

健胃消食片 HPLC 指纹图谱研究

陈华¹, 李岚¹, 陈小荣¹, 简晖², 张国松², 刘旭海^{1*}

(1. 江中药业股份有限公司, 南昌 330096;

2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330004)

[摘要] **目的:**采用 HPLC 建立健胃消食片的指纹图谱,为其质量控制提供有效的方法。**方法:**采用 XDB C₁₈柱,以乙腈-0.1% 磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 220 nm,运用国家药典委员会指纹图谱相似度计算软件,确定指纹图谱共有峰,计算相似度,并与市场上 4 批假冒江中健胃消食片的指纹图谱进行比较。**结果:**根据 13 批江中健胃消食片指纹图谱,确定了 17 个共有峰,其相似度均大于 0.97,而假冒产品指纹图谱相似度均 < 0.90。**结论:**所建立 HPLC 指纹图谱具有较好的精密度和重现性,可以有效表征江中健胃消食片的质量特点,能够有效控制产品质量。

[关键词] 高效液相色谱; 健胃消食片; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)05-0079-04

Study on HPLC Fingerprint of Jianwei Xiaoshi Tablets

CHEN Hua¹, LI Lan¹, CHEN Xiao-rong¹, JIAN Hui², ZHANG Guo-song², LIU Xu-hai^{1*}

(1. Jiangzhong Pharmaceutical Co. Ltd., Nanchang 330096, China; 2. The National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China;)

[Abstract] **Objective:** HPLC fingerprints of Jianwei Xiaoshi tablets were established to provide an effective method of quality control for it. **Method:** XDB C₁₈ column was used with acetonitrile-0.1% phosphate aqueous as the mobile phase by gradient elution; the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was at 220 nm. Fingerprint similarity evaluation software was used to determine common fingerprint peaks, calculate the similarity, and compared with 4 counterfeit Jianwei xiaoshi tablets on the market. **Result:** Under 13 Jianwei Xiaoshi tablets in Jiang's fingerprint, 17 common peaks were identified, the similarity was greater than 0.97, and the similarity of fingerprint of counterfeit products was less than 0.90. **Conclusion:** HPLC fingerprint established has better precision and reproducibility, and can effectively characterize the quality of Jianwei Xiaoshi tablets and control the product quality.

[Key words] HPLC; Jianwei Xiaoshi tablets; fingerprint

健胃消食片是由太子参、陈皮、山药、麦芽(炒)、山楂 5 味药制成的复方制剂^[1]。在现行质量控制方法中,仅采用高效液相色谱法测定指标成分

橙皮苷的含量。指纹图谱较好反映中药复杂的化学成分及其相对比例,在大多数中药有效成分尚未阐明的现状下,可有效地表征中药质量,已成为国内公认的鉴别中药和评价中药质量的有效手段,是一种良好的色谱鉴定方法^[2]。本实验采用 HPLC 法建立了健胃消食片指纹图谱色谱条件,可用于健胃消食片的质量控制。

1 材料

1.1 仪器 美国 Waters 高效液相色谱仪(Empower 工作站),2996PAD 检测器,上海科导超声有限公司 SK3200H 型超声仪,梅特勒 AG245 型电子天平。

1.2 试药 橙皮苷(110721-200211)对照品购于中国

[收稿日期] 20110211(006)

[基金项目] 江西省科委优势科技创新团队(2010DQB00100);江西省科技带头人培养计划(2009DD00400);十一五国家重大新药创制专项项目(2009ZX09308-003-313)

[第一作者] 陈华,执业药师,从事质量标准和质量控制研究, Tel:0791-3797080

[通讯作者] *刘旭海,硕士生导师,总工程师,从事中药学研究, Tel:0791-8164007, E-mail:LXH@jzjt.com

药品生物制品检定所;乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯;健胃消食片由江中药业股份有限公司提供;假冒江中健胃消食片均为市场抽查样品。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 分别取橙皮苷对照品适量,精密称定,用甲醇溶解制成每 1 mL 含橙皮苷 40 μg 的对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 取健胃消食片适量,研细,取约 3.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加水 50 mL,称定质量,超声处理 30 min,放冷,再称定质量,用水补足减失的质量,摇匀,离心,精密量取上清液 25 mL,置分液漏斗中,用水饱和的正丁醇提取 3 次,每次 20 mL,合并正丁醇液。再用正丁醇饱和的水洗涤 2 次,每次 20 mL,弃去水液。分取正丁醇液,水浴蒸干,残渣加 50% 甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.3 色谱条件 色谱柱 XDB C_{18} 柱(4.6 mm \times 250 mm 5 μm),以乙腈-0.1% 磷酸溶液按表 1 进行梯度洗脱,流速 1.0 mL \cdot min $^{-1}$,检测波长 220 nm,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。精密吸取以上溶液各 20 μL 注入液相色谱仪中测定。

