

基于指纹图谱技术探索不同粒径连翘粉体中化学成分溶出规律

肖 鹏¹, 刘新义², 张水寒^{1*}, 向大雄², 蔡 萍¹, 叶祖光^{3**}

1. 湖南省中医药研究院 湖南省中药粉体与创新药物省部共建重点实验室, 湖南 长沙 410013

2. 中南大学湘雅二医院 新制剂开发重点研究室, 湖南 长沙 410013

3. 中国中医科学院, 北京 100700

摘要: 目的 建立不同粒径连翘粉体的高效液相色谱法(HPLC)特征指纹图谱, 并对其系统进行聚类分析, 探讨粒径与化学成分溶出特征的相关性。方法 将连翘药材进行粉碎、过筛, 按粒径大小分成10组, 采用HPLC法建立不同粒径连翘粉体的指纹图谱, 结合主要共有指纹峰信息, 对不同粒径连翘粉体进行系统聚类分析。结果 不同粒径连翘粉体共有8个HPLC特征峰, 根据各粉体单位质量峰面积, 不同粒径连翘粉体被分为不同层次的3类, 其中超微粉单位质量峰面积最大。结论 不同粒径连翘粉体与化学成分溶出具有良好的相关性, 超微粉碎技术可以促进有效成分的溶出, 在粉碎加工药材方面具有很好的应用前景。

关键词: 高效液相色谱; 指纹图谱; 连翘; 粒径; 溶出

中图分类号: R943 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2012)06-0439-04

Study on dissolution characteristic of chemical constituents in *Forsythiae Fructus* powders with different particle diameters based on fingerprinting techniques

XIAO Juan¹, LIU Xin-yi², ZHANG Shui-han¹, XIANG Da-xiong², CAI Ping¹, YE Zu-guang³

1. Key Laboratory of Chinese Materia Medica Powder and Innovation Drug, Province and Ministry of Education Coconstruction, Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410013, China

2. Key Research Laboratory for Development of New Drugs, The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013, China

3. China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: Objective To establish the chromatographic fingerprint of *Forsythiae Fructus* powder (FFP) with different particle diameters and to explore the correlation between the particle diameter and the dissolution characteristic of chemical constituents by hierarchical cluster analysis. **Methods** *Forsythiae Fructus* was crushed, filtered, and divided into ten groups according to particle diameter. The chromatographic fingerprint of FFP with different particle diameters was established by HPLC. FFP with different particle diameters was analyzed by hierarchical cluster analysis. **Results** The eight characteristic peaks were identified in FFP with different particle diameters. And they could be divided into three categories according to peak area per unit mass. The biggest peak area per unit mass was super micropowder. **Conclusion** There are good correlations between particle diameter and dissolution characteristic of chemical constituents. Superfine pulverizing technology could be used to promote the dissolution rate of chemical constituents and have a good practical future in the crushing process of crude drugs.

Key words: HPLC; fingerprint; *Forsythiae Fructus*; particle diameter; dissolution

连翘 (*Forsythiae Fructus*) 为木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实, 具有清热解毒、消肿散结的功效^[1-2]。近年来, 指纹图谱借助于波谱和色谱等技术手段获得中药化学成分的

光谱或色谱图, 比较全面地反映中药中所含化学成分的类别与数量, 作为鉴别中药真实性、评价质量一致性和产品稳定性的可行模式, 有着较为广泛的影响和应用^[3-4]。随着粉碎加工技术的纵深发展, 尤

收稿日期: 2012-09-13

基金项目: 国家科技部“十二五”支撑计划(2011BAI01B08)

作者简介: 肖 鹏(1978—), 女, 湖南人, 助理研究员, 主要研究方向为中药新制剂与新技术。Tel: (0731)88881651 E-mail: 337000398@qq.com

*通讯作者 张水寒 Tel: (0731)88881651 E-mail: zhangshuihan0220@126.com

叶祖光 Tel: 13910652826 E-mail: yezuguang@sina.com

其超微粉碎技术的出现,将传统中药粉碎粒度降低至微米级(超微粉),植物细胞破壁率增大,有效成分的溶出将发生怎样变化^[5],该问题一直亟待解决。本实验旨在通过指纹图谱技术深入研究不同粒径连翘粉体的溶出情况,进一步探讨粒径与化学成分溶出特征的相关性。

