

# 金玄痔科熏洗散及其有效部位新制剂的 HPLC 指纹图谱比较

刘蔚, 李力, 蹇顺华, 王光忠, 叶晓川, 刘焱文\*

(湖北中医药大学中药资源与中药复方教育部重点实验室, 武汉 430061)

**[摘要]** 目的: 建立金玄痔科熏洗散有效部位新制剂的非挥发性成分的指纹图谱测定方法, 指认主要色谱峰, 分析比较其与原制剂有效成分的差异, 从而为金玄痔科熏洗散传统制剂的二次开发提供依据。方法: 采用 RP-HPLC, 流动相甲醇-0.4% 磷酸水溶液梯度洗脱, 检测波长 335 nm, 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 35 °C, 以指纹图谱计算软件计算相似度并进行图谱的比较及指认。结果: 建立了金玄痔科熏洗散及其有效部位新制剂的 HPLC 标准指纹图谱, 各 10 批次样品的相似度大于 0.945, 并指认了 5 个色谱峰。结论: 指纹图谱方法可靠、重复性好, 能有效比较金玄痔科熏洗散与其新制剂的数量关系, 新制剂有效成分的数和量均优于原制剂。

**[关键词]** 金玄痔科熏洗散; 有效部位; 高效液相指纹图谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)02-0099-04

## Comparison on the HPLC Fingerprint of Jinxuan Zhike Xunxisan and Its Active Ingredients Group

LIU Wei, LI Li, JIAN Shun-hua, WANG Guang-zhong, YE Xiao-chuan, LIU Yan-wen\*

(Ministry of Education Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Resources and Compounds, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the HPLC fingerprint method and compare the changes of chemical constituents of Jinxuan Zhike Xunxisan and its active ingredients group. **Method:** Chromatographic was investigated by RP-HPLC and the procedure analysis was performed at 35 °C with the methanol-0.4% phosphoric acid in gradient elution as the mobil phase. The detection wavelength was set at 335 nm and the flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. **Result:** The standard HPLC fingerprint and five main chromatographic peaks with the isolated compounds was obtained and the average similarities among the processed products of an active ingredients group were over 0.945. **Conclusion:** The method is reliable, accurate and provides a reference for the quality control of an active ingredients group.

**[Key words]** Jinxuan Zhike Xunxisan; active ingredients group; HPLC fingerprint

金玄痔科熏洗散为武汉马应龙药业集团股份有限公司生产的中药制剂, 由玄明粉、马齿苋、金银花、枯矾、荆芥 5 位中药组成, 具有消肿止痛、祛风燥湿

的功效, 临床主要用于痔疮术后、炎性外痔所致的肛门肿胀、疼痛, 中医辨证为湿热壅滞证。该品种为传统生产工艺制备, 存在药效物质基础不明确、质量标准有待提高、临床使用剂量大等问题。本课题前期实验采用二甲苯所致小鼠耳廓肿胀, 蛋清所致大鼠足跖肿胀等急性炎症模型及热板至痛试验, 对其抗炎、镇痛有效部位进行了筛选<sup>[1]</sup>, 在此基础上将有效部位重新组方得到有效部位新制剂, 并对有效部位新制剂的抗炎作用机制进行了系统研究<sup>[2]</sup>。本实验以金玄痔科熏洗散及其有效部位新制剂为研究对象, 建立了指纹图谱测定方法, 并对其化学成分进行了归属<sup>[3-4]</sup>。

**[收稿日期]** 20110907(008)

**[基金项目]** 湖北省教育厅产学研合作重点项目 (CX Y2009B038); 马应龙药业集团肛肠基金 (200808)

**[第一作者]** 刘蔚, 在读硕士, 从事中药学研究工作, Tel: 027-88920834, E-mail: lw165271351@163.com

**[通讯作者]** \* 刘焱文, 教授, 博士生导师, 从事中药学教学研究工作, Tel: 027-88920834, E-mail: ywliu2008@163.com

## 1 仪器与试药

Agilent 1100 高效液相色谱仪, 超声清洗器(上海科导超声仪器有限公司); 甲醇为色谱纯, 水为双蒸水, 其余试剂均为分析纯。10 批金玄痔科熏洗散由马应龙药业集团股份有限公司提供(批号分别为 100413, 100914, 101108, 110312, 110314, 110316, 110424, 110632, 110634, 110636), 金银花、荆芥、马齿苋、枯矾、玄明粉由马应龙药业股份有限公司提供, 经湖北中医药大学吴和珍教授鉴定为合格, 10 批有效部位新制剂由实验室自制(批号为 101028, 101129, 110224, 110225, 110226, 110510, 110512, 110516, 110520, 110528)。绿原酸对照品(批号 110753-200413)、木犀草素对照品(批号 111520-200504)、咖啡酸对照品(批号 110463-200312)、金丝桃苷对照品(批号 111521-200303), 均购自中国药品生物制品检定所。山奈素对照品由实验室前期分离得到, 经过 HPLC 测定纯度大于 95%。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱为 Venusil XBP C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相甲醇(A)-0.4% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(0 ~ 15 min, 22% ~ 30% A; 15 ~ 16 min, 30% ~ 40% A; 16 ~ 40 min, 40% ~ 58% A; 40 ~ 45 min, 58% ~ 90% A; 45 ~ 60 min, 90% ~ 100% A); 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温为 35 °C, 进样量为 10 μL, 检测波长为 335 nm, 记录时间为 60 min。

