

不同厂家黄连上清片特征指纹图谱比较

唐显虹*

(重庆科创职业学院 生命科学系,重庆 402160)

[摘要] **目的:**研究不同厂家和不同批次黄连上清片指纹图谱及色谱峰面积的差异。**方法:**采用高效液相色谱法,比较不同厂家和同一厂家不同批次黄连上清片特征指纹图谱的差异,并通过相似度软件分析其相似性。**结果:**不同厂家生产的黄连上清片在所含色谱峰的数目和峰面积上存在很大差异;同一厂家不同批号黄连上清片所含色谱峰的数目基本相同,含量虽然存在一定的差异,但相对不同厂家的差异较小。**结论:**不同厂家的黄连上清片指纹图谱变异范围差异较明显,同一厂家的产品质量基本稳定在一定水平内。

[关键词] 黄连上清片;高效液相色谱法;指纹图谱;蒽醌;质量控制

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)24-0067-05

Comparison Research of Characteristic Fingerprints of Huanglian Shangqing Tablets from Different Manufacturers

TANG Xian-hong*

(Department of Life Science, Chongqing Creation Vocational College, Chongqing 402160, China)

[Abstract] **Objective:** To study the difference in fingerprints and chromatographic peak area of different batches of Huanglian Shangqing pills from different manufacturers. **Method:** HPLC was used to compare the difference of characteristics fingerprints of different batches of Huanglian Shangqing tablets from different or same manufacturers. The similarity was analyzed with the similarity evaluation software. **Result:** There were big differences in the number of peaks and peak area of Huanglian Shangqing tablets from different manufacturers. The number of peaks of different batches of Huanglian Shangqing tablets from the same manufactures were almost similar, while the contents of them existed a certain difference. Relative to the different manufacturers, the difference of the content of different batches of Huanglian shangqing tablets was smaller among the same manufacturers. **Conclusion:** The variation of fingerprint of Huanglian Shangqing tablets is relatively obvious among different manufacturers, but the quality of Huanglian Shangqing tablets from the same manufactures is basically stable at a certain level.

[Key words] Huanglian Shangqing tablets; HPLC; fingerprints; anthraquinone; quality control

黄连上清片由大黄、黄芩、黄柏、黄连、石膏、栀子等 17 味中药组成的复方制剂,具有疏风清热、泻火止痛之功效,用于风热上攻、肺胃热盛所致的头晕目眩、暴发火眼、牙齿疼痛、口舌生疮、咽喉肿痛、耳痛耳鸣、大便秘结、小便短赤^[1]。药理研究表明黄连

上清片具有抗菌、解热、抗炎、镇痛、通便、镇静、降血压等作用^[2]。

目前其质量标准中含量测定已有黄连和黄柏的盐酸小檗碱^[1]、黄芩的黄芩苷^[3]、栀子的栀子苷^[4]、大黄的大黄酸、大黄素和大黄酚^[5],但这些方法均不能全面反映复方制剂的内在质量;目前黄连上清片的生产厂家众多,产品中所含化学成分的种类和含量也有较大差异。临床发现,不同厂家生产的黄连上清片质量和疗效存在很大的差异^[6],其药效不仅

[收稿日期] 20110625(004)

[通讯作者] *唐显虹,从事药理学教学与科研工作, Tel: 023-49841366, E-mail: txhjrf@sina.com

取决于某几个有效成分,而是依赖多种中药的化学成分,起到有主次的多靶点、有机的整体协同的治疗效果^[7]。本试验采用高效液相色谱法对市售黄连上清片的指纹图谱进行了研究,以期为进一步完善该制剂的质量控制标准提供依据。

1 仪器与试剂

1100 LC 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),KQ-250B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),RE-2000 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),SHZ-III 型循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司),AE240 型天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],DKS-28 型恒温水浴锅(嘉兴中新医疗仪器有限公司),FZ102 型微型植物试样粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司)。

