

开郁宁片高效液相色谱指纹图谱研究

朱立彬, 黄志军, 韩妮娜, 翟莉

(武汉健民中药工程有限公司, 430052)

摘要 目的 建立开郁宁片的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱, 对该产品中所含化学成分进行综合评价, 并为该产品质量标准的进一步提升提供新方法。方法 采用 HPLC 方法, 将获得的色谱数据转化为色谱指纹谱, 据此对开郁宁片样品进行分析鉴别。结果 相对保留值和相对峰面积相结合能够准确判断开郁宁片样品和标准的相似程度。结论 HPLC 指纹谱能有效实施生产上的在线控制, 保证不同批次开郁宁片质量稳定一致, 并能用于多成分含量测定。

关键词 开郁宁片; 芦丁; 金丝桃苷; 槲皮素; 色谱法, 高效液相; 指纹图谱

中图分类号 R286; R927.1

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2012)02-0238-04

开郁宁片为中药五类新药, 用于抑郁症、焦虑或烦躁不安。临床试验表明, 该药对轻中度抑郁症有较好的治疗效果。其主要成分为贯叶金丝桃提取物。贯叶金丝桃为藤黄科植物贯叶金丝桃 (*Hypericum per foratum* L.) 的干燥地上部分^[1]。本品药味较少, 为更好地控制其质量, 进一步提高质量标准, 对本品的生产进行在线控制, 笔者在本实验中建立了开郁宁片的指纹图谱。开郁宁片主要有效成分为黄酮, 结合原质量标准, 选择 50% 乙醇作为本品指纹图谱提取溶剂, 虽然贯叶金丝桃的指纹图谱研究已有文献报道^[2], 但本实验结合主要有效成分对开郁宁成品、半成品进行研究, 制定了指纹谱, 并对特征指纹峰中 3 种主要成分进行了归属, 对 10 批样品中此 3 种成分, 即芦丁、金丝桃苷和槲皮素, 进行含量测定。结果表明本方法操作简单, 重复性好, 可以作为本品质量标准提高的途径之一。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 DIONEX 高效液相系统 (P680 HPLC 泵, 自动进样器, TCC-100 柱温箱, UVD170U 紫外检测器), 电子天平 (Sartorius CP225D)。

1.2 试剂 乙腈 (色谱纯, 美国天地公司), 磷酸 (上海化学试剂公司, 分析纯), 水为双蒸水。金丝桃苷对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 1521-200202)、芦丁对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 100080-200306)、槲皮素对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 0211050702)。开郁宁片 (武汉健民中药工程有限责任公司提供, 批号: 20060501, 20060502, 20060603, 20060704, 20060705, 20060706, 20060907,

20060908, 20061009, 20061110)。

2 方法

2.1 色谱条件 色谱柱: Kromasil ODS-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) (南京汉邦科技有限公司), 检测波长经紫外扫描选定为 254 nm; 柱温 25 °C; 流速为 1 mL · min⁻¹; 进样量: 10 μL; 以乙腈为流动相 A, 以 0.5% 磷酸溶液为流动相 B, 按表 1 进行梯度洗脱。

表 1 梯度洗脱流动相

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	15	85
30	15	85
60	40	60
80	100	0

2.2 对照品溶液的制备

2.2.1 单组分对照品溶液的制备 取经五氧化二磷减压干燥 48 h 的对照品适量, 精密称定, 加甲醇分别制成每毫升含 0.3 mg 的溶液, 摇匀, 备用。

2.2.2 混合对照品溶液的制备 精密量取单组分对照品溶液芦丁、金丝桃苷、槲皮素各 3 mL, 置于 10 mL 棕色量瓶, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 供试品溶液的制备 取开郁宁片 15 片, 除去薄膜衣, 研细, 取 1 g, 精密称定, 置于 100 mL 锥形瓶, 精密加入 50% 乙醇 50 mL, 称定质量, 超声处理 20 min, 放冷, 再称定质量, 以 50% 乙醇补足减失的质量, 摇匀, 过滤, 取续滤液 2 mL 至 10 mL 量瓶, 加 50% 乙醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.4 指纹谱及有关参数的测定 在一定条件下, 各样品中各峰的相对保留值、相对峰面积为各样品所特有, 利用各样品的相对保留值、相对峰面积建立样品的 HPLC 相对保留值指纹谱^[3-5]。将 10 批开郁宁片照“2.3”所述方法制成供试品溶液, 按以上色谱条件进行分析, 得各样品的 HPLC 图谱, 建立 HPLC 指纹谱,

