

HH 胶囊的 HPLC 指纹图谱研究*

周道杰¹, 张传涛^{2△}, 郭尹玲¹, 杨 鸿², 范 刚¹, 王 政¹, 刘业方¹

(1. 成都中医药大学, 四川 成都 610075; 2. 成都中医药大学附属医院, 四川 成都 610072)

摘要: 目的 建立 HH 胶囊的 HPLC 指纹图谱分析方法, 拟定其指纹特征图谱指标成分群。方法 高效液相色谱法测定, 采用大连依利特 ODS-BP C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5μm), 检测波长 230 nm; 柱温 30℃; 流速 1.0 mL/min; 流动相: A 相为 0.1% 磷酸溶液, B 相为乙腈, 进行二元梯度洗脱。结果 最终标定 14 个特征峰构成 HH 胶囊的指纹图谱。通过与标准品对照, 确定其中 1 号峰为没食子酸、8 号峰为柯里拉京、9 号峰为虎杖苷、10 号峰为鞣花酸、13 号峰为甘草酸、14 号峰为齐墩果酸。结论 HPLC 法准确、可靠, 可为 HH 胶囊提供质量评价及鉴别依据, 并为其物质基础研究提供了一定参考。

关键词: HH 胶囊; 指纹图谱; 高效液相色谱

中图分类号: R284

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2015)03-0016-05

中医药是我国优势和特色。HH 胶囊是我们临床上治疗慢性乙型肝炎抗病毒的经验方, 前期研究证实具有较好的抗 HBV 作用^[1-3]。但是中药饮片质量由于受到产地、环境、污染等因素影响, 从而导致中药制剂质量、疗效的不稳定, 进而缺少国际说服力。为了保证 HH 胶囊质量、疗效的稳定性、临床安全性及提高中医药国际信服力, 有必要 HH 胶囊进行质控研究。HPLC 指纹图谱具有整体性、特征性和稳定性等特点, 能快速、有效地反映药材的化学成分及相对含量, 已被广泛应用于中药材及其制剂的质量控制、含量测定、鉴定等领域^[4-6]。本研究旨在采用 HPLC 指纹图谱对 HH 胶囊进行研究, 为其质量控制提供依据。

1 材料

美国 Agilent 1200 高效液相色谱仪, 配备四元梯度泵、在线脱气机、DAD 检测器、自动进样器、柱温箱和 ChemStation 化学工作站; ULUP-I-10T 优普超纯水机(成都超纯科技有限公司); CQ-250 超声波清洗器(上海必能信有限公司)。

没食子酸(批号: 110831-200302)、柯里拉京(批号: 111623-200302)、虎杖苷(批号: 111575-200301)、甘草酸铵(批号: 110731-200615)、齐墩果

酸(批号: 110709-200304)对照品均购自中国药品生物制品检定所。

HH 胶囊: 马鞭草 15g, 虎杖 15g, 赶黄草 20g, 叶下珠 25g, 苦参 15g, 郁金 15g, 薏苡仁 30g, 猪苓 20g, 甘草 10g。马鞭草系马鞭草科植物马鞭草 *Verbena officinalis* Linn. 的地上部分。虎杖系蓼科 Polygonaceae 植物虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 的干燥根茎和根。赶黄草(扯根菜)系虎耳草科(Saxifragaceae)扯根菜属(*Penthorum*)植物扯根菜(*Penthorum chinense* Pursh)的干燥地上部分。叶下珠系大戟科叶下珠属植物叶下珠 *Phyllanthus urinaria* L. 全草。苦参系豆科苦参属的 *Sophora flavescens* Alt 种苦参 *Sophora flavescens* 的根。郁金系姜科植物温郁金 *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling 的干燥块根。薏苡仁系禾本科植物薏苡 *Coix lacryma-jobi* L. var. *mayuen* (Roman.) Stapf 的种仁。猪苓系多孔菌科真菌猪苓 *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries 的干燥菌核。甘草系豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎。

