

黄连配方颗粒的 HPLC 指纹图谱研究

周 晖, 刘 萌*

(温州市药品检验所, 浙江 温州 325028)

配方颗粒是我国 1993 年尝试中药改革而发展的新剂型。产品采用将中药饮片经浸提、浓缩、干燥等若干工艺精制而成, 保持原中药饮片的性味与功能。2001 年国家药品监督管理局发布的《中药配方颗粒管理暂行规定》已明确规定配方颗粒可以在全国范围试点临床医院进行使用, 并对其质量标准的研究作了技术要求。本实验对批准研制的 3 家企业的黄连配方颗粒进行 HPLC 指纹图谱研究, 以便了解配方颗粒与原料饮片、药材在总成分和有效成分方面的符合程度, 比较和评价不同制备工艺与产品的内在质量、均一性等关系, 建立符合中药特点的质量标准。

1 仪器与材料

Waters 高效液相色谱仪, 515 泵二组, 2487 紫外检测器, 717 自动进样系统。乙腈为色谱纯, 其他试剂为分析纯。黄连配方颗粒及原料饮片由临床试用医院和研制企业提供(表 1)。黄连对照药材和盐酸小檗碱对照品由中国药品生物制品检定所提供。

表 1 样品来源

Table 1 Sample resources

编号	批 号	规 格	生产单位与来源
A 1	010320	每袋相当饮片 3 g	深圳三九医药贸易有限公司
A 2	021020	同上	同上
A 3	021115	同上	同上
A 饮片		饮片	同上(产地: 四川)
B 1	020914	每袋相当饮片 3 g	广东一方制药有限公司
B 2	021231	同上	同上
B 3	030850	同上	同上
B 饮片		饮片	同上(产地: 四川)
C 1	0204051	每袋相当饮片 3 g	江阴天江药业有限公司
C 2	0210073	同上	同上
C 3	0309025	同上	同上
C 饮片		饮片	同上(产地: 四川)

2 方法和结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 A lltech C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾, 梯度洗脱: 0~15 min 乙腈由 15% 升为 25%, 保持 15 min, 30~45 min 乙腈由 25% 升为 35%, 再保持 15 min 至 60 min; 流速为 0.5 mL/min; 检测波

长为 350 nm; 温度为 30 °C; 进样量为 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取盐酸小檗碱对照品适量, 用 1% 醋酸水溶液稀释成 40 μg/mL 的溶液, 即得。

2.3 对照药材溶液的制备: 精密称取黄连对照药材粉末 1 g, 置 100 mL 量瓶中, 加 1% 醋酸水溶液约 80 mL, 超声 30 min, 放冷, 加溶剂至刻度, 摇匀, 滤过。精密取续滤液 3 mL 置 25 mL 量瓶中, 加 1% 醋酸水溶液稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.4 供试品溶液的制备: 取黄连配方颗粒 1/3 袋(相当于饮片 1 g)及原料黄连饮片 1 g(研成粉末), 精密称定, 分别置 100 mL 量瓶中, 按对照药材溶液的制备方法制备, 即得。

2.5 测定方法: 取各供试品溶液和对照品溶液, 按上述色谱条件注入高效液相色谱仪, 记录色谱图, 计算, 即得。

2.6 方法学考察

2.6.1 精密度试验: 取同批供试品溶液连续进样 6 次, 测共有峰 11 个, 各共有峰相对峰面积 RSD < 3%。

2.6.2 重复性试验: 取同批颗粒 6 份, 按供试品溶液制备法制备, 分别进样, 测得各共有峰相对峰面积的 RSD < 3%。

2.6.3 稳定性试验: 取同批供试品溶液分别在 0, 6, 12, 24, 36 h 进样, 测得各共有峰相对峰面积的 RSD < 3%, 表明供试品溶液在 36 h 内稳定。

2.7 指纹图谱与各项技术参数

2.7.1 共有峰的指定: 比较对照药材与供试品的 HPLC 图和相关参数, 得出其中共有峰 11 个(图 1)。

2.7.2 共有峰的相对保留时间、峰面积、相对峰面积: 11 号峰为盐酸小檗碱, 是黄连的主成分, 其峰面积平均占总峰面积的 57%, 比较稳定, 选择作为参照峰。共有峰的相对保留时间和相对峰面积见表 2, 3。由表 3 可见样品间的共有峰相对面积 RSD < 4%。共有峰峰面积占总峰面积的 99.5%, RSD 为 0.2%, 符合指纹图谱的有关规定(表 4)。

