[中药指纹图谱]

西青果药材及提取物液相指纹图谱的应用研究

颜玉贞[1], 谢培山[1], 宋力飞[2], 刘乡乡[2], 卢平华[3], 黄晓玲[3]
(1. 广州市药品检验所;(510000) 2. 广州香雪制药有限公司;3. 香港力扬有限公司)

关键词:西青果;提取物;指纹图谱

摘要:**目的**:研究西青果色谱指纹图谱提供完整的质量信息,更有效地监控质量。**方法**:以 A:0.05mol·L^{-1}磷酸溶液/0.05mol·L^{-1}磷酸二氢钾溶液(1:1);B:甲醇;C:醋酸乙酯为流动相,梯度洗脱,建立了诃子、西青果高效液相色谱指纹图谱的基础上,进行了西青果药材、西青果浸膏粉(提取物)及制剂-藏青果含片的色谱指纹图谱的试验研究;**结果**:西青果及其提取物、成品的指纹图谱特征峰由没食子酸、terchebulin、chebulamin,河黎勒酸和诃子酸组成。**结论**:试验研究证明色谱指纹图谱是全程监控生产工艺质量的有效手段。

中图分类号:R284.1 **文献标识码**:A **文章编号**:1001-1528(2004)08-0603-04

Application of chromatographic fingerprint of immature fruits of *Terminalia chebula* and its extracts

YAN Yu-zhen[1], XIE Pei-shan[1], SONG Li-fei[2], LIU Xiang-xiang[2], LU Ping-hua[3], HUANG Xiao-ling[3]
(1. Guangzhou Institute for Drug Control; 2. Guangzhou Xiangxue Pharmaceutical Co., Ltd; Guangzhou, China; 3. Hong Kong Nikyang Enterprises Co., Ltd, Hong Kong, China)

KEY WORDS: immature fruits of *Terminalia chebula*; in-process-quality-control; chromatographic fingerprint

ABSTRACT: AIM: *Terminalia chebula* contained hydrolysable tannins up to about 35%. It was necessary to establish a chromatographic fingerprint to meet the quality control need effectively. **METHODS**: HPLC method was carried out with 3 kinds of the mobile phase, namely, A: 0.05mol·L^{-1} Phosphoric acid/0.05mol·L^{-1} Potassium dihydrogen phosphorate aqueous solution, B: methanol and C: Ethyl acetate, running in gradient mode based on the previous experiment. **RESULTS**: A marked peaks of HPLC fingerprint of the raw material, the extracts and its final product consisted of gallic acid, terchebulin, chebulamin, chebulagic acid and chebulinic acid. **CONCLUSION**: The fact has depicted that chromatographic fingerprint is a powerful tool for in-process-quality supervisory control and dynamic analysis of the active constituents during manufacture procedure of immature fruit products of Terminalia chebula.

西青果为使君子科诃子属植物的幼果,文献报道为诃子(*Terminalia chebula* Retz)[1]或 *T. chebula f. macrocarpa*[2]的幼果,富含可水解鞣质类成分。由于近年来对大分子酚酸类成分的化学及生理活性研究渐多,除抑菌、消炎、清热等作用外,其较强的清除自由基作用逐渐引起人们的注意。又由于大分子酚酸成分的化学不稳定性,对这类药材的质量控制也倍受注意。传统的质量控制指标一般是鉴别和测定其小分子酚酸如没食子酸等,难以反映药材的真实质量。色谱指纹图谱可以较为全面地检测其多种成分在药材中分布的全貌,使药材的内在质量情况可视[2]。本文在建立了诃子、西青果高效液相色谱指纹图谱的基础上[3],进一步进行了西青果药材、西青果浸膏粉(提取物)及制剂-藏青果含片色谱指纹图谱分析及全程监测生产工艺改进,提高产品质量的试验研究。

1 实验材料

1.1 供试样品 西青果药材 14 批(广州市药检所进口药材留样检品)、西青果浸膏粉、"藏青果喉片"各 10 批,由广州香雪制药有限公司提供。

1.2 仪器试剂

仪器:安捷伦 1100 液相色谱仪 + DAD 检测器;色谱柱:Lichrospher 100RP-18(4mm ×125mm 5μm);试剂:磷酸、磷酸

收稿日期:2003-10-25

作者简介:颜玉贞,(1953～),女,广东广州人,主任中药师,从事中药分析,E-mail:yan4481@zlcn.com。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