收稿日期 2011-08-09 修回日期 2011-09-13

作者简介 朱立彬 (1978-), 男, 湖北监利人, 高级工程师, 硕士, 主要从事新药研发以及质量研究。E-mail: zhulibin78@yahoo.com.cn。

通讯作者 黄志军 (1972-), 男, 副教授, 硕士生导师。电话: 027-84510229, E-mail: 84520229@sohu.com。

计算分析得到峰重叠率、*n* 强峰、特征指纹峰(包括相似率和差异率)。

2.4.1 相对保留值 α 的计算 一般在梯度洗脱的色谱条件下,色谱峰较多且较密集,难以插入一个合适的参照物,故选择出峰时间较居中、各样品均存在的组分作为参照物。本实验中笔者设立金丝桃苷为内参照峰($\alpha=1$),其他峰的保留时间与其相比,比值即为相对保留值 α 。由于保留时间受各种因素影响,每一次实验数据不可能完全相同,因此设定可信限为 $(\alpha \pm 5)\%$ 。 $\alpha = t_{Ri}/t_{R\alpha}$ (t_{Ri} :各组分的出峰时间, $t_{R\alpha}$:内参照峰的出峰时间)。

2.4.2 指纹谱的建立 按 α 值大小顺序排列,在每个 α 项下标出该组分的相对面积值(RA)。RA 是以峰面积总和最大的样品的总峰面积为分母,样品中各色谱峰面积为分子,计算得到各色谱峰的相对面积值。各样品中具有相同 α 值的组分,通过 RA 的比较,就可清楚地了解各样品中该组分的含量。这样,由相对保留值 α 和相对面积值 RA 组成样品的 HPLC 相对保留指纹谱。 $RA(\%) = (i \text{ 峰的面积值} / \text{样品的总面积值}) \times 100\%$ 。

3 结果

3.1 归属峰的确认 取芦丁、金丝桃苷、槲皮素混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,根据保留时间和叠加实验,确定对照品峰在各样品图谱中的位置,见图 1,2。

3.2 相对保留值指纹谱的建立 取本品 10 批,依照“2.1”项色谱条件进样分析,以金丝桃苷色谱峰为内参照峰,以总峰面积最大的样品的峰面积为分母,根据各样品 HPLC 图计算各样品色谱峰的 α 值(误差 $\leq 5\%$),即可认为是同一化合物,将各样品每个峰的 RA 值列于相应的 α 值项下,无相应峰的 RA 值计为 0,得到相对保留值指纹谱,见表 2。

3.3 样品之间的相似性 计算 10 批开郁宁片样品两

两之间的峰重叠率并列列表,组成反映样品间相似性的峰重叠率矩阵,峰重叠率是指两个相互比较样品共有峰数的 2 倍与总峰数的比值,即重叠率($\%$) = 共有峰数 $\times 2 / (\text{待测样品 I 峰数} + \text{待测样品 II 峰数}) \times 100\%$ 。见表 3。

