

肉桂配方颗粒的HPLC指纹图谱研究^Δ

曾超^{1*}, 陆东², 段伟昌², 蓝晓庆², 韦红言², 何翊², 杨梅², 周永强², 温庆伟² [1. 广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530023; 2. 培力(南宁)药业有限公司, 南宁 530007]

中图分类号 R283.62⁷;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)07-0635-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.07.20

摘要 目的: 建立肉桂配方颗粒的指纹图谱。方法: 采用反相高效液相色谱法。色谱柱为 Thermo Hypersil ODS-2(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(28:72, V/V), 检测波长为 280 nm, 流速为 1.0 ml/min, 进样量为 10 μl。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004A版)》对 10 批样品进行相似度评价。结果: 10 批肉桂配方颗粒共检出 4 个共有指纹峰, 并指出其中桂皮醛、肉桂酸、香豆素 3 个化学成分。10 批样品指纹图谱的相似度均 > 0.900。结论: 所建指纹图谱重复性好, 可作为肉桂药材及其配方颗粒的质量控制方法。

关键词 肉桂; 配方颗粒; 反相高效液相色谱法; 指纹图谱

Study on HPLC Fingerprint of *Cinnamomum cassia* Formula Granules

ZENG Chao¹, LU Dong², DUAN Wei-chang², LAN Xiao-qing², WEI Hong-yan², HE Yi², YANG Mei², ZHOU Yong-qiang², WEN Qing-wei² (1. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of TCM, Nanning 530023, China; 2. Pur-aPharm (Nanning) Pharmaceuticals Co., Ltd., Nanning 530007, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the fingerprint of *Cinnamomi cassia* formula granules. METHODS: RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on Thermo hypersil ODS-2(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with acetonitrile-0.1% phosphoric acid(28:72, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 280 nm and sample size was 10 μl. The similarity of 10 batches of samples were evaluated by using Similarity Calculation Software of TCM Chromatogram Fingerprint (2004 A edition). RESULTS: 4 common peaks were identified in 10 batches of samples, and 3 chemical compounds were identified, such as cinnamyl aldehyde, cinnamic acid, coumarin. The similarity of fingerprint were all higher than 0.900. CONCLUSIONS: HPLC fingerprint is reproducible, and a suitable method for quality control of *C. cassia* and *C. cassia* formula granules.

KEYWORDS *Cinnamomi cassia*; Formula granules; RP-HPLC; Fingerprint

为了提高分析对象的提取率, 减少杂质的干扰, 本试验以甲醇为提取溶剂, 以胡椒碱的提取率为指标, 分别比较了加热回流法与超声提取法的提取效果。结果显示, 在相同时间内, 回流提取法比超声提取法的提取率低 8%, 且超声提取法操作简单方便、提取时间较短、各操作参数可控、提取过程重复性较好, 有助于实现图谱的高重复性, 因此选择了超声提取法提取样品。

综上, 本试验采用 HPLC 法测定了萆薢根中胡椒碱的含量, 方法简便、快速、准确、重复性好, 可为今后开发维药萆薢根提供科学依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2010 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 161.
- [2] 呼日乐巴根. 胡椒碱的药理作用研究概况[J]. 中国民族医药杂志, 2009, 15(2): 68.

Δ 基金项目: 广西千亿元产业重大科技攻关项目(No. 桂科攻 11107009-2-7)

* 主管中药师。研究方向: 中药鉴定学。电话: 0771-5848422。E-mail: liujie882144@163.com

通信作者: 高级工程师, 博士。研究方向: 中药药效物质基础及中药配方颗粒质量标准。电话: 0771-3218026。E-mail: wqw760623@163.com

药杂志, 2009, 15(2): 68.

- [3] 赵小原, 其其格, 白音夫. 萆薢对大鼠寒冷型应激性胃黏膜损伤保护作用及病理改变的观察[J]. 中国民族医药杂志, 2004, 10(3): 28.
- [4] 国家中医药管理局. 中华本草: 维吾尔药卷[M]. 1 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 251.
- [5] 姚萍, 高鸿亮, 刘发. 萆薢根对胆汁反流胃炎大鼠模型的防治作用及对胃泌素、PGE₂、TNF-α、IL-8 含量的影响[J]. 中药药理与临床, 2012, 28(1): 111.
- [6] 包照日格图, 吴恩. 萆薢拔油非皂化物对小鼠高脂血症的影响[J]. 中草药, 1992, 23(4): 197.
- [7] 陈显慧, 王海梅, 李月廷, 等. 萆薢油非皂化物对大鼠血清高密度脂蛋白胆固醇的影响[J]. 中国民族医药杂志, 1997, 3(2): 45.
- [8] 郝福明. 关于萆薢的蒙医中医药用分析[J]. 中国民族医药杂志, 2001, 7(4): 16.
- [9] 马建春, 何伟, 李勇, 等. 萆薢中胡椒碱提取工艺研究[J]. 中国药房, 2010, 21(35): 3 295.

