

复方土荆皮酊的指纹图谱研究

李晓翠, 苗爱东*

(北京军区联勤部药品仪器检验所, 北京 100071)

[摘要] 目的: 采用高效液相色谱法建立复方土荆皮酊的指纹图谱。方法: 采用 Agilent Zorbax SB C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇(B)-0.09% 甲酸水溶液(A)为流动相进行梯度洗脱, 检测波长 260 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃。采用国家药典委员会颁发的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 A 版) 软件, 对 14 批次复方土荆皮酊的指纹图谱进行相似度计算。结果: 根据 14 批次复方土荆皮酊的指纹图谱, 确定了 13 个共有指纹峰, 其相似度均 > 0.960, 建立了对照指纹图谱。结论: 该方法的精密性、重复性、稳定性良好, 为复方土荆皮酊的质量控制提供了科学依据。

[关键词] 复方土荆皮酊; 指纹图谱; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0134-03

[doi] 10.11653/syfy2013220134

Study on the HPLC Fingerprint of Fufang Tujingpiding

LI Xiao-cui, MIAO Ai-dong*

(Institute for Drug and Instrument Control of Beijing Military Area Command, Beijing 100071, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a fingerprint of Fufang Tujingpiding by HPLC. **Method:** The experiment was conducted on Agilent Zorbax SB C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), eluted with methanol (B) - 0.09% formic acid aqueous solution (A) as the gradient elution mobile phases. The detective wavelength was set at 260 nm with the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was maintained at 30 ℃. The data was analyzed by Similarity Evaluation Software for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine software to compare the quality of 14 batches of Fufang Tujingpiding. **Result:** The standard chromatographic fingerprints of Fufang Tujingpiding was established, 13 co-possessing peaks were marked according to the fingerprints of 14 batches of it, and the similarity was greater than 0.96. **Conclusion:** The established method has good precision, reproducibility and stability, which provides the basis for the quality control of Fufang Tujingpiding as well.

[Key words] Fufang Tujingpiding; fingerprint; HPLC

复方土荆皮酊^[1]为皮肤科常用药物,具有抗表皮真菌和止痒等疗效,临床上主要用于手癣、脚癣和体癣等症的治疗。在前期的研究中对复方土荆皮酊的主要成分进行了含量测定^[2-3],对于中药成方制剂来说,其成分多而复杂,仅对其中一个成分或少数

成分进行测定,不能全面准确的反映该制剂的内在质量。在中药和中成药多成分质量控制模式的趋势下,用其中任一成分作为指标都不能够准确反映该药材或制剂的质量。中药指纹图谱技术经过 20 多年的研究和发展,已成为目前能够为国内外广泛接受的一种中药评价模式^[4-5]。多指标成分或特征成分的测定联合指纹图谱的同步检测^[6-8]将成为中成药质量标准的发展趋势,与目前正在提倡的中药质量标准提高研究行动相符合。本实验采用高效液相色谱法,建立复方土荆皮酊的指纹图谱,并对土荆皮乙酸-O-β-D-葡萄糖苷、土荆皮丙酸、土荆皮乙酸和土荆皮甲酸等二萜类化合物特征峰进行指认,为复方土荆皮酊的质量控制提供参考依据和必要补充。

[收稿日期] 20130425(013)

[基金项目] 军队“十二五”规划项目(军队医疗机构制剂标准提高研究课题)

[第一作者] 李晓翠, 硕士, 从事药物分析研究, Tel: 010-66870541, E-mail: lengzhu_1986@163.com

[通讯作者] * 苗爱东, 博士, 副主任药师, 副研究员, 从事药物分析研究, Tel: 010-66870541, E-mail: miaoaidong@sina.com

1 材料

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司,包括低压梯度四元泵 G1311A、自动进样器 G1329A、恒温箱 G1316A、DAD 检测器 G1315D 和脱气机 G1322A、Chem Station 色谱工作站),Mettler Toledo AG 285 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。甲醇为色谱纯,水为纯化水,其他试剂均为分析纯。

复方土荆皮酊,A 厂 14 批,S1:20091001,S2:20091102,S3:20100502,S4:20100712,S5:20101002,S6:20101003,S7:20101101,S8:20101103,S9:20110204,S10:20110305,S11:20110306,S12:20110307,S13:20110309,S14:20110402。B 厂 1 批,批号 100602。土荆皮乙酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110880-201003,含量为 99.1%)。土荆皮乙酸-*O*- β -*D*-葡萄糖苷对照品(批号 101224,含量 99.3%)、土荆皮丙酸对照品(批号 101223,98.6%)和土荆皮甲酸对照品(批号 101220,98.3%)均购自四川成都普瑞法科技开发有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Zorbax SB C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μ m),流动相为甲醇(A)-0.09% 甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0~15 min,15%~50% A;15~27 min,50%~60% A;27~40 min,60%~70% A;40~55 min,70%~95% A),检测波长 260 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 $^{\circ}$ C,进样体积 10 μ L。

