

双山颗粒剂 HPLC 指纹图谱研究

陈勇*, 谢臻, 韦韬, 郑锡任, 张龙, 周媛
(广西中医药大学药学院, 南宁 530001)

[摘要] 目的:建立双山颗粒 HPLC 指纹图谱分析方法,科学评价并有效控制双山颗粒剂质量。方法:采用反相高效液相色谱法,色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱 (4.6 mm×250 mm,5 μm),乙腈-0.1% 磷酸溶液梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 340 nm,柱温 25 ℃。结果:以绿原酸为参照峰,建立了双山颗粒剂 HPLC 指纹图谱,确立了 13 个共有峰,供试品之间的共有峰相似度 >0.98。结论:该方法准确,精密度、重复性较好,可作为控制双山颗粒质量的依据。
[关键词] 双山颗粒; 绿原酸; 高效液相色谱指纹图谱; 相似度
[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)24-0110-03

Studies on HPLC Fingerprint of Shuangshan Granules

CHEN Yong*, XIE Zhen, WEI Tao, ZHENG Xi-ren, ZHANG Long, ZHOU Yuan
(Faculty of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

[Abstract] Objective: HPLC chromatographic fingerprints for Shuangshan granules were developed in order to evaluate the internal quality. Method: HPLC analysis was performed at 25 ℃ by using a Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with the gradient elute of mobile phase consisting of acetonitrile-0.1% glacial acetic acid at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The UV detection was set at 340 nm. Result: Chlorogenic acid was used as the reference substance in the HPLC chromatographic fingerprint of Shuangshan Granules, which showed 13 common peaks and the similarity was 0.98 among 10 samples. Conclusion: This method was accurate, repeatable and useful for the quality control of Shuangshan granules.
[Key words] Shuangshan granules; chlorogenic acid; HPLC fingerprint; similarity

双山颗粒剂由山绿茶和山楂两味药材配伍而成,具有清热解毒、化湿消积之功效,用于热毒内蕴证咽喉炎、扁桃体炎及小儿疳积等症^[1]。山绿茶具有清热解毒、消肿止痛、活血通脉的功效,可用于降血压、降血脂、降胆固醇及冠心病、脑血管意外所致的偏瘫,以及风热感冒、肺热咳嗽、咽喉水肿、扁桃体炎、痢疾等症^[2]。现代药理研究表明,山绿茶醇提取物对四氧嘧啶所致的糖尿病小鼠具有较好的降血糖作用^[3],而山绿茶中 illexgenin A 对移植性肝癌所造

成的肝功能具有明显的保护作用^[4]。山楂具有消食健胃、行气散瘀的功效^[5]。现代医学研究表明,山楂叶总黄酮可减轻高尿酸血症大鼠血尿酸及血管内皮细胞功能损伤^[6],山楂饮具有促进小鼠溃疡愈合、改善炎症反应的作用^[7]。

本文通过分析比较 10 批次双山颗粒剂的色谱图,建立了该颗粒剂 HPLC 指纹图谱鉴别方法。实验结果表明各批次的双山颗粒剂色谱图具有良好的相似度,该法可以用于双山颗粒剂的质量控制。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Agilent 型 1100 高效液相色谱仪及色谱工作站(美国安捷伦科技有限公司),BP211D 型电子分析天平(德国赛多利斯),Millipore simplicity-185 型超纯水器(美国密理博公司),SB2200-T 型超声波清洗器(上海必能信公司)。

1.2 试药 双山颗粒剂 10 批(广西金秀圣堂药业有限责任公司提供,批号 20080401,20081201,

[收稿日期] 20111214(006)
[基金项目] 广西自然科学基金创新研究团队项目 (2011GXNSFF018006)
[通讯作者] * 陈勇,教授,硕士研究生导师,从事中药及其制剂质量分析的研究, Tel: 0771-3137585, E-mail: cy6381@163.com

20081202, 20090303, 20090304, 20090404, 20090801,20091201,20101001,20101201);山绿茶药材(采自广西上林县,经陈勇教授鉴定为冬青科植物海南冬青 *Ilex hainanensis* Merr. 的干燥叶);山楂药材(广西金秀圣堂药业有限责任公司提供,经我院中药鉴定教研室鉴定为蔷薇科植物山里红 *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br. 或山楂 *Crataegus pinnatifida* Bge. 的干燥成熟果实);绿原酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110753-200413,供含量测定用);水为超纯水;甲醇、乙腈为色谱纯;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),乙腈-0.1% 磷酸溶液为流动相,按表 1 进行梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 340 nm,柱温 25 ℃,进样量 10 μL。

