

胡黄连总苷的高效液相色谱特征图谱研究

侯文彬^{1,2,3,4}, 周福军^{2,3,4}, 单 洪^{2,3,4}, 刘昌孝^{4*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院 天津市中药质量控制技术工程实验室, 天津 300193

3. 中药现代制剂与质量控制技术国家地方联合工程实验室(天津), 天津 300193

4. 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300193

摘要: 目的 采用高效液相色谱法建立胡黄连总苷的特征图谱。方法 Luna C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.5%冰醋酸水溶液 (15.5:84.5), 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温为 35 ℃, 检测波长为 275 nm, 进样量为 10 μL。结果 建立了胡黄连总苷的特征图谱及其技术参数, 即供试品特征图谱中应有 11 个特征峰, 参照物峰相应的峰为 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。采用国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系 2004A 版》自动处理, 10 批胡黄连总苷的相似度均大于 0.998。结论 本方法操作简便, 准确可靠, 可用于控制胡黄连总苷的内在质量。

关键词: 胡黄连总苷; 特征图谱; 高效液相色谱法

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2013)05-0712-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.05.014

HPLC characteristic chromatograms of total glucosides in *Picrorhiza scrophulariiflora*

HOU Wen-bin^{1,2,3,4}, ZHOU Fu-jun^{2,3,4}, SHAN Qi^{2,3,4}, LIU Chang-xiao⁴

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Engineering Laboratory of Quality Control Technology of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. National & Local United Engineering Laboratory of Modern Preparation and Quality Control Technology of Traditional Chinese Medicine (Tianjin), Tianjin 300193, China

4. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To establish the characteristic chromatograms for the identification of the total glucosides in *Picrorhiza scrophulariiflora* (TGPS). **Methods** The column was Luna C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile - 0.5% glacial acetic acid (15.5: 84.5), at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was 275 nm. The column temperature was 35 ℃ with the injection volume of 10 μL. **Results** Characteristic chromatograms and technical parameters of the TGPS were established. Eleven common peaks were separated in the test sample, and S peak was the reference peak. The relative retention time of each characteristic peak and S peak were calculated, and their relative retention time should be within ± 5% of the specified value. The similarity indexes of 10 batches were calculated by software published by the Chinese Pharmacopoeia Committee. All these indexes were more than 0.998. **Conclusion** The method is simple, accurate and can be used for the quality control of the TGPS.

Key words: total glucosides in *Picrorhiza scrophulariiflora*; characteristic chromatograms; HPLC

胡黄连总苷是从玄参科植物胡黄连 *Picrorhiza scrophulariiflora* Pennell 的干燥根茎中经水提取、大

孔吸附树脂分离处理后得到的有效部位, 为环烯醚萜苷类, 主要含有胡黄连苷 II、胡黄连苷 I、胡黄

收稿日期: 2013-03-25

基金项目: 国家科技支撑计划课题 (2007BAI41B06)

作者简介: 侯文彬 (1969—), 男, 在读博士, 研究员, 主要从事中药新药研发。Tel: (022) 23006295 E-mail: houwb@tjpr.com

*通信作者 刘昌孝, 中国工程院院士, 从事新药研发、药物代谢动力学和新药评价研究工作 Tel: (022)23006863 E-mail: liuchangxiao@163.com

连苷Ⅲ、胡黄连苷Ⅳ等,具有清肝脂、调血脂、降低转氨酶、清除自由基、抗脂质过氧化、增强免疫、保护肝脏的作用,用于预防和/或治疗酒精性和非酒精性脂肪肝,以及急性脂肪肝或慢性脂肪肝,进而防止肝纤维化的形成^[1]。胡黄连总苷是本课题组研制的中药五类新药,已获得临床批件。为确保其药理作用和临床疗效,本实验对胡黄连总苷的特征图谱进行了研究,建立了胡黄连总苷的高效液相色谱特征图谱定性分析方法,采用特征图谱控制胡黄连总苷的质量对保证用药后疗效的稳定一致具有重要意义。

