

失笑散的 HPLC 指纹图谱研究

周习,陈佩东,张丽,丁安伟*

(南京中医药大学,江苏省方剂高技术研究重点实验室,南京 210046)

[摘要] 目的:建立失笑散 HPLC 指纹图谱,提高复方质量控制水平。方法:采用 HPLC, C₁₈ 色谱柱,流动相乙腈-0.1% 三氟乙酸,体积流量 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 360 nm,柱温 30 ℃。结果:初步建立失笑散 HPLC 指纹图谱,标示出 15 个共有色谱峰,10 批样品 HPLC 指纹图谱相似度在 0.962 ~0.996。结论:建立的方法分离效果好,灵敏、准确、简单,可作为失笑散质量评价的方法。

[关键词] 失笑散; 指纹图谱; 高效液相色谱; 蒲黄; 五灵脂; 质量控制

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)16-0073-04

[doi] 10.11653/syjf2013160073

HPLC Fingerprint of Shixiao San

ZHOU Xi, CHEN Pei-dong, ZHANG Li, DING An-wei*

(Jiangsu Key Laboratory for High Technolog Research of Traditional Chinese Medicine Fomulae ,
Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the fingerprint of Shixiao San, enhance the quality control of the method. **Method:** The RP-HPLC was performed on an C₁₈ chromatography column, with acetonitrile-0.1% of TFA as mobile phase, the flow rate was 1 mL·min⁻¹; the wavelength was set at 360 nm. The temperature of column was maintained at 30 ℃. **Result:** The common modes for the HPLC fingerprints were set up by ensuring 15 common peaks in the chromatograms. The similarity degrees in the ten batches were in the range of 0.962 to 0.996. **Conclusion:** The method is sensitive, accurate and simple, thereby it can be used specifically for the quality control of Shixiao San.

[Key words] Shixiao San; fingerprint; HPLC; Pollen Typhae; Faeces Trogop Terori; quality control

失笑散系中医经典名方,始载于《证类本草》卷二十二引《近效方》,由蒲黄-五灵脂(1:1)组成,具有活血化瘀、散结止痛之功效^[1-2],方中蒲黄的有效成分为香蒲新苷、异鼠李素-3-O-新橙皮苷和异鼠李素等黄酮类成分^[3-4],五灵脂的有效成分为穗花杉

双黄酮和扁柏双黄酮等^[5-6]。目前,市场上失笑散品种繁多,质量参差不齐,使得临床疗效无法得到保证。HPLC 指纹图谱以其快速准确的特点被广泛应用于中药分析鉴定等方面^[7-12]。本实验采用 HPLC 建立了失笑散的指纹图谱,并与对照药材同条件下分析。经试验初步确定了失笑散中 15 个指纹峰的归属,为该制剂的质量分析提供依据建立更加可靠的分析方法。

1 材料

Waters Alliance 2695 型高效液相色谱仪, Waters 2489 UV 检测器, Empower 色谱工作站, Shimadzu AY220 型电子天平, KQ-500 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

甲醇(色谱纯,汉邦公司)、乙腈(色谱纯,

[收稿日期] 20121028(006)

[基金项目] 国家中医药管理局中医药行业科研专项项目(2011107007)

[第一作者] 周习,硕士研究生,从事中药复方及质量标准的研究, Tel: 15950566301, E-mail: 1065273708@qq.com

[通讯作者] *丁安伟,博士生导师,从事中药复方及质量标准的研究, Tel: 025-85811523, E-mail: awding105@163.com

TEDIA)、三氟乙酸(色谱纯,阿拉丁公司),水为重蒸水(自制)。香蒲新苷对照品(供含量测定用,批号 111573-200402),异鼠李素-3-O-新橙皮苷(供含量测定用,批号 111571-200604),异鼠李素(供含量测定用,批号 110860-200406),槲皮素(供含量测定用,批号 100081-200907),穗花杉双黄酮(供含量测定用,批号 110273-200705),对照品均购自中国药品生物制品检定所。

药材购于内蒙古、湖北、江苏、安徽、山西、湖南、山东、广西等地,经南京中医药大学吴启南教授鉴定为香蒲科植物水烛香蒲 *Typha angustifolia* L. 的干燥花粉和鼯鼠科动物复齿鼯鼠的干燥粪便,具体样品来源见表 1。

表 1 蒲黄、五灵脂样品来源

No.	蒲黄	五灵脂	No.	蒲黄	五灵脂
S1	内蒙古	山西	S2	内蒙古	湖南
S3	湖北	山西	S4	湖北	安徽
S5	南京	湖南	S6	南京	安徽
S7	淮安	山东	S8	淮安	湖北
S9	安徽	广西	S10	安徽	山东

