

· 化学与分析 ·

灯盏花素分散片及灯盏花素原料的 HPLC 指纹图谱研究

王黎明¹, 梁建宁², 黄晓燕², 龙海燕², 夏新华^{1,3*}, 李文莉^{2*}

(1. 湖南中医药大学药学院, 长沙 410208; 2. 湖南省药品检验所, 长沙 410001;

3. 湖南省中医药研究院湖南省中药粉体与创新药物省部共建重点实验室, 长沙 410013)

[摘要] 目的: 建立灯盏花素分散片及灯盏花素原料的 HPLC 指纹图谱分析方法。方法: 采用 HPLC 法测定, 色谱柱为 Agilent TC-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1 mol·L⁻¹ 醋酸铵 (磷酸调 pH 3.0), 梯度洗脱, 检测波长 335 nm, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C。结果: 应用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”对灯盏花素分散片及灯盏花素原料各批次进行了质量评价, 相似度均 ≥ 0.99, 方法精密性、稳定性和重复性良好。结论: 所建立的液相色谱指纹图谱专属性和特征性强, 可以有效地控制灯盏花素分散片及其原料的质量。

[关键词] 灯盏花素分散片; 灯盏花素原料; 指纹图谱; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0077-04

HPLC Fringerprint Analysis on Breviscapin Dispersive in Tablets and Breviscapine Material

WANG Li-ming¹, LIANG Jian-ning², HUANG Xiao-yan², LONG Hai-yan², XIA Xin-hua^{1,3*}, LI Wen-li^{2*}

(1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

2. Hunan Institute for Drug Control, Changsha 410001, China; 3. Hunan Chinese Medicine

Powder and Innovation Drug Province Department Co-construction and Key Laboratories, Ministry of Education, Huna Academy of Chinese Medicine, Changsha 410013, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the method of fingerprint analysis on breviscapine in dispersive tablets and breviscapine material. **Method:** HPLC with Agilent TC-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used, acetonitrile-0.1 mol·L⁻¹ ammonium acetate solution (add phosphoric acid adjust pH to 3.0), gradient elution as a mobile phase and detection wavelength at 335 nm, flow rate was 0.8 mL·min⁻¹, and column temperature was 35 °C. **Result:** The samples quality was assessed by Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM (2.0 edition). The similarity was more than 0.99. Good precision, stability and repetition were showed. **Conclusion:** The method can be used in the quality control of breviscapine in dispersive tablets and breviscapine material.

[Key words] breviscapine in dispersive tablets; breviscapine material; fingerprint; HPLC

[收稿日期] 20110609(016)

[基金项目] 国家重大新药创制专项课题(2009ZX09308-004); 湖南省中药粉体与创新药物省部共建重点实验室及湖南省教育厅中药粉体技术创新团队基金

[第一作者] 王黎明, 在读硕士研究生, 从事中药制剂及其质量控制, Tel: 13787123153, E-mail: wangliming310@163.com

[通讯作者] *夏新华, 教授, 博士生导师, 从事中药制剂及其质量控制研究, Tel: 0731-88458305

灯盏花素是从菊科植物短葶飞蓬 *Erigeron breviscapus*(Vant.) Hand. Mazz. 中提取的黄酮类有效成分, 以野黄芩苷(灯盏乙素)为主, 含少量灯盏甲素, 其中乙素占 90% 以上^[1-2]。灯盏花素分散片处方来源于部颁标准灯盏花素片(WS₃-B-2516-97), 为灯盏花素加辅料制成的制剂, 具有活血化瘀、通络止痛的功效, 用于治疗中风后遗症、冠心病、心绞痛等多种缺血性疾病的治疗^[3-4]。灯盏花素分散片为单成分制剂, 虽然《中国药典》2010 年版一部

“灯盏花素”项下规定供口服用灯盏花素原料含野黄芩苷不得低于 90.0%^[5],但尚有约 10%的成分待确认(除野黄芩苷和灯盏甲素外的成分并不明确),仅仅通过现行质量标准的检测项目,难以确切评价其内在质量,批间均一性也无从控制。因此,为提高其质量控制水平,本文对灯盏花素分散片及其原料的 HPLC 指纹图谱进行了研究,并比较了不同生产批次的指纹图谱的差异,为控制产品质量提供依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 型全自动高效液相色谱仪系统,包括四元泵、在线真空脱气机、自动进样器、柱温箱、DAD 检测器。CG-300 型超声波清洗器(张家港市港威超声波仪器厂,300 W,25 kHz)。

