

- [3] 陈彦, 贾晓斌, Hu M, 等. Caco-2 细胞单层研究淫羊藿黄酮类成分的吸收转运[J]. 中草药, 2009, 40(2): 220-224.
- [4] Chen Y, Wang J, Jia X, et al. Role of intestinal hydrolase in the absorption of prenylated flavonoids present in Yinyanghuo [J]. *Molecules*, 2011, 16(2): 1336-1348.
- [5] 陈彦, 谭晓斌, 范晨怡, 等. 大鼠在体肠灌流模型研究淫羊藿不同黄酮苷的吸收代谢[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(22): 2928-2931.
- [6] Corporation H P. Kinetic characterization and effect of immobilized thermostable β -glucosidase in alginate gel beads on sugarcane juice[J]. *ISRN Biochemistry*, 2014, 2014: 178498.
- [7] Tsai C T, Meyer A S. Enzymatic cellulose hydrolysis: enzyme reusability and visualization of β -glucosidase immobilized in calcium alginate[J]. *Molecules*, 2014, 19(12): 19390-19406.
- [8] Zhou J, Chen Y, Wang Y, et al. A comparative study on the metabolism of *Epimedium koreanum* Nakai-prenylated flavonoids in rats by an intestinal enzyme (lactase phlorizin hydrolase) and intestinal flora[J]. *Molecules*, 2013, 19(1): 177-203.
- [9] Zhang X, Guan R F, Wu D Q, et al. Enzyme immobilization on amino-functionalized mesostructured cellular foam surfaces, characterization and catalytic properties[J]. *J Mol Catal B-Enzym*, 2005, 33(1): 43-50.
- [10] Khoshnevisan K, Bordbar A K, Zare D, et al. Immobilization of cellulase enzyme on superparamagnetic nanoparticles and determination of its activity and stability[J]. *Chem Eng J*, 2011, 171(2): 669-673.
- [11] 于兆慧, 刘其媛, 崔莉, 等. 微球固定化蜗牛酶转化人参皂苷 Rb₁ 制备人参稀有皂苷 Compound K 研究[J]. 中草药, 2014, 45(21): 3092-3097.
- [12] Ruan G H, Wei M P, Chen Z Y, et al. Novel regenerative large-volume immobilized enzyme reactor: preparation, characterization and application[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2014, 967: 13-20.
- [13] 李彦锋, 李军荣, 伏莲娣. 固定化酶的制备及应用[J]. 高分子通报, 2009(2): 13-17.
- [14] Zheng P, Wang J, Lu C, et al. Immobilized β -glucosidase on magnetic chitosan microspheres for hydrolysis of straw cellulose [J]. *Process Biochem*, 2013, 48(4): 683-687.

强力天麻杜仲胶囊的 HPLC 特征图谱

张锦^{1,2}, 刘俊宏^{1,2}, 赵珊^{1,3}, 王爱民^{1,2}, 李霞⁴, 何迅^{1,3*}, 李勇军^{1,3*}

(1. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州省药物制剂重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 3. 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵州 贵阳 550004; 4. 贵州宏宇药业有限公司, 贵州 贵阳 550018)

摘要: 目的 建立强力天麻杜仲胶囊(天麻、杜仲、独活等)的 HPLC 特征图谱。方法 强力天麻杜仲胶囊 70% 乙醇提取液的分析采用 Cortecstm C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 2.7 μ m); 流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液, 梯度洗脱; 体积流量 0.5 mL/min; 柱温 40 $^{\circ}$ C; 检测波长 220 nm。结果 该药物碱性、酸性乙酸乙酯部位的 HPLC 特征图谱分别有 28 个和 18 个共有峰, 鉴定出 3 个(天麻素、紫花前胡苷、7-羟基香豆素)和 4 个(没食子酸、原儿茶酸、绿原酸、紫云英苷)色谱峰, 10 批样品特征图谱相似度为 0.85 ~ 0.99。结论 该方法准确可靠, 可用于强力天麻杜仲胶囊的质量控制。