2 方法

2.1 色谱条件

大连依利特 ODS-BP C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250

* 基金项目: 国家自然科学基金(81202624、81102720、81072902)

收稿日期: 2015-04-01

作者简介: 周道杰(1988-), 男, 福建武夷山人, 在读硕士研究生, 现从事中医药防治肝病及感染病研究。

△通信作者: 张传涛, E-mail: 664958917@qq.com

mm, 5 μm); 检测波长: 230 nm; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μL ; 采样时间: 77 min; 流动相: A 相 0.1% 磷酸溶液, B 相乙腈, 进行二元梯度洗脱, 洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

序号	时间/min	A/%	B/%
1	0	95	5
2	10	92	8
3	40	80	20
4	50	70	30
5	70	20	80

表 2 精密度试验(相对保留时间)

实验号 峰号	1	2	3	4	5	平均值	RSD/%
峰 1	0.251	0.242	0.249	0.251	0.245	0.248	1.64
峰 2	0.406	0.395	0.388	0.399	0.402	0.398	1.72
峰 3	0.436	0.420	0.424	0.427	0.437	0.429	1.70
峰 4	0.826	0.828	0.834	0.821	0.847	0.831	1.17
峰 5	0.874	0.873	0.847	0.858	0.877	0.866	1.48
峰 6	0.917	0.897	0.905	0.890	0.876	0.897	1.73
峰 7	0.958	0.956	0.957	0.969	0.965	0.961	0.62
峰 8(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
峰 9	1.365	1.362	1.357	1.368	1.378	1.366	0.56
峰 10	1.399	1.395	1.397	1.398	1.424	1.403	0.86
峰 11	1.906	1.886	1.859	1.879	1.909	1.888	1.09
峰 12	1.924	1.904	1.908	1.913	1.931	1.916	0.59
峰 13	2.051	2.038	2.032	2.045	2.078	2.049	0.88
峰 14	2.462	2.438	2.430	2.452	2.473	2.451	0.72

2.3.2 重复性试验

取同一批样品 5 份, 按“供试品溶液的制备”项下操作, 在上述色谱条件下进行分析, 记录指纹图谱。结果表明, 各共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致, RSD 均小于 3%, 符合指纹图谱技术要求(见表 4、表 5)

2.3.3 稳定性试验

取同一批样品, 按“供试品溶液的制备”方法制备, 在上述色谱条件下分别在 0, 2, 4, 8, 16 h 进行分析, 记录指纹图谱。结果表明, 各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致, RSD 均小于 3%, 证明样品在 16 h 内稳定, 符合 HPLC 指纹图谱技术要求(见表 6、表 7)。

2.2 对照品/供试品溶液的制备

取对照品适量, 加甲醇即得对照品溶液。取 HH 胶囊粉末约 0.5g, 精密加入 50% 甲醇 30 mL, 摇匀, 滤过, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验

取同一批样品, 按“供试品溶液的制备”项下操作, 在上述色谱条件下, 连续测定 5 次, 记录各共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果(表 2 和表 3)RSD 均小于 3%, 证明仪器精密度良好, 符合 HPLC 指纹图谱技术要求。

表 3 精密度试验(相对峰面积)

实验号 峰号	1	2	3	4	5	平均值	RSD/%
峰 1	1.810	1.822	1.808	1.809	1.876	1.825	1.58
峰 2	0.432	0.422	0.424	0.425	0.424	0.426	0.92
峰 3	1.546	1.585	1.539	1.585	1.599	1.571	1.71
峰 4	0.399	0.397	0.395	0.388	0.410	0.398	2.02
峰 5	0.443	0.435	0.439	0.434	0.454	0.441	1.84
峰 6	0.456	0.453	0.469	0.459	0.465	0.460	1.44
峰 7	0.401	0.410	0.406	0.409	0.416	0.408	1.36
峰 8(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
峰 9	1.395	1.383	1.349	1.362	1.384	1.375	1.35
峰 10	0.645	0.620	0.636	0.626	0.630	0.631	1.50
峰 11	0.457	0.467	0.461	0.467	0.475	0.465	1.50
峰 12	0.504	0.503	0.511	0.487	0.517	0.505	2.22
峰 13	0.305	0.313	0.303	0.309	0.311	0.308	1.32
峰 14	2.182	2.174	2.244	2.149	2.229	2.196	1.80

