

枫蓼肠胃康口服液 HPLC 指纹图谱研究

杨 宪, 王伯初*, 刘玮琦, 李伟, 钱俊臻, 苏 辉

重庆大学生物工程学院, 重庆 400044

摘要: 建立了一种整体定性鉴别和指标成分定量的 HPLC 指纹图谱方法, 对由牛耳枫和辣蓼两味药材组成的枫蓼肠胃康口服液原料及成品进行了指纹图谱研究, 并测定了指标成分芦丁、金丝桃苷和异鼠李素的含量。采用 Waters ODS C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm I. D. 5 μm), 用含甲醇和甲酸溶液作为流动相, 进行梯度洗脱, 并对原料和成品的相应色谱峰进行归属鉴别。结果显示芦丁、金丝桃苷和异鼠李素得到了满意的线性范围, 相关系数均大于 0.999。按照 SFDA 的要求, 对原料和成品的色谱指纹图谱采用相关系数法和夹角余弦法两种数学方法计算它们的相似度, 两种计算方法相似度均不小于 0.852。表明建立的枫蓼肠胃康口服液的定性定量方法显著优于传统的质量控制方法。

关键词: HPLC 指纹图谱; 枫蓼肠胃康口服液; 牛耳枫; 辣蓼

中图分类号: Q946.91; R917

文献标识码: A

Studies on HPLC Fingerprint Chromatography of Fengliao Changweikang Oral Liquid

YANG Xian, WANG Bo-chu*, LIU Wei-qi, LI Wei, QIAN Jun-zhen, SU Hui

College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China

Abstract: This study established a HPLC HPLC-fingerprint method for the general characterization and indicator component determination. This method was used to investigate the HPLC fingerprint of Fengliao Changweikang (FC) oral liquid comprising of *Daphniphyllum calycinum* Benth. and *Polygonum hydropiper* Linn. The contents of rutin, hyperin and isorhamnetin as the indicator components were determined. The analysis was performed on a waters C₁₈ (250 mm × 4.6 mm I. D. 5 μm) utilizing a gradient elution profile with methanol and formic acid as the mobile phase. The results showed that calibration curves were linear with correlation coefficients >0.999 for all analytes. In accordance with the State Food and Drug Administration (SFDA) requirements, similarity degree was calculated by both correlation coefficient and the included angle cosine to verify the results. The similarity degree were more than 0.982 which suggested that the established HPLC-fingerprint method is significantly improved compared with the traditional method in characterizing and quantifying the components of Fengliao Changweikang (FC) oral liquid.

Key words: HPLC-fingerprint; FC oral liquid; *Daphniphyllum calycinum* Benth.; *Polygonum hydropiper* Linn

枫蓼肠胃康口服液是由牛耳枫 (*Daphniphyllum calycinum* Benth.) 和辣蓼 (*Polygonum hydropiper* Linn.) 两味药材组成, 除枫蓼肠胃康口服液外, 由牛耳枫和辣蓼组成的中药复方还有枫蓼肠胃康滴丸、枫蓼肠胃康合剂、枫蓼肠胃康软胶囊、枫蓼肠胃康颗粒等^[1]。药理作用筛选和广泛的临床应用证明它们具有理气健胃、除湿化滞的作用, 对腹胀、腹痛、腹泻等消化不良症状有确切的治疗作用^[1]。但无论是对牛耳枫和辣蓼药材, 还是枫蓼肠胃康口服液, 现

有的质量控制方法都比较简单。指纹图谱作为质量控制方法已成为目前的国际共识^[2-5]。本研究牛耳枫、辣蓼药材和枫蓼肠胃康口服液进行了指纹图谱分析, 并应用计算机相似度计算软件对指纹图谱进行了评价。使从药材的采购、生产工艺的合理性、稳定性, 到保证中药新药制剂的安全性, 以及临床用药的有效性, 具有一定的指导意义。

1 材料和方法

1.1 材料

芦丁、金丝桃苷和异鼠李素对照品均来源于中国药品生物制品检定所(芦丁、金丝桃苷和异鼠李

收稿日期: 2010-05-14 接受日期: 2010-09-07

基金项目: 重庆市科委重点攻关项目 (19807); 中央高校基金 (CDJXS11232241)

