

骨痹颗粒中桑寄生 HPLC-PDA 指纹图谱建立

吴倩莲¹, 刘佳佳¹, 潘林梅^{1,2,3*}, 朱华旭^{1,2,3*}

(1. 南京中医药大学药学院, 江苏南京 210023; 2. 南京中医药大学江苏省植物药深加工工程研究中心, 江苏南京 210023; 3. 南京中医药大学江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏南京 210023)

摘要: 目的 建立骨痹颗粒中桑寄生 HPLC-PDA 指纹图谱。方法 样品 50% 甲醇提取物的分析采用 Agilent ZORB X SB-C₁₈ 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 乙腈-0.2% 磷酸水溶液, 梯度洗脱; 检测波长 225 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃。结果 11 批样品指纹图谱中有 2 个共有峰, 相似度 0.366~0.871。结论 该方法稳定、准确, 重复性好, 可用于桑寄生药材的质量控制。

关键词: 桑寄生; 指纹图谱; HPLC

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2021)02-0528-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.02.047

骨痹颗粒具有补肝肾、通经络的功效, 临床上用于治疗骨关节炎^[1-2]。骨痹颗粒^[3]原方由桑寄生、川续断、骨碎补、鸡血藤等 8 味中药组成。总黄酮为骨痹颗粒中的药效成分之一, 课题组在研究膜技术精制骨痹颗粒的过程中将其保留率作为指标成分之一^[4-5], 并在研究骨痹颗粒质量标准中, 对桑寄生黄酮类成分进行薄层鉴别^[3]。为了更好地控制制剂质量, 本研究针对骨痹颗粒原方中君药桑寄生展开。

桑寄生为桑寄生科植物桑寄生 *Taxillus chinensis* (DC.) Danser 的干燥带叶茎枝, 具有祛风湿、强筋骨的功效, 主要化学成分为黄酮类, 2020 年版《中国药典》对桑寄生质量控制仅要求薄层检出槲皮素且不得检出强心苷^[6], 尚无指标性成分含量测定, 无法客观而全面地反映其内在质量。桑寄生因寄主^[7-9]、产地^[10-12]、用药部位^[13]等不同, 其化学成分的种类及含量具有一定的差异, 从根本上影响饮片的质量, 而饮片作为制剂原料, 又将进一步影响制剂质量。

本研究收集不同产地、寄主、生长状态及加工方式的桑寄生药材, 建立指纹图谱并测定槲皮素的含量, 初步探究影响指纹图谱的药材信息与色谱峰因素, 以期对桑寄生及骨痹颗粒质量提升研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器 Waters e2695 高效液相色谱系统 (含四元泵溶剂系统、在线脱气机和自动进样器、Waters 2998 型紫外检测器 (PDA) (美国 Waters 公司); BSA224S-CW 电子天平

(赛多利斯科学仪器北京有限公司); HC-C6002 型电子天平 (慈溪市华徐衡器实业有限公司); EPED-E2-20TS 实验室级超纯水器 (南京易普易达科技发展有限公司); KH-250B 型超声波清洗器 (昆山禾创超声仪器有限公司)。

1.2 试剂与药物 乙腈、甲醇 (德国默克公司); 水为超纯水; 磷酸 (分析纯, 西陇科技股份有限公司)。原儿茶酸 (南京良纬生物科技有限公司, 批号 lw18012207); (+)-儿茶素 (上海源叶生物科技有限公司, 批号 PO2A9F57645); 槲皮苷 (批号 111538-201606)、芦丁 (批号 100080-201810)、槲皮素 (批号 100081-201610), 均购于中国食品药品检定研究院; 篇蓄苷 (金益柏生物科技有限公司, 批号 16060806); 桑寄生药材, 信息见表 1。

