

桂枝茯苓胶囊 HPLC 指纹图谱研究

李家春, 孙 兰, 李红娟, 肖 伟, 毕宇安, 王振中*

江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

摘要: 目的 建立桂枝茯苓胶囊指纹图谱质量控制方法。方法 采用 HPLC 法测定, 色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.02%三氟乙酸溶液梯度洗脱; 检测波长 230 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 结果 10 批桂枝茯苓胶囊指纹图谱中标示出 13 个共有峰, 各峰分离度大于 1.5, 峰形良好。结论 该方法稳定可靠, 可以用于桂枝茯苓胶囊生产过程的质量控制与产品质量控制。

关键词: 桂枝茯苓胶囊; 指纹图谱; 质量控制; HPLC; 相似度

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)07-1333-03

HPLC fingerprint of Guizhi Fuling Capsule

LI Jia-chun, SUN Lan, LI Hong-juan, XIAO Wei, BI Yu-an, WANG Zhen-zhong

Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

Key words: Guizhi Fuling Capsule; fingerprint; quality control; HPLC; similarity

桂枝茯苓胶囊处方源于经典名方汉代张仲景的《金匱要略》, 全方由桂枝、茯苓、白芍、牡丹皮、桃仁等组成, 具有活血化瘀、缓消癥块的功效, 临床上主要用于治疗妇科痛经、子宫肌瘤、子宫内膜异位症、卵巢囊肿、乳腺增生等症^[1-2]。鉴于桂枝茯苓胶囊在化学组成上是一个复杂体系^[3-4], 各成分构成不明确, 有效成分和杂质没有明确的划分, 化学成分间共存的相互作用不明确, 而中药指纹图谱能够部分反映中药中所含化学成分的组成、数量及其适当的比例关系。为了更好地反映桂枝茯苓胶囊的内在质量, 本实验对桂枝茯苓胶囊指纹图谱进行了应用研究。

1 仪器与材料

Agilent 1200 型高效液相色谱仪 (包含两元泵、柱温箱、在线脱气机、自动进样器、MWD 检测器), BP211D 型电子分析天平 (德国 Sartorius 公司), Centrifuge 5415D 高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); Milli-Q Academic 纯水机 (法国 Millipore); KQ-250DB 型超声波清洗仪 (昆山市超声仪器有限公司)。

芍药苷对照品 (批号 110736-200732, 中国药品生物制品检定所), 桂枝茯苓胶囊试生产样品 (批号分别为 080401、090601、090701、090901、091001、091201、100101、100201、100301、100401, 江苏康缘药业股份有限公司提供)。乙腈、三氟乙酸 (色谱纯, Tedia 公司), 甲醇 (分析纯, 南京化学试剂公司), 超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.02%三氟乙酸 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~5 min, 5% B; 5~20 min, 5%~17% B; 20~30 min, 17%~19% B; 30~40 min, 19%~26% B; 40~60 min, 26%~88% B; 检测波长 230 nm; 进样量 10 μL; 柱温 30 ℃; 体积流量 1.0 mL/min; 理论塔板数按芍药苷峰计算不低于 4 000。

2.2 对照品溶液的制备

取芍药苷对照品适量, 精密称定, 加 50%甲醇制成 0.25 mg/mL 对照品溶液。

收稿日期: 2011-12-31

基金项目: 科技部“重大新药创制”科技重大专项 (2009ZX09504-004)

作者简介: 李家春 (1977—), 男, 硕士, 主要从事药品质量标准研究。Tel: (0518)85521949 E-mail: ljclgy2010@163.com

*通讯作者 王振中 Tel: (0518)85521956 E-mail: wzzhz-nj@163.net

网络出版时间: 2012-06-19 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120619.1732.003.html>

2.3 供试品溶液的制备

取本品内容物适量,混匀,研细,取约0.25 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入50%甲醇25 mL,超声处理(250 W, 40 kHz) 30 min,放冷,离心(12 000 r/min, 10 min),取上清液作为供试品溶液。

2.4 指纹图谱的生成及共有峰的确定

吸取10个不同批号的桂枝茯苓胶囊供试品溶液各10 μ L,依据“2.1”项下色谱条件,进样测定,生成指纹图谱及对照指纹图谱(R)。比较各批色谱图,均有稳定的13个色谱峰,且分离度良好,因此确定此13个峰为共有峰。色谱图见图1。