关键词: 强力天麻杜仲胶囊; 特征图谱; HPLC

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)09-1990-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.09.024

Characteristic HPLC chromatograms of Qiangli Tianmaduzhong Capsules

收稿日期: 2015-12-26

基金项目: 贵州省科技厅项目(20126009, 20134001); 贵州省卫生厅项目(gzwbkj2013-1-131); 科技支撑计划项目(2013BAI11B01)

作者简介: 张锦(1991—), 女, 硕士生, 从事中药、民族药的质量控制研究工作。E-mail: 1208552141@qq.com

* 通信作者: 何迅(1969—), 男, 教授, 从事中药新药制备工艺及质量标准研究。Tel: (0851) 6908468, E-mail: 2812878586@qq.com

李勇军(1973—), 男, 教授, 从事中药药效物质基础及质量标准研究。Tel: (0851) 6908468, E-mail: liyongjun@

ZHANG Jin^{1,2}, LIU Jun-hong^{1,2}, ZHAO Shan^{1,3}, WANG Ai-min^{1,2}, LI Xia⁴, HE Xun^{1,3*},
LI Yong-jun^{1,3*}

(1. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, Guiyang 550004, China; 3. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Guiyang 550004, China; 4. Guizhou Hongyu Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550018, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish the characteristic HPLC chromatograms of Qiangli Tianmaduzhong Capsules (*Gastrodiae Rhizoma*, *Eucommiae Cortex*, *Angelicae Pubescentis Radix*, etc.). **METHODS** The analysis of Qiangli Tianmaduzhong Capsules 70% ethanolic extract was carried out on a Cortecstm C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 2.7 μm), mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution in a gradient elution manner, flow rate was 0.5 mL/min, column temperature was maintained at 40 °C, and detection wavelength was set at 220 nm. **RESULTS** There were twenty-eight and eighteen common peaks in the characteristic HPLC chromatograms of alkaline ethyl acetate and acid ethyl acetate extracts of this drug, then three (gastrodin, nodakenin, 7-hydroxycoumarinand) and four (gallic acid, protocatechuate, chlorogenic acid, astragalin) chromatographic peaks were identified, respectively. The similarities of characteristic chromatograms of ten batches of samples were 0.85–0.99. **CONCLUSION** This accurate and reliable method can be used for the quality control of Qiangli Tianmaduzhong Capsules.

KEY WORDS: Qiangli Tianmaduzhong Capsules; characteristic chromatograms; HPLC

强力天麻杜仲胶囊由天麻、杜仲(盐制)、制草乌、附子(制)、独活、藁本、玄参、当归、地黄、川牛膝、槲寄生、羌活 12 味中药制备而成,具有散风活血,舒筋止痛的功效,用于中风引起的筋脉掣痛、肢体麻木、腰腿酸痛、头痛头昏等症^[1]。由于中药复方制剂药味多,成分复杂,故部分成分含有量的测定不能全面控制其质量,而中药特征图谱是一种综合、量化的质量控制手段,能够较好地反映中药复杂的化学成分,是一种理想的色谱鉴别方法^[2,4]。目前,尚无关于强力天麻杜仲胶囊特征图谱的研究报道,本实验收集了 10 批样品,参考文献 [5-12],建立了其特征图谱,可用于该药物的鉴别和质量控制。

1 仪器与材料

UltiMate 3000 型高效液相色谱仪,配置系统控制器、输液泵、脱气组件、低压梯度组件、自动进样器、柱温箱、温控样品室、UV-DAD 检测器、Chromleon 色谱数据工作站(美国戴安公司); AE 240 型电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司); CQ-250A-ST 型超声波清洗器(上海跃进医用光学器械厂);超纯水机(四川沃特尔科技发展有限公司)。

