

护肝片 HPLC 特征指纹图谱的研究

朱翔¹, 韩立炜^{1*}, 马伟辰², 倪健¹, 吴清¹

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 山东省淄博职业学院药学系, 山东 淄博 255000)

[摘要] 目的: 建立护肝片 HPLC 指纹图谱, 为进一步提高护肝片的质量标准提供科学依据, 并以此比较不同厂家产品质量的差异。方法: 采用 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相乙腈-水溶液梯度洗脱, 检测波长 250 nm, 流速 1.0 mL·min, 柱温 30 °C。结果: 确认了 23 个共有特征指纹峰, 且方法学实验中相对保留时间及相对峰面积的 RSD 均 < 5%; 不同来源的护肝片指纹图谱相似度均在 0.9 以上。结论: 该方法准确可靠, 可为护肝片的指纹图谱评价提供依据。

[关键词] 护肝片; 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(2011)14-0056-04

Study on HPLC Fingerprint of Hupan Tablet

ZHU Xiang¹, HAN Li-wei^{1*}, MA Wei-chen², NI Jian¹, WU Qing¹

(1. Pharmacy College of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China; 2. Department of Pharmaceutical Science, Zibo Vocational Institute of Shandong Province, Zibo 255000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish HPLC fingerprint of Hupan Tablet to improve its quality standard, and

[收稿日期] 20110316(015)

[基金项目] 国家中医药管理局公益性行业科研专项(200807038)

[第一作者] 朱翔, 研究生, 从事中药新剂型与新技术, Tel:010-84738936, E-mail:nansixs@163.com

[通讯作者] * 韩立炜, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药新剂型与新技术, Tel:010-84738616, E-mail:bjhlw@126.com

为 β -chlorogenin^[2], 其结构与薯蓣皂苷元和知母皂苷 A-III 具有相类似的结构。在 B 环无双键, C₂₅ 为 D 型; 知母皂苷 A-III 在 B 环无双键, C₂₅ 为 L 构型; 薯蓣皂苷元 B 环 C₅ 和 C₆ 为双键连接, C₂₅ 为 D 型。理论上推测, 知母皂苷 A-III 可能更适合作为大蒜总皂苷测定的对照品。本实验对两个对照品进行了筛选, 研究结果证实了该推测。

文献报道中总皂苷含量测定常用的显色剂有香草醛-高氯酸和茴香醛-硫酸^[3], 本实验对显色剂进行了筛选。研究表明茴香醛-硫酸法虽然具有较稳定的出峰位置以及良好的峰形, 但其吸光度较低, 灵敏度较差, 故选用香草醛-高氯酸作为显色剂。

显色反应过程中吸光度随显色的时间、温度、显色剂用量的改变而改变, 本实验对这些因素均进行了考察。实验时对这些因素应严格控制, 所用的香草醛-冰醋酸溶液应现用现配。

香草醛作为显色剂, 其与高氯酸的对实验

有一定干扰, 因此在保证灵敏度的前提下用量应越小越好。根据《中国药典》对于紫外分光光度法测定的相关规定^[4], 吸光度应在 0.3 ~ 0.7 之间, 故香草醛用量最终选用 0.2 mL。高氯酸作为发色体系的一部分, 筛选结果显示其用量越小, 吸光度值越高。本实验选用 0.6 mL 高氯酸, 既保证了分析的灵敏度, 也使反应能在足够的溶液体积内充分反应。

[参考文献]

- [1] 闫森森, 许真, 徐蝉, 等. 大蒜功能成分研究进展[J]. 食品科学, 2010, 3(5): 312.
- [2] Matsuura H. Saponins in garlic as modifiers of the risk of cardiovascular disease [J]. J Nutr, 2001, 131: 1000S-1005S.
- [3] 邱学艳, 林厚文, 沈利明, 等. 不同显色剂对玉竹总皂苷含量测定的影响[J]. 药学服务与研究, 2006, 6(2): 129.
- [4] 中国药典. 二部[S]. 2005: 附录 29.

[责任编辑 蔡仲德]

compare the quality of products from different companies using the new established method. **Method:** The separation was performed on Agilent Zorbax SB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) chromatographic column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (gradient elution) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. Detecting wavelength was set at 250 nm and the column temperature was set at 30 °C. **Result:** Twenty-three characteristic common peaks were confirmed. Relative standard deviations of relative retention time and relative peak area in the method verification were all less than 5%. The similarity of fingerprint of different sources of samples were all more than 0.9.

