

香连丸的 HPLC 指纹图谱研究

黄艳萍¹, 刘德玲¹, 刘小燕², 谭晓梅³

1. 广东食品药品职业学院, 广东 广州 510520

2. 广州白云山制药总厂, 广东 广州 510515

3. 南方医科大学中医药学院, 广东 广州 510515

摘要: 目的 建立香连丸的 HPLC 指纹图谱, 为香连丸的质量控制提供科学依据。方法 采用 HPLC 法, 以甲醇-25 mmol 磷酸二氢钾溶液为流动相梯度洗脱, 检测波长 254 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 25 °C, 建立了不同批号的香连丸指纹图谱。结果 10 批香连丸中各共有色谱峰的相对保留时间 RSD 均小于 1.0%, 标示出 12 个共有色谱峰, 10 批样品 HPLC 指纹图谱相似度良好。结论 该方法重现性好, 可为香连丸的质量评价提供科学依据。

关键词: 香连丸; 指纹图谱; 高效液相色谱法; 黄连; 质量控制

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)10-2014-03

HPLC fingerprint of Xianglian Pills

HUANG Yan-ping¹, LIU De-ling¹, LIU Xiao-yan², TAN Xiao-mei³

1. Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China

2. Guangzhou Baiyunshan Pharmaceutical Factory, Guangzhou 510515, China

3. School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Key words: Xianglian Pills; fingerprint; HPLC; *Coptidis Rhizoma*; quality control

香连丸是由萸黄连和木香组成的复方制剂, 具有清热化湿、行气止痛的功效, 方中萸黄连的有效成分为小檗碱、巴马汀和药根碱等生物碱^[1], 木香的有效成分为木香烃内酯和去氢木香内酯^[2]。目前, 市场上香连丸品种繁多, 质量参差不齐, 使得临床疗效无法得到保证。《中国药典》2010 年版一部仅以盐酸小檗碱作为香连丸的定量测定指标, 有文献报道^[3]采用 HPLC 法测其多种生物碱的量。指纹图谱是顺应中药多组分、多靶点的整体综合作用的特点, 从“全成分”的角度出发的一种现代中药质量控制方法, 对非单一成分药物的质量控制更加全面^[4-6]。为更全面地控制该制剂的质量, 本实验采用 HPLC 法建立了香连丸的指纹图谱, 并与对照药材同条件下分析。经试验初步确定了香连丸中指纹峰的归属, 为该制剂的质量分析提供依据, 建立更加可靠的分析方法。

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪, DAD 检测器(美

国 Agilent 公司); Milli-Q 超纯水纯化系统(18 MΩ, Millipore 公司); AS5150BD—1 型超声清洗器(天津奥特赛恩仪器有限公司); PB—10 型精密 pH 计、BP221D 电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。

盐酸小檗碱、吴茱萸碱、表小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀对照品均由中国药品生物制品检定所提供; 香连丸样品(批号 4060003、4060005、4060011、4060012、4070001、4070002、4070006、4070008、4070010、4070013)均由广州白云山制药总厂提供。甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Shimadzu Inertsil ODS-SP 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇(A)-25 mmol/L 磷酸二氢钾溶液(B)(pH 4.5), 梯度洗脱程序: 0~10 min, 10%~30% A; 10~20 min, 30%~45% A; 20~30 min, 45%~55% A; 30~50 min, 55%~60%

收稿日期: 2010-12-30

基金项目: 广东省中医药管理局建设中医药强省资助项目(2009272)

作者简介: 黄艳萍(1976—), 男, 高级实验师, 研究方向为中药质量分析及评价。Tel: (020)37216552 E-mail: hypgz@126.com

A; 50~60 min, 60%~10% A; 检测波长 230 nm; 柱温 35 ℃; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μ L。

2.2 香连丸供试品溶液的制备

取装量差异项下的香连丸, 研细, 取 0.50 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加入约 40 mL 甲醇超声 30 min (250 W, 40 kHz), 待冷却至室温后, 定容, 摇匀。取出适量离心 (12 000 r/min, 5 min) 后, 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取批号 4060003 样品制备的供试品溶液, 连续进样 5 次, 考察各共有色谱峰相对保留时间 (t_R)、相对峰面积 (A_R) 的一致性, 结果显示各共有色谱峰 t_R 、 A_R 基本没有明显变化, 各共有色谱峰 t_R 的 RSD 均小于 0.8%, 共有色谱峰 A_R 的 RSD 均小于 1.8%。

2.3.2 稳定性试验 取批号 4060003 样品制备的供试品溶液, 分别在 0、3、6、12、24 h 进样, 考察各共有色谱峰 t_R 、 A_R 的一致性, 结果显示各共有色谱峰 t_R 、 A_R 基本没有明显变化, 各共有色谱峰 t_R 的 RSD 均小于 0.9%, 共有色谱峰 A_R 的 RSD 均小于 2.1%, 符合指纹图谱要求。