1 仪器与试药

1.1 仪器

岛津 LC—10ATVP 高效液相色谱仪(日本岛津公司),BFM26 型贝利超微粉碎机(济南倍力粉技术有限公司),FA1104 型电子分析天平(上海天普分析仪器有限公司),Winner3001 新干粉激光粒度仪,弗安(上海)企业发展有限公司,ZES—8G 智能溶出仪(杭州德佳科学仪器有限公司),DZKW—S—4 电热恒温水浴锅(湖南精密科学仪器设备有限公司)。

1.2 试药

连翘苷对照品(中国药品生物制品检定所提供,批号 110821-200606);连翘药材购自湖南三湘饮片有限公司,经湖南省中医药研究院生药室温俊达副研究员鉴定为木犀科植物连翘 *Forsythiae suspense* (Thunb.) Vahl 的干燥成熟果实;甲醇为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 不同粒径连翘粉体的制备

称取连翘药材适量,先进行干燥,再置振荡粉碎机中进行粉碎,过 65、50、24、10 目筛获得连翘粗粉,取部分粗粉置超微粉碎机进行粉碎,依次过 300、200、150、120、100、80 目筛,所得的 10 组粉体采用 Winner3001 新干粉激光粒度仪检查其粒径分布,各组连翘粉体平均粒径(D_{50})分别为 2 148.74、1 21.35、88.67、78.46、57.38、46.85、30.52、24.13、18.64、13.39 μm 。

2.2 色谱条件

Hypersil BDS C_{18} 色谱柱(200 mm \times 4.6mm, 5 μm),流动相 A 为甲醇,流动相 B 为 0.1%醋酸-水,采用梯度洗脱:0~10 min, 5%~20% A; 10~25 min, 20%~44% A; 25~40 min, 44%~78% A; 40~70 min, 78%~90% A; 检测波长 277 nm,进样量 20 μL 。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取以上制备的各组连翘粉体 10 g,投入溶出仪中,按照溶出度测定法(中国药典 2010 年版

二部附录 X C),量取经脱气处理的溶剂 250 mL 蒸馏水注入每个操作容器内,加温使溶剂温度保持在(37 \pm 0.5) $^{\circ}\text{C}$,搅拌转速为 100 r/min,搅拌时间为 1 h,吸取上清液 2 mL,离心,取上清液用 0.45 μm 滤膜滤过,即得。

2.4 对照品溶液的制备

精密称取连翘苷对照品 12.2 mg,加甲醇定容至 50 mL 量瓶中,精密吸取 1 mL,加甲醇定容至 10 mL 的量瓶中,制成含连翘苷 24.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液,即得。

2.5 方法学研究^[6-7]

2.5.1 稳定性试验 取第 9 组粉体的供试品溶液,分别在 0、4、8、12、18、24 h 分别进样,记录指纹图谱,比较各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积,结果表明各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致, RSD<3.1%,样品在 24 h 内稳定,符合指纹图谱的检测要求。

2.5.2 精密度试验 取同一供试品溶液,连续进样 6 次,结果表明各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致, RSD<3.3%,符合指纹图谱的检测要求。

2.5.3 重复性试验 取同一样品 5 份,按照供试品制备和检测方法制备供试品并进行测定,考察色谱峰的相对保留时间、峰面积比值的一致性。结果表明各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致, RSD<2.3%,符合指纹图谱的检测要求。

2.6 样品 HPLC 图谱测定

取第 9 组粉体的供试品溶液,精密吸取 20 μL ,注入高效液相色谱仪,记录 70 min 的色谱图,供试品色谱见图 1,共有 8 个特征峰。

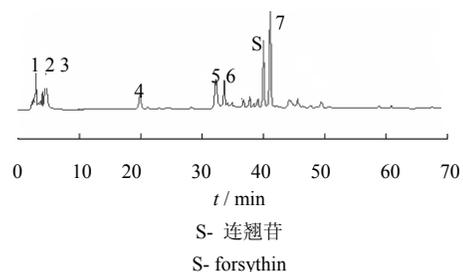


图 1 连翘粉体的指纹特征图谱

Fig. 1 Fingerprint characteristic peaks of FFP

2.7 指纹图谱的建立

2.7.1 共有指纹峰的标定 采用相对保留时间标定共有指纹峰,以图谱中连翘苷色谱峰为参照峰(S),将各色谱峰保留时间与同一图谱中参照物的保留时

间比较, 其比值为各色谱峰的相对保留时间, 计算连翘药材指纹图谱中各色谱峰的相对保留时间, 见表 1。其中 8 个色谱峰为各样品所共有, 故标定它们为共有指纹峰。