3 结果(HPLC 特征指纹图谱的建立)

取粉末样品, 按“供试品溶液的制备”项下操作, 制备供试品溶液, 并在上述色谱条件下, 精密吸取供试品溶液 10 μL , 注入高效液相色谱仪, 记录 77 min 色谱图。详细比较样品的色谱图, 选择稳定性和重复性好, 吸收较强, 特征明显的色谱峰为共有峰, 最终标定 14 个特征峰构成 HH 胶囊的指纹图谱。通过与标准品对照, 确定其中 1 号峰为没食子酸、8 号峰为柯里拉京、9 号峰为虎杖苷、10 号峰为鞣花酸、13 号峰为甘草酸、14 号峰为齐墩果酸。代表性指纹图谱见图 1。

由于 8 号峰分离度较好, 无杂质干扰, 时间适中, 且比较稳定, 故确定其为内参照峰(S), 指定其

表 4 重复性试验(相对保留时间)

实验号 峰号	1	2	3	4	5	平均值	RSD/%
峰 1	0.251	0.245	0.240	0.253	0.245	0.247	2.20
峰 2	0.406	0.389	0.388	0.392	0.391	0.393	1.84
峰 3	0.436	0.419	0.420	0.419	0.431	0.425	1.87
峰 4	0.826	0.838	0.835	0.814	0.858	0.834	1.96
峰 5	0.874	0.849	0.874	0.857	0.898	0.870	2.17
峰 6	0.917	0.920	0.886	0.889	0.935	0.909	2.29
峰 7	0.958	0.982	0.950	0.966	0.953	0.962	1.37
峰 8(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
峰 9	1.365	1.382	1.355	1.346	1.388	1.367	1.30
峰 10	1.399	1.411	1.411	1.374	1.432	1.405	1.51
峰 11	1.906	1.906	1.855	1.877	1.889	1.887	1.13
峰 12	1.924	1.931	1.880	1.921	1.924	1.916	1.05
峰 13	2.051	2.065	2.044	2.032	2.077	2.054	0.85
峰 14	2.462	2.435	2.447	2.470	2.456	2.454	0.55

表 6 稳定性试验(相对保留时间)

实验号 峰号	0 h	2 h	4 h	8 h	16 h	平均值	RSD/%
峰 1	0.251	0.249	0.246	0.246	0.253	0.249	1.21
峰 2	0.406	0.403	0.394	0.397	0.406	0.401	1.40
峰 3	0.436	0.434	0.424	0.430	0.434	0.431	1.10
峰 4	0.826	0.837	0.828	0.829	0.837	0.832	0.61
峰 5	0.874	0.866	0.868	0.864	0.873	0.869	0.53
峰 6	0.917	0.911	0.892	0.911	0.880	0.902	1.72
峰 7	0.958	0.973	0.960	0.954	0.985	0.966	1.34
峰 8(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
峰 9	1.365	1.382	1.360	1.356	1.379	1.369	0.85
峰 10	1.399	1.420	1.400	1.394	1.425	1.408	0.99
峰 11	1.906	1.898	1.868	1.867	1.913	1.890	1.14
峰 12	1.924	1.950	1.911	1.916	1.931	1.926	0.79
峰 13	2.051	2.076	2.041	2.040	2.074	2.056	0.85
峰 14	2.462	2.453	2.456	2.462	2.473	2.461	0.32

保留时间和峰面积值为 1.00, 计算样品指纹图谱中其他共有特征峰的相对保留时间和相对峰面积。

4 讨论

本研究选择大连依利特 ODS-BP C₁₈ 色谱柱对 HH 胶囊进行指纹图谱分析, 确定测定波长为 230 nm, 流动相系统为 0.1% 磷酸溶液和乙腈, 通过不断

