

湿毒清胶囊高效液相色谱指纹图谱

郑华, 蔡雨, 苏志恒*, 梁永红, 宋慧

(广西医科大学 医学科学实验中心, 药学院, 南宁 530021)

[摘要] **目的:**建立湿毒清胶囊高效液相色谱指纹图谱,对湿毒清胶囊产品的质量稳定性进行评价,为湿毒清胶囊的质量控制提供更为科学有效的方法。**方法:**采用 Agilent XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液,梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 220 nm,柱温 30 °C,对 10 批不同批次的湿毒清胶囊复方制剂进行分析,使用国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004 A 版,对产品的相似度进行评价。**结果:**建立了湿毒清胶囊指纹图谱,以黄芩苷为参照峰,确立了复方中 21 个共有峰,各共有峰的相对保留时间的 RSD < 1%,相对峰面积的 RSD < 4%,方法精密度、稳定性、重复性良好。采用该方法测定了 10 个批次湿毒清胶囊指纹图谱,相似度均 > 0.95。**结论:**10 批湿毒清胶囊复方制剂质量稳定。该方法简便易行,稳定可靠,重复性好,能够表征湿毒清胶囊的整体质量,可为其生产和质量控制提供科学的依据。

[关键词] 湿毒清胶囊; 高效液相色谱; 指纹图谱; 质量控制

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)02-0059-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016020059

Fingerprints of Shiduqing Capsule by High Performance Liquid Chromatography

ZHENG Hua, CAI Yu, SU Zhi-heng*, LIANG Yong-hong, SONG Hui
(Medical Scientific Research Center, School of Pharmaceutical Science,
Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a measurement method for HPLC fingerprints of Shiduqing capsule, to evaluate the quality stability of Shiduqing capsule, and provide a more scientific and effective method for the quality control of Shiduqing capsule. **Method:** The fingerprint of Shiduqing capsule was performed on Agilent XDB-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.1% phosphoric acid as gradient mobile phase. The flow rate was set at 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 220 nm and the column temperature was maintained at 30 °C. Traditional Chinese medicine (TCM) chromatographic fingerprint similarity evaluation system (2004AEdition) by State Pharmacopoeia Committee of China was used to evaluate the similarity of 10 batches of Shiduqing capsules. **Result:** The HPLC fingerprint of the Shiduqing capsules was established. Taking baicalin as the reference peak, 21 common peaks were found from the compounds. RSD of the relative retention time for each common chromatographic peak was less than 1% and the RSD of relative peak area was less than 4%. The method has good precision, repeatability and stability. With this method to determine the HPLC fingerprints of 10 batches of Shiduqing capsules, the similarity value was more than 0.95 for all of them. **Conclusion:** The quality of 10 batches of Shiduqing capsules is stable. This method is simple and easy to apply, with good precision, reproducibility and stability, which could manifest the overall quality characteristics of the Shiduqing capsules, and provide a scientific basis for the production and quality control of Shiduqing capsules.

[Key words] Shiduqing capsules; HPLC; fingerprint; quality control

[收稿日期] 20150704(004)

[第一作者] 郑华,博士,从事中药质量控制研究,Tel:0771-5358232,E-mail:215831305@qq.com

[通讯作者] * 苏志恒,生药学博士,副教授,从事中药质量控制研究及新药研发,Tel:0771-5327162,E-mail:suzhiheng1981@126.com

湿毒清胶囊由黄芩、白鲜皮、丹参、蝉蜕、地黄、当归、甘草、土茯苓、苦参 9 味中药组成,由广西玉林制药集团有限责任公司生产,属国家中药保护品种,临床上主要用于治疗皮肤瘙痒、皮肤过敏等,对湿疹疗效尤为显著。方中当归补血活血,调经止痛;地黄清热凉血,养阴生津,共为君药。苦参清热解毒,杀虫止痒;丹参清热除烦,活血祛瘀;土茯苓、白鲜皮、黄芩清热解毒,燥湿止痒,为臣药。蝉蜕祛风解痉,发散风热,为佐药。甘草调和诸药,为使药。全方共奏养血润肤,祛风止痒之功^[1]。湿毒清胶囊作为一种复方制剂,其化学成分和药效成分复杂,通过单一化学成分的含量测定难以对其质量进行全面有效的控制。当前对于湿毒清胶囊质量控制方法的研究多集中在对丹参酮 II_A,黄芩苷,丹酚酸 B,阿魏酸,苦参碱等单一化学成分的含量测定^[2-5],单一成分含量的变化不能全面反映中药复方制剂的整体性和复杂性,难以全面控制湿毒清胶囊的内在质量。因此,本实验建立湿毒清胶囊高效液相色谱指纹图谱,从整体上控制湿毒清胶囊的质量,为湿毒清胶囊的质量控制提供更加全面科学有效的方法。

