

清风胶囊的高效液相色谱指纹图谱的研究

张小红¹, 朱卫丰², 雷晓林³, 莫志贤⁴, 钱星文^{3*}

(1. 广东省食品药品职业技术学校, 广东 广州 510663; 2. 江西中医学院, 江西 南昌 330004;

3. 东方药林药业有限公司, 广东 广州 510515; 4. 南方医科大学, 广东 广州 510515)

摘要:目的 建立清风胶囊高效液相色谱指纹图谱, 为清风胶囊的质量控制提供依据。方法 采用高效液相色谱法建立指纹图谱, 以乙腈-水-磷酸缓冲盐进行梯度洗脱, 检测波长为 203 nm, 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温 25 °C, 用中药指纹图谱相似度评价系统计算其相似度。结果 10 批清风胶囊中共有峰的相对保留时间 RSD 小于 1%。在选定的色谱条件下确定了 16 个峰为清风胶囊的特征指纹峰, 10 批样品平均相似度为 0.988。结论 该法重现性好, 可为清风胶囊的质量评价提供依据。

关键词:清风胶囊; 指纹图谱; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2010)03-0394-03

清风胶囊是由青风藤、延胡索和人参等组成, 主要用于控制海洛因依赖者脱毒后的稽延性戒断症状^[1]。在前期的质量标准研究中, 笔者通过高效液相色谱法建立了青藤碱的测定方法, 通过薄层色谱法建立了人参和延胡索的鉴别方法。指纹图谱用于中药制剂的质量控制的研究报道较多^[2,3]。为了更好的保证产品的临床疗效稳定, 本实验采用 RP-HPLC 法对 10 批清风胶囊进行分析比较, 寻找各组分关系, 建立清风胶囊指纹图谱, 为清风胶囊的质量控制提供依据。

1 仪器与试剂

戴安 U3000 高效液相色谱仪, PDA 检测器, 色谱在线真空脱气机、四元梯度泵、柱温箱。

乙腈为色谱纯(美国 TEDIA 公司), 水为超纯水, 磷酸氢二钠、三乙胺和磷酸二氢钠为分析纯。清风胶囊(0.45 g/粒)由东方药林药业有限公司提供; 青藤碱、人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁、延胡索乙素对照品均购于中国药品生物制品检定所。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: Ultimate TM XB-C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水-磷酸盐缓冲盐(0.005 mol/L 的磷酸氢二钠溶液, 以 0.005 mol/L 的磷酸二氢钠调节 pH 值至 8.0, 再以 1% 的三乙胺调节 pH 值至 9.0), 采用梯度洗脱, 洗脱程序见表 1; 柱温: 25 °C; 体积流量: 1 mL/min; 检测波长: 203 nm; 进样量: 10 μL, 记录 140 min 图谱。

2.2 供试品溶液的制备: 取清风胶囊(批号

表 1 流动相梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution process of flow phase

时间/min	乙腈/%	水/%	磷酸盐/%
0	1	74	25
25	11	64	25
40	15	60	25
90	26	49	25
120	42	38	20
140	58	27	15

20071201) 内容物样品约 0.3 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇 25 mL, 超声提取 15 min (250 W, 40 kHz), 滤过, 取续滤液 10 mL, 水浴蒸干, 加甲醇适量, 多次洗涤, 定容至 10 mL, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验: 取同一供试品溶液(批号 20071201), 连续测定 6 次, 按上述色谱条件测定, 结果显示共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 0.8%, 共有峰的相对峰面积 RSD 均小于 1.6%。

2.3.2 稳定性试验: 取同一供试品溶液(批号 20071201) 分别在 0、3、6、9、12、24 h 各进样 1 次, 按上述色谱条件测定, 结果显示共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 1.3%, 共有峰的相对峰面积 RSD 均小于 2.2%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.3 重现性试验: 取同批次样品(批号 20071201) 6 份, 制备供试品溶液, 按上述色谱条件测定, 结果显示共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 2.2%, 共有峰的相对峰面积 RSD 均小于 2.8%。

①收稿日期: 2009-09-11

基金项目: 广东省奥港联合关键领域重点突破项目(2006984202)

作者简介: 张小红(1979—), 女, 江西新余人, 助理讲师, 硕士研究生, 主要从事中药新剂型研究。E-mail: susanzhx123@126.com

*通讯作者 钱星文 Tel: (020) 62789288-8302 E-mail: qianxw2003@126.com

2.3.4 空白试验:精密吸取空白溶剂甲醇 10 μL ,注入液相色谱仪,记录 180 min 内的色谱峰。结果表明,溶剂对清风胶囊指纹图谱中共有峰检出无干扰。

2.4 指纹图谱的建立

2.4.1 特征峰及参照峰的选择:《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行 2002 年)》对 10 批清风胶囊样品进行测定,对不同供试品所得的指纹图谱进行分析,选择稳定性和重复性好、吸收强、特征明显的色谱峰为共有峰,标定 16 个共有峰(图 1)。由样品指纹图谱可见 8 号峰峰型对称,峰面积较大,与左右峰都能达到基线分离,故选择该峰为制定指纹图谱的参照峰。经对照测定,该峰为青风藤药材中青藤碱所产生。统计各共有特征峰相对峰面积,其中共有峰占总峰面积的 81%,符合共有峰的要求。各特征峰的相对保留时间和相对峰面积见表 2。

