

黄白甘草洗剂的 HPLC 指纹图谱研究

段渠^{1*}, 林俊芝¹, 张定堃²

(1. 成都中医药大学附属医院, 成都 610072; 2. 成都中医药大学药学院, 成都 611137)

[摘要] 目的:建立黄白甘草洗剂的 HPLC 指纹图谱的检测方法。方法:采用 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.05% 磷酸水梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 237 nm,对 10 批黄白甘草洗剂进行 HPLC 指纹图谱检测,采用“中药色谱指纹图谱评价系统 2004 年 A 版”进行评价。结果:黄白甘草洗剂采用该方法分离效果好,确定了 20 个共有峰,10 批洗剂的相似度均 >0.9。结论:该方法重复性、稳定性好,建立的指纹图谱可为黄白甘草洗剂的质量评价提供依据。

[关键词] 黄白甘草洗剂; 高效液相色谱; 指纹图谱; 相似度评价

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0081-04

[doi] 10.11653/syfy2013240081

Study on the HPLC Fingerprint of Huangbai Gancao Lotion

DUAN Qu^{1*}, LIN Jun-zhi¹, ZHANG Ding-kun²

(1. Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China;
2. Chengdu University of TCM, College of Pharmacy, Chengdu 611137, China)

[收稿日期] 20130812012

[基金项目] 四川省教育厅课题(P09304)

[通讯作者] * 段渠,副研究员,硕士生导师,从事中医美容的临床实验研究及皮外科特色制剂研究,E-mail:duanqu@126.com

欧洲药典 7.0 版已收载香蜂花叶,但含量测定中仅规定迷迭香酸一种成分。我们的前期研究发现迷迭香酸,咖啡酸及咖啡酸乙酯为香蜂花的主要酚类成分。本实验建立了 RP-HPLC 法同时测定香蜂花中迷迭香酸、咖啡酸和咖啡酸乙酯的含量,实验结果表明,方法简便快速,结果准确,重复性好,可为香蜂花的质量控制提供依据。

[参考文献]

[1] 吴征镒,李锡文. 中国植物志. 第 66 卷[M]. 北京:科学出版社,1977:214.
[2] 陈银龙. 香蜂花的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(3):513.
[3] Adinee J, Piri K, Karami O. Essential oil component in flower of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) [J]. Am J Biochem Biotech, 2008(4):277.
[4] Weitzel C, Petersen M. Cloning and characterisation of rosmarinic acid synthase from *Melissa officinalis* L [J]. Phytochemistry, 2011, 72(7):572.

[5] Basta A, Tzakou O, Couladis M. Composition of the leaves essential oil of *Melissa officinalis* L. from Greece [J]. Flavour Fragr J, 2005(20):642.
[6] Sharafzadeh S, Khosh-khui M, Javidnia K. Aroma profile of leaf and stem of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) Grown under greenhouse conditions[J]. Adv Env Biol, 2011,5(4):547.
[7] Sousa A C, Gattass C R, Alviano D S, et al. *Melissa officinalis* L. essential oil; antitumoral and antioxidant activities [J]. J Pharm Pharmacol, 2004, 56(5):677.
[8] Mazzanti G, Battinelli L, Pompeo C, et al. Inhibitory activity of *Melissa officinalis* L. extract on Herpes simplex virus type 2 replication [J]. Nat Prod Res, 2008, 22(16):1433.
[9] 郑辉申,万祥荆,颖艾莎,等. 香蜂草药学研究进展[J]. 心血管病防治知识:学术版, 2012(4):50.
[10] 王琿,张振秋. HPLC 波长切换法同时测定迷迭香中咖啡酸、阿魏酸和迷迭香酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5):116.

