

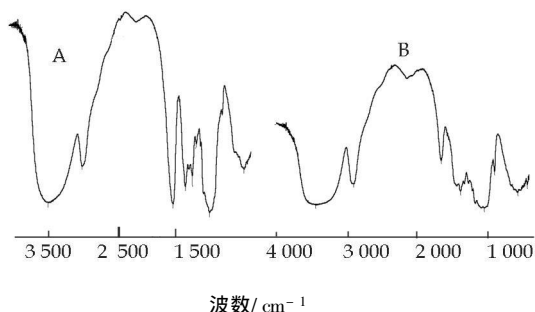


图8 改性粉体(A)和未改性粉体(B)的红外光谱图

Fig 8 FTIR spectrum of modified powder (A) and non modified powder (B)

OH键的叠加峰。此外原茯苓多糖中表征 β 吡喃糖环的 889 cm^{-1} 的吸收峰改性后消失。

2.7 改性粉的溶解性研究: 在50 mL蒸馏水中加入5 g被测样品, 25℃保温搅拌1 h, 悬浮液离心(3 000 r/min) 20 min, 上清液旋转蒸发浓缩、干燥后得固形物, 计算溶解度(上清液固形物质量/样品总质量 $\times 100\%$)。结果原粉和改性粉的溶解度分别为1.3%、88.5%。结果表明, 改性茯苓粉水溶性大大提高, 主要是接入了亲水性基团羧甲基的缘故, 水溶性的提高改善了粉体在中药制剂中的加工特性, 因而可以得出改性粉体加工特性提高的结论。

3 讨论

采用乙醇溶液为反应介质, 在单因素优化的工艺条件下制备的最终改性产物取代度在0.4左右, 这比其他采用异丙醇溶液媒介法改性的文献资料所报道的产物取代度略低, 究其原因可能是天然高分

子结构中结晶区和非结晶区共存, 结晶区的存在不利于羧甲基化反应进行, 因此必须破坏其结晶区, 才能使羧甲基在茯苓多糖中分布均匀, 从而获得高取代度的改性产物, 这一点上异丙醇溶液的溶胀效果可能优于乙醇溶液。取代度0.4的改性茯苓粉水溶性比原茯苓粉提高很大, 乙醇反应介质法得到的改性粉生物活性也大幅增加, 完全可以满足中医药的应用要求, 而异丙醇试剂价格高, 且存在安全毒性, 则限制了其在中医药中的应用。另外, 因茯苓中90%为茯苓多糖, 改性中省略了先碱提多糖的工艺, 直接采用茯苓菌核全粉改性, 减少了工艺流程和降低了生产成本。综上所述, 采用乙醇溶液媒介法改性是可行的。

通过单因素试验确定了直接采用茯苓全粉进行羧甲基化改性的条件: 反应介质为85%乙醇溶液, 反应温度50℃, 先碱化2 h后醚化6 h, 碱酸用量摩尔比控制在2.5:1~3:1时, 反应产物可得到最大取代度, 为扩大茯苓在中药制剂中的应用范围奠定了基础。

参考文献:

- [1] 王爱云, 陈群, 李成付, 等. 茯苓多糖修饰物抗肿瘤作用及其机制研究[J]. 中草药, 2009, 40(2): 268-271.
- [2] 丁琼, 张俐娜, 张志强. 茯苓菌丝体多糖的分离及结构析[J]. 高分子学报, 2000(2): 224.
- [3] 楼益明. 羧甲基纤维素生产及应用[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991.
- [4] 严衍祿. 现代仪器分析[M]. 第2版. 北京: 中国农业大学出版社, 1995.

山茱萸饮片的高效毛细管电泳指纹图谱研究

李俊松¹, 宋建平², 刘训红^{1*}, 张月婵¹, 蔡宝昌¹, 尹娣¹

(1 南京中医药大学 江苏省中药炮制重点实验室, 江苏 南京 210029; 2 盐城卫生职业技术学院, 江苏 盐城 224006)

