

杞菊地黄丸 HPLC 指纹图谱的建立及特征峰的归属分析

李澍才, 王颖* (四川省食品药品检验检测院, 成都 610097)

摘要: 目的 建立杞菊地黄丸的 HPLC 指纹图谱, 为科学评价及有效控制杞菊地黄丸的质量提供可靠方法。方法 采用 CAPCELL PAK MG C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 检测波长 225 nm, 采集时间 80 min。建立指纹图谱, 采用中药指纹图谱相似度评价系统对抽取的 239 批样品进行指纹图谱的相似度评价。结果 建立指纹图谱共有 23 个特征峰, 采用对照品和对照药材比对的方法对特征峰进行归属。239 批次样品中 238 批次的指纹图谱与对照指纹图谱的相似度>0.9, 相似度良好。结论 建立的杞菊地黄丸 HPLC 指纹图谱可用于制剂的质量控制, 为杞菊地黄丸的整体质量评价及控制提供依据。

关键词: 杞菊地黄丸; 指纹图谱; 特征峰; 归属分析; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1; R971.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2021)18-2222-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.18.005

引用本文: 李澍才, 王颖. 杞菊地黄丸 HPLC 指纹图谱的建立及特征峰的归属分析[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(18): 2222-2226.

Establishment of HPLC Fingerprint of Qiju Dihuang Pill and the Attribution Analysis of Characteristic Peaks

LI Shucai, WANG Ying* (Sichuan Provincial Food and Drug Inspection Institute, Chengdu 610097, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC fingerprint of Qiju Dihuang pill, and provide an effective and reliable method for the quality evaluation and quality control of Qiju Dihuang pill. **METHODS** The HPLC fingerprint analysis was carried out on a column of CAPCELL PAK MG C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), using a mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution. The detection wavelength was set at 225 nm, and the total run time was 80 min. The control fingerprint was established by similarity evaluation system of chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine, and the similarity of 239 batches of samples was evaluated. **RESULTS** There were 23 characteristic common peaks in HPLC chromatograms and all the characteristic common peaks were identified by comparison of both the reference substance and the reference herbs. The similarity of the 238 batches in 239 batches of samples was >0.9, and the similarity was good. **CONCLUSION** The established HPLC fingerprint information of Qiju Dihuang pill can be used for the quality control, and provide a basis for the overall quality evaluation and control of Qiju Dihuang pill.

KEYWORDS: Qiju Dihuang pill; fingerprint; characteristic peak; attribution analysis; HPLC

杞菊地黄丸为国家基本药物, 处方由枸杞子、菊花、熟地黄、酒萸肉、牡丹皮、山药、茯苓、泽泻等 8 味药组成, 具有滋肾养肝之功效, 用于肝肾阴亏, 眩晕耳鸣, 羞明畏光, 迎风流泪, 视物昏花等症^[1]。

杞菊地黄丸疗效确切, 广泛应用于临床^[2-4]。方中重用熟地大补肾阴, 为君药, 辅以酒萸肉、枸杞子补肾养肝明目; 山药滋肾补脾; 菊花疏散风热, 清肝明目, 以助君药。佐以泽泻泻肾降浊, 牡丹皮清散肝火, 茯苓健脾渗湿, 与君臣相合, 补而不滞。诸药相合, 共奏滋肾养肝明目之功^[5]。因此, 方中药材的稳定性关系着制剂的质量, 同时也影响着临床使用的安全性及有效性。现执行的药典标准仅检测莫诺昔、马钱苷和丹皮酚, 处

方中其他中药无控制手段, 不能全面反映该制剂的质量情况。中药指纹图谱是采用现代分析方法建立的一种能够全面反映中药复杂体系和丰富鉴别信息的鉴别技术, 能够有效表征中药质量, 广泛用于中药的质量控制及评价^[6-10]。杞菊地黄丸指纹图谱的研究较少, 谢彩侠等^[11]建立了近红外光谱和 HPLC 联用指纹图谱, 应用于 30 批次杞菊地黄丸(浓缩丸)的质量分析。孙国祥等^[12-13]建立了 HPLC 指纹图谱, 应用于 11 批次杞菊地黄丸(大蜜丸)质量分析。这些报道中未明确杞菊地黄丸指纹图谱中的特征峰的来源, 也未区分 2 种制法——大(小)蜜丸和水蜜丸的指纹图谱。本研究拟分别建立杞菊地黄丸大(小)蜜丸和水蜜丸的指纹图谱, 并进行特征峰归属分析, 还对抽检的大量杞

