

HPLC 指纹图谱法评价知柏地黄丸(浓缩丸)的质量^Δ

李雅静^{1*}, 王丰青², 谢彩侠^{1#}, 谢惠英¹, 张苗¹, 雷敬卫¹ (1. 河南中医药大学药学院, 郑州 450046; 2. 河南农业大学中药系, 郑州 450002)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)20-2747-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.20.03

摘要 目的: 建立知柏地黄丸(浓缩丸)的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱, 并评价其质量。方法: 色谱柱为 Dikma Diamonsil C₁₈, 流动相为 0.1% 醋酸溶液-甲醇(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 260 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 10 μL。以丹皮酚为参照, 分别绘制 A、B、C 厂有效期内样品和 A 厂有效期内与有效期外样品的 HPLC 图谱。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 A) 对 A、B、C 厂有效期内样品及 A 厂有效期内与有效期外样品进行相似度评价, 分别确定共有峰。结果: A、B、C 厂各 10 批有效期内样品的 HPLC 图谱分别有 24、29、32 个共有峰, A、B、C 厂样品 HPLC 图谱与对照指纹图谱的相似度均大于 0.94, 具有较好的一致性。A 厂有效期内样品的 HPLC 图谱与有效期外样品的 HPLC 图谱具有较好的一致性。结论: 本研究建立的 HPLC 指纹图谱可为评价知柏地黄丸(浓缩丸)的质量提供参考, 但其并不能有效鉴别有效期外的样品。

关键词 高效液相色谱法; 指纹图谱; 知柏地黄丸(浓缩丸); 有效期

Quality Evaluation of Zhibai Dihuang Pills (Concentrated Pills) by HPLC Fingerprint

LI Yajing¹, WANG Fengqing², XIE Caixia¹, XIE Huiying¹, ZHANG Miao¹, LEI Jingwei¹ (1. School of Pharmacy, Henan University of TCM, Zhengzhou 450046, China; 2. Dept. of Pharmacy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To establish the HPLC fingerprint of Zhibai dihuang pills (concentrated pills), and to evaluate its quality. **METHODS:** The determination was performed on Dikma Diamonsil C₁₈ column with mobile phase consisted of 0.1% acetic acid solution-methanol (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 260 nm, and column temperature was 30 ℃. The sample size was 10 μL. Using paeonol as reference, HPLC chromatograms of samples from A, B, C manufacturers within validity period and samples from manufacturer A within validity period and out of validity period were drawn. The similarity of HPLC chromatogram for samples from A, B and C manufacturers and samples from A manufacturer within validity period and out of validity period was evaluated by TCM Chromatogram Fingerprint Similarity Evaluation System (2004 A). Common peaks of HPLC chromatogram for 3 manufacturers sample within validity period were confirmed. **RESULTS:** There were 24, 29 and 32 common peaks in HPLC chromatograms for each 10 batches of samples from manufacturer A, B and C within validity period, respectively. The similarity of corresponding HPLC chromatograms of samples from manufacturer A, B and C compared with control HPLC chromatography were all higher than 0.94 with good agreement. HPLC chromatograms of sample from A manufacturer within validity period had good agreement with that from A manufacturer out of validity period. **CONCLUSIONS:** Established HPLC fingerprint analysis method can represent the quality of Zhibai dihuang pills (concentrated pills), but cannot effectively identify the expired samples.

KEYWORDS HPLC; Fingerprint; Zhibai dihuang pills (concentrated pills); Validity period

知柏地黄丸(浓缩丸)是在六味地黄丸的组方基础上加黄柏和知母两味药材精制而成, 可滋阴降火, 临床上广泛用于阴虚火旺、口干咽痛、潮热盗汗、小便短赤、耳鸣遗精等症的治疗^[1]。目前, 全国生产知柏地黄丸(浓缩丸)的厂家有 273 家, 由于该制剂药味较多, 不同厂家在其生产过程中所用的药材、辅料来源及生产工艺不尽

相同, 质量也有所差异。中药材中的化学成分是中药制剂药效的物质基础, 2015 年版《中国药典》(一部) 仅用牡丹皮中丹皮酚和山茱萸中马钱苷两种成分的含量作为评价知柏地黄丸(浓缩丸)质量的主要指标, 并没有体现该制剂多组分的特征。程翼宇等^[2] 定义中药制剂质量稳定性为在特定的一段时期(如有效期)内, 中药制剂保持化学、物理、生物特性以及疗效的能力。那么知柏地黄丸(浓缩丸)在存放及流通过程中一旦超过规定的有效期, 其质量特征与正常有效期内的制剂有无明显差异? 如何准确鉴别该制剂是否超出其有效期, 以防止有效期

Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81473299); 河南省科技攻关项目(No.182102311156)

* 硕士研究生。研究方向: 中药质量控制。电话: 0371-65962067

通信作者: 教授, 硕士生导师。研究方向: 中药质量控制。E-mail: nanyang.cxc@163.com

表2 梯度洗脱程序

Tab 2 Gradient elution procedure

时间, min	A, %	B, %
0	95	5
15	90	10
25	75	25
30	75	25
40	65	35
50	55	45
60	45	55
70	35	65
75	10	90

外的药品再次流入市场,给用药安全带来隐患? 这些也都是令人关心的问题。本研究利用化学计量学知识,对A、B、C厂生产的有效期内的知柏地黄丸(浓缩丸)样品及A厂生产的有效期内与有效期外的知柏地黄丸(浓缩丸)样品的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱信息进行采集和分析,以期建立一种科学、准确地控制知柏地黄丸(浓缩丸)质量的方法提供依据。

1 材料

1.1 仪器

2695型HPLC仪,包括2998光电二极管阵列检测器等(美国Waters公司);ME54E型万分之一电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);TY-500型超声波清洗仪(北京天佑恒达科技有限公司);SZ-93型自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂);CPA225D型十万分之一电子分析天平(德国Sartorius公司)。

1.2 药品与试剂

知柏地黄丸(浓缩丸)(2014年收集,来源见表1。其中,S31~S35号样品为A厂生产的有效期外的样品);马钱苷对照品(批号:110708-200506,纯度:>98%)、丹皮酚对照品(批号:111640-201005,纯度:>98%)均购自中国食品药品检定研究院;芒果苷对照品(批号: MUST-13110201,纯度:>98%)、盐酸黄柏碱对照品(批号: MUST-13021407,纯度:>98%)、盐酸小檗碱对照品(批号: MUST-13110201,纯度:>98%)均购自成都曼思特生物科技有限公司;甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为双蒸水。

表1 知柏地黄丸(浓缩丸)样品来源

Tab 1 Zhibai dihuang pills (concentrated pills) sample source

编号	厂家	批号	编号	厂家	批号	编号	厂家	批号
S1	A	20105	S13	B	20120634	S25	C	20130407
S2	A	120501	S14	B	20120840	S26	C	20130501
S3	A	120707	S15	B	20121009	S27	C	20130604
S4	A	120803	S16	B	20121227	S28	C	20130706
S5	A	121201	S17	B	20130138	S29	C	20130903
S6	A	130202	S18	B	20130354	S30	C	20140204
S7	A	130403	S19	B	20130525	S31	A	100101
S8	A	130602	S20	B	20130737	S32	A	100212
S9	A	131203	S21	C	20121208	S33	A	100403
S10	A	140102	S22	C	20130106	S34	A	100601
S11	B	20120178	S23	C	20130202	S35	A	101208
S12	B	20120452	S24	C	20130305			

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Dikma Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.1%醋酸溶液(A)-甲醇(B), 梯度洗脱(洗脱程序见表2); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 260 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取丹皮酚对照品2.78 mg、芒果苷对照品1.40 mg、盐酸黄柏碱对照品2.18 mg、盐酸小檗碱对照品2.32 mg、马钱苷对照品1.14 mg, 分别置于5 mL量瓶中, 加50%甲醇溶解并定容, 摇匀, 经0.22 μm微孔滤膜滤过, 制成单一对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品粉末约1.0 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入50%甲醇50 mL, 密塞, 称定质量, 超声(功率: 250 W, 频率: 40 kHz)处理40 min, 放冷, 用50%甲醇补足缺失的质量, 摇匀, 经0.22 μm微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取“2.2.2”项下供试品溶液(编号: S3)适量, 按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次, 以丹皮酚峰的保留时间和峰面积为参照, 记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果, A、B、C厂各10批有效期内样品的HPLC图谱的24、29、32个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3% (n=6), 表明本方法精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取“2.2.2”项下供试品溶液(编号: S3)适量, 分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定, 以丹皮酚峰的保留时间和峰面积为参照, 记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果, A、B、C厂各10批有效期内样品的HPLC图谱的24、29、32个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3% (n=6), 表明供试品溶液在室温下放置24 h内基本稳定。