摘要: 目的 建立山茱萸饮片高效毛细管电泳指纹图谱分析方法。方法 应用未涂渍标准熔融石英毛细管(64.5 cm $\times$ 75 μ m, 有效长度56 cm), 以50 mmol/L硼砂-40 mmol/L十二烷基硫酸钠-5%乙腈(pH 9.5)为缓冲液, 检测波长240 nm, 运行电压10 kV, 柱温18℃; 以马钱苷为参照物(IS), 测定指纹图谱, 并做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山茱萸饮片高效毛细管电泳指纹图谱, 且方法学考察符合规定的标准。结论 该法准确简便, 可作为控制山茱萸饮片内在质量的有效手段。

关键词: 山茱萸; 马钱苷; 高效毛细管电泳; 指纹图谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)12-1981-05

收稿日期: 2010-06-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30873438); 江苏省中药炮制重点实验室开放课题(ZYPZ007)

作者简介: 李俊松(1964—), 男, 江苏宜兴人, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事中药制剂、中药炮制研究。

Tel: (025)86798281 E-mail: lijunsong1964@163.com

* 通讯作者 刘训红 Tel: (025)86798281 E-mail: liuxunh1959@sohu.com

High performance capillary electrophoresis fingerprint of *Corni Fructus* pieces

LI Jur song¹, SONG Jiar ping², LIU Xuir hong¹, ZHANG Yue chan¹, CAI Bao chang¹, YIN Di¹

(1. Jiangsu Key Laboratory of Chinese Medicine Processing, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 2. Yancheng Health Vocational & Technical College, Yancheng 224006, China)

Abstract: Objective To establish a micellar electrokinetic chromatography method with high performance capillary electrophoresis (HPCE) fingerprint of *Corni Fructus* pieces **Methods** Separation was performed on a fused-silica capillary column (64.5 cm × 75 μm, effective length 56 cm) with 50 mmol/L borax solution-40 mmol/L SDS- 5% acetonitrile (pH 9.5) as HPCE buffer. The running voltage was 10 kV, the detection wavelength was 240 nm, and column temperature was 18 °C. Taking loganin as reference, the data were analysed by Fuzzy Cluster and Fingerprint Similarity Evaluation Software to compare the similarity of samples **Results** HPCE Fingerprint was established with nine common peaks. **Conclusion** The method is accurate, simple, and suitable to the quality control of *Corni Fructus*.

Key words: *Corni Fructus*; loganin; high performance capillary electrophoresis (HPCE); fingerprint

山茱萸为山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉,临床上多用酒制品。山萸肉长于敛汗固脱,用于自汗或大汗不止,阴虚盗汗,经酒蒸制后,补益肝肾作用增强,常用于眩晕耳鸣,阳痿遗精,遗尿,尿频,月经过多或崩漏,腰部酸痛等^[1]。山茱萸具有免疫调节、强心、抗休克、降血糖、抗氧化、抗衰老等作用,其主要活性成分为环烯醚萜类成分、鞣质类、有机酸类与多糖类等成分^[2-6]。本实验采用高效毛细管电泳法对采自陕西、安徽、河南、山西、浙江等不同厂家加工的制山茱萸饮片进行指纹图谱研究,为山茱萸饮片质量控制提供科学依据。

1 仪器与试药

Agilent G1600 AX 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; BUCHI Rotavapor R-3 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)。

莫诺苷对照品(江苏省药物研究所制备,质量分数 98%); 马钱苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 111640-200503)。其他化学试剂均为分析纯,实验用水为超纯水。

山茱萸饮片均经笔者鉴定,为山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉,其中 S1~ S3 由浙江中医药大学中药饮片厂按《中国药典》2005 年版加工制得, S4~ S5 由亳州市中药饮片厂按《中国药典》2005 年版加工制得,来源见表 1。

2 方法与结果

表 1 山茱萸样品来源

Table 1 Sources of *Corni Fructus* samples

样 品	编 号	来 源	批 号
酒制品	S1	河南	080625
	S2	浙江	080627
	S3	陕西	080626
	S4	安徽	081201
	S5	山西	081201
	S6	南京国医堂提供	—
	S7	南京国医堂提供	—
	S8	南京百草堂提供	—
	S9	南京百草堂提供	—
	S10	传统中医门诊部提供	—
生品	S11	陕西	Y080626
	S12	河南	Y080625