二氢钾、甲醇、醋酸乙酯均为分析纯,重蒸去离子水。

2　供试品溶液/对照品试液制备

2.1　西青果药材供试品溶液的制备　用丙酮直接提取,浓缩至一定体积便可。先后用甲醇、乙醇、丙酮作提取溶剂进行比较,经薄层检查,结果三者的主要提取物的薄层色谱相近,但甲醇与乙醇拖尾较明显,而丙酮对这种拖尾现象有明显改变,因此,选用丙酮作为提取溶剂。实验证明,取样50mg,用丙酮20mL加热提取3次,基本可将鞣质类成分提取完全。

2.2　西青果浸膏粉供试品溶液的制备　取本品相当于50mg药材量,精密称定,用丙酮超声提取3次,每次20mL,20min,滤过,合并滤液,蒸干,残渣用水溶解,并定容至10mL,摇匀,冰箱(5～10 ℃)放置1h,取出,通过孔径0.45μm的微孔滤膜,滤液为供试品溶液。

2.3　"藏青果喉片"供试品溶液的制备　取本品5片研细,用丙酮超声提取3次,每次20mL,20min滤过,按2.2方法制备供试品溶液。

2.4　对照品溶液制备　对照品溶液制备:取没食子酸、诃黎勒酸、诃子酸适量,用30%甲醇分别做成每1mL含0.2mg的溶液,通过直径为0.45μm的微孔滤膜,滤液为对照品溶液。

3　色谱条件及试验

色谱柱:Lichrospher 100RP-18

流动相:A 0.05mol·L^{-1}磷酸溶液-0.05mol·L^{-1}磷酸二氢钾溶液(1∶1);B　甲醇;C　醋酸乙醋;梯度洗脱

梯度(min)	A(%)	B(%)	C(%)
0	94	6	0
5	96	3	1
15	93	2	5
20	89	6	5
35	55	40	5

流速:1mL·min^{-1};柱温:30 ℃;检测波长:254nm、280nm。

试验:分别吸取对照品溶液与供试品溶液各20μL,注入液相色谱仪,测定色谱图,供试品溶液的液相色谱图应与标准图谱基本一致。

4　方法学认证　为了考察分析方法的可靠性,对供试品溶液的稳定性、色谱方法的重复性作了相应考察,结果证明均能满足指纹图谱的要求。详情见文献[1]。

5　实验结果及指纹图谱的建立　试验获得的有代表性的西青果液相色谱指纹图谱见图1,其棒状图见图2。西青果液相色谱指纹图谱可分为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ3个区段[1](图2)。指纹峰的位置:第1区包括1号～5号峰(保留时间范围2～10.6min);第2区包括6号～11号峰(保留时间范围11～22.5min);第3区包括12号～15号峰(保留时间范围23～40min)。以纵坐标刻度(mAU)粗略测量,第1区主峰为1号、3号及5号峰,其表观丰度呈1>>3<<5的构形,其中3号峰为没食子酸;2号、4号峰为极弱峰,共同构成第1区特征。第2区共有的特征是6号峰、7号峰与11号峰表观丰度呈递增趋势,9号、10号峰虽然很弱,但却是西青果的指纹特征之一[1]。第3区特征峰最突出的是13号峰(诃黎勒酸),15号峰(诃子酸)较成熟果实即大诃子为弱12号、14号峰极弱,强弱构成明显反差而构成第3区的特征(图1),转换成棒状图直观更清晰(图2)。