Conclusion: The method is reliable, accurate and can be used as a method to assess the quality of Huga Tablet.

[**Key words**] Huga Tablet; fingerprint; HPLC

护肝片是目前国内治疗慢性乙型肝炎、早期肝硬化及化疗药物性肝损伤的常用中成药,自1995年开始收载于《中国药典》一部。其处方由柴胡、茵陈、板蓝根、五味子、猪胆粉和绿豆6味药组成,是将《伤寒论》中的小柴胡汤和茵陈蒿汤结合现代药学研究及临床验证,重新合理配伍使用的现代中药复方。目前生产护肝片的厂家约130个,而在2010年版《中国药典》的质量标准中^[1],仅以五味子醇甲的含量评价成方的质量,并不够全面,难以准确评价不同厂家的产品质量。指纹图谱的研究亦未见报道。本实验旨在建立护肝片的HPLC指纹图谱,并以此对市售14个厂家及同厂家不同批次生产的护肝片进行相似度评价,比较其质量差异,为进一步提高中成药护肝片的质量标准提供科学依据。

1 仪器与试剂

岛津 Prominence LC-20A 型高效液相色谱仪(四元泵, SIL-20A 自动进样器, SPD-20A UV-VIS 检测器, 岛津工作站; 日本岛津仪器公司), KH7200DB 型数控超声波清洗器(功率 100W, 昆山禾创超声仪器有限公司)。

五味子醇甲(批号 110857-200709)、五味子酯甲(批号 111529-200503)、五味子甲素(批号 110764-200609)、五味子乙素(批号 110765-200609)、表告依春(批号 111753-200601)对照品,均购自中国药品生物制品检定所,柴胡皂苷 b₂(批号 HY0261),购自上海华壹生物科技有限公司;共收集并编号 14 个厂家的护肝片样品,分别购自北京(1~5 号与 13 号)、安徽(6 号)、江西(7~12 号)、山西(14 号)等地零售药店;乙腈(Promptar Company Ltd., 色谱纯)、娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。

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 μm);以乙腈为流动相 A,水为流动

相 B,按表 1 进行梯度洗脱;检测波长为 250 nm;流速 1.0 mL·min⁻¹;柱温 30 °C;进样量 10 μL。

表 1 护肝片流动相梯度洗脱条件

t/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	5	95
10	5	95
11	35	65
20	45	55
60	85	15

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取对照品五味子醇甲 1.24 mg、五味子酯甲 1.01 mg、五味子甲素 1.17 mg、五味子乙素 1.52 mg、表告依春 1.31 mg 和柴胡皂苷 1.29 mg,置于同一 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解定容,即得五味子醇甲为 0.049 6 g·L⁻¹、五味子酯甲为 0.040 4 g·L⁻¹、五味子甲素为 0.046 8 g·L⁻¹、五味子乙素为 0.060 8 g·L⁻¹、表告依春为 0.052 4 g·L⁻¹ 和柴胡皂苷为 0.051 6 g·L⁻¹ 的混合对照品溶液。

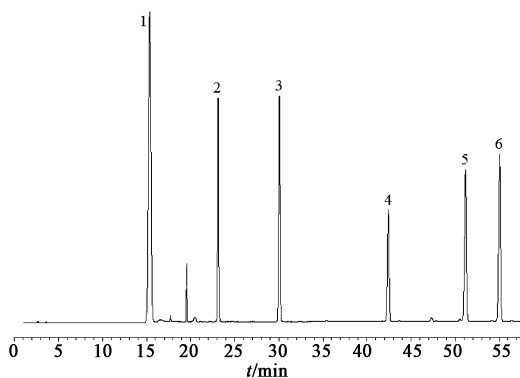
2.3 供试品溶液的制备 取护肝片 10 片,除去包衣研细,取 0.7 g,精密称定,加 25 mL 甲醇,称重,超声处理 20 min 后,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 测定法 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL,注入色谱仪,记录 60 min 色谱图,见图 1~3。

2.5 方法学考察

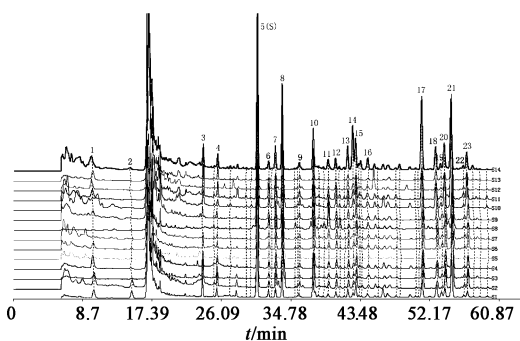
2.5.1 精密度试验 取同一供试品溶液,连续进样 5 次,记录其指纹图谱,以五味子醇甲色谱峰(指纹图谱中为 5 号峰)为内参比峰,计算指纹图谱中各共有峰的相对峰面积。结果各共有峰相对保留时间的 RSD < 0.5%,相对峰面积的 RSD < 4.8%,表明仪器精密度良好。

