

强肝胶囊 HPLC 指纹图谱研究

韦 辉¹, 刘素香^{2,3,4}, 刘 毅^{2,3,4}, 张铁军^{2,3,4*}, 陈常青^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院, 天津 300193

3. 天津市中药质量控制技术工程实验室, 天津 300193

4. 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

摘要: 目的 建立强肝胶囊 HPLC 指纹图谱并对其进行化学模式识别。方法 采用 Diamonsil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 在 230 nm 波长下, 以乙腈-0.05%磷酸水溶液进行梯度洗脱, 测定了 44 批强肝胶囊样品; 应用相似度分析软件建立强肝胶囊指纹图谱的共有模式, 并对色谱峰进行了指认。结果 建立强肝胶囊 HPLC 指纹图谱, 在确定的方法下, 得到 44 批强肝胶囊的色谱图, 并获得了 44 批样品的相似度; 确定共有峰 14 个, 其中 13 个归属到各药材, 11 个已确认成分。结论 强肝胶囊的 HPLC 指纹图谱的构建和共有色谱峰成分的确定为强肝胶囊药品质量控制提供参考。

关键词: 强肝胶囊; HPLC; 指纹图谱; 化学模式识别; 共有模式

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)07-0845-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.07.014

HPLC fingerprint of Qianggan Capsule

WEI Hui¹, LIU Su-xiang^{2,3,4}, LIU Yi^{2,3,4}, ZHANG Tie-jun^{2,3,4}, CHEN Chang-qing²

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

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. Tianjin Engineering Laboratory of Quality Control Technology of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

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

Abstract: Objective To establish HPLC fingerprint for Qianggan Capsule and identify the chemical pattern recognition. **Methods** The HPLC method was used with Diamonsil-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), under the 230 nm detection wavelength, gradient eluted by acetonitrile-0.05% H₃PO₄. The common mode of HPLC fingerprint for 44 batches of Qianggan Capsule was established with similarity analyses and the peaks were identified. **Results** Under the selected spectrum condition, the HPLC fingerprint for 44 batches of Qianggan Capsule and similarities for 44 batches of samples were obtained. Fourteen peaks were found, 13 belong to herbs and 11 were assigned. **Conclusion** The establishment of HPLC fingerprint of Qianggan Capsule and the identification of peaks provide more reference for the quality control of Qianggan Capsule.

Key words: Qianggan Capsule; HPLC; fingerprint; chemical pattern recognition; common mode

强肝胶囊收载于国家药典委员会编《国家药品标准》, 由茵陈、板蓝根、丹参、白芍、秦艽等 16 味药组成, 具有清热利湿、补脾养血、益气解郁之功效^[1]。研究证明, 强肝胶囊有较强的抗肝纤维化作用, 具有保护肝细胞、促进肝细胞再生、恢复肝功能和抑制纤维化作用^[2], 其中多种中药成分对肝

损伤均有明显抑制作用。陈理等^[3]采用 HPLC 法同时测定强肝胶囊中丹参酮 II_A 和甘草酸的量, 罗晨曲等^[4]利用 HPLC 法对强肝胶囊中龙胆苦苷进行测定。现行的用 1~2 种化学成分表征中药质量的质控方法, 无法全面表征中药制剂的物质基础和化学成分的整体性和复杂性, 难以全面控制强肝胶囊的

收稿日期: 2012-08-16

作者简介: 韦 辉 (1986—), 女, 天津中医药大学硕士研究生。Tel: (022)23006840 E-mail: weihui0100@126.com

*通信作者 张铁军 Tel: (022)23006848 E-mail: tiejunzh2000@yahoo.com.cn

陈常青 Tel: (022)23006829 E-mail: chencq@tjpr.com

内在质量。本研究采用 HPLC 法建立了强肝胶囊的指纹图谱,并对所得图谱进行分析,建立了强肝胶囊指纹图谱的指标参数评判标准,为全面控制强肝胶囊的质量提供了参考。

1 仪器与材料

安捷伦液相色谱仪 1100 系列,包括 G1310A 四元液相梯度泵、G1313A 自动进样器、G1314A VWD 检测器、CO—201 柱温箱、安捷伦色谱工作站。AB204—N 电子天平 (Mettler Toledo); Autoscience As3120 超声仪; Seastae R501B 旋转蒸发仪。