* 通讯作者 Tel: 86-013508396242; E-mail: wbc2000@126.com

素批号分别为: 100080-200707; 111521-200303 和 110860-200608)。从全国各地收集牛耳枫和辣蓼样品, 其中牛耳枫来源于江苏、广东、广西等地; 辣蓼来源于江西、四川、湖南和河北等地。所有样品经重庆市中药研究院张毅副研究员鉴定为正品。色谱甲醇和乙腈来源于美国, 其它试剂来源于分析纯。

1.2 测定方法

液相色谱条件, Agilent 1200, 包括自动进样器, 四元梯度泵, 在线脱气机, DAD 紫外检测器; Waters ODS C_{18} 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm ID, 5 μ m); 流动相由甲醇 (A) 和 0.4% 的甲酸水溶液 (B) 组成, 梯度洗脱程序为: 0 ~ 5 min, 29% A; 5 ~ 35 min, 29% ~ 50% A; 35 ~ 45 min, 55% ~ 40% A; 45 ~ 60 min, 40% ~ 29% A。检测波长: 359 nm。流速: 0.8 mL/min。进样量: 10 μ L, 牛耳枫、辣蓼药材和枫蓼肠胃康口服液在相同色谱条件下的色谱图见图 1。

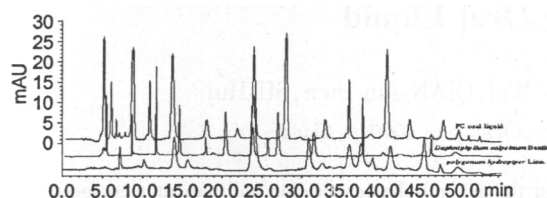


图 1 牛耳枫药材、辣蓼药材和枫蓼肠胃康口服液在相同色谱条件下的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of *D. calycinum*, *P. hydropiper* and FC oral liquid

1.2.1 对照品溶液的制备

精密称取芦丁、金丝桃苷和异鼠李素对照品, 加甲醇分别制成 0.856 mg/mL 芦丁对照溶液, 1.061 mg/mL 的金丝桃苷对照溶液, 1.520 mg/mL 的异鼠李素对照溶液。

1.2.2 供试品溶液的制备

药材供试品制备: 取药材粉末 1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 60% 乙醇 50 mL, 称定重量, 水浴回流 1 h, 放冷, 再称定重量, 用 60% 乙醇补

足减失的重量, 摇匀, 0.45 μ m 滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

成品供试品溶液的制备: 精密量取本品 10 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加流动相 10 mL, 摇匀, 超声处理 5 min, 取出, 放冷, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜 (0.45 μ m) 滤过, 取续滤液, 即得。

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

在梯度洗脱条件不变的情况下, 先后采用了四种流动相组成, 优化分离口服液生物活性成分, 方法 1 是流动相为甲醇: 乙腈 (68.8:31.2; v/v) 组成流动相 A, 3.8% 醋酸溶液组成流动相 B; 方法 2 是流动相 A 不变, 1.0% 醋酸溶液组成流动相 B; 方法 3 仍是流动相 A 不变, 将方法 2 中的 3.8% 醋酸溶液由 0.4% 磷酸代替; 方法 4 是甲醇组成流动相 A, 0.4% 甲酸组成流动相 B, 按 2.2 项下进行梯度洗脱。结果表明, 方法 4 是优选的流动相方法。

2.2 色谱柱的选择

Waters ODS C_{18} (250 mm \times 4.6 mm) 和 Boston CLC-phenyl (250 mm \times 4.6 mm) 两种色谱柱被选择, 实验结果表明, Waters ODS C_{18} (250 mm \times 4.6 mm) 无论从峰形还是整体出峰情况, 都比 Boston CLC-phenyl 色谱柱效果要好, 故本研究选用岛津 C_{18} (250 mm \times 4.6 mm) 作为实验研究用色谱柱。