1 材料

LC-20A 型液相色谱仪(包括 LC-20AT 型二元泵, SIL-20A 型进样器, SPD-20A 型紫外检测器,日本岛津), EL204 型 1/10 万电子天平(梅特勒-托利多), SG8200HPT 型超声波清洗器(上海冠特超声仪器有限公司)。

湿毒清胶囊购于广西南宁市老百姓大药房、康全药店、国泰大药房、一心药店,共 10 个批次(批号分别为 261955, 261961, 261992, 262033, 262077, 262080, 262084, 262085, 262097, 262109);黄芩苷对照品(批号 15012813),购于成都曼思特生物科技有限公司;乙腈为色谱纯,水为超纯水,甲醇为分析纯。

2 方法与结果

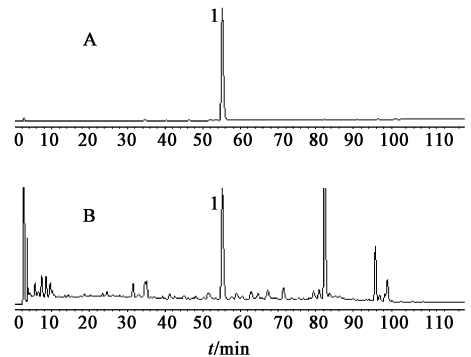
2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取黄芩苷 0.98 mg,加入甲醇 10 mL,超声 1 min,使其完全溶解,放冷,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,备用。

2.1.2 供试品溶液的制备 取湿毒清胶囊内容物 2 g,精密称定,置于 150 mL 圆底烧瓶,加入甲醇 80 mL,66 °C 水浴加热回流 10 min。

2.2 色谱条件 采用 Agilent XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1%

磷酸水(B)溶液梯度洗脱(0 ~ 20 min, 5% ~ 15% A; 20 ~ 50 min, 15% ~ 21% A; 50 ~ 60 min, 21% ~ 24% A; 60 ~ 65 min, 24% ~ 25% A; 65 ~ 75 min, 25% ~ 30% A; 75 ~ 80 min, 30% ~ 35% A; 80 ~ 90 min, 35% ~ 40% A; 90 ~ 120 min, 40% ~ 50% A),检测波长 220 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,进样量 20 μL。在该条件下,理论塔板数以黄芩苷计不低于 4 000。黄芩苷对照品与湿毒清胶囊样品色谱图见图 1。



A. 黄芩苷对照品; B. 湿毒清胶囊样品; 1. 黄芩苷

图 1 湿毒清胶囊 HPLC 指纹谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of Shiduqing capsules