2.2 混合对照品溶液的制备 精密称取土荆皮甲酸 10.12 mg,土荆皮丙酸 4.28 mg 分别置于 50 mL 量瓶中,土荆皮乙酸 9.30 mg,土荆皮乙酸-*O*- β -*D*-葡萄糖苷 5.84 mg,分别置于 25 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,得单一对照品储备液。精密吸取不同体积对照品储备溶液适量,置于同一量瓶中,得混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取复方土荆皮酊原液,摇匀,用 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤,即得。

2.4 测定方法 精密量取混合对照品和供试品溶液各 10 μ L,分别注入高效液相色谱仪,依上述色谱条件进行操作,记录 55 min 色谱图。

2.5 精密度试验 精密吸取 2.3 项下的供试品溶液 10 μ L,在 2.1 项色谱条件下连续进样 5 次,记录色谱图。以土荆皮乙酸为参照峰,考察各共有峰的相对保留时间和相对峰面积比值的一致性,结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 0.12%,相对峰面

积比值的 RSD 均 < 3.59%,表明精密度良好。

2.6 重复性试验 取同一批号(20110309)复方土荆皮酊 5 份,按 2.3 项下方法分别制备成供试品溶液,精密吸取 10 μ L,在 2.1 项色谱条件下进样分析。以土荆皮乙酸为参照峰,计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 0.13%,相对峰面积的 RSD 均 < 3.27%,表明重复性良好。

2.7 稳定性试验 精密吸取 2.3 项下的供试品溶液 10 μ L,分别在 0,4,8,12,16,20,24 h 进样分析,以土荆皮乙酸为参照峰,计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 0.23%,相对峰面积的 RSD 均 < 3.74%,表明供试品溶液在 24 h 内的稳定性良好。

2.8 指纹图谱的建立与分析

2.8.1 指纹图谱的采集 取 14 批次 A 厂生产的复方土荆皮酊按 2.3 项下方法制备供试品溶液,精密吸取 10 μ L,按 2.1 项下的色谱条件进样测定,并记录 14 批次复方土荆皮酊的指纹图谱,见图 1。

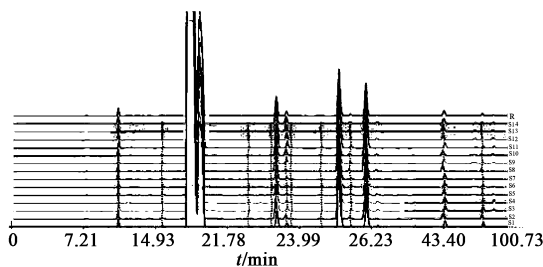


图 1 14 批复方土荆皮酊的指纹图谱

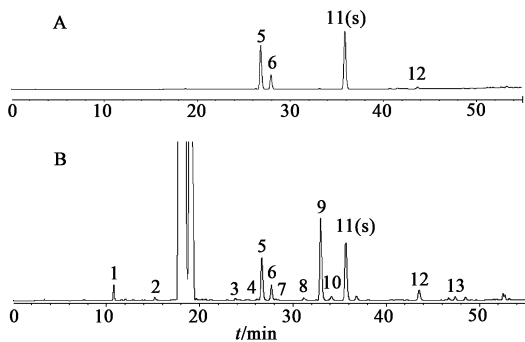
2.8.2 共有峰的标定与二萜类化合物的指认 将 14 批次复方土荆皮酊的相关信息录入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004 A 版,进行自动匹配,标定其中的 13 个色谱峰为样品的共有指纹峰。以土荆皮乙酸的保留时间和峰面积作为 1,分别计算各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积(表 1)。结果表明,同一厂家不同批次复方土荆皮酊共有峰的相对保留时间(峰号):0.302(1),0.425(2),0.668(3),0.733(4),0.748(5),0.776(6),0.789(7),0.874(8),0.924(9),0.957(10),1.000(11S),1.220(12),1.329(13),其 RSD 均 < 0.20%,共有峰的相对峰面积差异显著,相对峰面积的 RSD 在 7.91%~53.67%。

通过与对照品图谱(图 2)的保留时间,紫外吸收光谱图和最大吸收波长等的比较对照,指认其中的 5 号峰为土荆皮乙酸-*O*- β -*D*-葡萄糖苷,6 号峰为土荆皮丙酸,11 号峰为土荆皮乙酸,12 号峰为土荆