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: 240 nm; 压力进样: 5 000 Pa × 8 s; 分离电压: 10 kV; 毛细管温度: 18 °C; 运行缓冲液 50 mmol/L 硼砂-40 mmol/L SDS-5% 乙腈 (pH 9.5)。毛细管使用前以 0.1 mmol/L 氢氧化钠溶液、超纯水和运行缓冲液依次通过压力冲洗 5、10、5 min。

2.2 供试品溶液的制备: 取山茱萸粉末 1 g(过 50 目筛), 置 100 mL 具塞三角瓶中, 加 80% 甲醇 50 mL, 精密称定, 浸渍 1 h 后, 超声提取 60 min, 放冷, 再精密称定, 用 80% 甲醇补足其质量, 摇匀, 滤过。取滤液 30 mL, 水浴蒸干, 用 80% 甲醇溶解并定容至 5 mL, 摇匀, 以 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 作为供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验: 取同一供试品溶液(S1), 连续进样 5 次, 共有指纹峰的相对迁移时间 RSD < 0.95%, 共有峰相对峰面积 RSD < 2.10%。

2.3.2 重现性试验: 取同一样品(S1), 平行制备供试液 5 份, 在高效毛细管电泳仪上进样分析, 共有峰相对迁移时间 RSD< 1.80%, 共有峰相对峰面积 RSD< 2.40%。

2.3.3 稳定性试验: 取一新制备的供试品溶液(S1)于 0、2、4、8、12、24 h 测定其峰面积, 共有峰相对迁移时间 RSD< 3.15%, 共有峰相对峰面积 RSD< 2.99%。

2.4 指纹图谱的建立: 将供试品溶液(S1~ S10) 分别放入自动进样的样品管中, 按选定的测试条件进行检测。在上述实验条件下, 测定所有供试品 HPCE 色谱图。根据不同批次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(图 1)。

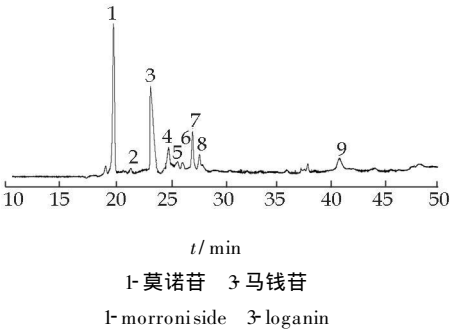


图 1 山茱萸饮片的 HPCE 指纹图谱

Fig 1 HPCE Fingerprint spectra of Corni Fructus pieces

2.5 指纹图谱分析

2.5.1 共有指纹峰标定: 经对供试品 HPCE 色谱图的分析、比较, 共标定 9 个共有峰, 作为指纹图谱的特征峰, 1、3 号峰与对照品对照分别鉴定为莫诺昔、马钱昔。以 3 号峰马钱昔为参照峰, 分别求出各共有峰与之相比的 α 值(调整迁移时间之比)和各共有峰的相对峰面积(峰面积之比), 结果见表 2。

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

Table 2 Relative migration time (α) and peak area of sharing peak of processed products of Corni Fructus in HPCE fingerprint

峰号	α	各地山茱萸的相对峰面积									
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.87	1.32	1.20	0.97	0.82	1.36	1.80	1.87	0.76	0.80	1.62
2	0.93	0.07	0.09	0.37	0.17	0.24	0.25	0.23	0.16	0.17	0.29
3	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
4	1.06	0.21	0.61	0.74	0.26	0.38	0.54	0.48	0.37	0.36	0.33
5	1.10	0.39	0.27	0.26	0.50	0.19	0.22	0.18	0.26	0.20	0.25
6	1.19	0.16	0.31	0.22	0.41	0.22	0.20	0.22	0.16	0.14	0.22
7	1.24	0.34	0.43	0.47	0.44	0.40	0.33	0.40	0.29	0.19	0.35
8	1.28	0.18	0.18	0.28	0.28	0.28	0.23	0.40	0.17	0.18	0.20
9	1.84	0.40	0.41	0.44	0.12	1.21	0.26	0.26	0.30	0.22	0.18

2.5.2 指纹图谱的聚类分析: 选择山茱萸 HPCE 指纹图谱中 9 个比较明显的共有峰, 根据表 1 中的数据, 用 SPSS 软件中 hierarchical cluster analysis 对 10 个山茱萸样品进行聚类分析, 所用聚类方法为 average linkage (between groups), 距离公式为 square Euclidean distance, 得不同样品山茱萸的聚类分析图(图 2)。

