乌灵胶囊的 HPLC 化学成分特征图谱研究*

陆静娴[1,2],祝明[1**],陈勇[1],张鹏[2],方丽[2]

(1. 浙江省食品药品检验所,杭州 310004; 2. 浙江中医药大学,杭州 310053)

摘要 目的:建立乌灵胶囊高效液相色谱化学成分特征图谱,为科学评价其质量提供可靠方法。方法:采用 Kromasil 100-5 C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm)色谱柱,以乙腈(A)-0.2%磷酸溶液(B)为流动相梯度洗脱(0~35 min,25% A→75% A),流速 1.0 mL·min^{-1},检测波长 248 nm,柱温 30 ℃。运用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 年版(国家药典委员会)进行分析。结果:构建了乌灵胶囊的特征图谱,提取分离得到其特征性成分 5-甲基蜂蜜曲霉素。结论:该方法准确,重复性好,可作为乌灵胶囊的质控方法。

关键词: 乌灵胶囊;特征图谱;5-甲基蜂蜜曲霉素

中图分类号: R917 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-1793(2011)04-0764-04

HPLC specific chromatogram of chemical constituents of Wuling capsules*

LU Jing-xian[1,2],ZHU Ming[1**],CHEN Yong[1],ZHANG Peng[2],FANG Li[2]

(1. Zhejiang Institute for Food and Drug Control,Hangzhou 310004,China; 2. Zhejiang TCM University,Hangzhou 310053,China)

Abstract **Objective:** To establish the method of specific chromatogram analysis of chemical constituents by RP-HPLC with diode array detector(DAD) for the quality control of Wuling capsules. **Methods:** The specific chromatograms were obtained on an Kromasil 100-5 C_{18}(250 mm×4.60 mm,5 μm) with the gradient elution solvent system composed of acetonitrile(A) and 0.2% solution of phosphoric acid(B)(0-35 min,25% A→75% A). The flow rate was 1.0 mL·min^{-1},the column temperature was maintained at 30 ℃,and the detection wavelength was set at 248 nm. It was analyzed with the Estimating System of Similarity of 2004A Version(the Country's Pharmacopeia Committee) on the Chinese Medicine Fingerprint Chromatogram. **Results:** The HPLC specific chromatogram of Wuling capsules was established. 5-methylmellein was extracted as the characteristic component of Wuling capsules. **Conclusion:** The method with good precision and reproducibility is reliable for the quality control of Wuling capsules.

Key words: Wuling capsules; specific chromatogram; 5-methylmellein

乌灵胶囊是以我国珍稀药用真菌-乌灵菌(俗称乌灵参)经现代生物技术精制而成的纯中药制剂,具有补肾健脑、养心安神的功效,临床多用于治疗失眠,或与西药联合使用治疗抑郁、神经官能症等[1]。

目前尚未见到有关乌灵胶囊 HPLC 特征图谱的研究报道,对乌灵胶囊的研究主要集中在核苷类成分上。本文对包括乌灵胶囊在内的 5 种药用真菌发酵类产品的核苷类成分进行测定。

通过保留时间和紫外光谱比较,验证了乌灵胶囊主药核苷类成分为:尿苷、腺嘌呤、鸟苷及腺苷,与文献报道[2]一致。同时发现核苷类成分基本为乌灵胶囊及同类产品所共有的成分,在色谱图中无显著差别。

故考虑改变色谱条件,寻找乌灵胶囊的特征成分以区别其他同类产品。经采用 HPLC 法试验,运用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 版(国家药典委员会)对 13 批乌灵胶囊进行分析,测定其特征图谱,根据《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》规定,进行特征图谱相似度比较,制成标

* 国家"十一五"重大新药创新专项课题:中药质量标准研究和信息化体系建设平台(2009ZX09308-004)

** 通讯作者 Tel:(0571)86459425; E-mail: zhumingd@hotmail.com

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

准特征图谱,从多方面控制制剂的质量,综合反映制剂质量的总体性和特征性,从而保证制剂内在质量的一致性与产品的稳定性。同时对其中的特征性成分进行提取,纯化,精制,鉴定为 5 – 甲基蜂蜜曲霉素(5 – methylmellein),该成分首次在乌灵菌发酵粉中提取分离。

1 仪器与试药

岛津 LC – 20AT 高效液相色谱仪(DGU – 20AS 在线脱气机,SIL – 10AT 自动进样器,SPD – M20A 二极管阵列检测器,CTO – 20AT 柱温箱),色谱工作站 LC Solution。