黄连上清片样品(购于大理市药品零售商店),芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为 110795-200806, 110757-200206, 110756-200110, 110796-201017, 110758-200912, 供含量测定用)。甲醇为色谱醇(美国 Tedia 试剂公司),水为娃哈哈牌纯净水,其他试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Ultrasphere™-ODS 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇(A)-0.1% 磷酸溶液(B),进行梯度洗脱:(0.00 ~ 5.00 min, 20% A, 5.00 ~ 18.00 min, 20% ~ 39% A, 18.00 ~ 48.00 min, 39% ~ 60% A, 48.00 ~ 73.00 min, 60% ~ 95% A);检测波长 270 nm;流速 1.0 mL·min⁻¹;柱温 40 ℃;进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚对照品适量,置 25 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液(每 1 mL 中含芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚分别为 40.0, 40.0, 40.0, 40.0, 20.0 μg)。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品 20 片,去糖衣,研细,精密称定约 1.0 g,置 500 mL 圆底烧瓶中,加 70% 乙醇 100 mL,室温浸泡 2 h,回流 1 h,重复 1 次,合并提取液,减压回收溶剂至干,用甲醇溶解并转移至 10 mL 量瓶中,定容至刻度,摇匀,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取同一批号(企业 2-2,批号 090445)的黄连上清片样品在上述色谱条件下,连续进样 6 次,记录指纹图谱。利用国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 年 A 版”软件进行相似度评价,相似度结果均 ≥ 0.950,以大黄酸为参照峰,13 个共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 2.54%。结果表明仪器精密度良好。

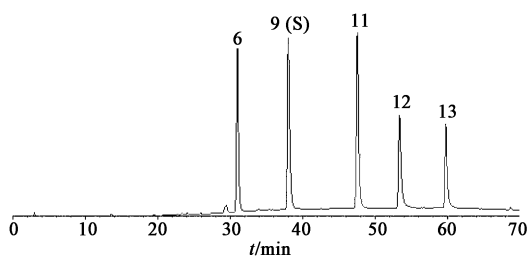
2.3.2 重复性试验 取同一批号(企业 2-2,批号 090445)的黄连上清片样品 1.0 g,共 6 份,精密称定,按 2.2.2 项下供试品溶液的制备方法制备,分别进样,记录指纹图谱。利用国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 年 A 版”软件进行相似度评价,相似度结果均 ≥ 0.962,以大黄酸为参照峰,13 个共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 2.14%。结果表明方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 取同一批号(企业 2-2,批号 090445)的黄连上清片样品在上述色谱条件下,连续进样 6 次,每次间隔时间为 5 h,分别在 0, 5, 10, 15, 20, 25 h 检测,记录指纹图谱。利用国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 年 A 版”软件进行相似度评价,相似度结果均 ≥ 0.951,以大黄酸为参照峰,13 个共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 1.51%。结果表明供试品溶液在室温下 25 h 内稳定性良好。

2.4 黄连上清片指纹图谱的建立 分别取 7 个不同厂家 10 批黄连上清片样品,按 2.2.2 项下供试品溶液的制备方法制备,按 2.1 项下的色谱条件操作,进样,记录 73 min 色谱图。

2.5 指纹图谱分析与评价

2.5.1 共有峰的标定和确认 将 10 批黄连上清片的色谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 年 A 版”软件,设定匹配模板,进行谱峰多点校正,并生成对照指纹图谱,结果见图 1 ~ 3。在测定的 10 批样品中,图谱显示约有 80 个色谱峰,选择其中 13 个共有峰为 10 批样品共有峰,确定为特征指纹峰,依次编号。为了尽可能了解黄连上清片指纹图谱中各成分的结构信息,根据同一化合物相同色谱分离条件下保留时间相同,紫外光谱图一致的原则,共指认出 5 个化合物的色谱峰,分别是 6 号峰