野黄芩苷对照品(批号 110842-200605,含量测定用),购自中国药品生物制品检定所。灯盏花甲素、芹菜素、高黄芩素对照品均由昆明生物谷医药研究院提供。

灯盏花素分散片为漯河南街村全威制药股份有限公司独家品种,共收集到该企业提供的 7 批样品。灯盏花素原料由云南植物药业有限公司提供 10 批,南昌弘益药业提供 2 批(云南植物药业有限公司),漯河南街村全威制药股份有限公司提供 1 批,共计 13 批。

水为纯化水,乙腈为色谱纯(Honeywell USA),磷酸为分析纯(长沙有机试剂厂),醋酸铵为分析纯(国药集团化学试剂有限公司)。

2 方法与结果^[6-7]

2.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent TC-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流速 0.8 mL·min⁻¹,柱温为 35 °C,检测波长为 335 nm,流动相乙腈-0.1 mol·L⁻¹醋酸铵(磷酸调 pH 3.0),梯度洗脱(0~15 min, 10%~15% A; 15~20 min, 15% A; 20~21 min, 15%~12% A; 21~41 min, 12% A; 41~66 min, 12%~20% A; 66~76 min, 20% A; 76~80 min, 20%~10% A)。

2.2 参照物溶液的配制 取野黄芩苷对照品适量,精密称定,用甲醇溶解配制成每 1 mL 含 0.1 mg 的参照物溶液。

2.3 对照品溶液的配制 分别取灯盏甲素、高黄芩素、芹菜素对照品适量,精密称定,用甲醇溶解配制成每 1 mL 各含 0.1 mg 的对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备

2.4.1 分散片供试品溶液的制备 取样品粉末适量(约相当于含野黄芩苷 10 mg),精密称定,置 100 mL 量瓶中,超声处理 30 min,加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4.2 原料供试品溶液的制备 取样品 10 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加入甲醇适量使溶解,并稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.5 阴性溶液的制备 按处方比例取不含灯盏花素的其他辅料按生产工艺制备阴性制剂,同供试品溶液制备方法处理。

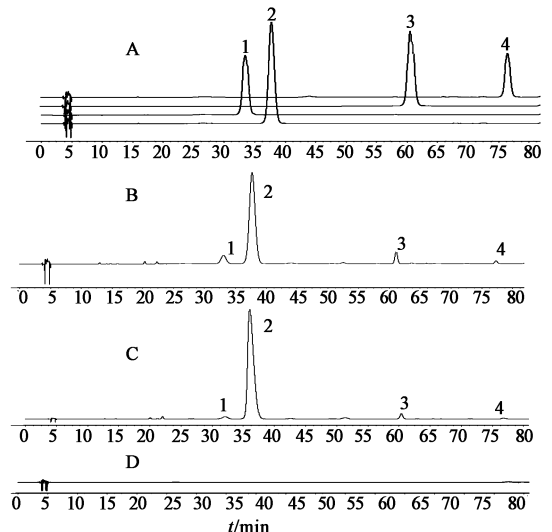
2.6 方法学考察

2.6.1 精密度试验 精密吸取供试品溶液 10 μL,依法连续进样 6 次,结果 12 个共有峰的相对保留时间的 RSD 均 < 1%, 2, 4, 7, 8, 11 号峰由于峰面积较小容易导致相对峰面积变化较大外,其他峰的相对峰面积的 RSD 均 < 5%。结果表明进样精密度良好。

2.6.2 稳定性试验 精密吸取同一份供试品溶液各 10 μL,分别于配制后的 0, 9, 15, 24, 36, 48 h,进样 6 次,结果 12 个共有峰的相对保留时间的 RSD 均 < 1%, 2, 4, 7, 8, 11 号峰由于峰面积较小容易导致相对峰面积变化较大外,其他峰的相对峰面积的 RSD 均 < 5%。结果表明供试品溶液在配制后 48 h 内基本稳定。

2.6.3 重复性试验 取同一批号样品依法制备 5 份供试品溶液,各取 10 μL,依法进样测定。结果 12 个共有峰的相对保留时间的 RSD 均 < 1%, 2, 3, 7, 8, 11 号峰由于峰面积较小容易导致相对峰面积变化较大外,其他峰的相对峰面积的 RSD 均 < 5%。结果表明本方法重复性较好。