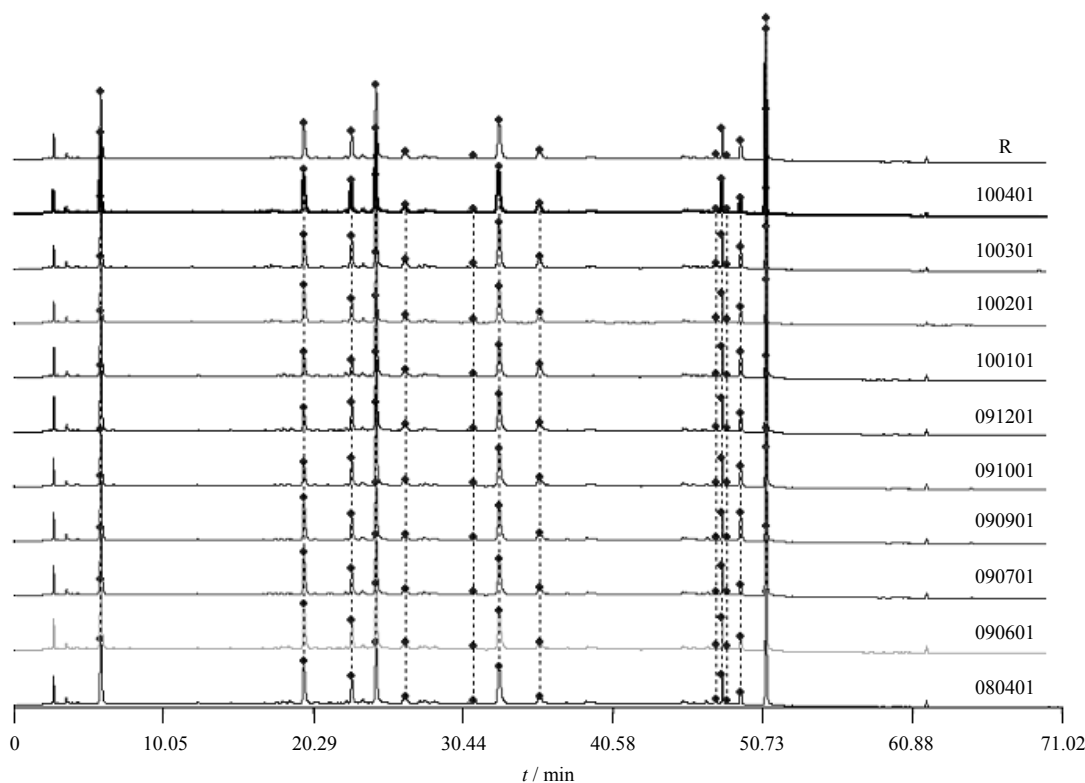


图1 10批桂枝茯苓胶囊HPLC指纹图谱及对照指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprint for ten batches of Guizhi Fuling Capsule and their reference fingerprint

2.5 溶剂峰与滞后峰的考察

测试结果表明溶剂无干扰,延长至2倍保留时间,未见有滞后峰。

2.6 精密度试验

取批号为080401的桂枝茯苓胶囊试生产样品,按“2.2”项下方法制备,依据“2.1”项下色谱条件,连续进样6次,以相对保留时间和相对峰面积的值为指标,计算其RSD,考察进样精密度,结果显示共有峰的相对保留时间RSD均小于1.41%,相对峰面积RSD均小于3.52%。

2.7 稳定性试验

取批号为080401的桂枝茯苓胶囊试生产样品,按“2.2”项下方法制备,依据“2.1”项下色谱条件,在0、4、8、12、18、24 h分别进样测定,以相对保留时间和相对峰面积的值为指标,计算其RSD,

考察供试品溶液稳定性,结果显示共有峰的相对保留时间RSD均小于0.69%,相对峰面积RSD均小于3.78%。表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.8 重复性试验

取批号为080401的桂枝茯苓胶囊试生产样品,按“2.2”项下方法制备,平行制备6份,依据“2.1”项下色谱条件,分别进样测定,以相对保留时间和相对峰面积的值为指标,计算其RSD,考察供试品处理方法的重复性,结果显示共有峰相对保留时间RSD均小于0.21%,共有峰的相对峰面积RSD均小于4.34%。

2.9 指纹图谱技术参数及相似度计算

13个共有峰的峰面积占总峰面积的90%以上,其中1、4(S峰)、7、13号峰的峰面积大于总峰面积的10%,占总峰面积的66.3%,2、3号峰的峰面

积大于总峰面积的 5%，占总峰面积的 10.5%。依据 LC-MS 对指纹图谱中特征峰的定性分析^[3]，各指纹峰所对应的化学成分分别是：没食子酸（1 号峰）、芍药内酯苷（3 号峰）、芍药苷（4 号峰）、1,2,3,4,6-β-五没食子酰葡萄糖（7 号峰）、肉桂酸（9 号峰）、苯甲酰芍药苷（10 号峰）、桂皮醛（12 号峰）、丹皮酚（13 号峰）。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统（A 版，国家药典委员会）进行评价，得 10 批桂枝茯苓胶囊指纹图谱的相似度结果分别为 0.993、0.994、0.994、0.990、0.993、0.994、0.990、0.999、0.997、0.998。