作者简介: 李澍才, 男, 博士, 主管药师 Tel: (028)60233829 E-mail: 550806454@qq.com

E-mail: 506814997@qq.com *通信作者: 王颖, 女, 副主任药师 Tel:

菊地黄丸样品进行质量评价。

1 材料与试剂

Agilent1200 高效液相色谱仪(DAD 检测器, 美国 Agilent 公司); XS105DV 电子天平(梅特勒托利多公司); Mili-Q 纯水仪(Millipore 公司); MultiReax 涡旋仪(Heidolph 公司); CAPCELL PAK MG C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)(资生堂公司)。乙腈、甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

对照品: 绿原酸(批号: 110753-201415; 纯度: 96.1%)、木犀草苷(批号: 111720-201408; 纯度: 93.5%)、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸(批号: 111782-201405; 纯度: 94.3%)、23-乙酰泽泻醇 B(批号: 111846-201203; 纯度: 98.3%)和 5-羟甲基糠醛(批号: 111626-201509; 纯度: 98.7%)均购自中国食品药品检定研究院; 莫诺苷(成都曼思特生物科技有限公司, 批号: MUST-14070102; 纯度: 95.0%)。对照药材: 山药(批号: 121137-201305)、枸杞子(批号: 121072-201410)、熟地黄(批号: 121196-200804)、菊花(批号: 121384-201103)、茯苓(批号: 121117-201308)、山茱萸(批号: 121495-201303)、泽泻(批号: 121081-201406)和牡丹皮(批号: 121490-201102)均购自中国食品药品检定研究院。

样品: 大蜜丸(北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂, 批号: 15013307; 规格: 每盒 90 g); 水蜜丸(河南省宛西制药股份有限公司, 批号: 150302; 规格: 每盒 72 g); 全国市售杞菊地黄丸抽检的 239 批次, 其中大(小)蜜丸 148 批次, 水蜜丸 91 批次。

2 方法与结果

2.1 测试溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 取绿原酸、木犀草苷、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、23-乙酰泽泻醇 B、莫诺苷、5-羟甲基糠醛等对照品适量, 精密称定, 分别加甲醇制成每 1 mL 约含 0.1 mg 的溶液, 摇匀, 即得。

2.1.2 对照药材溶液的制备 按照杞菊地黄丸处方取山药、枸杞子、熟地黄、菊花、茯苓、山茱萸、泽泻、牡丹皮等对照药材适量, 粉碎成细粉, 分别称取粉末约 1 g, 置具塞烧瓶中, 精密加入 80% 甲醇 20 mL, 称定质量, 水浴加热回流 1 h, 放冷, 用 80% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 0.45 μm 滤膜过滤, 取续滤液, 即得各对照药材溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取本品水蜜丸研碎,

或取大蜜丸剪碎, 混匀, 称取约 2 g, 精密称定。置具塞烧瓶中, 精密加入 80% 甲醇 20 mL, 密塞, 称定质量, 水浴加热 1 h, 冷却至室温, 用 80% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 0.45 μm 滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

2.1.4 阴性对照溶液的制备 按照杞菊地黄丸处方比例和制法, 制成仅缺少 1 味对照药材、不加炼蜜的阴性样品, 按“2.1.3”项下方法处理, 即得对应药材的阴性溶液。

2.2 色谱条件

Agilent 1200 高效液相色谱仪, 配置 DAD 检测器, 检测波长为 225 nm, 色谱柱为 CAPCELL PAK MG C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 ℃; 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为 0.1% 磷酸水溶液, 梯度洗脱(0~5 min, 5%→10%A; 5~25 min, 10%→17%A; 25~40 min, 17%→30%A; 40~60 min, 30%→50%A; 60~70 min, 50%→95%A; 70~80 min, 95%→5%A); 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 进样体积为 20 μL; 色谱记录时间为 80 min。

2.3 方法学考察

2.3.1 仪器精密度试验 取同一份“2.1.3”项下杞菊地黄丸供试品溶液(批号: 15013307), 按“2.2”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录各色谱峰保留时间和峰面积。以 22 号峰(丹皮酚)为参照峰, 测各特征峰相对保留时间 RSD<1%, 相对峰面积 RSD<5%, 显示仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验 取大蜜丸样品 6 份(批号: 15013307)和水蜜丸样品 5 份(批号: 150302), 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进行测定, 记录各色谱峰保留时间和峰面积, 见图 1。以 22 号峰(丹皮酚)为参照峰, 测各特征峰相对保留时间 RSD<1%, 相对峰面积 RSD<5%。并采用中药指纹图谱相似度评价系统进行评价, 色谱图的相似度均>0.99, 显示该方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 取同一份“2.1.3”项下杞菊地黄丸供试品溶液(批号: 15013307), 按“2.2”项下色谱条件分别于 0, 2, 4, 12, 24 h 测定, 记录各色谱峰保留时间和峰面积。以 22 号峰(丹皮酚)为参照峰, 测各特征峰相对保留时间 RSD<1%, 相对峰面积 RSD<5%, 显示供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