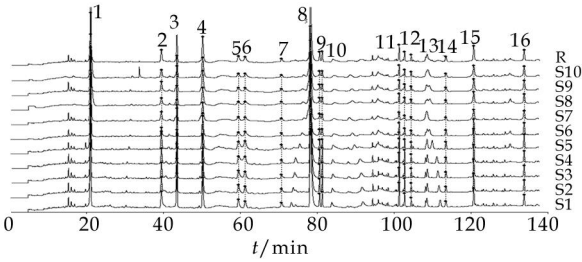


图 1 10 批不同清风胶囊样品的指纹图谱

Fig.1 Fingerprints of ten batches of Qingfeng Capsula

表 2 共有指纹峰的平均相对保留时间、相对峰面积

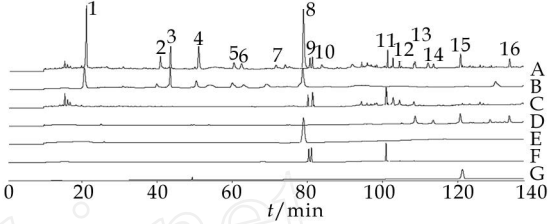
Table 2 Average relative retention time and average relative peak area of common peaks

峰号	相对保留时间	相对峰面积	峰号	相对保留时间	相对峰面积
1	0.269	0.699	9	1.024	0.082
2	0.513	0.149	10	1.033	0.087
3	0.554	0.250	11	1.287	0.092
4	0.645	0.325	12	1.305	0.046
5	0.765	0.098	13	1.327	0.037
6	0.788	0.108	14	1.443	0.060
7	0.906	0.058	15	1.534	0.016
8	1.000	1.000	16	1.700	0.078

2.4.2 指纹图谱中特征峰的归属分析:取清风胶囊处方中药材,按清风胶囊的制备工艺及供试品制备方法制备药材溶液;同时取青藤碱、人参皂苷 Rg_1 、 Re 、 Rb_1 及延胡索乙素对照品用甲醇配成适当质量浓度,即得;依法进样测定,通过比较色谱保留时间及紫外光谱特征确定制剂中各峰与药材的相关性。

成品中 16 个特征色谱峰在对应的药材具有很好的明显归属性,其中 1~8 与清风藤药材有明显归属性;9~13 与人参药材有明显归属性;14~16 与延

胡索药材有明显归属性;其中 8 号峰为青风藤中的青藤碱,9、10、11 号峰人参中的人参皂苷 Rg_1 、 Re 、 Rb_1 , 15 号峰为延胡索中所延胡索乙素,结果见图 2。



A-样品 B-青风藤 C-人参 D-延胡索 E-青藤碱
F-人参皂苷 Rg_1 、 Re 、 Rb_1 G-延胡索乙素
A-sample B- *Caulis Sinomenii* C- *Radix Ginseng* D- *Rhizoma Corydalis* E- sinomenine
F- ginsenoside Rg_1 、 Re 、 Rb_1 G- tetrahydropalmatine

图 1 清风胶囊指纹图谱特征峰归属

Fig.1 Characteristic peak attribution in fingerprint of Qingfeng Capsula

2.4.3 相似度的计算:采用国家药典委员会开发的中药色谱指纹图谱相似度评价系统研究版(2004A),将色谱工作站中的数据导入该软件,选定上述 16 个特征峰进行谱峰匹配,通过中位数矢量计算得出清风藤胶囊 10 批样品指纹图谱的共有模式,并以此共有模式为标准图谱,计算各批样品的相似度,见表 3。结果 10 批样品平均相似度为 0.988。一般情况下,相似度大于 0.9 即认为相似度良好^[4],因此 10 批清风胶囊的 HPLC 指纹图谱相似度良好。

表 3 10 批清风胶囊样品的相似度

Table 3 Similarities of ten batches of Qingfeng Capsula

样品号	相似度	样品号	相似度
S1	0.990	S6	0.991
S2	0.981	S7	0.982
S3	0.976	S8	0.983
S4	0.982	S9	0.965
S5	0.974	S10	0.969

2.4.4 指纹图谱共有模式的确立:用国家药典委员会提供的中药色谱指纹图谱相似度评价系统对 10 批清风胶囊进行模式识别,获得了清风胶囊的指纹图谱的共有模式,见图 3。

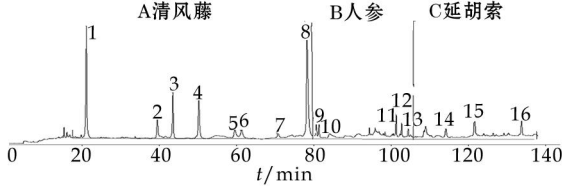


图 3 清风胶囊共有模式指纹图谱

Fig.3 Common mode fingerprint of Qingfeng Capsula

3 讨论

指纹图谱技术是国际公认的控制中药质量的有效手段,它以其信息量大的特点克服了中药材、中成药的复杂性。本实验通过高效液相色谱法建立了清风胶囊的指纹图谱,结果表明10批不同清风胶囊各峰的相对保留时间基本一致,色谱图形基本一致。同时该方法可以对处方主要药材进行鉴定,同时对药材中的已知主要有效物质进行鉴定,为该制剂的质量控制提供很好的依据。

