

实验研究

昆明山海棠片 HPLC 指纹图谱研究*

郭响香^{1,2} 王云红² 于金英^{2,3} 禹奇男^{2,3} 张传辉^{2,3} 杨荣平^{1,2,3**}

(1. 陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 重庆市中药研究院, 重庆 400065; 3. 成都中医药大学, 四川 成都 611137)

摘要:目的 建立昆明山海棠片 HPLC 指纹图谱。方法 采用 HPLC 法, 用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A(国家药典委员会)对 20 批昆明山海棠片制剂的数据进行分析、建立其指纹图谱, 并对该方法进行方法学验证。结果 不同批次样品图谱相似度均在 0.9 以上, 色谱方法可靠。结论 建立的指纹图谱能较全面地反映了制剂的质量, 其方法可靠且简单易行, 具有较好的重复性、适应性, 为昆明山海棠片的整体质量评价提供科学依据。

关键词:昆明山海棠片; 高效液相色谱法; 指纹图谱

中图分类号: R 927 文献标识码: A 文章编号: 1002-168X(2015)03-0088-04

DOI: 10.13424/j.cnki.jsctcm.2015.03.033

A Study on the HPLC Fingerprints of the Tripterygium Hypoglaucom Tablet

GUO Xiangxiang^{1,2}, WANG Yunhong², YU Jinying^{2,3}, YU Qi'nan^{2,3},
ZHANG Chuanhui^{2,3}, YANG Rongping^{1,2,3}

(1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China;

2. Chongqing Institute for Chinese Medical Researches, Chongqing 400065, China;

3. Chengdu University of Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

Abstract Objective: To establish the HPLC (high performance liquid chromatography) fingerprints for the Tripterygium Hypoglaucom Tablet. **Methods:** The data of 20 batches of Tripterygium Hypoglaucom Tablets were analyzed to establish the fingerprints with "similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of TCM" (version 2004A made by Natinal Pharmacopoeia commission) by HPLC and the established method was methodologically verified. **Results:** The similarity of the different batches was higher than 0.9 and the method was reliable. **Conclusion:** The established fingerprints can comprehensively reflect the qualities of the tablet and this method is easy, safe and feasible with good repeatability and adaptability to lay a scientific basis for the evaluation of the overall quality of the Tripterygium Hypoglaucom Tablet.

Keywords the Tripterygium Hypoglaucom Tablet; HPLC; fingerprint

昆明山海棠, 又称六方藤, 火把花等, 为卫矛科植物昆明山海棠 (*Tripterygium hypoglaucom* (levL) Hutch.) 的干燥根。秋、冬采挖, 除去泥土, 干燥。分布于长江以南部分省区及西南地区, 主产于云南楚雄、红河、玉溪、昆明等地。具有免疫

调节、抗炎、抗肿瘤及抗生育等作用, 临床上用于治疗类风湿性关节炎等多种疾病^[1,2]。其片剂昆明山海棠片具有祛风除湿, 舒筋活络, 清热解毒的功效。用于类风湿性关节炎、红斑狼疮。中药是中医防病治病的物质基础, 其质量直接影响中医

* 基金项目: 重庆市科委集成示范项目 (cstc2013jcsf10011); 重庆市科委科技平台与基地建设 (科研院所创新能力建设) 项目 (cstc2012pt-kyys10004); 重庆市科委科技平台与基地建设 (科研院所创新能力建设) 项目 (cstc2012pt-kyys10001)