2.7.2 共有指纹峰的相对峰面积 以图谱中连翘苷为参照, 将各色谱峰峰面积与同一图谱中参照物的峰面积比较, 其比值为各色谱峰的相对峰面积, 见表 2。

表 1 不同粒径连翘粉体的相对保留时间

Table 1 Relative retention time of FFP with different particle diameters

样品编号	D ₅₀ /μm	1	2	3	4	5	6	S	7
1	2 148.74	0.077	0.094	0.114	0.798	0.813	0.857	1	1.013
2	121.35	0.075	0.092	0.116	0.796	0.811	0.853	1	1.011
3	88.67	0.078	0.095	0.115	0.797	0.809	0.851	1	1.009
4	78.46	0.076	0.091	0.111	0.794	0.817	0.856	1	1.019
5	57.38	0.075	0.096	0.113	0.795	0.816	0.861	1	1.022
6	46.85	0.077	0.097	0.117	0.789	0.819	0.863	1	1.031
7	30.52	0.081	0.098	0.119	0.793	0.807	0.879	1	1.014
8	24.13	0.080	0.093	0.112	0.786	0.805	0.858	1	1.018
9	18.64	0.076	0.096	0.109	0.819	0.814	0.869	1	1.016
10	13.39	0.079	0.099	0.11	0.811	0.821	0.873	1	1.109
	平均	0.077	0.094	0.114	0.798	0.813	0.857	1	1.013
	RSD/%	2.67	2.74	2.82	0.88	0.69	1.09	0	0.56

表 2 不同粒径连翘粉体的相对峰面积

Table 2 Relative peak area of FFP with different particle diameters

样品编号	D ₅₀ /μm	1	2	3	4	5	6	S	7
1	2 148.74	0.378	0.301	0.296	0.386	0.663	0.498	1	1.191
2	121.35	0.381	0.306	0.291	0.388	0.671	0.493	1	1.201
3	88.67	0.385	0.303	0.301	0.391	0.681	0.502	1	1.204
4	78.46	0.396	0.302	0.294	0.396	0.675	0.504	1	1.202
5	57.38	0.397	0.309	0.298	0.401	0.673	0.508	1	1.216
6	46.85	0.393	0.311	0.286	0.406	0.683	0.514	1	1.215
7	30.52	0.402	0.313	0.289	0.405	0.682	0.519	1	1.219
8	24.13	0.408	0.311	0.297	0.402	0.685	0.517	1	1.201
9	18.64	0.411	0.317	0.306	0.411	0.691	0.518	1	1.258
10	13.39	0.421	0.319	0.311	0.416	0.694	0.522	1	1.278
	平均	0.397	0.309	0.391	0.400	0.680	0.510	1	1.219
	RSD/%	1.37	2.00	2.57	2.47	1.38	1.85	0	2.28

2.7.3 相似度 采用中国药典委员会出版的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》软件, (2004 年 A 版) 进行相似度计算。设置参照图谱, 对照图谱生成方法采用中位数法, 时间窗宽度为 0.20, 多点校正后自动匹配, 生成对照指纹图谱, 见图 2。相似度结果表明, 不同粒径连翘粉体相似度良好。

2.8 聚类分析^[8]

为了考察不同粒径连翘粉体溶出与指纹图谱的相关性, 本课题组选择单位质量的峰面积进行聚类分析, 考虑到峰 1、峰 2、峰 3 的分离度不太好,

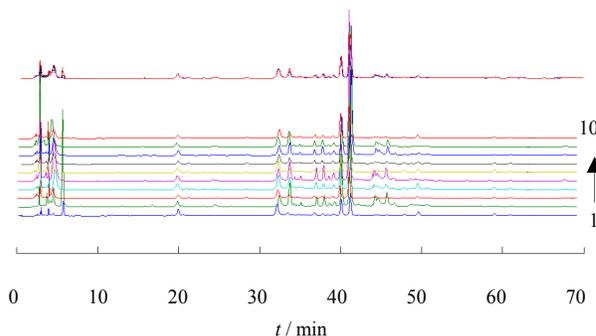


图 2 不同粒径连翘粉体相似度计算(全谱)结果
Fig. 2 Similarity of FFP with different particle diameters

