

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.09.018

治瘥胶囊高效液相色谱指纹图谱建立及多成分含量测定*

凌 骢,徐 斌,刘亮镜,王 权[△]

(安徽省芜湖市中医医院,安徽 芜湖 241000)

摘要:目的 建立治瘥胶囊的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并测定制剂中绿原酸、黄芩苷、栀子苷、芍药苷、丹皮酚5个成分的含量。方法 采用指纹图谱指认上述5个成分,并采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)软件评价10批样品的相似度;采用HPLC法测定上述5个成分的含量,色谱柱为Waters XBridgeTM-C₁₈柱(150 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-0.2%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长分别为330 nm(绿原酸)、230 nm(芍药苷和栀子苷)、278 nm(黄芩苷和丹皮酚),柱温为20℃,进样量为10 μL。结果 标定出16个共有峰,10批样品的相似度为0.978~0.997。绿原酸、栀子苷、芍药苷、黄芩苷和丹皮酚的质量浓度分别在7.470~44.820 mg/mL、6.380~63.800 mg/mL、6.260~62.600 mg/mL、11.275~112.750 mg/mL、2.015~20.150 mg/mL范围内与峰面积线性关系良好($R^2=0.999\ 9, 0.999\ 8, 1.000\ 0, 0.999\ 6, 0.999\ 9, n=6$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于2.0%($n=6$);平均加样回收率分别为97.76%, 99.08%, 97.30%, 99.65%, 97.20%, RSD分别为1.91%, 1.26%, 1.34%, 1.36%, 1.85%($n=6$);含量分别为2.47~2.85 mg/g、3.60~3.88 mg/g、1.85~2.07 mg/g、6.72~7.64 mg/g、1.56~1.70 mg/g。结论 该方法操作简便、结果准确、重复性好,可用于治瘥胶囊的质量控制。

关键词:治瘥胶囊;高效液相色谱法;指纹图谱;绿原酸;丹皮酚;芍药苷;栀子苷;黄芩苷

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)09-0078-05

Establishment of HPLC Fingerprints of Zhicuo Capsules and Content Determination of Multi-Components

LING Cong, XU Bin, LIU Liangjing, WANG Quan

(Wuhu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhu, Anhui, China 241000)

Abstract: Objective To establish the high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprints of Zhicuo Capsules and to determine the content of five components such as chlorogenic acid, baicalin, geniposide, paeoniflorin and paeonol in the preparation. **Methods** The above five components were identified by fingerprints, and the similarity of ten batches of samples was evaluated by the software "Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (Version 2012)". The content of the above five components was determined by the HPLC method, the chromatographic column was Waters XBridgeTM-C₁₈ column (150 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.2% phosphoric acid solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was set at 330 nm for chlorogenic acid, 230 nm for paeoniflorin and geniposide, and 278 nm for baicalin and paeonol, the column temperature was 20℃ and the injection volume was 10 μL. **Results** Sixteen common peaks were identified, and the similarity of 10 batches of samples was 0.978-0.997. The linear ranges of chlorogenic acid, geniposide, paeoniflorin, baicalin and paeonol were 7.470-44.820 mg/mL, 6.380-63.800 mg/mL, 6.260-62.600 mg/mL, 11.275-112.750 mg/mL, 2.015-20.150 mg/mL ($R^2=0.999\ 9, 0.999\ 8, 1.000\ 0, 0.999\ 6, 0.999\ 9, n=6$). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 2.0% ($n=6$). The average recoveries chlorogenic acid, geniposide, paeoniflorin, baicalin and paeonol were 97.76%, 99.08%, 97.30%, 99.65%, 97.20% with RSDs of 1.91%, 1.26%, 1.34%, 1.36%, 1.85% ($n=6$), respectively. The contents of the above five components were 2.47-2.85 mg/g, 3.60-3.88 mg/g, 1.85-2.07 mg/g, 6.72-7.64 mg/g, 1.56-1.70 mg/g. **Conclusion** The method is simple, accurate and reproducible, which can be used for the quality control of Zhicuo Capsules.

