

芩连片 HPLC 指纹图谱研究

陈雪英(东北农业大学动物医学学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 目的 研究芩连片高效液相色谱指纹图谱, 建立整体特征的质量评价方法。方法 采用 DAD-ELSD 串联检测技术, Zorbax 色谱柱, 以乙腈-1.5%冰醋酸为流动相, 梯度洗脱, 检测波长为 280 nm。结果 本色谱条件下芩连片各成分得到了较好的分离, 标准指纹图谱均由 10 个特征峰组成。结论 所建立的 HPLC 指纹图谱表达了芩连片可测组分整体特征。具有重复性好、特征性强、方法简便等特点, 可用于芩连片的质量评价。

关键词: 高效液相色谱法; 芩连片; 指纹图谱

中图分类号: R284.1; R917.101

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2010)07-0615-03

Study on the HPLC Fingerprint of Qinlian Tablets

CHEN Xueying(Medical College Animal, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE Identification and quality evaluation of complex traditional Chinese medicine preparation of Qinlian tablets were carried out by HPLC fingerprint analysis. **METHODS** HPLC-DAD fingerprint of Qinlian tablets was conducted with Zorbax column and non-linear elution with the mobile phase consisted of acetonitrile-1.5% glacial acetic acid and detective wavelength was 280 nm. **RESULTS** Components of Qinlian tablets were separated completely in the chromatographic condition. The standard fingerprint consisted 10 co-possessing peaks. **CONCLUSION** The established HPLC fingerprint represents the whole character of Qinlian tablets. The method is found to be simple and accurate which enhanced the specialty for control and assessment of the product quality.

KEY WORDS: HPLC; Qinlian tablets; fingerprint

芩连片为临床常用中成药、国家基本药物、中国药典 2005 年版一部收载品种^[1]。具有清热解毒, 消肿止痛的功效。临床广泛用于脏腑蕴热结毒的多种病变, 如呼吸道感染、口腔炎症、细菌性痢疾等^[2]。

关于芩连片质量控制方法较多, 以高效液相色谱法居多。中国药典 2005 年版一部仅以黄芩苷含量测定作为该制剂的质量控制标准^[1], 此外芩连片中盐酸小檗碱、芍药苷、甘草酸的含量测定方法均有报道^[2-3]。但这些方法均不能全面反映复方制剂的内在质量。采用中药指纹图谱的方式, 将有效地表征中药质量, 为实现中药走向世界提供有力的质量保证^[4]。目前关于芩连片指纹图谱研究未见报道, 本试验采用 DAD-ELSD 串联技术, 以黄芩苷为内标物建立了芩连片 HPLC 指纹图谱, 并采用中国药典委员会推荐使用的“中药色谱指纹图谱相似度评价软件(2004A)”进行相似度评价。

1 实验材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(DAD 检测器); Alltech 2000ES 型蒸发光检测器; Zorbax C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); Diamonsil C18 色谱柱

(4.6 mm×250 mm, 5 μm); Shiseido C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm); Sartorius-BS110S 分析天平(德国赛多利斯公司); KQ-300DB 型数控超声仪(昆山市超声仪器有限公司); 中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版(国家药典委员会)。

乙腈、甲醇: 色谱纯, 美国天地试剂公司; 冰乙酸: 色谱纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 水: 超纯水; 其余试剂为分析纯。黄芩苷对照品由中国药品生物制品检定所提供(批号: 110715-200514, 供含量测定用); 芩连片: 按中国药典 2005 年版一部芩连片项下制备 10 批样品, 原料药材均购于哈药集团世一堂中药饮片有限公司。

2 方法

2.1 色谱条件

Zorbax C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-1.5%冰醋酸水溶液, 非线性梯度洗脱; 柱温 30 °C; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 280 nm; 蒸发光检测器漂移管温度 119 °C, 载气流速 2.0 L·min⁻¹; 记录时间 90 min。

2.2 供试品溶液的制备

作者简介: 陈雪英, 女, 实验师 Tel: (0451)89068751 E-mail: chenxueying20042004@126.com

取10批芩连片样品,分别精密称取样品粉末2.5 g,加甲醇30 mL超声处理30 min,滤过,滤液通过孔径为0.45 μ m的微孔滤膜,作为供试品溶液。

2.3 对照品溶液的制备

精密称取黄芩苷对照品适量,加甲醇制成每1 mL含0.1 mg的溶液,即得。

3 结果与分析

3.1 指纹图谱的方法学验证

3.1.1 实验条件的优化 由于处方较大,成分复杂,优化的目的是尽量将不同极性的成分简化在一张色谱图中得到较好的分离,考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-1.5%冰乙酸不同梯度下的色谱图,比较了Zorbax, Diamonsil, Shiseido等不同牌号的色谱柱的分离效果,并对检测波长和柱温等参数进行了优化,最终确定了“2.1”项下所述色谱条件。