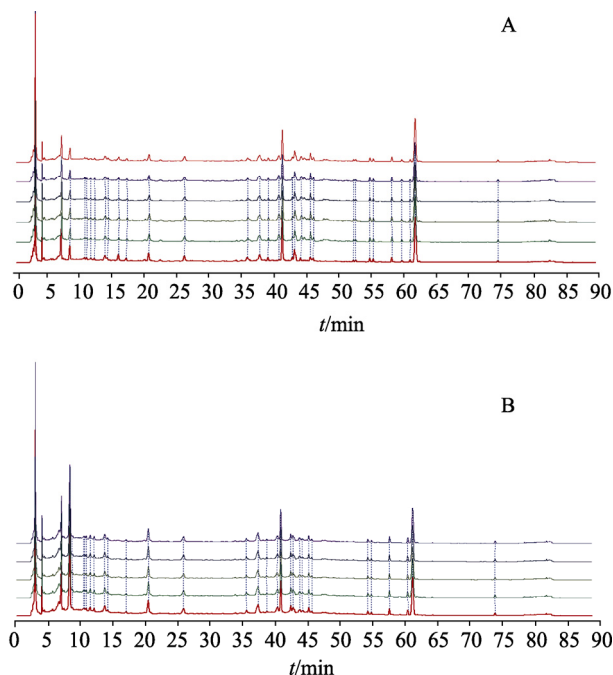


图1 大蜜丸和水蜜丸重复性考察图谱

A-大蜜丸($n=6$); B-水蜜丸($n=5$)。

Fig. 1 Reproducibility chromatograms of big-honeyed pills and water-honeyed pills

A-big-honeyed pills($n=6$); B-water-honeyed pills($n=5$).

2.4 特征峰归属

供试品色谱图中共检出 23 个特征峰, 其中有 10 个色谱峰可用对照品来定性(即 5-羟甲基糠醛、莫诺苷、绿原酸、马钱苷、芍药苷、木犀草苷、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁、蒙花苷、木犀草素、丹皮酚), 其余 13 个峰采用对照药材和阴性对照进行归属, 即在相同条件下测定, 根据供试品色谱图中与对照药材色谱图中保留时间及紫外吸收光谱均

一致且阴性无干扰的峰归属为该味药材的峰。通过上述方法确定, 本品色谱图各特征峰的具体归属见图 2 及表 1。

表 1 特征峰的归属

Tab. 1 Attribution of characteristic peaks

峰号	名称	峰号	名称
1	熟地黄 1* (5-羟甲基糠醛)	13	菊花 5
2	酒萸肉 1(莫诺苷)	14	菊花 6
3	牡丹皮 1	15	菊花 7
4	菊花 1(绿原酸)	16	菊花 8(蒙花苷)
5	酒萸肉 2(马钱苷)	17	菊花 9
6	牡丹皮 2(芍药苷)	18	菊花 10(木犀草素)
7	牡丹皮 3	19	菊花 11
8	菊花 2(木犀草苷)	20	牡丹皮 5
9	牡丹皮 4	21	菊花 12
10	酒萸肉 3	22	牡丹皮 6(丹皮酚)
11	菊花 3(3, 5- <i>O</i> -二咖啡酰 基奎宁)	23	菊花 13
12	菊花 4		

注: *利用对照药材和阴性对照进行归属的特征峰。

Note: *Characteristic peaks identified by negative reference substance and reference herbs.