**2.2 有效部位新制剂的制备** 称取金银花、荆芥、马齿苋粉碎按 3:4:3 的比例混合均匀, 经过超临界 CO<sub>2</sub> 萃取得挥发油(部位 1 得率为 2.36%); 萃取后的药渣用 60% 乙醇渗漉, 渗漉液浓缩后上 D101 大孔吸附树脂柱依次用水、70% 乙醇洗脱, 收集醇洗脱液, 浓缩后喷雾干燥的粉末(部位 2 得率为 5.35%); 将玄明粉、枯矾按处方比例混合得部位 3, 将部位 1, 2, 3 按 2.36:5.35:90 的比例研磨、混匀、过筛、分装即得。

### 2.3 溶液的配制

**2.3.1 对照品溶液的配制** 分别取绿原酸、木犀草素、咖啡酸、金丝桃苷、山奈素对照品适量, 分别加适量 70% 甲醇溶解, 即得。

**2.3.2 供试品溶液的配制** 分别取金玄痔科熏洗散及其有效部位新制剂 0.55(相当于 0.95 g 生药), 0.49 g(相当于 0.95 g 生药), 精密称定, 精密加入 70% 甲醇 25 mL, 称定质量, 超声提取 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 70% 甲醇补足损失的质量, 摇匀, 滤

过, 取续滤液分别得金玄痔科熏洗散及其有效部位新制剂供试品溶液。

### 2.4 方法学考察

**2.4.1 精密度试验** 分别取有效部位新制剂及原制剂 0.49, 0.55 g, 按 2.3.2 供试品制备方法制备, 精密吸取 10 μL 在上述色谱条件下连续进样 6 次, 记录指纹图谱, 结果两制剂的相对保留时间的 RSD 分别 < 0.5%, 0.78%; 相对峰面积的 RSD 分别小于 3.8%, 4.6%, RSD 均 < 5%, 表明仪器精密度良好。

**2.4.2 稳定性试验** 取供试品溶液, 在相同条件下分别于 0, 5, 10, 15, 20, 25 h 进样分析, 记录指纹图谱, 结果两制剂的相对保留时间的 RSD 分别 < 0.46%, 0.68%; 相对峰面积的 RSD 分别 < 4.3%, 4.5%, RSD 均 < 5%, 表明样品在 25 h 内稳定。

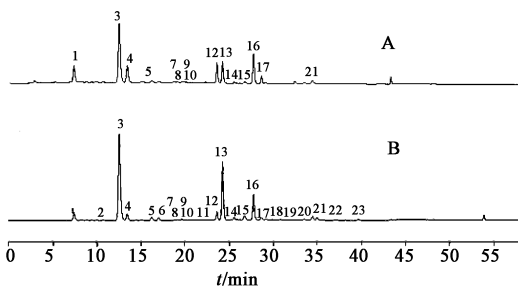
**2.4.3 重复性试验** 取有效部位新制剂及原制剂各 0.49 g 和 0.55 g, 按 2.3.2 供试品制备方法平行制备 6 份, 精密吸取 10 μL 在上述色谱条件下进行分析, 结果两制剂的相对保留时间的 RSD 分别 < 0.38%, 0.58%; 相对峰面积的 RSD 分别 < 4.1%, 4.8%, RSD 均 < 5%, 符合有关要求。

### 2.5 指纹图谱分析与评价

**2.5.1 共有峰的标定及与药材的比较** 参照《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》, 根据不同批次药材按处方比例分别制备 10 批金玄痔科熏洗散及其有效部位新制剂, 建立 2 种制剂的指纹图谱。金玄痔科熏洗散有效部位新制剂中选择第 7 批样品指纹图谱为对照指纹图谱, 标定出 23 个共有峰; 金玄痔科熏洗散原制剂中选择第 5 批样品指纹图谱为对照指纹图谱共标定 17 个共有峰。2 种指纹图谱比较结果表明, 新制剂较原制剂多出 2, 6, 11, 18, 19, 20, 22, 23 号等 8 个色谱峰, 但缺少 a, b 等 2 个色谱峰(见图 1)。