[责任编辑 顾雪竹]

[Abstract] Objective: To establish HPLC fingerprint detection for Huangbai Gancao lotion. **Method:** Kromasil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was selected, gradient eluted with mobile phase of acetonitrile-0.05% phosphoric acid water, flow rate was 1.0 mL · min⁻¹, detection wavelength was 237 nm. 10 batches of Huangbai Gancao lotion were detected by HPLC fingerprint, then evaluated with 2004 edition of ‘chromatographic fingerprint evaluation system of Chinese medicine’. **Result:** By taking this method, peaks separation of Huangbai Gancao lotion was better, 20 common peaks were identified. Furthermore, similarity of these 10 batches was more than 0.9. **Conclusion:** This analysis method owns good repeatability and stability, it could provide a detection method for quality control of Huangbai Gancao lotion.

[Key words] Huangbai Gancao lotion; HPLC; Fingerprint; similarity evaluation

黄白甘草汤是成都中医药大学附属医院治疗剥脱性唇炎的外用洗剂,由黄精、马齿苋、白芷、生甘草 4 味药物按 2:2:1:2 的比例,经纯水提取、离心去除沉淀、减压浓缩制备而成。课题组前期对该洗剂的疗效进行了临床观察,发现其疗效明显优于对照药物红霉素眼膏,对于剥脱性唇炎具有疗效显著、副作用低的特点^[1]。但鉴于目前该制剂质量标准中缺乏有效的鉴别方法,课题组在完成对其水提工艺正交考察的基础上,应用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件”,对该洗剂的 HPLC 指纹图谱进行了研究,以期更好地控制质量,为新药研发提供支撑。

1 仪器与试剂

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津),Mettler Toledo EL104 型 1/万电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),甘草苷对照品(四川维克奇生物科技有限公司,批号 111127),甘草酸铵对照品(四川维克奇生物科技有限公司,批号 110222),乙腈为色谱纯,磷酸为分析纯,水为怡宝纯净水,黄白甘草洗剂处方中的黄精、马齿苋、白芷、生甘草均为成都中医药大学附属医院药房提供的小包装饮片,经成都中医药大学药学院标本中心卢先明教授鉴定分别为百合科植物滇黄精 *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl 的干燥鳞茎、马齿苋科植物马齿苋 *Portulaca oleracea* L. 的干燥地上部分、伞形科植物白芷 *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. 的干燥根及豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎切制而成的饮片。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 取甘草苷与甘草酸铵对照品适量,精密称定,置棕色量瓶中,加甲醇适量超声使溶解,取出放冷,加甲醇定容,制备成浓度分别为 96.8,239.2 mg · L⁻¹ 的混合对照品溶液。

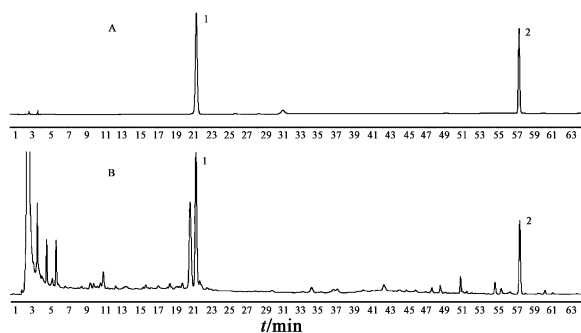
2.2 供试品溶液的制备 按 2:2:1:2 的比例称取 4 种饮片,加入 6 倍量纯水提取,每次 1 h,提取 3 次,

纱布过滤,合并滤液,放冷后,4 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,去除沉淀,70 °C 减压浓缩至 0.2 g · mL⁻¹ 的浓度,加入 0.25% 苯甲酸钠,灌装,灭菌,即得。精密吸取各批次的黄白甘草洗剂 10 mL 于 100 mL 量瓶中,加纯水定容,混匀,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得供试品溶液。

2.3 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm)(Akzo Nobel 公司);流动相乙腈(A)-0.05% 磷酸(B),洗脱程序见表 1;柱温 25 °C,检测波长 237 nm,流速 1.0 mL · min⁻¹。对照品与供试品溶液的 HPLC 图见图 1。