乙腈为色谱纯,甲醇、乙醇、磷酸均为分析纯,水为天磁纯净水。龙胆苦苷 (批号 110770-200712)、芍药苷 (批号 0736-9710)、甘草苷 (批号 111610-200503)、没食子酸 (批号 110831-200302)、丹参素 (批号 110855-200507) 均购自中国药品生物制品检定所,质量分数均 $\geq 98\%$; 丹酚酸 B (质量分数 $\geq 98\%$) 购自天津一方科技有限公司; 芍药内酯苷 (质量分数 $\geq 98\%$) 购自深圳市美和生物科技有限公司; 甘草酸单铵盐 (质量分数 $\geq 98\%$) 购自天津一方科技有限公司; 茵陈、板蓝根、丹参、白芍、秦艽等 16 味药材 (均由天津药物研究院张铁军研究员鉴定符合《中国药典》2010 年版及相关法定标准规定) 和 44 批强肝胶囊成品均由石家庄东方药业有限公司提供,批号见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 检测波长 230 nm; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μ L; 流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液,梯度洗脱: 0~15 min, 0~10%乙腈; 15~50 min, 10%~30%乙腈; 50~65 min, 30%~60%乙腈; 65~70 min, 60%~100%乙腈。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取芍药苷、龙胆苦苷、丹参素、甘草苷、丹酚酸 B、芍药内酯苷、没食子酸、甘草酸单铵盐对照品适量,精密称定,用 70%甲醇制成各对照品溶液。

2.2.2 强肝胶囊供试品溶液 取本品内容物,混匀,取胶囊粉末约 1.0 g,精密称定,置烧瓶中,加入 70%甲醇 100 mL,超声处理 1 h,取下,放至室温,离心 5 min,取上清液浓缩至约 10 mL,用约 20 mL 水溶解转移至分液漏斗中,用水饱和的正丁醇萃取 3 次,每次用量分别为 30、20、20 mL,合并 3 次萃

表 1 强肝胶囊样品

Table 1 Samples of Qianggan Capsule

编号	批号	编号	批号
S1	20100651	S23	20100537
S2	20100652	S24	20100542
S3	20100316	S25	20100427
S4	20100215	S26	20100429
S5	20091250	S37	20100541
S6	20091146	S28	20100434
S7	20090934	S29	20100539
S8	20090522	S30	20100322
S9	20090203	S31	20100540
S10	20081037	S32	20100432
S11	20071035	S33	20100428
S12	20070205	S34	20100325
S13	20100320	S35	20100536
S14	20100426	S36	20091038
S15	20100433	S37	20100214
S16	20100538	S38	20091143
S17	20100543	S39	20070925
S18	20100430	S40	20071245
S19	20100317	S41	20070415
S20	20100431	S42	20081244
S21	20100319	S43	20090310
S22	20110435	S44	20090416

取液,减压浓缩至干,用甲醇溶解定容至 10 mL 量瓶中,摇匀,0.45 μ m 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 各药材供试品溶液 取茵陈、板蓝根、丹参、白芍、秦艽等药材粉末,各约 1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50%甲醇 20 mL,称定质量,超声提取 30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,0.45 μ m 微孔滤膜滤过,取续滤液,作为药材对照溶液。

2.2.4 各阴性对照溶液 取按强肝胶囊处方比例分别制备的缺各味药材的阴性样品,按“2.2.2”项下方法制备,即得阴性对照溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取批号为 20100316 的胶囊样品 1 份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,精密量取同一供试品溶液,连续进样 5 次,考察色谱峰相对保留时间和相对峰面积的一致性。8 号峰芍药苷峰形好,分离度较好,且为强肝胶囊原质控指

标,为主要有效成分,因此选为参照峰,计算其中14个色谱峰相对保留时间的RSD均小于0.6%,相对峰面积的RSD均小于4.0%。

2.3.2 重复性试验 取批号为20100316的胶囊样品5份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,考察色谱峰相对保留时间和相对峰面积的一致性。以芍药苷为参照峰,计算其中14个色谱峰相对保留时间的RSD均小于0.1%,相对峰面积的RSD均小于5.0%。

2.3.3 稳定性试验 取批号为20100316的胶囊样品1份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别在0、3、6、9、12、24 h进样分析,考察色谱峰相对保留时间和相对峰面积的一致性。以芍药苷为参照峰,计算其中14个色谱峰相对保留时间的RSD均小于0.2%,相对峰面积的RSD均小于4.0%。表明供试品溶液在24 h内基本稳定。

