

## 温肾降浊散的 HPLC 指纹图谱

邹韬博<sup>1</sup>, 陈曦<sup>2</sup>, 李建民<sup>1</sup>, 方衡<sup>1</sup>, 王发善<sup>3</sup>, 张宁<sup>1</sup>, 刘海洋<sup>1\*</sup>

(1. 黑龙江中医药大学佳木斯学院, 黑龙江 佳木斯 154007;

2. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193; 3. 多多药业有限公司, 黑龙江 佳木斯 154005)

**[摘要]** 目的:应用 HPLC 建立温肾降浊散的指纹图谱。方法:ANGLA Promosil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温 30 ℃, 流动相乙腈-0.1% 磷酸水, 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长 224 nm, 进样量 10 μL。结果:温肾降浊散中多数峰可以达到基线分离。用中药色谱指纹图谱相似度评价系统对 10 批样品的指纹图谱进行峰匹配, 确定 14 个共有峰, 10 批温肾降浊散中共有峰的相对保留时间 RSD < 1%, 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(版本 2004 A)计算指纹图谱的相似度均 > 0.93。结论:该法建立的指纹图谱分离度好、信息量大、基线平稳, 可以作为温肾降浊散的质量控制手段并为其有效成分的研究提供依据。

**[关键词]** 温肾降浊散; 高效液相色谱; 指纹图谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0107-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013240107

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20131011.1443.004.html>

**[网络出版时间]** 2013-10-11 14:43

## HPLC Fingerprint of Wenshen Jiangzhuo Powder

ZOU Tao-bo<sup>1</sup>, CHEN Xi<sup>2</sup>, LI Jian-min<sup>1</sup>, FANG Heng<sup>1</sup>, WANG Fa-shan<sup>3</sup>, ZHANG Ning<sup>1</sup>, LIU Hai-yang<sup>1\*</sup>

(1. Jiamusi College, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Jiamusi 154007, China;

**[收稿日期]** 20120921(009)

**[基金项目]** 中央级公益性科研院所基本科研业务专项(YZYN-11-03, YZYN-13-02); 北京协和医学院协和青年基金项目(XHYN-01)

**[第一作者]** 邹韬博, 硕士, 从事中药药效物质基础及体内代谢研究, Tel:18863129294, E-mail: zoutaobo.1988@yahoo.com.cn

**[通讯作者]** \* 刘海洋, 讲师, 从事方剂药效物质基础研究, Tel:0454-6100350, E-mail: zhang-ning2006@hotmail.com

肪性成分的分析 and 评价, 为后面做相关药理活性、综合开发中成药新品种等方面提供了理论依据。

### [参考文献]

[1] 吴晋. 神农本草经(重排本)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 67.  
[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 190.  
[3] 夏光成, 萧培根, 马毓泉. 中药秦艽原植物的研究[J]. 药学学报, 1965, 12(6): 399.  
[4] 陈千良, 石张燕, 涂光忠, 等. 陕西产秦艽的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(19): 1519.  
[5] 胡一晨, 吉琅, 廖晴, 等. 秦艽花液质联用的指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(2): 67.  
[6] 王霞英, 王旭鹏, 马月琴, 等. 宁夏栽培秦艽与野生秦艽有效成分的比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013,

19(9): 100.  
[7] 陈嘉漠. 本草蒙筌[M]. 北京: 中国古籍出版社, 2009.  
[8] Z L Zhao, Gaawe Dorje, Z T Wang. Identification of medicinal plants used as Tibetan traditional medicine Jie-Ji[J]. J Ethnopharmacol, 2010, 132: 122.  
[9] 刘占文, 陈长勋, 金若敏, 等. 龙胆苦苷的保肝作用研究[J]. 中草药, 2002, 33(1): 47.  
[10] 李勇慧, 曹晓燕, 押辉远. 大叶秦艽中脂肪酸及挥发油成分的 GC-MS 分析[J]. 中药材, 2011, 33(4): 559.  
[11] 高咏莉, 余振喜, 林瑞超, 等. 藏药萝卜秦艽挥发油成分的 GC-MS 分析研究[J]. 中国现代药物应用, 2009, 3(4): 25.