6. 芦荟大黄酸 9. 大黄酸 11. 大黄素
12. 大黄酚 13. 大黄素甲醚

图1 对照品 HPLC

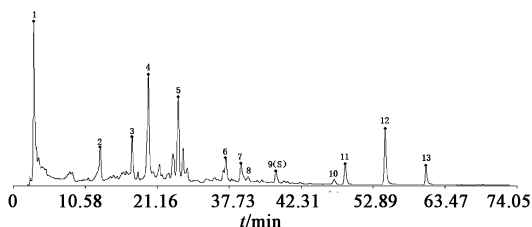


图2 黄连上清片 HPLC

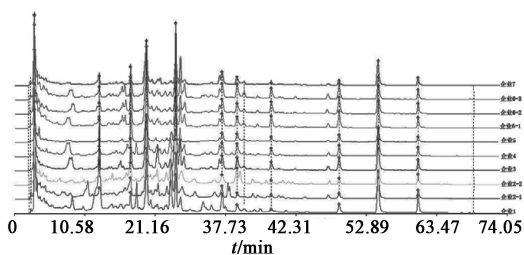


图3 不同生产厂家黄连上清片 HPLC

(芦荟大黄素)、9号峰(大黄酸)、11号峰(大黄素)、12号峰(大黄酚)和13号峰(大黄素甲醚)。为了用

数字统一标定不同生产厂家黄连上清片的指纹图谱特征,选定供试品溶液指纹图谱中的9号共有峰(该色谱峰峰面积较大且较稳定、保留时间适中)为参照峰(S),计算各共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积,结果见表1。

由图1~3可知,10个样品的色谱图,可直观地看出同一厂家不同批次间样品差异不大,其色谱图比较相似,而不同厂家的产品差异较大,其色谱图差异明显,说明不同的厂家生产工艺存在较大差异,而同一厂家对其生产过程控制得较好。

由表1可知,10批不同生产厂家黄连上清片相对保留时间的RSD较小(0.00%~2.68%),而相对峰面积的RSD较大,说明黄连上清片指纹图谱中主要峰群的整体面貌基本一致,但各成分含量有较大区别。因此,中药复方的新剂型的开发及其质量标准的建立规范是目前应该思考和解决的问题。

2.5.2 相似度评价 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统2004年A版”软件进行数据处理:以相关系数(中位数)代表其相似度,与不同生产厂家代表性黄连上清片样品生成的对照指纹图谱(共有模式)比较,10批黄连上清片样品的相似度见表2。

由表2可知,黄连上清片不同生产厂家的对照图谱之间相似度较差,说明不同生产厂家的黄连上清片所含化学成分的组成和比例有不同程度的变化,提示厂家在药材来源的选择和生产工艺方面可能存在差异。同一生产厂家不同批次相似度有区

表1 10批样品色谱指纹图谱共有峰相对峰面积

编号	相对峰面积										RSD/%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	11.840	14.855	11.178	5.531	4.940	4.101	3.734	1.996	3.204	25.016	36.43
2	24.608	3.460	6.946	1.601	1.886	1.042	1.161	0.788	1.208	7.731	46.41
3	3.201	5.032	5.598	2.300	1.474	3.732	1.967	2.003	1.926	3.999	49.65
4	11.874	12.729	13.626	6.622	11.469	4.763	5.043	4.168	4.210	24.943	39.87
5	6.083	8.667	9.871	14.791	5.380	1.553	2.257	2.152	2.388	12.742	80.68
6	3.827	3.194	2.978	1.959	1.873	1.809	1.227	1.239	1.425	6.765	24.34
7	2.105	1.746	4.245	1.815	1.805	1.818	1.033	1.014	1.424	4.449	55.31
8	1.321	0.919	0.647	0.837	0.615	0.808	0.562	0.482	0.771	1.903	15.69
9(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
10	0.113	0.678	0.787	0.427	0.370	0.232	0.330	0.306	0.399	0.758	44.65
11	1.800	1.148	1.397	1.401	1.168	1.070	1.183	1.337	1.166	2.494	9.74
12	7.458	5.579	7.521	3.428	2.893	2.376	1.813	2.225	1.520	13.227	43.85
13	2.574	1.579	1.907	1.003	0.777	0.755	0.600	0.719	0.572	3.657	34.09