2.3 枫蓼肠胃康口服液含量测定方法学研究

2.3.1 线性、检测限和定量限

取 1.2.1 项下的芦丁、金丝桃苷和异鼠李素对照液适量, 混合并成梯度稀释成六个浓度梯度, 取各稀释液 10 μ L, 分别进入高效液相色谱仪。结果以各对照液浓度为横坐标, 对应的峰面积为纵坐标, 进行线性回归, 得线性方程。同时, 取 1.2.1 项下的芦丁、金丝桃苷和异鼠李素对照液适量, 分别进行逐级稀释, 当信噪比为 (3:1) 时为检测限, 当信噪比为 (10:1) 时为定量限, 见表 1。

表 1 枫蓼肠胃康口服液的线性方程、检测限和定量限

Table 1 Linearity, LOD and LOQ for FC oral liquid using the optimized method

对照品 Standard	线性范围 linear range (μ g/mL)	线性方程 linear equation	回归系数 Regress r^2 ($n=5$)	检测限 LOD (μ g/mL)	定量限 LOQ (μ g/mL)
芦丁	0.237 ~ 18.976	$Y = 356549X + 13246$	$r = 0.9996$	0.01581	0.05271
金丝桃苷	0.005 ~ 2.140	$Y = 3.14484 \times 106X + 208.5$	$r = 1.0000$	0.00072	0.00240
异鼠李素	0.040 ~ 8.024	$Y = 574379X + 34772$	$r = 0.9998$	0.00292	0.00974

2.3.2 精密度和回收率

取同一供试品溶液,分别于 0、2、4、8、16、24 h 进样 6 次,研究日内精密度的测定结果样品中 3 个成分的含量 RSD 为 0.7% ~ 1.2%,表明日内精密度良好(见表 2)。同时取上述供试品溶液,连续 6 d 进样 6 次,研究日间精密度的测定结果样品中 3 个成分的含量 RSD 为 1.1% ~ 2.6%,表明日间精密度良

好。

选取已知含量的样品,精密量取约 5 mL,再加入样品中与各成分含量相同的各对照品,照“1.2.2”项下制备供试品,进行回收率试验,测定结果样品中 3 个成分的含量 RSD 为 1.5% ~ 2.3%,表明回收率良好。

表 2 枫蓼肠胃康口服液的 3 个成分的日内和日间精密度

Table 2 Summary of Intra-day and inter-day precision in FC oral liquid

峰号 Peak No.	对照品 Standard	日内精密度 Intra-day precisions (mg/g)		日间精密度 Inter-day precisions (mg/g)		回收率 Recovery (%)	
		均值 ± 标准偏差 Mean ± SD	RSD (%)	均值 ± 标准偏差 Mean ± SD	RSD (%)	均值 Mmean	RSD (%)
11	芦丁	0.349 ± 0.008	1.0	0.341 ± 0.006	2.4	100.5	2.2
15	金丝桃苷	0.026 ± 0.010	1.2	0.018 ± 0.012	1.1	99.3	2.3
21	异鼠李素	0.032 ± 0.006	0.7	0.038 ± 0.007	2.6	98.4	1.5

2.3.3 样品测定

取 11 批牛耳枫药材、辣蓼药材和枫蓼肠胃康口服液样品,按“1.2”项下色谱条件检测各自芦丁、金丝桃苷和异鼠李素的含量,结果见表 3。枫蓼肠胃康口服液中,每 1 mL 口服液相当于 2 g 牛耳枫药材和 1 g 辣蓼药材制备而成。从 11 批牛耳枫、辣蓼药材的芦丁含量范围分别为:牛耳枫 0.0224% ~ 0.0295%,辣蓼 0.0155% ~ 0.0235%,而枫蓼肠胃康口服液中芦丁含量为 0.295 ~ 0.452 mg/mL,根据枫蓼肠胃康口服液的处方组成,以芦丁为指标,枫蓼肠胃康口服液成品收率为 48.92% ~ 54.79%。同