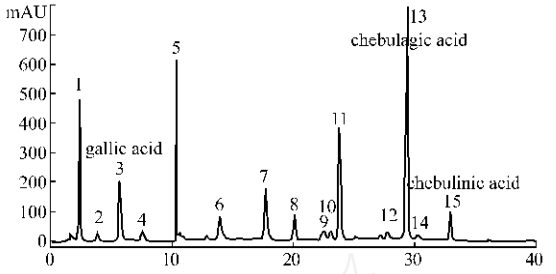

Fig. 1　HPLC fingerprint of immature fruits of *Terminalia*

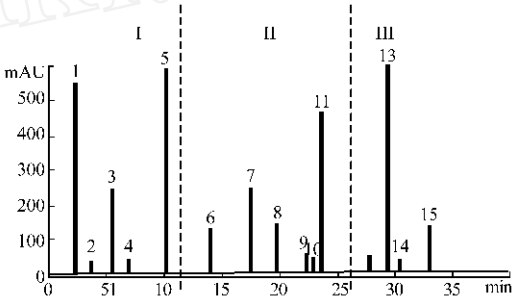

Fig. 2　Bar graph generated from figure 1

5.1　西青果液相色谱指纹图谱

利用液相色谱的在线DAD检测器,测定主要色谱峰的光谱,给以定性鉴别的信息(图3)。

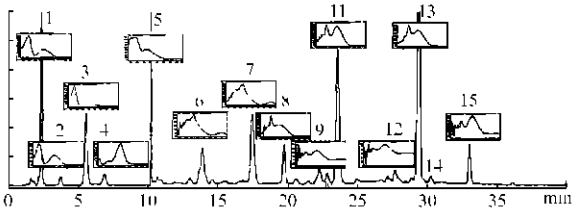

Fig. 3　The HPLC fingerprint and the UV spectra of the main peaks

经液相色谱-质谱联用分析测定,确定了7个峰的归属,即1号峰为没食子酸-D-葡萄糖苷,3号峰为没食子酸,4号峰为punicalagin,5号峰为Terchebulin,11号峰为Chebulamin,13号峰为诃黎勒酸,15号峰为诃子酸(图4)。

由上述试验结果表明西青果指纹图谱所表达的特征峰基本上均是酚酸类成分,色谱的高保留成分为以没食子酸(gallic acid)、terchebulin、chebulamin、诃黎勒酸(chebulagic acid)及诃子酸(chebulinic acid)为代表的分子量大小不同的没食子酸及其葡萄糖苷。这与西青果含鞣质类成分高达35%以上的事实相符。

5.2　西青果药材、提取物及成品(片剂)的实测指纹图谱

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

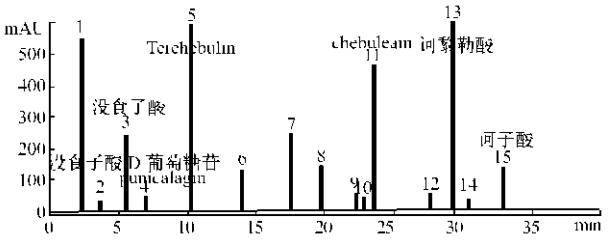

Fig. 4　The chemical attribution of the main peaks in the fingerprint by LC/MS

西青果药材 14 批样品的指纹图谱(图 5)

