

安络小皮伞提取物特征图谱研究

周婷婷^{1,2}, 姜翔之³, 王颖², 罗浩铭², 陈英红²

(¹延边大学, 吉林延吉 133002)

(²吉林省中医药科学院)

(³吉林大学中日联谊医院)

安络小皮伞 (*Marasmius androsaceus*) 俗称鬼毛针, 是一种真菌, 属担子菌纲伞菌目白蘑科小皮伞属, 其化学成分有甘露醇、胆甾醇醋酸酯、氨基酸、对羟基肉桂酸、麦角甾醇、及糖类和蛋白类成分等。以安络小皮伞为主要原料制成的中成药痛宁、安络痛, 很久以来都是被广大患者所认可的镇痛疗效确切, 效果持久的药品^[1~3]。安络小皮伞提取物中糖蛋白为其主要活性成分, 其中多糖含量占 66.1%, 蛋白质含量占 35.4%。本文根据特征图谱的技术要求, 采用 HPLC 法^[4,5]建立安络小皮伞提取物中多糖特征图谱, 可作为其内在质量控制标准。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-2010 高效液相色谱仪 (日本岛津), SPD-M10AVP 检测器, AB204-N 分析天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司), 相似度软件: FP-CASE (湖南中南大学梁逸曾教授领衔开发, 为国家药典委员会认可使用的两个软件之一)。

1.2 试药

药材由通化兴华药业有限公司提供, 安络小皮伞提取物由长春中医药大学提供, 对照品: 甘露糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖均购自 Sigma 公司, 纯度均 99% 以上。1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP) 和三氟乙酸 (TFA) 均购自 (国药集团化学试剂有限公司)。乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil-C₁₈ (250mm × 4.6mm, 5μm); 流动相: A: 磷酸盐缓冲液 (pH6.8): 乙腈 (85: 15, v/v); B: 磷酸盐缓冲液 (pH6.8): 乙腈 (60: 40, v/v)。梯度洗脱比例在 0min→10min→40min, A: 100%→92%→70%; 流速: 0.9ml·min⁻¹, 检测波长: 250nm, 进样量 10μl。在此条件下, 样品中 5 种成分均能达到基线分离, 理论板数按甘露糖衍生物峰计算应不低于 25000。

2.2 供试品溶液的制备

安络小皮伞菌丝体发酵物 1000g, 加 8L 重蒸水, 100°C 水浴搅拌 1h, 提取 4 次, 合并滤液, 2000r·min⁻¹ 离心 3min, 合并上清液, 浓缩至 2L, 加乙醇至醇含量为 80%, 搅拌、静止过夜, 2000r·min⁻¹ 离心 3min, 沉淀加少量水溶解, 2000r·min⁻¹ 离心 3min, 上清液, 冻干, 即得安络小皮伞糖蛋白。精确称取安络小皮伞糖蛋白样品 20mg 于具塞试管中, 加入 2mol·L⁻¹TFA 2ml, 110°C 水解 15h, 放置至室温, 加 0.3mol·L⁻¹NaOH 调节 pH 至中性, 即得水解液备用。加入 6ml 0.5mol·L⁻¹ 的 PMP 甲醇溶液和 5ml 0.3mol·L⁻¹NaOH 溶液, 混匀; 70°C 水浴反应 30min, 取出, 冷却 10min, 用 5ml 0.3mol·L⁻¹HCl 中和, 加入等体积氯仿萃取, 取水层, 重复 3 次, 取上层静置过夜, 即得。

2.3 对照品溶液的制备

取 5 种对照品适量, 加蒸馏水配成 2×10⁻⁵

$3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液, 取 5ml 于试管中, 依次加入 6ml $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PMP 甲醇溶液和 5ml $0.3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 溶液, 混匀; 70°C 水浴反应 30min, 取出, 冷却 10min, 用 5ml $0.3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 中和, 加入等体积氯仿萃取, 取水层, 重复 3 次, 取上层静置过夜, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 稳定性试验

取同一批供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 8, 16, 24h 进样, 考察各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的一致性。结果, 各色谱峰的相对保留时间的 RSD 为 $0.076\% \sim 0.134\%$ ($n=6$); 相对峰面积的 RSD 为 $0.838\% \sim 1.704\%$ ($n=6$)。表明供试品溶液稳定性良好。

2.4.2 精密度试验

取同一批供试品溶液, 连续进样 6 次, 考察各色谱峰相对保留时间和相对峰面积的一致性。结果, 各色谱峰的相对保留时间的 RSD 为 $0.049\% \sim 0.118\%$ ($n=6$); 相对峰面积的 RSD 为 $0.266\% \sim 0.973\%$ ($n=6$)。表明仪器的精密度良好。

2.4.3 重复性试验

取同一批供试品 6 份, 精密称定, 依法制备相应的供试品溶液, 分别进样检测, 考察各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的一致性。结果, 各色谱峰的相对保留时间的 RSD 为 $0.056\% \sim 0.193\%$ ($n=6$); 相对峰面积的 RSD 为 $0.311\% \sim 0.945\%$ ($n=6$)。表明该方法的重复性良好。

