

益母草注射液的毛细管电泳指纹图谱研究

苗文娟¹, 杨 蕾², 吴大蓉³, 张 鹏⁴, 陈 聪¹, 叶利明¹

(1. 四川大学华西药学院, 四川 成都 610041; 2. 四川省食品药品检验所, 四川 成都 610036; 3. 成都市时代药物制剂研究所有限公司, 四川 成都 610031; 4. Beckman 公司上海办事处, 上海 200021)

摘 要:目的 建立益母草注射液的毛细管电泳指纹图谱。方法 以水苏碱峰为参照物峰, 采用毛细管区带电泳法建立益母草注射液指纹图谱。结果 标示出益母草注射液中 12 个主要共有峰。结论 所建立方法具有良好的重现性与分离度, 可为益母草注射液的质量控制提供依据。

关键词:益母草注射液; 毛细管电泳; 水苏碱; 指纹图谱

中图分类号: R286.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2007)08-1171-04

Fingerprints of *Leonurus heterophyllus* Injection with capillary electrophoresisMIAO Wen-juan¹, YANG Lei², WU Da-rong³, ZHANG Peng⁴, CHEN Cong¹, YE Li-ming¹

(1. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Sichuan Provincial Institute for Food and Drug Control, Chengdu 610036, China; 3. Chengdu Institute of Times Pharmaceutical Research, Chengdu 610031, China; 4. Station of Beckman-Coulter Company in Shanghai, Shanghai 200021, China)

Abstract: **Objective** To establish the fingerprints method of capillary electrophoresis for *Leonurus heterophyllus* Injection. **Methods** Method of capillary zone electrophoresis was developed to establish the fingerprints of *Leonurus heterophyllus* Injection with the peak of stachydrine as reference. **Results** Fingerprints of *Leonurus heterophyllus* Injection obtained contained 12 major common peaks. **Conclusion** The method has good reproducibility and resolution which can be used for the quality control of *Leonurus heterophyllus* Injection.

Key words: *Leonurus heterophyllus* Injection; capillary electrophoresis; stachydrine; fingerprint

益母草为唇形科植物益母草 *Leonurus heterophyllus* Houtt. 的全草, 是治疗妇科症之要药。益母草注射液为益母草中有效成分制成的灭菌水溶液, 具有活血、调经的作用。指纹图谱质控技术是保证中成药功效, 实现中药现代化的一个重要方面。本实验采用高效毛细管电泳法(HPCE)对益母草注射液指纹图谱进行了研究, 以期更科学地对其质量进行控制。

1 仪器与试剂

P/ACE MDQ 毛细管电泳仪(Beckman-Coulter 公司); 旋转蒸发仪(上海申顺生物科技有限公司); 千分之一电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); PHS-25 型 pH 计(上海精密科学仪器有限公司)。

益母草注射液由成都制药一厂提供; 水苏碱对照品由四川省药品检验所提供; 硼砂、硼酸、异丙醇等试剂均为分析纯(成都化学试剂厂); 乙腈、甲醇为

色谱纯, 实验用水为去离子水; 所用试剂均通过 0.45 μm 微孔滤膜滤过。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备: 精密称取水苏碱对照品 10.0 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液。益母草注射液作为供试品溶液采取直接进样。

2.2 色谱条件: Beckman-Coulter 公司未涂层石英毛细管(57 cm $\times$ 75 μm , 有效长度为 50 cm); 检测波长: 207 nm; 运行电压: 20 kV; 柱温: 24 $^{\circ}\text{C}$; 以 50 mmol/L 硼砂-50 mmol/L 硼酸(1:1, 1 mol/L NaOH 调 pH 值至 9.5)-0.5 mmol/L SDS 为背景电解质; 进样: 2.0 kPa, 2 s。

2.3 参照物峰的确定: 将水苏碱对照品溶液和益母草注射液在毛细管电泳仪上分别进样, 对比迁移时间可知 2 号峰为水苏碱。在供试品溶液中加入水苏碱对照品溶液, 进样分析, 结果水苏碱的电泳峰增

