

# 土茯苓配方颗粒 HPLC 指纹图谱研究

温庆伟<sup>1,2</sup>, 邹录惠<sup>2</sup>, 蓝晓庆<sup>2</sup>, 黄丽凤<sup>2</sup>, 陆东<sup>2</sup>, 韦红言<sup>2</sup>, 周永强<sup>2\*</sup>

(1. 广西医科大学药学院, 南宁 530021; 2. 培力(南宁)药业有限公司, 南宁 530007)

**[摘要]** 目的: 采用反相高效液相色谱法(HPLC), 建立土茯苓配方颗粒的指纹图谱。方法: 采用 Ultimate<sup>®</sup> AQ-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 甲醇-0.2% 磷酸水溶液(35:65)洗脱; 检测波长 290 nm; 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量 10 μL, 采集时间 60 min。结果: 分析方法有较好的重复性, 共检出 7 个共有峰, 并指出落新妇苷(astilbin)、白藜芦醇(resveratrol) 2 个化学成分。10 批土茯苓配方颗粒的指纹图谱相似度均 > 0.98。结论: HPLC 指纹图谱重复性好, 可作为土茯苓配方颗粒产品质量控制的技术手段之一。

**[关键词]** 土茯苓; 配方颗粒; 高效液相色谱法(HPLC); 指纹图谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0099-04

## Study on Fingerprint of Smilacis Glabrae Rhizoma Formula Granules by HPLC

WEN Qing-wei<sup>1,2</sup>, ZOU Lu-hui<sup>2</sup>, LAN Xiao-qing<sup>2</sup>, HUANG Li-feng<sup>2</sup>,  
LU Dong<sup>2</sup>, WEI Hong-yan<sup>2</sup>, ZHOU Yong-qiang<sup>2\*</sup>

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;

2. PuraPharm (Nanning) Pharmaceuticals Co. Ltd., Nanning 530007, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate and establish the fingerprint of Smilacis Glabrae Rhizoma Formula Granules by RP-HPLC. **Method:** The samples were injected with 10 μL in a HPLC system coupled with Ultimate<sup>®</sup> AQ-C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), and eluted with methanol-0.2% phosphoric acid solution (35:65) at 1.0 mL·min<sup>-1</sup> under 30 °C. The data was recorded for 60min by UV director at 290 nm. **Result:** Two compounds (astilbin, resveratrol) were identified from the 7 common peaks in the fingerprint which had a good reproducibility and similarity with correlation coefficient (> 0.98) in the analysis of 10 different batches products. **Conclusion:** HPLC fingerprint would be a selective, simple, acute and suitable method for quality control in the herbs and Formula Granules of Smilacis Glabrae Rhizoma.

**[Key words]** Smilacis Glabrae Rhizoma; formula granules; HPLC; fingerprint

土茯苓始载于《本草经集注》<sup>[1]</sup>, 为百合科植物光叶菝葜的干燥根茎, 原名禹余粮, 主产于广西、广

东。土茯苓性平, 味甘, 归肝、胃经, 有除湿、解毒、通利关节之功效<sup>[2]</sup>。土茯苓配方颗粒是以符合炮制规范的土茯苓饮片为原料, 经现代化的提取、浓缩、干燥、制粒等制剂工艺技术加工而成的, 仅供中医师在临床处方使用的颗粒制剂, 具有体积小、服用、携带方便, 起效迅速、疗效确切的优点, 并保留了传统中药汤剂的“原汁原味”。但中药饮片经过一系列现代制药工艺制成配方颗粒后, 就会失去它原有的许多外观、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)去进行有效的鉴别。如果仅仅按照《中国药典》对其指标成分进行含量测定,

