

中药复方卵泡方的 HPLC 指纹图谱

★ 张金强^{1*} 黄慧莲² 果德安² 毕开顺¹ (1. 沈阳药科大学中药学院 沈阳 110016; 2. 中国科学院上海药物所 中药现代化研究中心 上海 201203)

摘要:目的:建立中药复方卵泡方的 HPLC 指纹图谱。方法:色谱柱:Agilent Zorbax C₁₈ 柱(250 mm×4.6 μm, 5 μm);流动相:乙腈-0.5%冰醋酸;洗脱方式:线性梯度洗脱;柱温:30℃;流速:1.0 mL/min⁻¹;检测波长:254 nm;进样量:10 μL。结果:建立了卵泡方的对照指纹图谱并确定了 15 个共有峰,各批卵泡方样品与对照指纹图谱相似度均在 0.938 以上。结论:该方法简便、准确、重现性好,为卵泡方的质量控制提供了依据。

关键词:卵泡方;高效液相色谱法;指纹图谱;质量控制

中图分类号:R 917 **文献标识码:**A

Chromatographic Fingerprint of Luanpao Prescription by HPLC

ZHANG Jin-qiang¹, HUANG Hui-lian², GUO De-an², BI Kai-shun¹

¹ Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016

² Shanghai Research Center for Modernization of Traditional Chinese Medicine, Shanghai Institute of Materia Medica, Shanghai Institute for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203

Abstract: Objective: Chromatographic fingerprint analysis was established for the quality control of Luanpao Prescription (LPP). Methods: HPLC-UV fingerprint of LPP was developed with Zorbax SB C₁₈ column and a simple linear gradient elution with the mobile phase consisted of acetonitrile-0.5% glacial acetic acid. The flow rate was set at 1.0 mL/min and the column temperature was kept at 30℃. The eluent was detected at 254 nm. The LC/MS method was applied for the identification of peaks in chromatographic fingerprint. Results: Fingerprint consisted of 15 common characteristic peaks in 10 different batches of normal samples. The similarity of CFP of 10 samples was over 0.938. Conclusion: The HPLC analysis of chromatography fingerprint could comprehensively control the quality of the formula.

Key words: Luanpao Prescription; HPLC; Chromatographic fingerprint; Quality control

卵泡方临床用来治疗妇女不孕,由黄芩、大黄、淫羊藿等十三味中药组成。作者采用 HPLC 法研究了卵泡方化学成分的指纹图谱,并应用 LC/MS 分析技术对共有峰进行鉴定,其中 12 个色谱峰保留时间、紫外光谱和 MS/MS² 质谱与对照品分别对应确证。考察了各组成药对方成分的贡献,通过对组方中单味药与复方指纹图谱的比较,可以发现没有

明显的新成分的产生,复方的主要成分都可以在单味药中找到出处。其中,黄芩、淫羊藿、大黄、山茱萸和知母对方指纹峰贡献较多。

1 仪器与材料

高效液相色谱仪:Agilent 1100 高效液相色谱仪(Agilent Technologies, Germany),配有四元泵、真空脱气机、自动进样器、二极管阵列检测器。TSQ 三级

* 作者简介:张金强(1978-),男,满族,辽宁丹东人,在读博士,主要从事中药质量控制研究,E-mail: bonezhjq2002@163.com

四极杆(ThermoFinnigan, San Jose, CA)通过电喷雾电离源(ESI)与 Agilent 1100 液相色谱仪相连接。

B3500S-DTH 超声仪(上海必能信仪器有限公司);

N-1000 型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司);

BT 25S 型 Sartorius 电子天平(德国 Sartorius 公司)。

原儿茶酸、莫诺苷、马钱素、芒果苷、阿魏酸、黄芩苷、淫羊藿苷、汉黄芩苷、黄芩素、大黄酸、汉黄芩素、千层纸素 A、大黄素、大黄酚等对照品为作者由卵泡方中分离得到,纯度经 HPLC 检验均大于 98%;乙腈为色谱纯(Burdick&Jackson, Honeywell International Inc., USA);乙酸为色谱纯(TEDIA, TEDIA COMPANY, INC., USA);其他试剂为分析纯(国药集团化学试剂有限公司);纯净水由 Milli-Q 纯水制备系统制备。卵泡方样品由绿谷制药有限公司提供,批次:041002, 042121, 060710, 060814, 060902, 060903, 060904, 060905, 060906, 060923。

2 方法与结果

2.1 液相色谱条件 Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)(Palo Alto, CA, USA);