2 种制剂与组方药材的指纹图谱比较, 金玄痔科熏洗散原制剂及其有效部位新制剂中 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 18, 19, 23 号峰与金银花药材指纹图谱峰相对应; 11 号峰与马齿苋药材指纹图谱峰相对应; 21 号峰以荆芥药材指纹图谱峰相对应; 3, 5, 10, 13, 15, 17, 20 号峰为金银花药材和荆芥药材共有; a, 13, 16 号峰为金银花药材与马齿苋药材共有; b 和 22 号峰在 3 味药材中均未出现, 可能为 3 味药材混合提取过程中产生的新成分(图 2)。

**2.5.2 特征指纹峰分析** 以峰面积稳定、峰形较好、且峰面积 > 10% 的 3 号峰(绿原酸)作为参照峰, 对不同批次制剂的相对保留时间和相对峰面积



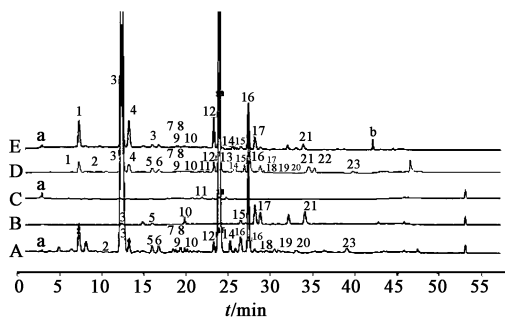
A. 金玄痔科熏洗散有效部位新制剂; B. 金玄痔科熏洗散原制剂;  
3. 绿原酸; 5. 咖啡酸; 15. 金丝桃苷; 23. 木犀草素

图1 金玄痔科熏洗散及其有效部位新制剂的标准指纹图谱

表1 金玄痔科熏洗散及其有效部位新制剂的指纹图谱测定结果(相对峰面积)

峰号	金玄痔科熏洗散		金玄痔科熏洗散有效部位新制剂	
	平均值	RSD/%	平均值	RSD/%
a	0.033	12.0	-	-
1	0.260	6.2	0.055	35.6
2	1	1	0.005	24.8
3	1.000	0	1.000	0
4	0.285	5.1	0.056	20.7
5	0.041	26.4	0.052	41.7
6	-	-	0.001	26.4
7	0.025	11.6	0.007	41.8
8	0.037	12.4	0.011	36.9
9	0.027	7.4	0.003	47.3
10	0.031	25.2	0.004	38.7
11	-	-	0.074	20.9
12	0.252	12.1	0.806	45.7
13	0.313	17.0	0.029	34.2
14	0.045	36.3	0.067	31.7
15	0.059	36.9	0.327	28.1
16	0.446	12.6	0.052	34.9
17	0.096	32.7	0.015	59.5
18	-	-	0.002	30.3
19	-	-	0.002	40.3
20	-	-	0.009	70.0
21	0.054	9.8	0.060	42.5
22	-	-	0.040	43.0
23	-	-	0.010	45.3
b	0.036	28.2	-	-

注:“-”表示未检出



A. 金银花药材; B. 荆芥药材; C. 马齿苋药材;  
D. 金玄痔科熏洗散有效部位新制剂;  
E. 金玄痔科熏洗散原制剂; b. 山奈素

图2 金银花、荆芥、马齿苋药材及金玄痔科熏洗散原、新制剂指纹图谱叠加图

分析统计。结果表明,金玄痔科熏洗散及其有效部位新制剂的共有峰的相对保留时间的 RSD 分别 < 0.74% ,0.38% ;相对峰面积的 RSD 差别较大,其平均值和 RSD 见表 1。

金玄痔科熏洗散及其有效部位新制剂各批次样品的相对峰面积差异较大, RSD 分别为 5.1% ~ 36.9% ,20.7% ~ 70% 。10 批金玄痔科熏洗散制剂与对照指纹图谱比较其相似度为 0.826 以上;其 10 批有效部位新制剂与对照指纹图谱比较相似度为 0.945 以上。说明得到的标准指纹图谱具有较好的代表性,可用于各批次制剂的指纹图谱的比较测定<sup>[5-6]</sup>(图 3,4)。

**2.5.3 主要色谱峰的指认** 根据建立的指纹图谱方法依次对各对照品进行测定,按照同一化合物在相同色谱条件下,相同保留时间处具有相同的紫外光谱图的原则,归属指认了图谱共有峰中 3,5,15,23,b 号 5 个色谱峰,分别为绿原酸、咖啡酸、金丝桃苷、木犀草素、山奈素,见图 1。