表 1 桑寄生药材信息

编号	批号	来源	备注
S1	GX07701	广西	野生, 杂寄生
S2	GX07702	广西	野生, 杂寄生
S3	GX07703	广西	野生, 杂寄生
S4	GX07704	广西	野生, 杂寄生
S5	GX07705	广西	野生, 鲜货长条
S6	GX07711	广西	
S7	GX07712	广西	
S8	GX07713	广西	
S9	GX07714	广西	
S10	HN08981	海南	野生, 晒干
S11	HA08982	海南	野生, 晒干

收稿日期: 2019-07-18

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81673610, 81773919); 国家“十二五”重大新药创新专项 (2011ZX09401-308-037); 江苏省科技厅重点研发计划—社会发展面上项目 (BE2016754); 江苏省六大人才高峰项目 (2014-YY-014); 江苏省高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD)

作者简介: 吴倩莲 (1996—), 女, 硕士生, 研究方向为中药制药分离技术。Tel: 15105177508, E-mail: 15105177508@163.com

* 通信作者: 潘林梅 (1971—), 女, 副教授, 从事中药制药分离过程研究。Tel: (025) 85811063, E-mail: linmeip@126.com

朱华旭 (1972—), 女, 研究员, 从事基于化学结构的中药制药分离过程研究。Tel: (025) 85811509, E-mail: Huaxu72@126.com

2 方法

2.1 桑寄生指纹图谱建立

2.1.1 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相乙腈 (A) -0.2% 磷酸水溶液 (B), 洗脱梯度 (0~6 min, 2%~8% A; 6~10 min, 8%~10% A; 10~15 min, 10%~12% A; 15~25 min, 12%~16% A; 25~45 min, 16%~30% A; 45~50 min, 30%~36% A; 50~53 min, 36% A; 53~55 min, 36%~43% A; 55~60 min, 43%~56% A; 60~62 min, 56%~60% A; 62~65 min, 60%~2% A; 65~70 min, 2% A); 检测波长 225 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL。理论塔板数按槲皮苷峰计算应不低于 10 000。

2.1.2 对照品溶液制备 分别取原儿茶酸、(+)-儿茶素、篇蓄苷、槲皮苷、槲皮素对照品适量, 精密称定, 各加甲醇制成每 1 mL 含 0.10 mg 的溶液, 即得。

2.1.3 供试品溶液制备 精密称定 1.0 g 药材粗粉, 加入 50% 甲醇-水溶液 30 mL, 超声 (200 W, 40 kHz) 提取 30 min, 离心, 取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

2.1.4 方法学考察

2.1.4.1 精密密度试验 取 S9 供试品溶液, 在“2.1.1”项条件下连续进样 6 次, 每次 10 μL, 记录色谱图。以槲皮苷色谱峰为参照, 测得各共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 0.5%, 相对峰面积 RSD 均小于 3.0%, 表明仪器精密密度良好。

2.1.4.2 稳定性试验 取 S9 供试品溶液, 每隔 3 h 进样一次, 共测定 18 h, 分别进样 10 μL, 记录色谱图, 以槲皮苷色谱峰为参照, 测得各共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 2.5%, 相对峰面积 RSD 均小于 3.0%, 表明供试品溶液在 18 h 内稳定性良好。

2.1.4.3 重复性试验 取 S9 样品, 按“2.1.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 分别在“2.1.1”项条件下进样, 记录色谱图, 以槲皮苷色谱峰为参照, 测得各共有峰相对保留时间 RSD 均小于 1.5%, 相对峰面积 RSD 均小于 4.5%, 表明该方法重复性良好。

2.1.5 指纹图谱建立 取 11 批样品, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 并在“2.1.1”项条件下进样, 收集色谱图。图谱导入国家药典委员会推荐的中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版, 设 S9 样品图谱作为参照图谱, 采用平均数法, 时间窗宽度为 0.1, 经过多点校正后自动匹配, 对 11 批不同样品的指纹图谱及与生成的对照指纹图谱进行相似度分析。

2.2 槲皮苷含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适应性试验 同“2.1.1”项下方法; 检测波长 254 nm。