2.7 样品的测定 精密吸取对照品溶液、供试品溶液及阴性溶液各 10 μL,按拟定方法进样分析,见图 1。



A. 对照品; B. 灯盏花素分散片; C. 灯盏花素原料; D. 阴性;
1. 芹菜素; 2. 野黄芩苷; 3. 灯盏花甲素; 4. 高黄芩素

图 1 灯盏花素分散片 HPLC

2.8 灯盏花素分散片指纹图谱的建立与分析

2.8.1 共有峰的确定与峰位归属 经比较 7 批样品的 HPLC 图,确定灯盏花素分散片的 12 个峰作为特征峰组成其指纹图谱。通过对照品定位实验,考察对照品的保留时间及紫外光谱,鉴别了灯盏花素分散片 HPLC 指纹图谱中 5[#],6[#],9[#],12[#] 四个色谱峰,分别为 5[#] 芹菜素、6[#] 野黄芩苷、9[#] 灯盏花甲素、12[#] 高黄芩素(表 1,图 2)。

表 1 灯盏花素分散片指纹图谱特征峰表

No.	成分名称	t /min	相对保留 时间	峰面积比 /%
1	未知	12.964	0.346	0.23
2	未知	15.896	0.425	0.11
3	未知	20.278	0.542	0.60
4	未知	22.269	0.595	0.51
5	芹菜素	32.818	0.877	7.39
6	野黄芩苷(S)	37.423	1	82.47
7	未知	43.572	1.164	0.86
8	未知	52.093	1.392	0.71
9	灯盏花甲素	60.813	1.625	5.21
10	未知	63.309	1.692	0.37
11	未知	65.725	1.756	0.17
12	高黄芩素	76.939	2.056	1.38

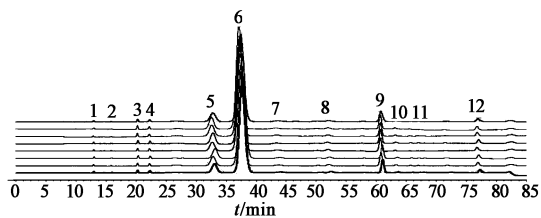


图 2 7 批灯盏花素分散片 HPLC 指纹图谱重叠图

2.8.2 特征指纹峰分析 采用国家药典委员会中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2.0 版),计算均值相似度,结果表明 7 批样品的相似度均 > 0.99, HPLC 指纹重叠图谱见图 2。

2.9 灯盏花素原料指纹图谱的建立与分析

2.9.1 共有峰的确定与峰位归属 经比较 13 批原料的 HPLC 图,确定灯盏花素原料的 8 个峰作为特征峰组成其指纹图谱。通过对照品定位实验,考察对照品的保留时间及紫外光谱,鉴别了灯盏花素原料图谱中 3[#] 为芹菜素、4[#] 为野黄芩苷峰(S)、7[#] 为灯盏花甲素、8[#] 为高黄芩素(表 2,图 3)。

2.9.2 特征指纹峰分析 采用国家药典委员会中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2.0 版),计算均

表 2 灯盏花素原料指纹图谱特征峰表

No.	成分名称	t /min	相对保留 时间	峰面积比 /%
1	未知	20.248	0.545	0.197
2	未知	22.202	0.598	0.498
3	芹菜素	32.570	0.878	1.730
4	野黄芩苷(S)	37.086	1	92.9
5	未知	43.572	1.162	0.312
6	未知	51.784	1.396	0.312
7	灯盏花甲素	60.679	1.636	0.093
8	高黄芩素	76.867	2.072	0.424

值相似度,结果表明 13 批原料的相似度均 > 0.99, HPLC 指纹重叠图谱见图 3。

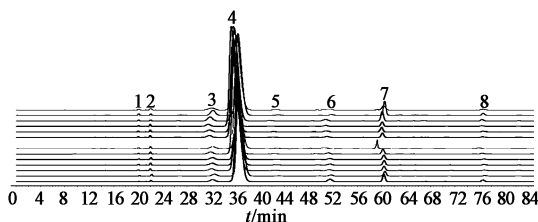


图 3 13 批灯盏花素原料 HPLC 指纹图谱重叠图

3 讨论

本研究采用甲醇-磷酸系统、乙腈-甲醇-甲酸系统,梯度洗脱、乙腈-醋酸铵系统,梯度洗脱,结果以乙腈-醋酸铵系统洗脱效果较佳。共试验了 3 种不同品牌的色谱柱,分别是 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Agilent TC-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), XB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),其中 Agilent TC-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱的分离效果最好。利用 DAD 检测器进行紫外扫描检测,对不同波长下检测的色谱图进行比较,结果供试品在 335 nm 检测波长下检出峰数最多、峰面积均较大,故选择 335 nm 作为检测波长。