[责任编辑 顾雪竹]

2. Peking Union Medical College Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China; 3. DUODUO Pharmaceutical Co. LTD., Jiamusi 154005, China)

**[ Abstract ] Objective:** To establish HPLC fingerprint of Wenshen Jiangzhuo powder. **Method:** ANGLA Promosil C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with the column temperature kept at 30 °C; the detection wavelength was set at 224 nm, and the injection volume was 10 μL, and a gradient solution of acetonitrile and H<sub>2</sub>O (acidified to 0.1% with phosphoric acid). **Result:** Most peaks could be separated preferably, and the RSD of the relative relation time of ten batches of Wenshen Jiangzhuo powder was lower than 1%, fourteen common peaks were obtained in the fingerprint of ten batches of Wenshen Jiangzhuo powder by peaks match with Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM. The similarity of fingerprints was calculated more than 0.93. **Conclusion:** The established HPLC fingerprint has desirable accuracy, repeatability and stability, it could be used as a method of quality control and provide evidence for the research of effective components of Wenshen Jiangzhuo powder.

**[ Key words ]** Wenshen Jiangzhuo powder; HPLC; fingerprint chromatography

温肾降浊散是以大黄为君药、历经百余年祖传结合临床经验总结而成的中药临床验方,用于治疗急性慢性肾盂肾炎、急性慢性肾小球肾炎、肾病综合征、慢性肾功能不全等疾病引起的尿路感染、水肿、血尿、蛋白尿等症状。近年来,随着患糖尿病、高血压、肥胖代谢综合征的人群不断增加,慢性肾脏病的患病率也不断上升<sup>[1-6]</sup>。温肾降浊散在临床治疗上效果明显,多多药业有限公司将此药的开发生产作为重点项目,本实验建立了温肾降浊散的 HPLC 指纹图谱,为此药的开发生产提供支持。

### 1 材料

Dionex P680 型液相色谱仪(美国戴安公司), ANGLA Promosil C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, BT224S 型 1/10 万电子天平(赛多利斯公司), KQ5200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), 中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004 A)。乙腈(HPLC 级,美国迪马公司), 甲醇(HPLC 级,美国迪马公司), 娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈有限公司), 甲醇(分析纯,天津市红岩化学试剂厂), 磷酸(分析纯,天津北方天医化学试剂厂)。温肾降浊散(多多药业有限公司提供), 大黄酚(中国药品生物制品检定所,批号 110796-201113), 大黄素(中国药品生物制品检定所,批号 110783-201113), 大黄酸(中国药品生物制品检定所,批号 110776-201113)。

### 2 方法与结果

**2.1 供试品溶液的配制** 精密称取温肾降浊散粉末约 0.6 g, 用 50 mL 甲醇超声 60 min, 滤过, 减压浓缩后用甲醇定容至 10 mL, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取

续滤液为供试品溶液。

**2.2 对照品溶液的配制** 称取大黄酚、大黄素及大黄酸对照品适量, 精密称定, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成大黄酚、大黄素及大黄酸对照品溶液。

表 1 流动相梯度变化表

t/min	A	B	V/mL·min <sup>-1</sup>
0	5	95	1
10	15	85	1
14	15	85	1
16	23	77	1
18	23	77	0.6
21	26	74	0.6
22	26	74	1
30	34	66	1
36	37	63	1
69	70	30	1
73	74	26	1
86	100	0	1

**2.3 色谱条件** ANGLA Promosil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱程序见表 1, 检测波长 224 nm, 进样量 10 μL, 柱温 30 °C。

### 2.4 色谱条件的选择

**2.4.1 色谱柱的选择** 考察了 AGELA Promosil C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱及 AGELA Venusil XBP-C<sub>8</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱。结果表明, AGELA Promosil C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)