2.2.2 供试品溶液制备 同“2.1.3”项下方法。

2.2.3 方法学考察

2.2.3.1 线性关系考察 对照品母液制备, 取槲皮苷对照品约 10 mg, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 制备成 1 mL 含 1 mg 槲皮苷对照品溶液。精密吸取对照品

母液 5.0 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 并逐级对半稀释, 在“2.1.1”项条件下进样。以进样量为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归, 得槲皮苷回归方程 $Y = 25\ 493\ 401X + 181\ 920$ ($r = 0.999\ 9$), 在 0.312 5 ~ 10.000 0 μg 范围内线性关系良好。

2.2.3.2 精密密度试验 取 S9 供试品溶液与槲皮苷对照品, 在“2.1.1”项条件下连续进样 6 次, 每次 10 μL, 记录色谱图, 测得槲皮苷峰面积 RSD 分别为 0.47%、0.92%, 表明仪器精密密度良好。

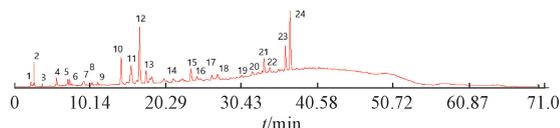
2.2.3.3 稳定性试验 取 S9 供试品溶液与槲皮苷对照品, 在“2.1.1”项条件下, 每隔 3 h 进样 1 次, 共测定 18 h, 分别进样 10 μL, 记录色谱图, 测得槲皮苷峰面积 RSD 分别为 0.33%、0.54%, 表明供试品及对照品溶液中槲皮苷在 18 h 内稳定性良好。

2.2.3.4 重复性试验 按“2.1.3”项下方法平行制备 6 份 S9 供试品溶液, 在“2.1.1”项条件下进样 10 μL 分析, 记录色谱图, 测得槲皮苷峰面积 RSD 为 0.54%, 表明该方法重复性良好。

2.2.3.5 加样回收率试验 平行精密称取 6 份 S9 样品, 加入一定量槲皮苷对照品溶液按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1.1”项条件下进样 10 μL 分析, 记录色谱图, 测得槲皮苷的回收率分别为 100.18%、99.64%、100.32%、102.12%、102.64%、102.84%, 平均回收率 101.29%。

3 结果

3.1 特征图谱建立 设 S9 样品图谱作为参照图谱, 采用平均数法, 时间窗宽度为 0.1, 生成对照指纹图谱, 见图 1, 在桑寄生药材特征图谱中建立 24 个特征峰。与槲皮苷参照峰相应的峰为 S 峰, 计算各特征峰与 S 峰的相对保留时间, 其相对保留时间应在规定值的 ±5% 之内。规定值为 0.16 (峰 4)、0.30 (峰 9)、0.39 (峰 10)、0.43 (峰 11)、0.46 (峰 12)、0.48 (峰 13)、0.64 (峰 15)、0.66 (峰 16)、0.72 (峰 17)、0.74 (峰 18)、0.86 (峰 20)、0.90 (峰 21)、0.93 (峰 22)、0.98 (峰 23)。采用对照品比对法结合紫外吸收光谱可指认峰 9 为原儿茶酸, 峰 12 为 (+)-儿茶素, 峰 20 为芦丁, 峰 23 为篇蓄苷, 峰 24 为槲皮苷。