**[收稿日期]** 20120608(012)

**[基金项目]** 广西千亿元产业重大科技攻关项目(桂科攻11107009-2)

**[第一作者]** 温庆伟, 高级工程师, 在读博士, 从事中药药效物质基础及中药配方颗粒质量标准研究, Tel: 0771-3218026, E-mail: wqw760623@163.com

**[通讯作者]** \*周永强, 博士, 从事中药新药的研究与开发, Tel: 0771-3218026, E-mail: zhouyongqiangsl@163.com

则较难全面地判定中药配方颗粒产品的真伪与优劣,从而给企业或国家药品主管部门的质量控制和监管造成一定的困难。

运用 RP-HPLC 法对土茯苓配方颗粒的指纹图谱进行研究未见报道。本文采用 RP-HPLC 建立的土茯苓配方颗粒指纹图谱,给产品质量控制、监管提供了一种科学的手段,同时也为配方颗粒不同批次间的一致性、均匀性提供了一种可行的分析方法。

## 1 材料

**1.1 仪器** 美国 Agilent-1100 高效液相色谱仪(包括四元梯度泵、在线脱气机、柱温箱、自动进样器、DAD 检测器),UV-Vis 分光光度计(UV-3101PC 型,日本 Shimadzu)。

**1.2 试药** 落新妇苷(含量测定用,批号 A0102)和白藜芦醇(含量测定用,批号 MUST-11050301)均购于成都曼斯特生物科技有限公司,甲醇(色谱纯,Merck),磷酸(分析纯,≥85%),水(超纯水),其他试剂均为分析纯。

10 批土茯苓配方颗粒由培力(南宁)药业有限公司提供,批号分别为 S1 (A120024), S2 (A111136), S3 (A110463), S4 (A110356), S5 (A100924), S6 (A100444), S7 (A091059), S8 (A090578), S9 (A090390), S10 (A082111)。土茯苓药材(批号 090928,产地广西)与批号为 A110356 的土茯苓配方颗粒所用的药材一致,经广西壮族自治区食品药品检验所韦家福老师鉴定为百合科植物光叶菝葜 *Smilax glabra* Roxb. 的干燥根茎。

**1.3 指纹图谱相似度评估软件** 中国药典委员会推荐的中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004A 版,均值法)。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Ultimate® AQ-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),进样量 10 μL,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长为 290 nm,以甲醇-0.2% 磷酸溶液(35:65)为流动相进行洗脱,柱温 30 ℃,采集时间 60 min。

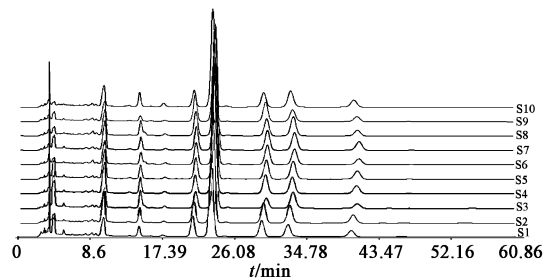
**2.2 对照品溶液的制备** 取落新妇苷、白藜芦醇对照品适量,精密称定,加 70% 乙醇制成每 1 mL 含落新妇苷 0.1 mg、白藜芦醇 20 μg 的溶液,作为对照品溶液。

**2.3 供试品溶液的制备** 取土茯苓配方颗粒,研细,取约 0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加 70% 乙醇 50 mL,密塞,精密称定,超声处理 30 min,用 70% 乙醇补足减失的质量,经 0.45 μm 滤膜滤过,

作为土茯苓配方颗粒供试品溶液。另取土茯苓药材粉末(过二号筛),取约 0.6 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加 70% 乙醇 50 mL,同“配方颗粒供试品溶液”的制备方法制成土茯苓药材供试品溶液。

**2.4 检测波长的选择** 采用紫外-可见分光光度计分别对土茯苓配方颗粒供试品溶液与土茯苓药材供试品溶液进行扫描,结果在 290 nm 处均有最大的紫外吸收。因此,选择 290 nm 作为检测波长。

**2.5 特征峰的选择** 精密吸取按照 2.3 项下方法制备的土茯苓药材及配方颗粒(批号 A110356)供试液各 10 μL,注入液相色谱仪,分别采集其指纹图谱。结果表明,配方颗粒中有 7 个特征峰均可在药材色谱图中得到追踪,充分表明了配方颗粒与药材在化学成分上的相似性,各峰分离度好,并且通过与对照品色谱峰比对,指出“Astilbin、Resveratrol”2 个化学成分的色谱峰(图 2)。



