1 10 批通塞脉微丸特征指纹峰相对迁移时间

Peak No	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	均值
1	0.494	0.501	0.499	0.500	0.487	0.507	0.506	0.501	0.503	0.496	0.499
2	0.531	0.538	0.535	0.536	0.523	0.543	0.542	0.536	0.533	0.541	0.536
3	0.570	0.576	0.574	0.575	0.562	0.581	0.580	0.575	0.573	0.561	0.573
4	0.696	0.702	0.699	0.701	0.690	0.706	0.705	0.700	0.698	0.702	0.700
5	0.760	0.764	0.762	0.764	0.754	0.769	0.768	0.764	0.766	0.761	0.763
6	0.787	0.792	0.790	0.792	0.783	0.796	0.795	0.791	0.790	0.789	0.791
7	0.885	0.887	0.887	0.888	0.881	0.890	0.889	0.886	0.891	0.883	0.887
8	0.971	0.972	0.972	0.974	0.972	0.971	0.972	0.970	0.973	0.971	0.972
9(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
10	1.093	1.091	1.092	1.094	1.099	1.090	1.100	1.092	1.095	1.101	1.095
11	1.130	1.127	1.129	1.131	1.138	1.124	1.126	1.128	1.125	1.129	1.129
12	1.157	1.154	1.156	1.158	1.166	1.147	1.148	1.150	1.152	1.156	1.154
13	1.190	1.186	1.188	1.190	1.202	1.186	1.187	1.191	1.200	1.197	1.192
14	1.230	1.225	1.227	1.229	1.245	1.224	1.226	1.232	1.228	1.231	1.230
15	1.377	1.365	1.369	1.365	1.394	1.356	1.358	1.373	1.376	1.369	1.370
16	1.484	1.471	1.476	1.477	1.517	1.460	1.463	1.480	1.479	1.464	1.477

表 2 10 批通塞脉微丸特征指纹峰相对峰面积

Peak No	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	均值
1	1.709	1.521	1.610	1.613	1.686	1.691	1.583	1.603	1.637	1.668	1.632
2	2.335	2.046	2.056	2.041	2.111	2.234	2.198	2.354	2.287	2.246	2.191
3	0.336	0.295	0.305	0.304	0.327	0.321	0.312	0.305	0.316	0.309	0.313
4	0.371	0.385	0.375	0.345	0.345	0.354	0.362	0.351	0.321	0.357	0.357
5	2.258	2.053	2.034	2.010	2.268	2.113	2.045	2.119	2.207	2.089	2.120
6	0.658	0.589	0.632	0.564	0.600	0.634	0.625	0.647	0.651	0.639	0.624
7	0.449	0.486	0.443	0.485	0.499	0.465	0.459	0.467	0.472	0.453	0.468
8	2.368	2.323	2.342	2.213	2.429	2.421	2.323	2.297	2.289	2.413	2.342
9(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
10	1.017	1.013	1.051	1.037	1.039	1.067	1.063	1.069	1.083	1.057	1.050
11	0.748	0.732	0.712	0.724	0.717	0.715	0.721	0.739	0.726	0.741	0.728
12	6.149	5.946	5.852	5.635	6.437	6.247	6.313	6.102	5.993	6.036	6.071
13	3.068	2.940	2.823	2.812	3.090	3.102	2.997	2.875	2.969	3.021	2.970
14	2.974	2.751	2.983	2.895	3.005	2.910	2.926	3.002	2.953	2.870	2.927
15	1.419	1.460	1.402	1.418	1.496	1.434	1.489	1.399	1.501	1.433	1.445
16	1.593	1.731	1.561	1.604	1.699	1.630	1.652	1.601	1.595	1.611	1.628

表 3 10 批通塞脉微丸 HPLC 指纹图谱相似度

样品号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
相似度	0.984	0.975	0.935	0.923	0.916	0.928	0.941	0.948	0.989	0.909

2.6 通塞脉微丸和中药材指纹图谱的相关性 分别取各药材、阴性制剂和微丸制剂约 0.50 g, 精密称定, 按 2.2.2 项下制备样品供试液。按照通塞脉微

丸指纹图谱的色谱条件测定, 得到各样品的图谱, 进行药材与成品的相关性进行分析, 以确定各色谱峰的药材归属, 见表 4。

表 4 通塞脉微丸和中药材指纹图谱的相关性

共有峰号	黄芪	当归	金银花	玄参	石斛	甘草
1	+	+	+	+	+	
2	+					
3	+					
4					+	
5(甘草苷)						+
6			+			
7				+	+	
8						+
9(甘草素)						+
10						+
11	+					+
12(甘草酸单铵盐)						+
13(肉桂酸)				+		
14(绿原酸)			+			
15(阿魏酸)		+				
16		+	+			