9. 原儿茶酸 12. (+)-儿茶素 20. 芦丁 23. 篇蓄苷 24. 槲皮苷

图 1 桑寄生特征图谱

3.2 相似度评价 经多点校正后对 11 批样品指纹图谱进行匹配, 仅得到 2 个共有峰, 见图 2, 相似度见表 2。

11 批药材相似度为 0.366~0.871, 均小于 0.9, 表明药材差异大。11 批样品指纹图谱中, 仅找到 2 个共有峰,

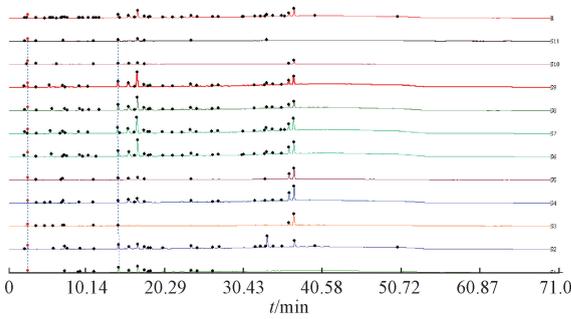


图2 11批样品HPLC-PDA指纹图谱

表2 桑寄生药材指纹图谱相似度与含量

编号	批号	相似度	含量/ $(\bar{x} \pm s, \%)$
S1	GX07701	0.696	0.007 8±0.000 4
S2	GX07702	0.366	0.234 5±0.016 0
S3	GX07703	0.497	0.433 8±0.038 1
S4	GX07704	0.739	0.551 4±0.042 7
S5	GX07705	0.651	0.449 2±0.022 8
S6	GX07711	0.870	0.457 3±0.032 9
S7	GX07712	0.871	0.448 0±0.047 9
S8	GX07713	0.854	0.209 4±0.011 2
S9	GX07714	0.861	0.266 1±0.091 9
S10	HN08981	0.639	0.132 9±0.004 8
S11	HN08982	0.637	0.008 8±0.001 3

共有峰数目少,主要由个别样品引起,S3、S10在0~25 min部分色谱峰较少,S1、3、11在25~40 min部分色谱峰较少。

3.3 槲皮苷含量 将11批样品按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,在“2.1.1”项条件下(检测波长254 nm)进样分析,平行3次,计算各批样品中槲皮苷的平均含量及RSD。表2显示,槲皮苷含量最高达0.5514%,最低0.0078%,具有较大差异。采用SPSS 24.0软件,经Explore过程检验其平均含量正态分布,设置信区间为95%,依据ShapiroWilk法检验,结果为 $P=0.237>0.05$,具有统计学意义,表明各批槲皮苷含量呈正态分布。

4 讨论与分析

4.1 检测波长 采用二极管阵列在200~400 nm范围内进行紫外全波长扫描,得到3D峰形-时间图谱,从整体上看,225 nm波长下整体色谱峰吸收强烈,色谱信息丰富,桑寄生中主要为黄酮类成分,360 nm下槲皮苷成分色谱峰面积稳定。与水以及甲醇相比,桑寄生中成分用50%甲醇-水提取的效果更佳,基线噪音小,对色谱峰干扰小。

4.2 指标成分选择 桑寄生中多含黄酮类、生物碱、生物碱、氨基酸等成分,曾有报道含有儿茶类成分,寄主不同,糖苷类含量具有一定差异。本研究采用PDA全波长扫描检测全程色谱峰紫外吸收光谱,60%以上色谱峰表现出黄酮类紫外吸收光谱特点。黄酮类成分主要为槲皮苷、蒽醌苷等,是桑寄生的主要活性成分,有研究表明槲皮苷是桑寄生归肝、肾经与祛风湿功效的重要物质基础^[14-18],故将槲皮苷作为含量检测对象。另外,文献曾有报道桑寄生检测

出槲皮素^[11],曹越等^[19]将槲皮素作为桑寄生指纹图谱的特征性成分之一,但本研究中仅S11检测出少量槲皮素,大部分黄酮类以槲皮苷形式存在,与苏本伟等^[18]报道一致。

4.3 聚类分析 将特征峰响应值导入SPSS 24.0,采用系统聚类法,方法组间联接,平均欧式距离为测量区间。聚类树状图分为2个主支,S6~S9为非野生品种,聚在一起,其余为另外一支,均为非野生品种。下支S3~S5相聚,S1~S2、S10~S11相聚,其中S5为桑树寄主,而S3~S4非桑树寄主,但S3与S5更为相似,表明寄主差异对桑寄生特征峰面貌影响较低;另外,S10~S11产于海南,与产于广西的S1~S2区分开,表明一定程度上可区分产地。初步推测影响桑寄生特征峰整体面貌的因素①生长状态(野生/非野生);②寄主(桑树寄主/杂寄生);③产地,且其影响程度可能为生长状态>产地因素>寄主因素。见图3。