故选择峰 S、峰 4、峰 5、峰 6、峰 7 进行研究, 结果见表 3。将表 3 不同粒径连翘粉体的单位质量峰

面积测定结果用 SPSS10.0 进行系统聚类分析, 见图 3。

表 3 不同粒径连翘粉体的单位质量峰面积

Table 3 Peak area per unit mass of FFP with different particle diameters

样品编号	$D_{50}/\mu\text{m}$	S	4	5	6	7
1	2 148.74	2 234	862	1 481	1 112	2 661
2	121.35	2 348	911	1 575	1 157	2 820
3	88.67	2 415	944	1 645	1 212	2 908
4	78.46	2 547	1 008	1 719	1 284	3 062
5	57.38	2 875	1 152	1 934	1 460	3 496
6	46.85	2 889	1 173	1 973	1 485	3 510
7	30.52	2 910	1 178	1 984	1 510	3 547
8	24.13	3 045	1 224	2 086	1 574	3 657
9	18.64	3 469	1 426	2 397	1 797	4 364
10	13.39	3 547	1 475	2 462	1 851	4 533

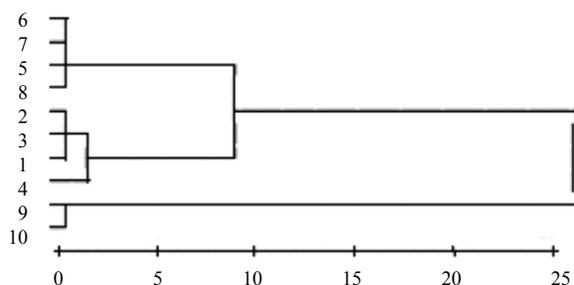


图 3 不同粒径连翘粉体聚类分析结果

Fig. 3 Clustering analysis on FFP with different particle diameters

3 讨论

从表 2 中不同粒径连翘溶出指纹图谱相对峰面积测定结果, 发现随着粒径的减少, 其相对峰面积具有增长的趋势。尤其是峰 4、峰 5、峰 6、峰 7, 这些成分极性相对较小, 在粒径减小、细胞破壁率增大的条件下, 溶出效果比极性相对较大的成分更明显, 可能与其相对分子质量相对较小, 在植物细胞中可以较快释放有关; 另外还发现超微粉与其他粉体指纹图谱中峰的个数基本一致, 这表明连翘药材经超微粉碎后能保持有效成分的稳定。从表 3 不同粒径连翘粉体单位质量峰面积测定结果, 基本上可以看出粒径差别较少的单位质量峰面积比较接近, 且药材粒径越小, 单位质量峰面积越大; 通过聚类分析, 可以发现不同粒径连翘溶出的指纹图谱大致可以分为三大类: I 类 (1 号、2 号、3 号、4 号, 即 D_{50} 由 78.46~2148.74 μm), II 类 (5 号、6 号、7 号、8 号, 即 D_{50} 由 57.38~24.13 μm), III 类 (9 号、10 号, 即 D_{50} 由 18.64~13.39 μm)。由于连

翘药材粉碎的粒径大小不一样, 化学成分的溶出也相应发生一定的变化, 尤其当粒径大小达到超微粉时, 细胞破壁率增大, 从而使有效成分的溶出少受细胞壁和细胞膜的阻碍, 植物细胞中有效成分的溶出比粗粉、细粉要容易, 故溶出量相应增多, 表明超微粉碎技术在中药材加工方面具有较好的应用前景。

参考文献

- [1] 李德成, 刘庆燕. 连翘不同提取液对大肠杆菌体外抑菌作用比较 [J]. 西南国防医药, 2011, 21(10): 1059-1060.
- [2] 肖会敏, 郭倩倩, 周暄宣, 等. 连翘挥发油软胶囊治疗上呼吸道感染疗效观察 [J]. 中医药临床杂志, 2011, 23(7): 595-596.
- [3] 丰加涛, 金郁, 王金成, 等. 基于定量指纹图谱技术的中药质量控制 [J]. 色谱, 2008, 26(2): 180-185.
- [4] 罗文, 王伟, 石任兵, 等. 山楂药材 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(1): 39-42.
- [5] 吴璐, 张水寒, 袁清照, 等. 大黄不同粒径粉体在家兔体内药代动力学的比较研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2009, 29(4): 37-40.
- [6] 袁清照, 张水寒, 李顺祥, 等. 吴茱萸道地药材的高效液相指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2010, 41(9): 1534-1538.
- [7] 丁平, 黄海波, 邱金英, 等. 应用色谱指纹图谱技术区别赤芝和紫芝 [J]. 华西药学杂志, 2009, 24(4): 404-406.
- [8] 刘江, 陈兴福, 刘莎, 等. 基于主成分聚类分析的川产麦冬种质资源质量综合评价研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(5): 570-573.