

芩百清肺浓缩丸 HPLC-UV-ELSD 指纹图谱的建立

霍金海,曹贵阳,王伟明*

(黑龙江省中医研究院,哈尔滨 150036)

[摘要] 目的:研究芩百清肺浓缩丸高效液相色谱指纹图谱,建立整体特征的质量评价方法。方法:采用 UV-ELSD 串联检测技术,Zorbax 色谱柱,以乙腈-1.5% 冰醋酸为流动相,梯度洗脱,检测波长 280nm。结果:本色谱条件下芩百清肺浓缩丸各成分得到了较好的分离,标准指纹图谱均由 10 个特征峰组成,相似度 >0.05。结论:所建立的 HPLC 指纹图谱表达了芩百清肺浓缩丸可测组分的整体特征。具有重复性好、特征性强、方法简便等特点,可用于芩百清肺浓缩丸的质量评价。

[关键词] 芩百清肺浓缩丸;紫外/蒸发光散射检测器;指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0084-04

Fingerprinting Analysis of Qinbaiqingfeinongsuo Pills by HPLC with Ultraviolet and Evaporative Light Scattering Detection

HUO Jin-hai, CAO Gui-yang, WANG Wei-ming*

(Heilongjiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150036, China)

[Abstract] **Objective:** Identification and quality evaluation of complex traditional Chinese medicine preparation of Qinbaiqingfeinongsuo Pills were carried out by HPLC fingerprint analysis. **Method:** UV-ELSD fingerprint of Qinbaiqingfeinongsuo Pills was conducted with Zorbax column and non-linear elution with the mobile phase consisted of acetonitrile-1.5% glacial acetic acid and detective wavelength was set at 280 nm. **Result:** Components of Qinbaiqing feinongsuo Pills were separated completely in the chromatographic condition. The standard fingerprint consisted 10 co-possessing peaks. **Conclusion:** The established HPLC fingerprint represents the whole character of Qinbaiqingfeinongsuo Pills. The method is found to be simple and accurate which enhanced the specialty for control and assessment of the product quality.

[Key words] Qinbaiqingfeinongsuo Pills; UV/ELSD; chromatographic fingerprint

芩百清肺浓缩丸为黑龙江省中医研究院自主研发(专利号 ZL 03 1 02049.6),SFDA 批准的第一个用于临床研究的治疗支原体肺炎中药新药。目前已在 8 家 GCP 临床观察基地历时 6 年完成了临床研

究,结果表明芩百清肺浓缩丸对儿童支原体肺炎具有较好的治疗作用。

芩百清肺浓缩丸是由黄芩、百部等 6 味中药组成的复方制剂,化学成分十分复杂,很难通过一种或几种成分含量控制来反映其质量。中药指纹图谱作为中药这一复杂样品体系质控的技术手段,能全面反映中药内在化学成分的种类、数量、分布比例及其整体含量^[1]。由于芩百清肺浓缩丸中所含百部生物碱、桔梗皂苷、麦冬皂苷等成分无紫外吸收或仅有末端吸收,高效液相色谱-紫外(HPLC-UV)检测方法无法兼顾这些指纹特征^[2]。本实验采用紫外-蒸发光散射检测器(UV-ELSD)联用方法建立了一次色谱条件综合反映芩百清肺浓缩丸主要成分的指纹图谱。利用 ELSD 对绝大多数物质均有响应的特

[收稿日期] 20120405(012)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2010ZX09101-104);黑龙江省青年基金(QC2011C114)

[第一作者] 霍金海,硕士,助理研究员,从事中药制剂分析及质量标准研究, Tel: 045155665478, E-mail: jinhaihuo@126.com

[通讯作者] *王伟明,博士,研究员,从事中药新药研究, Tel: 045155665478, E-mail: zyyjy@163.com

点,表征复方中大部分组分群。

1 仪器与试剂

1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),2000ES 型蒸发光检测器(美国 Alltech 公司),Diamonsil 钻石 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),Shiseido C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),KQ-300DB 型数控超声仪(昆山市超声仪器有限公司),RE-52 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),BP211D 型电子天平(德国 Sartorius 公司),中药色谱指纹图谱相似度评价系统(国家药典委员会 2004A 版)。