** 通讯作者: 杨荣平, 研究员, 硕士生导师, 主要研究方向: 中药制剂新剂型新技术及中药制剂分析。E-mail: yangrp@cqacmm.com。

的临床疗效和中药的实验研究,也是关系到用药安全的大事。因此,中药的质量控制一直是中药研究和生产领域里的重要研究课题。中药指纹图谱是一种综合的、宏观的、可量化的手段,用于鉴别中药材和中成药真伪,评价原料药材、半成品和成品质量的均一性和稳定性。它与现行的单一指标成分或活性成分的鉴定相比,由于它所包含的信息是综合的、多层次的和具体量化的,因此更为科学和合理。利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)可直观分析不同批次制剂的质量差异^[3-5]。为全面评价昆明山海棠片的质量,本文拟建立该制剂的指纹图谱,旨在对该制剂进行整体质量评价及控制提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器 高效液相色谱仪 Waters 2695-2998 (四元泵, DAD 检测器, 在线脱气, 美国 Waters 公司); 岛津 20A 系列高效液相色谱仪(二元泵, 在线脱气, DAD 检测器, 自动进样器, 日本岛津公司); AW-220 型电子天平(万分之一, 岛津有限公司); CPA225D 型电子天平(十万分之一, 德国 Sartorius 公司); SB-5200DT 型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 试药 表儿茶素对照品(成都恩特生物科

技有限公司, 批号 MUST-13022906, 纯度 $\geq 98\%$); 乙腈、甲醇均为色谱纯, 磷酸为分析纯, 水为超纯水。实验所用的 20 批样品由重庆市中药研究院制药厂提供, 各样品批号(22060508, 22060116, 22070119, 22070910, 22070506, 22080601, 22081109, 22081007, 22090501, 22090212, 22090111, 22100903, 22100901, 22100404, 11090101, 11110303, 11110301, 12080401, 121006, 130310)。

1.3 指纹图谱相似度评估软件 中国药典委员会推荐的中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004A 版, 相关系数法)。

2 方法

2.1 色谱条件 色谱柱: welch Ultimate[®] XB-C₁₈ (4.6×250 mm, 5 μ m), 流动相: 乙腈(A)-0.1% 磷酸(B), 梯度洗脱(0-20 min, 9% A; 20-30 min, 9%-13% A; 30-35 min, 13% A; 35-90 min, 13-60% A; 90-105 min, 60-95% A; 105-110 min, 95% A), 检测波长: 210 nm, 流速: 1 mL/min, 柱温: 25 $^{\circ}$ C, 进样量: 10 μ L, 检测时间 110 min。

2.2 对照品溶液的制备 取表儿茶素对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成浓度为 3.46 mg \cdot mL⁻¹ 的溶液, 即得。对照品色谱图见图 1。

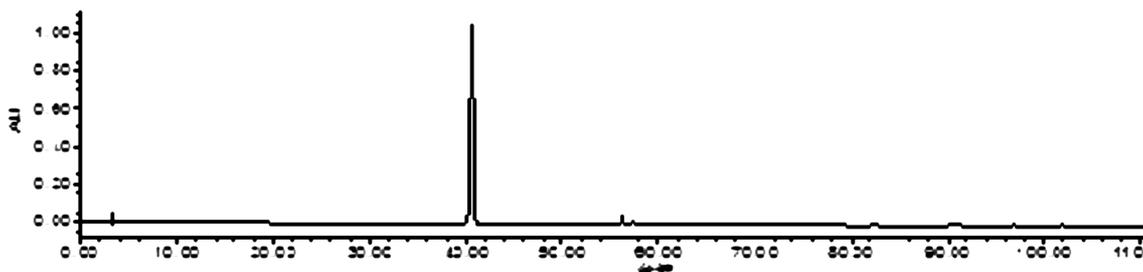


图1 表儿茶素对照品

2.3 供试品溶液制备方法考察

2.3.1 提取溶媒 取批号为 130310 的样品 10 g, 研细, 称取约 1 g, 置具塞锥形瓶中, 分别加水、甲醇、50% 甲醇、乙醇、50% 乙醇、乙酸乙酯 40 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液用乙酸乙酯萃取 3 次, 每次 20 mL, 合并萃取液于 50 $^{\circ}$ C 水浴蒸干。残渣加甲醇溶解并稀释至 5 mL, 摇匀, 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 即得。结果以水为溶媒制备的供试品溶液色谱峰较多, 峰高较高, 故选水为提取溶媒。

2.3.2 提取方法的考察 取批号为 130310 的样品 10 g, 研细, 按“2.4”项下供试品溶液的制备方法, 分别比较超声处理与回流处理的样品 HPLC 图谱, 结果回流与超声提取制剂的色谱图差别不大, 故选用操作简单易行的超声处理为提取方法。