中药色谱指纹图谱相似度评价系统(国家药典委员会)。

乌灵胶囊 13 批,由浙江佐力药业股份有限公司提供;金水宝胶囊 8 批、宁心宝胶囊 2 批、至灵胶囊 2 批和百令胶囊 4 批均购于药店。乌灵菌粉对照药材由浙江省食品药品检验所提供;5 – 甲基蜂蜜曲霉素对照品由浙江省食品药品检验所实验室提取制备,其结构采用核磁共振氢谱和碳谱确认,并经 LC – MS 验证,采用 HPLC 面积归一化法计算其纯度大于 98%。乙腈为色谱纯,水为重蒸水,其余为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 Kromasil 100 – 5 C_{18} 柱(250 mm × 4.60 mm,5 μm)色谱柱,以乙腈(A) – 0.2% 磷酸溶液(B)为流动相,梯度洗脱(0 ~ 35 min,25% A→75% A),流速 1.0 mL · min^{-1},检测波长 248 nm,柱温 30 ℃,进样量 10 μL。

2.2 供试品溶液及对照药材溶液的制备 取乌灵胶囊内容物及乌灵菌粉对照药材 1.5 g,加甲醇 20 mL,超声(250 W,40 kHz)处理 30 min,滤过,取续滤液,即得。

2.3 对照品溶液的制备 取 5 – 甲基蜂蜜曲霉素对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 25 μg 的溶液,即得。

2.4 测定方法 分别精密吸取对照品溶液、对照药材溶液及供试品溶液各 10 μL,注入高效液相色谱仪,记录 35 min 色谱图(图 1),即得。分析 13 批乌灵胶囊的 HPLC 色谱行为,确定指纹区及共有峰。供试品色谱中,以 5 – 甲基蜂蜜曲菌素对应的色谱峰为参照峰 S,计算各共有峰的相对保留时间。

2.5 专属性试验

因乌灵胶囊是由单一发酵乌灵菌粉制成的胶囊,无其他辅料,所以主要考察了类似产品对本方法有无干扰。结果表明:采用本法可以区别其他类似产品,本法专属性强。

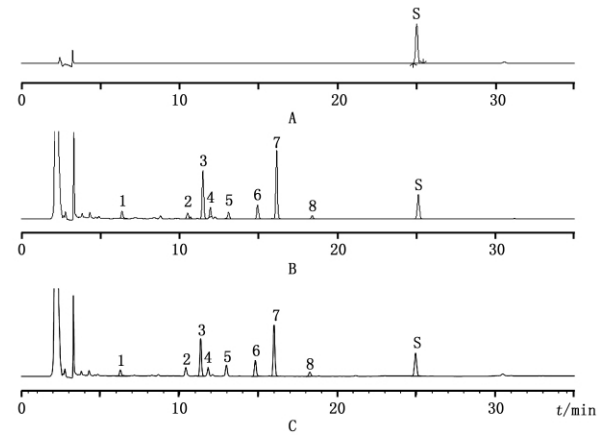

图 1 5 – 甲基蜂蜜曲霉素对照品(A)、乌灵菌粉对照药材(B)乌灵胶囊 7 号样品(C)色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of 5 – methylmellein reference substance (A), Wuling Fermentative powder reference drug (B) and Wuling capsules sample No. 7 (C)

为了考察本品与类似产品间的区别,采用上述条件测定了 8 批金水宝胶囊、2 批宁心宝胶囊、2 批至灵胶囊和 4 批百令胶囊。结果表明:同一种产品,所测定的不同批号样品色谱图中主要峰基本一致,但不同产品的色谱图有所不同。金水宝胶囊在该色谱条件下出现色谱峰,但与乌灵胶囊差距较大,而其他产品,如至灵胶囊、百令胶囊、宁心宝胶囊等则在该色谱条件下与乌灵胶囊完全不一致(见图 2)几乎无色谱峰,采用本法可以区别其他类似菌粉,本法专属性强。

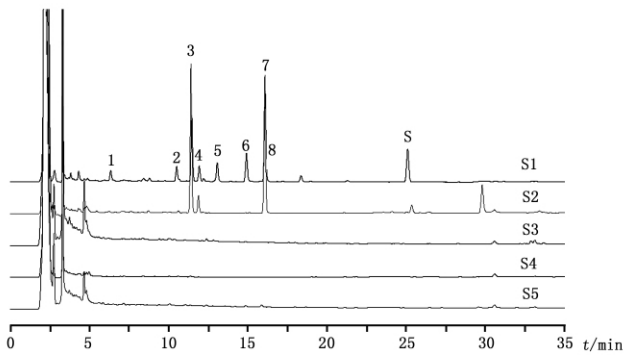

图 2 乌灵胶囊与药用真菌类产品比较 HPLC 色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of reference substances and samples