2.3.3 重现性试验 取批号 4060003 的样品 5 份, 分别制备供试品溶液, 同法进行测定, 考察各共有色谱峰 t_R 、 A_R 的一致性, 结果显示各共有色谱峰 t_R 、 A_R 基本没有明显变化, 各共有色谱峰 t_R 的 RSD 均小于 0.8%, 共有色谱峰 A_R 的 RSD 均小于 1.8%。符合指纹图谱要求。

2.3.4 空白试验 精密吸取空白溶剂甲醇 10 μ L, 注入液相色谱仪, 记录 65 min 内的色谱峰, 结果表明, 空白溶剂对香连丸指纹图谱中共有峰检出无干扰。

2.4 指纹图谱的建立与分析

2.4.1 图谱的获得 精密吸取各香连丸供试品溶液 10 μ L, 按上述色谱条件进样分析, 记录色谱图, 结果见图 1。

2.4.2 共有峰和参照峰的确定 以 10 批样品的测定结果进行分析, 选择稳定性和重现性好、吸收强、特征明显的色谱峰为共有峰, 标定 12 个共有峰 (图 1)。由样品指纹图谱可见 10 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, 该峰为黄连药材中小檗碱。统计各共有特征峰 A_R , 其中共有峰占总峰面积的 85%, 符合共有峰的要求。各特征峰的 t_R 和 A_R 见表 1。

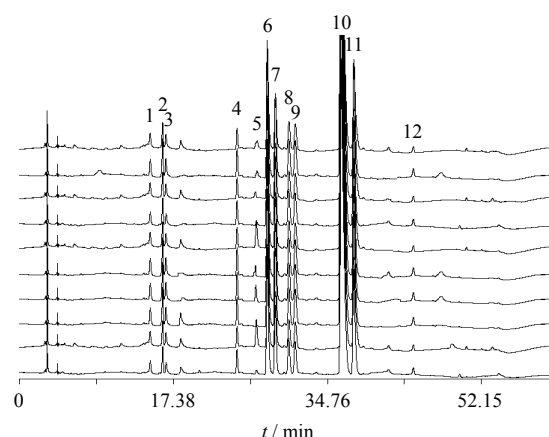


图 1 10 批不同香连丸样品的指纹图谱

Fig. 1 Fingerprints of ten batches of Xianglian Pills

表 1 共有指纹峰的平均 t_R 和 A_R

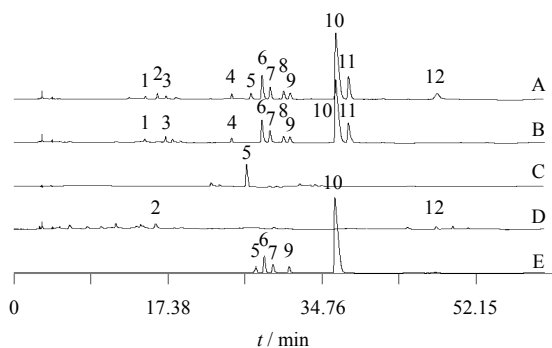
Table 1 Average t_R and A_R of common peaks

峰号	t_R	A_R	峰号	t_R	A_R	峰号	t_R	A_R
1	0.408	0.014	5	0.738	0.006	9	0.859	0.063
2	0.446	0.029	6	0.771	0.224	10	1.000	1.000
3	0.457	0.016	7	0.797	0.119	11	1.040	0.224
4	0.678	0.028	8	0.839	0.068	12	1.149	0.004

2.4.3 指纹图谱中特征峰的归属分析 取香连丸处方中各药材, 按香连丸的制备工艺及供试品制备方法制备各药材供试品溶液; 同时取盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱、表小檗碱及吴茱萸碱对照品用甲醇配成适当质量浓度, 即得对照品溶液。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 5 个特征色谱峰在对应的药材具有很好的明显归属, 其中 5 号峰为吴茱萸药材中吴茱萸碱, 6、7、9、10 号峰分别为黄连药材中的盐酸药根碱、表小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱, 结果见图 2。

2.4.4 相似度计算 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 12 个特征峰进行谱峰匹配, 通过中数矢量计算得出香连丸 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, 结果见表 2。10 批样品平均相似度为 0.988。10 批香连丸的 HPLC 指纹图谱相似度良好。

2.4.5 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 批香连丸进行模式识别, 获得了香连丸的指纹图谱的共有模式, 见图 3。