1 实验材料

1.1 仪器

Agilent 1100 液相色谱仪, G1310 泵, G1313A 自动进样器, G1316A 柱温箱, G1314A 紫外检测器。

1.2 试药

胡黄连总苷, 自制, 批号分别为 20110110-1、20110111-1、20110111-2、20110111-3、20110112-1、20110112-2、20110112-3、20110113-1、20110113-2、20110113-3。胡黄连苷Ⅱ、胡黄连苷Ⅰ对照品购于中国食品药品检定研究院, 批号分别为 111596-200301、111727-200501。

1.3 试剂

乙腈 (Fisher 化学试剂公司, 色谱纯), 冰醋酸 (天津市凯信化学工业有限公司, 分析纯), 甲醇 (天津市康科德科技有限公司, 分析纯)。

2 方法

2.1 色谱条件

Luna C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.5%冰醋酸水溶液 (15.5:84.5), 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温为 35 ℃, 检测波长为 275 nm, 进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取胡黄连苷Ⅰ、胡黄连苷Ⅱ对照品适量, 加甲醇制成 0.1 mg/mL 胡黄连苷Ⅰ和 0.05 mg/mL 胡黄连苷Ⅱ的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品约 10 mg, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 分别精密吸取同一批胡黄连总苷 (批号 20110110-1) 供试品溶液 10 μL, 按照上述

色谱条件连续进样 6 次, 记录特征图谱。以胡黄连苷Ⅱ为参照峰, 计算主要峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明, 主要峰相对保留时间 RSD 值<1.0%, 相对峰面积均 RSD 值<3.0%, 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系 2004A 版》进行评价, 相似度大于 0.999。

2.3.2 稳定性试验 取同一批胡黄连总苷样品 (批号 20110110-1) 溶液在室温下保存 24 h, 分别于 0、8、16、36 h 测定, 记录特征图谱, 以胡黄连苷Ⅱ为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明, 各共有峰相对保留时间 RSD 值<1.0%, 相对峰面积稳定, 除 1 个 RSD 值<6.0%外, 其余 RSD 值<4.0%, 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系 2004A 版》进行评价, 相似度大于 0.999, 结果表明样品在 36 h 内相对较稳定, 但峰面积变化较大, 提示样品制备后应尽快测定。

2.3.3 重复性试验 取同一批胡黄连总苷 (批号 20110110-1), 分别称取 6 份, 制备供试品溶液, 分别注入液相色谱仪进行测定, 记录特征图谱, 以胡黄连苷Ⅱ为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明, 各共有峰相对保留时间 RSD 值<1.0%, 相对峰面积稳定, RSD 值<4.0%, 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系 2004A 版》进行评价, 相似度大于 0.999, 表明本方法的重复性良好。

3 结果^[2]

3.1 特征图谱的测定与共有峰的建立

精密吸取 10 批胡黄连总苷供试品溶液, 依次进样 10 μL, 在上述色谱条件下分别测定, 记录色谱图。其中峰 8 的面积较大、保留时间适中且为活性成分胡黄连苷Ⅱ, 因此选其作为参照峰, 保留时间和峰面积为 1, 计算其他各峰的相对保留时间和相对峰面积值, 结果见表 1、2。经中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 进行分析, 结果 10 批样品有 14 个共有峰, 见图 1 (其中 R 为 10 批胡黄连总苷的共有模式)。

3.2 胡黄连总苷特征图谱的建立

通过测定 10 批胡黄连总苷, 得到 14 个共有峰, 其中 9、10、11 号峰的峰面积较小, 并且相对峰面积的 RSD 值相差较大, 故 9、10、11 号峰不作为胡黄连总苷的特征峰, 最终选择了 11 个共有峰作为特征图谱的特征峰, 且特征峰的总面积占总峰面积的

表 1 10 批胡黄连总苷各峰相对保留时间

Table 1 Relative retention time of common peaks for 10 batches of total glucosides in *Picrorhiza scrophulariiflora*