收稿日期: 2006-11-03

作者简介: 苗文娟(1983-), 女, 河北人, 在读硕士, 药物分析专业, 主要研究方向为仪器及药物分析。

Tel: (028)85502305 E-mail: miaojuan2004@sohu.com

益。水苏碱峰与相邻峰分离良好,且在 207 nm 波长处有较大吸收,故选作参照物峰。

益母草注射液的毛细管电泳分离图谱见图 1,共确认了 12 个主要共有峰,在 35 min 内完成分离。

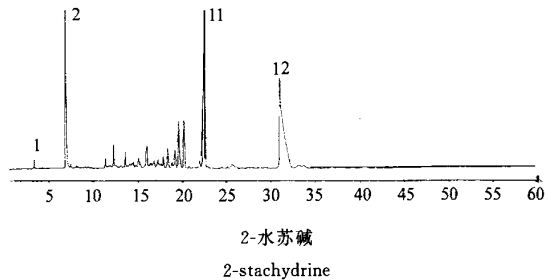


图 1 益母草注射液的毛细管电泳图谱
Fig. 1 Capillary electropherogram of *Leonurus heterophyllus* Injection

2.4 方法学考察

2.4.1 稳定性试验:取批号 040805 的益母草注射液供试品溶液分别于 0、2、4、8、24 h 进样测定,计算,结果主要共有峰迁移时间 RSD 均小于 0.76%,峰面积 RSD 均小于 3.87%。

2.4.2 精密性试验:取批号 040806 的益母草注射液供试品溶液连续进样 5 次,进样测定,计算,结果各峰迁移时间 RSD 均小于 0.37%,峰面积 RSD 均小于 4.15%。

2.4.3 重现性试验:取批号 040810 的益母草注射液,分别在本实验室和四川省药品检验所分析测试室进行检测,各重复进样 5 次,结果 10 次进样所得

表 1 益母草注射液指纹图谱中共有峰的相对迁移时间

批号	相对迁移时间											
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12
040805	0.488 0	1.000 0	1.670 2	1.834 1	2.025 5	2.352 7	2.684 9	2.807 1	2.871 4	2.960 7	3.309 3	4.586 8
040806	0.488 3	1.000 0	1.666 9	1.801 2	1.991 3	2.348 8	2.687 5	2.807 2	2.873 3	2.961 4	3.310 4	4.548 6
040808	0.490 4	1.000 0	1.669 9	1.745 9	1.935 2	2.339 3	2.687 1	2.809 1	2.870 2	2.957 2	3.298 9	4.505 3
040810	0.489 3	1.000 0	1.664 4	1.816 9	2.004 4	2.336 3	2.665 7	2.786 8	2.847 6	2.936 1	3.278 5	4.505 4
040812	0.489 6	1.000 0	1.661 1	1.783 9	1.972 4	2.336 1	2.672 7	2.793 2	2.855 2	2.942 4	3.284 5	4.493 4
040813	0.490 8	1.000 0	1.661 1	1.732 3	1.919 7	2.327 6	2.673 3	2.793 2	2.853 9	2.939 4	3.277 8	4.451 7
040818	0.487 7	1.000 0	1.668 1	1.816 6	2.007 2	2.349 5	2.686 8	2.811 0	2.873 9	2.963 9	3.314 7	4.594 9
040825	0.488 5	1.000 0	1.665 4	1.790 8	1.980 6	2.349 2	2.695 8	2.815 8	2.879 6	2.968 3	3.318 1	4.576 6
040827	0.489 9	1.000 0	1.656 2	1.736 0	1.925 0	2.336 2	2.687 2	2.809 0	2.871 2	2.957 7	3.302 0	4.512 7
040828	0.487 3	1.000 0	1.668 0	1.797 3	1.988 9	2.351 8	2.695 2	2.819 7	2.884 5	2.925 1	3.328 7	4.547 1
040903	0.488 1	1.000 0	1.662 5	1.771 8	1.961 2	2.346 8	2.696 0	2.820 5	2.820 5	2.973 5	3.326 3	4.592 2
040910	0.487 5	1.000 0	1.659 3	1.727 6	1.916 4	2.347 1	2.708 2	2.834 1	2.896 9	2.985 9	3.340 3	4.591 9
RSD/%	0.24	0.00	0.27	2.05	1.89	0.34	0.44	0.47	0.69	0.58	0.60	1.05