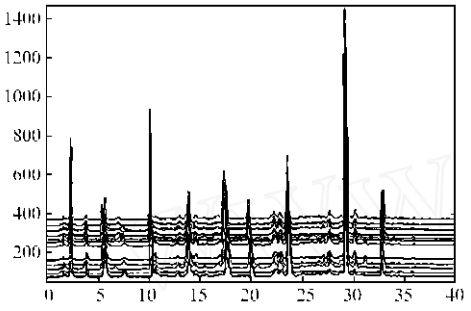

Fig. 5　HPLC fingerprint of 14 batches of raw materials

西青果提取物(浸膏粉) 10 批样品的指纹图谱见图 6。

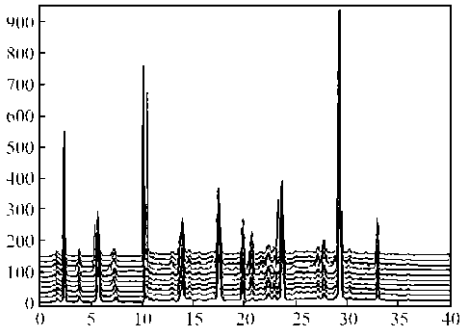

Fig. 6　HPLC fingerprint of 10 batches of the extracts

西青果成品(“藏青果喉片”) 10 批样品的指纹图谱见图 7。

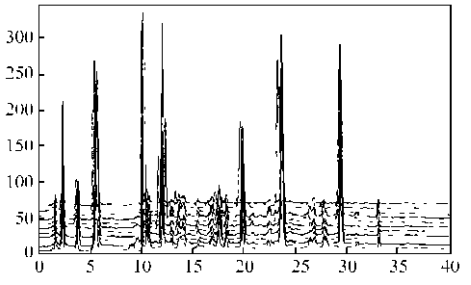

Fig. 7　HPLC fingerprint of the Tablets

6　指纹图相似度评价

中药指纹图谱相似度评价软件由湖南中南大学中药现代化研究中心开发药典会推荐试用的软件之一,该软件是基于 matlab 平台本身已具备的强大计算功能、图形功能、文件操作功能,开发独立的 CASE 软件加入 Toolbok,载入的数据可以是 *. mat、*. csv 文件、*. txt 文件或 *. xls 文件;采用色谱的全谱数据,计算的精确度高,可靠性好。还可以进行主成分分析,建立类模型,加强对指纹图谱的谱峰识别,从而有更确切的评价能力。将指纹图谱积分数据经上述计算机软件计算,14 批药材样品无论是采用相关系数还是相合系数(夹角余弦值),均值方法还是中位数方法,计算所得结果相似度都在0.9528～0.9979范围内。提取物样品 10 批样品计算所得相似度都在0.9847～0.9994范围内。成品 10 批样品相似度都在0.9592～0.9981范围内,均已达到指纹图谱相似度的要求。

7　西青果指纹图谱在生产工艺中监控质量的应用

西青果所含的酚酸类成分在水介质中加热易于水解,故制剂生产的工艺研究避免水解是主要的研究目标。首先考察了原工艺的浸膏和成品的指纹图谱,发现原工艺为水煎煮、常温浓缩,生产过程中高分子多聚体没食子酰基葡萄糖苷大部分已被水解,除色谱中各个峰的总积分值大大降低外(纵坐标显示的 mAU 值可明显看出),第 3 区的组份明显水解损失(图 8)。

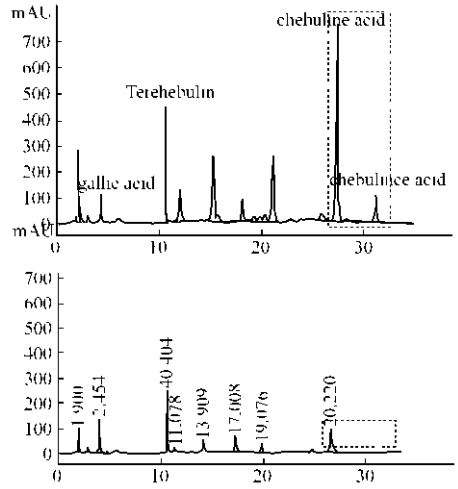

Fig. 8　Fingerprint Comparison of crude drug (above) and the extracts produced by old extraction method

生产厂家根据此质量分析的信息几经反复试验研究,改变了提取溶剂及提取方法、改进了浓缩工艺,得到的提取物(浸膏)指纹图谱与药材指纹图谱直观观察相比,可明显看出相似程度得到很大的提高(图 9)。

再通过指纹图谱考察最后的成品(喉片),发现成品的指纹图谱显示出与浸膏有差异,主要是全成分有较为明显的损失,第 3 区水解尤甚(图 10),究其原因是压片前制粒烘干过程中导致部分酚酸类成分受热水解。所以片剂的成型工序仍需进一步改进提高。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

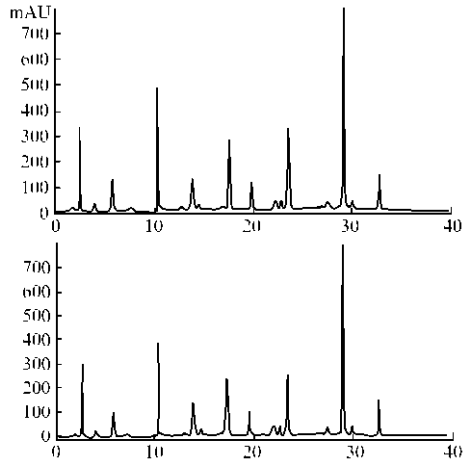

Fig. 9 Fingerprint comparison of the crude drug (above) and the extracts produced by new extraction method