强力天麻杜仲胶囊 10 批(批号 11254011、11254018、12254001、12254002、13254001、13254003、14254001、14254002、14254004、14254006,编号 S1~S10)由贵州宏宇药业有限公

司提供。绿原酸(110753-201415)、天麻素(110807-201306)对照品购自中国食品药品检定研究院;紫花前胡苷、7-羟基香豆素、原儿茶酸、紫云英苷、没食子酸为本课题组从强力天麻杜仲胶囊中分离获得,光谱鉴定其结构,HPLC 峰面积归一化法测得其含有量均大于 98%。

乙酸乙酯为分析纯(上海申博化工有限公司);甲醇、乙醇为分析纯(上海振兴化工一厂);乙腈为色谱纯(韩国 SK 化工株式会社);盐酸为分析纯(重庆川东有限公司);氨水为分析纯(重庆江川化工有限公司);水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 吸取绿原酸(1.000 mg/mL)、天麻素(0.998 mg/mL)、紫花前胡苷(0.997 mg/mL)、7-羟基香豆素(1.000 mg/mL)、原儿茶酸(0.974 mg/mL)、紫云英苷(1.003 mg/mL)、没食子酸(1.004 mg/mL)各 0.2 mL,置于 5 mL 量瓶中,70% 甲醇稀释至刻度,即得。

2.2 供试品溶液的制备 精密称取胶囊内容物 1 g,置于磨口烧瓶中,精密加入 70% 乙醇 30 mL,称定质量,水浴回流 2 h,放冷,70% 乙醇补足缺失的质量,混匀,滤过,少量 70% 乙醇洗涤,合并滤液和洗涤液,蒸至近干,残渣加 15 mL 水溶解,石油醚萃取 3 次,每次 10 mL,弃去石油醚层,水层用氨水调 pH 至 11~12,乙酸乙酯萃取 4 次,每次 10 mL,合并乙酸乙酯层,蒸干,得碱性

乙酸乙酯部位 (A 部位)。水层用稀盐酸调 pH 至 1~2, 乙酸乙酯萃取 4 次, 每次 10 mL, 合并乙酸乙酯层, 蒸干, 得酸性乙酸乙酯部位 (B 部位)。将 A、B 部位残留物用 70% 甲醇溶解定容至 2 mL, 摇匀, 高速离心 10 min (10 000 r/min), 取上清液, 即得。

2.3 色谱条件 Cortecstm C₁₈ 色谱柱 (2.7 μm, 4.6 mm × 150 mm); 流动相乙腈-0.1% 磷酸水, 梯度洗脱 (程序见表 1); 进样量 5 μL; 体积流量 0.5 mL/min; 检测波长 220 nm; 柱温 40 °C。

表 1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution programs

碱性乙酸乙酯部位		酸性乙酸乙酯部位	
时间/min	乙腈/%	时间/min	乙腈/%
0	5	0	5
13	31	18	12
21	31	40	48
22	44	41	95
30	44		
31	95		

2.4 方法学考察

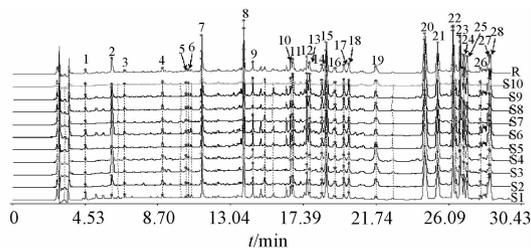
2.4.1 精密度的试验 取胶囊 (批号 13254001) 适量, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 连续进样 6 次, 在“2.3”项下色谱条件进行测定, 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004A)”计算相似度, A 部位以紫花前胡苷 (8 号峰) 为参照峰 (S_A), B 部位以原儿茶酸 (5 号峰) 为参照峰 (S_B)。结果, A、B 部位相似度均在 0.99 以上, 共有峰相对保留时间 RSD 分别为 0.09%、0.08%, 相对峰面积 RSD 分别为 1.98%、1.97%, 表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取胶囊 (批号 13254001) 适量, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.3”项色谱条件下于 0、2、4、6、12、24 h 进样测定。结果, A、B 部位相似度均为 0.99 以上, 共有峰相对保留时间 RSD 分别为 0.88%、1.94%, 相对峰面积 RSD 均为 1.74%, 表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定性良好。