2.4 指纹图谱的测定及共有峰的确定

按照确定的指纹图谱检测方法测定了44批强肝胶囊指纹图谱,对44批样品指纹图谱进行数据分

析,结果确定有14个色谱峰为强肝胶囊所共有,因此,确定其为共有指纹峰,且共有峰的总面积占总峰面积的90%以上。

2.5 指纹图谱分析

采用国家药典委员会编的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统2004A版”。参数设置:(1)参照图谱:采用批号为20100651样品的色谱图(S1)作为相似度计算时校正的参照图谱。(2)时间窗宽度:0.10。(3)校正方式:多点校正。校正色谱峰的确定:实验记录了保留时间2 h的色谱图,结果表明特征峰在0~65 min收集完全,因此,在指纹图谱检测方法中规定仅记录0~65 min中的特征峰。(4)指纹图谱的生成:从44批中选择10批样品色谱图生成指纹图谱见图1-A,生成的对照指纹图谱见图1-B,相似度计算结果见表2,10批样品相似度均在0.9以上,符合要求。将测定获得的44批样品数据采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004B)》与生成的对照指纹图谱进行了相似度评价,结果见表3。

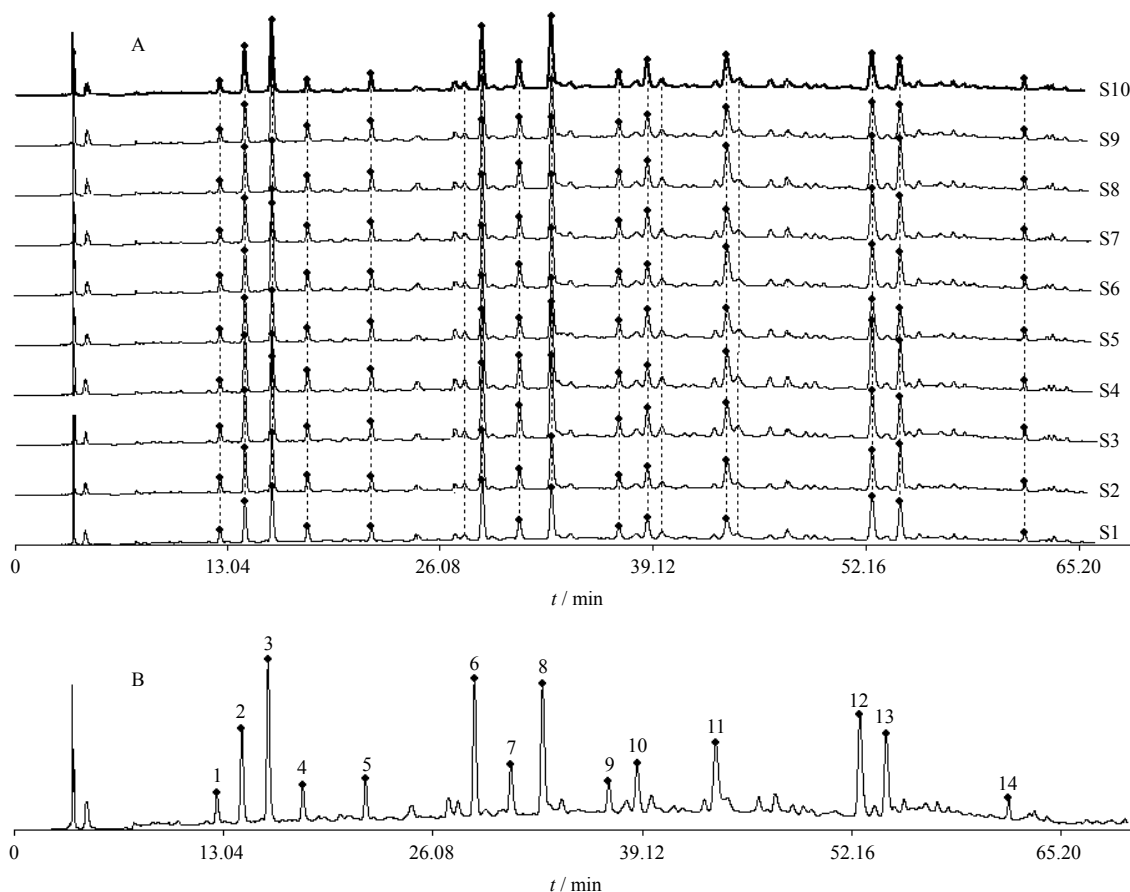


图1 10批强肝胶囊样品指纹图谱(A)和对照指纹图谱(B)