2.10 指纹图谱共有峰的归属及相关性分析

对指纹图谱中的部分共有峰进行了归属，见图 2，其中 1、2、4、6、7、10 号峰来自白芍与牡丹皮，3、11 号峰来自白芍，5、8、13 号峰来自牡丹皮，9、12 号峰分别为肉桂酸和桂皮醛来自桂枝^[5]。桃仁与茯苓在指纹图谱中的相关性没有得到体现，其原因主要为两药材中主要成分的紫外最大吸收波长靠近末端吸收，在 230 nm 波长下吸收系数较小，如茯苓中的三萜类成分与桃仁中的甾苷类成分。指纹图谱中体现这两种药材共有峰的表达，尚有待在高灵敏度的质量型检测器中进一步研究。

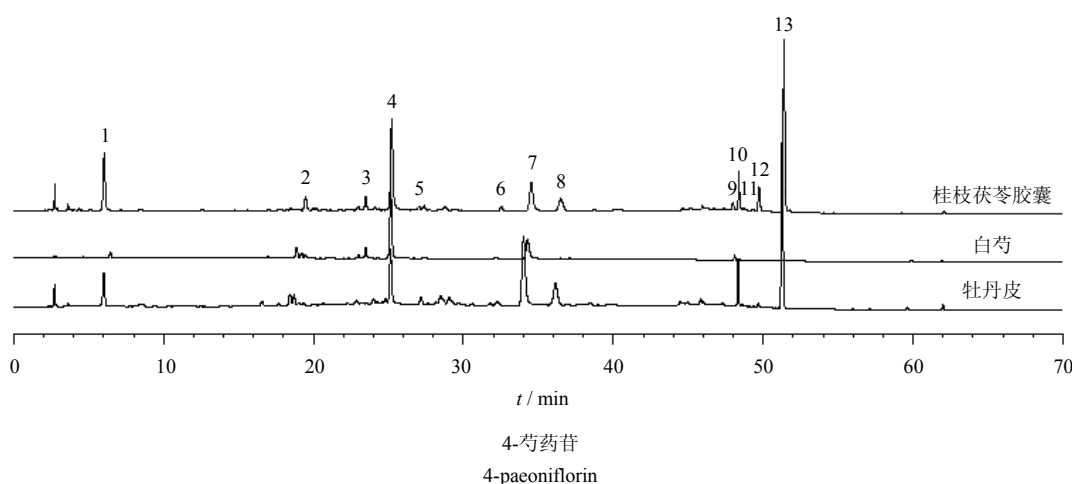


图 2 桂枝茯苓胶囊部分特征峰的归属

Fig. 2 Some characteristic peak assignments in fingerprint of Guizhi Fuling Capsule

3 讨论

3.1 检测波长与色谱条件的确定

根据全波长（200~400 nm）扫描的三维图谱可以看出，在 230 nm 处各成分响应值较高，表达的信息最为丰富，且在此波长的梯度洗脱条件下基线较为平稳，故确定检测波长为 230 nm。

实验过程中分别对甲醇-0.02%三氟乙酸、乙腈-水、乙腈-0.02%三氟乙酸等色谱条件进行了考察。结果表明乙腈-0.02%三氟乙酸系统最佳，各峰分离度大于 1.5，峰形尖锐，保留时间适中，因此选择其为色谱条件。

3.2 提取方法的选择

考察了回流提取与超声提取方式，以及乙醇及 100%、70%、50%甲醇提取溶剂，结果表明，超声

处理优于回流，50%甲醇提取的色谱峰最为完全。提取时间优选的结果表明，30 min 提取较为完全。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 汪朝晖, 杜彦萍, 黄习文, 等. 桂枝茯苓胶囊治疗乳腺增生病 (瘀血阻络证) 临床研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2009, 26(2): 103.
- [3] 王振中, 李 成, 李家春, 等. 桂枝茯苓胶囊化学成分研究 (I) [J]. 中草药, 2011, 42(5): 856-858.
- [4] 朱克近, 王振中, 李 成, 等. 桂枝茯苓胶囊化学成分研究 (II) [J]. 中草药, 2011, 42(6): 1087-1089.
- [5] 王振中, 李家春, 窦 霞, 等. 液相色谱-质谱联用法对桂枝茯苓胶囊指纹图谱中特征峰的鉴定 [J]. 南京中医药大学学报, 2009, 25(3): 194-196.