表 1 流动相梯度洗脱

t/min	乙腈/%	0.1% 磷酸溶液/%
0	8	92
20	15	85
40	20	80
50	23	77
60	30	70
75	30	70

2.2 供试品溶液的制备 取双山颗粒 5.0 g,精密称定,加入 50% 乙醇 25 mL,称定质量,超声处理 15 min,放冷,再称定质量,用 50% 乙醇补足缺失的质量,摇匀,于 0.46 μm 滤膜滤过,即得。

2.3 药材供试品溶液的制备 参照双山颗粒原质量标准^[2],精密称取处方各味药材,水煎煮提取 1.5 h,滤过,定容至 25 mL,摇匀,于 0.45 μm 滤膜滤过,即得。

2.4 对照品溶液的制备 取绿原酸对照品适量,精密称定,加 50% 乙醇制成每 1 mL 含绿原酸 0.106 mg 对照品溶液。

2.5 精密度试验 取同一批供试品溶液,连续进样 6 次,在上述色谱条件下记录色谱图。结果各主要色谱峰的相对峰面积 RSD 在 0.41 ~ 2.51%,相对保留时间 RSD 在 0.03 ~ 0.27%,符合指纹图谱研究技术要求。

2.6 稳定性试验 取同一批供试品溶液,在上述色谱条件下,分别在 0,2,4,8,12,24 h 进样分析,结果各主要色谱峰的相对峰面积 RSD 在 0.18% ~

2.90%,相对保留时间 RSD 在 0.09% ~ 0.59%,表明样品在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取同一批供试品 6 份,按 2.2 项下的方法制备并测定,结果各主要色谱峰的相对峰面积的 RSD 在 0.26% ~ 2.88%,相对保留时间的 RSD 在 0.01% ~ 0.11%,表明方法重复性良好。

3 指纹图谱的建立及技术参数

3.1 参照色谱峰的建立 根据《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》规定,实验选取绿原酸峰(第 S 号峰)作为参照物峰,进行相对保留时间和相对峰面积的计算,符合指纹图谱研究需要。在同样色谱条件下,取绿原酸对照品溶液和供试品溶液分别进样,色谱图见图 1,2。

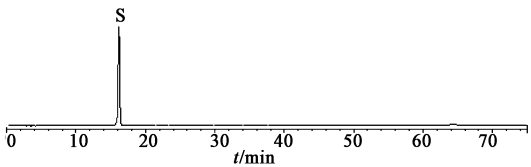


图 1 绿原酸对照品 HPLC

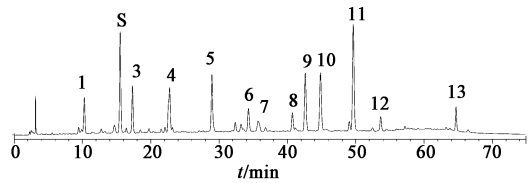


图 2 双山颗粒 HPLC

3.2 共有指纹峰的标定及归属 借助《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版》软件,对指纹图谱的相关参数进行自动匹配,标定药材的 13 个共有指纹峰。选择编号为 1 的双山颗粒图谱为参照图谱,以中位数法作为对照指纹图谱的生成方法,设定时间窗宽度为 0.40 min,提取双山颗粒的共有模式建立对照指纹图谱。结果见图 3。分别取山绿茶和山楂药材供试品溶液,按上述色谱条件进样分析,根据各色谱峰保留时间和紫外吸收光谱特征认定共有峰 1 ~ 13 来源于山绿茶;共有峰 1,2,4,5,10,12,13 为山绿茶与山楂共有。山楂药材中有 1,S,4,5,10,12,13 峰。结果见图 4 ~ 5。由于该制剂的处方工艺为水提,因此,双山颗粒中来源于山楂的成分较少,多为水溶性成分,在此色谱条件下,山楂药材供试品色谱图中的色谱峰较少。但从色谱图可以看出,山楂中绿原酸的含量较高,而绿原酸具有广泛的抗菌作用。因此,双山颗粒可用于治疗热毒内蕴证咽喉炎、扁桃体炎等炎症。结果见图 4 ~ 5。