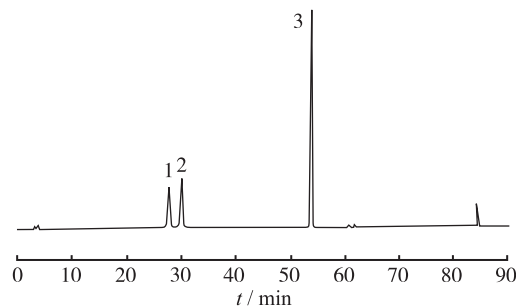


图 1 芦丁、金丝桃苷、槲皮素混合对照品 HPLC 图
1. 芦丁;2. 金丝桃苷;3. 槲皮素

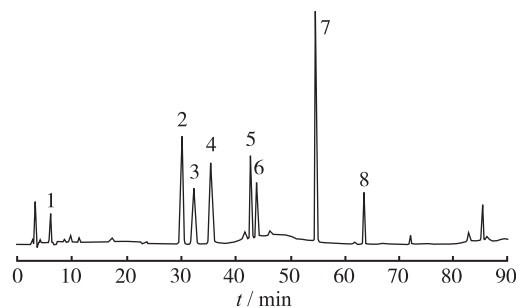


图 2 开郁宁样品 HPLC 指纹谱
2. 芦丁,3. 金丝桃苷,7. 槲皮素

3.4 样品的 4 强峰 每个样品均选出其中峰面积最大的 4 个峰排列成表,得 10 个样品的 4 强峰表,见表 4。

3.5 特征指纹峰 以上述 10 个样品 4 强峰为主体,结合它们在 10 个样品中出现的频率,分析得出 4 强峰即为开郁宁片特征指纹峰。将不同批次样品中芦丁、金丝桃苷和槲皮素的含量数值列表 5(含量测定数据来源于武汉健民中药工程有限责任公司分析室)。

表 2 10 批开郁宁样品相对保留值指纹谱

相对保留值 α	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	共有峰
0.233	0.012	0.008	0.000	0.015	0.009	0.007	0.009	0.006	0.000	0.016	8
0.900	0.121	0.130	0.119	0.133	0.151	0.149	0.116	0.118	0.121	0.141	10
1.000	0.101	0.110	0.100	0.113	0.106	0.113	0.105	0.109	0.104	0.113	10
1.100	0.086	0.096	0.084	0.093	0.088	0.093	0.089	0.085	0.089	0.087	10
1.650	0.024	0.000	0.020	0.025	0.028	0.021	0.026	0.029	0.022	0.028	9
1.740	0.021	0.021	0.024	0.000	0.024	0.024	0.020	0.000	0.020	0.020	8
2.300	0.136	0.139	0.144	0.141	0.143	0.099	0.136	0.144	0.137	0.141	10
2.690	0.000	0.000	0.008	0.007	0.007	0.009	0.006	0.008	0.000	0.010	7
总峰数	7	6	7	7	8	8	8	7	6	8	
总相对面积	0.501	0.504	0.499	0.527	0.556	0.515	0.507	0.499	0.493	0.556	

表 3 10 批开郁宁样品 HPLC 指纹峰的重叠率

%

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	100.00									
2	92.31	100.00								
3	85.71	76.92	100.00							
4	85.71	61.54	85.71	100.00						
5	93.33	85.71	93.33	93.33	100.00					
6	93.33	85.71	93.33	93.33	100.00	100.00				
7	93.33	85.71	93.33	93.33	100.00	100.00	100.00			
8	93.33	85.71	93.33	93.33	100.00	100.00	100.00	100.00		
9	92.31	83.33	92.31	76.92	85.71	85.71	85.71	85.71	100.00	
10	93.33	85.71	93.33	93.33	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

表 4 10 批开郁宁样品中 4 强峰的相对峰面积

样品号	1	2	3	4
	($\alpha=0.900$)	($\alpha=1.000$)	($\alpha=1.100$)	($\alpha=2.300$)
1	0.121	0.101	0.086	0.136
2	0.130	0.110	0.096	0.139
3	0.119	0.100	0.084	0.144
4	0.133	0.113	0.093	0.141
5	0.151	0.106	0.088	0.143
6	0.149	0.113	0.093	0.099
7	0.116	0.105	0.089	0.136
8	0.118	0.109	0.085	0.144
9	0.121	0.104	0.089	0.137
10	0.141	0.113	0.087	0.141