2.3.3 重复性试验 精密称取样品(编号: S3)粉末适量, 共6份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 以丹皮酚峰的保留时间和峰面积为参照, 记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果, A、B、C厂各10批有效期内样品的HPLC图谱的24、29、32个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3% (n=6), 表明本方法重复性良好。

2.4 A、B、C厂有效期内样品的HPLC指纹图谱的生成与共有峰相关分析、相似度分析

2.4.1 HPLC 指纹图谱的生成 取30批有效期内样品粉末各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 A)对30批样品的HPLC图谱进行分析,得HPLC指纹图谱,详见图1、图2。

2.4.2 共有峰相关分析 由图2可知,A厂样品标定24个共有峰,其中峰9、14、15、16、23分别为黄柏碱、芒果苷、马钱苷、小檗碱、丹皮酚;B厂样品标定29个共有峰,其中峰10、20、21、22、28分别为黄柏碱、芒果苷、马钱苷、小檗碱、丹皮酚;C厂样品标定32个共有峰,其中峰12、19、20、24、31分别为黄柏碱、芒果苷、马钱苷、小檗碱、丹皮酚。

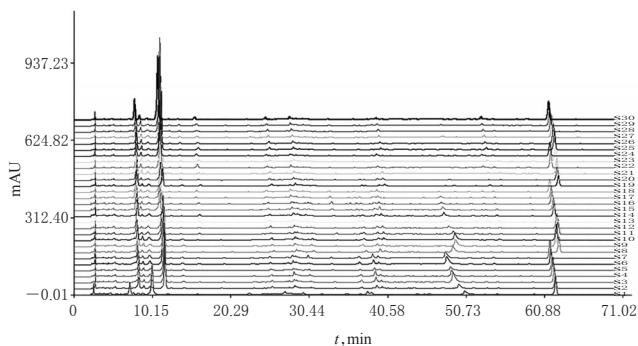
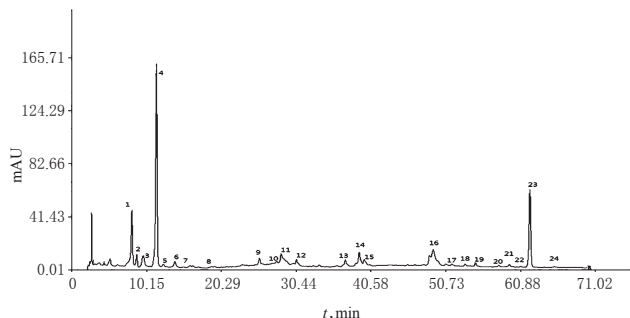
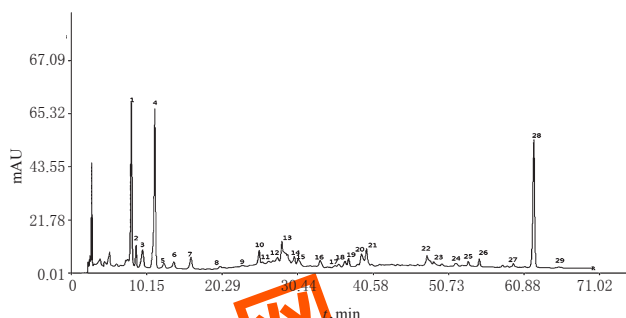


图1 30批有效期内样品的HPLC叠加指纹图谱

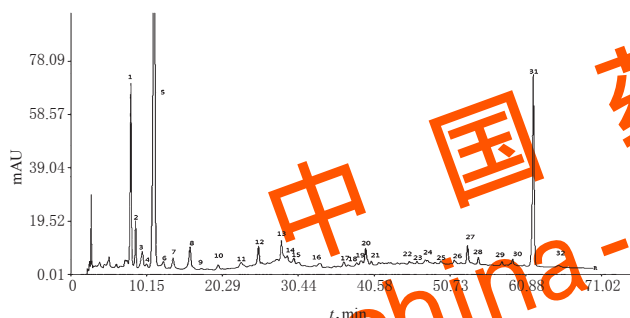
Fig 1 Superposed HPLC fingerprints of 30 batches of samples within validity period