3.1.2 供试品溶液的制备方法选择 考察了提取方法、提取溶剂、提取时间、提取次数等条件。结果以甲醇超声处理30 min即可达到指纹图谱测定的要求。

3.1.3 参照物的选择 保留时间为60.2 min左右的色谱峰是HPLC图谱中峰面积较大、出峰时间适中且很稳定的一个峰,经对照品对照认定为黄芩苷的吸收峰,故选择黄芩苷作为参照物。

3.1.4 仪器精密度试验 取同一份供试品溶液,连续进样6次,结果指纹图谱的全貌无明显变化,各相对保留时间及共有峰相对峰面积的RSD均小于1%,表明仪器精密度良好。

3.1.5 稳定性试验 取同一份供试品溶液,每6 h进样分析,结果直观观察指纹图谱的全貌无明显变化,各相对保留时间及共有峰相对峰面积的RSD均小于2%。表明样品在24 h内稳定性良好。

3.1.6 重复性试验 取同一批号的供试品5份,分别测定HPLC图,结果直观观察指纹图谱的全貌无明显变化,各相对保留时间及共有峰相对峰面积的RSD小于2%,表明方法重复性良好。

3.2 色谱指纹图谱的构建与解析

3.2.1 指纹图谱的测定

芩连片供试品溶液 10 批,液相色谱仪自动进样 10 μ L 进行分析,记录 90 min 的色谱图,色谱图见图 1 和图 2。以黄芩苷色谱峰(8 号峰)的保留时间为 1,计算相对保留时间,结果见表 1 和表 2。

3.2.2 指纹图谱相似度计算

选取色谱图中的十强峰,由色谱工作站辅助自

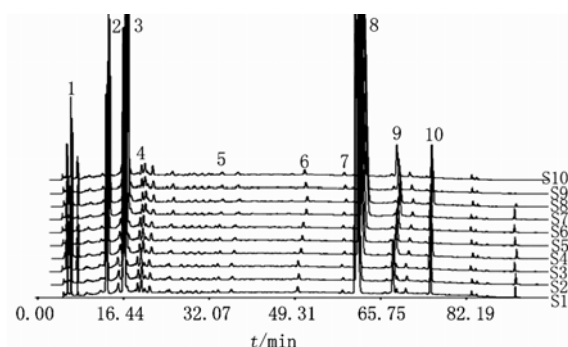


图1 芩连片指纹图谱(DAD)

Fig 1 HPLC fingerprint of Qinlian tablets(DAD)

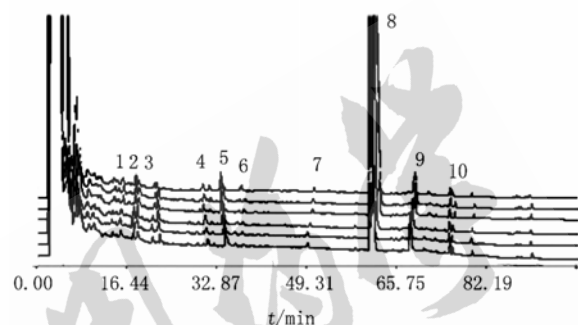


图2 芩连片指纹图谱(ELSD)

Fig 2 HPLC fingerprint of Qinlian tablets(ELSD)

动进行峰匹配,确定共有指纹峰 10 个,其中包括作为参照物的黄芩苷色谱峰(图 1、图 2 中的峰 8)。利用“相关系数”法和“夹角余弦”法计算指纹图谱的相似度,结果见表 1、表 2。两种方法计算的相似度结果均在 0.99 以上,说明该方法可行,所建立的指纹图谱可全面控制芩连片质量。

4 结论与讨论

本实验在确定了以甲醇为提取溶剂、乙腈-1.5%冰醋酸为最佳洗脱系统的基础上,建立了芩连片 HPLC 指纹图谱,分别确定了 10 个共有峰,其中包括参照物黄芩苷的色谱峰。各项方法学考察及相似度均符合要求。该方法简便、可靠、重复性好,可为芩连片产品提供有效的质量控制方法,也为新药二次开发提供重要参考。

本试验首次采用 DAD-ELSD 串联检测技术建立了芩连片 HPLC 指纹图谱,同时具备两种指纹图谱中 20 个共有峰的芩连片认定为合格产品,提供了“双重把关”的质量控制技术,对芩连片质量提出了更高的要求,符合中药制剂质量控制的发展方向。