乙腈、甲醇、冰乙酸为色谱纯;水为自制超纯水;其余试剂为分析纯。

黄芩苷对照品由中国药品生物制品检定所提供(批号 715-200111,供含量测定用);芩百清肺浓缩丸及单味药材、阴性供试品由黑龙江中医研究院中药所制备,药材购于安徽沪淮中药科技有限公司(生产许可证皖 Y20050027),经王伟明研究员鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Diamonsil 钻石 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-1.5% 冰乙酸水溶液(B),采用线性洗脱程序:0 ~ 60 min, 0% ~ 30% A; 60 ~ 75 min, 30% ~ 46% A; 75 ~ 80 min, 46% ~ 70% A; 80 ~ 90 min, 70% ~ 100% A,柱温 30 °C,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μL,紫外检测波长 280 nm,蒸发光检测器漂移管温度 110 °C,载气流速 1.0 L·min⁻¹,不分流模式;记录时间 90 min。

2.2 对照品溶液及供试品溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取黄芩苷对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 66 μg 的溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取芩百清肺浓缩丸 3 g,加水 10 mL,超声使溶解,缓慢加入 95% 乙醇 30 mL,并不断搅拌,4 °C 醇沉过夜,滤过,残渣分别加 95% 乙醇 10 mL 洗涤,合并滤液,减压挥干溶剂,残渣加甲醇溶解并定容至 10 mL,过 0.45 μm 微孔滤膜,作为供试品溶液。

2.3 方法学考察 精密度试验:取同一份供试品溶液,连续进样 6 次,结果直观观察指纹图谱的全貌无明显变化,各相对保留时间及共有峰相对峰面积的 RSD 均 < 2%,表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一份供试品溶液,每 6 h 进样分析,结果直观观察指纹图谱的全貌无明显变化,各

相对保留时间及共有峰相对峰面积的 RSD 均 > 2%。表明样品在 24 h 内稳定性良好。

重复性试验:取同一批号的供试品 5 份,分别测定 HPLC 图,结果直观观察指纹图谱的全貌无明显变化,各相对保留时间及共有峰相对峰面积的 RSD < 2%,表明方法重复性良好。

3 结果与分析

3.1 指纹图谱的测定 芩百清肺浓缩丸供试品溶液 10 批,液相色谱仪自动进样 10 μL 进行分析,记录 90 min 的色谱图(图 1 ~ 2)。以黄芩苷色谱峰(8 号峰)的保留时间为 1,计算相对保留时间。

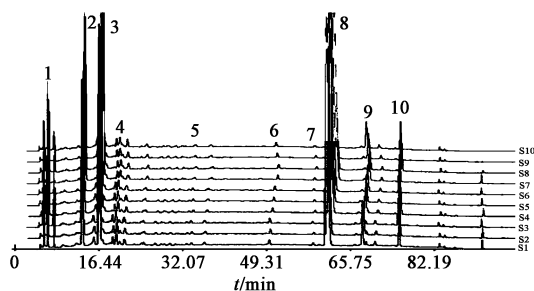


图 1 芩百清肺浓缩丸指纹图谱(DAD)

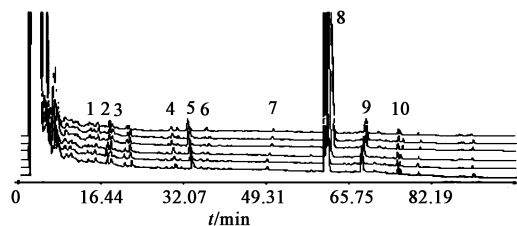


图 2 芩百清肺浓缩丸指纹图谱(ELSD)

3.2 指纹图谱相似度计算 选取色谱图中的十强峰,由色谱工作站辅助自动进行峰匹配,确定共有指纹峰 10 个,其中包括作为参照物的黄芩苷色谱峰(图 1 ~ 2 中的峰 8)。利用“相关系数”法和“夹角余弦”法计算指纹图谱的相似度,结果见表 1 ~ 2。2 种方法计算的相似度结果均 > 0.95,说明该方法可行,所建立的指纹图谱可全面控制芩百清肺浓缩丸质量。

3.3 指纹图谱中主要色谱峰的组成药味归属 在相同色谱条件下,测定了各单味药材、阴性对照组及全方各供试品的指纹图谱,通过对全方与各组成药味的阳性和阴性对照组指纹图谱中各峰相对保留时间的比较分析,归属了 10 个特征共有峰,结果表明:紫外指纹图谱谱中 1,2,3 号峰由百部、麦冬、桔梗、紫菀共同产生。4 号峰来源于桔梗,5 号峰来源于百部,6 号峰来源于桔梗,7 号峰来源于地龙,8,9,10 号峰来源于黄芩;蒸发光指纹图谱中 1,2,3 号峰

