

祛痰止咳颗粒指纹图谱研究*

郑文燕¹, 王晓东², 彭维¹, 沈艺², 苏薇薇¹

(1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275; 2. 广州市花城制药厂, 广东 广州 510555)

摘要: 采用 HPLC 法构建了祛痰止咳颗粒指纹图谱, 色谱条件为 Elite Hypersil BDS (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇 (A) - 0.15% (φ) 冰醋酸溶液 (B) 为流动相, 线性梯度洗脱 A (15% → 75%), 流速 1.0 mL/min, 柱温 25 °C, 检测波长 260 nm。该指纹图谱中, 确定了 19 个共有峰, 并采用对照品对照法及 HPLC-ESI-MS/MS 联用技术鉴定出 10 个黄酮类化合物。构建的指纹图谱, 操作简便、准确可靠、重复性较好, 为祛痰止咳颗粒质量控制提供了科学依据。

关键词: 祛痰止咳颗粒; 高效液相色谱法; 指纹图谱

中图分类号: R96 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529 - 6579 (2011) 03 - 0098 - 04

HPLC Fingerprint of Qutanzhike Granule

ZHENG Wenyan¹, WANG Xiaodong², PENG Wei¹, SHEN Yi², SU Weiwei¹

(1. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. Guangzhou Huacheng Pharmaceutical Company Limited, Guangzhou 510515, China)

Abstract: HPLC fingerprint of Qutanzhike Granule was established with Elite Hypersil BDS column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), methanol (A) and 0.15% acetic acid (B) as mobile phase. The elution profile was: 0 ~ 95 min 15% to 75% A in B (linear gradient). The column temperature was set at 25 °C and the flow rate was 1.0 mL/min. The detective wavelength was at 260 nm. 19 common peaks were selected as the fingerprint peaks from 12 batches of the production. In the established fingerprint, 10 flavonoids were identified by the HPLC-ESI/MS/MS based on MS spectra and standard reference. The method can be used for quality control of Qutanzhike Granule with great precision, accuracy and good reproducibility.

Key words: Qutanzhike Granule; HPLC; fingerprint

祛痰止咳颗粒是广州市花城制药厂独家生产的国家中药保护品种, 具有健脾燥湿、祛痰止咳的功效; 主要用于慢性支气管炎及支气管炎合并肺气肿、肺心病所引起的痰多, 咳嗽, 喘息等症。该颗粒是由《伤寒论》和《金匱要略》中的参夏汤与十枣汤化裁而来^[1], 主要由紫花杜鹃、党参、芫花、甘遂、水半夏五味药材组成。笔者首次建立了祛痰止咳颗粒的指纹图谱质量控制方法, 解决原质量标准无法全面控制该产品质量的瓶颈问题, 并将该项指纹图谱技术应用于生产实践, 监控成品质量。

1 仪器与试剂

Dionex P680 高效液相色谱仪 (美国戴安公司, ASI-100 自动进样器、ATH-585 柱温箱、四元梯度泵、PDA-100 检测器) 及 Chromeleon 工作站; Agilent 高效液相色谱-质谱联用仪 (Agilent 1200RRLC-6410 三重四级杆串联质谱仪); BP211D 电子分析天平 (瑞士沙多利斯公司); T660/H 超声波清洗器 (美国埃玛公司)。

金丝桃苷 (批号: 111521-200303)、槲皮苷

* 收稿日期: 2010-08-05

基金项目: 广东省科技计划资助项目 (2010B050100013)

作者简介: 郑文燕 (1986 年出生), 女, 硕士研究生; 通讯作者: 苏薇薇; E-mail: lsssw@126.com

(批号: 111538 - 200403)、槲皮素(批号: 100081 - 200406)、木犀草素(批号: 111720 - 200603)对照品均购自中国药品生物制品检定所; 芹菜素(批号: 20090304)、芫花素(批号: 90007586)对照品分别购自天津尖峰天然产物研究开发有限公司和阿法埃莎化学有限公司; 12批祛痰止咳颗粒由广州市花城制药厂提供。