表 5 10 批开郁宁样品中芦丁、金丝桃苷和槲皮素的含量测定结果

样品号	mg · 片 ⁻¹		
	芦丁 ($\alpha=0.900$)	金丝桃苷 ($\alpha=1.000$)	槲皮素 ($\alpha=2.300$)
1	9.957	5.216	5.252
2	8.099	6.853	8.659
3	7.481	6.286	9.052
4	10.157	8.630	10.768
5	11.390	7.996	10.786
6	7.173	5.440	4.766
7	6.978	6.316	8.181
8	8.894	8.215	10.853
9	9.057	7.785	10.255
10	8.120	6.507	8.120

3.6 特征指纹峰的相似率和差异率

3.6.1 特征指纹峰的相似率 相似率是指样品中某个特征指纹峰的相对面积值与对照品中该特征指纹峰的相对面积值的比值(以百分率表示)。其计算公式如下,某个特征指纹峰的相似率($\%$) = $RA_{i\text{样}}/RA_{i\text{对}} \times 100\%$ ($RA_{i\text{样}}$ 为样品中某特征指纹峰的相对面积值, $RA_{i\text{对}}$ 为对照品中该特征指纹峰的相对面积值),不同批次开郁宁片的特征指纹峰的相似率见表 6。

3.6.2 特征指纹的差异率 差异率是指样品中某个特

征指纹峰与对照品中该特征指纹峰的相对面积值的差值的绝对值与标准特征指纹峰相对面积值的比值,其计算公式如下,某个特征指纹峰的差异率($\%$) = $|RA_{i\text{样}} - RA_{i\text{对}}| / RA_{\text{特征}} \times 100\%$ ($RA_{i\text{样}}$ 为样品中某特征指纹峰的相对面积值, $RA_{i\text{对}}$ 为对照品中该特征指纹峰的相对面积值, $RA_{\text{特征}}$ 为标准特征指纹峰的相对面积值)。不同批次开郁宁片的特征指纹峰的相似率见表 7。

表 6 10 批开郁宁样品特征指纹峰的相似率

%

样品号	$\alpha=0.900$	$\alpha=1.000$	$\alpha=1.100$	$\alpha=2.300$
1	86.43	91.82	95.56	97.14
2	92.86	100.00	106.67	99.29
3	85.00	90.91	93.33	102.86
4	95.00	102.73	103.33	100.71
5	107.86	96.36	97.78	102.14
6	106.43	102.73	103.33	70.71
7	82.86	95.45	98.89	97.14
8	84.29	99.09	94.44	102.86
9	86.43	94.55	98.89	97.86
10	100.71	102.73	96.67	100.71
总相似率	0.93	0.98	0.99	0.97

表 7 10 批开郁宁样品特征指纹峰的差异率

%

样品号	$\alpha=0.900$	$\alpha=1.000$	$\alpha=1.100$	$\alpha=2.300$
1	0.14	0.08	0.04	0.03
2	0.07	0.00	0.07	0.01
3	0.15	0.09	0.07	0.03
4	0.05	0.03	0.03	0.01
5	0.08	0.04	0.02	0.02
6	0.06	0.03	0.03	0.29
7	0.17	0.05	0.01	0.03
8	0.16	0.01	0.06	0.03
9	0.14	0.05	0.01	0.02
10	0.01	0.03	0.03	0.01
总差异率	0.10	0.04	0.04	0.05

4 讨论

笔者在本实验流动相条件下对供试品溶液进行了

紫外扫描(200~400 nm 波长范围内),发现在约 254 nm 处有最大吸收,而且通过四通道检测也发现 254 nm 处峰数最多、峰形较好,考虑到本品有效成分主要为黄酮类成分,所以选择 254 nm 为本品指纹谱测定波长。

国内中成药指纹图谱的报道较少,主要是因为中药成分复杂,各成分的药理作用不明确,在选择提取溶剂时遇到较大困难。因为药理作用不明确,无法针对相应成分采用适宜的提取溶剂,至于利用指纹图谱进行含量测定,国内相关报道较少。开郁宁片的主要成分为贯叶金丝桃提取物,药理学实验结果已经表明黄酮类成分为其主要有效成分,本研究针对该类成分建立指纹图谱,系统反映开郁宁片以及贯叶金丝桃药材中该类成分的化学信息。笔者参考各类文献^[2,6]建立开郁宁片指纹图谱,选择特征指纹峰,并对芦丁、金丝桃苷、槲皮素进行了归属,实验结果表明该指纹图谱技术可用于对开郁宁成品进行质量监控,用 HPLC 指纹图谱能有效实施生产在线控制,保证不同批次产品质量稳定一致,为提高质量标准提供了理论基础。