2.5 对照指纹图谱的建立

从每个生产企业中选择一批样品, 共选择 43 批大(小)蜜丸和 30 批水蜜丸, 按照上述方法处理并测定, 记录色谱图。分别将大(小)蜜丸和水蜜丸样品色谱图导入中药指纹图谱相似度评价系统进行指纹图谱合成, 并采用“中位数”法获得各自的对照特征图谱, 色谱图见图 3。比较大(小)蜜丸和水蜜丸样品的对照特征图谱, 特征峰基本一致。

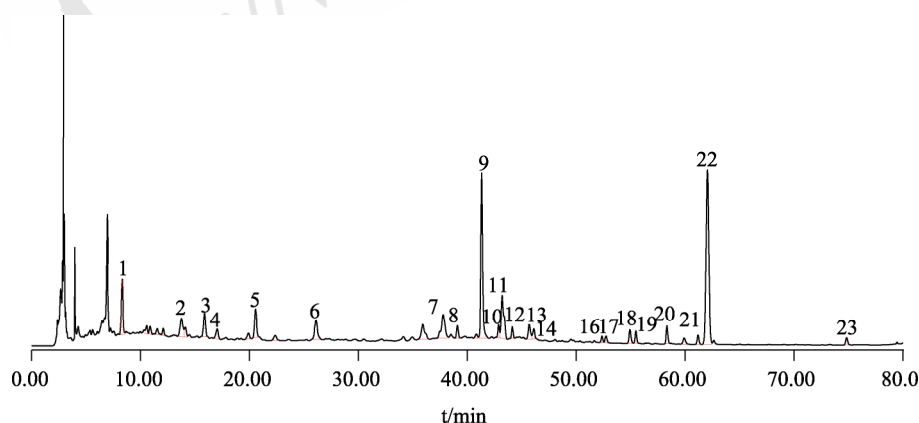


图2 特征峰归属色谱图

1~23-特征峰。

Fig. 2 HPLC chromatogram of attribution of characteristic peaks

1-23-characteristic peak.

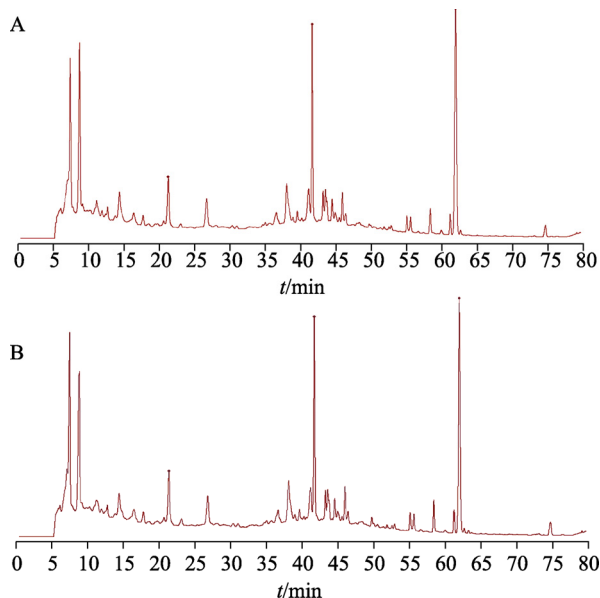


图3 杞菊地黄丸[大(小)蜜丸和水蜜丸]对照特征图谱
A-大(小)蜜丸; B-水蜜丸。

Fig. 3 HPLC chromatogram of Qiju Dihuang pills(big, small-honeyed pills and water-honeyed pills)
A-big, small-honeyed pills; B-water-honeyed pills.

2.6 样品测定及结果分析

采用本研究拟定的方法对本次抽取的 239 批样品进行指纹图谱测定, 并采用中药指纹图谱相似度评价系统进行相似度计算, 结果 148 批大(小)蜜丸中有 37 批样品相似度 <0.80 , 91 批水蜜丸中有 9 批样品相似度 <0.80 , 相似度结果见图 4。分析其相似度低的原因, 这些样品 5-羟甲基糠醛峰差异较大, 因此影响了相似度计算。采用除 5-羟甲基糠醛峰外的其他特征峰进行相似度计算, 结果除 1 批为 0.85 外, 其他均 >0.90 , 相似度结果见图 5。

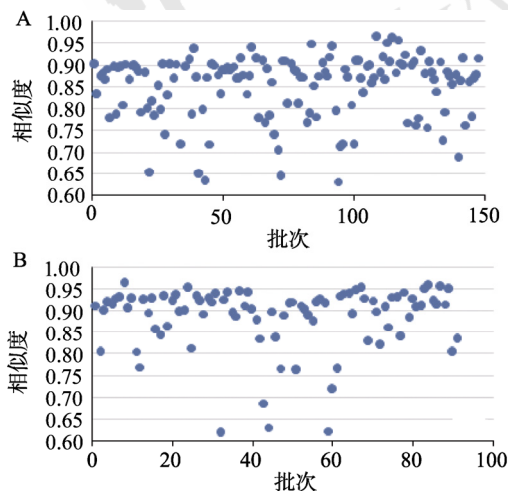


图4 相似度结果

A-148 批大(小)蜜丸; B-91 批水蜜丸。

Fig. 4 Similarity result

A-148 batches of big-honeyed pills and small-honeyed pills; B-91 batches of water-honeyed pills.