3 讨论

为获得良好的重现性,经常更换背景电解质和充分清洗毛细管柱至关重要。因此每运行 5 次试验之后更换新的缓冲液;背景电解质中含表面活性剂

各峰迁移时间 RSD 均小于 0.87%,峰面积 RSD 均小于 4.45%。

2.5 样品测定:取 12 批益母草注射液,分别按上述电泳条件测定,以水苏碱峰为参照峰,规定其相对迁移时间和相对峰面积为 1.000,指纹图谱中 12 个主要共有峰见图 2,相对迁移时间和相对峰面积分别见表 1、2。因此制定了益母草注射液标准指纹图谱的技术参数,共有峰的峰号(相对迁移时间):1(0.489)、2(1.00)、3(1.664)、4(1.780)、5(1.969)、7(2.343)、8(2.687)、9(2.809)、10(2.866)、11(3.307)、12(4.542)。

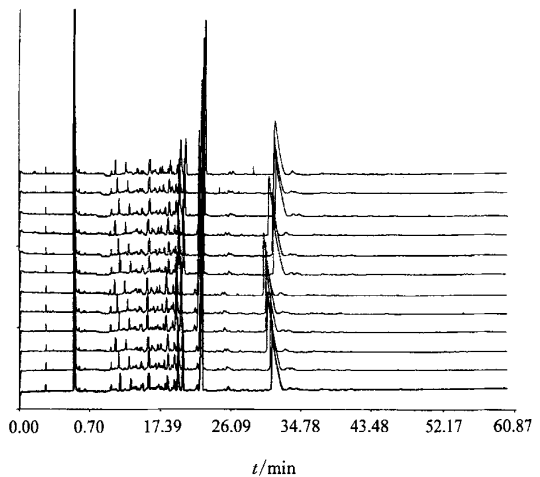


图 2 益母草注射液的指纹图谱的比较
Fig. 2 Fingerprints comparison of *Leonurus heterophyllus* Injection

SDS,故清洗步骤中不需用 0.1mol/L NaOH,但 SDS 容易吸附在毛细管壁上,因此每次运行时,依次用去离子水、甲醇、去离子水、相应缓冲液各冲洗 2 min。

表 2 益母草注射液指纹图谱中共有峰的相对峰面积

Table 2 Relative area of common peaks for *Leonurus heterophyllus* Injection in fingerprint

批号	相对峰面积											
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12
040805	0.008 1	1.000 0	0.024 1	0.062 1	0.041 7	0.113 5	0.080 9	0.049 5	0.237 0	0.230 9	1.394 3	1.539 4
040806	0.007 8	1.000 0	0.021 9	0.060 6	0.043 1	0.117 1	0.080 4	0.050 7	0.232 7	0.224 2	1.390 0	1.494 9
040808	0.008 3	1.000 0	0.025 5	0.058 1	0.043 3	0.117 8	0.080 4	0.051 5	0.243 4	0.239 2	1.419 5	1.454 1
040810	0.008 4	1.000 0	0.021 8	0.060 4	0.042 0	0.112 3	0.081 0	0.047 0	0.249 3	0.227 0	1.376 8	1.486 1
040812	0.008 1	1.000 0	0.023 4	0.058 4	0.042 8	0.115 6	0.079 9	0.049 1	0.247 6	0.218 8	1.399 1	1.417 3
040813	0.008 4	1.000 0	0.023 8	0.057 3	0.044 7	0.114 9	0.080 1	0.051 0	0.239 9	0.232 7	1.385 3	1.430 1
040818	0.008 2	1.000 0	0.022 9	0.058 9	0.040 6	0.112 9	0.080 7	0.049 7	0.239 2	0.223 0	1.353 9	1.455 5
040825	0.007 9	1.000 0	0.024 6	0.057 7	0.042 5	0.113 3	0.080 1	0.050 4	0.240 4	0.225 4	1.397 1	1.462 0
040827	0.008 2	1.000 0	0.024 6	0.055 7	0.043 1	0.112 2	0.080 3	0.050 6	0.231 8	0.227 9	1.361 6	1.438 8
040828	0.008 3	1.000 0	0.024 3	0.059 8	0.044 8	0.112 3	0.080 7	0.050 6	0.222 3	0.218 0	1.395 2	1.439 4
040903	0.008 1	1.000 0	0.025 0	0.055 0	0.044 8	0.116 2	0.080 1	0.050 9	0.226 3	0.216 2	1.408 5	1.514 0
040910	0.008 3	1.000 0	0.024 8	0.055 9	0.048 6	0.119 6	0.080 1	0.055 6	0.242 0	0.235 3	1.404 0	1.442 4
RSD/%	2.33	0.00	4.93	3.72	4.76	2.14	0.45	3.91	3.41	3.14	1.35	2.51