表 1 流动相梯度洗脱程序 %

t/min	乙腈	0.1% 磷酸溶液
0 ~ 15	5 ~ 10	95 ~ 90
15 ~ 30	10 ~ 20	90 ~ 80
30 ~ 45	20 ~ 30	80 ~ 70
45 ~ 60	30 ~ 40	70 ~ 60
60 ~ 70	40 ~ 5	60 ~ 95

2.4 稳定性试验 取同一供试品(批号 10090148)溶液,分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 h 进样,考察各共有峰与内参比峰(14 号峰橙皮苷)的相对保留时间及相对峰面积比值的一致性,结果各共有峰的相对保留时间 RSD 0.92% ~ 2.41%,相对峰面积比值 RSD 0.90% ~ 2.56%,结果显示供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.5 精密度试验 取同一供试品(批号 10090148)溶液,连续进样 6 次,考察各共有峰的相对保留时间及相对峰面积比值的一致性,结果各共有峰的相对保留时间 RSD 0.60% ~ 2.01%,相对峰面积比值 RSD 0.89% ~ 2.21%,符合指纹图谱要求,精密度良好。

2.6 重复性试验 取同一批号(10090148)的供试品溶液 6 份,进行测定,考察各共有峰的相对保留时间及相对峰面积比值的一致性,结果各共有峰的相对保留时间 RSD 0.46% ~ 2.02%,相对峰面积比值 RSD 0.91% ~ 2.41%,结果表明方法重复性良好。

3 指纹图谱的建立及分析

3.1 健胃消食片高效液相指纹图谱的建立 以 13 批健胃消食片为研究对象,进行特征指纹图谱研究。在上述色谱条件下分析,记录色谱图。获得包括橙皮苷(14 号峰,内参比峰)在内的色谱峰,从图中选出 17 个共有峰,其中超过总峰面积 10% 的色谱峰有 2 个,作为指纹图谱的特征峰,组建健胃消食片的指纹图谱。计算各特征峰的相对保留时间,数据见表 2。

3.2 特征指纹图谱相似度评价 应用国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统研究版(2004 A)”对 13 批健胃消食片进行质量评价。将 13 批样品色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统研究版(2004 A)”,经校准后,软件即生成“对照谱图”。参与共有模式建立的样品色谱图和生成的对照谱图见图 1, 2。