灯盏花素为自灯盏细辛中提取的以野黄芩苷(灯盏乙素)为主的黄酮类化合物有效部位,故选野黄芩苷(灯盏乙素)为参照物。

本研究分析了灯盏花素分散片的 HPLC 指纹图谱,结果表明不同批次样品均具有 12 个特征峰,各峰的相对保留时间有极好的相似性, RSD 均 < 1.0%, 相对峰面积有一定的差异性,与 7 批均值生成的对照相比,相似度均 > 0.99,说明本品批间差异小。

13 批原料的相似度数值较高,均 < 0.99,说明原料的批间差异较小,但有少数样品弱峰分布有差异。各批原料样品按《中国药典》2010 年版一部

HPLC 测定截叶铁扫帚不同药用部位中槲皮素、山奈酚的含量

朱晓勤¹, 彭水梅², 吴锦忠^{1*}

(1. 福建中医药大学中西医结合研究院, 福州 350108;

2. 福建中医药大学药学院, 福州 350108)

[摘要] 目的: 建立高效液相色谱法同时测定截叶铁扫帚不同药用部位中槲皮素、山奈酚含量的方法。方法: 采用 Daisogel Sp-ODS-BP C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.2% 磷酸(63:37), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C, 检测波长 360 nm。结果: 槲皮素在 6.25 ~ 100 mg·L⁻¹ 呈良好的线性关系($r=0.9999$), 加样回收率 100.75%, RSD 1.92%, 山奈酚在 0.638 ~ 20.4 mg·L⁻¹ 呈良好的线性关系($r=0.9999$), 加样回收率为 99.76%, RSD 1.99%。根、枝、叶部位槲皮素的平均质量分数分别为 9.00, 41.79, 221.86 μg·g⁻¹, 山奈酚的平均质量分数分别为 3.09, 7.52, 40.72 μg·g⁻¹。结论: 该方法简便快速, 结果准确可靠, 可作为截叶铁扫帚不同药用部位的含量测定方法, 为合理开发利用截叶铁扫帚资源提供理论依据。

[关键词] 截叶铁扫帚; 槲皮素; 山奈酚; 含量测定; 药用部位

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0080-04

Determination of the Content of Quercetin and Kaempferol from Different Medicinal Parts of *Lespedeza cuneata* by HPLC

ZHU Xiao-qin¹, PENG Shui-mei², WU Jin-zhong^{1*}

(1. Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, 350108, China;

2. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, 350108, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a HPLC method for the determination of the content of quercetin and Kaempferol from different medicinal parts of *Lespedeza cuneata*. **Method:** Samples were analyzed on Daisogel Sp-ODS-BP C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), with the mobile phase consisted of methanol-0.20% phosphoric acid

[收稿日期] 20110707(003)

[基金项目] 福建中医学院服务海西建设重点项目; 福建省教育厅科技项目(JA10167)

[第一作者] 朱晓勤, 实验师, 中药学硕士, 从事中药化学成分提取分离及活性筛选研究, Tel: 0591-22861586, 15880106281, E-mail: zxq198338@163.com

[通讯作者] * 吴锦忠, 教授, 从事复方中药天然药物物质基础研究, E-mail: jinzhongfj@126.com, Tel: 0591-22861611

“灯盏花素”项下测试含量, 其野黄芩苷含量均 > 90.0%。通过指纹图谱控制各批原料基本含有相同的其他少量未知化学成分, 以达到控制原料质量的目的。

[参考文献]

[1] 杨丽梅, 顾军, 林明建. 灯盏花素的研究进展[J]. 天津药学, 2010, 22(1): 56.
[2] 巢艳红, 徐希明, 余江南. 灯盏花素新剂型及其质量控制的研究进展[J]. 中国药事, 2010, 24(7): 711.

[3] 丁润芳, 李正翔. 灯盏花素制剂的临床应用[J]. 天津药学, 2009, 21(2): 61.
[4] 高帅荣, 万屏. 灯盏花素临床应用进展[J]. 云南中医中药杂志, 2009, 30(3): 67.
[5] 中国药典. 一部[S]. 2010: 378.
[6] 范莉, 濮润, 赵海誉, 等. 红花药材的 HPLC 指纹图谱及质量研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1): 37.
[7] 袁强, 李兰, 毛蕾, 等. 复方降糖滴丸 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 79.

[责任编辑 蔡仲德]