理,由于牛耳枫中未检出金丝桃苷,11 批辣蓼药材的金丝桃苷含量范围为:0.00311% ~ 0.00632%,枫蓼肠胃康口服液中金丝桃苷含量为 0.0189 mg/mL ~ 0.0480 mg/mL,以金丝桃苷为指标,可得出成品收率为 60.77% ~ 75.95%。牛耳枫中也未检出异鼠李素,11 批辣蓼药材的异鼠李素含量范围为:0.00170% ~ 0.00371%,而枫蓼肠胃康口服液中异鼠李素含量为 0.0124 ~ 0.0282 mg/mL,以异鼠李素为指标,成品收率为 72.94% ~ 76.01%。可见按此制备工艺,异鼠李素的提取率最高。

表 3 11 批牛耳枫药材、辣蓼药材和枫蓼肠胃康口服液的含量测定结果

Table 3 The contents of the 3 components from the 11 batches of raw material medicine and FC oral liquid (n = 3)

样品号 Sample No.	含量 Content						
	牛耳枫 <i>D. calycinum</i> (mg/g)		辣蓼 <i>P. hydropiper</i> (mg/g)			枫蓼肠胃康口服液 FC oral liquid (mg/mL)	
	芦丁 Rutin	芦丁 Rutin	金丝桃苷 Hyperin	异鼠李素 Isorhamnetin	芦丁 Rutin	金丝桃苷 Hyperin	异鼠李素 Isorhamnetin
1	0.272 ± 0.011	0.181 ± 0.011	0.0343 ± 0.008	0.0170 ± 0.015	0.349 ± 0.008	0.0261 ± 0.010	0.0124 ± 0.006
2	0.224 ± 0.013	0.168 ± 0.012	0.0517 ± 0.004	0.0247 ± 0.016	0.295 ± 0.013	0.0393 ± 0.011	0.0181 ± 0.004
3	0.232 ± 0.006	0.155 ± 0.014	0.0632 ± 0.006	0.0299 ± 0.007	0.298 ± 0.007	0.0480 ± 0.013	0.0230 ± 0.005
4	0.326 ± 0.009	0.217 ± 0.005	0.0249 ± 0.009	0.0288 ± 0.003	0.418 ± 0.006	0.0189 ± 0.013	0.0211 ± 0.006
5	0.259 ± 0.015	0.173 ± 0.009	0.0338 ± 0.003	0.0257 ± 0.011	0.333 ± 0.010	0.0257 ± 0.012	0.0175 ± 0.008
6	0.351 ± 0.016	0.234 ± 0.006	0.0468 ± 0.011	0.0337 ± 0.004	0.450 ± 0.011	0.0336 ± 0.003	0.0253 ± 0.002
7	0.258 ± 0.012	0.172 ± 0.021	0.0542 ± 0.013	0.0221 ± 0.009	0.331 ± 0.009	0.0412 ± 0.012	0.0163 ± 0.005

8	0.241 ± 0.021	0.161 ± 0.022	0.0541 ± 0.016	0.0371 ± 0.013	0.309 ± 0.007	0.0411 ± 0.012	0.0282 ± 0.003
9	0.352 ± 0.024	0.235 ± 0.013	0.0311 ± 0.021	0.0241 ± 0.015	0.452 ± 0.002	0.0236 ± 0.017	0.0183 ± 0.011
10	0.295 ± 0.013	0.217 ± 0.017	0.0353 ± 0.018	0.0322 ± 0.019	0.417 ± 0.010	0.0268 ± 0.011	0.0244 ± 0.007
11	0.320 ± 0.013	0.214 ± 0.014	0.0428 ± 0.013	0.0359 ± 0.003	0.411 ± 0.006	0.0325 ± 0.006	0.0273 ± 0.001

2.4 枫蓼肠胃康口服液指纹图谱研究

2.4.1 共有峰

参照色谱峰的选择: 通过色谱图比较, 在共有峰确定的基础上, 按峰面积由大到小统计各样品色谱图中强信号峰, 随机选择一个出峰时间较居中、在各样品中均存在的成分作为参照峰(s)。辣蓼、牛耳枫和枫蓼肠胃康口服液制剂的 HPLC 色谱图中, 芦丁成分中符合参照峰的选择要求, 故以芦丁为参照峰。