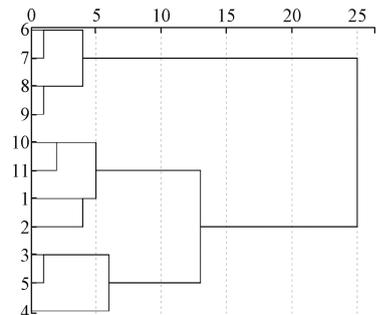


图3 聚类分析图

4.4 主成分分析 为研究影响桑寄生药材特征峰面貌的主要成分,将响应值数据采用SPSS 24.0进行标准化处理。总方差解释结果见表3。

表3 总方差分析

成分	总计	初始特征值方差百分比/%	累积/%
1	15.865	66.106	66.106
2	2.759	11.496	77.602
3	1.676	6.985	84.587
4	1.403	5.847	90.434

前4个主成分特征值均大于1,对总方差的贡献率达90.434%,即累积对桑寄生特征峰整体面貌的贡献为90.434%,因此选择前4个主成分进行分析,将得到的成分矩阵进行标准化处理,经过方差最大正交旋转后,得到旋转后因子负荷矩阵。

将矩阵导入SIMCA 14,绘制椭圆得分图,见图4。以色谱峰为研究对象,以经过椭圆中心(0,0)点的两垂直坐标轴为基准,综合考察色谱峰对应点与两坐标轴的距离,垂直距离越远,代表其对区分不同批样品的贡献越大,即对桑寄生特征峰整体面貌的影响作用越大。结果见图4,表明9、6、24、23号峰是影响桑寄生整体面貌的特征峰,其中原儿茶酸、槲皮苷及蒽醌苷的含量对表现桑寄生整体面貌具有意义。

表 4 旋转后因子负荷矩阵

峰号	成分			
	1	2	3	5
1	0.648	0.578	0.252	0.355
2	0.666	0.413	0.091	0.435
3	-0.121	0.888	0.155	0.065
4	0.453	0.623	0.326	-0.156
5	0.051	0.067	0.788	0.409
6	0.861	-0.040	-0.224	-0.151
7	0.811	0.499	0.120	0.110
8	0.668	0.639	0.261	0.100
9	-0.215	-0.142	0.120	-0.863
10	0.925	0.208	0.091	0.157
11	0.721	0.324	0.540	0.213
12	0.761	0.494	0.281	0.197
13	0.938	0.239	0.112	0.147
14	0.763	0.591	0.152	0.032
15	0.896	0.147	0.319	0.271
16	0.946	0.082	-0.010	0.141
17	0.722	0.497	0.214	0.284
18	0.774	0.309	0.414	0.298
19	0.670	0.514	0.450	0.241
20	0.781	0.034	0.500	0.237
21	0.462	0.761	0.127	0.337
22	0.696	0.086	0.378	0.548
23	0.165	0.273	0.898	-0.084
24	0.058	0.203	0.877	-0.295

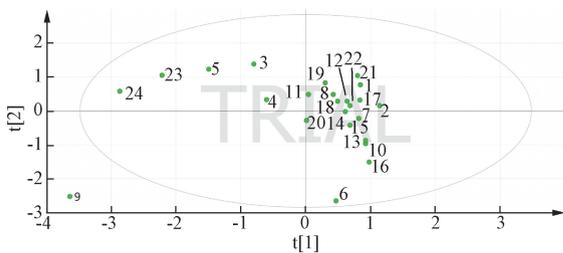


图 4 22 批样品主成分分析图

5 结论与展望

本研究建立了桑寄生药材指纹图谱与含量测定方法，对主要色谱峰进行指认，通过聚类分析与主成分分析研究影响桑寄生特征峰面貌的因素（生长状态、产地、寄主）及主要色谱峰（原儿茶酸、槲皮苷、蒽醌苷），以期为研究桑寄生质量及骨痹颗粒成方制剂质量稳定提供基础。精制后的骨痹方药液能改善炎症并促软骨细胞增殖^[19]，桑寄生化学成分繁多复杂，药效成分众多，药理作用广泛，要建立全面的科学的药材质量评价体系，针对桑寄生单味药以及有效成分群进行细胞水平生物药效研究，以期为进一步提高骨痹颗粒质量与临床合理用药提供参考。

参考文献:

[1] 周正新,李文华,朱 磊,等. 中药骨痹通消颗粒干预激素性股骨头坏死模型兔的细胞凋亡[J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(20): 3190-3194.