表 1 流动相梯度洗脱方式

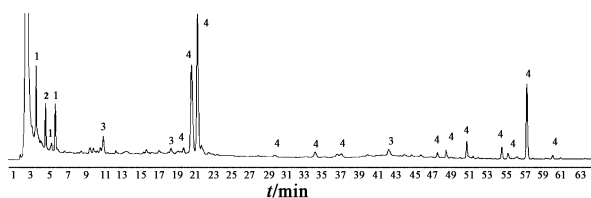
t/min	A/%	B/%	t/min	A/%	B/%
0 ~ 15	12 → 20	88 → 80	57 ~ 63	45	55
15 ~ 32	20 → 24	80 → 76	63 ~ 70	45 → 90	55 → 10
32 ~ 57	24 → 45	76 → 55	70 ~ 80	90 → 98	10 → 2



A. 对照品; B. 供试品; 1. 甘草苷; 2. 甘草酸铵

图 1 黄白甘草洗剂 HPLC

2.4 指纹图谱中主要峰的归属^[2] 黄精、马齿苋、白芷、生甘草 4 味饮片,按 2.2 中的处方量及工艺条件分别加工制备,采用相同的色谱条件进行分析。经过与成品 HPLC 比较,可从成品指纹图谱中辨认出主要共有色谱峰的来源,其中来自黄精的色谱峰 3 个,来自马齿苋的色谱峰 1 个,来自白芷的色谱峰 3 个,来自生甘草的色谱峰 13 个,结果见图 2。



1. 来自黄精;2. 来自马齿苋;3. 来自白芷;4. 来自生甘草

图2 指纹图谱中主要峰的归属

2.5 方法学研究^[3-5]

2.5.1 精密度试验 取 2.2 项下的一份供试品溶液 10 μL , 连续进样 6 次, 考察色谱峰的相对保留时间与峰面积, 结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 1%, 峰面积的 RSD 均 < 5%, 表明仪器精密度良好, 符合指纹图谱相关要求。

2.5.2 重复性试验 按 2.2 项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 分别进样, 结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 1.5%, 峰面积的 RSD 均 < 5%, 表明该方法重复性良好。

2.5.3 稳定性试验 取 2.2 项下的一份供试品溶液, 分别于室温放置 0, 4, 8, 12, 16, 24 h 后进样测定, 结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 1.5%, 峰面积的 RSD 均 < 5%, 表明黄白甘草洗剂供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6 指纹图谱的建立与分析^[6-7]

2.6.1 黄白甘草汤的 HPLC 指纹图谱的建立 按 2.2 项下供试品溶液的制备方法, 分别制备 10 批次黄白甘草洗剂的供试品溶液, 按 2.3 项下色谱条件进样, 计算各共有峰的相对峰面积, 结果见表 2。