2.3 方法学考察

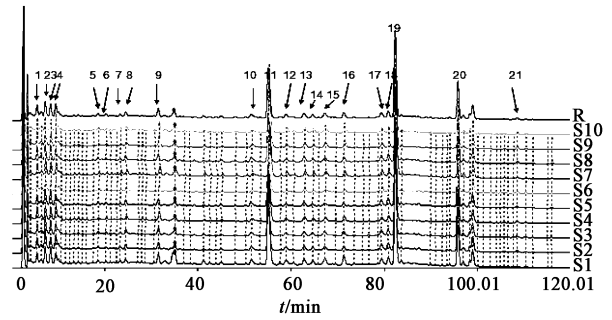
2.3.1 精密度试验 取湿毒清胶囊 2 g,精密称定,按照 2.1.2 项下的方法制备供试品溶液,按照 2.2 项下的色谱条件,平行进样 5 次,并将结果导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004 A 版,进行色谱峰匹配^[6],结果以黄芩苷为参照峰,19 个共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 1%,相对峰面积的 RSD 均 < 4%,表明仪器稳定,精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取湿毒清胶囊内容物 2 g,精密称定,按照 2.1.2 项下的方法制备供试品溶液;按照 2.2 项下的色谱条件,分别在室温放置 1, 4, 7, 10, 13, 24 h 后进行测定,并将结果导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004 A 版,进行色谱峰匹配^[6],结果 1 ~ 21 号共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 1%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.3 重复性试验 取同一批号湿毒清胶囊内容物,按照 2.1.2 项下方法平行制备供试品溶液 6 份;按照 2.2 项下的色谱条件,平行进样 6 次,并将结果导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004 A 版,进行色谱峰匹配^[6],结果以黄芩苷为参照峰,湿毒清胶囊供试品主要共有峰的相对保留时间的 RSD 均 < 1%,相对峰面积的 RSD 均 < 4%,表明该

方法重复性良好。

2.4 样品测定及指纹图谱分析 取 10 个批次的湿毒清胶囊,分别按照 2.1.2 项下的方法平行制备供试品溶液 10 份;按照 2.2 项下的色谱条件进行测定,并将结果导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004 A 版,进行色谱峰匹配,并生成对照图谱,结果见图 2。选取图 2 峰面积较大,分离度较好的 21 个共有峰,以黄芩苷(色谱峰编号为 11)为参照峰,计算色谱图中各个峰的相对保留时间和相对峰面积,计算结果见表 1、2。



R. 对照图谱;S1~S10. 10 批样品

图 2 10 批湿毒清胶囊的 HPLC 指纹谱

Fig.2 10 batches of Shiduqing capsule fingerprint

表 1 10 批湿毒清胶囊 21 个共有峰的相对保留时间

Table 1 Ten batches of Shiduqing capsule relative retention time

| 峰号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 0.100 | 0.100 | 0.101 | 0.100 | 0.100 | 0.101 | 0.100 | 0.100 | 0.100 | 0.100 |
| 2 | 0.132 | 0.132 | 0.132 | 0.132 | 0.132 | 0.132 | 0.132 | 0.132 | 0.132 | 0.132 |
| 3 | 0.153 | 0.153 | 0.153 | 0.153 | 0.153 | 0.153 | 0.153 | 0.153 | 0.153 | 0.153 |
| 4 | 0.173 | 0.173 | 0.174 | 0.173 | 0.173 | 0.173 | 0.173 | 0.173 | 0.174 | 0.174 |
| 5 | 0.338 | 0.338 | 0.338 | 0.338 | 0.338 | 0.338 | 0.338 | 0.338 | 0.338 | 0.338 |
| 6 | 0.368 | 0.368 | 0.368 | 0.368 | 0.368 | 0.368 | 0.368 | 0.368 | 0.368 | 0.368 |
| 7 | 0.423 | 0.423 | 0.424 | 0.424 | 0.423 | 0.423 | 0.424 | 0.423 | 0.424 | 0.424 |
| 8 | 0.444 | 0.445 | 0.445 | 0.445 | 0.445 | 0.445 | 0.445 | 0.445 | 0.445 | 0.445 |
| 9 | 0.573 | 0.573 | 0.573 | 0.572 | 0.572 | 0.572 | 0.572 | 0.573 | 0.572 | 0.573 |
| 10 | 0.934 | 0.934 | 0.934 | 0.934 | 0.933 | 0.934 | 0.934 | 0.933 | 0.934 | 0.934 |
| 11 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |
| 12 | 1.069 | 1.069 | 1.070 | 1.067 | 1.071 | 1.069 | 1.067 | 1.071 | 1.067 | 1.067 |
| 13 | 1.138 | 1.139 | 1.140 | 1.139 | 1.140 | 1.139 | 1.139 | 1.138 | 1.138 | 1.138 |
| 14 | 1.172 | 1.172 | 1.173 | 1.173 | 1.173 | 1.173 | 1.173 | 1.172 | 1.172 | 1.172 |
| 15 | 1.219 | 1.219 | 1.220 | 1.220 | 1.220 | 1.220 | 1.220 | 1.219 | 1.219 | 1.219 |
| 16 | 1.293 | 1.294 | 1.295 | 1.294 | 1.295 | 1.294 | 1.294 | 1.294 | 1.294 | 1.293 |
| 17 | 1.439 | 1.440 | 1.441 | 1.441 | 1.441 | 1.440 | 1.440 | 1.439 | 1.439 | 1.438 |
| 18 | 1.465 | 1.466 | 1.468 | 1.468 | 1.468 | 1.467 | 1.467 | 1.466 | 1.466 | 1.465 |
| 19 | 1.492 | 1.494 | 1.496 | 1.495 | 1.495 | 1.494 | 1.494 | 1.493 | 1.493 | 1.492 |
| 20 | 1.736 | 1.737 | 1.740 | 1.740 | 1.740 | 1.739 | 1.739 | 1.737 | 1.736 | 1.735 |
| 21 | 1.966 | 1.968 | 1.971 | 1.971 | 1.970 | 1.970 | 1.969 | 1.967 | 1.966 | 1.965 |