峰号	10 批胡黄连总苷相对保留时间										均值	RSD/%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10		
1	0.233	0.233	0.233	0.233	0.233	0.234	0.234	0.233	0.233	0.234	0.233	0.245
2	0.276	0.276	0.276	0.276	0.277	0.277	0.277	0.276	0.276	0.278	0.277	0.212
3	0.448	0.448	0.449	0.449	0.449	0.450	0.450	0.449	0.449	0.450	0.449	0.153
4	0.629	0.628	0.629	0.629	0.629	0.629	0.628	0.629	0.628	0.629	0.629	0.064
5	0.749	0.749	0.750	0.750	0.750	0.751	0.751	0.750	0.749	0.750	0.750	0.096
6	0.857	0.856	0.857	0.857	0.857	0.859	0.858	0.857	0.857	0.857	0.857	0.072
7	0.927	0.927	0.927	0.927	0.928	0.930	0.929	0.927	0.927	0.928	0.928	0.127
S	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
8	1.368	1.364	1.370	1.368	1.371	1.370	1.372	1.369	1.370	1.369	1.369	0.165
9	1.624	1.618	1.626	1.624	1.626	1.624	1.629	1.625	1.627	1.625	1.625	0.175
10	1.743	1.735	1.745	1.745	1.745	1.742	1.747	1.744	1.743	1.745	1.743	0.195
11	2.611	2.602	2.617	2.614	2.611	2.606	2.620	2.615	2.610	2.614	2.612	0.199
12	2.804	2.793	2.811	2.807	2.804	2.794	2.816	2.808	2.801	2.806	2.805	0.251
13	3.140	3.130	3.148	3.145	3.140	3.127	3.152	3.149	3.136	3.140	3.141	0.259

表 2 10 批胡黄连总苷各峰相对峰面积

Table 2 Relative peak areas of common peaks for 10 batches of total glucosides in *P. scrophulariiflora*

峰号	10 批胡黄连总苷相对峰面积										均值	RSD/%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10		
1	0.06	0.057	0.059	0.057	0.056	0.056	0.057	0.057	0.058	0.058	0.058	2.207
2	0.168	0.166	0.166	0.161	0.162	0.158	0.159	0.172	0.162	0.162	0.164	2.644
3	0.150	0.138	0.135	0.141	0.135	0.128	0.129	0.130	0.133	0.134	0.135	4.828
4	0.124	0.126	0.126	0.121	0.122	0.118	0.121	0.120	0.121	0.123	0.122	2.106
5	0.195	0.203	0.202	0.199	0.200	0.195	0.201	0.200	0.201	0.201	0.200	1.357
6	0.071	0.068	0.077	0.072	0.071	0.068	0.07	0.072	0.074	0.075	0.072	4.037
7	0.079	0.079	0.080	0.081	0.085	0.082	0.085	0.081	0.081	0.078	0.081	2.932
S	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
8	0.054	0.053	0.051	0.047	0.045	0.049	0.047	0.048	0.045	0.049	0.049	6.320
9	0.07	0.063	0.067	0.063	0.06	0.055	0.061	0.063	0.063	0.061	0.063	6.399
10	0.057	0.063	0.058	0.05	0.049	0.063	0.059	0.060	0.061	0.059	0.058	8.361
11	1.418	1.382	1.418	1.344	1.281	1.357	1.346	1.359	1.371	1.378	1.365	2.896
12	0.084	0.094	0.091	0.097	0.098	0.09	0.104	0.1000	0.102	0.100	0.096	6.459
13	0.117	0.121	0.128	0.119	0.121	0.118	0.123	0.125	0.116	0.126	0.121	3.322

90%以上, 见图 2。经对照品的定位归属和通过一级和二级 HPLC-MS 扫描谱对它们的结构进行了推断, 其中峰 1 为云杉苷, 峰 2 为草夹竹桃苷, 峰 3 为香草酸, 峰 4 为胡黄连苷 IV, 峰 5 为胡黄连苷 III, 峰 6 为藏黄连酚苷 A, 峰 7 为香草乙酮, 峰 8 (S) 为胡黄连苷 II, 峰 9 为胡黄连苷 I, 峰 10 为 6-阿

魏酰梓醇, 峰 11 为梓醇型二糖环烯醚萜苷。

3.3 特征峰相似度分析

将 10 批胡黄连总苷数据导入国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系 2004A 版》进行特征色谱峰匹配, 用中位数法得到对照特征图谱, 得出各批样品图谱与对照图谱的相似度, 见表 3。