[2] 周玲玲,刘 慧,周 聪,等. 骨痹颗粒防治兔骨关节炎的作用及机制[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(20): 4975-4977.

[3] 薛世姣,谈 聪,马世平,等. 骨痹颗粒质量标准研究[J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25(5): 614-618.

[4] 杨 磊,宗 杰,朱华旭,等. 不同膜材料精制中药复方骨痹颗粒的比较[J]. 膜科学与技术, 2016, 36(5): 116-123.

[5] 宗 杰. 陶瓷膜分离、水提醇沉及大孔树脂吸附三种精制方法对骨痹颗粒主要药效学的影响及其机理初探[C] // 海峡两岸膜法水处理院士高峰论坛暨第六届全国医药行业膜分离技术应用研讨会论文集. 厦门: 海峡两岸膜法水处理院士高峰论坛暨第六届全国医药行业膜分离技术应用研讨会, 2015.

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.

[7] 张 慧,黄蜚颖,刘人源,等. 不同寄主桑寄生药材对原发性高血压大鼠降压作用的影响[J]. 中成药, 2018, 40(2): 249-254.

[8] 贾年飞,谭雯雯,李 兵,等. 紫外分光光度法测定不同寄主桑寄生总黄酮的含量[J]. 广西中医药, 2013, 36(5): 79-80.

[9] 苏本伟,张协君,朱开昕,等. 寄主树种和采收期对广西桑寄生槲皮苷含量的影响[J]. 中成药, 2014, 36(9): 1925-1929.

[10] 王誉霖,周汉华,张文龙,等. 贵阳市不同生长地点桑寄生挥发性成分的研究[J]. 贵阳中医学院学报, 2015, 37(4): 15-19.

[11] 苏本伟,王 辉,李永华,等. 基于时空变化的桑寄生中广寄生苷、槲皮苷、槲皮素含量分析[J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(19): 1922-1926.

[12] 银倍侨,黄蜚颖,刘人源,等. 广西不同产地桑寄生药材红外光谱学研究[J]. 亚太传统医药, 2018, 14(6): 38-41.

[13] 苏本伟,张协君,朱开昕,等. RP-HPLC法测定桑寄生中槲皮苷和槲皮素含量的提取方法比较[J]. 广西中医药, 2012, 35(4): 53-55.

[14] 赵华伟,汪 晶,崔 瑛,等. 基于“病证-效应-生物样本分析”方法的桑寄生补肝肾强筋骨功效物质及归经研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2016, 18(4): 626-631.

[15] 管 俊. 桑寄生总黄酮祛风湿功效物质及归经研究[D]. 郑州: 河南中医药大学, 2017.

[16] 李玲玲,管 俊,冯 静,等. 基于“病证-效应-生物样本分析”方法的桑寄生总黄酮祛风湿功效物质及归经研究[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(5): 2203-2208.

[17] 朱开昕,苏本伟,赵明惠,等. 中药桑寄生强筋骨的研究进展[J]. 中国处方药, 2018, 16(7): 25-26.

[18] 苏本伟,王 辉,李永华,等. 基于寄主差异的桑寄生中广寄生苷、槲皮苷、槲皮素含量分析[J]. 国际药学研究杂志, 2017, 44(7): 738-742.

[19] 曹 越,彭 维,苏薇薇,等. 广东从化桑寄生药材的HPLC指纹图谱研究[J]. 中药材, 2010, 33(4): 532-535.