表 1 芩百清肺浓缩丸指纹图谱 (UV) 共有指纹峰相对峰面积及相似度

No.	相对峰面积									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.011 5	0.011 6	0.011 4	0.011 4	0.010 3	0.011 7	0.009 7	0.011 4	0.011 2	0.011 9
2	0.249 1	0.243 7	0.242 6	0.241 7	0.235 7	0.237 6	0.218 9	0.219 4	0.217 6	0.238 0
3	0.534 9	0.522 7	0.517 6	0.507 1	0.490 1	0.476 7	0.455 0	0.472 0	0.455 0	0.525 8
4	0.013 1	0.012 4	0.012 3	0.012 3	0.012 1	0.011 4	0.010 1	0.010 2	0.011 2	0.011 5
5	0.005 7	0.005 6	0.005 6	0.005 4	0.005 0	0.004 5	0.004 1	0.004 4	0.004 4	0.005 4
6	0.008 7	0.009 2	0.009 2	0.009 2	0.007 8	0.008 1	0.008 4	0.008 2	0.008 2	0.009 0
7	0.004 8	0.004 7	0.004 8	0.004 6	0.004 9	0.004 9	0.004 3	0.005 1	0.005 1	0.005 2
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	0.053 7	0.048 7	0.045 0	0.060 1	0.059 1	0.056 9	0.047 5	0.056 3	0.056 3	0.061 8
10	0.047 6	0.046 6	0.046 3	0.046 1	0.045 0	0.043 9	0.041 4	0.041 4	0.042 8	0.046 0
相关系数	0.999 4	0.999 7	0.999 8	0.999 9	0.999 9	0.999 9	0.999 3	0.999 7	0.999 3	0.999 7
夹角余弦	0.999 5	0.999 7	0.999 8	0.999 9	0.999 9	0.999 9	0.999 4	0.999 8	0.999 4	0.999 7

表 2 芩百清肺浓缩丸指纹图谱 (ELSD) 共有指纹峰相对峰面积及相似度

No.	相对峰面积									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.014 0	0.014 3	0.014 4	0.018 2	0.014 5	0.014 3	0.014 3	0.013 7	0.014 6	0.014 0
2	0.021 1	0.021 1	0.021 1	0.025 9	0.021 4	0.021 0	0.024 4	0.021 4	0.021 6	0.021 1
3	0.022 3	0.024 5	0.021 2	0.025 2	0.022 0	0.023 5	0.021 2	0.021 6	0.021 3	0.021 6
4	0.013 3	0.013 2	0.013 1	0.012 0	0.015 2	0.013 3	0.013 1	0.011 1	0.013 0	0.013 3
5	0.049 1	0.047 4	0.048 2	0.048 0	0.047 2	0.044 3	0.047 5	0.048 8	0.049 5	0.047 3
6	0.011 9	0.012 8	0.011 9	0.011 9	0.013 9	0.011 9	0.010 6	0.011 9	0.014 9	0.011 9
7	0.019 7	0.019 8	0.015 2	0.020 1	0.020 1	0.019 0	0.019 2	0.019 9	0.019 3	0.019 0
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	0.060 0	0.062 3	0.063 2	0.061 7	0.062 3	0.062 3	0.062 6	0.061 0	0.062 7	0.064 5
10	0.011 0	0.010 8	0.010 9	0.010 9	0.011 0	0.010 8	0.010 8	0.011 7	0.010 8	0.011 0
相关系数	0.999 2	0.999 6	0.999 3	0.999 5	0.999 4	0.999 2	0.999 3	0.999 1	0.999 7	0.999 7
夹角余弦	0.999 4	0.999 9	0.999 5	0.999 6	0.999 8	0.999 6	0.999 4	0.999 5	0.999 8	0.999 9

来源于地龙。4 号峰来源于麦冬,5,6 号峰来源于百部,7 号峰号峰来源于桔梗,8,9,10 号峰来源于黄芩。

4 讨论

4.1 提取溶剂的选择 以尽可能多体现芩百清肺浓缩丸中主要成分为原则,考察了 50% 甲醇、甲醇、正丁醇超声提取效果,以 50% 甲醇指纹图谱响应峰最多。但在实验过程中发现样品中含有大量多糖、黏液质类成分,黏度较大,过滤困难,峰型不好。进