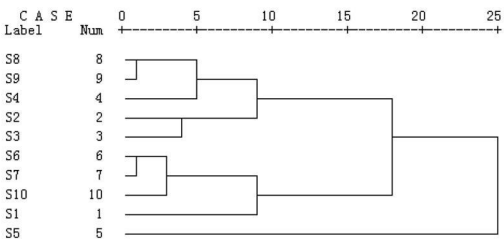


图 2 山茱萸饮片 HPCE 指纹图谱的聚类分析图
Fig 2 Hierarchical cluster analysis of HPCE fingerprints of Corni Fructus

结果显示, 当距离标尺在 1 时, 样品 S8、S9、S6、S7 分别归为一类, 当距离标尺在 3 时, 样品 S6、S7 与 S10 归为一类, 当距离标尺在 4 时, 样品 S2、S3 归为一类, 当距离标尺在 5 时, 样品 S8、S9 与 S4 归为一类, 当距离标尺在 9 时, 样品 S8、S9、S4 与 S2、S3, 样品 S6、S7、S10 与 S1 各归为一类, 当距离标尺在 18 时, S8、S9、S4、S2、S3 与 S6、S7、S10、S1 归为一类, 当距离标尺在 25 时, 所有样品才归为一类。

2.5.3 色谱峰的重叠率: 以山茱萸标准谱图(R) 为基准, 计算样品色谱峰的重叠率[样品色谱峰的重叠率= 待测样品与标准样品共有的峰数× 2/(待测样品峰数+ 标准样品峰数) × 100%], 1~ 10 号样品色谱峰的重叠率依次为 81.82%、75%、78.26%、72%、78.26%、81.82%、81.82%、75%、78.26%、75%。

2.5.4 相似度评价: 将测试数据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(图 3), 进行色谱峰差异性评价和整体相似性评价。S1~ S10 相似度值分别为 0.922、0.873、0.799、0.646、0.932、0.807、0.817、0.911、0.912、0.918。

2.5.5 山茱萸炮制前后 HPCE 谱比较: 对河南产山茱萸酒制品(S1) 与相对应的生品(S12) 的 HPCE 谱进行比较, 发现山茱萸炮制前后均具有上述 9 个共有峰, 但共有峰的相对峰面积具有一定差异, 山茱萸(河南产) 酒制品与生品的相似度为 0.874(图 4)。结果表明, 不同产地加工或商品山茱萸酒制品的

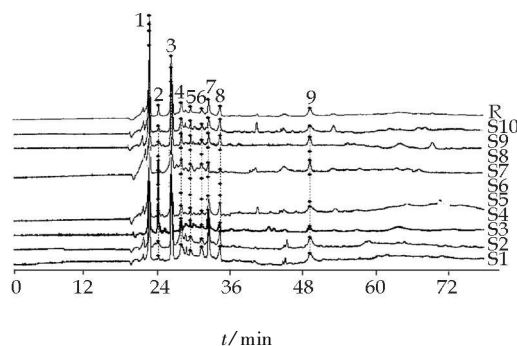


图3 山茱萸饮片 HPCE 指纹图谱共有模式

Fig 3 HPCE Fingerprint common pattern of *Corni Fructus*

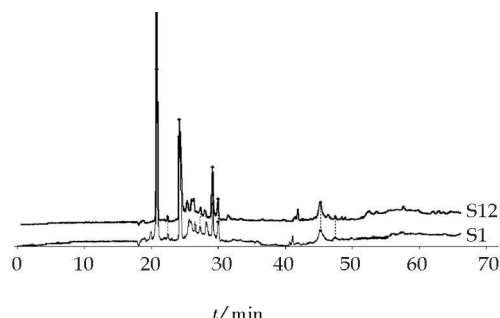


图4 山茱萸炮制前后 HPCE 谱比较

Fig 4 Comparison of HPCE fingerprints between crude product and processed product