(收稿日期: 2013-09-29 修回日期: 2013-12-17)

中药配方颗粒是近年来出现的一种中药饮片的补充形式,它是用符合炮制规范的传统中药饮片作为原料,经现代制药技术提取、浓缩、分离、干燥、制粒等步骤精制而成的纯中药制品。它具有携带与服用方便、起效迅速、疗效确切等优点,同时能保证传统复方的“原汁原味”,满足医师进行辨证论治、随证加减的需要,故近年来在美国、欧洲、澳大利亚、韩国、日本等国家和台湾、香港地区发展极快。但是,中药饮片经过一系列现代制药工艺制成配方颗粒后,失去了原有的大部分外观、显微及理化特征,无法再用常规技术手段(如显微观察、理化反应等)进行有效的鉴别。如果仅仅按照《中国药典》规定对其指标成分进行含量测定,则较难全面地判定产品的真伪与优劣,给药品的质量控制和监管造成一定的困难。因此,制定具有专属性强、重复性好、有效、可行的技术方法来控制中药配方颗粒原材料与产品的质量就显得尤为重要。

肉桂,始载于《神农本草经》^[1],列为上品,为樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥树皮,性平,味辛、甘,具有补火助阳、引火归元、散寒止痛、温通经脉之功效^[2]。有关肉桂配方颗粒的质量控制方法尚未见研究报道,故本课题组采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法建立了肉桂配方颗粒的指纹图谱。

1 材料

1.1 仪器

1100 型 HPLC 仪,包括四元梯度泵、可变波长检测器(VWD)、在线脱气机、柱温箱、自动进样器(美国 Agilent 公司);UV-3101PC 型 UV-Vis 分光光度计(日本 Shimadzu 公司);KQ500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

10 批肉桂配方颗粒由培力(南宁)药业有限公司提供,样品编号(批号)分别为 S1(A080040)、S2(A080797)、S3(082135)、S4(A090746)、S5(A100237)、S6(A100702)、S7(A101184)、S8(A101471)、S9(A110498)、S10(A120868);桂皮醛、肉桂酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110786-200503、111710-200513,供含量测定用);香豆素对照品(成都曼斯特生物科技有限公司,批号: MUST-1007260,纯度:98.40%);甲醇(色谱纯,美国 Merck 公司);水为超纯水,磷酸等其他试剂均为分析纯。

1.3 药材

肉桂药材购自南宁千金子中草药有限公司(批号: 110419),产地为广西,经广西壮族自治区食品药品监督管理局韦家福副主任药师鉴定为樟科植物肉桂 *C. cassia* Presl 的干燥树皮。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Thermo hypersil ODS-2(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1% 磷酸溶液(28:72, V/V); 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 30 °C; 检测波长: 280 nm; 进样量: 10 μl; 采集时间: 35 min。

2.2 混合对照品溶液的制备

取桂皮醛、肉桂酸、香豆素对照品各适量,精密称定,加甲醇制成每 1 ml 含桂皮醛 0.10 mg、肉桂酸 0.25 mg、香豆素 0.15 mg 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取肉桂配方颗粒约 2.0 g,加稀乙醇 25 ml,超声处理(功率:100 W,频率:50 kHz)30 min,取出,放冷,摇匀,滤过,取续滤液,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,作为肉桂配方颗粒的供试品溶液。

另取肉桂药材粉末(过四号筛)约 2.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加稀乙醇 25 ml,同法制成肉桂药材的供试品溶液。

2.4 检测波长的选择

采用 UV-Vis 分光光度计分别对肉桂配方颗粒供试品溶液与肉桂药材供试品溶液进行扫描,发现在 280 nm 波长处均有最大的紫外吸收(见图 1)。因此,选择 280 nm 作为检测波长。