表 5 重复性试验(相对峰面积)

实验号 峰号	1	2	3	4	5	平均值	RSD/%
峰 1	1.810	1.846	1.830	1.786	1.885	1.831	2.04
峰 2	0.432	0.424	0.411	0.435	0.426	0.425	2.18
峰 3	1.546	1.581	1.591	1.540	1.654	1.582	2.88
峰 4	0.399	0.390	0.405	0.389	0.401	0.397	1.78
峰 5	0.443	0.442	0.430	0.433	0.459	0.441	2.53
峰 6	0.456	0.467	0.461	0.470	0.488	0.469	2.58
峰 7	0.401	0.394	0.406	0.390	0.415	0.401	2.51
峰 8(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
峰 9	1.395	1.369	1.417	1.360	1.387	1.386	1.63
峰 10	0.645	0.628	0.623	0.611	0.648	0.631	2.46
峰 11	0.457	0.463	0.468	0.459	0.480	0.465	1.94
峰 12	0.504	0.488	0.509	0.495	0.516	0.502	2.19
峰 13	0.305	0.306	0.310	0.301	0.316	0.308	1.90
峰 14	2.182	2.219	2.116	2.114	2.228	2.172	2.53

表 7 稳定性试验(相对峰面积)

实验号 峰号	0 h	2 h	4 h	8 h	16 h	平均值	RSD/%
峰 1	1.810	1.754	1.851	1.806	1.848	1.814	2.17
峰 2	0.432	0.445	0.417	0.436	0.422	0.431	2.59
峰 3	1.546	1.605	1.492	1.586	1.532	1.552	2.87
峰 4	0.399	0.393	0.398	0.395	0.405	0.398	1.19
峰 5	0.443	0.438	0.445	0.432	0.448	0.441	1.42
峰 6	0.456	0.468	0.460	0.462	0.481	0.466	2.07
峰 7	0.401	0.394	0.384	0.393	0.413	0.397	2.72
峰 8(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
峰 9	1.395	1.445	1.357	1.356	1.400	1.391	2.63
峰 10	0.645	0.649	0.636	0.639	0.669	0.648	1.99
峰 11	0.457	0.475	0.451	0.478	0.464	0.465	2.46
峰 12	0.504	0.516	0.485	0.499	0.516	0.504	2.55
峰 13	0.305	0.312	0.311	0.326	0.311	0.313	2.43
峰 14	2.182	2.132	2.205	2.122	2.254	2.179	2.49

优化条件下, 记录 77 min 色谱图, 详细比较样品的色谱图, 选择稳定性和重复性好, 吸收较强, 特征明显的色谱峰为共有峰, 最终标定 14 个特征峰构成 HH 胶囊的指纹图谱。通过与标准品对照, 确定其中 1 号峰为没食子酸、8 号峰为柯里拉京、9 号峰为虎杖苷、10 号峰为鞣花酸、13 号峰为甘草酸、14 号峰