S1. 乌灵胶囊(Wuling capsules) S2. 金水宝胶囊(Jinshuibao capsules) S3. 至灵胶囊(Zhiling capsules) S4. 宁心宝胶囊(Ningxinbao capsules) S5. 百令胶囊(Bailing capsules)

2.6 方法学考察

2.6.1 精密度试验 取乌灵胶囊 7 号,照“2.2”项下方法制备供试品溶液,连续进样 6 次,记录色谱

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

图,计算共有峰的相对保留时间,结果 RSD 均小于 0.5%。

2.6.2 重复性试验 取乌灵胶囊 7 号样品 6 份,照"2.2"项下方法制备供试品溶液,分别检测,结果 RSD 均小于 0.5%。

2.6.3 稳定性试验 精密吸取乌灵胶囊供试品溶液 10 μL,按以上色谱条件,分别在 0,5,20,25,29,31,37,41,48 h 进样 1 针,测定相对保留时间,其 RSD 均小于 0.5%。结果表明:乌灵胶囊供试品溶液在室温下放置 48 h 内稳定。

2.7 乌灵胶囊 HPLC 特征图谱共有模式建立 按"2.4"项方法共测定 13 批乌灵胶囊,结果所有测定的样品均能检测到 9 个主要色谱峰(见表 2),而且与对照药材的 9 个主要色谱峰保留时间一致,与对照品色谱峰保留时间一致。结论:除溶剂峰外,样品呈现与对照药材 9 个最强峰保留时间一致的色谱峰,并呈现与 5 - 甲基蜂蜜曲菌素对照品峰保留时间一致的色谱峰。

表 1 13 批乌灵胶囊特征图谱共有峰的相对保留时间

Tab 1 Relative retention time of common peaks in specific chromatogram for 13 batches of Wuling capsules

样品号	共有峰相对保留时间(relative retention time of common peaks)								
(sample No.)	1	2	3	4	5	6	7	8	S
1	0.250	0.416	0.454	0.473	0.519	0.593	0.640	0.731	1
2	0.250	0.417	0.454	0.473	0.520	0.593	0.641	0.731	1
3	0.251	0.417	0.455	0.474	0.520	0.593	0.641	0.732	1
4	0.253	0.419	0.457	0.477	0.522	0.595	0.643	0.733	1
5	0.253	0.418	0.457	0.476	0.521	0.595	0.643	0.732	1
7	0.253	0.419	0.457	0.476	0.521	0.595	0.643	0.732	1
8	0.251	0.417	0.455	0.474	0.520	0.593	0.641	0.732	1
9	0.251	0.417	0.454	0.473	0.520	0.593	0.641	0.731	1
10	0.251	0.417	0.454	0.473	0.520	0.593	0.641	0.731	1
11	0.250	0.416	0.454	0.473	0.520	0.593	0.641	0.731	1
12	0.252	0.418	0.456	0.475	0.521	0.594	0.642	0.732	1
13	0.252	0.418	0.456	0.475	0.521	0.594	0.642	0.732	1
平均	0.251	0.417	0.455	0.474	0.520	0.594	0.642	0.732	1
RSD	0.4%	0.2%	0.3%	0.3%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%

根据《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》规定,进行特征图谱相似度比较,制成标准特征图谱,见图 3。

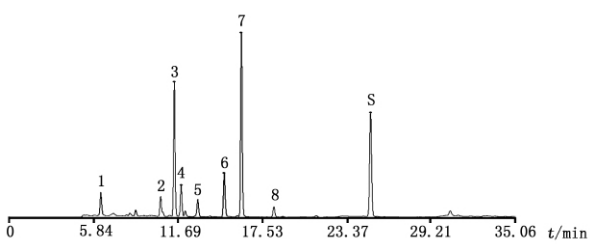

图 3 乌灵胶囊标准特征图谱

Fig 3 Reference fingerprint of Wuling Capsules

2.8 样品特征图谱相似度的测定 以上述生成的乌灵胶囊样品标准特征图谱作对照,按国家药典委员会提供的中药色谱指纹图谱相似度评价系统评价[3],对 13 批乌灵胶囊样品进行特征图谱相似度的测定,结果除 1 号样品的相似度为 0.930 外,其余 12 批样品的相似度在 0.960 ~ 1.000 之间。