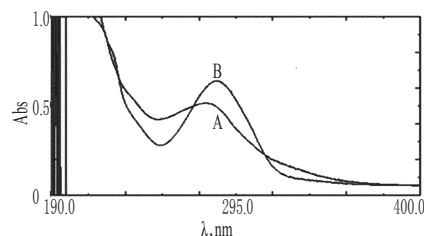


图 1 肉桂药材和肉桂配方颗粒的最大吸收波长紫外扫描图
A.肉桂配方颗粒;B.肉桂药材

Fig 1 Maximum absorption wavelength UV scanning spectrum of *C. cassia* and *C. cassia* formula granules

A. *C. cassia* formula granules; B. *C. cassia*

2.5 特征峰的选择

为了科学、全面地反映产品与原药材质量的相关性,笔者对肉桂配方颗粒与肉桂药材的共有峰进行研究:精密吸取两种供试品溶液各 10 μl,注入液相色谱仪,分别采集指纹图谱。结果表明,肉桂配方颗粒色谱图中有 4 个特征峰均可在肉桂药材的色谱图中得到追踪,充分表明了肉桂配方颗粒与肉桂药材在化学成分上的相似性,且各峰分离度好;通过与对照品色谱峰比对,指认出“cinnamyl dldehyde(桂皮醛)”“cinnamic acid(肉桂酸)”“coumarin(香豆素)”3 个化学成分的色谱峰(见图 2)。因此,该方法可作为肉桂配方颗粒质量控制的技术手段。

2.6 指纹图谱的建立

2.6.1 指纹图谱的采集 取 10 批肉桂配方颗粒各适量,分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液,参照《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》建立其 HPLC 指纹图谱:精密吸取供试品溶液 10 μl,注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定,记录 35 min 内的图谱。10 批肉桂配方颗粒的 HPLC 指纹图谱见图 3。

2.6.2 参照峰的选择 由于峰 3 所指成分(cinnamyl dldehyde, 肉桂醛)为肉桂配方颗粒中主要的醛类成分,在 HPLC 图中分离度较好,且含量较高、稳定,故选择峰 3 为参照峰(S)。

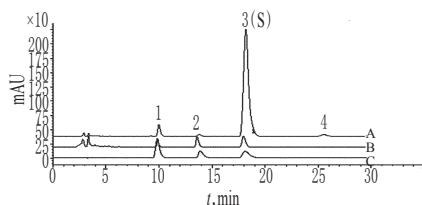


图2 肉桂药材、肉桂配方颗粒与混合对照品的HPLC图
A.肉桂药材;B.肉桂配方颗粒(批号:A110498);C.混合对照品;1.香豆素;2.肉桂酸;3.桂皮醛;4.未知成分

Fig 2 HPLC chromatograms of *C. cassia*, *C. cassia* formula granules and mixed control

A.*C. cassia*;B.*C. cassia* formula granules(A110498); C. mixed control;1. coumarin;2.cinnamic acid;3.cinnamyl dldehyde;4.unknown composition

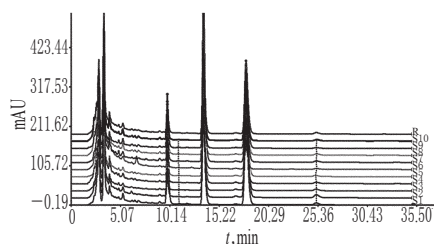


图3 10批肉桂配方颗粒的HPLC指纹图谱

Fig 3 HPLC fingerprint of 10 batches of *C. cassia* formula granules

2.6.3 共有指纹峰的标定 采用国家药典委员会推荐的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)》软件自动匹配10批肉桂配方颗粒HPLC图谱的相关参数,标定其中匹配数目为4的色谱峰为共有指纹峰,可得10批样品中共有指纹峰的峰面积均大于色谱峰总面积的90%。选择批号为A110498样品的图谱为参照图谱,以平均数法作为对照指纹图谱的生成方法,设定时间窗宽度为0.10 min,提取它的共有指纹峰模式,建立指纹图谱。根据数据分析结果,最终标定4个共有指纹峰。以肉桂醛峰为参照峰(S),计算各峰的相对保留时间平均值和相对峰面积平均值,结果见表1(表中“-”表示未识别峰)。

表1 共有指纹峰的相对保留时间与相对峰面积平均值

Tab 1 Relative retention time and relative peak area of common peaks

峰号	相对保留时间	相对峰面积	化学成分名称
峰1	0.55	0.24	香豆素
峰2	0.76	1.08	肉桂酸
峰3	1.00	1.00	桂皮醛
峰4	1.40	0.03	-