2.3.3 提取时间的考察 取批号为 130310 的样品 10 g, 研细, 按“2.4”项下供试品溶液的制备方法, 分别比较了超声提取 15 min、30 min、45 min 的样品 HPLC 图谱。提取时间结果, 不同提取时间的色谱图差别不大, 故选用提取时间适中的 30 min 为提取时间。

2.3.4 萃取次数的考察 取批号为 130310 的样品 10 g, 研细, 按“2.4”项下供试品溶液的制备方法, 分别比较用乙酸乙酯萃取 1 次、2 次、3 次、4 次, 每次 20 mL 的萃取方法, 结果以乙酸乙酯萃取 3 次的样品 HPLC 图谱峰面积较高, 故选用此萃取方法。

2.4 供试品溶液的制备 综合以上考察结果, 我们确定昆明山海棠片 HPLC 指纹图谱供试品溶液

的制备方法为,取本品 10 g,研细,称取约 1 g,置具塞锥形瓶中,加水 40 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液用乙酸乙酯萃取 3 次,每次 20 mL,合并萃取

液于 50 ℃ 水浴蒸干。残渣加甲醇溶解并稀释至 5 mL,摇匀,0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。供试品溶液的色谱指纹图谱见图 2。

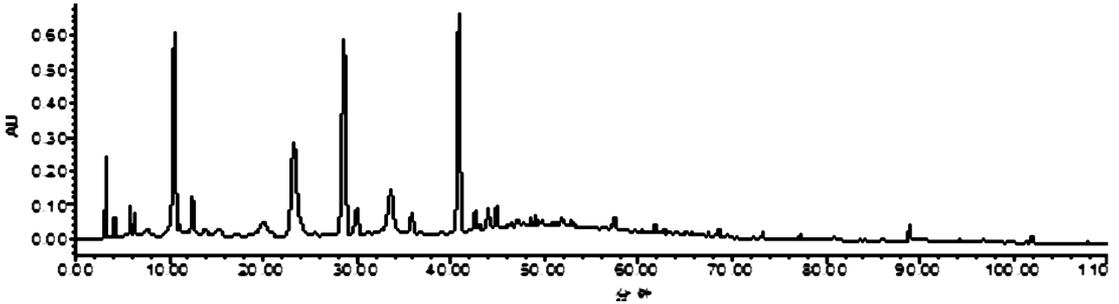


图 2 供试品溶液 HPLC 图谱

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 取批号为 130310 样品的供试品溶液 10 μL,按“2.1”项下色谱条件,连续进样 6 次,记录共有指纹峰保留时间和峰面积,计算相对保留时间和相对峰面积的 RSD。结果共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 均小于 3%,表明仪器精密度良好。

2.5.2 重复性试验 分别精密称取批号为 130310 的样品 6 份,按“2.4”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样,记录各指纹峰保留时间和峰面积,计算相对保留时间和相对峰面积的 RSD。结果共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积均 RSD 均小于 3%,表明该方法下供试品溶液重复性良好。

2.5.3 稳定性试验 取批号为 130310 样品的供试品溶液 10 μL,按“2.1”项下色谱条件分别于 0、4、6、8、12、24 h 进样,记录各指纹峰保留时间和峰面积,计算相对保留时间和相对峰面积的 RSD。结果共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 均小于 3%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5.4 耐用性实验

2.5.4.1 色谱柱与仪器 精密称取批号为 130310 的样品,按“2.4”项下方法制备供试品溶液,分别用 Waters 2695-2998 高效液相色谱仪、岛津 20A 系列高效液相色谱仪和 Cosmosil-C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm)、welch Ultimate XB-C8(4.6×250 mm,5 μm) 色谱柱,按“2.1”项下色谱条件进样,记录各指纹峰保留时间和峰面积。

2.5.4.2 柱温 精密称取批号为 130310 的样品,按“2.4”项下方法制备供试品溶液,“2.1”项下色谱条件进样,分别考察 25 ℃、30 ℃ 时的色谱指纹图谱,记录各指纹峰保留时间和峰面积,