表2 黄白甘草洗剂 10 批样品相对峰面积

共有峰号	样品批号										RSD /%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	
1	3.48	4.10	4.37	3.61	3.39	4.73	3.94	4.24	4.29	3.96	10.58
2	0.37	0.52	0.41	0.48	0.33	0.34	0.40	0.61	0.42	0.43	19.88
3	2.42	2.26	2.45	2.51	2.34	2.67	2.17	2.61	2.63	1.98	9.17
4	1.02	1.84	1.53	1.20	1.23	1.11	1.04	1.34	1.18	1.21	19.58
5	0.45	0.54	0.53	0.41	0.53	0.54	0.58	0.62	0.72	0.47	16.42
6	0.58	0.81	0.72	0.49	0.85	0.56	0.54	0.65	0.76	0.52	19.93
7	6.98	8.70	8.22	8.00	7.21	7.42	8.25	9.27	7.83	8.12	8.60
8	9.43	11.56	11.42	10.31	10.84	9.33	10.40	11.94	11.74	10.30	8.67
9	0.28	0.38	0.33	0.29	0.28	0.27	0.21	0.31	0.32	0.22	17.45
10	0.47	0.63	0.58	0.48	0.50	0.44	0.39	0.66	0.54	0.47	16.58
11	0.52	0.61	0.57	0.62	0.61	0.55	0.57	0.55	0.75	0.60	10.64
12	0.36	0.62	0.54	0.63	0.76	0.56	0.78	0.69	0.65	0.50	20.62
13	0.61	0.61	0.61	0.76	0.38	0.60	0.74	0.87	0.67	0.78	20.39
14	0.26	0.28	0.24	0.36	0.31	0.20	0.33	0.24	0.23	0.28	18.03
15	0.35	0.45	0.38	0.43	0.41	0.31	0.42	0.53	0.35	0.52	17.31
16	0.82	0.60	0.66	1.06	0.91	0.74	0.96	0.87	0.67	1.12	20.83
17	0.56	0.66	0.55	0.68	0.70	0.51	0.59	0.75	0.45	0.67	15.48
18	0.31	0.32	0.27	0.45	0.40	0.27	0.44	0.37	0.27	0.43	20.90
19	3.63	3.42	3.99	3.44	3.39	3.26	3.42	3.84	3.32	3.83	7.09
20	0.19	0.27	0.22	0.24	0.28	0.35	0.22	0.31	0.15	0.24	23.53

表3 10 批黄白甘草洗剂的相似度

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照
S1	1.000	0.980	0.982	0.988	0.991	0.981	0.976	0.991	0.976	0.985	0.993
S2	0.980	1.000	0.992	0.987	0.976	0.998	0.987	0.976	0.961	0.982	0.992
S3	0.982	0.992	1.000	0.988	0.974	0.991	0.988	0.980	0.966	0.980	0.992
S4	0.988	0.987	0.988	1.000	0.981	0.990	0.984	0.984	0.960	0.989	0.993
S5	0.991	0.976	0.974	0.981	1.000	0.979	0.975	0.990	0.978	0.982	0.991
S6	0.981	0.998	0.991	0.990	0.979	1.000	0.990	0.980	0.966	0.985	0.994
S7	0.976	0.987	0.988	0.984	0.975	0.990	1.000	0.975	0.976	0.981	0.992
S8	0.991	0.976	0.980	0.984	0.990	0.980	0.975	1.000	0.974	0.988	0.992
S9	0.976	0.961	0.966	0.960	0.978	0.966	0.976	0.974	1.000	0.964	0.981
S10	0.985	0.982	0.980	0.989	0.982	0.985	0.981	0.988	0.964	1.000	0.992
对照	0.993	0.992	0.992	0.993	0.991	0.994	0.992	0.992	0.981	0.992	1.000

2.6.2 黄白甘草洗剂共有指纹图谱的建立 应用中草药指纹图谱相似度评价系统 2004A 版对 10 批黄白甘草洗剂的色谱图进行分析,建立其指纹图谱,其 HPLC 指纹图谱叠图见图 3。

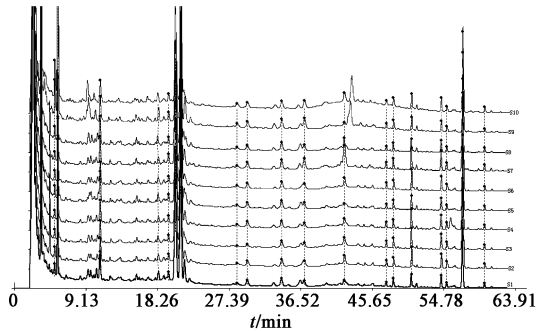


图 3 10 批黄白甘草洗剂的 HPLC 指纹图谱

2.6.3 黄白甘草洗剂相似度计算 以 S1 批黄白甘草洗剂的色谱图为参照图谱,利用中位数法,时间窗 0.1 min,计算 10 批黄白甘草洗剂的相似度,结果见表 3。结果表明,10 批黄白甘草洗剂的相似度较高,达到了 0.981 ~ 0.994。