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃, 进样量 10 μL, 检测波长, 360 nm, 流动相 A 水(含 0.1% 三氟乙酸), B 乙腈, 梯度洗脱(0 ~ 20 min, 10% ~ 15% B; 20 ~ 45 min, 15% ~ 15% B; 45 ~ 70 min, 15% ~ 55% B; 70 ~ 85 min, 55% ~ 60% B; 85 ~ 100 min, 60% ~ 100% B; 100 ~ 110 min, 100% B)。

2.2 供试品溶液的制备 分别精密称定不同产地的蒲黄花粉和五灵脂干燥粉末 1.0 g, 于 100 mL 具塞锥形瓶中, 加甲醇 50 mL 超声提取 45 min。待其冷却后补足甲醇超声过程中减少的质量, 吸取上清液, 经 0.45 μm 滤膜进行过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

2.3 对照品溶液的制备 取对照品香蒲新苷、异鼠李素-3-O-新橙皮苷、异鼠李素、槲皮素、穗花杉双黄酮适量, 精密称定, 至于 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 使其充分溶解, 经 0.45 μm 滤膜进行过滤, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取 S1 样品制备的供试品溶液, 连续进样 5 次, 记录指纹图谱并积分, 图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 A 版处理, 5 次进样所得指纹图谱的相似度均 > 0.99, 符合指

纹图谱测定要求, 精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取 S1 样品制备的供试品溶液, 连续取样 5 次, 记录指纹图谱并积分, 图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 A 版处理, 5 次进样所得指纹图谱的相似度均 > 0.99, 符合指纹图谱测定要求, 重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取 S1 样品制备的供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 8, 24 h 内进样, 记录指纹图谱并积分, 图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 A 版处理, 5 次进样所得指纹图谱的相似度均 > 0.99, 符合指纹图谱测定要求, 稳定性良好。

2.4.4 空白试验 精密吸取空白溶剂甲醇 10 μL, 注入液相色谱仪, 按照上述色谱条件, 记录 110 min 内的色谱峰, 结果表明, 空白溶剂对失笑散指纹图谱中共有峰检出无干扰。

2.5 指纹图谱的建立与分析

2.5.1 图谱的获得 精密吸取各失笑散供试品溶液 10 μL, 按照上述色谱条件进行分析, 记录色谱图, 结果见图 1。

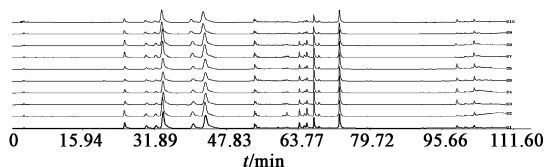


图 1 10 批次失笑散 HPLC

2.5.2 共有峰和参照峰的确定 以 10 批样品的测量结果进行分析, 选择稳定性好、吸收强、特征明显的色谱峰为共有峰, 标定 15 个共有峰(图 2)。统计各共有特征峰, 其中共有峰占总峰面积的 85% 以上, 符合共有峰的要求。由样品指纹图谱可见 5 号峰峰形对称, 峰面积较大, 与左右峰都能达到基线分离, 故选择该峰为参照峰, 将其保留时间和色谱峰面积均设为 1, 将其他特征峰的保留时间与峰面积和该峰的保留时间和峰面积相比, 得到各峰的相对保留时间和相对峰面积(表 2, 3)。经与对照品对照, 该峰为蒲黄中的香蒲新苷。各特征峰的 t_R 和 A_R 见表 4。

2.5.3 指纹图谱中特征峰的归属分析 取失笑散中的 2 味药材, 按按失笑散供试品制备方法制备各药材供试品溶液; 同时取香蒲新苷、异鼠李素-3-O-新橙皮苷、异鼠李素、槲皮素、穗花杉双黄酮对照品用甲醇溶解配成相应的对照品溶液, 依照上述方法进行测定, 通过比较色谱保留时间和紫外吸收峰面积来确定复方中各峰与药材的相关性。复方中 5 个