以黄芩苷为参照峰,10 个批次的湿毒清胶囊的 21 个共有峰相对保留时间的 RSD 均 <1%, 相对峰面积的 RSD 均 <4%。

2.5 10 批湿毒清胶囊 HPLC 指纹图谱的相似度评价 将 10 批湿毒清胶囊的高效液相色谱图导入国家药典委员会推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004 A 版,计算 10 批湿毒清胶囊与对照指纹图谱的相似度^[20],结果 10 批湿毒清胶囊的相似

度分别为 0.975,0.983,0.988,0.987,0.980,0.975,0.984,0.985,0.979,0.956,均 >0.95。

3 讨论

本实验先后选择了乙腈-水和乙腈-0.1% 磷酸水溶液作为流动相,当乙腈-水作为流动相系统,所得色谱峰信息量少,乙腈-0.1% 磷酸水溶液作为流动相系统时,洗脱能力较强,色谱图信息量大,因此选择乙腈-0.1% 磷酸水溶液作为流动相系统。本实

表 2 10 批湿毒清胶囊 21 个共有峰的相对峰面积

Table 2 Ten batches of Shiduqing capsule relative peak area

| 峰号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 0.151 | 0.152 | 0.149 | 0.152 | 0.152 | 0.151 | 0.151 | 0.151 | 0.152 | 0.151 |
| 2 | 0.182 | 0.180 | 0.178 | 0.181 | 0.182 | 0.181 | 0.181 | 0.182 | 0.181 | 0.181 |
| 3 | 0.189 | 0.188 | 0.186 | 0.189 | 0.189 | 0.187 | 0.188 | 0.188 | 0.189 | 0.189 |
| 4 | 0.146 | 0.149 | 0.144 | 0.148 | 0.147 | 0.146 | 0.146 | 0.147 | 0.146 | 0.147 |
| 5 | 0.103 | 0.103 | 0.101 | 0.103 | 0.103 | 0.102 | 0.102 | 0.103 | 0.103 | 0.103 |
| 6 | 0.086 | 0.087 | 0.086 | 0.087 | 0.086 | 0.086 | 0.085 | 0.087 | 0.087 | 0.086 |
| 7 | 0.103 | 0.103 | 0.100 | 0.103 | 0.103 | 0.103 | 0.103 | 0.103 | 0.103 | 0.103 |
| 8 | 0.140 | 0.140 | 0.138 | 0.140 | 0.140 | 0.140 | 0.137 | 0.139 | 0.141 | 0.140 |
| 9 | 0.131 | 0.131 | 0.128 | 0.130 | 0.130 | 0.130 | 0.130 | 0.133 | 0.130 | 0.131 |
| 10 | 0.170 | 0.170 | 0.167 | 0.170 | 0.170 | 0.170 | 0.169 | 0.169 | 0.170 | 0.170 |
| 11 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |
| 12 | 0.119 | 0.120 | 0.118 | 0.119 | 0.118 | 0.121 | 0.119 | 0.119 | 0.120 | 0.119 |
| 13 | 0.174 | 0.174 | 0.169 | 0.177 | 0.174 | 0.173 | 0.172 | 0.177 | 0.177 | 0.176 |
| 14 | 0.128 | 0.128 | 0.125 | 0.128 | 0.128 | 0.127 | 0.124 | 0.126 | 0.128 | 0.127 |
| 15 | 0.167 | 0.166 | 0.165 | 0.167 | 0.167 | 0.170 | 0.167 | 0.166 | 0.165 | 0.171 |
| 16 | 0.205 | 0.205 | 0.198 | 0.204 | 0.204 | 0.203 | 0.203 | 0.204 | 0.205 | 0.204 |
| 17 | 0.135 | 0.135 | 0.124 | 0.135 | 0.136 | 0.135 | 0.130 | 0.136 | 0.136 | 0.136 |
| 18 | 0.133 | 0.133 | 0.123 | 0.125 | 0.136 | 0.134 | 0.125 | 0.134 | 0.136 | 0.136 |
| 19 | 1.120 | 1.145 | 1.102 | 1.127 | 1.117 | 1.112 | 1.111 | 1.120 | 1.121 | 1.119 |
| 20 | 0.360 | 0.361 | 0.360 | 0.361 | 0.358 | 0.361 | 0.358 | 0.357 | 0.359 | 0.363 |
| 21 | 0.009 | 0.009 | 0.009 | 0.010 | 0.009 | 0.009 | 0.009 | 0.010 | 0.010 | 0.009 |