3 讨论

检测波长选择时,曾对样品在 220, 237, 250, 280, 320 nm 处进行了分析,结果表明,在 237 nm 时所反映的色谱峰信息最多,基线平稳,且指纹图谱中峰面积最大的 3 个峰均属于生甘草,参照《中国药典》2010 年版(一部)对甘草药材及饮片质量控制的条件,将检测波长设定为 237 nm 以同时满足定性鉴别与定量控制的需要。流动相选择时,曾对甲醇-水系统、乙腈-水系统进行了筛选考察,甲醇-水系统的分离度较差,尤其是黄精、马齿苋中水溶性成分含量较高,不能满足指纹图谱分离的需要;而乙腈-水系统中部分峰峰形差、拖尾严重,导致相邻色谱峰互相包裹,不易分开,故最终选择乙腈-磷酸水系统。此外,空白溶剂在 68 ~ 80 min 有一系列溶剂峰,故在共有指纹图谱的建立过程中仅计算了 65 min 之内的色谱信息。

为了更全面地对黄白甘草洗剂的质量进行控制,课题组曾对君药黄精中的指标成分薯蓣皂苷元^[5]、臣药马齿苋中的指标成分橙皮苷与槲皮素^[6]及使药白芷中的指标成分欧前胡素、异欧前胡素在该条件下进行了色谱峰定位,但均未成功,这与上述成分在饮片中含有量过低,水溶性较差等因素密切相关。

本文建立的方法鉴别了黄白甘草洗剂中 20 个共有峰,对其共有峰的来源进行了鉴定。其中,保留时间为 21.18, 51.19 min 的两个色谱峰分别为甘草中的二氢黄酮类成分甘草苷及异黄酮类成分甘草酸铵。上述成分具有一定的肾上腺皮质激素样抗炎作用,也具有一定的抗病原微生物(腺病毒、单纯疱疹病毒、带状疱疹病毒、金葡菌、阿米巴原虫等)作用^[7],可能是黄白甘草洗剂临床治疗剥脱性唇炎重要的物质基础之一。此外,由于该制剂系外用湿敷涂抹,经皮给药吸收,实际给药量不高,可有效避免普通口服制剂处方中甘草剂量过大引起的类肾上腺素皮质功能亢进等副作用,提高治疗的安全性。

[参考文献]

- [1] 段渠,李俊仪,程宏斌. 黄白甘草汤外用治疗脾虚血燥型剥脱性唇炎疗效观察[J]. 四川中医, 2013, 31(1): 113.
- [2] 张永欣,杨华,张启伟,等. 清风痛胶囊液相色谱指纹图谱测定条件的研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(23): 2492.
- [3] 周习,陈佩东,张丽,等. 失笑散的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(16): 73.
- [4] 邸学,王海波,杨欣欣,等. 藤梨根药材 HPLC 指纹图谱及质量研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(10): 135.
- [5] 江洁怡,胥爱丽,毕晓黎,等. 白头翁配方颗粒的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(15): 85.
- [6] 向孙敏,韩丽,刘李梅,等. 愈肠宁胶囊中苦参提取物的生物碱类成分指纹图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(14): 13.
- [7] 刘正清,杨华,易跃能. 乌药药材水提液的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(12): 127.
- [8] 陈立娜,都述虎,高艳坤,等. RP-HPLC 法测定黄精中薯蓣皂苷元含量[J]. 现代中药研究与实践, 2006, 20(4): 32.
- [9] 丁怀伟,姚佳琪,宋少江. 马齿苋的化学成分和药理活性研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(10): 831.
- [10] 吴清和. 中药药理学[M]. 北京:高等教育出版社, 2007: 221.

[责任编辑 顾雪竹]