2.6.4 指纹图谱的相似度计算 采用相关系数法对10批肉桂配方颗粒指纹图谱的相似度进行计算^[3-4],结果见表2。

由表2可见,各批样品的相似度均>0.900,表明不同批次肉桂配方颗粒的一致性与重复性较好。

2.6.5 相对保留时间与相对峰面积的计算 10批肉桂配方颗粒4个共有峰的相对保留时间和相对峰面积分别见表3、表4。

2.7 方法学考察

2.7.1 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液(批号:

表2 10批肉桂配方颗粒的相似度计算结果

Tab 2 The similarity of 10 batches of *C. cassia* formula granules

序号	样品编号	相似度	序号	样品编号	相似度
1	S1	0.944	6	S6	0.905
2	S2	0.956	7	S7	0.918
3	S3	0.967	8	S8	0.999
4	S4	0.972	9	S9	0.992
5	S5	0.980	10	S10	0.985

表3 10批肉桂配方颗粒的相对保留时间

Tab 3 Relative retention time of 10 batches of *C. cassia* formula granules

样品编号	峰1	峰2	峰3(S)	峰4
S1	0.55	0.76	1.00	1.40
S2	0.55	0.76	1.00	1.40
S3	0.55	0.76	1.00	1.40
S4	0.55	0.76	1.00	1.40
S5	0.55	0.76	1.00	1.40
S6	0.55	0.76	1.00	1.40
S7	0.55	0.76	1.00	1.40
S8	0.55	0.76	1.00	1.40
S9	0.55	0.76	1.00	1.40
S10	0.55	0.76	1.00	1.40
平均值	0.55	0.76	1.00	1.40

表4 10批肉桂配方颗粒的相对峰面积

Tab 4 Relative peak area of 10 batches of *C. cassia* formula granules

样品编号	峰1	峰2	峰3(S)	峰4
S1	0.70	0.77	1.00	0.03
S2	0.11	0.67	1.00	0.03
S3	0.08	0.52	1.00	0.02
S4	0.17	1.37	1.00	0.04
S5	0.13	0.58	1.00	0.02
S6	0.28	2.29	1.00	0.06
S7	0.19	2.05	1.00	0.03
S8	0.26	0.96	1.00	0.03
S9	0.33	0.71	1.00	0.02
S10	0.20	0.88	1.00	0.03
平均值	0.24	1.08	1.00	0.03

A110498)适量,按上述色谱条件连续进样测定6次,记录色谱图。结果显示,各共有指纹峰相对保留时间的RSD<0.01%,相对峰面积的RSD<3.00%,连续进样6次测得的指纹图谱与其所得共有模式图谱的相似度分别为0.997、0.997、0.999、0.999、0.999、0.999,RSD=0.10%(n=6),表明本方法精密度良好,符合指纹图谱技术要求。

2.7.2 重复性试验 精密称取同一批肉桂配方颗粒(批号:A110498)适量,按“2.3”项下方法平行制备6份供试品溶液,分别按上述色谱条件进样测定,记录色谱图。结果显示,各共有指纹峰相对保留时间的RSD<0.01%,相对峰面积的RSD<3.00%,测得的指纹图谱与其所得共有模式图谱的相似度均为1.000,表明本方法重复性良好,符合指纹图谱技术要求。

2.7.3 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液(批号:

A110498)适量,分别于0、4、8、12、16 h按上述色谱条件进样测定,记录色谱图。结果显示,各共有指纹峰相对保留时间的RSD<0.01%,相对峰面积的RSD<3.00%,测得的指纹图谱与其所得共有模式图谱的相似度分别为0.955、0.975、0.973、0.956、0.982,RSD=1.25%(n=5),表明供试品溶液在16 h内基本稳定。

2.8 小结

本研究所指认的肉桂药材与肉桂配方颗粒的4个共有特征峰,经过多批次产品验证,各峰重复性好,相对保留时间稳定:1(0.55)、2(0.76)、3(S,1.00)、4(1.40),可以作为该品种原料与产品指纹图谱的共有峰,用于生产各环节的质量控制。

3 讨论

目前,应用于中药配方颗粒鉴别的技术方法报道较少,仅有薄层色谱(TLC)、傅里叶变换红外光谱(FT-IR)、HPLC指纹图谱等少数几种^[6-11]。前两者具有操作简单、快速等优点,但专属性不是很强,较难全面反映从原药材加工到中药配方颗粒整个生产过程中化学成分上的细微差异。而HPLC指纹图谱技术方法较成熟,弥补了前两者的不足,从化学成分角度去体现中药材(或饮片)、中药煎剂与中药配方颗粒的相似(或差异)性,操作也不复杂;更重要的是,它给多年来一直困扰大家的“中药饮片与中药配方颗粒是否等质”等争议性问题提供了有力的证据,也逐渐得到了国家药监部门的认可和推崇。