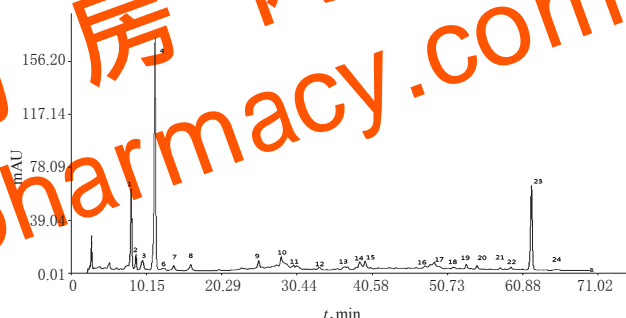
A. A厂样品



B. B厂样品



C. C厂样品



D. A、B、C厂样品

图2 有效期内样品的HPLC对照指纹图谱

Fig 2 HPLC control fingerprints of samples within validity period

2.4.3 相似度分析 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 A),分别以样品S1、S11、S21的HPLC图谱作为对照,对A、B、C厂各10批有效期内样品进行整

体相似度评价。结果显示,A、B、C厂样品相似度均大于0.94,表明A、B、C厂各自样品的批间差异较小,质量稳定性良好,详见表3~表5。

表3 A厂有效期内样品相似度评价结果

Tab 3 Similarity evaluation results of samples from manufacturer A within validity period

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照
S1	1.000	0.998	0.924	0.998	0.954	0.990	0.999	0.959	0.998	0.994	0.995
S2	0.998	1.000	0.929	0.992	0.952	0.993	0.995	0.950	0.999	0.995	0.994
S3	0.924	0.929	1.000	0.914	0.901	0.931	0.922	0.891	0.930	0.930	0.944
S4	0.998	0.992	0.914	1.000	0.951	0.981	0.998	0.964	0.991	0.988	0.991
S5	0.954	0.952	0.901	0.951	1.000	0.978	0.965	0.993	0.964	0.977	0.975
S6	0.990	0.993	0.931	0.981	0.978	1.000	0.990	0.969	0.997	0.999	0.996
S7	0.999	0.995	0.922	0.998	0.965	0.990	1.000	0.972	0.996	0.995	0.996
S8	0.959	0.950	0.891	0.964	0.993	0.969	0.972	1.000	0.961	0.972	0.975
S9	0.998	0.999	0.930	0.991	0.964	0.997	0.996	0.961	1.000	0.998	0.997
S10	0.994	0.995	0.930	0.988	0.977	0.999	0.995	0.972	0.998	1.000	0.998
对照	0.995	0.994	0.944	0.991	0.975	0.996	0.996	0.975	0.997	0.998	1.000

表4 B厂有效期内样品相似度评价结果

Tab 4 Similarity evaluation results of samples from manufacturer B within validity period

编号	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	对照
S11	1.000	0.997	0.967	0.792	0.967	0.982	0.996	0.965	0.924	0.992	0.991
S12	0.997	1.000	0.966	0.820	0.957	0.993	0.999	0.965	0.947	0.989	0.997
S13	0.967	0.966	1.000	0.656	0.993	0.945	0.967	0.999	0.942	0.992	0.981
S14	0.892	0.920	0.956	1.000	0.619	0.867	0.920	0.959	0.991	0.925	0.991
S15	0.967	0.957	0.993	0.919	1.000	0.924	0.957	0.990	0.899	0.990	0.967
S16	0.982	0.993	0.945	0.867	0.924	1.000	0.994	0.946	0.966	0.969	0.990
S17	0.996	0.999	0.967	0.820	0.957	0.994	1.000	0.966	0.951	0.989	0.997
S18	0.965	0.965	0.999	0.659	0.990	0.946	0.966	1.000	0.948	0.990	0.981
S19	0.924	0.947	0.942	0.891	0.899	0.966	0.951	0.948	1.000	0.937	0.965
S20	0.992	0.989	0.992	0.925	0.990	0.969	0.989	0.990	0.937	1.000	0.993
对照	0.991	0.997	0.981	0.891	0.967	0.990	0.997	0.981	0.965	0.993	1.000

表5 C厂有效期内样品相似度评价结果

Tab 5 Similarity evaluation results of samples from manufacturer C within validity period