Zorbax SB-C₁₈ 保护柱(20 mm × 4 mm, 5 μm)(Palo Alto, CA, USA);

流动相:(A)乙腈-(B)0.5%冰醋酸水溶液梯度洗脱。0~20 min:A 8%升至 12%,B 92%降至 88%;20~40 min:A 12%升至 20%,B 88%降至 80%;40~66 min:A 20%升至 30%,B 80%降至 70%;66~90 min:A 30%升至 44%,B 70%降至 56%;90~100 min:A 44%升至 92%,B 56%降至 8%;100~104 min:A 92%,B 8%等度洗脱;

流速:1.0 ml/min;

检测波长:254 nm;

进样量:10 μl;

柱温:30 ℃。

2.2 质谱条件 ESI 源:正、负离子检测;

扫描范围:m/z 50~1500;

鞘气(N₂):40 u;

辅助气(N₂):5 u;

毛细管温度:350 ℃;

喷雾电压:4 400 V。

2.3 供试品溶液的制备 取卵泡方粉末 0.1 g,精密称定,置于 50 ml 具塞三角瓶中,精密加入 25.00 ml 75% 甲醇,称重,超声提取 45 min,冷却至室温,补足失重,0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。

2.4 对照品溶液的制备 分别精密称取各标准品适量,置量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 取卵泡方粉末(041002)0.1 g,精密称定,按“供试品溶液的制备”项下操作制备供试品溶液,在上述色谱条件下重复进样 6 次,记录指纹图谱。将所得数据采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)”软件进行处理,相似度为 1.000,相对峰面积 RSD 小于 3.9%。

2.5.2 重现性试验 取卵泡方粉末(041002)0.1 g,6 份,精密称定,按“供试品溶液的制备”项下操作制备供试品溶液,在上述色谱条件下进样 HPLC 分析,记录指纹图谱。将所得数据采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)”软件进行处理,相似度高于 0.996;相对峰面积 RSD 小于 4.7%。

2.5.3 稳定性试验 按“供试品溶液的制备”项下操作制备供试品溶液,在上述色谱条件下分别于 0、2、6、8、12 h 进样 5 次,记录指纹图谱。将所得数据采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)”软件进行处理,相似度高于 0.999;相对峰面积 RSD 小于 4.4%。

2.6 卵泡方指纹图谱建立及相似度

2.6.1 指纹图谱的建立 取 10 批不同批次的卵泡方样品,按“2.3”方法制备供试品,取卵泡方供试品溶液 10 μl 进样,按照高效液相色谱法测定,记录 104 min 的色谱图。比较各批供试品的色谱图,确定了 15 个共有峰,以 6 号峰(黄芩苷)为内参比峰,计算其它共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积。色谱图见图 1。10 批次样品中 15 个共有指纹峰占总峰面积的 68% 以上。

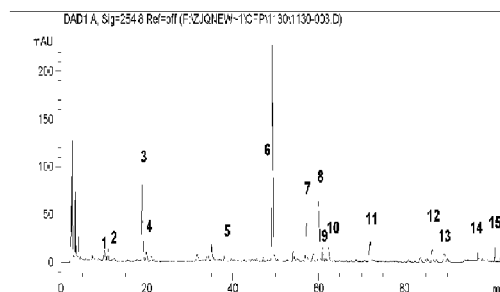


图 1 卵泡方 HPLC 指纹图谱

注:2 = Morroside; 3 = Mangiferin; 4 = Loganin; 5 = Chrysin-6-C- α -L-arabinopyranosyl-8-C- β -D-glucopyranoside; 6 = Baicalin; 7 = Oroxylin-A-glycoside; 8 = Wogonoside; 9 = Epimedin C; 10 = Icarin; 11 = Baicalein; 12 = Wogonin; 13 = Oroxylin A

2.6.2 相似度计算 所得数据采用国家药典委员

会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)”软件进行处理,获得卵泡方的标准指纹图谱,色谱指纹图谱经软件生成可反映药品质量的对照图谱,以此为基准,计算样本图谱与对照图谱的相似度,对卵泡方质量进行评价。10 批样品指纹图谱与对照图谱比较,相似度均高于 0.938。

3 讨论

中药质量控制是中医药现代化过程中的关键环节,加强质量标准研究,建立起符合中医药理论和中药特点的质量标准体系非常重要。由于中药是多成分、多靶点、多环节在起作用,因此,传统的单一成分的线性质量控制模式,不能适应全面地控制中药质量的要求,有必要建立起能系统全面的控制中药质量的非线性质量控制模式。而在这个过程中,中药指纹图谱技术起到了非常重要的作用,而且是中药质量控制的发展趋势^[1~3]。