2.5 特征图谱分析、数据处理和相似度评价

2.5.1 特征图谱分析、数据处理

试验中将现有已知对照品甘露糖, 半乳糖醛酸, 葡萄糖, 半乳糖, 阿拉伯糖, 按照“2.3”方法制备对照品溶液, 分别进样, 通过保留时间确定供试品溶液中 1 号峰为甘露糖, 2 号峰为半乳糖醛酸, 3 号峰为葡萄糖, 4 号峰为半乳糖, 5 号峰为阿拉伯糖。通过 PMP 对照在 5 ~

10min 之间的色谱峰为 PMP。

按上述方法检测 10 批安络小皮伞多糖的特征图谱, 见图 1、图 2。通过 10 批供试品特征图谱分析, 上述 5 个色谱峰为各批供试品所共有, 因此确定这 5 个峰为共有特征峰。在共有峰中, 1 号峰甘露糖占 30% 以上, 因此以其为参照峰。相对保留时间为 1, 10 批样品相对保留时间和共有峰面积百分比见表 1、表 2。由表可计算出安络小皮伞提取物中 2 号色谱峰相对保留时间为 $1.748 \sim 1.932$, 相对峰面积为 $0.279 \sim 0.465$; 3 号色谱峰相对保留时间为 $1.991 \sim 2.201$, 相对峰面积为 $0.554 \sim 0.924$; 4 号色谱峰相对保留时间为 $2.180 \sim 2.410$, 相对峰面积 $0.716 \sim 1.194$; 5 号色谱峰相对保留时间为 $2.283 \sim 2.523$, 相对峰面积 $0.314 \sim 0.430$ 。

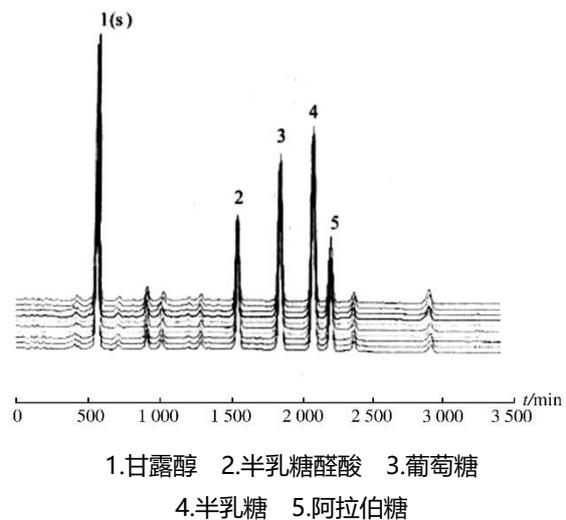
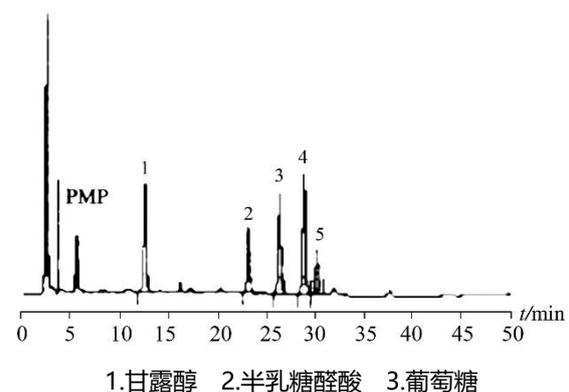


图 1 10 批安络小皮伞提取物特征图谱



4.半乳糖 5.阿拉伯糖

表 1 10 批安络小皮伞提取物特征图谱共有峰的相对保留时间 (s)

批号	1 号峰 (s)	2 号峰	3 号峰	4 号峰	5 号峰
1	1.000	1.840	2.095	2.296	2.403
2	1.000	1.843	2.096	2.295	2.402
3	1.000	1.839	2.093	2.297	2.402
4	1.000	1.841	2.094	2.297	2.405
5	1.000	1.838	2.094	2.295	2.404
6	1.000	1.841	2.095	2.296	2.402
7	1.000	1.840	2.096	2.295	2.404
8	1.000	1.839	2.095	2.296	2.403
9	1.000	1.842	2.096	2.294	2.404
10	1.000	1.841	2.097	2.295	2.402
平均值	1.000	1.840	2.096	2.295	2.403

表 2 10 批安络小皮伞提取物特征图谱共有峰的相对峰面积

批号	1 号峰 (s)	2 号峰	3 号峰	4 号峰	5 号峰
1	1.000	0.412	0.701	0.915	0.320
2	1.000	0.417	0.677	0.917	0.326
3	1.000	0.418	0.709	0.910	0.314
4	1.000	0.384	0.712	0.927	0.328
5	1.000	0.421	0.678	0.913	0.329
6	1.000	0.385	0.716	0.938	0.333
7	1.000	0.387	0.729	0.945	0.342
8	1.000	0.383	0.715	0.935	0.331
9	1.000	0.371	0.734	0.945	0.338
10	1.000	0.387	0.737	0.953	0.342
平均值	1.000	0.372	0.739	0.955	0.344