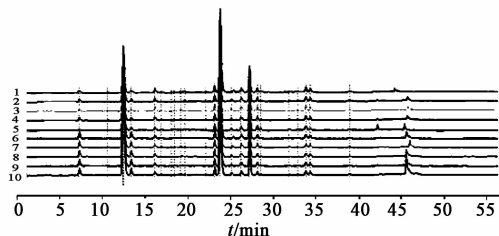


图3 10批金玄痔科熏洗散有效部位新制剂的指纹图谱叠加

### 3 讨论

**3.1 HPLC 指纹图谱的建立** 通过系统的比较研究,建立了金玄痔科熏洗散及其有效部位新制剂的

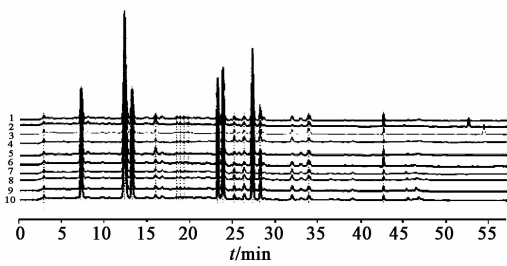


图 4 10 批金玄痔科熏洗散的指纹图谱叠加

HPLC 指纹图谱测定方法,记录各供试品溶液在 210,250,280,335,350 nm 波长下的色谱图,比较各波长下供试品溶液的色谱峰,发现检测波长为 335 nm 时,色谱峰强度普遍较强,基线也较平稳,故选择 335 nm 作为指纹图谱的检测波长。并对甲醇-水、甲醇-0.4% 磷酸水、乙腈-0.4% 磷酸水等多种流动相的梯度洗脱进行了优选,结果表明甲醇-0.4% 磷酸水洗脱系统效果较好,在该系统下各色谱峰的峰形和分离度较好,因此选用该系统作为指纹图谱流动相。

**3.2 两种制剂的指纹图谱比较分析** 两种制剂的指纹图谱测定结果表明,其各批次的指纹图谱中主要色谱峰的图貌基本一致。可能使用药材产地的不一致,使得两种制剂的相对峰面积变化幅度较大,但有效部位新制剂的相似度为 0.945,表明金玄痔科熏洗散有效部位新制剂的生产工艺稳定、可控、重复性好,为稳定其制剂质量提供了可靠依据。

**3.3 两种制剂的化学成分比较分析** 比较两种制剂的标准指纹图谱,金玄痔科熏洗散有效部位新制剂共有峰为 23 个,而原制剂为 17 个,新制剂较原制剂多出 2,6,11,18,19,20,22,23 号等 8 个色谱峰,可能与新工艺对这些成分的富集有关。但缺少 a,b 等 2 个色谱峰;新制剂中主要活性成分 3,5,15,23 号峰即绿原酸、咖啡酸、金丝桃苷、木犀草素的峰面积均明显增加<sup>[7-9]</sup>。本课题前期研究结果表明,其

抗炎、镇痛主要活性成分为黄酮类、皂苷类、有机酸类。前期药理实验表明金玄痔科熏洗散有效部位新制剂的抗炎、镇痛作用优于原制剂。将本论文实验结果与前期药理实验结果结合分析,金玄痔科熏洗散有效部位新制剂有效物质含量高,抗炎镇痛效果好,从而为金玄痔科熏洗散传统制剂的二次开发提供了科学依据。

#### [参考文献]

- [1] 章文颖,周璐,文莉,等. 金玄痔科熏洗散的抗炎镇痛活性物质筛选研究[J]. 中国中医药信息杂志,2010,17(2):35.
- [2] Li W, Lu Z, Wei L, et al. Mechanisms of anti-inflammatory effect of an active ingredients group from Jinxuan Zhike Xunxi San[J]. J Ethnopharmacol,2011,135:308.
- [3] 胡柳,栾连军,程翼宇. 复方有效部位与组方药材指纹图谱色谱峰相关性研究[J]. 中国药学杂志,2004,39(12):895.
- [4] 丁既鹏,李世林. 醇提法和超声法提取金银花中黄酮类物质的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2005,11(4):64.
- [5] 高明,赵镭,赵光树. 白芍和赤芍 HPLC 指纹图谱比较研究[J]. 中草药,2010,41(11):1904.
- [6] 郑晓珂,魏悦,冯卫生. 不同采收期连翘的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(3):1.
- [7] 林卓慧. 木犀草素抗菌活性研究[J]. 检验医学与临床,2009,6(12):1022.
- [8] 吴卫华,康桢,欧阳冬生,等. 绿原酸的药理学研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2006,18:691.
- [9] 石娟,刘瑞,宋晓涛,等. HPLC 测定不同中鹿衔草中金丝桃苷的含量[J]. 中国中药杂志,2002,27(8):618.

[责任编辑 蔡仲德]