

3 讨论

通过侧柏叶特征图谱分析发现,侧柏叶具有较稳定的特征指纹峰,大部分峰形尖锐,分离度好。其中,侧柏叶标示出 22 个特征峰,水煎液标示出 16 个特征峰。通过药材与水煎液特征图谱比较,水煎液的峰 1~5 相对峰面积比值明显高于药材,而峰 17~22 则难以检测出。通过特征峰紫外光谱分析,峰 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 为黄酮类成分。其中,以峰 16、峰 13、峰 18 为主,采用对照品定位鉴别了 5 个黄酮类特征峰(杨梅苷、异槲皮苷、槲皮苷、槲皮素、穗花杉双黄酮),其他成分的鉴别有待于进一步研究。

分别以侧柏叶及其水煎液特征图谱生成的共有模式为对照,10 批侧柏叶及其水煎液的相似度分别大于 0.99 和 0.90,相似度较高;以侧柏叶药材特征图谱为对照,分析同批次药材与其水煎液之间的相似度,则有 7 批样品的相似度大于 0.95,3 批低于 0.90,表明常规水煎提取工艺大部分能保留侧柏叶的主要特征成分。

本研究针对侧柏叶药材及水煎液特征峰的特点,在前期研究的基础上^[10],优化了流动相系统,标示出 16~22 个特征峰,为侧柏叶及含侧柏叶复方制剂质量控制提供了方法参考,同时为侧柏叶粉末及含侧柏叶复方粉末水煎液外用的物质基础研究提供了一

定的依据。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 200-201.
- [2] 魏刚, 王淑英. 侧柏叶挥发油化学成分气质联用分析[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(1): 18-19.
- [3] 单鸣秋, 钱雯, 高静, 等. UPLC-MS 分析侧柏叶中黄酮类化合物[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(12): 1626-1629.
- [4] 姚晓东. 侧柏炭质量标准及止血机理研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2009.
- [5] 公衍玲, 金宏, 王宏波. 侧柏叶挥发油提取工艺及其抑菌活性研究[J]. 化学与生物工程, 2009, 26(2): 36-38.
- [6] 梁统, 覃燕梅, 梁念慈, 等. 侧柏总黄酮的抗炎作用及机制[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(12): 1407-1410.
- [7] 丁航, 刘慧明, 梁统, 等. 侧柏叶中黄酮类化合物对 H_2O_2 诱导的人红细胞氧化作用的影响[J]. 实用临床医学, 2003, 4(3): 23-24.
- [8] 蒋继宏, 李晓储, 高雪芹, 等. 侧柏挥发油成分及抗肿瘤活性的研究[J]. 林业科学研究, 2006, 19(3): 311-315.
- [9] 粟晓黎, 林瑞超. 中药侧柏叶黄酮成分指纹图谱分析方法的研究[J]. 药物分析杂志, 2003, 23(6): 317-320.
- [10] 刘翠玲, 魏刚, 刘东辉, 等. 侧柏叶 HPLC 指纹图谱的方法学研究[J]. 中成药, 2010, 32(8): 1281-1283.
- [11] 黄彦, 梁承志, 张毅. 侧柏叶的药理学研究及其在皮肤科的运用[J]. 云南中医中药杂志, 2007, 28(3): 42-44.

(编辑: 宋威)

香草固齿酊的 HPLC 指纹图谱研究

吴淑媛, 谢 谦, 王 岩, 林钦贤, 郭小媚(广东药学院, 广东 广州 510006)

摘要: 目的 建立香草固齿酊的指纹图谱。方法 采用 HPLC 法, 色谱柱为 PLATISIL ODS 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液, 梯度洗脱; 检测波长为 250 nm; 柱温为 30 $^{\circ}$ C; 流速为 0.8 mL $\cdot$ min⁻¹。结果 指纹图谱中共有 16 个特征峰, 其中香附有 10 个特征峰, 墨旱莲有 6 个特征峰。结论 建立的指纹图谱适用于香草固齿酊的质量控制。

关键词: 香草固齿酊; 指纹图谱; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)05-0490-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.05.016

HPLC Fingerprint Analysis of Xiangcao Guchi Tincture

WU Shuyuan, XIE Qian, WANG Yan, LIN Qinxian, GUO Xiaomei (Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