通过对图谱的分析,在色谱图中8号峰面积大、分离效果好;通过归属分析该峰为君药青风藤药材中的青藤碱峰。青藤碱是青风藤中生物碱成分,也是中国药品生物制品检定所确认的标准物质,因此选定8号峰为本指纹图谱技术要求的参照峰。

本制剂为中药复方制剂,成分复杂,故采用梯度洗脱。通过分析本品主要含生物碱和皂苷类物质,而生物碱的高效液相法测定时,一般采用 pH 值较

高的流动相系统,所以色谱柱的选择时选用能耐受高 pH 的色谱柱。分别考察了依利特柱、戴安柱、Waters柱及Ultimate柱对指纹图谱的分离情况,结果显示,Ultimate柱对色谱峰的峰分离好,峰型对称,故选Ultimate色谱柱作为检测柱;同时比较甲醇-水-磷酸盐缓冲液及乙腈-水-磷酸盐缓冲液等系统以及不同的梯度洗脱方法等,结果发现本实验采用的乙腈-水-磷酸盐缓冲液系统可以使样品色谱峰得到较好地分离,且色谱峰峰形较好,故选用该系统为流动相。

参考文献:

- [1] 莫志贤,王彩云,罗晓云,等. 清风胶囊用于海洛因依赖者脱毒治疗的临床观察[J]. 中药材,2003,7(26):531-533.
- [2] 高秀丽,蒋倩,张敏,等. 龙血竭胶囊的HPLC指纹图谱研究[J]. 中草药,2009,39(6):855-857.
- [3] 孙宁,秦培勇,谭天伟. 乳快消片HPLC指纹图谱的研究[J]. 中草药,2009,39(11):1659-1661.
- [4] 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)[S]. 2002.

HPLC-DAD 法测定炮制辅料吴茱萸汁中绿原酸、吴茱萸内酯、吴茱萸碱和吴茱萸次碱

蒋俊^{1,2},贾晓斌^{1,2,*},陈彦¹,蔡宝昌³,吴皓³

- (1. 江苏省中医药研究院中药新型给药系统重点实验室,国家中医药管理局中药释药系统重点研究室,江苏南京 210028;
2. 江苏大学药学院,江苏镇江 212013; 3. 南京中医药大学江苏省中药炮制重点实验室,江苏南京 210029)

摘要:目的 测定黄黄连的炮制辅料吴茱萸汁中3类组分的4个代表性成分吴茱萸碱、吴茱萸次碱、吴茱萸内酯、绿原酸,为黄黄连炮制辅料吴茱萸汁的质量控制提供重要依据。方法 采用HPLC-DAD法,色谱柱为Zorbax SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸,梯度洗脱程序;体积流量:1 mL/min;检测波长:205、225、324 nm;柱温:25℃。结果 绿原酸、吴茱萸内酯均为水溶性成分,在吴茱萸汁中的质量分数分别为6.638、8.234 mg/g,吴茱萸碱和吴茱萸次碱均为脂溶性成分,在吴茱萸汁中的质量分数分别为0.406、0.380 mg/g。结论 黄黄连的炮制辅料吴茱萸汁中主要含有绿原酸、吴茱萸内酯、吴茱萸碱、吴茱萸次碱等成分,对这些成分进行测定,可为黄黄连炮制辅料吴茱萸汁的质量控制提供重要依据。

关键词:黄黄连;炮制辅料;吴茱萸汁;高效液相色谱

中图分类号:R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2010)03-0396-03

黄黄连的炮制是取吴茱萸汁制黄连,炮制目的是用药性辛热的吴茱萸来抑制黄连的苦寒之性,使黄连寒而不滞的同时又增强黄连清气分湿热,散肝胆郁火的功效,主要用于积滞内阻、胸膈痞闷、胁肋胀满、下痢脓血等症^[1]。吴茱萸具有散寒止痛、助阳

止泻等功能^[2],主要含有生物碱、苦味素、挥发油、萜类、有机酸类等成分,其中吴茱萸碱、吴茱萸次碱等生物碱类成分和吴茱萸内酯等苦味素类成分为主要活性成分^[3]。因此吴茱萸汁的制备及其质量将直接影响到黄黄连的临床疗效。目前,对吴茱萸药材或

①收稿日期:2009-08-10

基金项目:江苏省中医药领军人才专项(2006);江苏省中药炮制重点实验室开放课题(ZYPZ002)

作者简介:蒋俊(1986—),男,江苏镇江人,主要从事中药新剂型、新技术和中药炮制、制剂分析等方面研究。

Tel:(025)85637809 E-mail:xuyan9323@126.com

*通讯作者 贾晓斌 Tel:(025)85637809 E-mail:jxiaobin2005@hotmail.com