3 讨论

3.1 参照中国药典 2005 年版一部百令胶囊指纹图谱的色谱条件[4],我们对包括乌灵胶囊在内的 5 种药用真菌发酵类产品的核苷类成分进行测定。以 Ultimate AQ C_{18}(250 mm × 4.6 mm,5 μm)为色谱柱;以甲醇为流动相 A,以 0.04 mol·L^{-1}磷酸二氢钾溶液为流动相 B 进行梯度洗脱,0 ~ 45 min A 相比例由 0% →30%;流速 1.0 mL·min^{-1};柱温 30 ℃。DAD 检测条件:259 nm;光谱扫描:200 ~ 400 nm。取乌灵胶囊或药用真菌发酵产品 0.5 g,加 50% 甲醇 20 mL,超声处理 30 min,滤过,取续滤液作为供试品溶液。取次黄嘌呤、尿苷、胸腺嘧啶、腺嘌呤、鸟苷及腺苷对照品,分别加 20% 甲醇制成每 1 mL 含 20 μg 的溶液。确证了金水宝胶囊主要色谱峰成分为:尿苷、腺嘌呤、鸟苷和腺苷;宁心宝胶囊主要色谱峰成分为:尿苷、鸟苷和腺苷;至灵胶囊主要色谱峰成分为:尿苷、腺嘌呤、鸟苷和腺苷;百令胶囊主要色谱峰成分为:尿苷、胸腺嘧啶、鸟苷和腺苷;复

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

方猴头胶囊主要色谱峰成分为:尿苷、鸟苷和腺苷。结果表明核苷类成分为药用真菌发酵类产品的共有成分。

3.2 本文建立的乌灵胶囊特征图谱鉴别方法具有专属性,从图1中可以看出1号、2号、5号、6号、8号及S峰为其特有成分,可以区别其他菌类发酵产品,提高了鉴别的专属性。S特征峰5-甲基蜂蜜曲霉素可用于乌灵胶囊指标性成分的定量测定,为今后的标准提高提供基础。其余特征峰的成分及药理活性有待进一步研究。

3.3 以特征成分5-甲基蜂蜜曲霉素为定量指标,比较了甲醇、无水乙醇2种溶剂的考察,结果甲醇对特征峰的提取效率较高;对甲醇用量进行考察,选用了15 mL、20 mL及25 mL,结果20 mL甲醇即能将其提取完全;对超声时间进行考察,比较了15 min、30 min及40 min,结果表明30 min即能将其提取完全。因此确定供试品溶液的制备条件为:取乌灵胶囊内容物或乌灵菌粉1.5 g,加甲醇20 mL,超声处理30 min,滤过,取续滤液,即得。

3.4 采用二极管阵列检测器记录200~400 nm的光谱图,比较了等吸收图后发现在248 nm处样品信息量大,基线平稳,且与其他同类产品的区别较明显,因此,最后选择248 nm为乌灵胶囊的检测波长。

3.5 本实验色谱条件采用梯度洗脱,能够提供更多信息,同时缩短分析周期。比较了乙腈-0.02%磷酸水溶液、乙腈-0.04 mol·L^{-1}磷酸二氢钾溶液、乙腈-水等系统进行梯度洗脱,结果以乙腈-0.2%磷酸水溶液梯度洗脱得到的色谱峰形较好,且对色谱柱影响较小。

3.6 本实验比较了Ultimate XB-C_{18}色谱柱、Shim-pack VP-ODS色谱柱,结果分离情况良好,共有峰的相对保留时间RSD均小于5%。

3.7 根据相同色谱条件下记录的1~13号样品的HPLC特征图谱与同类菌类发酵产品图谱间的差异,暂定样品在248 nm波长下相似度不得低于0.90。

参考文献

1 XU Bin(徐彬),ZHOU Wei-yin(周未莹),ZHANG Shui-jing(章水晶). Observation on effect of Wuling capsule in treating poststroke depression(乌灵胶囊治疗卒中后抑郁的疗效观察). *Chin J Integr Tradit West Med*(中国中西医结合杂志),2007,27(7):640

2 TANG Jun(汤俊),CHENG Min(程敏),LU Jing(鲁静). Profiling and determination of nucleosides in several medicinal fungi by HPLC method(三种药用真菌核苷类成分的分析及含量比较). Chinese Pharmaceutical Association 2008 Annual Meeting of the Eighth China Academic Pharmacist Week Technology(2008年中国药学会学术年会暨第八周中国药师周论文集). 2008

3 Technical Requirement of the Fingerprint in Injection of Chinese Materia Medica(Tentative Standard)[中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)]. 2001.1

4 ChP(中国药典). 2005. Vol Ⅰ(一部):434

(本文于2010年12月24日修改回)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net