卵泡方中含有多类成分且极性范围跨度较大,故采用梯度洗脱;其中蒽醌类,黄酮类,有机酸类等成分含有羟基或羧基,呈较强的酸性,为防止色谱峰拖尾,故使用酸性缓冲系统。为得到较好的分离度和重现性,考察了甲醇-醋酸,甲醇-磷酸,乙腈-醋酸,乙腈-磷酸等系统。结果显示甲醇-酸系统色谱峰较宽,分离度差,分析时间较长时基线有较明显的漂移;而乙腈-酸系统都具有较好的分离度和重现性,乙腈-醋酸系统的基线更为稳定,故选择乙腈-0.5%冰醋酸系统为 HPLC 和 LC/MS 分析的流动相。

结合文献对卵泡方中各药材中所含成分紫外最大吸收波长的报道,采用二极管阵列检测器对卵泡方中的成分的紫外吸收波长进行了考察,结果表明,254 nm 处的色谱峰信息最全面,色谱图的特征性最强,因此选择 254 nm 为检测波长。

应用 LC/MS 的分析结果对卵泡方中的 15 个特征峰进行鉴定。其中 12 个色谱峰保留时间(t_R)、紫外光谱(UV)和 MS/MS2 质谱与对照品分别对应确证:2 号峰为 morroniside ($t_R = 10.9\text{min}$); 3 号峰为 mangiferin ($t_R = 18.9\text{min}$), 4 号峰为 loganin ($t_R = 19.1\text{min}$); 5 号峰为 Chrysin-6-C- α -L-arabinopyranosyl-8-C- β -D-glucopyranoside ($t_R = 38.0\text{min}$); 6 号峰为 baicalin ($t_R = 49.2\text{min}$); 7 号峰为 oroxylin-A-glycoside ($t_R = 57.2\text{min}$); 8 号峰为 wogonoside ($t_R = 60.0\text{min}$); 9 号峰为 epimedin B ($t_R = 61.0\text{min}$); 10 号峰为 icariin ($t_R = 62.4\text{min}$); 11 号峰为 baicalein ($t_R = 72.0\text{min}$); 12 号峰为 wogonin ($t_R = 86.5\text{min}$); 13 号峰为 oroxylin A ($t_R = 89.2\text{min}$)。

参考文献

- [1] 果德安. 中药指纹图谱技术已成为中药质量控制研究国际趋势—中医药现代化国际科技大会参会感[J]. 中成药, 2003, 25(7): 附3-附4.
- [2] 任德全. 中药质量控制的里程碑—中药指纹图谱[J]. 2001, 23(1): 1-2.
- [3] 谢培山. 刍议中药指纹图谱的现状、发展和问题[J]. 中药材, 2007, 30(3): 257-259.

(收稿日期:2008-03-28)

《中医的现在与未来》征订启示

由我国著名中医基础理论学者、天津市精粹国医经验研究所所长张维耀编著的《中医的现在与未来》(第二版)已由天津科学技术出版社出版。全书 100 万字,分为九章:1. 命运攸关的抉择;2. 试评中医经典著作;3. 中医理论体系的形成;4. 理论核心的演变;5. 脏象学说的实质;6. 中医系统论假说;7. 中西医结合是里程碑;8. 中医现代化方向;9. 人才决定现代化的成败。

2006 年 6 月 10 日,《人民日报》海外版撰文评论此书,认为该书“具有里程碑的意义,是因为它具备了三个条件:其一,该书对经典中医学理论体系的形成作出了整体性的规范;其二,确定了现代中医学门类应该具备的要素和经典中医学的根本区别;其三,阐明了由中医学基本概念构成的现代中医基本原理和假说。该书系统介绍了经典中医学规范体系和未来发展方向,论述严谨,证明有据,剖析深入。”所以说此书是中医学发展史上里程碑式的著作,是经典中医学和现代中医学的分水岭,对当前中医学、中西医结合研究中的不规范和误区,提出了极具参考价值的论点,在当前发扬中医学还是废弃中医学的大讨论中有较大的指导意义。

该书是中医学、中西医结合研究者,中、高级中医师,各级管理人员的必读之书。定价:185 元,求购册数较多可优惠,书到后付款。联系地址:天津市南开区黄河道 467 号博爱门诊;邮编:300110;电话:02227641818;联系人:张子超,胡雯,张晓芳。