A. 土茯苓药材;B. 土茯苓配方颗粒;C. 落新妇苷和白藜芦醇对照品  
图 2 土茯苓药材、配方颗粒与混合对照品 HPLC

## 2.6 指纹图谱的建立

**2.6.1 指纹图谱的采集** 按照 2.3 项下的方法制备 10 批土茯苓配方颗粒样品溶液,参照《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》建立其 HPLC-DAD 指纹图谱,精密吸取供试品和对照品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,测定,记录 60 min 图谱。10 批土茯苓配方颗粒 HPLC 指纹图谱见图 3。

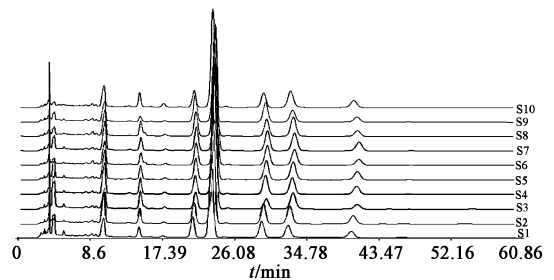


图 3 10 批土茯苓配方颗粒的 HPLC 指纹图谱

**2.6.2 参照峰的选择** 峰 4 (Astilbin) 为土茯苓配方颗粒中主要的黄酮类成分,在 HPLC 图谱中分离度较好,且含量较高、稳定,所以选择峰 4 为参照峰。

**2.6.3 共有指纹峰的标定** 采用评价软件自动匹配 10 批次配方颗粒 HPLC 图谱的相关参数,标定其中匹配数目为 7 的色谱峰为共有指纹峰,10 批次产品中具有特征峰的峰面积均大于色谱峰总面积的 90%。选择批号为 A110356-01 土茯苓配方颗粒图谱为参照图谱,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 0.50 min,提取它的共有峰模式,建立指纹图谱。根据数据分析结果最终标定 7 个共有峰,以 astilbin 为参照峰(S),计算各峰的相对保留时间(relative retention time, RRT)和相对峰面积(relative peak area, RPA),结果见表 1。

表 1 共有峰的相对保留时间

Peaks	Peak1	Peak2	Peak3	Peak4(S)	Peak5	Peak6	Peak7
RRT	0.442	0.626	0.904	1	1.260	1.397	1.722
RPA	0.208	0.073	0.371	1	0.435	0.218	0.079
化合物	-	-	-	astilbin	-	resveratrol	-

注: - 未指认。

**2.6.4 特征图谱的相似度计算** 采用相关系数法进行相似度计算<sup>[3-4]</sup>,10 批土茯苓配方颗粒的指纹图谱相似度计算结果见表 2。各批次相似度均 > 0.98,说明不同批次间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计算** 10 批土茯苓配方颗粒 7 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积结果见表 3,4。

表 2 10 批土茯苓配方颗粒相似度的计算

No.	相似度	No.	相似度
S1	0.990	S6	0.989
S2	0.989	S7	0.997
S3	0.993	S8	0.981
S4	0.983	S9	0.991
S5	0.985	S10	0.993

表 3 10 批土茯苓配方颗粒的相对保留时间

Peaks	Peak1	Peak2	Peak3	Peak4(S)	Peak5	Peak6	Peak7
S1	0.444	0.626	0.904	1	1.261	1.397	1.724
S2	0.442	0.625	0.904	1	1.261	1.395	1.721
S3	0.441	0.623	0.903	1	1.262	1.398	1.724
S4	0.441	0.624	0.903	1	1.261	1.397	1.725
S5	0.441	0.623	0.903	1	1.261	1.397	1.723
S6	0.441	0.623	0.903	1	1.263	1.340	1.725
S7	0.441	0.623	0.903	1	1.263	1.399	1.726
S8	0.442	0.624	0.903	1	1.263	1.398	1.723
S9	0.441	0.624	0.903	1	1.262	1.399	1.726
S10	0.442	0.624	0.904	1	1.260	1.398	1.723