2.5.2 重复性试验 取 1 号厂家(批号 201006110)护肝片样品,平行制备 6 份供试品溶液,



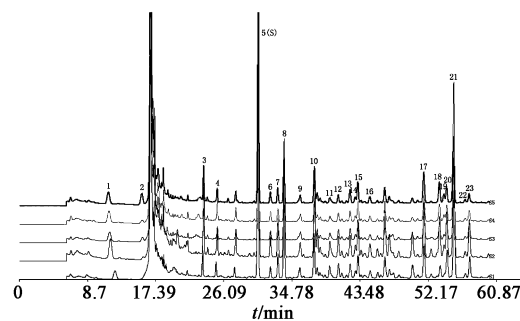
1. 表告依春; 2. 柴胡皂苷 b2; 3. 五味子醇甲;
4. 五味子酯甲; 5. 五味子甲素; 6. 五味子乙素

图 1 混合对照品 HPLC



2. 表告依春; 3. 柴胡皂苷 b2; 5(S). 五味子醇甲;
14. 五味子酯甲; 17. 五味子甲素; 21. 五味子乙素

图 2 14 个厂家护肝片样品的匹配色谱



2. 表告依春; 3 柴胡皂苷 b2; 5(S). 五味子醇甲;
14. 五味子酯甲; 17. 五味子甲素; 21. 五味子乙素

图 3 同一厂家 5 个批次护肝片样品的匹配色谱

按上述色谱条件进样,记录指纹图谱。结果各共有峰相对保留时间的 RSD < 0.7%, 相对峰面积的 RSD < 4.4%, 表明方法的重复性良好。

2.5.3 稳定性试验 取同一供试品溶液分别在 0, 3, 6, 9, 12, 24 h 进样分析,记录指纹图谱。结果各共有峰相对保留时间的 RSD < 0.6%, 相对峰面积的 RSD < 4.4%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.6 指纹图谱的建立与分析

2.6.1 共有峰的确认和归属 采用 2004A 版“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件(国家药典委员会)对 14 批不同来源的护肝片样品进行分析,选择了稳定性好且吸收较强的 23 个峰标定为共有峰(图 2)。经对照品比对,其中 5 号峰为护肝片的主要指标成分五味子醇甲,因其在各共有峰中峰面积最大且较稳定,故将其作为内参比峰;2,3,14,17,21 号峰依次为表告依春、柴胡皂苷 b2、五味子酯甲、五味子甲素和五味子乙素。将护肝片样品图谱与各药材图谱比对后,证实共有峰 1,2 为板蓝根的特征峰,3,4 为柴胡的特征峰,5~23 为五味子的特征峰。

2.6.2 相似度计算 将上述 14 个不同厂家及同厂家不同批次的实验数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004A 版软件,剪切前 6 min 色谱峰后,进行自动匹配并以中位数法生成对照图谱,计算各批样品与对照图谱间的相似度,见表 2 和表 3。14 个厂家及同厂家 5 个批次的护肝片指纹图谱相似度均 > 0.9。

表 2 14 个厂家护肝片指纹图谱相似度计算

No.	相似度	No.	相似度
S ₁	0.963	S ₈	0.917
S ₂	0.962	S ₉	0.993
S ₃	0.993	S ₁₀	0.966
S ₄	0.986	S ₁₁	0.991
S ₅	0.972	S ₁₂	0.957
S ₆	0.989	S ₁₃	0.955
S ₇	0.982	S ₁₄	0.933

表 3 1 号厂家 5 个批次护肝片指纹图谱相似度计算

No.	相似度
S ₁₋₁	0.975
S ₁₋₂	0.985
S ₁₋₃	0.994
S ₁₋₄	0.998
S ₁₋₅	0.996

3 讨论

护肝片由柴胡、茵陈、板蓝根、五味子、猪胆粉和绿豆 6 味药组成,其化学成分的组成极为复杂,而目前对此成药的药效物质基础的研究还很少。但由于本方是在经方基础上结合现代药理及临床验证,重新合理配伍的现代中药复方。因此首先选择在降低转氨酶、抗肝炎病毒、抑制肝细胞纤维化、修复肝组织损伤等方面有确切药理活性及临床疗效的化学成分群作为指纹图谱研究的重点,以满足指纹图谱的专属性特征。

