

五味子配方颗粒的 HPLC 指纹图谱研究

胥爱丽*, 董玉娟

(广东省中医研究所, 广州 510095)

[摘要] 目的: 建立五味子配方颗粒的 HPLC 指纹图谱, 为科学评价其质量提供依据。方法: 采用高效液相色谱法, 以 Waters Xbridge C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 为色谱柱, 以乙腈-水为流动相进行梯度洗脱, 检测波长 254 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C。结果: 建立了五味子配方颗粒的指纹图谱, 确定了 18 个共有峰, 各批五味子配方颗粒样品指纹图谱与对照指纹图谱相似度均 > 0.9, 可用于五味子配方颗粒的质量控制。结论: 该方法简单、准确、重复性好, 能有效地对五味子配方颗粒的质量进行评价。

[关键词] 五味子配方颗粒; 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)02-0081-04

Study on HPLC Fingerprint Analysis of *Schisandra chinensis* Formula Granules

XU Ai-li*, DONG Yu-juan

(Guangdong Province Institute of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method of fingerprint analysis on *S. chinensis* Formula Granules by HPLC and provide a reference for quality evaluation of *S. chinensis* Formula Granules. **Method:** The chromatographic fingerprints were obtained by the Waters Xbridge C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with the gradient elution solvent system composed of acetonitrile-water. The detective wavelength was set at 254 nm. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the column temperature was maintained at 25 °C. **Result:** 18 co-possessing peaks were selected as the fingerprint peaks of *S. chinensis* Formula Granules and good similarities with correlation coefficients higher than 0.9 were found in fingerprints between the different samples of *S. chinensis* Formula Granules and the standard fingerprint. **Conclusion:** The method with good reproducibility is simple and accurate. It can be used as a quality control method for *S. chinensis* Formula Granules.

[Key words] *Schisandra chinensis* Formula Granules; HPLC; fingerprints

五味子为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz) Baill. 的干燥成熟果实, 具有收敛固涩、益气生津、补肾宁心之功效、用于久嗽虚喘, 梦遗滑精, 遗尿尿频, 久泻不止, 自汗盗汗, 津伤口渴, 内热消渴, 心悸失眠等症^[1]。

中药的服用以煎剂为主, 煎剂的基础是中药饮

片。然而, 用水煎煮饮片、口服的用药方法和习惯已与现代社会快节奏的生活方式和临床应用不相适应^[2]。五味子配方颗粒是以符合炮制规范的五味子饮片为原料, 经现代工业化提取、浓缩、干燥、制粒而成的中药系列产品, 作为新的饮片形式替代中药饮片供临床配方使用。中药配方颗粒保留了原中药饮片的药性药效, 且具有无需煎煮、易于调剂、携带、运输、储存、服用方便等优点^[3]。中药指纹图谱能较为全面的反映中药饮片或制剂的内在质量, 具有系统性、整体性和稳定性等特点, 特别适用于中药饮片及制剂的质量评价。

目前对五味子配方颗粒质量评价方面的研究仅

[收稿日期] 20120627(005)

[基金项目] 广东省教育部科技部产学研结合项目 (2011A091000005)

[通讯作者] * 胥爱丽, 硕士, 主管中药师, 从事中药质量分析, Tel: 020-83501292, E-mail: xal555@163.com

局限于高效液相色谱法测定单一成分或同时测定几种成分的含量^[4-9],但对五味子配方颗粒指纹图谱研究尚无报道。本文建立了五味子配方颗粒的指纹图谱分析方法,对不同批次五味子配方颗粒进行研究并得出其指纹图谱共有模式,为五味子配方颗粒质量评价提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Waters e2695-2998 型高效液相色谱仪 (PAD 检测器、四元梯度泵), Waters Xbridge C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, Empower 2 数据处理软件系统, KQ5200DE 型数控超声波清洗器 (昆山), Mettler XS205DU 型电子天平 (瑞士), MilliPore Advantage A10 自动纯水机 (美国)。

1.2 试剂 五味子配方颗粒 (批号见表 1) 购于广东一方制药有限公司。五味子甲素 (批号 110764-200408)、五味子乙素 (批号 765-9202)、五味子醇甲 (批号 110857-200406) 对照品均购于中国药品生物制品检定所。