1-吴茱萸碱 2-盐酸药根碱 3-表小檗碱 4-盐酸巴马汀 5-盐酸小檗碱
A-香连丸样品 B-黄连 C-吴茱萸 D-木香 E-混合对照品
1-evodiamine 2-jateorrhizine hydrochloride 3-epiberberine
4-palmatine hydrochloride 5-berberine hydrochloride
A-Xianglian Pills sample B-Coptidis Rhizoma C-Euodiae Fructus
D-Aucklandiae Radix E-mixed reference substances

图2 香连丸指纹图谱特征峰的归属

Fig. 2 Characteristic peak attribution in fingerprint of Xianglian Pills

表2 10批香连丸样品的相似度

Table 2 Similarities of ten batches of Xianglian Pills

样品号	相似度	样品号	相似度	样品号	相似度
4060003	0.991	4070001	0.962	4070010	0.995
4060005	0.985	4070002	0.958	4070013	0.988
4060011	0.984	4070006	0.983		
4060012	0.983	4070008	0.995		

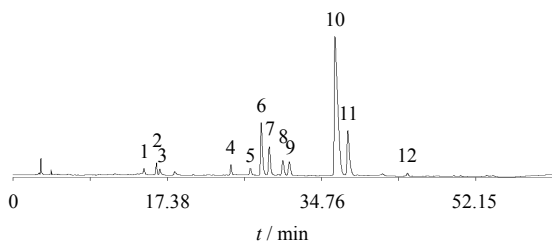


图3 香连丸共有模式指纹图谱

Fig. 3 Common mode fingerprint of Xianglian Pills

3 讨论

香连丸中所含的生物碱有异喹啉和吲哚类, 两者 pK_b 和极性等方面相差较大, 对流动相的选择有一定难度, 试验中采用乙腈-水 (含 0.5% 甲酸, 0.2% 氨水)、乙腈-水 (含 0.5% 甲酸, 0.2% 氨水, 1.25 g/L 十二烷基磺酸钠)、甲醇-0.01 mmol/L 三乙胺水溶液 (冰醋酸调 pH 7.0)、甲醇-25 mmol/L 磷酸二氢钾溶液 (磷酸调 pH 4.6) 系统的梯度洗脱作为流动相, 结果以甲醇-25 mmol/L 磷酸二氢钾溶液 (pH 4.6) 溶液系统洗脱效果更佳。利用 DAD 检测器进行紫外扫描检测, 对 210、220、254、276、345、430 nm 6 个

波长下检测的色谱图进行比较, 结果供试品溶液在 254 nm 检测波长下检出峰数最多、峰面积均较大, 故选择 254 nm 作为检测波长。比较了 Kromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Eclipse XDB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Hypersil ODS (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Shimadzu Inertsil ODS-SP (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 4 种色谱柱对指纹图谱的分离情况, 结果显示 Shimadzu Inertsil ODS-SP (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱对色谱峰分离良好, 峰型对称, 选择其作为检测用色谱柱。通过对甲醇及不同含水量乙醇作为溶媒进行筛选, 确定了采用甲醇作为提取溶媒。通过比较超声处理、索氏提取与水浴回流提取, 结果超声提取主要色谱峰没有缺失, 且操作简便, 因此, 选择超声提取方法。

通过对照品定位对照及 DAD 的光谱功能分析, 鉴定了 5 个主要特征峰, 包括吴茱萸碱、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱和表小檗碱。通过香连丸与各单味药进行定位对照及 DAD 光谱分析, 结果绝大部分特征峰的归属明确, 主要特征成分来源于黄连。根据同类成分具有类似的紫外光谱, 通过 DAD 光谱, 基本确定了主要特征峰的类型。指纹图谱中 2、12 号峰与木香药材有明显归属性。

本实验分析了 10 批香连丸的 HPLC 指纹图谱, 结果表明不同批次样品均具有 12 个特征峰, 峰面积相对量有一定的差异性, 与 10 批均值生成的对照相比, 相似度均大于 0.98, 结果表明, 所建立的方法可以较好评价香连丸的质量。

参考文献

- [1] 戈早川, 周建明. 胶束薄层扫描法测定黄连及其制剂中的小檗碱、巴马汀和药根碱 [J]. 分析化学, 2004, 32(1): 99-101.
- [2] 徐宇, 方鲁延, 谈红, 等. HPLC 法测定木香中去氢木香内酯的含量 [J]. 中草药, 2004, 35(12): 1416-1417.
- [3] 吴玉琼, 胡芳弟, 封士兰, 等. 高效液相色谱法测定香连丸及其组方药材中 5 种活性组分的含量 [J]. 分析测试技术与仪器, 2009, 15(4): 220-225.
- [4] 张铁军. 中药质量认识与质量评价 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 1-9.
- [5] 张小红, 朱卫丰, 雷晓林, 等. 清风胶囊的高效液相色谱指纹图谱的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 394-396.
- [6] 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.