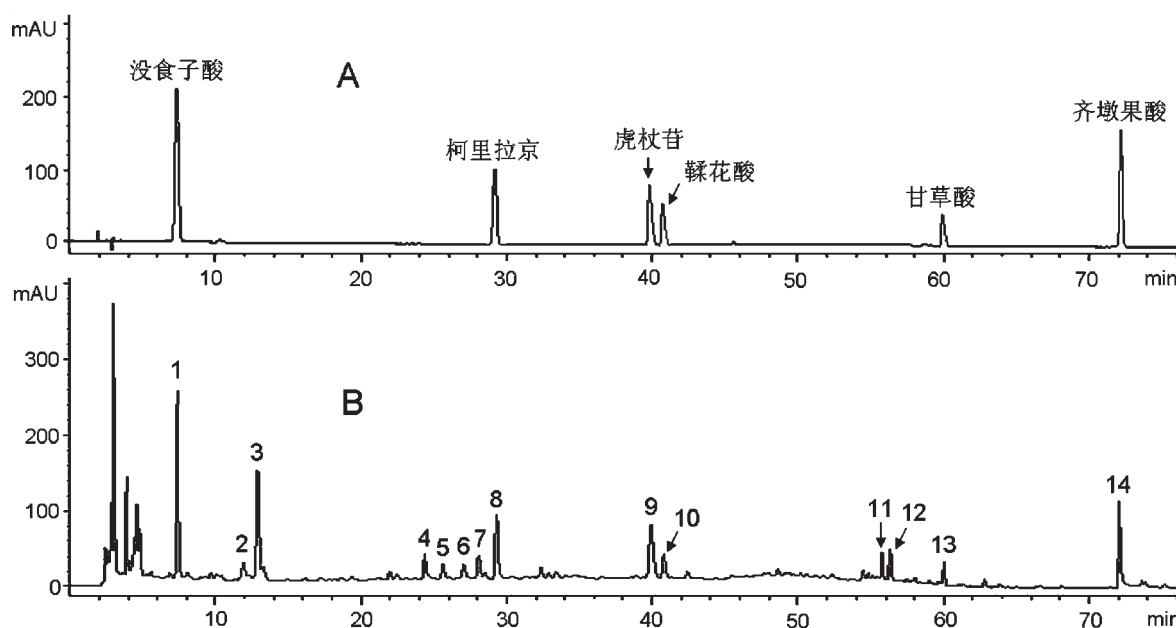


图1 HH 胶囊的 HPLC 特征指纹图谱(A:对照品;B:供试品)

为齐墩果酸。其中虎杖苷具有保肝、抗氧化等作用^[7], 没食子酸具有降低 HBsAg/HBeAg 而抗乙肝病毒作用^[8], 柯里拉京具有保肝^[9]、抗病毒^[10]、抗炎^[11]、抗氧化^[12]等多种生物活性, 这些活性成分可能是HH 胶囊发挥抗 HBV 作用的有效成分之一, 这仍需要进一步深入研究证实, 但是本研究一方面确立了 HH 胶囊的 HPLC 指纹图谱, 为 HH 胶囊的质量控制提供了可靠的依据, 同时也为 HH 胶囊抗 HBV 活性物质的筛选奠定了基础, 这为今后开展中医药药理研究提供了思路。

参考文献:

- [1] 张传涛, 廖志航, 吴疆, 等. HH 胶囊抗乙肝病毒的体外 (2.2.15 细胞) 实验研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(1): 78-80.
- [2] 张传涛, 廖志航, 吴疆, 等. HH 胶囊体外抗乙型肝炎病毒的作用及其机制 [J]. 世界华人消化杂志, 2010 (7): 652-656.
- [3] 张传涛, 张莉敏, 吴疆, 等. 新 HH 方对 HBV 转基因小鼠脾脏源树突状细胞功能影响的实验研究 [J]. 四川中医, 2013, 31(8): 45-47.
- [4] 张超, 何宝丰, 陈世友, 等. HPLC 测定滇紫草及其两个近缘种中乙酰紫草素的含量 [J]. 云南中医学院学报, 2014, 37(6): 17-19
- [5] 苏健. 高效液相色谱法测定雪胆素片中雪胆素甲的含量

[J]. 云南中医学院学报, 2014, 37(2): 21-23.