乙腈为色谱纯,液相用水为纯水,其余试剂均为分析纯。

表 1 五味子配方颗粒测试样品批号

样品	批号	样品	批号	样品	批号
S ₁	0706076	S ₅	0901108	S ₈	1005303
S ₂	0708134	S ₆	0906007	S ₉	1007075
S ₃	0712167	S ₇	0912010	S ₁₀	1109066
S ₄	0808029				

2 方法与结果

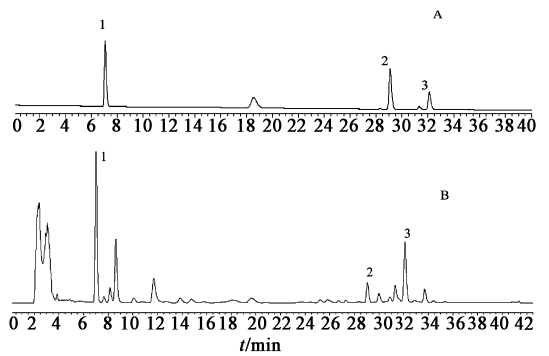
2.1 色谱条件 Waters Xbridge C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 柱, 流动相 A-乙腈 A, B 水, 按表 2 进行梯度洗脱。

表 2 流动相梯度条件

t/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0 ~ 20	55 ~ 50	45 ~ 50
20 ~ 23	50 ~ 70	50 ~ 30
23 ~ 38	70 ~ 85	30 ~ 15

检测波长 254 nm, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 25 °C, 进样体积 10 μL。所得图谱见图 1。

2.1 对照品溶液的制备 取五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 各含五味子醇甲 0.050 4 mg, 五味子甲素 0.039 0 mg, 五味子乙素 0.022 2 mg 的混合溶液, 置冰箱内保存, 备用。



A: 对照品; B: 供试品

1. 五味子醇甲; 2. 五味子甲素; 3. 五味子乙素

图 1 对照品及供试品 HPLC

2.2 供试品溶液的制备 取上述 S₁ ~ S₁₀ 五味子配方颗粒约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 取出, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液过 0.45 μm 滤膜, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 重复性试验 取同一批号样品 (0706076), 分别精密称取 6 份, 按照 2.2 项下方法制备供试品溶液, 分别进样, 以 1 号峰五味子醇甲为参照峰, 计算出 1 ~ 18 号共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD < 3%, 同时用相似度评价软件计算各色谱指纹图谱的相似度均 > 0.99, 表明方法重复性良好。

2.3.2 精密度试验 取重复性试验中同一供试品溶液, 连续进样 5 次, 以 1 号峰五味子醇甲为参照峰, 计算出 1 ~ 18 号共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD < 3%, 同时用相似度评价软件计算各色谱指纹图谱的相似度均 > 0.99, 表明仪器稳定, 精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 取重复性试验中同一供试品溶液, 分别在 0, 4, 8, 12, 24 h 进样, 以 1 号峰五味子醇甲为参照峰, 计算出 1 ~ 18 号共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD < 3%, 同时用相似度评价软件计算各色谱指纹图谱的相似度均 > 0.99, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4 指纹图谱的建立 精密吸取 2.2 项下制备的供试品溶液各 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 得到 10 个批号五味子配方颗粒 HPLC 指纹图谱, 将其导入采用药典委员会推荐的中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (A 版), 进行色谱峰匹配, 匹配结果见图 3, 所得对照指纹图谱见图 4。以 1 号峰五味子醇甲为