取供试品溶液 10 μ L, 注入高效液相色谱仪, 记录不再出峰时的色谱图, 通过比较各峰的保留时间选择每一个图谱都产生的共有峰, 确定共有峰的个数^[9]。在 11 批样品共有峰和参照峰(s) 确定的基础上, 将参照峰(s) 的相对保留时间和相对峰面积记为 1, 各指纹峰保留时间与同一图谱中参照物的保留时间相比, 比值为各指纹峰的相对保留时间, 同理, 各指纹峰的峰面积与同一图谱中参照物的峰面积相比, 比值为各指纹峰的相对峰面积。

从不同产地的 11 批样品通过 HPLC 分析。结果表明: 11 批牛耳枫的指纹图谱中, 在 60 min 内共有 15 个共有色谱峰, 如图 2。11 批辣蓼的指纹图谱中, 在 60 min 内共有 14 个共有色谱峰, 如图 3。11 批枫蓼肠胃康口服液指纹图谱中, 在 60 min 内共有 22 个共有色谱峰, 如图 4。

11 批牛耳枫、辣蓼药材和枫蓼肠胃康口服液中, 各均以样品 1 为对照图谱, 在本研究中, 样品通过 HPLC 分析, 芦丁作为参照峰, 11 批牛耳枫、辣蓼药材和枫蓼肠胃康口服液相对保留时间 RSD 分别不超过 0.72%、0.70% 和 0.65%。通过夹角余弦和相关系数法计算各自的相似度^[6,7], 11 批牛耳枫药材为: 0.852 ~ 0.993 和 0.854 ~ 0.992; 辣蓼药材为:

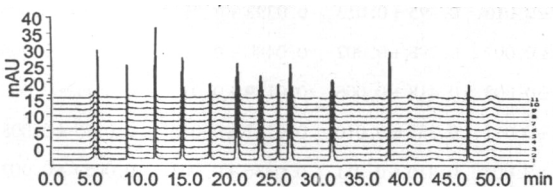


图 2 不同产地的牛耳枫药材的 HPLC 色谱图

Fig. 2 Chromatogram of *D. calycinum* from different places

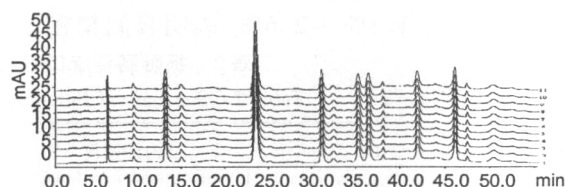


图 3 不同产地的辣蓼药材的 HPLC 色谱图

Fig. 3 Chromatogram of *P. hydropiper* from different places

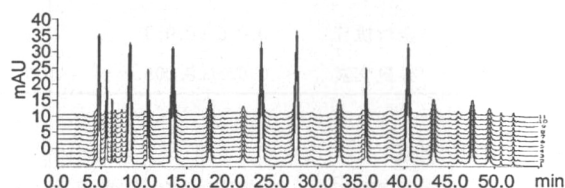


图 4 不同批的枫蓼肠胃康口服液的 HPLC 色谱图

Fig. 4 Chromatogram of FC oral liquid from different Samples

0.873 ~ 0.997 和 0.860 ~ 0.993; 枫蓼肠胃康口服液为: 0.983 ~ 0.998 和 0.982 ~ 1.000。两种计算方法相似度均 ≥ 0.852 , 这表明所建立指纹图谱的技术指标基本稳定, 重现性好。

2.4.2 非共有峰

通过对 11 批牛耳枫、辣蓼药材和枫蓼肠胃康口服液供试品的测定, 统计各批非共有峰面积和占总峰面积和的比值, 其结果牛耳枫、辣蓼药材和枫蓼肠胃康口服液中, 非共有峰面积之和占总峰面积的百分比分别在 4.4% ~ 9.1%, 在 4.1% ~ 8.6%, 在 4.7% ~ 9.7% (图 2 ~ 图 4), 没有超过洪筱坤^[8]提出的 10% 的要求, 可见此方法可行。从而也间接说明, 原药材的质量变化由许多因素影响, 因此, 通过对原药材的指纹图谱的研究, 仅仅当原药材的质量得到控制, 并符合要求, 由它们制成的中药的质量得也才能保持稳定性和一致性。