甲醇(美国Burdick & Jackson)为色谱纯; 甲醇(广东光华化学厂有限公司)、冰醋酸(天津市富宇精细化工有限公司)均为分析纯; 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取金丝桃苷、槲皮素、木犀草素对照品各1mg, 槲皮苷、芹菜素、芫花素对照品各2mg, 置10mL量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 制成每1mL含金丝桃苷、槲皮素、木犀草素各0.1mg, 含槲皮苷、芹菜素、芫花素各0.2mg的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取祛痰止咳颗粒10袋, 研细, 取约16g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇100mL, 密塞, 称定质量, 超声处理(功率360W, 频率35kHz)30min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液50mL, 减压回收溶剂至干, 残渣加水约5mL溶解, 定量转移至固相萃取小柱(填料: C₁₈, 规格: 6mL, 500mg), 加水20mL分次淋洗, 淋洗液弃去, 再用甲醇20mL分次洗脱, 收集洗脱液, 减压回收溶剂至干, 残渣定量加入甲醇2mL, 使完全溶解, 用0.45μm微孔滤膜滤过, 即得祛痰止咳颗粒供试品溶液。紫花杜鹃、芫花等5味药材按处方比例折算, 称取粉末, 分别制成单味药材供试品溶液以及阴性缺味的供试品溶液, 同法处理。

2.2 色谱条件

依利特Hypersil BDS C₁₈(4.6mm × 250mm, 5μm)色谱柱; 以甲醇为流动相A, 以φ=0.15%冰醋酸溶液为流动相B, 线性梯度洗脱: 0~95min, A(15%→75%); 流速为1mL/min; 检测波长: 260nm; 柱温为25℃; 进样量: 20μL。理论塔板数按以芹菜素计算不低于9000。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 按“供试品溶液的制备”方法制备祛痰止咳颗粒供试品溶液(批号: 090308), 连续进样6次, 记录HPLC色谱图, 以保留时间64min峰面积较大、较稳定的色谱峰(17号峰)芹菜素作为参照峰, 计算各特征峰相对保留时间和相对峰面积的RSD。结果各共有峰的相对保留时间RSD为0.04%~0.80%, 相对峰面积的RSD为1.06%~2.00%; 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统2004A版》进行评价, 相似度大于0.999, 表明仪器精密度好。

2.3.2 稳定性考察 按“供试品溶液的制备”方法制备祛痰止咳颗粒供试品溶液(批号: 090308), 分别在0、2、4、6、8、10、24h进样分析, 记录HPLC色谱图, 以芹菜素色谱峰为参照峰, 计算各特征峰相对保留时间和相对峰面积的RSD。结果各共有峰的相对保留时间RSD为0.01%~0.88%, 相对峰面积的RSD为1.13%~2.08%; 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统2004A版》进行评价, 相似度大于0.999, 表明供试品溶液在放置24h内稳定性好。

2.3.3 重复性试验 取同一批祛痰止咳颗粒(批号: 090308), 按“供试品溶液的制备”方法平行操作, 制备6份祛痰止咳颗粒供试品溶液, 分别进样分析, 记录HPLC色谱图, 以芹菜素色谱峰为参照峰, 计算各特征峰相对保留时间和相对峰面积的RSD。结果相对保留时间的RSD为0.05%~0.16%, 相对峰面积的RSD为1.12%~2.69%; 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统2004A版》进行评价, 相似度大于0.999, 表明该方法重复性好。

2.4 祛痰止咳颗粒指纹图谱的构建及相关技术参数

2.4.1 指纹图谱的构建 取12个批号的祛痰止咳颗粒供试品溶液, 按“2.2”项下的色谱条件进行测定, 将12批成品的数据采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统2004A版》进行评价, 确定19个共有峰并获得共有模式(参照指纹图谱)见图1。结果表明12批祛痰止咳颗粒的相似度均大于0.90, 证明祛痰止咳颗粒的生产工艺稳定, 产品的均一性较好, 结果见图2及表1。