Key words: Zhicuo Capsules; HPLC; fingerprint; chlorogenic acid; paeonol; paeoniflorin; geniposide; baicalin

治瘥胶囊为安徽省芜湖市中医医院院内特色制剂(皖药制字Z20050016),由金银花、酒黄芩、焦栀子、赤芍、牡丹皮、丹参、夏枯草等12味中药组方,具有清泄热毒、化湿通腑功效,临床用于治疗热毒血浊型湿疹^[1]、痤疮的效果显著,对脂溢性皮炎、酒糟鼻及皮肤溃疡亦有

良好疗效。其现行质量标准仅限定了丹酚酸B含量,指标单一,专属性差,难以保证质量和疗效^[2-4]。高效液相色谱(HPLC)指纹图谱具有整体性、特征性、可量化等特点,与中药成分的复杂性、模糊性相适应,是公认的评价中药制剂质量的可靠方法^[5-7]。为进一步控制治瘥

*基金项目:安徽省高等学校自然科学重点研究项目[KJ2020A0872]。

第一作者:凌骢,男,大学本科,主管中药师,研究方向为中药临方炮制与个体化用药质量控制,(电子信箱)sunpu197812@163.com。

[△]通信作者:王权,男,硕士,主管中药师,研究方向为院内制剂开发,(电子信箱)316091563@qq.com。

胶囊质量的一致性和稳定性,本研究中建立了治瘞胶囊的HPLC指纹图谱,并测定其中具有抗菌消炎活性作用的绿原酸、黄芩苷、栀子苷、芍药苷、丹皮酚^[8-13]的含量,以对该制剂的质量进行有效表征、综合评价和全面控制。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent-1200型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),配有G1314B型可变波长检测器;XP-205型分析天平(精度为0.01 mg),AL-204型分析天平(精度为0.1 mg),均购自梅特勒-托利多仪器有限公司;KQ-500DB型数控超声仪(上海博讯实业有限公司,功率为200~500 W,频率为40 kHz);UPS-11-10T型纯水机(成都优普净化科技有限公司)。

1.2 试药

绿原酸对照品(批号为110753-201415,纯度为96.2%),栀子苷对照品(批号为110749-201617,纯度为98.4%),芍药苷对照品(批号为110736-201741,纯度为95.7%),黄芩苷对照品(批号为110715-201821,纯度为95.4%),丹皮酚对照品(批号为110708-201407,纯度为99.9%),均购自中国食品药品检定研究院;乙腈(分析纯,美国Tedia Company公司);磷酸(分析纯,上海展云化工有限公司);水为自制超纯水;治瘞胶囊(安徽省芜湖市中医医院制剂室,批号分别为ZS201201, ZS201202, ZS201203, ZS210101, ZS210102, ZS210103, ZS210104, ZS210201, ZS210202, ZS210203, 编号设为S₁-S₁₀)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[14-20]

色谱柱:Waters XBridgeTM-C₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.2%磷酸溶液(B),梯度洗脱(程序见表1);流速:1.0 mL/min;检测波长:330 nm(0~13.5 min,绿原酸),230 nm(13.5~42.0 min,栀子苷和芍药苷),278 nm(42.0~60.0 min,黄芩苷和丹皮酚);柱温:20℃;进样量:10 μL。

表1 梯度洗脱程序(%)

Tab. 1 Gradient elution procedure(%)

时间	流动相A	时间	流动相A
0~12 min	8~10	30~40 min	18~20
12~15 min	10	40~50 min	20~25
15~25 min	10~15	50~60 min	25~40
25~30 min	15~18		

2.2 溶液制备

取绿原酸、栀子苷、芍药苷、黄芩苷和丹皮酚对照品各适量,分别加甲醇制成质量浓度为249.0,319.0,

626.0,225.5,201.5 μg/mL的对照品贮备液;精密吸取此对照品贮备液1.0,1.0,0.5,2.5,0.5 mL,置10 mL容量瓶中,加甲醇定容,即得质量浓度分别为24.900,31.900,31.300,56.375,10.075 μg/mL的混合对照品溶液。取样品(批号为ZS201201)1 g,精密称定,置锥形瓶中,加入75%甲醇50 mL,称定质量,超声处理(功率为350 W,频率为40 kHz)30 min,放至室温,用75%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过;取续滤液2 mL,置5 mL容量瓶中,加75%甲醇定容,摇匀,即得供试品溶液。按样品处方和制备工艺制备不含金银花、焦栀子、赤芍、酒黄芩、牡丹皮的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.3 指纹图谱建立

2.3.1 共有峰指认

精密吸取2.2项下混合对照品溶液和供试品溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,共标定16个共有峰,根据保留时间指认出1号峰为绿原酸,2号峰为栀子苷,3号峰为芍药苷,4号峰为黄芩苷,5号峰为丹皮酚。详见图1。