表 3 10 批五味子配方颗粒共有峰的相对保留时间

No.	样品号									
	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈	S ₉	S ₁₀
1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
2	1.092	1.092	1.092	1.092	1.092	1.092	1.092	1.092	1.092	1.092
3	1.164	1.163	1.163	1.163	1.162	1.164	1.163	1.164	1.164	1.164
4	1.230	1.229	1.229	1.230	1.229	1.230	1.230	1.230	1.230	1.230
5	1.530	1.530	1.530	1.534	1.532	1.529	1.529	1.529	1.529	1.528
6	1.668	1.668	1.667	1.669	1.669	1.668	1.668	1.669	1.669	1.669
7	1.975	1.976	1.974	1.976	1.977	1.972	1.976	1.975	1.975	1.975
8	2.105	2.104	2.104	2.106	2.105	2.104	2.103	2.107	2.105	2.106
9	2.799	2.799	2.799	2.798	2.798	2.799	2.799	2.799	2.798	2.799
10	3.592	3.589	3.589	3.599	3.602	3.593	3.598	3.592	3.590	3.590
11	3.677	3.671	3.673	3.675	3.678	3.677	3.674	3.678	3.674	3.673
12	3.804	3.802	3.802	3.803	3.804	3.804	3.802	3.805	3.800	3.801
13	4.137	4.132	4.133	4.137	4.134	4.134	4.134	4.137	4.132	4.134
14	4.269	4.265	4.266	4.261	4.262	4.267	4.268	4.271	4.265	4.267
15	4.396	4.391	4.392	4.397	4.397	4.392	4.394	4.396	4.390	4.390
16	4.458	4.453	4.453	4.456	4.459	4.455	4.456	4.459	4.452	4.455
17	4.570	4.564	4.566	4.562	4.570	4.565	4.567	4.570	4.562	4.565
18	4.792	4.793	4.796	4.791	4.797	4.794	4.796	4.799	4.791	4.794

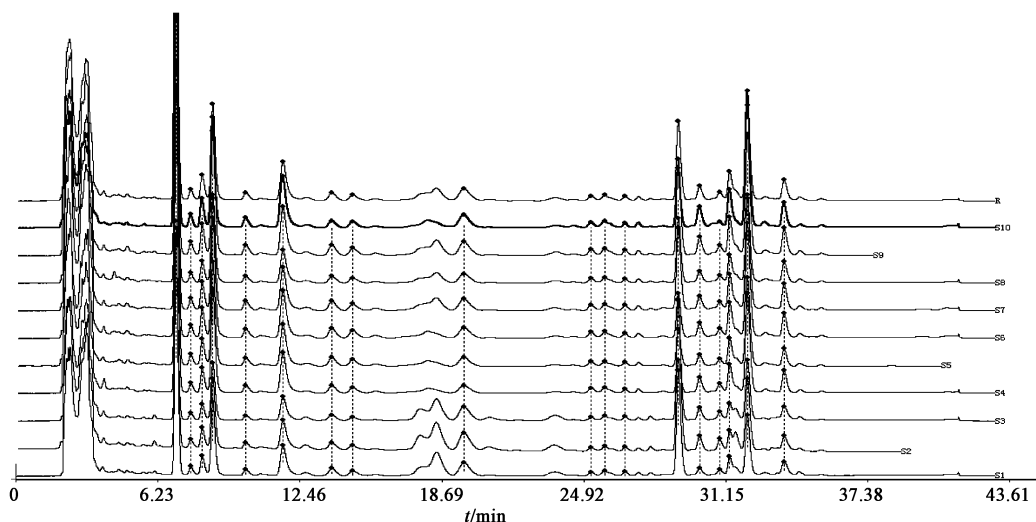


图 2 10 批五味子配方颗粒匹配色谱

参照确定 18 个共有峰为构成五味子配方颗粒指纹图谱的特征峰,样品共有峰的相对保留时间及相对峰面积分别列于表 2、表 3。10 批五味子配方颗粒与对照指纹图谱相似度计算结果分别为:0.947, 0.902, 0.911, 0.995, 0.995, 0.995, 0.996, 0.997, 0.996, 0.990。

3 讨论

对五味子配方颗粒的提取方法进行考察筛选,

最终选定用甲醇作为提取溶剂,超声提取 30 min。超声提取是利用超声波的波效应、机械粉碎作用和空化作用,提取杂质较少,并且消耗时间短,操作方便,加热回流法和超声提取法的提取率无明显差异,故采用甲醇作提取溶剂,超声提取,方法简便、快速。考察流动相系统、检测波长这两个因素,并结合相关色谱图的分离度,基线,所提供的信息综合考虑,最终确定 HPLC 色谱条件。由于五味子配方颗粒的成