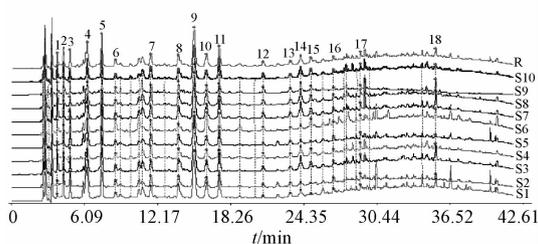
2.4.3 重复性试验 取胶囊 (批号 13254001) 适量, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液 6 份, 在“2.3”项色谱条件下进行测定。结果, A、B 部位相似度均为 0.99 以上, 共有峰相对保留时间 RSD 分别为 0.62%、0.12%, 相对峰面积 RSD 分别为 1.75%、1.89%, 表明该方法重复性良好。

2.5 特征图谱的建立 取 10 批样品, 按“2.2”

项下方法制备供试品溶液, 在“2.3”项色谱条件下测定, 将 A、B 部位数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004A)”, 生成特征图谱, 以其中 1 个批号 (11254011) 样品的色谱图 (S1) 为参照图谱, 通过多点校正和自动匹配, 生成对照特征图谱 R, 见图 1。经分析确定, A 部位的色谱图中有 28 个色谱峰为共有特征峰, 而 B 部位有 18 个。



a. 碱性乙酸乙酯部位 (A 部位)



b. 酸性乙酸乙酯部位 (B 部位)

图 1 HPLC 特征图谱

Fig. 1 Characteristic HPLC chromatograms

2.6 相似度评价 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)”, 对 10 批样品 A、B 部位的特征图谱进行相似度计算, 结果见表 2。

表 2 相似度评价结果

Tab. 2 Results of similarity evaluation

部位	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
A	0.871	0.889	0.963	0.974	0.931	0.919	0.961	0.977	0.983	0.931
B	0.850	0.887	0.967	0.968	0.993	0.966	0.937	0.965	0.965	0.993

2.7 色谱峰归属分析 取胶囊适量, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 取“2.1”项下混合对照品溶液, 在“2.3”项色谱条件下进行测定, 通过各峰保留时间和紫外光谱图对比分析, 确定了部分峰的归属, 具体见图 2。在 A 部位, 指认了 3 个色谱峰, 分别为 1 号峰 (天麻素)、8 号峰 (紫花前胡苷)、9 号峰 (7-羟基香豆素); 在 B 部位, 指认了 4 个色谱峰, 分别为 2 号峰 (没食子酸)、5 号峰 (原儿茶酸)、8 号峰 (绿原酸)、17 号峰 (紫云英苷)。其中, 天麻素来自君药天麻, 紫云