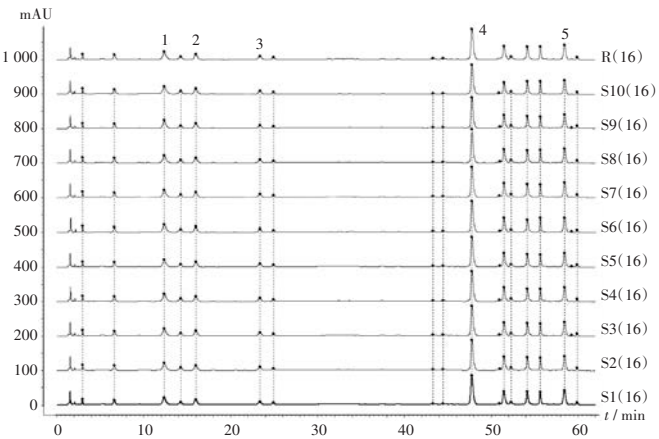


图1 高效液相色谱叠加指纹图谱

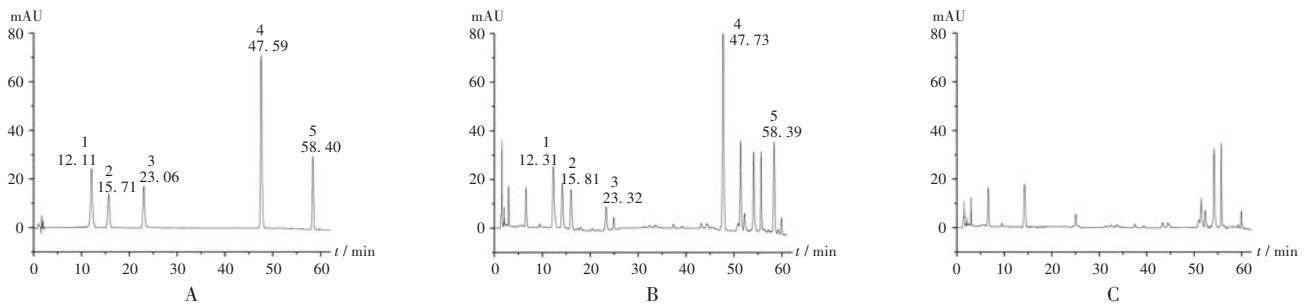
Fig. 1 HPLC superimposed fingerprints

2.3.2 方法学考察

精密度试验:精密吸取2.2项下供试品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次。以栀子苷峰为参照峰,各共有峰相对保留时间的RSD为0.12%~1.04%(n=6),相对峰面积的RSD为0.20%~2.67%(n=6),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:精密吸取2.2项下供试品溶液适量,按2.1项下色谱条件分别于0,2,4,8,12,24 h时进样测定。结果以栀子苷峰为参照峰,各共有峰相对保留时间的RSD为0.09%~0.42%(n=6),相对峰面积的RSD为0.32%~2.44%(n=6),表明供试品溶液在室温下24 h内稳定性良好。

重复性试验:取样品(批号为ZS201201)适量,精密



1. 绿原酸 2. 栀子苷 3. 芍药苷 4. 黄芩苷 5. 丹皮酚

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图2 高效液相色谱图

1. Chlorogenic acid 2. Geniposide 3. Paeoniflorin 4. Baicalin 5. Paeonol

A. Mixed reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 2 HPLC chromatograms

称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,平行6份,按2.1项下色谱条件进样测定。结果以栀子苷峰为参照峰,各共有峰相对保留时间的RSD为0.17%~1.75% ($n=6$),相对峰面积的RSD为0.53%~2.72% ($n=6$),表明方法重复性良好。

2.3.3 相似度评价

取10批样品(批号分别为ZS201201, ZS201202, ZS201203, ZS210101, ZS210102, ZS210103, ZS210104, ZS210201, ZS210202, ZS210203)各适量,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,将色谱数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)软件,结果相似度分别为0.994, 0.985, 0.997, 0.991, 0.989, 0.990, 0.993, 0.985, 0.982, 0.978。

2.4 含量测定

2.4.1 方法学考察

专属性试验:精密吸取2.2项下3种溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定。结果阴性对照无干扰,表明方法专属性良好。色谱图见图2。

线性关系考察:精密吸取2.2项下芍药苷和丹皮酚对照品贮备液各0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 栀子苷对照品贮备液0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 mL, 绿原酸对照品贮备液0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8 mL, 黄芩苷对照品贮备液0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL, 分别置10 mL容量瓶中,加甲醇定容,分别配制系列质量浓度的对照品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定。以对照品溶液质量浓度为横坐标($X, \mu\text{g/mL}$)、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表2。