编号	S21	S22	S23	S24	S25	S26	S27	S28	S29	S30	对照
S21	1.000	0.934	0.994	0.952	0.983	0.991	0.988	0.958	0.936	0.919	0.988
S22	0.934	1.000	0.916	0.997	0.903	0.908	0.902	0.994	0.999	0.998	0.976
S23	0.994	0.916	1.000	0.931	0.997	0.999	0.999	0.935	0.917	0.905	0.981
S24	0.952	0.997	0.931	1.000	0.915	0.923	0.916	0.999	0.998	0.991	0.984
S25	0.983	0.903	0.997	0.915	1.000	0.997	0.998	0.917	0.904	0.896	0.972
S26	0.991	0.908	0.999	0.923	0.997	1.000	0.999	0.927	0.909	0.897	0.977
S27	0.988	0.902	0.999	0.916	0.998	0.999	1.000	0.920	0.903	0.892	0.973
S28	0.958	0.994	0.935	0.999	0.917	0.927	0.920	1.000	0.995	0.985	0.985
S29	0.936	0.999	0.917	0.998	0.904	0.909	0.903	0.995	1.000	0.998	0.977
S30	0.919	0.998	0.905	0.991	0.896	0.897	0.892	0.985	0.998	1.000	0.969
对照	0.988	0.976	0.981	0.984	0.972	0.977	0.973	0.985	0.977	0.969	1.000

2.5 A厂有效期内与有效期外样品的HPLC指纹图谱的生成与相似度分析

2.5.1 HPLC指纹图谱的生成 取A厂5批有效期内样品与5批有效期外样品粉末各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”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》(2004 A)对10批样品的HPLC图谱进行分析,得HPLC指纹图谱,详见图3、图4。

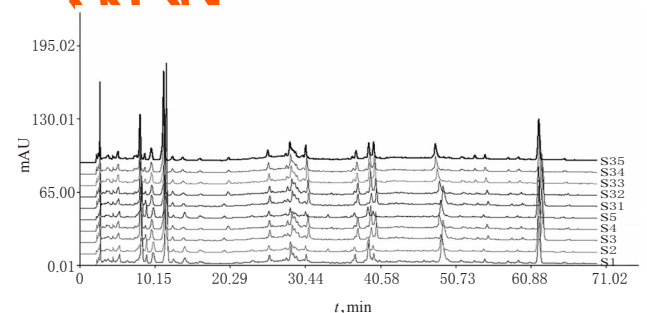


图3 A厂10批有效期内与有效期外样品的HPLC叠加指纹图谱

Fig 3 Superposed HPLC fingerprint of 10 batches of samples from manufacturer A within validity period and out of validity period

2.5.2 相似度分析 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 A),以10批样品的共有模式作为对照,进行整体相似度评价。结果显示,有效期内与有效期外

样品的相似度均大于0.96,说明有效期内与有效期外样品的主要成分没有明显差异,详见表6。

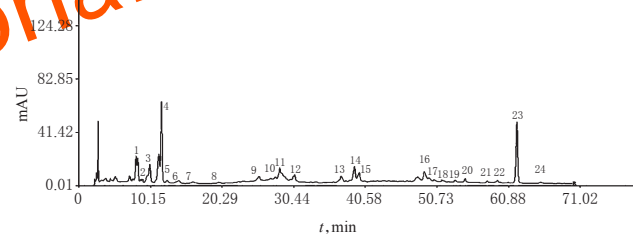


图4 A厂有效期内与有效期外样品的HPLC对照指纹图谱

Fig 4 HPLC control fingerprint of samples from manufacturer A within validity period and out of validity period

3 讨论

科学的中药制剂质量控制与评价方法是保证中药制剂临床用药安全、有效和质量稳定、可控的重要前提。而中药制剂是一种多组分相互作用的特殊药品,具有复杂性、整体性等特征,其质量控制及评价方法应体现自身的特点。目前,2015年版《中国药典》(一部)中有关中药制剂质量控制的方法大多采用某个或某几个化学成分的含量来作为其质量是否合格的评价标准,不符合其整体性特征,也不能真实反映其质量。因此中药制剂至今未得到国际主流药品市场的认可。中药现代化

表6 A厂有效期内与有效期外样品相似度评价结果

Tab 6 Similarity evaluation results of samples from manufacturer A within validity period and out of validity period