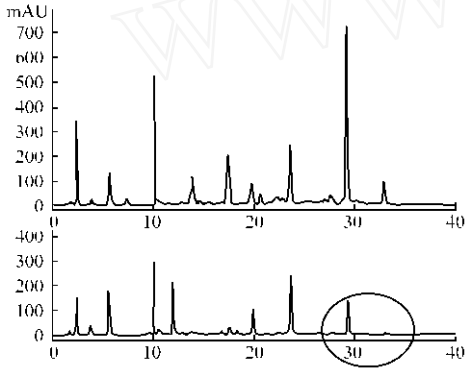

Fig. 10 Fingerprint comparison between the extracts and the Tablets

根据第 1 次工艺改进后的指纹图谱检测结果,生产厂家又进一步改进了片剂的成型工艺,再通过指纹图谱检测,发现最终产品的质量得到进一步提高,突出表现在第 3 区的特征峰较好地得到保留(图 13),水解损失的情况明显改善,说明生产工艺的改进是成功的,指纹图谱的检测也是有效的。

8 讨论

8.1 西青果含丰富的可水解鞣质,由于鞣质类成分色谱分离难度较大,文献报道不多,而且已有报道[4,5]所得的色谱分离度都不能达到指纹图谱的要求,本文经试验优化建立的液相色谱条件可检出西青果的没食子酸及其葡萄糖苷的22个

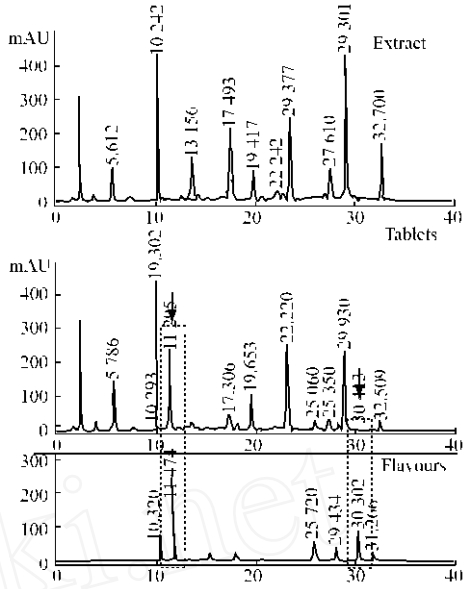

Fig. 13 Fingerprint comparison between the extracts (top), the final products (Tablets formed by new tabletting method (middle). The content of flavor essence (bottom) added in the Tablets also was detected in the Tablets

色谱峰,其中指纹特征峰 15 个,分子量依保留时间递增[5],经 LC/MS 分离鉴定出 7 个峰的化学归属,其中没食子酸、诃黎勒酸及诃子酸经对照品色谱确认。将色谱分为 3 个区,易于直观辨认,专属性强。可有效地进行品种鉴别,定量操作得到的指纹图谱可以从积分数据评价制剂的半成品和成品的质量是否一致和稳定,并可观察生产过程中成分的动态变化,为优化生产工艺提供有效的监控手段。

8.2 如果按照常规的质量标准监控生产工艺,一般是测定其没食子酸的含量,即没食子酸含量越高,说明生产工艺越"合理";但是指纹图谱从更深的层面揭示生产过程中动态的质量变化,显示了测定单一的成分含量的偏颇,甚至是不合理的。事实上诃黎勒酸及诃子酸等成分水解的部分产物就是没食子酸(图 14),测定没食子酸含量不仅反映不出水解破坏的情况,相反还将误导生产。而且由于没食子酸在有水的情况下加热或较长时间放置也会进一步分解破坏,所以测定没食子酸含量来确定工艺无论从哪一个角度都是不合适的。

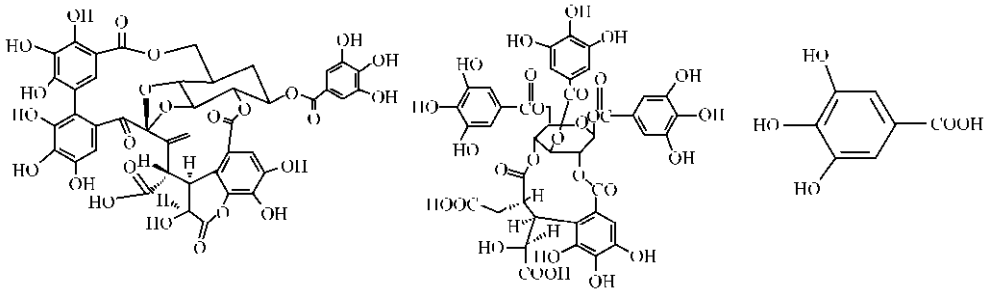

Fig. 14 Chemical structures of chebulagic acid (left)、chebulinic acid (middle)、gallic acid (right)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参考文献:

[1] 中国药品生物制品检定所,进口药材质量分析研究 [M],1988:76,卫生部颁发

[2] 谢培山. 中药指纹图谱概念-属性-技术-应用 [J]. 中国中药杂志,2001,26(10):653-655.