本研究采用 DAD-ELSD 串联检测方式, DAD 检测器专属性强、灵敏度高,广泛应用于中药成分分析,但对于无紫外吸收的化合物无法检测。ELSD

表 1 芩连片指纹图谱(DAD)共有指纹峰相对保留时间表

Tab 1 Peaks of HPLC(DAD) fingerprint common pattern of Qinlian tablets

	相对保留时间										平均值	RSD/%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	0.085 9	0.088 6	0.088 6	0.088 6	0.088 6	0.089 3	0.089 4	0.088 0	0.089 2	0.088 9	0.088 5	1.13
2	0.183 7	0.183 8	0.184 5	0.184 8	0.186 0	0.188 6	0.191 5	0.187 7	0.189 3	0.189 7	0.187 0	1.49
3	0.240 2	0.240 1	0.241 0	0.241 6	0.243 1	0.245 5	0.249 3	0.246 3	0.247 5	0.249 9	0.244 5	1.53
4	0.286 3	0.286 5	0.287 3	0.287 7	0.289 6	0.292 0	0.296 7	0.293 4	0.294 0	0.296 6	0.291 0	1.40
5	0.549 8	0.549 1	0.549 6	0.549 4	0.549 7	0.547 7	0.550 5	0.551 6	0.552 1	0.557 1	0.550 7	0.47
6	0.811 2	0.812 4	0.812 9	0.814 0	0.816 9	0.818 2	0.822 7	0.821 8	0.821 1	0.822 6	0.817 5	0.54
7	0.959 7	0.957 5	0.956 5	0.955 5	0.951 6	0.946 9	0.943 5	0.946 5	0.947 3	0.950 5	0.951 5	0.58
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
9	1.124 6	1.124 0	1.123 1	1.123 3	1.123 0	1.123 5	1.121 1	1.119 5	1.110 3	1.120 0	1.121 3	0.37
10	1.247 8	1.245 4	1.243 2	1.241 1	1.233 7	1.227 4	1.221 8	1.225 3	1.227 4	1.232 8	1.234 6	0.75

表 2 芩连片指纹图谱(ELSD)共有指纹峰相对保留时间表

Tab 2 Peaks of HPLC(ELSD) fingerprint common pattern of Qinlian tablets

	相对保留时间										平均值	RSD/%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	0.255 4	0.257 0	0.256 4	0.255 6	0.256 2	0.252 8	0.246 8	0.249 4	0.248 6	0.255 3	0.253 3	1.47
2	0.292 9	0.293 8	0.293 7	0.290 5	0.292 5	0.289 8	0.283 2	0.287 1	0.285 9	0.286 0	0.289 5	1.30
3	0.306 7	0.304 0	0.304 3	0.307 1	0.303 0	0.301 3	0.295 5	0.299 1	0.297 7	0.306 6	0.302 5	1.33
4	0.500 4	0.491 7	0.491 5	0.488 7	0.493 1	0.501 7	0.498 6	0.509 1	0.509 8	0.515 9	0.500 1	1.83
5	0.550 8	0.543 7	0.543 3	0.540 5	0.545 6	0.554 4	0.551 7	0.562 4	0.563 5	0.570 2	0.552 6	1.80
6	0.605 3	0.602 2	0.603 6	0.608 4	0.613 6	0.613 6	0.606 6	0.617 8	0.618 8	0.624 6	0.611 5	1.21
7	0.816 7	0.815 8	0.818 3	0.820 3	0.816 7	0.814 4	0.799 1	0.809 0	0.807 9	0.808 7	0.812 7	0.79
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
9	1.111 6	1.112 7	1.114 4	1.117 5	1.121 0	1.118 7	1.101 6	1.117 5	1.117 0	1.119 7	1.115 2	0.51
10	1.223 8	1.218 6	1.219 2	1.217 2	1.224 4	1.228 6	1.216 6	1.236 4	1.237 2	1.242 1	1.226 4	0.76

检测器为通用型检测器，可弥补这一不足，但其灵敏度较DAD低。二者串联实现优势互补，在所设HPLC条件下，芩连片中所含成分能够被最大限度的检出，表明该方法可以用于芩连片所含成分的定性及定量分析，为芩连片体内药效物质研究奠定了基础。

REFERENCES

[1] Ch.P(2005)Vol I(中国药典 2005 年版一部)[S]. 2005: 464- 465.

[2] GAO Y. Study on methods of quality control and pharmacokinetics of Qinlian tablets [D]. Shengyang: Shenyang Pharmaceutical University, 2008.

[3] HUANG X L, CHENG X H, XU Z Y, et al. HPLC simultaneous determination of baicalin and berberine hydrochloride contents in Qinlian tablets [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2007, 27(3): 371-373.

[4] CHENG Y. Fractions of TCM fingerprint chromatograms in quality evaluation [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med(中国中医药信息杂志), 2006, 15(6): 107-108.

收稿日期: 2009-08-28