表 2 样品和对照药材的共有峰相对保留时间

Table 2 Relative retention time of common peaks of samples and Rhizoma Coptidis

编 号	共有峰相对保留时间											r
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
对照药材	0.14	0.17	0.21	0.24	0.58	0.73	0.76	0.77	0.81	0.96	1	1.000
A 1	0.14	0.16	0.20	0.23	0.57	0.72	0.75	0.76	0.80	0.95	1	1.000
A 2	0.14	0.16	0.21	0.24	0.57	0.74	0.76	0.78	0.82	0.96	1	1.000
A 3	0.14	0.16	0.20	0.23	0.57	0.73	0.76	0.77	0.81	0.96	1	1.000
A 饮片	0.14	0.16	0.21	0.24	0.57	0.72	0.75	0.77	0.81	0.96	1	1.000
B 1	0.14	0.16	0.20	0.22	0.57	0.73	0.76	0.77	0.81	0.96	1	1.000
B 2	0.14	0.17	0.21	0.24	0.58	0.73	0.75	0.77	0.81	0.96	1	1.000
B 3	0.14	0.16	0.21	0.24	0.57	0.74	0.77	0.78	0.82	0.96	1	1.000
B 饮片	0.14	0.16	0.21	0.24	0.57	0.73	0.76	0.77	0.81	0.96	1	1.000
C 1	0.14	0.16	0.20	0.23	0.57	0.72	0.75	0.77	0.81	0.96	1	1.000
C 2	0.14	0.17	0.21	0.24	0.58	0.73	0.76	0.77	0.81	0.96	1	1.000
C 3	0.14	0.16	0.20	0.23	0.57	0.73	0.75	0.77	0.81	0.96	1	1.000
C 饮片	0.14	0.17	0.21	0.24	0.57	0.73	0.75	0.77	0.81	0.96	1	1.000
均值	0.14	0.16	0.21	0.24	0.57	0.73	0.76	0.77	0.81	0.96	1	1.000

表 3 样品和对照药材的共有峰相对峰面积

Table 3 Relative areas of common peaks of samples and Rhizoma Coptidis

编 号	共有峰相对峰面积											r
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
对照药材	0.01	0.02	0.02	0.02	0.11	0.04	0.04	0.22	0.28	0.16	1	0.975
A 1	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.06	0.07	0.05	0.14	0.25	1	0.995
A 2	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.06	0.07	0.05	0.15	0.24	1	0.996
A 3	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.07	0.05	0.15	0.25	1	0.995
A 饮片	0.003	0.01	0.01	0.01	0.03	0.07	0.16	0.06	0.29	0.26	1	0.998
B 1	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.06	0.12	0.06	0.23	0.24	1	1.000
B 2	0.004	0.01	0.01	0.01	0.03	0.06	0.10	0.06	0.22	0.23	1	1.000
B 3	0.002	0.01	0.01	0.01	0.03	0.06	0.11	0.06	0.22	0.25	1	1.000
B 饮片	0.003	0.01	0.01	0.01	0.04	0.07	0.17	0.06	0.31	0.28	2	0.996
C 1	0.005	0.01	0.01	0.01	0.02	0.06	0.12	0.06	0.23	0.25	1	1.000
C 2	0.003	0.02	0.02	0.02	0.03	0.06	0.12	0.06	0.24	0.25	1	1.000
C 3	0.003	0.01	0.01	0.01	0.03	0.06	0.13	0.06	0.25	0.24	1	1.000
C 饮片	0.003	0.02	0.01	0.01	0.05	0.07	0.19	0.07	0.33	0.29	1	0.993
均值	0.005	0.01	0.01	0.01	0.03	0.06	0.12	0.06	0.23	0.23	1	1.000
RSD /%	0.34	0.45	0.29	0.29	1.03	1.24	3.52	0.55	2.67	1.37	0	

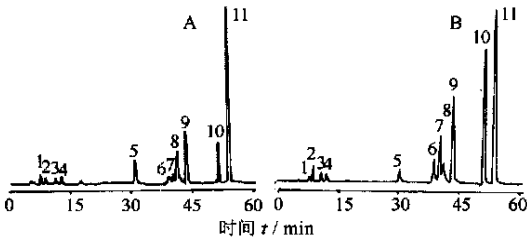


图 1 黄连对照品(A)和黄连配方颗粒(B)的HPLC指纹图

Fig 1 HPLC fingerprint of Rhizoma Coptidis (A) and its granules (B)

$$r = \frac{\sum_{k=1}^n X_{K1} X_{Kj}}{\sqrt{(\sum_{k=1}^n X_{K1}^2)(\sum_{k=1}^n X_{Kj}^2)}}$$

2.8 共有成分相对含量的计算: 将每克对照药材与配方颗粒黄连及原料黄连饮片的共有峰面积进行比

较, 计算共有成分的相对含量, 同时计算盐酸小檗碱含量, 结果见表 4。

表 4 共有峰面积和相对含量

Table 4 Areas of common peaks and relative content

编 号	共有峰峰面积相对值/%		盐酸小檗碱		
	总峰面积	对照药材共有峰	含量/%	平均/%	RSD/%
对照药材	98.9	100	5.6		
A 1	99.1	42.4	2.7		
A 2	99.6	38.4	2.5		
A 3	99.8	42.7	2.8	2.7	5.4
A 饮片	99.4	187.1	10.4		
B 1	99.3	49.9	3.0		
B 2	99.7	45.9	2.8		
B 3	99.6	60.5	3.7	3.3	14.4
B 饮片	99.5	201.4	10.8		
C 1	99.4	108.5	6.5		
C 2	99.5	102.9	6.1		
C 3	99.7	109.1	6.4	6.3	3.3
C 饮片	99.6	215.6	11.2		