HPCE 指纹谱具有一定差异, 河南、山西、南京百草堂、传统中医门诊部山茱萸饮片指纹谱相似度较好 (> 0.911), 其他来源的山茱萸饮片除陕西、安徽外, 相似度均在 0.8 以上; 山茱萸炮制前后共有峰相同, 但相对峰面积有异, 山茱萸(河南产)酒制品与生品的相似度为 0.874, 其炮制过程中共有峰相对峰面积变化规律有待进一步探讨。

3 讨论

3.1 电泳条件优化: 毛细管电泳的分离选择性的分离效率主要取决于缓冲液的类型、酸度及浓度, 缓冲液添加剂、电压、温度等也有一定影响。实验对山茱萸饮片中獐牙菜苷、马钱苷进行了分离研究, 重点考察了缓冲溶液浓度、表面活性剂浓度、有机溶剂、缓冲溶液 pH、运行电压、运行温度等实验条件对分离的影响。

3.1.1 缓冲液体系选择: 本实验考察了硼砂、乙酸铵、硼砂-SDS 及硼砂-SDS-乙腈 4 个体系的缓冲溶液, 发现选用硼砂缓冲液或乙酸铵缓冲液时, 獐牙菜苷和马钱苷分离度很差, 基本不能分开, 但当在硼砂缓冲液中加入 SDS, 分离有所改善, 但獐牙菜苷和马钱苷的分离度达不到 $R_f \geq 1.5$ 的要求, 故需要加入有机溶剂以增加样品溶液中非水物质的溶解度, 同

时也会影响胶束相和流动相的性质, 进而改变溶质在水相和胶束相的分配比例, 有利于提高分离效率, 当加入乙腈后分离度变好, $R_f \geq 1.5$, 故选择硼砂-SDS-乙腈缓冲体系。

3.1.2 硼砂浓度的影响: 缓冲液浓度是影响被测物迁移时间和分离度的一个重要因素, 这是因为缓冲液的浓度决定了溶液的黏度系数、溶质的扩散系数以及毛细管内壁的 ξ 电位。实验考察了 8~50 mmol/L 硼砂缓冲溶液, 结果发现迁移时间和分离度随着缓冲液浓度的升高而增大; 当缓冲液浓度到 50 mmol/L 时对照品的峰形和分离度最佳。

3.1.3 SDS 浓度的影响: 考察了 10、15、20、25、30、35、40 mmol/L 7 个 SDS 浓度下的分离情况, 当 SDS 浓度为 40 mmol/L 时, 山茱萸中成分的分离情况较理想, 且被测物的峰形及迁移时间较好。

3.1.4 乙腈浓度的影响: 在胶束电泳 (MECC) 中, 乙腈作为有机添加剂, 有利于提高憎水溶质在水相中的溶解性, 并且会影响胶束相和流动相的性质, 进而改变了溶质在水相和胶束相的分配比例, 有利于提高分离效率。实验考察了体积分数 5%、10%、15%、20% 乙腈对山茱萸中成分分离的影响, 发现乙腈体积分数在 5% 时, 峰形较好, 且各组分的分离也达到 $R_f > 1.5$ 。

3.1.5 缓冲溶液 pH 值的影响: 缓冲液的 pH 直接影响毛细管表面的 ξ 电势, 从而影响电渗流的方向和速度, 同时溶液的 pH 值也决定样品中各组分分子的表面电荷数, 从而影响组分的迁移时间和分离度, 故本实验对缓冲液的 pH 值进行了优化选择以获得较好的分离条件。考察了 pH 8.8~9.5 的缓冲液, 发现随着 pH 值的增大, 各组分的分离度增加而迁移时间延长, 峰高亦增高, 当 pH 值为 9.5 时被测物可达到基线基本分离。

3.1.6 运行电压的影响: 实验考察了分离电压在 10~22 kV 的条件下对各组分迁移时间的影响, 结果表明分离电压增高, 组分迁移时间缩短, 分离效果较差, 当分离电压为 10 kV 时, 山茱萸中成分分离效果较好。

3.1.7 运行温度的影响: 毛细管电泳中, 运行温度也影响电场的强度, 从而影响电渗流速度和带电物质的迁移速率, 影响分析物的迁移时间。实验考察了运行温度 15~30 °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, 当运行温为 18 °C 时样品的各组分分离效果好, 且分析时间缩短。

3.1.8 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, 记录并比较不同波长的色谱图, 根据分析物的紫外吸收特征, 发现在 240 nm 波长处, 被测物质均有较好的吸收, 故选择 240 nm 为检测波长。