精密度试验:精密吸取2.2项下混合对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果见表2,表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取2.2项下供试品溶液适量,分别于0, 2, 4, 8, 12, 24 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记

表2 线性关系考察及精密度、稳定性、重复性试验结果($n=6$)

Tab. 2 Results of the linear relation, precision, stability and repeatability tests ($n=6$)

成分	回归方程	R^2	线性范围 (mg/mL)	RSD(%)		
				精密度试验	稳定性试验	重复性试验
绿原酸	$Y=29.543X-10.5870$	0.9999	7.470~44.820	0.83	0.75	1.52
栀子苷	$Y=11.912X+0.6305$	0.9998	6.380~63.800	0.61	0.51	1.28
芍药苷	$Y=12.867X-3.0511$	1.0000	6.260~62.600	1.44	1.02	1.57
黄芩苷	$Y=29.337X+10.6830$	0.9996	11.275~112.750	0.94	0.72	1.42
丹皮酚	$Y=56.747X-2.6788$	0.9999	2.015~20.150	0.58	0.67	1.31

录峰面积。结果见表2,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

重复性试验:取样品(批号为ZS201201)适量,精密称定,依法制备供试品溶液,平行6份,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并按外标法计算含量。结果见表2,表明方法重复性良好。

加样回收试验:取样品(批号为ZS201201)0.5 g,精密称定,平行6份,置50 mL容量瓶中,依次加入绿原酸、栀子苷、芍药苷、黄芩苷、丹皮酚对照品(质量浓度分别为0.707 6, 0.719 9, 0.523 7, 0.740 3, 0.783 6 mg/mL) 2.0, 2.5, 1.8, 5.0, 1.0 mL,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,按外标法计算含量,并计算回收率。结果见表3。

2.4.2 样品含量测定

取10批样品,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定3次,记录峰面积,并按外标法计算含量。结果见表4。

3 讨论

3.1 色谱条件选择

中药制剂各成分的最大吸收波长不同,单波长下的色谱信号弱,积分误差大,而不同基线的多波长检测数据处理烦琐^[21-23]。故本研究中选用了可变波长紫外

表3 加样回收试验结果($n=6$)
Tab. 3 Results of the recovery test($n=6$)

成分	取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
绿原酸	0.500 3	1.416 1	1.415 2	2.800 5	97.82	97.76	1.91
	0.499 8	1.414 7	1.415 2	2.783 4	96.71		
	0.500 2	1.415 8	1.415 2	2.808 3	98.40		
	0.499 7	1.414 4	1.415 2	2.761 1	95.16		
	0.499 4	1.413 6	1.415 2	2.796 0	97.68		
	0.500 5	1.416 7	1.415 2	2.842 9	100.78		
栀子苷	0.500 3	1.800 9	1.799 8	3.603 2	100.14	99.08	1.26
	0.499 8	1.799 1	1.799 8	3.595 0	99.78		
	0.500 2	1.800 6	1.799 8	3.608 7	100.46		
	0.499 7	1.798 8	1.799 8	3.549 2	97.26		
	0.499 4	1.797 7	1.799 8	3.567 0	98.31		
	0.500 5	1.801 6	1.799 8	3.574 6	98.51		
芍药苷	0.500 3	0.943 1	0.942 7	1.880 3	99.42	97.30	1.34
	0.499 8	0.942 2	0.942 7	1.848 1	96.10		
	0.500 2	0.942 9	0.942 7	1.859 4	97.22		
	0.499 7	0.942 0	0.942 7	1.848 5	96.16		
	0.499 4	0.941 4	0.942 7	1.852 8	96.68		
	0.500 5	0.943 5	0.942 7	1.869 5	98.23		
黄芩苷	0.500 3	3.703 2	3.701 5	7.391 8	99.65	99.65	1.36
	0.499 8	3.699 5	3.701 5	7.365 5	99.04		
	0.500 2	3.702 5	3.701 5	7.325 0	97.87		
	0.499 7	3.698 8	3.701 5	7.423 9	100.64		
	0.499 4	3.696 6	3.701 5	7.360 0	98.97		
	0.500 5	3.704 7	3.701 5	7.469 4	101.71		
丹皮酚	0.500 3	0.784 1	0.783 6	1.539 0	96.34	97.20	1.85
	0.499 8	0.783 3	0.783 6	1.541 7	96.78		
	0.500 2	0.784 0	0.783 6	1.570 2	100.33		
	0.499 7	0.783 2	0.783 6	1.536 5	96.13		
	0.499 4	0.782 7	0.783 6	1.530 3	95.41		
	0.500 5	0.784 4	0.783 6	1.554 1	98.23		