英昔来自臣药杜仲, 紫花前胡昔来自独活, 7-羟基香豆素来自独活、羌活, 而没食子酸、原儿茶酸、绿原酸为多味药材的共有成分。

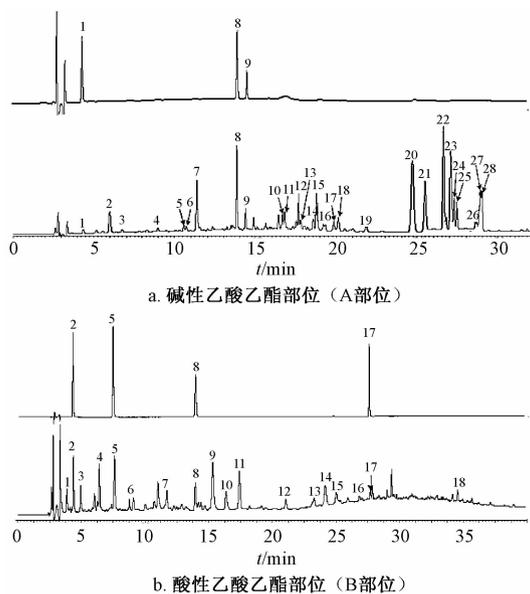


图2 色谱峰归属分析

Fig. 2 Attribution analysis of chromatographic peaks

3 讨论

本实验考察了直接用乙醇、甲醇提取, 提取后挥去醇用乙酸乙酯、正丁醇直接萃取, 调酸后用乙酸乙酯、正丁醇萃取等多种处理方法, 发现存在图谱信息少、峰强度低、分离度差、基线漂移严重等问题。最终发现, 样品用乙醇提取后挥去醇残留物, 水溶解后调酸碱 pH 用乙酸乙酯萃取, 制备得到碱性乙酸乙酯部位 (A 部位) 和酸性乙酸乙酯部位 (B 部位), 两者图谱信息量大、基线平稳、重复性好, 可用于表征强力杜仲天麻胶囊的内在

信息。

应用 DAD 检测器, 对强力杜仲天麻胶囊 A、B 部位进行 200 ~ 400 nm 全波长扫描, 并对各波长下色谱图进行分析比较。为了能较全面地反映制剂内在信息, 根据色谱峰数目、各峰分离度以及峰形, 最终选择 220 nm 作为检测波长。

另外, 还比较了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1% 甲酸水、乙腈-0.1% 磷酸水等流动相, 发现乙腈-0.1% 磷酸水的色谱峰数目较多, 而且分离度、对称性良好, 故选择该流动相进行洗脱。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 卫生部药品标准 (中药成方制剂): 第 16 册[S]. 1998: 170.
- [2] 周莉莉, 王冰, 徐度, 等. 肾石通颗粒 HPLC 特征图谱研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 22(3): 98-101.
- [3] 孙玉雯, 刘起华, 文谨, 等. 益髓生血颗粒特定指纹图谱及特征峰分析[J]. 中成药, 2014, 36(1): 125-130.
- [4] 罗曼, 周兰, 申瑾, 等. 银翘解毒丸特征图谱初步研究[J]. 中成药, 2012, 34(11): 2162-2166.
- [5] 孙汝明, 李翔, 曹红, 等. 感冒清热颗粒 HPLC 特征图谱研究[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(2): 335-339.
- [6] 孙一蕊, 范春林, 王贵阳, 等. 消渴丸 HPLC 特征图谱研究[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(3): 539-546.
- [7] 谢瑞芳, 石志娜, 周昕, 等. 养肝利胆颗粒 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中成药, 2012, 34(2): 188-191.
- [8] 崔佰吉, 张宏梅, 张秀荣. HPLC 指纹图谱对延灯滴丸质量评价的研究[J]. 中成药, 2012, 34(1): 3-7.
- [9] 黄春跃, 杨义芳, 唐博雅, 等. 栀子厚朴汤颗粒指纹图谱与组方药材及其提取物的相关性研究[J]. 中成药, 2013, 35(8): 1720-1723.
- [10] 黄春跃, 杨义芳, 唐博雅, 等. 白头翁汤颗粒剂指纹图谱与组方药材及其提取物的相关性[J]. 中国医药工业杂志, 2013, 44(2): 175-179.
- [11] 王枚博, 毛秀红, 王柯, 等. 麻仁润肠软胶囊特征图谱研究及苦杏仁气相鉴别[J]. 中成药, 2015, 37(6): 1262-1266.
- [12] 高家荣, 吴溪, 韩燕全, 等. 酸枣仁-五味子药对的单煎液、单煎混合液与合煎液 UPLC 特征指纹图谱相关性研究[J]. 中成药, 2013, 35(8): 1001-1005.