收稿日期: 2013-04-21

作者简介: 吴淑媛, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药新剂型与新技术。Email: yantai20072011@163.com。通讯作者: 王岩, 博士, 教授, 主要从事药物新剂型与质量控制研究。Email: gdpuwy@126.com。

基金项目: 广东省中医药局科研基金(2010202)。

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprints of *Xiangcao Guchi* tincture. **Methods** HPLC was adopted for the fingerprint analysis, and the chromatographic conditions were as follows: PLATISIL ODS (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column, mobile phase consisting of acetonitrile–0.1 % phosphorous acid solution (gradient elution), detection wavelength at 250 nm, column temperature being 30 °C and flow rate at 0.8 mL · min⁻¹. **Results** There were 16 common characteristic peaks shown in the fingerprints. Among these peaks, 10 peaks were of *Rhizoma Cyperi* and 6 peaks were of *Herba Ecliptae*. **Conclusion** The established fingerprints can be used to control the quality of *Xiangcao Guchi* tincture.

Keywords: *Xiangcao Guchi* tincture; Fingerprints; HPLC

香草固齿酊由香附、墨旱莲二药组方而成,为广东药学院附属第一医院口腔科临床应用多年的经验方,具有祛风止痛、凉血止血、补肾固齿之功效,该制剂组方独特精炼,主要用于治疗牙周炎。现代药理研究^[1-3]表明,方中香附抗菌消炎、补肾固齿的有效成分为香附挥发油,墨旱莲抗炎有效成分为蟛蜞菊内酯^[4]。为了更好的控制香草固齿酊的质量,本研究采用高效液相色谱法建立其指纹图谱^[5-6],为香草固齿酊质量标准的制订提供依据。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(Waters 2695);色谱柱为 PLATISIL ODS 柱(柱号:5031865,迪马科技有限公司);RE-52A 型旋转蒸发器(上海亚荣化仪器厂);α-香附酮、蟛蜞菊内酯对照品,购于中国药品生物制品检定所,批号分别为:110748-201111,111885-201102;香草固齿酊 10 批,本实验组制备,批号:120911~120920;甲醇、乙腈为色谱纯;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:PLATISIL ODS(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)–0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱:0~20 min, A 体积百分数为 20%~30%;20~40 min, A 为 30%~50%;40~45 min, A 为 50%~65%;45~60 min, A 为 65%~70%;60~70 min, A 为 70%~90%;流速:0.8 mL · min⁻¹;检测波长:250 nm;柱温:30 °C;进样量:10 μL。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取 α-香附酮对照品 1.86 mg、蟛蜞菊内酯对照品 3.26 mg,加甲醇制成 α-香附酮、蟛蜞菊内酯分别为 0.0744, 0.1304 mg · mL⁻¹ 的混合溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备 取香草固齿酊 50 mL 于 100 mL 圆底烧瓶中,于旋转蒸发器中 60 °C 减压浓缩至乙醇全部蒸干,放冷,加水 50 mL 使溶解,用乙酸乙酯萃取 3 次,分别为 50, 40, 40 mL,合并上层液,

蒸干,用 60 %乙醇溶解并转移至 10 mL 量瓶中,稀释至刻度,摇匀,即得。

2.4 阴性对照溶液的制备 按处方量分别称取缺香附和缺墨旱莲的其余药材,同法制成酊剂^[7],按照 2.3 项下方法制得缺香附及缺墨旱莲的阴性对照溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 分别精密吸取上述供试品溶液 10 μL,按照上述色谱条件进行测定,连续进样 6 次。结果以 9, 15, 16 号峰的峰面积比值相对标准偏差(RSD)计,RSD 均小于 1.0 %,表明仪器精密度良好。

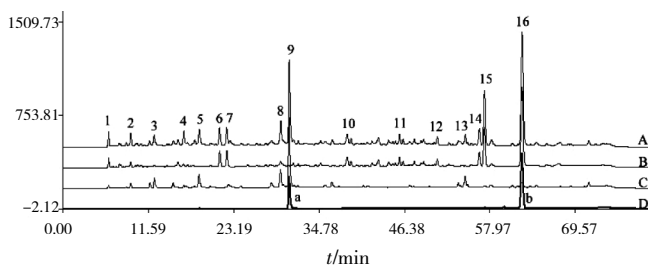
2.5.2 重复性试验 取同一批香草固齿酊 6 份(批号:120911),按照 2.3 项下方法平行制备供试品溶液,分别精密吸取 10 μL,进样测定并记录色谱图。以 9, 15, 16 号峰的峰面积比值 RSD 计,均小于 1.5 %,说明本法重复性良好。