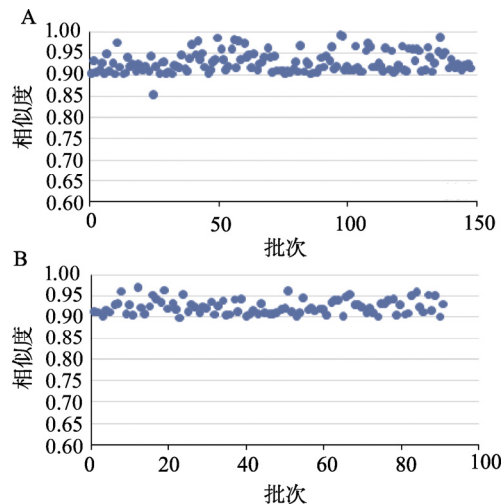


图5 相似度结果(不包含特征峰 1)

A-148 批大(小)蜜丸; B-91 批水蜜丸。

Fig. 5 Similarity result(without characteristic peak 1)

A-148 batches of big-honeyed pills and small-honeyed pills; B-91 batches of water-honeyed pills.

3 讨论

3.1 供试品溶液制备的选择

本研究考察了不同比例甲醇(50%, 80%, 100%)进行提取的情况, 通过试验结果可知, 甲醇作为提取溶剂, 大蜜丸样品不能溶散, 50%甲醇和 80%甲醇差异不大, 考虑到 50%甲醇含水比例较高, 糖分等杂质提取较多, 对柱子污染较大, 因此最终选择 80%甲醇作为提取溶剂。

3.2 流动相考察和检测波长选择

本研究共考察了乙腈-0.1%磷酸溶液、乙腈-水、甲醇-0.1%磷酸溶液、甲醇-水等 4 种流动相组成, 进行梯度洗脱。结果发现, 乙腈-0.1%磷酸溶液作为流动相时, 供试品色谱峰中的个数较多, 因此最终选择乙腈-0.1%磷酸溶液为测定流动相。同时考虑到所选波长应能同时检出尽量多的峰, 因此通过二极管阵列检测器对各波长进行筛选, 最终选择了 225 nm 作为测定波长。

3.3 5-羟甲基糠醛对相似度计算的影响与质量控制

本研究共检出 23 个特征色谱峰, 在计算相似度时发现特征峰 1(5-羟甲基糠醛)影响了相似度的计算, 导致结果异常。从熟地黄阴性样品色谱图(图 6)可知杞菊地黄丸中 5-羟甲基糠醛来源于熟地黄; 同时制剂中加入的炼蜜可通过加热蜂蜜产生, 蜂蜜中葡萄糖等单糖化合物在高温或弱酸条件下脱水产生 5-羟甲基糠醛, 因此杞菊地黄丸中 5-羟甲基糠醛还可能来源于制剂中的炼蜜^[14-15]。根据中国药典 2020 年版一部中杞菊地黄丸的“制法”计