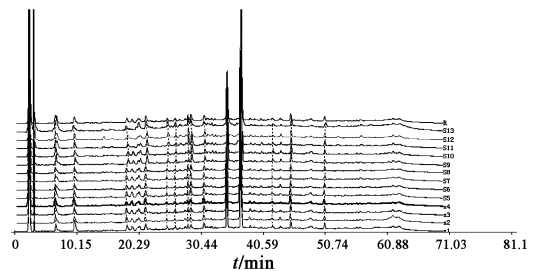


图 1 13 批样品的 HPLC 指纹图谱

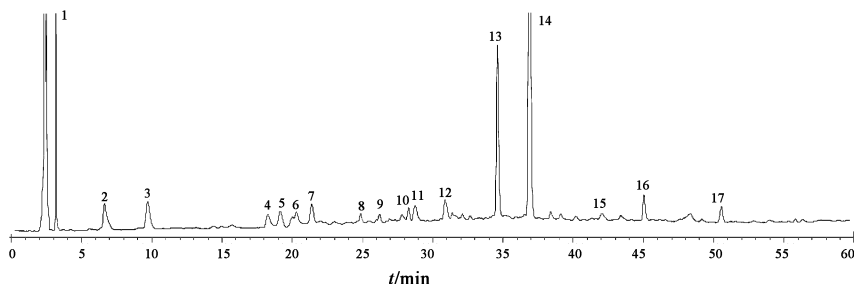


图 2 健胃消食片对照指纹图谱

表 2 13 批健胃消食片共有峰相对保留时间

批号	峰号																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
0801008	0.086	0.183	0.265	0.497	0.520	0.551	0.579	0.674	0.710	0.766	0.779	0.836	0.938	1	1.139	1.220	1.370
0802016	0.086	0.181	0.264	0.494	0.518	0.551	0.579	0.674	0.710	0.767	0.780	0.837	0.938	1	1.140	1.222	1.373
0803047	0.086	0.180	0.263	0.494	0.518	0.549	0.578	0.674	0.709	0.766	0.779	0.837	0.938	1	1.140	1.221	1.371
0804129	0.086	0.180	0.263	0.495	0.519	0.550	0.580	0.674	0.710	0.767	0.780	0.837	0.938	1	1.140	1.221	1.371
0805116	0.086	0.181	0.264	0.495	0.519	0.551	0.580	0.674	0.709	0.766	0.779	0.837	0.938	1	1.139	1.220	1.370
0806063	0.086	0.180	0.263	0.495	0.520	0.551	0.580	0.675	0.710	0.767	0.780	0.837	0.938	1	1.138	1.220	1.372
0807052	0.086	0.181	0.264	0.495	0.519	0.550	0.580	0.674	0.710	0.766	0.779	0.837	0.938	1	1.140	1.222	1.373
0809025	0.086	0.181	0.264	0.495	0.519	0.551	0.580	0.674	0.710	0.767	0.780	0.837	0.938	1	1.139	1.221	1.372
09110113	0.086	0.184	0.263	0.502	0.523	0.555	0.584	0.676	0.712	0.768	0.782	0.839	0.939	1	1.139	1.219	1.368
0911066	0.086	0.181	0.265	0.500	0.523	0.555	0.584	0.676	0.711	0.767	0.781	0.839	0.939	1	1.138	1.219	1.367
10090148	0.086	0.181	0.264	0.500	0.523	0.555	0.584	0.680	0.711	0.767	0.781	0.839	0.939	1	1.138	1.220	1.368
10090151	0.085	0.180	0.264	0.500	0.523	0.555	0.584	0.677	0.711	0.768	0.781	0.839	0.939	1	1.138	1.220	1.369
10110010	0.084	0.180	0.263	0.499	0.523	0.554	0.582	0.678	0.712	0.768	0.781	0.839	0.938	1	1.149	1.221	1.370

再将对照谱图和 13 批样品色谱图全谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统检验版(2004 B)”,即可计算出样品与对照谱图的相似度

数据,结果见表 3。以 2 种方法(相关系数分别为平均数和中位数)计算的相似度均在 0.97 以上,符合指纹图谱技术要求^[3]。结果见表 4。

表 3 13 批次的健胃消食片相似度计算

样品号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	R
S1	1	0.913	0.912	0.923	0.901	0.92	0.936	0.953	0.957	0.902	0.902	0.909	0.944	0.919
S2	0.913	1	0.997	0.995	0.996	0.997	0.991	0.978	0.982	0.988	0.985	0.984	0.981	0.998
S3	0.912	0.997	1	0.998	0.995	0.997	0.992	0.979	0.983	0.987	0.983	0.984	0.984	0.998
S4	0.923	0.995	0.998	1	0.989	0.997	0.997	0.988	0.99	0.981	0.977	0.98	0.986	0.996
S5	0.901	0.996	0.995	0.989	1	0.995	0.981	0.963	0.969	0.994	0.992	0.99	0.976	0.997
S6	0.92	0.997	0.997	0.997	0.995	1	0.993	0.982	0.984	0.99	0.988	0.988	0.983	0.999
S7	0.936	0.991	0.992	0.997	0.981	0.993	1	0.996	0.997	0.972	0.969	0.973	0.985	0.991
S8	0.953	0.978	0.979	0.988	0.963	0.982	0.996	1	0.998	0.954	0.951	0.956	0.978	0.978
S9	0.957	0.982	0.983	0.99	0.969	0.984	0.997	0.998	1	0.96	0.957	0.962	0.982	0.982
S10	0.902	0.988	0.987	0.981	0.994	0.99	0.972	0.954	0.96	1	0.999	0.997	0.979	0.992
S11	0.902	0.985	0.983	0.977	0.992	0.988	0.969	0.951	0.957	0.999	1	0.997	0.976	0.99
S12	0.909	0.984	0.984	0.98	0.99	0.988	0.973	0.956	0.962	0.997	0.997	1	0.985	0.99
S13	0.944	0.981	0.984	0.986	0.976	0.983	0.985	0.978	0.982	0.979	0.976	0.985	1	0.984
R	0.919	0.998	0.998	0.996	0.997	0.999	0.991	0.978	0.982	0.992	0.99	0.99	0.984	1