验在 220,286 nm 两个波长进行检测,两个检测波长分离度 ≥ 1.5 的峰数目相等,而 220 nm 检测波长下,色谱峰数目较多,色谱图信息量相对较大,较符合指纹图谱要求的整体性,故选择 220 nm。

中药复方是多味药、多组分、多因素构成的复杂体系,其化学成分的复杂性和多样性是其疗效的物质基础。中药指纹图谱技术作为一种从整体上控制质量的手段,已被国内外广泛认可^[7]。本文通过对不同批次的湿毒清胶囊的指纹图谱分析,以黄芩苷作为参照峰对 10 批样品色谱图进行了相似度评价,其相似度均 > 0.95 ,表明湿毒清胶囊复方制剂各批次质量较稳定。利用指纹图谱相似度评价结果可以直观分析不同批号制剂质量差异,不仅可以用于指导生产,还可用于控制药材的来源产地、采摘期,选用有效部位对成品造成的影响^[8-9]。本研究建立的指纹图谱评价方法简便易行,稳定可靠,重复性好,可作为湿毒清胶囊质量控制的方法,可为进一步提高湿毒清胶囊的质量控制水平提供科学依据。

[参考文献]

[1] 郝近大. 中国药典辅助说明[M]. 北京:中国中医药

出版社,2011:534.

[2] 李思明,何俊兵,王辉,等. 湿毒清胶囊化学成分与药理作用研究进展[J]. 现代药物与临床,2009,24(4): 220-224.

[3] 冯新刚,李钦青,代龙. HPLC 测定湿毒清胶囊中苦参碱的含量[J]. 现代中药研究与实践,2011,25(2): 70-71.

[4] 黄诗远,陈凤,姚红霞. RP-HPLC 法测定湿毒清胶囊中丹酚酸 B 和黄芩苷的含量[J]. 中国药师,2008,11(16):663-664.

[5] 唐安玲,郑琰,宋英,等. HPLC 测定疏经止痛胶囊中芍药苷和丹参酮 II_A 含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(3):41-43.

[6] 高颖,张云天,徐以亮,等. 炒麦芽颗粒的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(20): 115-117.

[7] 刘智,王爱民,许祖超,等. 全天麻胶囊特征指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(15):86-88.

[8] 张前飞,杨玉琴,秦利芬,等. 降粘胶囊 HPLC 指纹图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(1):77-81.

[9] 方芳,王晶,方舟,等. 复方黄白胶囊的多波长融合 HPLC 指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(17):113-116.

[责任编辑 顾雪竹]