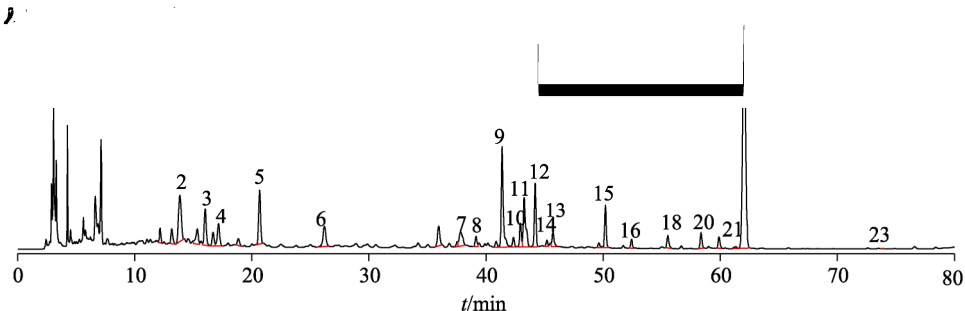


图6 熟地黄阴性样品色谱图

Fig. 6 HPLC chromatogram of negative sample of Rehmannia

算,水蜜丸中炼蜜含量为26%~59%,熟地黄含量为18%~20%,大(小)蜜丸中炼蜜含量为44%~58%,熟地黄含量为13%~15%;样品中的炼蜜直接影响色谱图中5-羟甲基糠醛色谱峰的大小,但不同来源炼蜜的质量不同,不同样品中炼蜜对5-羟甲基糠醛色谱峰的影响并不一致,因此5-羟甲基糠醛不适合用于蜜丸类样品的相似度计算。5-羟甲基糠醛具有神经毒性^[16],239批样品中有46批的5-羟甲基糠醛较高,建议对杞菊地黄丸中5-羟甲基糠醛含量开展质量控制。

3.4 小结

本研究建立杞菊地黄丸的HPLC指纹图谱,其中共有23个特征峰,所对应特征峰的相对保留时间稳定,方法学考察表明精密度、稳定性、重复性均符合要求。利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统,计算出相似度符合国家相关要求,为科学评价及有效控制杞菊地黄丸的质量提供可靠方法。

REFERENCES

- [1] 中国药典.一部[S]. 2020: 1004-1005.
- [2] FAN M S, LI R. Clinical analysis of Qiju Dihuang pill combined with losartan potassium tablet in the treatment of menopause insomnia with hypertension[J]. World J Sleep Med(世界睡眠医学杂志), 2019, 6(1): 22-23.
- [3] 王科,唐文婷,李曦.中药熏蒸联合杞菊地黄丸治疗白内障术后干眼症49例[J].环球中医药, 2018, 11(9): 1417-1419.
- [4] LI H M, YAO P Y, LI X H. Clinical study on Qiju Dihuang pills combined with extract of *Ginkgo biloba* leaves in treatment of nonproliferative diabetic retinopathy[J]. Drugs Clin(现代药物与临床), 2020, 35(6): 1176-1180.
- [5] QIN Y, ZHU J G. Textual research of the medicinal function of Radices Rehmanniae[J]. China J Chin Med(中医学报), 2018, 33(1): 114-118.
- [6] YU X H, GAO H Y, JIN C S, et al. Fingerprint of Paeoniae Radix Alba standard decoction from different producing areas and determination of four monoterpenoid glycosides components[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2020, 37(11): 1290-1295.
- [7] LI F F, WEI Y, SONG M J, et al. Determination of three components and fingerprint research in Anisi stellati Fructus by QAMS method[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2020, 29(12): 1419-1424.
- [8] ZHAN L L. Study on fingerprint and multi-components determination of Niu Huang Qinggan capsules by HPLC[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2020, 37(1): 45-49.
- [9] LI L M, DENG Y, TANG J L, et al. Quality assessment of Naodesheng pills based on fingerprint and content determination[J]. Hunan J Tradit Chin Med(湖南中医杂志), 2020, 36(10): 168-172.
- [10] YAN T, SONG X L, ZHANG N, et al. Study on HPLC fingerprints of Wuweiqinzhao pills and determination of four major components[J]. J Baotou Med Coll(包头医学院学报), 2020, 36(2): 110-113.
- [11] XIE C X, FAN M Y, BAI Y, et al. Evaluation of the quality of Qiju Dihuang pills (condensed) by NIRS and HPLC fingerprint[J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2014, 45(12): 1177-1180.
- [12] SUN G X, WU B. Quantitative identification Qijudihuang pill by integrating overall information method based on parallel five wavelength high performance liquid chromatographic fingerprints[J]. Chin J Chromatogr(色谱), 2010, 28(9): 877-884.
- [13] SUN G X, WU B. Quality identification of Qijudihuang pills by digitized HPLC fingerprints[J]. Centr South Pharm(中南药学), 2010, 8(4): 299-303.
- [14] LIU X X, HUANG J Z, SUN L L, et al. Quality investigation of refined honey in Antai pills(big honeyed pills)[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2017, 37(12): 2279-2285.
- [15] WANG Q, XIE Q F, LIU L N, et al. Quality investigation of honey in Liuwei Dihuang pill(big honeyed pills)(2) Determination of 5-hydroxymethyl furfural(5-HMF)[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2010, 30(12): 2349-2351.
- [16] LI E C, HE J M, JIN H T, et al. Research progress of pharmacological activity and toxicity of 5-hydroxymethylfurfural[J]. Chin J Pharmacovigil(中国药物警戒), 2018, 15(4): 210-215.

收稿日期: 2021-02-01

(本文责编: 曹粤锋)