表1 12批祛痰止咳颗粒相似度评价表

Table1 Similarity analysis result of 12 batches of Qutanzhike granule

批号	090308	090309	090311	090312	091003	091004	091005	091006	091007	091104	091105	091108
相似度	0.956	0.944	0.983	0.940	0.991	0.991	0.990	0.993	0.987	0.986	0.992	0.985

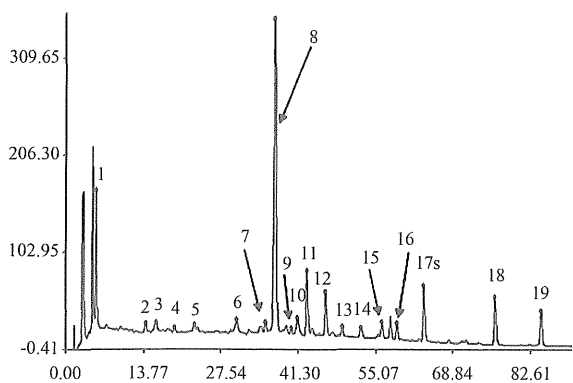


图 1 祛痰止咳颗粒的 HPLC 参照指纹图谱

Fig. 1 The referential HPLC fingerprint of Qutanzhike granule

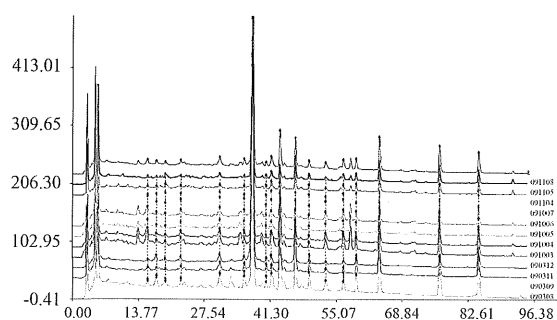


图 2 12 批祛痰止咳颗粒相似度评价结果图

Fig. 2 Similarity analysis figure of 12 batches of Qutanzhike granule

2.4.2 共有峰的标定及药材归属 分别精密吸取单味药材及阴性缺味供试品溶液, 注入液相色谱仪, 采集色谱图。通过对比分析, 19 个共有峰中, 归属于君药紫花杜鹃的色谱峰有 3 个, 分别为第 7、11、15 号峰; 归属于臣药芫花的色谱峰应有 7 个, 分别为第 6、8、9、12、15、17、19 号峰; 归属于甘遂的色谱峰应有 3 个, 分别为 2、4、5 号峰, 其中 2 号峰为党参和甘遂的共有峰, 1 号峰为所有药材的共有峰。同时, 在此分析条件下, 水半夏成分峰在图谱上没有体现, 结果见图 3、4、5。

2.4.3 色谱峰的定性分析

1) 对照品对照法 取金丝桃苷、槲皮素、木犀草素、槲皮苷、芹菜素、芫花素的混合对照品溶液及祛痰止咳颗粒供试品溶液适量, 按“2.2”项色谱条件进样分析, 采集色谱图, 根据色谱峰的保留时间定位以及化学成分的 PDA 光谱图信息对比, 确定 7 号峰、11 号峰、14 号峰、15 号峰、17 号峰、19 号峰分别为金丝桃苷、槲皮苷、槲皮素、木犀草素、芹菜素、芫花素, 结果见图 6。

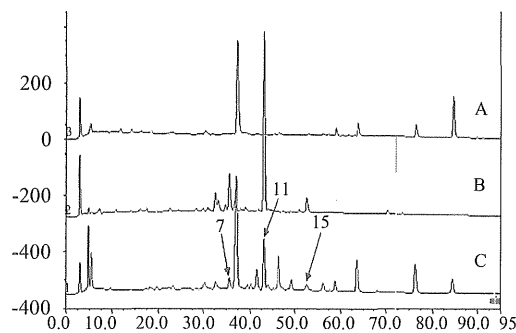


图 3 祛痰止咳颗粒指纹图谱、紫花杜鹃药材色谱图及缺紫花杜鹃阴性色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of Qutanzhike granule fingerprint、*Rhododendron mariae* Hance、negative sample without *Rhododendron mariae* Hance (A: 紫花杜鹃阴性; B: 紫花杜鹃药材; C: 祛痰止咳颗粒色谱图)