Fig. 1 HPLC fingerprints of 10 batches of Qianggan Capsule samples (A) and reference fingerprint (B)

表2 10批样品相似度评价结果
Table 2 Similarities for 10 batches of samples

批号	相似度	
	参照图谱	对照图谱
20100651	1.000	0.988
20100319	0.992	0.980
20100435	0.994	0.987
20100537	0.973	0.981
20100542	0.978	0.991
20100427	0.995	0.993
20100429	0.980	0.971
20100541	0.945	0.965
20100325	0.938	0.961
20100316	0.955	0.984

表3 44批样品相似度评价结果
Table 3 Similarities for 44 batches of samples

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.988	S23	0.981
S2	0.984	S24	0.991
S3	0.984	S25	0.993
S4	0.988	S26	0.971
S5	0.991	S27	0.965
S6	0.990	S28	0.991
S7	0.914	S29	0.983
S8	0.979	S30	0.990
S9	0.957	S31	0.982
S10	0.924	S32	0.992
S11	0.753	S33	0.992
S12	0.858	S34	0.961
S13	0.913	S35	0.993
S14	0.990	S36	0.995
S15	0.994	S37	0.988
S16	0.969	S38	0.968
S17	0.987	S39	0.898
S18	0.988	S40	0.839
S19	0.977	S41	0.904
S20	0.983	S42	0.813
S21	0.980	S43	0.971
S22	0.987	S44	0.949

上述数据表明, 44批样品中仅有5批样品相似度低于0.9, 其余39批强肝胶囊的指纹图谱的相似度均大于0.9。说明本品的质量稳定性较好。相似度

低于0.9的样品批号分别为20071035、20070205、20070925、20071245、20081244, 均为2007、2008年生产, 可能与当年原料药材有关。

2.6 色谱峰指认

2.6.1 对照药材归属 分别精密吸取供试品溶液, 16味药材及各阴性样品溶液10 μ L, 注入高效液相色谱仪, 记录65 min色谱图。对保留时间一致且阴性样品图谱中未出现的色谱峰进行分析比较, 根据紫外光谱信息, 对全方与药材指纹谱中的相关峰进行指认, 确定特征峰的药材归属。通过强肝胶囊复方与全方药材相关性研究, 确认强肝胶囊复方HPLC指纹图谱的14个共有特征峰的来源, 其中1个峰不能得到归属, 其余指纹峰来自白芍(4个)、丹参(3个)、甘草(2个)、秦艽(2个)、茵陈(1个)、黄芪(1个), 5号峰可能来自秦艽或/和茵陈。

2.6.2 对照品法指认复方中各成分 利用对照品对各峰的成分进行指认, 分别精密吸取供试品溶液、对照品溶液各10 μ L, 注入高效液相色谱仪, 记录65 min色谱图, 通过各峰保留时间和色谱行为的比较, 对各峰进行指认。共指认了8个色谱峰, 分别为2号峰(没食子酸)、4号峰(丹参素)、6号峰(龙胆苦苷)、7号峰(芍药内酯苷)、8号峰(芍药苷)、10号峰(甘草苷)、12号峰(丹酚酸B)、14号峰(甘草酸)。

2.6.3 HPLC-MS指认复方中各成分

(1) HPLC 色谱条件: 乙腈-0.05%甲酸溶液作为流动相, 梯度洗脱条件: 0~15 min, 0%~10% A; 15~50 min, 11%~30% A; 50~65 min, 30%~60% A; 65~70 min, 60%~100% A; 70~75 min, 100%~0% A; 体积流量0.4 mL/min; 检测波长230 nm。

(2) MS 分析条件: 仪器为Agilent Technologies Device List: 1290-ALS G4226A, 1290-Bin pump G4220A, 1290-Column, 1290-DAD G4212A, MS Q-TOF。采用ESI法。气体温度: 350.00 $^{\circ}$ C; 气体体积流量8 L/min; 喷雾器压力241.325 kPa; Scan Segments Scan Seg[#] Ion Polarity 1 Negative Scan Segment 1; TOF/Q-MS 质谱仪离子捕获方式: MSI, 范围 m/z 100~1 700, 扫描速度 m/z 1.4; 扫描源参数: VCap 3 500, 碰撞诱导解离150, Skimmer 1 65, OctopoleRFPeak 750。