表 2 10 批次失笑散共有峰的相对保留时间

No.	各指纹峰相对保留时间									
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.088	0.088	0.087	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.087	0.088
2	0.747	0.748	0.746	0.752	0.750	0.751	0.750	0.749	0.749	0.753
3	0.887	0.891	0.888	0.895	0.892	0.893	0.892	0.890	0.890	0.896
4	0.949	0.955	0.952	0.958	0.956	0.956	0.956	0.953	0.953	0.960
5	0.994	1.000	0.998	1.004	1.001	1.002	1.001	0.998	0.998	1.005
6	1.187	1.198	1.196	1.201	1.199	1.199	1.198	1.195	1.195	1.203
7	1.266	1.280	1.277	1.281	1.280	1.280	1.279	1.275	1.275	1.284
8	1.602	1.605	1.604	1.605	1.604	1.604	1.605	1.603	1.603	1.604
9	1.813	1.817	1.816	1.815	1.815	1.815	1.815	1.814	1.814	1.815
10	1.895	1.899	1.897	1.897	1.897	1.897	1.897	1.896	1.896	1.897
11	1.945	1.948	1.947	1.947	1.946	1.947	1.947	1.946	1.946	1.947
12	1.992	1.996	1.994	1.994	1.993	1.994	1.994	1.993	1.993	1.993
13	2.160	2.163	2.161	2.161	2.161	2.161	2.162	2.160	2.161	2.161
14	2.933	2.937	2.933	2.932	2.931	2.932	2.932	2.925	2.925	2.925
15	3.045	3.032	3.046	3.046	3.045	3.046	3.046	3.044	3.044	3.044

表 3 10 批次失笑散共有峰的相对峰面积

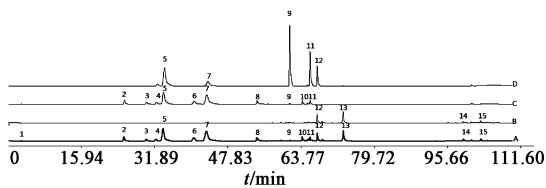
No.	各指纹峰相对峰面积									
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.004	0.006	0.005	0.008	0.010	0.010	0.009	0.019	0.006	0.007
2	0.124	0.122	0.120	0.113	0.086	0.088	0.063	0.072	0.114	0.037
3	0.073	0.075	0.073	0.069	0.063	0.061	0.044	0.049	0.068	0.066
4	0.090	0.091	0.092	0.087	0.056	0.058	0.039	0.045	0.072	0.096
5	0.751	0.757	0.774	0.737	0.515	0.517	0.434	0.450	0.700	0.126
6	0.194	0.195	0.190	0.183	0.158	0.154	0.131	0.133	0.179	0.155
7	0.655	0.647	0.626	0.614	0.637	0.637	0.571	0.569	0.601	0.185
8	0.074	0.073	0.074	0.068	0.065	0.065	0.120	0.090	0.069	0.215
9	0.010	0.013	0.012	0.056	0.018	0.016	0.026	0.025	0.017	0.244
10	0.074	0.086	0.065	0.087	0.076	0.075	0.096	0.077	0.059	0.274
11	0.081	0.079	0.085	0.134	0.061	0.062	0.066	0.059	0.089	0.303
12	0.200	0.199	0.206	0.207	0.273	0.281	0.276	0.265	0.199	0.333
13	0.353	0.353	0.361	0.345	0.476	0.482	0.453	0.458	0.347	0.363
14	0.038	0.032	0.034	0.008	0.118	0.109	0.086	0.131	0.026	0.392
15	0.033	0.035	0.045	0.040	0.048	0.058	0.100	0.097	0.074	0.422

特征峰在对应的药材具有很好的归属性,其中 5 号峰为蒲黄中的香蒲新苷,7,9,11 分别为蒲黄中的异鼠李素-3-O-新橙皮苷,异鼠李素,槲皮素,12 为五灵脂中的穗花杉双黄酮,见图 2。

2.5.4 指纹图谱的相似度评价 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004A 版)对 10 批不

同产地的失笑散分别进行相似度评价,计算各色谱图的整体相似度,S1 ~ S10 相似度分别为 0.995, 0.994, 0.993, 0.992, 0.985, 0.985, 0.964, 0.962, 0.996, 0.993。

2.5.5 指纹图谱共有模式的确立 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004A 版)对 10 批



5. 香蒲新苷; 7. 异鼠李素-3-O-新橙皮苷;
9. 异鼠李素; 11. 槲皮素. 12. 穗花杉双黄酮;
A. 失笑散; B. 五灵脂; C. 蒲黄; D. 混标溶液

图 2 失笑散指纹图谱的特征峰归属

表 4 共有指纹峰的平均 t_R 和 A_R

No.	A_R	t_R	峰号	A_R	t_R
1	0.50	0.25	9	1.64	0.05
2	0.32	0.29	10	0.65	0.05
3	0.16	0.31	11	0.73	0.05
4	0.30	0.32	12	0.20	0.05
5	0.36	0.33	13	0.15	0.04
6	0.14	0.36	14	1.15	0.14
7	0.24	0.38	15	1.23	0.14
8	0.51	0.06			