细叶桉果实提取物抑菌活性及光谱鉴别的研究

周燕园^{1,2*}, 黄燕¹, 梁臣艳¹, 梁子宁¹

(1. 广西中医学院, 南宁 530001; 2. 桂林医学院, 广西 桂林 541004)

[摘要] **目的:**探讨细叶桉果实的体外抑菌作用及光谱的鉴别方法。**方法:**采用连续稀释法对细叶桉果实不同溶剂提取物进行抑菌实验研究,并进行紫外-可见光谱的测定。**结果:**细叶桉果实的不同溶剂提取物在体外对供试菌(金黄色葡萄球菌、金黄色葡萄球菌耐药株、大肠杆菌、绿脓杆菌、伤寒杆菌、腐生葡萄球菌、甲型溶血性链球菌、乙型溶血性链球菌)均有一定程度的抑制作用。经紫外-可见光谱扫描发现具有明显的特征吸收峰。**结论:**细叶桉果实提取物具有明显的体外抑菌作用;紫外-可见光谱研究为药材鉴别提供了实验依据。

[关键词] 细叶桉果实;抑菌;最小抑菌浓度;鉴别

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)14-0059-04

[收稿日期] 20110210(013)

[基金项目] 广西教育厅科研项目(200911LX243);广西中医学院校级科研课题(P2009057)

[通讯作者] *周燕园,副教授,硕士,研究方向:药物、天然药物、中药及民族药的质量与成分分析,药理活性的研究,Tel:0773-5891880, E-mail:zhou-yanyuan@163.com

本品中用量较大且含相关药效成分较多的药味是柴胡、茵陈、板蓝根和五味子,而根据已有的研究表明,柴胡中的柴胡皂苷、五味子中的木脂素类和板蓝根中的抗病毒成分表告依春等^[2]均在修复肝组织损伤、降低转氨酶、抑制肝细胞纤维化及抗肝炎病毒方面有确切疗效。因此在建立指纹图谱时,首先对上述 3 类有效成分群的共有吸收波长进行选择。由于柴胡皂苷 a, c, d 不稳定,在药液煎煮过程中易转化为在 250 nm 吸收较好的柴胡皂苷 b₂^[3],结合 3D 全波长 HPLC 图谱,最终确定 3 类成分均有较强吸收的 250 nm 作为检测波长。

由于柴胡皂苷及茵陈、板蓝根中的主要成分极性较大而五味子中木脂素类极性却较小,因此最终选择甲醇作为提取溶剂,以较简便易行的超声提取法提取。

在建立指纹图谱方法时发现,15~23 min 的峰是由柴胡、茵陈、板蓝根 3 味药的许多极微量成分堆积而成,峰面积均极小且峰形不好。因此,若将其视为一组峰或几个峰进行匹配,则误差很大,匹配也不准确,易造成最终相似度判断的错误。因此本实验对 15~23 min 的峰去除积分且使用相似度评价软件中的剪切功能,对前 6 min 来自各味药的大极性成分的堆积峰作剪切处理,以保证相似度计算前匹配的准确性。但须指出的是,15~23 min 的峰仍然

属于此张特征指纹图谱中的特征之一,因其体现了柴胡、茵陈、板蓝根中微量成分群的特征,不可忽略。而对其去除积分仅因其在相似度计算时无法准确匹配的缘故。

本实验对 14 个厂家产品指纹图谱的相似度分析表明整体相似性较高,但也不难发现来源于柴胡、板蓝根的 1~3 号共有峰及五味子醇甲等个别标志性成分的含量差异显著。对五味子中有效成分的含量测定也证实了这一点。因此,有必要将指纹图谱的相似度计算与含量测定方法相结合,以求既全面又细致地评价产品的内在质量^[4]。此外,有必要进一步研究建立护肝片的第 2 张指纹图谱,可重点对上述提到的柴胡、茵陈、板蓝根中的未知微量成分尝试进行富集分离,使护肝片特征指纹图谱更加完善。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2010:760.
- [2] 徐丽华,黄芳,陈婷,等.板蓝根中的抗病毒活性成分[J].中国天然药物,2005,3(6):359.
- [3] 陈帅,李燕,孙秋实,等.柴胡炮制后皂苷成分的变化分析[J].中成药,2010,32(5):793.
- [4] 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.

[责任编辑 蔡仲德]