表 3 10 批安络小皮伞提取物特征图谱相似性评价结果

药材编号	相关系数 (中位数)	相关系数 (均值)	相合系数 (中位数)	相合系数 (均值)
1	0.9800	0.9790	0.9820	0.9811
2	0.9889	0.9894	0.9901	0.9905
3	0.9914	0.9904	0.9923	0.9913
4	0.9824	0.9840	0.9848	0.9857
5	0.9829	0.9910	0.9932	0.9919
6	0.9890	0.9872	0.9902	0.9886

图 2 安络小皮伞提取物标准特征图谱

7	0.9644	0.9687	0.9673	0.9713
8	0.9910	0.9929	0.9916	0.9934
9	0.9906	0.9924	0.9915	0.9931
10	0.9648	0.9682	0.9685	0.9715

2.5.2 相似性评价

采用计算机辅助相似性评价系统采用对 10 批样品取其平均值色谱或中位数色谱作为对比的标样进行相似性分析的评价方法, 比较 10 批供试品 HPLC 指纹图谱全谱相似性, 通过中位数和均值评价, 10 批供试品相似性达到 0.9。表明 10 批供试品具有较好的相似性。结果见表 3。

3 讨论

3.1 本实验室多年来对多糖的单糖组成进行了系统的研究, 曾采用薄层气谱法、气相色谱法、高效液相色谱法分析银耳多糖的单糖组成^[7], 结果显示PMP-hplc法最适合对单糖组成比较复杂的酸性杂多糖的分析, 因为PMP衍生化反应条件比较温和, 不需要酸的催化, 不产生立体异构现象, 在 250nm处有强吸收, 弥补糖在紫外区无吸收的缺陷。对该方法的方法学进行了系统的研究, 对PMP衍生化的温度、时间及加入盐酸中和的量进行了考察^[8], 结果显示, 衍生化温度为 70°C、时间为 30min, 加入等当量的盐酸中和反应液中的氢氧化钠为最佳衍生化条件。将该条件应用于安络小皮伞提取物单糖组成分析, 结果各单糖分离度均达到要求。

3.2 色谱条件的选择

3.2.1 流动相的选择

本试验对A为磷酸盐缓冲液 (pH6.8): 乙腈(85: 15, u/u); B为磷酸盐缓冲液 (pH6.8): 乙腈 (60: 40, u/u) 系统进行了优化, 选择了 3 种梯度洗脱条件① 0min → 10min →

40min, A: 100%→92%→70%; ②0min→20min→60min, A: 100%→84%→60%; ③0min→10min→50min, A: 92%→84%→60%。结果选择梯度①所设计的梯度洗脱, 其分析结果较理想, 各峰之间分离度符合要求。

3.2.2 色谱柱

试验中考察Agilent ZORBAX Eelipse XB C₁₈; Phenomenex HyperClone C₁₈; Diamonsil-C₁₈ 三种色谱柱的分离效果, 结果显示, Diamonsil-C₁₈ 色谱柱基线分离符合要求, 峰形对称性好。

3.3 通过相似度评价对 10 批样品的相对保留时间和相对保留面积的比值进行限定, 可以鉴定药材品质优劣, 同时作为样品的质量标准, 使各批次样品的稳定性和重现性良好。特征图谱的相似性是通过色谱的整体性和模糊性来体现的, 在不完全清楚样品的所有成分时, 特征图谱相似性的评价可反映其内在质量的均一性和稳定性。但是, 在整体图谱相似性良好的情况下, 样品所含有效成分的含量仍然可能存在较大差异。因此, 有必要在特征图谱评价基础

上尽可能增加有效成分的含量测定, 进一步评价药品质量。

参考文献

- [1] 叶文博, 杨晓彤, 陈莹. 安络小皮伞对大鼠的长效镇痛作用[J]. 中药药理与临床, 2002, 18(4):19-21
- [2] 戴芳澜. 中国真菌总汇[M]. 北京: 科学出版社, 1979: 532-534
- [3] 陈英红, 姜瑞芝, 高其品. 安络小皮伞醇提取物中镇痛成分麦角甾醇和肉桂酸的含量测定[J]. 中成药, 2005, 27(5):583-585
- [4] 汤清华, 张琼光, 熊富良, 等. 蓝竹根胶囊醇-水提取物的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药师, 2012.15(4): 454-456
- [5] 袁文娟, 高文分, 孟芹, 等. 玉屏风颗粒 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药师, 2012, 15(3):316-318
- [6] 马定远, 陈军, 李萍, 等. 柱前衍生化高效液相色谱法分析多糖中的单糖组成[J]. 分析化学研究简报, 2002, 30(6):702-705
- [7] 韩威, 姜瑞芝, 陈英红, 等. 银耳多糖单糖组成分析的三种色谱方法比较[J]. 天然产物研究与开发, 2012. 24(3):359-361
- [8] 陈英红, 姜瑞芝, 罗浩铭, 等. 高相液相色谱法建立银耳多糖特定图谱的研究[J]. 药物分析杂志, 2012, 32 (1):136-139