2.4.3 枫蓼肠胃康口服液的峰来源分析

牛耳枫、辣蓼和枫蓼肠胃康口服液组成一张图中, 如图 1 所示。牛耳枫共有 15 个共有色谱峰, 辣蓼有 14 个共有色谱峰, 而枫蓼肠胃康口服液有 22 个共有色谱峰。其中, 枫蓼肠胃康口服液有 22 个共

有峰中,有7个色谱峰来源于牛耳枫,有8个色谱峰来源于辣蓼,在牛耳枫、辣蓼和枫蓼肠胃康口服液中,均有芦丁成分存在,结果见表4。但枫蓼肠胃康口服液中色谱中,有8个色谱峰在牛耳枫和辣蓼中没有明确归属,同时牛耳枫中有8个色谱峰,辣蓼中有6个色谱峰在枫蓼肠胃康口服液中也没有出现。其原因

可能由于在牛耳枫和辣蓼药材中,这些色谱峰代表的化学成分的含量相当微量,因此没有计入药材的共有峰,但经过提取后,它们的含量增大,故在成品中体现出来;而牛耳枫和辣蓼药材中的一些较明显的色谱峰,其代表的成分的提取过程中被除掉了,故在成品中没有发现相应的色谱峰。

表4 牛耳枫、辣蓼和枫蓼肠胃康口服液中部分色谱峰归属情况

Table 4 The correspondence of peaks between in FC oral liquid and in raw herbs

样品 Samples	峰号 Peak No.														
枫蓼肠胃康口服液	1	4	6	8	9	11	13	14	15	16	18	19	20	21	
牛耳枫	1		2		3	4				5	6			7	
辣蓼		1		2		3	4	5	6				7		8

3 结论

建立一种整体定性鉴别和指标成分定量的HPLC指纹图谱方法,对由牛耳枫和辣蓼两味药材组成的枫蓼肠胃康口服液原料及成品进行了指纹图谱研究,并测定了指标成分芦丁、金丝桃苷和异鼠李素的含量。从色谱图上比较,牛耳枫、辣蓼和枫蓼肠胃康口服液色谱图总体上是比较一致,说明该药材和成品群体成分的一致性,并且显示出较好的稳定性。制定的指纹图谱可对枫蓼肠胃康口服液及原料药材组分群体特征的一致性作出判断。并且它们指纹图谱的共有特征峰中,整体分离度比较好;不同批次药材指纹图谱概貌也有较好的一致性,能充分反映它们化学成分的特征^[9,10]。

参考文献

- 1 State Food and Drug Administration, registered number of approval: Z20090448, Z20050169, Z20080252 and Z10910055.
- 2 FDA Guidance for Industry—Botanical Drug Products (Draft Guidance). US Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA, 2000. 18-22.
- 3 Requirements for Studying Fingerprints of Traditional Chinese Medicine Injection. Drug Administration Bureau of Chi-

na, Beijing, China 2002.

- 4 WHO. Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1991.
- 5 Note for Guidance on Quality of Herbal Medicinal Products. European Medicines Agency, London, UK, 2001.
- 6 Liu YS(刘永锁), Cao M(曹敏), Wang YM(王义明) *et al.* Similarity system theory to evaluate the similarity of high performance liquid chromatography fingerprint of traditional Chinese medicine quantitatively. *Chin J Anal Chem(分析化学)* 2006, 34: 333-337.
- 7 Miao AD(苗爱东), Sun DJ(孙殿甲). Application of Microsoft Excel 2002 to calculate the similarity in fingerprints of Chinese herbs. *Prog Pharm Sci(药学进展)* 2003, 27: 51-54.
- 8 Hong YK(洪筱坤), Wang ZH(王智华). Digitized fingerprint of traditional and herbal drugs (中药数字化指纹图谱). Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishing House, 2003. 82-83.
- 9 Zhou YX(周玉新). Research Techniques of Traditional and Herbal Drugs Fingerprint(中药指纹图谱研究技术). Beijing: Chemical Industry Press, 2002. 37-38, Index 2.
- 10 Liu W Y(刘文英). Pharmaceutical analysis(药物分析). Beijing: People's Medical Publishing House, 2008. 98-99, 411, 435.