(3) 测定结果: 实验同时比较了在ESI“+”离子和“-”离子条件下的信息情况, 结果在“-”离子条件下离子信息较多; 而在“+”离子条件下, 噪

音的水平相对较高,ESI“+”离子和“-”离子条件测定结果见图 2。

通过对各化合物的质谱裂解信息的分析,并结合现有对照品和文献报道进行比对,对强肝胶囊中

化学成分进行了结构推测。结果指出 7 个主要成分,见表 4。经过质谱指认,可以确定 9 号峰黄芪成分为毛蕊异黄酮苷,11 号峰白芍成分为没食子酰芍药苷,13 号峰丹参成分为丹酚酸 A,5 号峰仍未

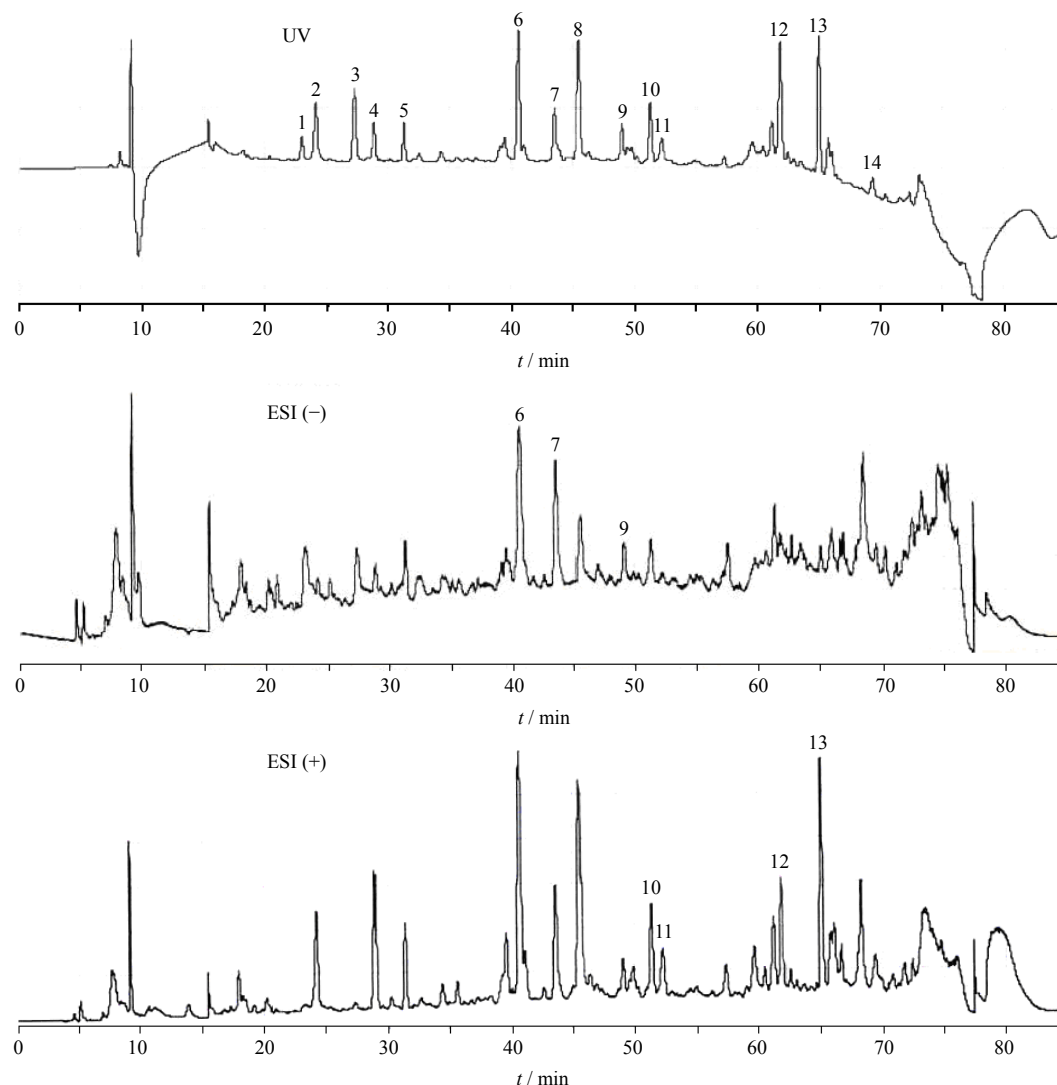


图 2 强肝胶囊样品液质图谱

Fig. 2 LC-MS chromatogram of Qianggan Capsule

表 4 强肝胶囊 HPLC-MS 分析结果

Table 4 HPLC-MS analytic results of Qianggan Capsule

峰号	保留时间 / min	$[M-H]^- (m/z)$	化合物
6	40.159~40.951	356	龙胆苦苷
7	43.138~43.988	481	芍药内酯苷
9	48.574~49.283	447	毛蕊异黄酮苷
10	50.739~51.602	417	甘草苷
11	51.980~52.477	631	没食子酰芍药苷
12	61.624~61.919	717	丹酚酸 B
13	64.755~65.027	494	丹酚酸 A

知。结合上述对照品指认结果,14 个峰中 11 个峰已确定了成分。

3 讨论

分别对提取溶剂、提取方式、提取时间、萃取溶剂和萃取次数进行考察,实验结果表明,70%甲醇超声 1 h,正丁醇萃取 3 次所得色谱峰总数多,且峰面积相对较大,分离度好。

初始采用甲醇-0.05%磷酸水溶液进行梯度洗脱,龙胆苦苷、芍药苷等成分未能很好地洗脱出来,基线漂移严重,把有机相改成乙腈,基线基本平稳,

各峰分离度有所改善,且峰形较好。

使用二极管阵列检测器对样品进行 200~400 nm 的全波长扫描,并对各波长下的色谱图进行分析比较。结果表明,在 230 nm 下检测到峰的数目较多,各峰分离良好,特征峰明显且峰形较好,从图谱中可以尽可能地获取色谱组分信息以反映体系组成的全貌,且 230 nm 为原指标成分芍药苷的最大吸收,因此选定 230 nm 为测定波长。