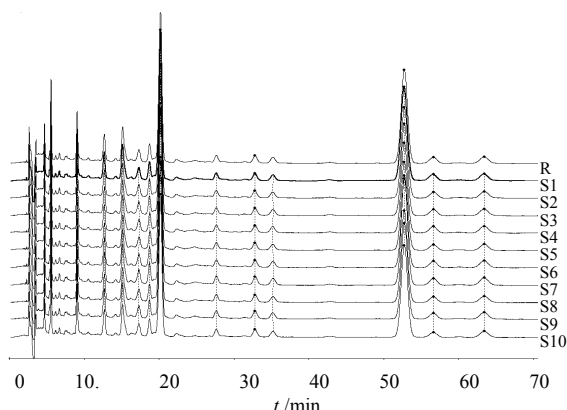


图 1 10 批胡黄连总苷的 HPLC 特征指纹图谱
Fig. 1 HPLC fingerprints for 10 batches of total glucosides in *P. scrophulariiflora*

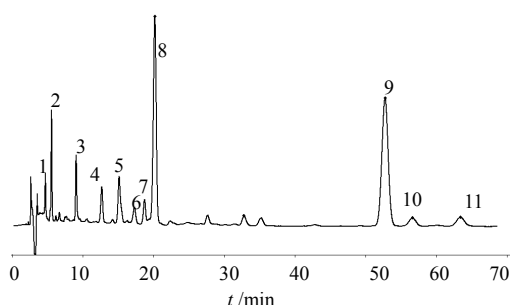


图 2 对照特征图谱
Fig. 2 Reference characteristic chromatogram

表 3 相似度评价结果

Table 3 Results of similarity analysis

批 号	相似度	批 号	相似度
20110110-1	0.999	201101112-2	0.999
20110111-1	1.000	20110112-3	0.999
20110111-2	0.999	201101113-1	1.000
20110111-3	0.999	20110113-2	0.999
20110112-1	0.998	20110113-3	1.000

4 讨论

4.1 流动相的选择

流动相为以甲醇 - 水^[3-5]、乙腈 - 水溶液^[6]系统, 不同比例进行考察, 结果以乙腈 - 0.5%冰醋酸 (15.5 : 84.5) 等度洗脱, 色谱图中各峰基本达到基线分离, 且重复性良好, 优于其他条件的梯度洗脱。

4.2 检测波长的选择

在选定的液相色谱条件下, 采用二极管阵列检测器对样品进行测定, 综合考虑基线、色谱峰的数目及信号响应值, 确定 275 nm 为最佳检测波长。

4.3 提取溶剂的考察

对甲醇、95%乙醇、50%乙醇 3 种溶剂进行考察。结果甲醇溶解的样品, 峰形较好, 50%乙醇、95%乙醇峰形不好, 所以选择甲醇作为胡黄连总苷特征图谱检测提取溶剂。

在本实验的方法条件下胡黄连总苷中的 11 个特征峰分离较好, 相似度分析结果表明, 各批次样品之间具有较好的相似性, 相似度均大于 0.998。因此本方法重复性好、特征性强、操作简便, 为将来更全面地控制胡黄连总苷的质量提供了依据。

参考文献

- [1] 侯文彬, 赵专友, 周福军, 等. 胡黄连总苷提取物在制备用于预防和治疗脂肪肝药物中的用途 [P]. 中国: 201010543645, 2012-05-23.
- [2] 刘 毅, 刘素香, 龚苏晓, 等. 当归药材 HPLC 指纹图谱及其液相色谱 - 质谱联用分析 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(4): 259-262.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2010: 226.
- [4] 张 铭, 孙 敏, 樊宏伟. 胡黄连药材的指纹图谱研究 [J]. 生物学杂志, 2009, 26(1): 11-14.
- [5] 石 欣, 鲍劲松, 白雅静. RP-HPLC 法测定清热八味胶囊中胡黄连苷 I 的含量 [J]. 中国民族医药杂志, 2011(3): 52-54.
- [6] 白在贤, 王 栋, 林 燕. 高效液相色谱法测定蒙药清感九味中胡黄连苷的含量 [J]. 中国民族医药杂志, 2008(1): 38-39.