2.5.3 稳定性试验 取同一份香草固齿酊(批号:120911)制成的供试品溶液,分别于 0, 4, 8, 12, 16, 24 h 时进样分析,每次 10 μL。以 9, 15, 16 号峰的峰面积比值 RSD 计,均小于 0.8 %,表明供试品溶液在室温放置 24 h 内保持稳定。

2.6 指纹图谱的建立

2.6.1 样品测定 取香草固齿酊 10 批(批号:120911~120920),分别按 2.3 项下方法制备供试品溶液,分别精密吸取 10 μL 注入液相色谱仪,按照上述色谱条件进行测定,并记录 80 min 内的色谱图。将所得的 HPLC 图谱 S1~S10 导入国家药典委员会《中药指纹图谱相似度评价系统 2004A》软件,对比后确定共有特征峰为 16 个。

2.6.2 共有峰的归属 比较混合对照品溶液、缺香附和缺墨旱莲阴性对照溶液及 10 批供试品溶液的色谱图,确定共有峰中属于香附的有 10 个,分别为 1, 4, 6, 7, 10, 11, 12, 14, 15, 16 号峰,其中,16 号为 α-香附酮峰;属于墨旱莲的峰有 6 个,分别为 2, 3, 5, 8, 9, 13 号峰,其中,9 号为蟛蜞菊内酯峰,见图 1。



a. 蟾蜍菊内酯; b. α -香附酮; A. 供试品; B. 缺墨旱莲阴性; C. 缺香附阴性; D. 混合对照品

图1 共有峰归属 HPLC 图

Figure 1 The relative adscription analysis of common peaks in HPLC fingerprint

2.6.3 参照峰的选择 由于 α -香附酮、蟾蜍菊内酯峰分别为香附和墨旱莲的主要有效成分,二者分离度均较好,但相比于 α -香附酮峰,蟾蜍菊内酯峰在色谱图中保留时间居中、峰面积大小也居中,故选择9号蟾蜍菊内酯峰为参照峰进行相对保留时间和相对峰面积的计算,结果见表1和表2。

表1 10批样品共有峰相对保留时间(以9号峰蟾蜍菊内酯峰为参照峰)

Table 1 Relative retention time of common peaks in fingerprints of 10 batches of samples

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	平均值	RSD/%
1	0.202	0.202	0.204	0.201	0.199	0.203	0.204	0.202	0.202	0.202	0.202	0.72
2	0.300	0.300	0.303	0.301	0.299	0.304	0.305	0.302	0.303	0.301	0.302	0.64
3	0.404	0.405	0.411	0.412	0.401	0.411	0.411	0.416	0.407	0.404	0.408	1.15
4	0.534	0.530	0.537	0.551	0.533	0.551	0.543	0.532	0.533	0.529	0.537	1.52
5	0.602	0.601	0.607	0.610	0.598	0.606	0.612	0.603	0.601	0.609	0.605	0.76
6	0.692	0.699	0.703	0.704	0.691	0.711	0.705	0.709	0.699	0.693	0.701	1.00
7	0.723	0.729	0.726	0.726	0.729	0.741	0.746	0.731	0.722	0.731	0.730	1.04
8	0.962	0.958	0.967	0.963	0.957	0.981	0.966	0.962	0.958	0.966	0.964	0.72
9(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0
10	1.255	1.251	1.263	1.263	1.249	1.277	1.272	1.264	1.252	1.251	1.260	0.77
11	1.487	1.479	1.502	1.502	1.474	1.491	1.491	1.492	1.481	1.487	1.489	0.61
12	1.653	1.652	1.666	1.655	1.650	1.671	1.655	1.647	1.653	1.646	1.655	0.48
13	1.778	1.777	1.794	1.784	1.786	1.805	1.793	1.766	1.788	1.777	1.785	0.62
14	1.840	1.844	1.865	1.844	1.851	1.859	1.858	1.836	1.856	1.845	1.850	0.51
15	1.862	1.859	1.872	1.889	1.864	1.903	1.891	1.880	1.870	1.876	1.877	0.76
16	2.029	2.035	2.052	2.059	2.037	2.063	2.047	2.021	2.035	2.025	2.040	0.70