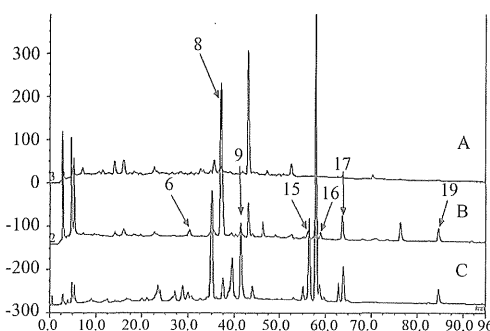


图 4 祛痰止咳颗粒指纹图谱、芫花材色谱图及缺芫花阴性色谱图

Fig. 4 HPLC chromatograms of Qutanzhike granule fingerprint、*Daphne genkwa*, Sieb. et Zucc.、negative sample without *Daphne genkwa*, Sieb. et Zucc. (A: 芫花阴性; B: 祛痰止咳颗粒; C: 芫花药材色谱图)

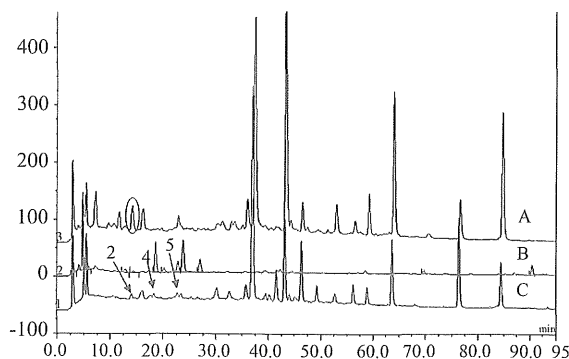


图 5 祛痰止咳颗粒指纹图谱、甘遂药材色谱图及缺甘遂阴性色谱图

Fig. 5 HPLC chromatograms of Qutanzhike granule fingerprint、*Typhonium flagelliforme* Blume、negative sample without *Typhonium flagelliforme* Blume (A: 甘遂阴性; B: 甘遂药材; C: 祛痰止咳颗粒色谱图)

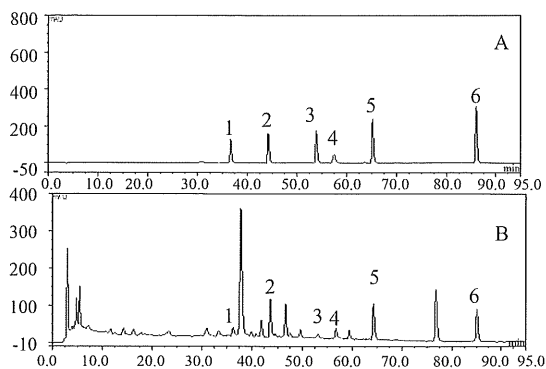


图 6 混合对照品图与标准指纹图谱
Table 6 Chromatogram of mixture of references and referential fingerprint

A 混合对照品色谱图 B 祛痰止咳颗粒色谱图
A mixture of references B Qutanzhike granule

- 1: 金丝桃苷 (Hyperoside); 2: 槲皮苷 (Quercitrin);
3: 槲皮素 (Quercetin); 4: 木犀草素 (Luteolin);
5: 芹菜素 (Apigenin); 6: 芫花素 (Genkwanin)

2) LC-ESI-MS/MS 成分鉴别 采用 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm × 50 mm, 1.8 μm) 柱, 甲醇 - 0.15% (φ) 冰醋酸溶液作为流动相, 对祛痰止咳颗粒色谱成分进行分析。ESI-MS/MS 参数: 干燥氮气温度 350 °C, 流量 13.0 L/min, 雾化器压力 40 psi, 毛细管电压 4 000 V, 扫描质量范围 m/z 100 ~ 1 000。黄酮类化合物中的羟基容易形成稳定的氧负离子, 故用负离子模式检测有较好的信噪比。通过质谱的分子离子峰、裂解碎片, 结合紫外吸收光谱特征, 相关文献^[2-7]以及对照品对照, 对颗粒中的色谱峰进行归属, 确证 6 个化学成分, 指证 4 个化学成分, 结果见表 2。