表 4 10 批五味子配方颗粒共有峰的相对峰面积

No.	样品号									
	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈	S ₉	S ₁₀
1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
2	0.042	0.042	0.040	0.034	0.041	0.039	0.039	0.037	0.038	0.030
3	0.098	0.107	0.098	0.096	0.104	0.101	0.101	0.092	0.099	0.071
4	0.384	0.387	0.378	0.432	0.432	0.444	0.434	0.407	0.429	0.301
5	0.038	0.035	0.035	0.038	0.039	0.039	0.043	0.038	0.043	0.032
6	0.243	0.251	0.239	0.245	0.249	0.251	0.238	0.218	0.242	0.205
7	0.069	0.069	0.068	0.050	0.057	0.058	0.057	0.050	0.060	0.031
8	0.044	0.063	0.060	0.041	0.046	0.047	0.043	0.041	0.044	0.030
9	0.158	0.258	0.213	0.076	0.089	0.090	0.104	0.098	0.110	0.080
10	0.022	0.026	0.026	0.026	0.025	0.027	0.027	0.024	0.027	0.018
11	0.045	0.052	0.054	0.038	0.036	0.038	0.042	0.039	0.043	0.035
12	0.020	0.026	0.040	0.015	0.018	0.016	0.020	0.017	0.019	0.012
13	0.580	0.875	0.816	0.151	0.158	0.164	0.356	0.300	0.337	0.162
14	0.044	0.100	0.092	0.078	0.066	0.066	0.069	0.061	0.075	0.068
15	0.032	0.074	0.060	0.052	0.045	0.047	0.045	0.043	0.049	0.030
16	0.137	0.214	0.184	0.154	0.160	0.168	0.180	0.170	0.173	0.126
17	0.339	0.429	0.415	0.457	0.412	0.465	0.476	0.447	0.463	0.404
18	0.084	0.085	0.091	0.101	0.084	0.096	0.117	0.116	0.115	0.074

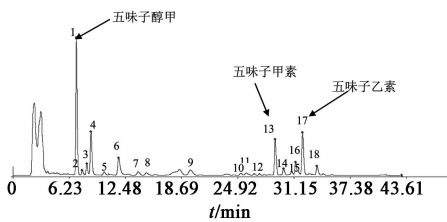


图 3 五味子配方颗粒对照指纹图谱

分复杂,选择单一的流动相比比例无法达到很好的分离,而采用梯度洗脱可以使五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素的色谱峰达到基线分离。考虑到使用甲醇^[10]作流动相柱压较高,波动较大,故改为乙腈-水体系作为流动相,结果表明乙腈-水体系可使色谱峰达到基线分离,出峰较多,且峰形较好。

与对照品 HPLC 色谱图相比较,确认不同批号五味子配方颗粒 HPLC 共有模式图中 1 号峰为五味子醇甲,13 号峰为五味子甲素,17 号峰为五味子乙素,其中 1 号峰五味子醇甲峰面积较大且较稳定,选择此峰为参照峰。不同批号五味子配方颗粒中五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素含量也有所不同,这可认为是与原料(生长环境、采收时间等)或制备工艺(提取、过滤、浓缩、干燥、制粒)等因素影响有关。故在生产配方颗粒时要对原料要进行质量控制并采用规范化的生产工艺以确保配方颗粒的质量稳定。

[参考文献]

[1] 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: 292.

[2] 叶殷殷, 曾元儿, 曹骋. 中药配方颗粒的研究进展[J]. 临床医学工程, 2011, 18(5): 807.

[3] 陈培胜, 朱月信. 中药配方颗粒行业标准研究思路[J]. 中医杂志, 2012, 53(6): 469.

[4] 周继政, 陈庆辉, 徐以亮. 高效液相色谱法测定五味子配方颗粒中五味子醇甲的含量[J]. 时珍国医国药, 2003, 14(12): 732.

[5] 叶绿萍, 黄志俭, 刘小意, 等. 北五味子配方颗粒中五味子甲素及乙素的含量测定[J]. 云南中医中药杂志, 2011, 32(8): 67.

[6] 张岚, 杨水新. 五味子配方颗粒中木脂素成分分析[J]. 药学实践杂志, 2007, 25(6): 382.

[7] 黄文倩, 李丽, 肖永庆, 等. HPLC 同时测定五味子中 6 种木脂素类成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10): 63.

[8] 李先宽, 王冰, 何华, 等. 辽宁省五味子木脂素含量动态变化研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1): 107.

[9] 楼招欢, 吕圭源, 陈素红. 南、北五味子及其炮制品中木脂素类成分比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18): 43.

[10] 高建平, 王彦涵, 郁韵秋, 等. 南五味子木脂素成分的 HPLC 含量测定及其变异规律[J]. 中国天然药物, 2003, 1(2): 891.

[责任编辑 顾雪竹]