2.7 相似度分析 将10批供试品溶液的色谱数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(国家药典委员会2004 A版)进行数据处理,选择多点校正后色谱峰自动匹配,选择中位数法,生成香草固齿酊的对照指纹图谱R。计算相似度,10批样品均为0.99以上,数据见表3,对照指纹图谱R见图2。

2.8 质量控制指标 参照《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》的相关规定,确定香草固齿酊的

表2 10批样品共有峰相对峰面积(以9号峰蟾蜍菊内酯峰为参照峰)

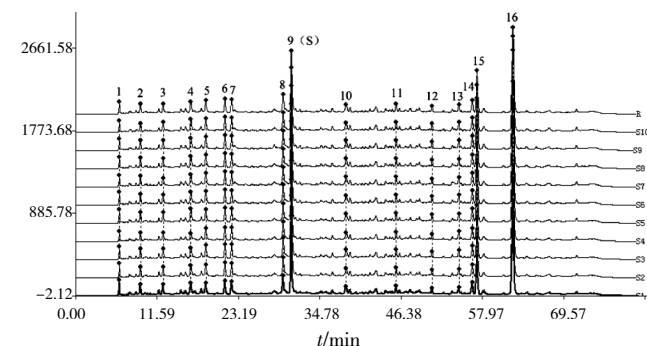
Table 2 Relative peak areas of common peaks of 10 batches of samples

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	平均值	RSD/%
1	0.140	0.127	0.108	0.083	0.118	0.105	0.093	0.098	0.097	0.099	0.106	16.01
2	0.146	0.135	0.126	0.105	0.131	0.122	0.117	0.120	0.115	0.114	0.123	9.62
3	0.121	0.112	0.103	0.083	0.107	0.101	0.092	0.099	0.097	0.088	0.100	11.27
4	0.176	0.156	0.133	0.084	0.191	0.153	0.145	0.150	0.151	0.159	0.150	18.82
5	0.163	0.163	0.175	0.159	0.176	0.164	0.166	0.156	0.161	0.164	0.165	3.86
6	0.228	0.211	0.218	0.201	0.221	0.206	0.210	0.208	0.203	0.207	0.211	4.03
7	0.199	0.202	0.208	0.196	0.205	0.201	0.195	0.192	0.180	0.181	0.196	4.79
8	0.242	0.235	0.242	0.225	0.212	0.215	0.214	0.227	0.220	0.208	0.224	5.52
9(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0
10	0.131	0.116	0.126	0.111	0.135	0.122	0.115	0.118	0.117	0.117	0.121	6.31
11	0.111	0.107	0.107	0.104	0.102	0.105	0.095	0.099	0.095	0.096	0.102	4.60
12	0.074	0.070	0.071	0.064	0.085	0.075	0.074	0.079	0.079	0.078	0.075	7.77
13	0.080	0.080	0.082	0.089	0.088	0.090	0.084	0.086	0.084	0.089	0.085	4.42
14	0.221	0.211	0.213	0.214	0.235	0.216	0.220	0.212	0.223	0.229	0.219	3.59
15	0.818	0.780	0.771	0.710	1.048	0.783	0.797	0.812	0.994	0.906	0.842	12.70
16	1.932	1.790	1.812	1.774	2.423	1.981	1.933	1.983	2.272	2.108	2.001	10.60

表3 10批样品相似度计算结果

Table 3 Results of similarity evaluation of 10 batches of samples

样品号	相似度	样品号	相似度
1	0.999	6	0.999
2	0.998	7	1
3	0.998	8	1
4	0.998	9	0.998
5	0.997	10	0.999



S1~S10为10批样品;R.对照指纹图谱

图2 10批香草固齿酊样品匹配后的 HPLC 图

Figure 2 HPLC fingerprint of 10 batches of Xiangcao Guchi tincture

质量控制具体指标有以下几条:(1)供试品图谱与对照指纹图谱R比较,其共有峰的相对保留时间差值不得大于 $\pm 10\%$;(2)非共有峰总面积不得大于总峰面积的5%;(3)供试品图谱中各共有峰面积的比值与指纹图谱各共有峰面积的比值比较,16号峰的峰面积差值不得大于 $\pm 20\%$,9,15号(下转第509页)