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S31	S32	S33	S34	S35	对照
S1	1.000	0.974	0.989	0.999	0.989	0.997	0.949	0.995	0.995	0.997	0.999
S2	0.974	1.000	0.997	0.974	0.997	0.955	0.871	0.947	0.951	0.956	0.967
S3	0.989	0.997	1.000	0.989	0.998	0.976	0.905	0.970	0.972	0.976	0.984
S4	0.999	0.974	0.989	1.000	0.989	0.997	0.949	0.995	0.995	0.997	0.999
S5	0.989	0.997	0.998	0.989	1.000	0.976	0.905	0.970	0.972	0.976	0.984
S31	0.997	0.955	0.976	0.997	0.976	1.000	0.968	0.999	0.997	0.982	0.999
S32	0.949	0.871	0.905	0.949	0.905	0.968	1.000	0.973	0.973	0.969	0.963
S33	0.995	0.947	0.970	0.995	0.970	0.999	0.973	1.000	0.993	0.996	0.998
S34	0.995	0.951	0.972	0.995	0.972	0.997	0.973	0.993	1.000	0.999	0.998
S35	0.997	0.956	0.976	0.997	0.976	0.982	0.969	0.996	0.999	1.000	0.999
对照	0.999	0.967	0.984	0.999	0.984	0.999	0.963	0.998	0.998	0.999	1.000

就是根据中药成分复杂的特点,将传统的中医药理论与现代科学技术相结合,构建一套符合中药特点的质量控制与评价体系,以保障其质量的稳定与可控。光谱及色谱指纹图谱可以在一定程度上反映待测对象中包括物质的多少及含量高低等信息,是一种相对综合、整体的质量评价方法^[3-5]。本研究即利用HPLC指纹图谱法对A、B、C厂生产的有效期内样品的化学成分进行了分析。结果表明,3个厂样品质量整体上具有相对一致性。

本研究还分析了A厂生产的有效期内与有效期外样品(提取溶剂为50%甲醇溶液)的HPLC指纹图谱信息,发现两者并没有明显差异,原因可能是:(1)两种样品的化学成分并没有发生改变,而只是在物理或者生物性状方面发生了变化;(2)两种样品的化学成分有差异,但50%甲醇溶液提取物的HPLC指纹图谱信息所反映的化学成分并没有发生改变,而这种改变来源于其他部位化学成分,但本方法无法检测到。2015年版《中国药典》(一部)规定丹皮酚和马钱苷的含量为评价本样品质量是否合格的指标,而提取这两个成分所用的溶剂均为甲醇,因此,如果在样品的市场流通和使用过程中,均以这两个成分的含量作为评价标准的话,就有可能使大量已超出有效期的样品流入市场,不仅影响药物的临床疗效,而且给用药安全带来了极大的隐患。

药品有效期的合理制定是保证药品安全、有效使用的前提。中药制剂要想走出国门,走向国际市场,必须符合国际行业标准^[6]。中药成分复杂,而且在放置过程中可能会产生许多复杂的物理、化学及生物学变化,那

么中药制剂有效期制定过程中所采用的评价方法是否能够反映其真实质量的变化?这种变化与中药制剂的临床疗效及安全性之间有何关系?这一系列问题^[7-8]仍有待解决。因此,当前迫切需要建立一套科学、合理的评价中药制剂有效期的方法。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:1069.
- [2] 程翼宇,钱忠直,张伯礼. 创建以过程管控为核心的中药质量控制技术体系[J]. 中国中药杂志,2017,42(1):1-4.
- [3] 谢彩侠,王丽娜,刘蕊,等. NIRS与HPLC指纹图谱技术在玉米须质量分析中的应用[J]. 药物分析杂志,2017,36(2):356-358.
- [4] 刘清茹,谭伟民,文诗泳,等. 枳壳药材挥发油的GC-MS指纹图谱研究[J]. 中国药房,2018,29(4):461-464.
- [5] 郑丁丁,张小梅,杨怡火,等. 火把花根片中间体的HPLC指纹图谱研究[J]. 中国药房,2017,28(33):4714-4717.
- [6] 宋广大,袁燕芳,孙玉雯. 浅谈制定中药有效期的重要性及策略[J]. 内蒙古中医药,2015,24(11):111-112.
- [7] 王金梅,姚辰,李昌勤,等. 经典恒温法预测红花的有效期[J]. 天然产物研究与开发,2017,29(2):273-277.
- [8] 黄勤挽,苏娟,范润勇,等. 不同包装和贮藏条件对熟地黄小包装饮片有效期的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(7):31-34.

(收稿日期:2018-01-03 修回日期:2018-03-21)

(编辑:张静)