可能由于开郁宁片处方较简单,各成分之间干扰较少,在本技术条件下特征指纹峰有 4 个,目前由于条

件所限,只对其中 3 种成分,即芦丁、金丝桃苷和槲皮素进行了含量测定研究,以后随着对照品的丰富或者进一步对其中未知成分进行分离鉴定,了解其未知成分后,可以同时 4 个特征指纹峰进行定量。应用该技术能更好地对大生产进行质量监控,进一步保证本品不同批次之间的稳定性。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:215.
- [2] 郑清明,秦路平,郑汉臣,等. 金丝桃属植物的 HPLC 指纹谱的研究[J]. 中草药,2003,34(4):365-370.
- [3] 洪筱,王智华. 中药数字化色谱指纹谱[M]. 上海:上海科学技术出版社,2003.
- [4] 于书仪,刘树民,邵佳峰. 穿山龙甲醇提取液指纹图谱分析[J]. 医药导报,2010,29(5):664-666.
- [5] HONG X K, WANG Z H, GUO J X, et al. The fingerprint spectrum analysis of GC relative retention values for essential oil of 19 species of *Bupleurum genus*[J]. Acta Pharm Sin, 1998,23(11):839-845.
- [6] 陈美兰,黄璐琦,黄芳华,等. 贯叶金丝桃的资源研究概况[J]. 中国中医药信息杂志,2003,10(3):81-83.

DOI 10.3870/yydb.2012.02.042

高效液相色谱法测定胃疡散中延胡索乙素含量

费改顺,马慧萍,贾正平,董志臣,何蕾,李兰茹

(兰州军区兰州总医院药剂科,730050)

摘要 目的 建立测定胃疡散中延胡索乙素含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Hypersil ODS2-C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇-0.1%磷酸(50:50)(三乙胺调 pH 6.0),检测波长:280 nm,流速:1.0 mL·min⁻¹,柱温:室温。结果 延胡索乙素含量在 3.6~57.6 μg·mL⁻¹ 范围内线性关系良好,r=0.999 9,平均加样回收率为 98.20%,RSD 为 1.25%(n=9)。结论 该方法简便易行,准确可靠,可用于胃疡散中延胡索乙素的含量测定。

关键词 胃疡散;延胡索乙素;色谱法;高效液相;含量测定

中图分类号 R286;R927.1

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2012)02-0241-03

胃疡散是我院临床应用多年的中药制剂,由延胡索、党参、白术、茯苓、生甘草等多味中药组成[医院制剂文号:兰制字(2006)F00038]。具有益气健脾、活血

化淤、收敛止血、行气镇痛、保护溃疡面、促进溃疡面愈合功效,用于治疗食少、纳差、嗝气、泛吐清水、胃酸过多、胃溃疡、十二指肠球部溃疡及上消化道出血等。方中延胡索为君药,延胡索乙素为其主要有效成分^[1-2]。为了控制该制剂的质量,保证临床用药安全有效,笔者在本实验中采用高效液相色谱法测定制剂中延胡索乙素的含量,取得满意结果。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Waters 高效液相色谱仪;包括 510 型泵,481 型紫外检测器,U6K-030433 型进样器,N3000 色谱

收稿日期 2011-05-09 修回日期 2011-08-12

作者简介 费改顺(1963-),男,甘肃漳县人,副主任药师,硕士,主要从事医院制剂和新药研究工作。电话:0931-8994671,E-mail:mahuijingcxr@yahoo.com.cn。

通讯作者 贾正平(1957-),男,山西太原人,教授,博士生导师,主任药师,主要从事医院药学、临床药理和新药研究工作。电话:0931-8994652。