## 2.7 方法学考察

**2.7.1 精密性试验** 精密吸取同一配方颗粒供试品溶液,依法连续进样 6 次,结果各特征峰的相对保留时间 RSD 均 < 0.92%,相对峰面积 RSD 均 < 1.68%,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 0.995,0.998,0.993,0.996,0.997,0.996,RSD 0.17%,表明精密性良好。

**2.7.2 重复性试验** 精密吸取同一批配方颗粒供试品溶液 6 份,分别进样,结果各特征峰的相对保留时间 RSD 均 < 0.47%,相对峰面积 RSD 均 < 1.20%,测得的指纹图谱与其所得共有模式图谱的相似度分别为 0.991,0.993,0.989,0.987,0.995,

0.996,RSD 0.35%,表明重复性良好。

**2.7.3 稳定性试验** 分别吸取同一配方颗粒溶液,分别于 0,4,8,12,24 h 进样,记录色谱图。结果各特征峰的相对保留时间 RSD 均 < 1.24%,相对峰面积 RSD 均 < 1.68%,测得的指纹图谱与其所得共有模式图谱的相似度分别为 0.991,0.989,0.995,0.994,0.993,RSD 0.24%,说明样品溶液 24 h 内基本稳定。

**2.8 结果** 指定的土茯苓药材及配方颗粒 7 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(0.44),2(0.63),3(0.90),4S(1.00),5(1.26),6(1.39),7(1.72)。可以作为该品

表 4 10 批土茯苓配方颗粒的相对峰面积

Peaks	Peak1	Peak2	Peak3	Peak4(S)	Peak5	Peak6	Peak7
S1	0.164	0.073	0.230	1	0.236	0.189	0.10
S2	0.188	0.075	0.159	1	0.192	0.186	0.093
S3	0.163	0.143	0.172	1	0.135	0.244	0.073
S4	0.183	0.079	0.138	1	0.184	0.177	0.093
S5	0.170	0.067	0.158	1	0.187	0.192	0.099
S6	0.168	0.087	0.199	1	0.230	0.203	0.083
S7	0.168	0.063	0.174	1	0.192	0.189	0.101
S8	0.160	0.098	0.197	1	0.179	0.225	0.072
S9	0.197	0.045	0.344	1	0.331	0.221	0.098
S10	0.155	0.089	0.156	1	0.177	0.230	0.103

种原料、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,仅有 TLC, FT-IR, HPLC 指纹图谱等少数几种<sup>[5-11]</sup>。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 特征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)、中药汤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。

考察了乙腈-0.05% 磷酸水溶液梯度洗脱与甲醇-0.2% 磷酸水溶液获得的土茯苓配方颗粒图谱<sup>[11]</sup>。结果表明,以甲醇-0.2% 磷酸水溶液为流动相进行洗脱,基线平稳,各成分峰分离度较好。

对土茯苓配方颗粒进行特征图谱分析,共标出 7 个共有峰,鉴定出 2 种成分,10 批样品相似度均 > 0.98,说明不同来源土茯苓配方颗粒的化学组成一致性较好。结果显示,此方法简便可靠、分离效果好,所建立的指纹图谱特征性强,具有较好的稳定性、可控性,可以用于土茯苓药材及其配方颗粒的质量控制。

### [参考文献]

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第 8 册[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1999:163.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:17.

[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] 苏本正. 黄连配方颗粒薄层鉴别方法研究[J]. 山西中医, 2011, 27(11):49.

[6] 孙冬梅, 谭志灿, 毕晓黎, 等. 茵陈配方颗粒红外光谱分析及总黄酮含量测定[J]. 湖北中医药大学学报, 2011, 13(6):30.

[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] 李磊, 张宏桂, 孙毅坤, 等. 土茯苓药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中华中医药杂志, 2007, 22(4):206.

[责任编辑 顾雪竹]