一步选用乙醇沉淀法制备样品,色谱峰较多、分离度较好。

4.2 流动相的选择 对多种流动相系统进行了选择,甲醇-水,乙腈-水,乙腈-1.5% 冰乙酸。由于醇-水系统的热力学和可压缩性等因素,在梯度洗脱时容易导致基线漂移,部分色谱峰拖尾。乙腈相对较好,加酸后所得色谱峰数目多(黄芩苷在 60 min 左右有明显的吸收峰),峰形好。

4.3 检测波长的选择 采用二极管阵列检测器,在

分析时进行全波长紫外扫描,并在不同波长下获取数据,经比较后表明,280 nm 色谱图峰形最好,出峰数目适中,各色谱峰相互之间分离度较好,故检测波长定为 280 nm。

4.4 ELSD 参数优化 考察了分流、不分流两种模式对各成分响应的影响。结果表明:分流后 ELSD 响应大大降低,检测灵敏度无法满足指纹图谱检测要求,故选择不分流模式。

4.5 漂移管温度选择 考察了 90,100,110 °C 漂移管温度对峰响应值的影响,结果温度升高,ELSD 的响应也随之稍有增大。为保证高水相流动相的蒸发,选择 110 °C 为漂移管温度。

4.6 雾化气体流速的选择 考察了 1.0,2.0,2.5 L·min⁻¹ 雾化气体流速对响应的影响,结果表明,随着氮气流速的降低,ELSD 的响应增高,特别是保留时间在 20~50 min 色谱峰响应增高明显。这是因为雾化气体流速越小,雾化产生的气溶胶液滴越大,气溶胶中流动相被蒸发后生成的物质粒子越大,对激光的散射能力越强,响应越高。因此选择 1.0 L·min⁻¹ 为最终条件。

4.7 参照物的选择 保留时间为 60.2 min 左右的色谱峰(见图 1,2)是 HPLC 图谱中峰面积较大、出峰时间适中且很稳定的一个峰,经对照品对照认定为黄芩苷的吸收峰,故选择黄芩苷作为参照物。

本研究采用 DAD-ELSD 串联检测方式建立了芩百清肺浓缩丸指纹图谱,方法学验证表明该方法具良好重复性,符合指纹图谱测定要求。运用国家药典委员会主持研制开发的相似度计算软件对不同批次的样品指纹图谱进行相似度评价,结果相似度良好。可用于其所含成分的定性及定量分析,为该产品提供了有效的质量控制方法。并通过单味药

材、各单味药材阴性对照组、对照品与全方指纹图谱的比较研究,将全方的 10 个共有峰进行了归属分析。从而为深入研究芩百清肺浓缩丸的药效物质基础、配伍机制提供分析方法。

[参考文献]

- [1] 周玉新. 中药指纹图谱技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.
- [2] 梁生旺. 中药制剂分析[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003.
- [3] 魏清芳, 王嘉林. 木香顺气丸甲醇提取物的 HPLC 指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 110.
- [4] 覃洁萍, 姚蓉, 李耀华. 复方扶芳藤制剂正丁醇部位 HPLC-ELSD 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 72.
- [5] 邵青, 程翼宇. 复方丹参提取物高效液相色谱-紫外-蒸发光散射检测指纹图谱的建立[J]. 分析化学, 2006, 34(6): 863.
- [6] 李文兰, 孙志, 程斌, 等. 金匱肾气丸的紫外光谱-质谱/质谱研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(8): 1914.
- [7] 王宗权, 贾继明, 宋剑. 不同产地黄芪 HPLC-ELSD 指纹图谱的研究[J]. 中医药学报, 2010, 38(2): 91.
- [8] 赵敬堃, 王德生, 段淑荣, 等. 复智散 HPLC-UV/ELSD 指纹图谱的研究[J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(12): 1830.
- [9] 曹进, 徐燕, 张永知, 等. 清开灵注射液 HPLC/ELSD 指纹图谱建立及质量相关性研究[J]. 分析化学, 2004, 32(4): 469.
- [10] 李文兰, 于莹莹, 赵稷, 等. 金匱肾气丸总苷类成分 HPLC-DAD-ELSD 指纹图谱的建立[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(3): 968.

[责任编辑 顾雪竹]