表4 样品含量测定结果(mg/g, $n=3$)

Tab. 4 Results of content determination of five components in the samples(mg/g, $n=3$)						
批号	绿原酸	栀子苷	芍药苷	黄芩苷	丹皮酚	
ZS201201	2.83	3.60	1.89	7.40	1.57	
ZS201202	2.85	3.88	2.07	7.64	1.70	
ZS201203	2.76	3.74	2.00	7.40	1.65	
ZS210101	2.72	3.73	1.98	7.35	1.64	
ZS210102	2.47	3.63	1.85	6.72	1.56	
ZS210103	2.60	3.76	1.98	7.15	1.65	
ZS210104	2.56	3.65	1.90	6.95	1.58	
ZS210201	2.58	3.79	1.94	7.09	1.62	
ZS210202	2.66	3.81	2.00	7.25	1.63	
ZS210203	2.62	3.79	1.99	7.23	1.66	

检测器,根据目标成分的最大吸收波长,选择了330 nm(绿原酸)、230 nm(芍药苷和栀子苷)和278 nm(黄芩苷和丹皮酚)。磷酸溶液体积分数考察了0.1%,0.2%,0.4%,柱温考察了20℃和25℃,综合比较5个待测成分色谱峰的分离度和对称性,最终选择0.2%磷酸溶液流动相和20℃柱温。

3.2 提取溶剂选择

提取溶剂考察了甲醇、75%甲醇、50%甲醇,三者色谱峰数量无差异,但75%甲醇提取时响应值最理想。故最终选择75%甲醇为提取溶剂。

3.3 色谱峰数量与强度

建立指纹图谱时,主要从5个待测成分色谱峰的分离度和分析时长考虑,流动相梯度洗脱至40%乙腈结束,样品尚有部分极性较小的成分未被检测到,导致色谱峰数量偏少;保留时间为30~40 min时,有数个响应值较小的色谱峰,色谱峰积分面积的RSD大于5%,未列为共有峰。

3.4 一测多评法

本研究中尝试以栀子苷为内标物,按斜率校正法和多点校正法计算其余成分含量,并采用SPSS 20.0统计学软件对各成分含量的3组数据进行 t 检验,结果2种一测多评法^[24-25]与外标法所得绿原酸和丹皮酚含量均有显著差异($P<0.05$),故未能建立样品的一测多评法,最终仅采用指纹图谱指认成分。

参考文献

[1] 马冲,陈蕾,王兴臣,等.王新陆教授从血浊论治皮肤病经验撷菁[J].天津中医药,2021,38(2):152-156.
[2] 吴思宇,杨丹丹,傅静,等.谱效关系在中药质量控制中的应用[J].长春中医药大学学报,2019,35(2):399-402.
[3] 李永鹏,张永萍,宋霞,等.多波长HPLC法同时测定百花定喘片中9种成分[J].中国药师,2019,22(10):1921-1924.
[4] 王帅,包永睿,李天娇,等.中药质量评价关键问题与分析方法探讨[J].分析测试学报,2021,40(1):132-138.
[5] 甄汉深,范秀春,丘琴,等.中药指纹图谱研究的一些问题探讨[J].时珍国医国药,2015,26(8):1960-1961.
[6] 俞洁东,曾海松,吴革林,等.脉络通颗粒HPLC指纹图谱研究[J].中国医药导报,2019,16(4):39-42.
[7] 陈俊,翟伟峰.桑葛降脂丸HPLC指纹图谱及7个成分含量测定的研究[J].中国药师,2021,24(4):789-793.
[8] 胡璇,李卫东,张硕峰,等.四倍体金银花水提物抗炎作用和急性毒性实验研究[J].中草药,2015,46(11):1649-1652.
[9] 缪艳燕,徐帮会,徐剑,等.金银花的HPLC指纹图谱建立及其抗炎作用谱-效关系研究[J].中国药房,2020,31(20):2497-2502.
[10] 姚雪,程云霞,陈龙,等.黄芩化学成分的研究[J].中成药,2020,42(11):2935-2940.
[11] 邓怒骄,张文兴.大黄素、栀子苷对炎症反应综合症的临床作用研究进展[J].湖南中医杂志,2019,35(5):177-179.