本研究考察比较了乙腈-水梯度洗脱与乙腈-0.1%磷酸溶液等度洗脱获得的肉桂配方颗粒的HPLC图谱^[11]。结果表明,以乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相进行等度洗脱,基线平稳,各成分峰分离度较好,故选其作为流动相。

综上,本研究对肉桂配方颗粒进行指纹图谱分析,共标出4个共有指纹峰,鉴定出其中3种成分,10批样品的相似度均>0.900,说明不同批次肉桂配方颗粒的化学组成一致性较

好。本方法简便、可靠、分离效果好,所建立的指纹图谱具有较好的稳定性、可控性和重复性,可作为肉桂药材及其配方颗粒的质量控制方法。

参考文献

- [1] 中国药科大学,中国医药科技出版社.中药辞海:第一卷[M].北京:中国医药科技出版社,1993:2105.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:127.
- [3] 关洪月,李林,刘晓,等.中药指纹图谱相似度计算方法探析[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(18):282.
- [4] 詹雪艳,史新元,段天璇,等.色谱指纹图谱相似度方法的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(2):248.
- [5] 崔京,霍立茹,郑朝华,等.采用GC法建立肉桂药材中挥发油及其 β -环糊精包合物的指纹图谱[J].药学进展,2006,30(4):175.
- [6] 金宏,于慧荣,公衍玲.肉桂挥发油GC-MS指纹图谱研究[J].中国林副特产,2010(5):28.
- [7] 毕晓黎,罗文汇,谭志灿.红外光谱对广藿香配方颗粒的鉴别研究[J].中国医药指南,2011,9(9):177.
- [8] 胥爱丽,毕晓黎,罗文汇,等.菊花配方颗粒的HPLC指纹图谱研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(4):80.
- [9] 毕晓黎,胥爱丽,李养学.三七配方颗粒的HPLC指纹图谱研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(9):54.
- [10] 李洁,罗文汇,毕晓黎,等.FT-IR法对砂仁配方颗粒的鉴别研究[J].湖南中医杂志,2012,28(2):102.
- [11] 方琴,魏刚,丁平,等.肉桂GC特征指纹图谱方法学研究[J].中药新药与临床药理,2006,17(3):188.

(收稿日期:2013-01-10 修回日期:2013-03-15)

国家卫生和计划生育委员会等六部门召开电视电话会议 总结打击非法行医专项行动集中整治阶段工作

本刊讯 2014年1月21日,国家卫生和计划生育委员会(以下简称国家卫生计生委)、公安部、国家食品药品监管总局、国家中医药局、解放军总后勤部卫生部、武警部队后勤部联合召开电视电话会议,总结进一步整顿医疗秩序打击非法行医专项行动集中整治阶段工作,部署深入巩固阶段工作。全国专项行动领导小组副组长、国家卫生计生委副主任陈啸宏出席会议并讲话,全国专项行动领导小组副组长、国家卫生计生委副主任崔丽主持会议,公安部、国家卫生计生委、国家食品药品监管总局、国家中医药局、解放军总后勤部卫生部、武警部队后勤部相关负责同志出席会议。

陈啸宏充分肯定各地区、各部门密切协作,扎实开展专项行动,3个月集中整治取得了重要阶段性成效,非法行医行为

得到初步遏制,医疗秩序得到有效整顿,医疗机构和医务人员的依法执业意识进一步增强,人民群众抵制非法行医的自觉性进一步提高,为继续做好深入巩固阶段的工作奠定了坚实基础。陈啸宏指出,随着大力促进健康服务业发展、鼓励社会办医和允许医师多点执业等一系列政策措施的出台,医疗监管的任务越来越重,责任越来越大,对我们的治理能力、监管能力、执行能力提出了更高的要求。陈啸宏要求,各地区、各部门要进一步增强使命感和责任感,再接再厉,确保专项行动取得更大实效。深入巩固阶段主要抓好以下几方面工作:一是突出重点,进一步加大整治力度;二是加大宣传力度,引导广大群众安全就医;三是协作配合,强化齐抓共管的工作格局;四是标本兼治,建立健全长效监管机制。