本品提取工艺为水煎煮,其中化学成分多为水溶性成分,因此选用了 HPLC 法建立其指纹图谱主要针对水溶性成分。在选定的色谱条件下,测定了 44 批强肝胶囊样品指纹图谱,得到 44 批强肝胶囊与对照图谱的相似度,其中 5 批相似度在 0.9 以下。经过分析,2007、2008 年产胶囊样品的指纹图谱中,一些峰相对峰面积减小,一些峰相对峰面积增大,其原因可能与不同年限所投料药材的品种、质量、产地、来源不同有关;或是生产过程中操作步骤不同引起,也可能是放置年限导致的某些峰相对峰面积减小。所以,对于强肝胶囊的质量应该从源头和生产全过程进行监测,严格控制原药材的质量及其投放量,对生产过程中提取、浓缩、干燥的温度和时间予以严格控制,如有必要,可检测各提取液的指标分量,从而保证强肝胶囊成分中有效成分的

量相对稳定。

实验研究过程中发现,在强肝胶囊指纹图谱中,丹参酚酸 B 的色谱峰降低而丹参素和丹酚酸 A 的色谱峰在增加,在同批的丹参药材图谱中丹参素峰很小,而且未检测到丹酚酸 A 峰,因此,推测丹酚酸 B 在提取过程中可能部分转化为丹参素和丹酚酸 A,具体原因有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 国家药品标准·新药转正标准 (第 35 册) [S]. 2004.
- [2] 陈四喜, 侯循亚, 李 英. 强肝胶囊治疗日本血吸虫病早期肝纤维化的临床研究 [J]. 热带病与寄生虫学, 2006, 4(2): 78-80.
- [3] 陈 理, 孙靖霞. 高效液相色谱法测定强肝胶囊中丹参酮 II_A 及甘草酸的含量 [J]. 中国新药杂志, 2001, 10(6): 436-437.
- [4] 罗晨曲, 吕情花, 彭建军, 等. HPLC 法测定强肝胶囊中龙胆苦苷的含量 [J]. 中国药房, 2008, 19(36): 2849-2850.
- [5] 黎 阳, 刘素香, 张铁军, 等. 枳实的高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2009, 40(9): 1469-1474.
- [6] 黎 阳, 刘素香, 张铁军, 等. 麻仁软胶囊的指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2011, 42(6): 1097-1100.