通过对通塞脉微丸、阴性制剂及组方药材的 HPCE 指纹图谱相关性的研究, 确定了通塞脉微丸 HPCE 指纹图谱中 16 个色谱峰的药材归属, 其中 5, 9, 12, 13, 14, 15 号峰经过与相对应的标准品对照后确定: 对照品试验表明迁移时间 9.474 min 处的色谱峰为甘草苷(5 号峰), 12.460 min 处的色谱峰为甘草素(9 号峰), 14.455 min 处的色谱峰为甘草酸单铵盐(12 号峰), 14.901 min 处的色谱峰为肉桂酸(13 号峰), 15.384 min 处的色谱峰为绿原酸(14 号峰), 17.181 min 处的色谱峰为阿魏酸(15 号峰)。

3 讨论

3.1 提取溶剂及提取方法的选择 分别以水、50% 甲醇、0.1 mol·L⁻¹ KOH 溶液和 40 mmol·L⁻¹ 硼砂溶液制备样品供试液, 结果表明 0.1 mol·L⁻¹ KOH 溶液提取的成分较少, 40 mmol·L⁻¹ 硼砂溶液提取的成分最多, 水、50% 甲醇溶液提取的成分相似。故试验选择 40 mmol·L⁻¹ 硼砂溶液为提取溶剂。

提取方法考察了超声提取法和加热回流提取法, 结果 2 种方法所提取的成分相似, 含量亦近似, 考虑到超声提取法操作方便, 故选用超声提取法, 同时考察了提取时间, 以超声 30 min 为宜。

3.2 缓冲介质的选择 本试验分别考察了硼砂溶液和磷酸盐溶液 2 个不同缓冲溶液体系, 发现硼砂体系的分离效率优于磷酸盐体系; 接着考察了 10 ~

100 mmol·L⁻¹ 不同浓度范围的硼砂缓冲液, 结果发现分离效率随浓度的增大而增高, 但超过 40 mmol·L⁻¹ 后, 分离效率逐渐降低且迁移时间延长, 故试验选用 40 mmol·L⁻¹ 硼砂缓冲溶液为分离介质。同时考察了缓冲液 pH 4.5 ~10.5, 结果以 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠调节 40 mmol·L⁻¹ 硼砂缓冲溶液至 pH 9.18 效果为佳。

试验还发现加入有机改性剂后能有效改变分离效果, 比较了加入改性剂的种类, 结果甲醇效果好于乙腈; 考察了甲醇的含量, 结果以缓冲液 40 mmol·L⁻¹ 硼砂(pH 9.18) 加入 10% 甲醇(体积比) 的分离效果最佳, 当甲醇体积分数大于 10% 后, 目标成分的迁移时间延长且分离效率逐渐降低。

本文建立了通塞脉微丸的毛细管电泳指纹图谱, 根据 10 批通塞脉微丸指纹图谱的特征, 确定了 16 个共有指纹峰, 并鉴定了其中的甘草苷, 甘草素, 甘草酸单铵盐, 肉桂酸, 绿原酸, 阿魏酸等色谱峰, 与作者前期创建的通塞脉微丸 HPLC 色谱指纹图谱^[2] 相比, HPLC 指纹图谱在稳定性和重复性方面优于 HPCE 指纹图谱, 而 HPCE 指纹图谱则具有分析时间短(<30 min)、色谱峰柱效高、分析成本低、环境友好等优势。2 种方法计算的相同 10 批通塞脉微丸指纹图谱相似度结果一致(均大于 0.9), 都能较好地控制通塞脉微丸质量的一致性和稳定性。因此, 本试验为通塞脉微丸的质量控制提供了一种简单、快速、高效的方法。

此外, 试验还对组方药材和微丸进行了相关性研究, 发现通塞脉微丸的电泳图和组方药材的电泳图具有某些相关性, 但有些成分在药材电泳图中出现的峰, 在微丸的指纹图中则没有出现, 说明各药在提取及微丸的加工过程中各成分可能已发生一定变化, 进一步证明了对复方中药制剂各成分同时进行质量控制的必要性。

[参考文献]

- [1] 李伟东, 蔡宝昌, 丁选胜. 通塞脉微丸化学成分 HPLC/MS 研究 [J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(11): 2355.
- [2] 李伟东, 蔡宝昌, 狄留庆. 通塞脉微丸 HPLC 指纹图谱的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(3): 16.
- [3] 中国药典. 一部 [S]. 2010: 附录 39.

[责任编辑 顾雪竹]