3.2 共有峰面积与总峰面积比值的计算: 对各样品的峰面积进行统计, 计算各样品指纹图谱中的 9 个共有峰的总面积各占总峰面积的比值。结果显示所有样品的共有峰总面积占总峰面积的比值均大于 90%, 满足指纹图谱的技术要求。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005
- [2] 贾德贤, 闫兴丽, 张建军, 等. 山茱萸化学及药理研究进展[J]. 中医药信息杂志, 2002, 9(7): 83-84
- [3] 苗明三, 杨云. 山茱萸多糖抗氧化作用研究[J]. 河南中医, 2002, 22(2): 12-13
- [4] 李建民, 周勇, 张丽, 等. 山茱萸总苷对人脐静脉内皮细胞表达 α 4 β 7 整合素影响[J]. 上海免疫学杂志, 2001, 21(5): 298-300
- [5] 周京华, 李春生, 李电东. 山茱萸有效化学成分的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2001, 10(11): 808-811
- [6] 杨晋, 陈随清, 冀春茹, 等. 山茱萸化学成分的分离鉴定[J]. 中草药, 2005, 36(12): 1380-1382

制备高效液相色谱从竹根中制备苜蓿素的研究

张锐¹, 刘建群¹, 刘丽艳², 徐彭^{1*}

(1 江西医学院, 江西 南昌 330004; 2 江西省肿瘤医院, 江西 南昌 330000)

摘要:目的 研究从竹根中制备苜蓿素对照品的方法。方法 结合硅胶柱色谱、制备 HPLC 法对竹根醋酸乙酯部位进行分离纯化, 通过熔点及 UV、IR 波谱学方法对其分离产物进行结构鉴定。结果 所得苜蓿素用归一化法定量, 质量分数大于 98%。结论 本法简便, 制备成本低, 所得苜蓿素可作为中药定性、定量分析使用的对照品。

关键词: 竹根; 苜蓿素; 对照品; 制备

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)12-1985-03

Preparation of tricin from *Bambusa textilis* by preparative HPLC

ZHANG Rui¹, LIU Jian-qun¹, LIU Li-yan², XUE Peng¹

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. Jiangxi Tumor Hospital, Nanchang 330000, China)

Abstract: Objective To establish a separation method of tricin reference substance from *Bambusa textilis*. **Methods** After extracted with ethyl acetate, the extract of *B. textilis* was isolated and purified by silica gel column chromatography and preparative HPLC. Tricins were identified by melting point, UV, and IR spectroscopy. **Results** The content of tricin was over 98% by normalization method of HPLC. **Conclusion** The developed method is simple with lower cost, by which tricin can be used as reference substances for the qualitative and quantitative analyses of Chinese herbal medicine.

Key words: *Bambusa textilis* Mc Clure; tricin; reference substance; preparation

苜蓿素属黄酮类化合物, 广泛存在于禾本科植物中, 其中在竹根中的量较高。本研究所用制备苜蓿素的原料为禾本科竹亚科箬竹属植物青皮竹 *Bambusa textilis* Mc Clure 的干燥根。本研究前期的药理实验表明, 青皮竹的竹根具有显著的抗过敏作用, 并从抗过敏有效部位中分离鉴定了 15 个化合物^[1-2], 通过致敏豚鼠的离体肠平滑肌过敏性收缩实

验, 发现苜蓿素具有显著的抗过敏活性。此外苜蓿素还具有显著的抗癌活性^[3]。目前市场上无苜蓿素对照品出售, 限制了对苜蓿素进一步的开发与研究。本实验结合硅胶柱色谱分离和制备 HPLC 法对竹根醋酸乙酯部位进行分离纯化, 制备苜蓿素对照品, 对进一步揭示竹根药效的物质基础、控制药材质量和开发新的天然药物具有十分重要的意义。

收稿日期: 2010-03-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30660220)

作者简介: 张锐(1976—), 男, 江西进贤人, 副研究员, 硕士, 研究方向为中药化学成分及质量评价。

Tel: (0791) 7118657 E-mail: work037@sohu.com

* 通讯作者 徐彭 Tel: (0791) 6811604 E-mail: xp0420@163.com