表 2 与共有模式比较的不同厂家黄连上清片的相似度评价

样品号	生产厂家	批号	相似度	样品号	生产厂家	批号	相似度
1	企业 1	091008	0.786	6	企业 5	091201	0.877
2	企业 2-1	20090443	0.845	7	企业 6-1	20100103	0.933
3	企业 2-2	20090445	0.879	8	企业 6-2	20100109	0.875
4	企业 3	100101	0.839	9	企业 6-3	20100503	0.924
5	企业 4	0712011	0.916	10	企业 7	100305	0.930

别,中药复方制剂质量的不均一性仍然是影响其质量的首要问题,质量的不均一也是使得中药复方制剂的药效物质基础无法确切说明的重要原因之一。

2.5.3 主成分分析 无论是采用相关系数还是质量夹角余弦来计算相似度,它们比较的只是色谱指纹图谱的整体相似,并没有考虑提取物的“量”的不同^[8]。因此采用化学模式识别(主成分分析)的方法,对黄连上清片 HPLC 色谱指纹图谱其中的 13 个共有峰峰面积与称样量比值(简称峰质比)的总和为指标,我们考察了黄连上清片中 13 个主要化学成分含量在不同生产厂家的变化(图 4)。同时对已确认的 5 种蒽醌类化合物(6,9,11~13 号共有峰)的峰面积与称样量比值(简称峰质比)的总和为指标,我们考察了黄连上清片中 5 个已知化学成分含量在不同生产厂家的变化(图 5)。

业 5 成分含量较低,相差 3 倍左右。黄连上清片中 5 种蒽醌类化合物在企业 1 的成分含量较高,企业 5 成分含量较低,相差 2 倍左右。因此《中国药典》仅以黄连、黄柏的盐酸小檗碱来控制黄连上清片的质量是否合理,有待进一步深入研究。不同生产厂家黄连上清片样品虽然成分含量有差异,但其色谱概貌基本一致,符合黄连上清片的指纹特征。

3 讨论

对不同流动相体系、检测波长和供试品溶液的制备方法^[1,5,9-10]进行了考察,结果显示甲醇-0.1%磷酸溶液流动相体系梯度洗脱所得到色谱图基线较平稳且分离效果好;检测波长在 270 nm 处测定峰数多且响应灵敏度高;以 70%乙醇为提取溶剂,室温浸泡 2 h 后回流 1 h,提取 2 次即可将黄连上清片中的被测成分基本提取完全。

中药的多指标定量分析是目前中药质量控制和评价的一个技术难点,其根本原因在于可供定量用的对照品有限。中药指纹图谱技术是国际公认的控制中药质量的有效手段,以其信息量大的特点克服了中成药的复杂性,能够反映中药复方“多组分多靶点的整合调节作用”的特点。它以“识别指纹图谱”的表现形式来控制中药复方制剂的质量^[11]。本试验建立了黄连上清片的高效液相色谱指纹图谱,并结合化学计量学中的主成分分析法对不同厂家的黄连上清片进行化学模式识别,可准确判断不同厂家黄连上清片样本间的成分差异,既能从定性又能从定量角度评价中药指纹图谱,而且反映了指纹图谱的整体性寓于模糊性,为考察和控制药材质量提供了有效方法。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S]. 2010: 1067.
[2] 周浓.实用临床中成药学[M].北京:中国中医药出版社,2010: 42.
[3] 范全民,孙冬云,周慧娟.HPLC 测定黄连上清片

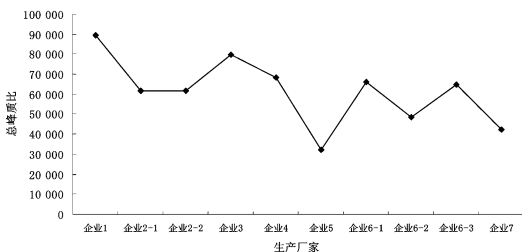


图 4 黄连上清片图谱总峰质比的变化

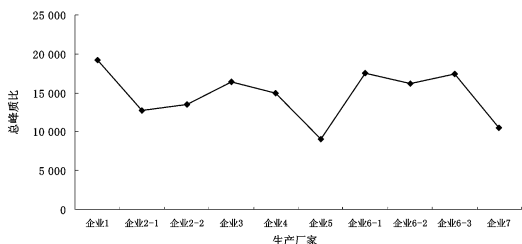


图 5 黄连上清片中 5 种蒽醌类化合物总峰质比的变化

由图 4~5 可知,不同生产厂家之间各成分及含量存在较大差异,而相同生产厂家不同批号之间各成分及含量较为稳定。通过比较可以看出,黄连上清片中共有峰峰面积在企业 1 的成分含量较高,企