2.5.4.3 流动相 pH 精密称取批号为 130310 的样品,按“2.4”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样,分别考察流动相系统为乙腈-0.1% 磷酸、乙腈-0.08% 磷酸、乙腈-0.12% 磷酸的色谱指纹图谱,记录各指纹峰保留时间和峰面积。

耐用性实验结果表明供试品溶液在外界环境微调的情况下,所测试结果基本一致,色谱方法可靠。

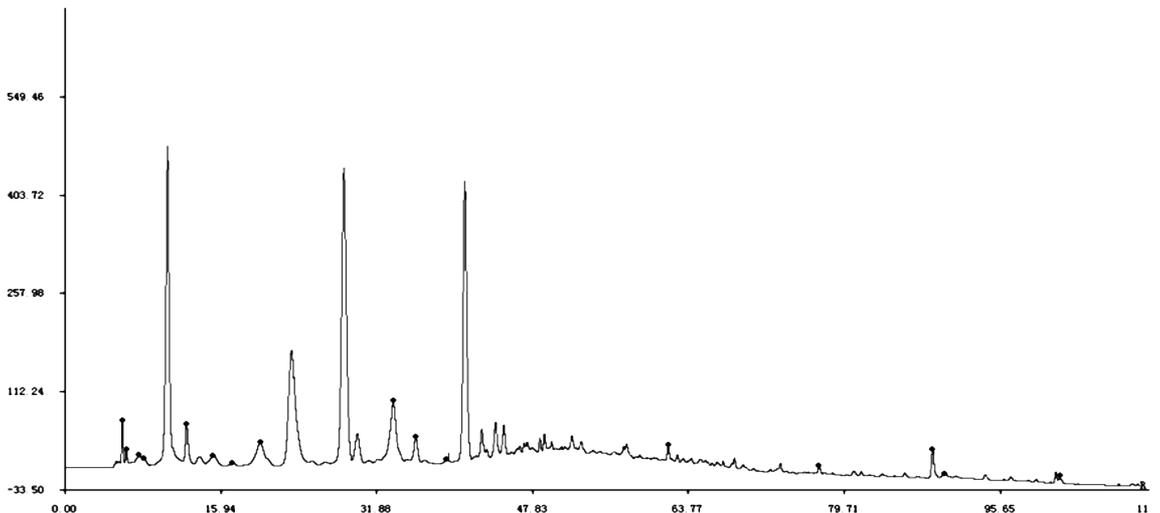


图 3 20 批昆明山海棠片 HPLC 指纹图谱共有模式图

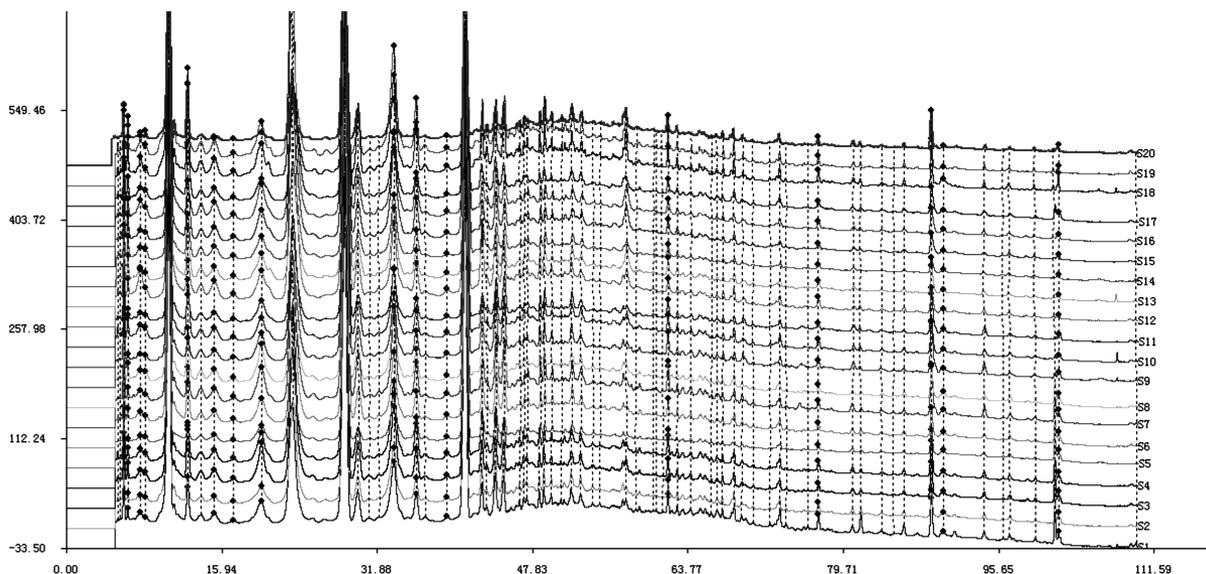


图4 20批火把花根片 HPLC 对照指纹图谱

2.6 指纹图谱的建立 分别取20批样品。按“2.4”项下制备供试品溶液,按“2.1”项下方法,测定并记录110 min的色谱图。根据20批供试品溶液的测定结果,分析确定了70个共有指纹峰。20批昆明山海棠片 HPLC 指纹图谱共有模式图,见图3、图4。

2.7 指纹图谱相似度 利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A)计算软件,采用相关系数法对20批昆明山海棠片进行了相似度计算,结果20批样品与对照指纹图谱相似度均在0.9以上,见表1。结果表明,20批样品相似度良好。

表1 相似度

批次	相似度	批次	相似度
22060508	0.984	22090111	0.993
22060116	0.994	22100903	0.990
22070119	0.997	22100901	0.998
22070910	0.996	22100404	0.997
22070506	0.991	11090101	0.988
22080601	0.997	11110303	0.999
22081109	0.992	11110301	0.997
22081007	0.998	12080401	0.989