考虑到供试品溶液与背景电解质的离子强度有差异可能会对分离有影响,因此考察了以益母草注射液直接进样、益母草注射液用背景电解质稀释一倍进样以及益母草注射液蒸干后用背景电解质溶解稀释进样的重现性,结果供试品溶液与背景电解质的离子强度差异不会对分离有显著影响,故选择直接进样。这可能是因为进样量与毛细管中所充缓冲液体积相比所占比例很小。

背景电解质的种类、pH 值、浓度对分离的影响:磷酸盐由于制备工艺的影响,含金属离子较多,且分离所需时间长,往往分离效果远不如硼酸盐缓冲液。缓冲液 pH 值对迁移时间影响的总趋势是 pH 升高,迁移时间缩短,这主要是由于在高 pH 值溶液中,毛细管壁的硅醇基离解加强,电荷数增加,Zeta 电势增加,从而使电渗速度加快,但 pH 值过高,迁移速度过快,会导致分离度降低。随着缓冲液浓度的增加,离子强度增加,降低双电层厚度,从而导致 Zeta 电势下降,电渗速度降低,使分离度增加。但缓冲液浓度太高,则电流大,产生焦耳热过多,反而导致分离度明显下降。

分离电压、柱温和进样量对分离的影响:通常在不产生过多焦耳热的前提下,使用尽可能高的分离电压,以实现最大分离度和最短分析时间。实验证明,20 kV 分离效果最好。温度每改变 1℃,将改变黏度 2%~3%,因此影响电渗。考察后发现以 24℃分离效果最好。增大进样量会导致区带扩散,使柱效下降,分离度降低。本实验证明,适当减小进样量可以大大改善分离效果。

背景电解质中添加剂对分离的影响:添加有机改性剂会改变 Zeta 电势和电渗,但其造成的影响很复杂。实验证明,加入有机添加剂不会改善分离。背

景电解质中加入阴离子表面活性剂 SDS 可能增加电渗,使总的分离时间缩短,考察后发现加入 0.5 mmol/L SDS 分离效果大大改善。

12 号峰拖尾较严重,一直未能解决,其可能原因是硼酸离子与益母草中所含某些成分形成配合物所致,拟对其详细原因进一步研究。

电泳条件的选择:采用 PDA 检测器进行波长扫描,在 207 nm 波长处出峰数目最多,且水苏碱对照品在此波长下有较大吸收,因此确定检测波长为 207 nm。比较了 75、50 μm 毛细管,发现 75 μm 内径的分离效果远远好于 50 μm 内径的毛细管。在选择背景电解质种类时,首先比较磷酸缓冲液和硼砂盐,结果以硼砂盐为背景的电解质的重现性好。又比较了硼砂盐和硼砂-硼酸混合液,结果后者的分离效果好;再加入适量的十二烷基磺酸钠(SDS),分离度变好,故选择添加 0.5 mmol/L SDS 的硼砂-硼酸缓冲液为背景电解质。比较 pH 为 8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0 的背景电解质,结果以 pH 9.5 分离效果最好。分别配制 30 mmol/L 硼酸-30 mmol/L 硼砂、40 mmol/L 硼酸-40 mmol/L 硼砂、50 mmol/L 硼酸-50 mmol/L 硼砂、80 mmol/L 硼酸-20 mmol/L 硼砂、60 mmol/L 硼酸-60 mmol/L 的背景电解质,结果以 40 mmol/L 硼酸-40 mmol/L 硼砂时分离效果最好。对 12~25 kV 电压进行考察,分离结果以 20 kV 分离效果最好。对 18~30℃柱温进行考察,以 24℃分离效果最好。分别选择进样为 3.4 kPa,5 s;3.4 kPa,4 s;2.7 kPa,3 s;2.1 kPa,2 s;2.1 kPa,3 s,结果以进样为 2.1 kPa,2 s 时分离效果最好。

References:

- [1] Xie B S. On the feasibility of application of chromatographic fingerprint identification to herbal medication [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2000, 22(6): 391-392.