HPLC 法测定痛风宁微丸中薯蓣皂苷元的含量

王志宏, 李雪婷, 王沛*, 王继彦, 贾天宝
(长春中医药大学, 长春 130117)

[摘要] 目的: 建立痛风宁微丸中薯蓣皂苷元的含量测定方法。方法: 采用高效液相色谱法测定痛风宁微丸中薯蓣皂苷元的含量。色谱法分析条件为 Agilenttc-C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水溶液(10:90), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 17 °C, 检测波长 203 nm。结果: 薯蓣皂苷元量在 1.000 ~ 5.000 μg 与峰面积呈良好的线性关系 $r = 0.9997$, 平均回收率 101.95%, RSD 0.08%。结论: 本方法简便可行、结果准确可靠, 重复性好, 可作为痛风宁微丸中薯蓣皂苷元的含量测定方法。

[关键词] 高效液相色谱法; 痛风宁微丸; 薯蓣皂苷元; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)24-0071-03

Content Determination of Diosgenin in Tongfengning Mini-pill by HPLC

WANG Zhi-hong, LI Xue-ting, WANG Pei*, WANG Ji-yan, JIA Tian-bao
(Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determining diosgenin in Tongfengning mini-pill. **Method:** HPLC determination of Diosgenin in Tongfengning mini-pill. Column: Agilenttc SB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), mobile phase was acetonitrile-water (10:90), flow rate 1.0 mL·min⁻¹, column temperature: 17 °C, detection wavelength was 203 nm. **Result:** Diosgenin in 1.000-5.000 μg range and peak area was linear regression, $r = 0.9997$, the average recovery was 101.95%, RSD 0.08%. **Conclusion:** The method is simple and reproducible for the determination of diosgenin in decoction of Tongfengning mini-pill by HPLC.

[Key words] HPLC; Tongfengning mini-pill; diosgenin; determination

[收稿日期] 20110709(001)

[基金项目] 吉林省科技厅课题(20090926)

[第一作者] 王志宏, 副教授, 从事中药及生化药物与质量监控工作, Tel:0431-86172366, E-mail:wzh1965@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 王沛, 教授, 研究生导师, 从事药物新剂型及新药开发工作, Tel:0431-82225672, E-mail:wapa1988@163.com

- 中黄芩苷的含量[J]. 中成药, 2006, 28(10): 1545.
- [4] 王小龙, 叶红. 高效液相色谱法测定黄连上清片中栀子苷的含量[J]. 时珍国医国药, 2004, 15(1): 7.
- [5] 汪霞. 反相 HPLC 法测定黄连上清片中大黄酸、大黄素、大黄酚的含量[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(8): 1310.
- [6] 黄海燕, 钟建理, 薛漓. 黄连上清片中黄连的鉴别及含量测定[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(3): 412.
- [7] 李小娜, 张兰桐, 殷玮. 中药复方药效物质基础研究途径与方法[J]. 中草药, 2006, 37(6): 801.
- [8] 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.
- [9] 任军, 方国民. 黄连上清片提取工艺研究[J]. 安徽医药, 2003, 7(6): 470.
- [10] 倪永年, 彭韵燕. 化学计量学用于解析黄连上清片的高效液相色谱指纹图谱[J]. 计算机与应用化学, 2007, 24(1): 113.
- [11] 陶金华, 狄留庆, 文红梅, 等. 中药指纹图谱谱效相关性研究思路探讨[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(18): 2410.

[责任编辑 蔡仲德]