22090501	0.992	121006	0.982
22090212	0.999	130310	0.937

3 讨论

本试验对20批昆明山海棠片的 HPLC 指纹图谱进行分析,确定了70个共有指纹峰,相似度均在0.90以上,可以较全面的体现该制剂的整体性,表明20批样品间质量差异较小。能全面反映其内在化学成分的种类与数量,对制剂的整体控制提供

依据,能很好的控制其质量,保证安全用药。本研究建立的方法操作简单,重复性好,结果可靠,可用于昆明山海棠片的质量控制与评价。

中药材和中药复方制剂能发挥治疗效果的物质基础是其化学成分。现行的中药质量标准中列入了显微鉴别、理化鉴别、含量测定等多种方法。尚不足以解决中药的复杂性。建立指纹图谱的意义就在于选准了中药质量标准现代化的突破口,将现代分析科学与中医药整体观有机结合,有效地运用了全面质量管理的理念,是一种充分利用现代分析技术手段所能达到的最好表征中药复杂体系特性的方法。好的指纹图谱不但表达了成品的质量,更可以达到控制工艺操作和原药材的质控,即可从指纹图谱来追根溯源,寻找工艺操作中的问题和实现对原药材 GAP 质量要求,还可以应用于中药新药的开发研究。因此建立中药昆明山海棠指纹图谱具有重要意义。

参考文献

- [1] 曾润铭,杜世新,吴杰. 昆明山海棠与类风湿关节炎滑膜细胞体外增殖和凋亡[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2009,13(50):9892-9897.
- [2] 韩进庭. 昆明山海棠药理作用及临床应用研究进展[J]. 现代医药卫生,2009,25(16):2459-2460.
- [3] 王玺,王文字,张克荣,等. 中药 HPLC 指纹图谱相似性研究的探讨[J]. 沈阳药科大学学报,2003,20(5):360-362.
- [4] 曹进,饶毅,沈群,等. 中药注射剂指纹图谱分析[J]. 世界科学技术,2001,3(4):20-24.
- [5] 孙磊,乔善义,赵毅民. 中药指纹图谱应用研究进展[J]. 国际药学研究杂志,2009,36(3):194-195.