- [2] Kuang R R, Wang F. Research on fingerprint of Xiangdan Injection [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36 (7): 1006-1008.
- [3] Jiang Y D, Liang H. Traditional Chinese medicine fingerprints of *Cornus officinalis* with capillary electrophoresis [J]. *J Xi'an Jiaotong Univ* (西安交通大学报), 2004, 38 (2): 204-207.
- [4] Lu X M, Zhang D D. Chiral separation of Simendan Enantiomers by capillary zone electrophoresis [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学研究简报), 2005, 33 (7): 1003-1006.
- [5] You S, Wang L. Studies on fingerprint of *Ginkgo Leaves Injection* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33 (3): 216-218.
- [6] Sun G X, Hou Z F. Study on the capillary electrophoresis fingerprints of *Folium isatidis* [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学研究简报), 2005, 33 (6): 853-856.
- [7] Sun G X, Wan Y S. Study on the fingerprints of *Belamcanda chinensis* (L.) DC. by capillary electrophoresis [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 2004, 22 (3): 206-209.

怀菊花挥发性成分的 GC 指纹图谱研究

刘 伟¹, 邢志霞², 陈志红¹, 王 东¹

(1. 河南中医学院 分析测试中心, 河南 郑州 450008; 2. 漯河医学高等专科学校, 河南 漯河 462002)

摘要:目的 建立怀菊花挥发性成分的 GC 指纹图谱分析方法。方法 采用 GC 法。色谱柱: HP-5 (5%) - 二苯基聚硅氧烷共聚物, 毛细管柱 (30.0 m × 320 μm, 0.25 μm); 检测器: 氢焰离子化检测器 (FID); 检测器温度: 180 °C; 载气: 氮气; 载气流速: 2.3 mL/min; 空气流量: 300 mL/min; 氢气流量: 30 mL/min; 程序升温。建立怀菊花的 GC 指纹图谱。结果 确定了怀菊花的 GC 指纹图谱中 27 个共有峰, 各怀菊花样品指纹图谱与对照指纹图谱相似度均在 0.9 以上。结论 此方法简单、准确、重现性好, 为怀菊花的质量控制标准提供了有效的方法。

关键词: 怀菊花; 挥发性成分; 气相色谱法; 指纹图谱

中图分类号: R286.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)08-1174-04

GC Fingerprint analysis of volatile oil in Huai *Chrysanthemum morifolium* in Henan Province

LIU Wei¹, XING Zhi-xia², CHEN Zhi-hong¹, WANG Dong¹

(1. Center of Analysis and Measurement, Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;
2. Luohe Medicine College, Luohe 462002, China)

Abstract: **Objective** To establish a method of fingerprint analysis on Huai *Chrysanthemum morifolium* in Henan Province by GC. **Methods** The GC method was applied with a fiber column (30 m × 320 μm, 0.25 μm) coated with HP-5 (5%) - diphenylpolysiloxane. The detector was FID detector; The temperature of the detector was 180 °C; Nitrogen was used as the carrier gas with its flow rate 2.3 mL/min; The flow rate of atmosphere was 300 mL/min, and the flow rate of hydrogen was 30 mL/min in temperature programmer. The fingerprint of Huai *C. morifolium* in Henan Province was established. **Results** Twenty-seven common peaks were found in GC fingerprint of Huai *C. morifolium* in Henan Province and good similarities with correlation coefficients over 0.9 were found in the fingerprints compared between the fingerprint of Huai *C. morifolium* in Henan Province from different sources and standard fingerprint. **Conclusion** The method is accurate, simple, and can be used for the quality control of Huai *C. morifolium* in Henan Province.

Key words: Huai *Chrysanthemum morifolium* Romat. in Henan Province; volatile oil; GC; fingerprint

菊花为菊科植物菊花 *Chrysanthemum morifolium* Romat. 的干燥头状花序, 味甘、微苦, 微寒, 无毒, 入肝、肺经, 质轻气清, 甘凉益阴, 苦凉泄热^[1], 具有清肝明目、清热解毒、疏风降压等功效。菊花中含有多种挥发性成分和黄酮类、绿原酸、木犀草素、水

苏碱等非挥发性成分。菊花以河南古怀庆府, 今温县、武陟等地所产怀菊花品质优良, 自古形成道地药材。本实验采用气相色谱法建立了怀菊花挥发性成分的指纹图谱分析方法, 操作性强, 重复性好, 可为控制怀菊花的质量提供参考。

收稿日期: 2006-10-12

基金项目: 河南省教育厅科学研究项目 (2003350178)

作者简介: 刘 伟 (1955—), 男, 教授, 硕士生导师, 主要从事中药和药物分析的教学、科研工作。