3.3 指纹图谱的应用 取 4 批假冒江中健胃消食片样品,按建立的指纹图谱分析方法操作,进行指纹图谱相似度评价。假冒产品与江中健胃消食片指纹图谱见图 3,相似度评价数据见表 5。结果假冒产品的相似度均 < 0.90,说明两者质量存在明显差异。

4 讨论

4.1 提取方法的考察 本实验曾采用水、50% 甲醇、甲醇分别超声提取,结果杂质峰干扰严重,分离度较差。而采用水超声提取后正丁醇萃取,可除去较多杂质峰,各组分能够良好分离,色谱图包含的色谱峰信息多。

表 4 13 批次的健胃消食片相似度数据

项目	相似度	
	平均数	中位数
S1	0.990	0.998
S2	0.998	0.995
S3	0.998	0.996
S4	0.996	0.996
S5	0.997	0.993
S6	0.999	0.998
S7	0.991	0.993
S8	0.978	0.985
S9	0.982	0.988
S10	0.991	0.991
S11	0.992	0.989
S12	0.990	0.991
S13	0.990	0.992

表 5 假药的相似度评价数据

项目	相似度	
	平均数	中位数
S1	0.836	0.836
S2	0.846	0.846
S3	0.881	0.881
S4	0.772	0.772
江中健胃消食片	1	

的特征图谱进行分析,结合色谱峰个数和峰强度综合考察,结果在 220 nm 波长下可以比较完整地体现健胃消食片的特征图谱特征,故选择 220 nm 作为特征图谱的检测波长。

按照江中健胃消食片指纹图谱色谱条件,确定了 17 个共有峰,各色谱峰特征峰保留时间稳定,13 批样品的相似度均 < 0.97,能够体现江中健胃消食片的质量特点,而 4 批假冒江中健胃消食片的相似度均 < 0.90,说明江中健胃消食片与假冒产品质量存在明显差异,所建立的指纹图谱具有较好的稳定性和鉴别作用,可用于江中健胃消食片的质量评价。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2010:122.
- [2] 谢培山.色谱指纹图谱分析是中药质量控制的可行策略[J].中药新药与临床药理,2001,12(3):141.
- [3] 国家药品管理监督局.中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)的通知[J].中成药,2000,22(10):671.
- [4] 宋洁瑾,陈涛,李进.梯度洗脱方法在中药指纹图谱中的应用[J].天津药学,2007,6(19):70.
- [5] 钱俊臻,王伯初.橙皮苷药理作用研究进展[J].天然产物研究与发展,2010,22:176.

[责任编辑 蔡仲德]

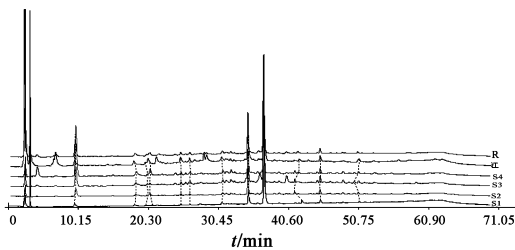


图 3 4 批假药指纹图谱(S5 为江中健胃消食片, S1, S2, S3, S4 为假药)

4.2 流动相的选择 本试验曾采用乙腈-0.1% 磷酸溶液流动相系统^[4],甲醇-0.1% 磷酸流动相系统等,由于色谱峰分离度不好,最终选择了乙腈-0.1% 磷酸溶液梯度流动相系统。

4.3 波长的选择 因中药成分复杂,在一个波长下难以体现所有成分的特征。故对 200 ~ 360 nm 波段