[3] 颜玉贞,卢平华,谢培山. 西青果与诃子的 HPLC 指纹图谱鉴别研究 [J]. 中药新药与临床药理,2001,12(3):173.

[4] Takuo Okuda, Kazuko Mori, Kaoru Seno and Tsutomu Hatano, Constituents of geranium Thumbergii Sieb et Zucc. VII HPLC of hydrolysable Tannins and related polyphenols, Journal of Chromatography [J],1979,171,313-320.

[5] 刘延泽,冀春茹. 高效液相色谱法在中草药鞣质研究种类的应用 [J]. 中草药,1991,22(2):89-93.

当归寄生注射液指纹图谱研究

于 淼, 于治国*, 高 阳, 赵云丽
(沈阳药科大学,药学院,辽宁 沈阳 110016)

关键词:当归寄生注射液;HPLC;色谱指纹图谱

摘要:目的:研究当归寄生注射液(当归、槲寄生)的色谱指纹图谱测定方法。方法:以阿魏酸为对照品,应用 HPLC 法,色谱柱:Zorbax SB-C_{18}(4.6mm ×250mm,5-Micro),流动相:A = 甲醇∶四氢呋喃∶(85∶15),B = 0.5%冰醋酸溶液(梯度洗脱),柱温:40 ℃,测定波长:270nm,分析时间:60min,流速:1mL·min^{-1}。结果:标示出当归寄生注射液 18 个共有峰。结论:该方法准确、重复性好,为当归寄生注射液的指纹图谱质量控制提供了依据。

中图分类号:R284.1 文献标识码:A 文章编号:1001-1528(2004)08-0607-04

Study on HPLC fingerprint of Dangguijisheng Injection

YU Miao, YU Zhi-guo*, GAO Yang, ZHAO Yun-li
(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

KEY WORDS: Dangguijisheng Injection; HPLC; fingerprint

ABSTRACT: AIM: To establish the fingerprint chromatogram of Dangguijisheng Injection (Radix Angelicae Sinensis, Herba Visci) **METHODS**: HPLC with Zorbax SB-C_{18}(4.6mm ×250mm,5-Micro) column was used, A phase (mechanol∶tetrahydrofuran = 85∶15) and B phase (0.5% acetic acid (gradient elution)) were adopted as a mobile phase, respectively, and detection wavelength set at 270 nm. **RESULTS**: 18 peaks constitued the HPLC fingerprint of Compound Dangguijisheng Injection. **CONCLUSION**: The method is simple and accurate with a good reproducibility and can be used as a quality control for Dangguijisheng Injection.

为了确保中药注射剂的质量稳定和临床用药的安全,国家药品监督管理局拟首先在中药注射剂质量标准中引入指纹图谱技术要求[1]。当归寄生注射液是由当归和槲寄生经水提醇沉精制而成的注射液,具有舒筋活络,祛风湿,镇痛的作用,临床上用于治疗风湿性关节炎、肥大型脊椎炎、腰膝劳损、腰腿痛、痛经、坐骨神经痛。本文采用 HPLC 研究了当归寄生注射液的指纹图谱质控技术。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

日本岛津 LC-10ATvp 高效液相色谱仪,SPD-10Avp 紫外检测器。

柱温箱:TC-130,色谱数据处理系统(ANASTAR 工作站)

1.2 试剂

收稿日期:2003-10-08
项目来源:国家药典委员会项目。

作者简介:于淼(1972～),女,辽宁鞍山人,主管药师,药学硕士,从事中西药品质量标准研究与药品质量检验。
*通信联系人:于治国,硕士生导师,电话:024-23843711-3366,E-mail:yzg-cnn@163.com。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net