色谱柱出峰较多,峰形较好。

**2.4.2 洗脱系统的选择** 乙腈-0.1%磷酸水及甲醇-0.1%磷酸水梯度洗脱。结果表明,甲醇-0.1%磷酸水梯度洗脱,基线漂移严重,乙腈-0.1%磷酸水梯度洗脱系统更优。

**2.4.3 检测波长的选择** 选择了 205, 224, 254, 334 nm 4 个波长进行扫描,结果表明,224 nm 色谱图峰形最好,出峰数目适中,各色谱峰相互之间分离度较好,故检测波长定为 224 nm。

**2.5 参照峰的选择** 在 HPLC 指纹图谱中选择出峰时间适中且稳定的色谱峰作为参照峰,结果 69 min 色谱峰符合此条件,经对照品对照认定为大黄酚的吸收峰,因此选择大黄酚作为参照物(S 峰)。

**2.6 精密度试验** 按 2.1 项下方法制备供试品溶液,用 2.3 项下色谱条件连续测定 6 次,各色谱峰相对保留时间 RSD < 1%,各色谱峰相对峰面积 RSD < 3%。说明该仪器精密度良好。

**2.7 重复性试验** 按 2.1 项下方法重复制备 6 份同一批次的供试品溶液,用 2.3 项下色谱条件分别测定,各色谱峰相对保留时间 RSD < 1%,各色谱峰相对峰面积 RSD < 3%,表明该方法重复性良好。

**2.8 稳定性试验** 按 2.1 项下方法制备供试品溶液,用 2.3 项下色谱条件,分别在 0, 2, 4, 8, 16, 24 h 测定,各色谱峰相对保留时间 RSD < 1%,各色谱峰峰面积 RSD < 3%,表明样品溶液在 24 h 内稳定。

**2.9 指纹图谱的测定** 按照 2.1 项制备温肾降浊散样品 10 批,用 2.3 项下色谱条件测定了 10 批温肾降浊散的指纹图谱,采用国家药典委员会的中药色谱指纹图谱相似度评价系统(版本 2004 A),确定 14 个共有峰,其相对保留时间的 RSD 均 < 1%。见图 1。

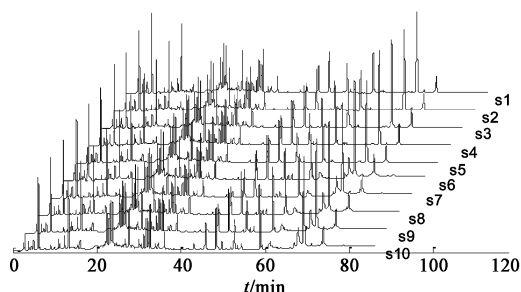


图 1 温肾降浊散 10 个批次的指纹图谱

**2.10 共有峰的相对保留时间相对峰面积指纹图谱相似度计算** 选取色谱中的强峰,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)》进行色谱峰匹配,确定 14 个共有色谱峰,并建立了温肾降浊散

HPLC 指纹图谱的共有模式(平均值)(图 2)。以大黄酚色谱峰的保留时间和峰面积积分为 1,各共有峰的相对保留时间及相对峰面积的 RSD 均 < 3%,以 14 个共有峰峰面积的均值做模板,利用“相关系数”法<sup>[7]</sup>计算指纹图谱的相似度,不同批次的相关系数在 0.939 9~0.999 6(表 2),均 > 0.93,说明各批次温肾降浊散具有良好的—致性。

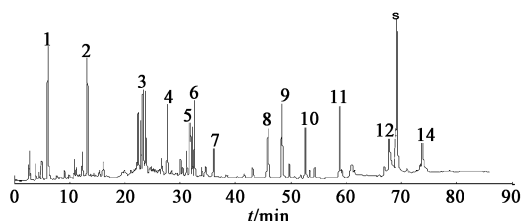
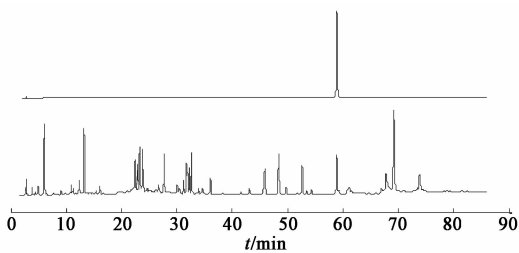


图 2 温肾降浊散 HPLC-UV 指纹图谱 14 个共有峰

表 2 不同批次温肾降浊散相似度

No.	相似度	No.	相似度
S1	0.976 5	S7	0.943 8
S2	0.952 7	S8	0.996 6
S3	0.999 6	S9	0.939 9
S4	0.976 9	S10	0.973 8
S5	0.983 2	mean	1
S6	0.986 5		

**2.11 色谱峰的认定** 取温肾降浊散粉末按 2.1 项下方法制备样品溶液,另取大黄素及大黄酸对照品,按 2.2 项下方法制备对照品溶液,按 2.3 项下色谱条件进行测定,得出保留时间在 58.8, 48.3 min 色谱峰分别为大黄素及大黄酸的色谱峰,见图 3~4。