- [6] 郑立雄, 陈金东, 任杨帆, 等. 三七叶与茎 HPLC 的比较分析及 Rb3 含量测定[J]. 云南中医学院学报, 2014, 37(5): 332-35.
- [7] 黄兆胜, 王宗伟, 刘明平, 等. 虎杖苷对 CCl₄ 损伤原代培养大鼠肝细胞的保护作用 [J]. 中国药理学报, 1998, 14(6): 543.
- [8] 郑民实, 孔庚星, 张鑫, 等. 没食子酸抗 HBsAg/HBeAg 的实验研究[J]. 实用中医药杂志, 1998, 14(1): 5.
- [9] Myagmar B E, Aniya Y. Free radical scavenging action of medicinal herbs from Mongolia [J]. Phytomedicine, 2000, 7(3): 221-229.
- [10] Xu H X, Wan M, Dong H, et al. Inhibitory activity of flavonoids and tannins against HIV-1 protease[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2000, 23(9): 1072-1076.
- [11] Zhao L, Zhang S L, Tao J Y, et al. Preliminary exploration on anti-inflammatory mechanism of Corilagin-beta-1-O-galloyl-3,6-(R)-hexahydroxydiphenoyl-D-glucose in vitro [J]. International immunopharmacology, 2008, 8(7): 1059-1064.
- [12] Kumaran A, Karunakaran R J. Nitric oxide radical scavenging active components from Phyllanthus emblica L[J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2006, 61(1): 1-5.

(编辑: 杨阳)

HPLC Fingerprint Analysis on HH Capsules

ZHOU daojie¹, ZHANG Zhuantao^{2△}, GUO YinLing¹, YANG Hong²,
FAN Gang¹, WANG Zheng¹, LIU Yefang¹

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China;

2. Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China)

ABSTRACT: Objective To establish analysis method of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) fingerprint on HH capsules, to developed its characteristic fingerprint component groups. **Methods** HPLC with Dalian Elite ODS-BP C₁₈ column 4.6 mm × 250 mm, 5μm) was used, detection wavelength was 230nm; column temperature was 30℃; flow rate was 1.0 mL/min; mobile phase: A phase with 0.1% phosphoric acid, B phase with acetonitrile, gradient elution performed. **Results** The final calibrated 14 characteristic peaks constituted HH capsules fingerprint. By comparison with the standard, determined the 1st peak gallic acid, the 8th peak Corilagin, the 9th peak polydatin, the 10th peak of ellagic acid, the 13th peak of glycyrrhizin, the 14th Feng Qi oleanolic acid. **Conclusion** HPLC method is accurate, reliable, and can provide a basis for quality evaluation and identification of HH capsules, and provide some reference for material fundamental research.

KEY WORDS: HH Capsules; Fingerprint; High Performance Liquid Chromatography

(原文见第 10 页)

The Effect of Shunqi Tongfu Mixture on Plasma Levels of Gastrointestinal Hormones in Rats with Gastrointestinal Motility Disorder

ZHOU Shaorong, JIAO Lannong, YAO Jiangeng, HE Guohua,
YUAN Chengye, BAO Qingbing, MAO Yue[△]

(Department of General Surgery, Taizhou Chinese Medicine Hospital Affiliated
to Nanjing University of Chinese Medicine, Taizhou, 225300)

ABSTRACT: Objective To investigate the effect of Shunqi Tongfu mixture on plasma MTL, Ach, SS in rats with gastrointestinal motility disorder. **Methods** Select SD rats were randomly divided into normal control group, negative control group, Shunqi Tongfu mixture group and mosapride citrate group. Except the normal control group, the other three groups were prepared into models of gastrointestinal motility disorder, then given drug administered, abdominal aortic blood, Elisa determination of plasma MTL, Ach, SS content. **Results** ①After treatment, the weight of Shunqi Tongfu mixture group was significant difference from the negative control group($P<0.05$). ②Model group MTL, Ach, SS were significantly difference from the normal control group($P<0.05$). After treatment, Shunqi Tongfu mixture group MTL, Ach in plasma increased significantly and SS decreased significantly, all compared with negative control group ($P<0.05$). **Conclusion** The mechanism of Shunqi Tongfu mixture promote gastrointestinal motility may be: Elevate levels of plasma MTL and Ach, then promote the effect of gastrointestinal smooth muscle contraction; inhibit the secretion of SS, promote gastrointestinal and pancreatic exocrine secretion, activate the protective effect on the gastrointestinal mucosa, maintain the normal physiological function of gastrointestinal tract.

KEY WORDS: Shunqi Tongfu mixture; gastrointestinal motility disorder; motilin; acetylcholine; somatostatin