3 讨论

3.1 本实验采用1%醋酸水溶液为溶剂,黄连配方颗粒和饮片溶出较好;采用乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾梯度洗脱,黄连中各成分得到较好分离,HPLC 色谱图效果良好。经方法学考察:盐酸小檗碱精密度、重复性、稳定性试验良好;在4~80 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积呈良好线性关系,方程为 $A = 84\,917\,C - 59\,263$, $r = 0.999\,9$;平均回收率为99.6%,RSD 为1.1% ($n = 3$)。本法可用于黄连饮片及其配方颗粒的质量评价和控制。

3.2 从指纹图看,3厂家9批配方颗粒与原料饮片、

对照药材在总成分和有效成分方面具有良好的相似性。采用相似度算法计算,与平均样品值比较,共有峰相对保留时间的相似系数 $r \geq 0.999\,9$;共有峰相对峰面积的相似系数 $r \geq 0.993$ 。平均共有峰总面积在99%以上。提示各家黄连配方颗粒的生产工艺基本成熟,用于生产的原料饮片品种稳定、质量可靠。

3.3 相对于对照药材,3厂家黄连配方颗粒的共有峰总面积和盐酸小檗碱的含量差异较大。提示各厂家有必要按有关规定规范工艺和质量,研究颗粒与饮片的等效性关系,合理调整配方颗粒的标示规格,制定出科学、统一的质量标准。

HPLC 法测定鼻炎灵片中欧前胡素的含量

赵春香¹, 梁英², 王丽娜^{1*}

(1. 吉林省药品检验所, 吉林 长春 130062; 2. 吉林省利华制药厂, 吉林 长春 130000)

鼻炎灵片是由苍耳子、黄芩、白芷等8味中药经提取加工制成的中药复方制剂。具有透窍消肿、祛风退热之功效,主要用于慢性鼻窦炎、鼻炎及鼻塞头痛、涕涕臭气、嗅觉失灵等。原质量标准没有含量测定项。本实验采用HPLC 法对制剂中欧前胡素进行了含量测定。方法简便、快速,可以有效地控制产品的质量。

1 仪器与试药

LC-10A Tvp 高效液相色谱仪, SPD-10A vp 紫外检测器, WDL-95 工作站。

欧前胡素(批号: 0826-9502)对照品购自中国药品生物制品检定所,鼻炎灵片由吉林省博维药业有限公司提供。甲醇为优级纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 用Agilent Zorbax 80A Extend-C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 甲醇-0.3% 磷酸溶液(60:40)为流动相, 检测波长为248 nm。理论塔板数按欧前胡素峰计不得低于8 000。

2.2 供试品溶液的制备: 取本品10片, 除去糖衣后, 精密称定, 研细, 精密称取0.7 g, 置索氏提取器中, 加甲醇适量, 回流提取3 h, 提取液蒸干, 残渣加甲醇使溶解, 并转移至25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀。用微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 标准曲线的制备: 精密称取欧前胡素对照品5.21 mg, 置25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻

度, 摇匀, 作为对照品溶液。精密量取0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 mL, 分别置25 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 分别精密量取10 μL 注入液相色谱仪, 记录峰面积积分值。以进样量为横坐标, 峰面积积分值为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程为: $A = 72\,422\,776\,C + 94\,150$, $r = 0.999\,8$ 。结果表明欧前胡素在0.008 3~0.25 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

2.4 空白试验: 按处方比例及制备工艺配制缺白芷的阴性对照适量, 称取0.7 g, 按2.2项下的方法操作, 并测定, 结果阴性对照无干扰, 见图1。

2.5 精密度试验: 取同一对照品溶液, 连续进样5次, 每次10 μL , 记录欧前胡素峰面积, 结果峰面积RSD = 0.4%。

2.6 重现性试验: 取同一批号样品(批号20021101), 制备供试品溶液, 平行测定5份, 得欧前胡素的含量为23.2 $\mu\text{g/片}$, RSD 为2.0%。

2.7 稳定性试验: 取同一对照品溶液, 每隔24 h 注入液相色谱仪10 μL , 记录峰面积, 结果欧前胡素峰面积RSD 为0.4% ($n = 6$), 结果表明对照品溶液在5 d 内稳定性良好。

2.8 加样回收试验: 精密称取已知含量的样品适量(批号: 20021101, 含欧前胡素约44 μg), 置索氏提取器中, 精密加入0.208 4 mg/mL 欧前胡素对照品