表 1 14 批复方土荆皮酊共有指纹峰的相对峰面积

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	RSD/%
1	0.110	0.155	0.182	0.120	0.108	0.108	0.121	0.112	0.144	0.132	0.137	0.170	0.146	0.145	17.45
2	0.028	0.037	0.042	0.026	0.026	0.026	0.029	0.027	0.035	0.032	0.030	0.038	0.032	0.032	15.75
3	0.011	0.016	0.021	0.022	0.014	0.014	0.014	0.015	0.020	0.021	0.024	0.026	0.024	0.026	26.31
4	0.021	0.018	0.017	0.017	0.019	0.018	0.017	0.018	0.014	0.015	0.016	0.014	0.014	0.014	12.29
5	0.394	0.570	0.700	0.403	0.451	0.453	0.452	0.453	0.593	0.626	0.627	0.648	0.651	0.641	19.53
6	0.078	0.112	0.136	0.059	0.052	0.051	0.056	0.058	0.188	0.184	0.185	0.216	0.216	0.216	53.67
7	0.026	0.024	0.022	0.020	0.017	0.017	0.017	0.017	0.014	0.019	0.018	0.019	0.014	0.014	19.33
8	0.019	0.024	0.029	0.019	0.018	0.013	0.013	0.016	0.035	0.031	0.034	0.036	0.036	0.037	35.77
9	2.076	2.133	2.272	1.405	1.061	1.046	1.150	1.095	1.251	1.117	1.203	1.547	1.265	1.291	29.81
10	0.042	0.057	0.065	0.043	0.050	0.050	0.050	0.051	0.061	0.062	0.063	0.063	0.066	0.063	14.73
11(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
12	0.151	0.159	0.160	0.143	0.143	0.142	0.146	0.148	0.168	0.166	0.168	0.173	0.176	0.172	7.91
13	0.093	0.084	0.086	0.064	0.049	0.049	0.046	0.048	0.043	0.042	0.043	0.043	0.042	0.043	33.41

皮甲酸。由于土荆皮乙酸的色谱峰面积较大而且稳定,故选土荆皮乙酸为参照峰。



A. 对照品; B. 供试品; 5. 土荆皮乙酸 *O*- β -D-葡萄糖苷;
6. 土荆皮丙酸; 11. 土荆皮乙酸; 12. 土荆皮甲酸

图 2 复方土荆皮酊的 HPLC 指纹图谱

2.8.3 指纹图谱相似度评价 采用国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 A 版)软件对同一厂家的 14 批次复方土荆皮酊进行相似度分析,通过与对照指纹图谱(即共有模式)比较,它们的相似度均 >0.960(表 2)。将收集到的另一厂家的 1 批(B 厂,批号 100602)复方土荆皮酊与 A 厂的指纹图谱共有模式相比,其相似度为 0.999,说明不同厂家不同批次的复方土荆皮酊指纹图谱具有很好的一致性,建立的方法能够有效控制复方土荆皮酊的内在质量。

表 2 14 批复方土荆皮酊指纹图谱的相似度

No.	相似度	No.	相似度	No.	相似度
S1	0.960	S6	0.994	S11	0.998
S2	0.968	S7	0.997	S12	0.995
S3	0.968	S8	0.996	S13	0.998
S4	0.991	S9	0.999	S14	0.998
S5	0.995	S10	0.996		

3 讨论

复方土荆皮酊是单味药材与苯甲酸和水杨酸这

2 种化学药组成的中西药复方制剂,土荆皮药材中的特征性成分与苯甲酸和水杨酸的含量差别很大,对色谱数据进行拟合时发现:将包含有苯甲酸和水杨酸这 2 种化学成分的色谱数据带入相似度评价软件中,计算出的相似度值均 >0.979,无法客观真实反映各批次样品间的差异。在扣除了苯甲酸和水杨酸色谱峰贡献后,仅以处方中土荆皮药材的色谱图去表征该制剂的指纹图谱,得到各批次样品间相似度值在 0.960~0.999,基本能够如实反映样品间的实际差异情况,说明这种图谱处理方式可能更合理一些。

【参考文献】

[1] 卫生部药品标准. 中药成方制剂第 13 册 [S]. 2007:142.
[2] 李晓翠, 苗爱东. HPLC 测定复方土荆皮酊中 3 种成分的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (19):108.
[3] 李晓翠, 苗爱东. HPLC 法同时测定复方土荆皮酊中 4 种二萜类成分 [J]. 中成药, 2012, 34(11):2124.
[4] 李文博, 韩建平, 高钧, 等. 养血清脑颗粒的高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 分析化学, 2011, 39 (3):387.
[5] 王华, 蔡萍, 万丹. 双黄花片 HPLC 指纹图谱的研究及其绿原酸和黄芩苷含量测定 [J]. 湖南中医药大学学报, 2012, 32(7):41.
[6] 翟宇, 沈岚, 李青颖, 等. 基于指纹图谱分析与多指标成分定量测定的扶正化癥胶囊质量评价研究 [J]. 中成药, 2012, 34(3):389.
[7] 颜月园, 萧伟, 吴云, 等. 散结镇痛胶囊中皂苷类成分的指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2012, 43(3):496.
[8] 李文博, 韩建平, 高钧, 等. 养血清脑颗粒的高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 分析化学, 2011, 39 (3):387.

[责任编辑 顾雪竹]