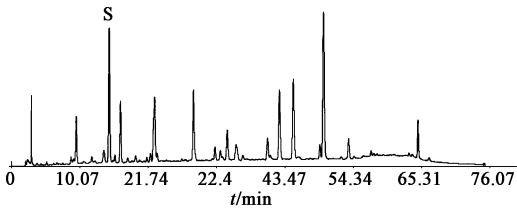


图 3 共有模式建立对照指纹图谱

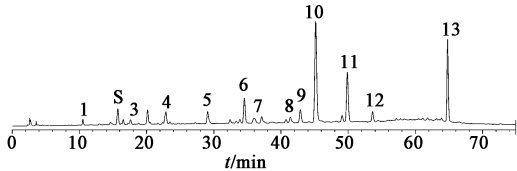


图 4 山绿茶药材 HPLC 图

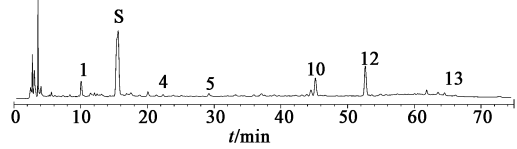


图 5 山楂药材 HPLC

3.3 指纹图谱的采集 按照 2.2 项下的方法制备 10 批次双山颗粒供试品溶液,建立其 HPLC 指纹图谱。10 批双山颗粒 HPLC 叠加色谱图见图 6。

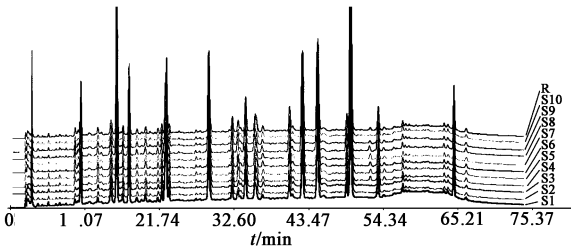


图 6 10 批双山颗粒 HPLC 指纹图谱

3.4 指纹图谱的分析 指纹图谱的相似度是通过色谱的整体性和模糊性来体现的,在不可能清楚中药复方制剂的所有成分时,指纹图谱相似度的评价可以反映制剂内在质量的均一性和稳定性^[8]。借助《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版》软件对双山颗粒 HPLC 指纹图谱进行分析,各色谱图中共有峰总面积占有所有色谱峰面积比在 90.47% ~ 98.13%。10 批供试品色谱图与对照指纹图谱相似度均 >0.99,供试品批间相似度均 >0.98,表明相似度较好。结果见表 2。

4 讨论

比较了甲醇-水系统、甲醇-磷酸系统、乙腈-水系统和乙腈-磷酸等系统,结果表明在乙腈-磷酸系统条件下,主要色谱峰分离度较好,本实验流动

表 2 10 批双山颗粒指纹图谱相似度

No.	批号	相似度	No.	批号	相似度
1	20080401	0.995	6	20090404	0.998
2	20081201	0.995	7	20090801	0.998
3	20081202	0.995	8	20091201	0.998
4	20090303	0.998	9	20101001	0.997
5	20090304	0.998	10	20101201	0.997

相条件^[9]可将 3 个很好分离。
结果表明在 340 nm 下各色谱峰的表现丰度较高,并能充分反映样品组分全貌,基线也较为平稳,故选择 340 nm 为测定波长。
本实验参照《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》建立了双山颗粒 HPLC 指纹图谱,对色谱参数进行匹配和运算。实验虽然收集了多个批号的样品,采用 HPLC 法作为获取化学数据的手段,进行了双山颗粒剂指纹图谱研究,但所获得的信息可以从一个侧面反映该制剂的质量评价。

[参考文献]

[1] 国家药品监督管理局. 国家中成药标准汇编(中成药地方标准上升国家标准部分)眼科耳鼻喉科皮肤科分册[S]. 2002;127.

[2] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准第 20 册[S]. 南宁:广西科学技术出版社, 1992,137.

[3] 李萍,彭百承,李上球,等. 山绿茶醇提物对四氧嘧啶诱导糖尿病小鼠的降血糖作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(10):137.

[4] 程齐来,李洪亮. 山绿茶中 Ilexgenin A 抗大鼠移植性肝癌的作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(6):196.

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2005;22.

[6] 张知贵,杨华. 山楂中总黄酮对高尿酸血症大鼠血尿酸及血管内皮细胞功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(12):257.

[7] 王桂芳,赵保胜,石宇,等. 山楂饮灌胃联合愈疡生新方灌肠对小鼠 UC 的治疗作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(5):193.

[8] 谢培山. 中药色谱指纹图谱鉴别的概念、属性、技术与应用[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(10):653.

[9] 陈勇,谢臻,刘婧,等. HPLC 法测定山绿茶不同炮制品中绿原酸和芦丁的含量[J]. 广西中医药,2007,30(5):58.

[责任编辑 顾雪竹]