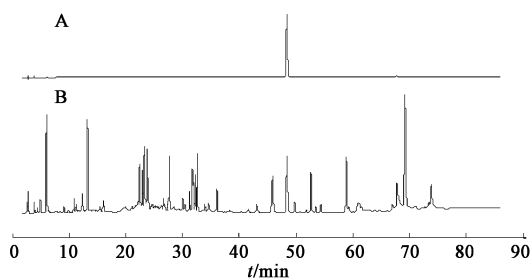


A. 大黄素对照品; B. 温肾降浊散样品

图 3 温肾降浊散 HPLC

### 3 小结

中药指纹图谱是动用现代分析技术对中药化学信息以图形(图像)的方式进行表征并加以描述的一种综合的、量化的化学鉴定手段<sup>[8]</sup>。其包括色谱指纹图谱和光谱指纹图谱,其中色谱指纹图谱是主流,尤其是薄层色谱(TCL)、高效液相色谱(HPLC)和气相色谱(GC),已是公认的 3 种常规手



A. 大黄酸对照品; B. 样品

图 4 温肾降浊散 HPLC

段。高效液相色谱指纹图谱具有分离效能高、分析速度快等优点,用于中药的定量分析、定性鉴别,以及中药复方的研究<sup>[9]</sup>。

目前,在中药色谱指纹图谱研究中越来越多的研究将图谱间的相似度作为评判指纹图谱的重要参数和标准。相似度表示的是样品指纹图谱与对照指纹图谱间的相似程度,综合了样品的定量数据和定性信息。相似度的计算方法一般采用两种算法,一种是相关系数法,另一种是向量夹角余弦法<sup>[10-11]</sup>,其计算公式为:

$$\text{相关系数} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

$$\text{夹角余弦} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^n x_i^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n y_i^2}} \quad \text{公式中 } x_i \text{ 为某}$$

个样品对应保留时间下的峰面积或峰高, $y_i$ 为  $n$  批样品对应保留时间下的平均峰面积或峰高。

本实验建立了温肾降浊散的 HPLC 指纹图谱,采用国家药典委员会的中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(版本 2004 A),生成了温肾降浊散指纹图谱的共有模式,确定了 14 个共有峰,计算了 10 批

温肾降浊散的指纹图谱的相似度,均  $>0.93$ ,且各色谱峰相对保留时间稳定,说明本试验方法所建立的指纹图谱具有较好的稳定性和可控性,可以从整体定性评价温肾降浊散的质量优劣,并为其质量标准实现安全、有效、稳定、可控提供依据。

### [参考文献]

- [1] 张林军,刘军,常超,等. 补阳还五汤治疗 2 型糖尿病研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1):243.
- [2] 宋爱娥. 在校大学生高血压患病现状及认知情况调查[J]. 齐鲁护理杂志, 2012, 18(16):47.
- [3] 刘德慧,邢翔飞. II 型糖尿病大鼠模型的特点及评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(12):212.
- [4] 彭丽. 我国高血压社区防治现状[J]. 临床合理用药, 2012, 3(4B):167.
- [5] 黄允瑜,陈慕芝,郑光,等. 基于文本挖掘技术的肥胖和高血脂症处方规律研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9):236.
- [6] 周艳艳,胡晓华. 补肾疏肝化痰法治疗青春期肥胖型多囊卵巢综合征 30 例[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7):239.
- [7] 苗爱东,孙殿甲. Excel 2002 在中药指纹图谱相似度计算中的应用[J]. 药学进展, 2003, 27(1):51.
- [8] 刘军红,廖国玲. 中药指纹图谱的研究综述[J]. 农业科学研究, 2009, 30(2):32.
- [9] 张丽芳,薛飞群. 中药指纹图谱的检测方法[J]. 中药与天然药物, 2004, 14(6):10.
- [10] 张尊建,李茜. 丹参及丹参注射液指纹图谱的 HPLC-MS 研究[J]. 中草药, 2002, 33(12):1074.
- [11] 余静,李茜,沈文斌,等. 刺五加 HPLC/UV/MS 指纹图谱研究[J]. 中国药科大学学报, 2003, 34(002):148.

[责任编辑 顾雪竹]