不同产地的失笑散进行模式识别, 获得失笑散指纹图谱共有模式, 如图 3。

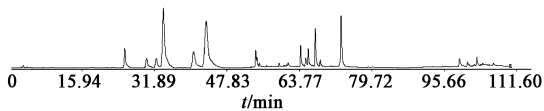


图 3 失笑散共有模式指纹图谱

3 讨论

由于失笑散中含有蒲黄和五灵脂 2 味药, 蒲黄中主要含有黄酮类物质, 结构类似, 较难分离, 而五灵脂中除了含有双黄酮外, 还含有一些萜类物质, 与黄酮类极性差别较大, 对流动相的选择具有一定的难度。本实验综合了蒲黄及五灵脂的色谱条件, 采用了甲醇-水系统、乙腈-水系统、乙腈-水 (0.1% 三氟乙酸) 分别进行梯度洗脱, 结果以乙腈-水 (0.1% 三氟乙酸) 系统洗脱效果最佳。在 UV 检测器下, 分别对 254, 265, 310, 360 nm 4 个波长下进行检测, 结果以在 360 nm 波长下, 出峰较多, 峰面积较大, 基线较平稳, 最终选择在 360 nm 波长下进行检测。

通过对照品定位对照及 UV 的光谱功能分析, 鉴定 5 个主要特征峰, 包括香蒲新苷, 异鼠李素-3-O-新橙皮苷, 异鼠李素, 槲皮素, 穗花杉双黄酮。通过失笑散与各单味药进行定位对照及 UV 光谱分析, 结果绝大多数特征峰归属明确, 极性大的部位主要为蒲黄中成分, 极性小的主要源于五灵脂。指纹图谱中 5, 7, 9, 11 号峰与蒲黄有明显归属性, 12 号

峰与失笑散有明显归属性。

中药复方成分极为复杂, 仅仅使用定性鉴别和指标成分的含量测定方法很难准确的判断其内在的质量^[13], 更不用说找出其中引起药效的物质基础; 而对其进行指纹图谱测定, 可提供多成分群的特征。按照国家药典委员会关于“中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)的通知”, 以 HPLC 梯度洗脱法对复方失笑散进行指纹图谱研究^[14], 实验证明, 该方法可操作性强、重复性好, 可作为复方失笑散指纹图谱研究。本实验分析了 10 批次失笑散的 HPLC 指纹图谱, 结果表明 10 批次均具有 15 个特征峰, 峰面积相对量有一定的差异性, 相似度均 > 0.965, 所建立的方法可以较好评价失笑散的质量。

[参考文献]

- [1] 周卫, 宿树兰, 刘培, 等. 蒲黄-五灵脂药对在少腹逐瘀汤活血化瘀效应中的贡献[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(6): 179.
- [2] 王恺. 枳实消痞丸合失笑散加减治疗慢性萎缩性胃炎 81 例[J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, 17(17): 259.
- [3] 张水寒, 王实强, 刘春海, 等. 蒲黄药材的质量标准研究[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(3): 136.
- [4] 杨瑛, 王实强, 蔡光先. 蒲黄 HPLC 指纹图谱标准研究[J]. 中国中医药, 2008, 23(5): 444.
- [5] 朱翔宇. 五灵脂化学成分与质量控制标准研究[D]. 成都: 西南交通大学, 2010.
- [6] 焦玉, 刘晓秋. 五灵脂的 HPLC 指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 98.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 61.
- [8] 段营辉, 戴毅, 高昊, 等. 草珊瑚的化学成分研究[J]. 中草药, 2010, 41(1): 29.
- [9] 关洪月, 李林, 刘晓, 等. 中药指纹图谱相似度计算方法探析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 282.
- [10] 詹雪艳, 史新元, 段天璇, 等. 色谱指纹图谱相似度方法的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(2): 248.
- [11] 魏惠珍, 王信, 王跃生, 等. 炒苦杏仁饮片指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8): 71.
- [12] 何建雄, 赖小平, 魏刚, 等. 银翘柴桂汤 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13): 63.
- [13] 王旭, 于江泳, 倪龙, 等. 中成药本体对照标准幅度质量控制模式的探索[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 274.
- [14] 杨雪梅. 浅谈几种中药指纹图谱技术在中药鉴定中的应用[J]. 中国药事, 2007, 21(2): 119.

[责任编辑 顾雪竹]