表 2 祛痰止咳颗粒化学成分质谱归属
Table 2 MS data of chemical components in Qutanzhike granule

色谱峰	化合物	相对分子质量	[M-H] ⁻	主要碎片离子
7*	金丝桃苷	464	463	299.8
8	芹菜素葡萄糖醛酸苷	446	445	268.9
11*	槲皮苷	448	447	301
12	芫根苷	578	577	283.1
14*	槲皮素	302	301	—
15*	木犀草素	286	285	—
16	槲皮素	594	593	285.3、370.7
17*	芹菜素	270	269	224.9、150.8、117.1
18	羟基芫花素	300	299	284.1
19*	芫花素	284	283	268

* 为有对照品对照

3 讨论

1) 本研究首次构建了祛痰止咳颗粒高效液相 (HPLC) 指纹图谱, 采用二元线性梯度洗脱, 在波长 260 nm 下检测出 19 个共有色谱峰。在此色谱条件下, 能同时检出祛痰止咳颗粒中紫花杜鹃、芫花、甘遂、党参四味药材, 归属于紫花杜鹃的色谱峰有 3 个, 归属于芫花的色谱峰有 7 个, 归属于甘遂的色谱峰有 3 个, 归属于党参的色谱峰有 1 个, 该峰与甘遂共有。其中, 紫花杜鹃和芫花分别为方中的君药和臣药, 药效学表明黄酮类成分为这两味药镇咳化痰的有效成分, 在该方法下能同时检出归属于芫花和紫花杜鹃药材的 10 个黄酮类成分, 解决原质量标准无法全面控制该产品质量的瓶颈问题, 为成品的内在质量提供了强有力的保障。

2) 采用 HPLC-ESI/MS/MS 及 HPLC-PDA 对祛痰止咳颗粒图谱中的色谱峰进行分析, 通过质谱的分子离子峰、裂解碎片, 结合紫外吸收光谱特征, 与对照品对照, 鉴定出指纹图谱中的 10 个化学成分: 峰确证 6 个化学成分, 分别为金丝桃苷、槲皮苷、芫根苷、槲皮素、木犀草素、芹菜素、芫花素; 指证 4 个化学成分, 分别为芹菜素 - 7 - O - β - D - 葡萄糖醛酸苷、芫根苷、槲皮素、羟基芫花素; 采用归一化法对 12 批成品指纹图谱中的共有特征峰进行统计, 已知成分的色谱峰面积之和占共有色谱峰面积总和的 66% 以上。

参考文献:

[1] 郭景仙, 贺利军, 林晓兰. 祛痰止咳颗粒临床使用情况分析[J]. 医药导报, 2007, 26(6): 678 - 681.
[2] 黄辉强, 冯毅凡, 芮雯, 等. 紫花杜鹃中黄酮类成分的 UPLC/Q-TOF-MS 分析[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(7): 875 - 878.
[3] 朱华, 肖建波, 邹登峰, 等. 硅胶柱色谱/RP-HPLC/LC-ESI-MS 分离纯化鉴定拳卷地钱中芹菜素 - 7 - O - β - D - 葡萄糖醛酸苷[J]. 中医学刊, 2005, 23(1): 20 - 22.
[4] 石枫, 郑维发. 芫花根的酚类成分及其免疫调节活性[J]. 徐州师范大学学报, 2004, 22(4): 34 - 39.
[5] 王彩芳, 李尧尧, 黄兰岚, 等. 芫花化学成分研究[J]. 中药材, 2009, 32(4): 508 - 511.
[6] 曾毅梅, 肖洁, 王金辉, 等. 芫花醋炙品中黄酮类成分的分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(5): 353 - 356.
[7] 宋丽丽, 陆娟, 颜佩芳, 等. RP-HPLC 测定芫花中 3-O-β-D-(6"-p-香豆酰)-吡喃葡萄糖苷的含量[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(3): 301 - 303.