

糖脉康颗粒 HPLC-DAD 指纹图谱研究

赵启鹏^{1,2}, 张艺³

(1. 宁夏回药现代化工程技术研究中心, 银川 750004; 2. 宁夏医科大学药学院, 银川 750004;
3. 成都中医药大学民族医药学院, 成都 611137)

[摘要] 目的: 建立糖脉康颗粒的 HPLC-DAD 指纹图谱, 为评价及控制药品质量提供可靠方法。方法: 采用梯度洗脱方法对样品进行分析。DIKMA 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 0.4% 冰乙酸-乙腈梯度洗脱, 检测波长 270 nm, 柱温 30 °C; 采用指纹图谱相似度软件进行数据分析。结果: 建立了糖脉康颗粒的 HPLC-DAD 对照指纹图谱, 方法精密度、稳定性和重复性良好。标示了 21 个共有色谱峰, 14 批样品的色谱指纹图谱的相似度 > 0.80。结论: 糖脉康颗粒 HPLC-DAD 指纹图谱的建立, 可为有效控制糖脉康颗粒成品制剂的质量提供参考。

[关键词] 糖脉康颗粒; 高效液相色谱-二极管阵列; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)19-0101-04

Research on HPLC-DAD Fingerprint of Compound Tangmaikang

ZHAO Qi-peng^{1,2}, ZHANG Yi³

(1. Ningxia Research Center of Modern Hui Medicine Engineering and Technology, Yinchuan 750004, China;
2. College of Pharmacy, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China;
3. College of Ethnomedicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a sensitive HPLC-DAD fingerprint method for controlling the quality of compound Tangmaikang. **Method:** HPLC analysis was performed on a Dikma C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), with a mixture of acetonitrile and water as mobile phase in gradient mode. The wavelength was set at 270 nm, and column temperature was 30 °C. The data were processed by fingerprint similarity evaluation software. **Result:** A standard HPLC-DAD fingerprint for Compound Tangmaikang with 21 common peaks was established. The similarity of 14 batches of compound Tangmaikang was more than 0.80. Good precision, stability and repetition were showed. **Conclusion:** This method can be used for the quality control of compound Tangmaikang.

[Key words] Tangmaikang; HPLC-DAD; fingerprint

糖脉康颗粒组方来源于《丹溪心法·消渴方》、《景岳全书·玉女煎》和《金匱要略·肾气丸》^[1-3]。由黄芪、丹参、葛根、黄连、淫羊藿等中药组成。具有养阴清热, 活血化瘀, 益气固肾之功效。用以气阴两虚兼血瘀证为主要证候的糖尿病。

指纹图谱技术具有整体性和模糊性的基本属

性, 能反应物质特征的“完整全貌”。中药指纹图谱的方法及思路, 对于更好的控制中药复方制剂质量均有很大帮助, 本实验通过对糖脉康颗粒进行指纹图谱研究, 可以为糖脉康颗粒的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器 美国安捷伦 1200 系列高效液相色谱仪: 标准自动进样器 (G1329A), 二极管阵列检测器 (G1315B/C), HT-340K 柱温箱; 电子天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

1.2 试剂 乙腈、甲醇 (色谱纯, Fisher 公司), 冰乙酸 (HPLC 级, 成都科龙化工试剂厂)。糖脉康颗粒

[收稿日期] 20110517(001)

[第一作者] 赵启鹏, 博士, 讲师, 从事中药及民族药药效物质基础研究, Tel: 0951-6980585, E-mail: zhqp623@126.com

由成都中汇制药有限公司生产,黄芪、生地、赤芍、丹参、牛膝、麦冬、黄精、葛根、桑叶、淫羊藿、黄连 11 味药由成都惠康公司提供;芍药苷(批号 110736-200526),葛根素(批号 110752-200511),淫羊藿苷(批号 110737-200414),芦丁对照品(批号 100080-200707),盐酸小檗碱(批号 110713-200609),丹酚酸 B(批号 111562-200605),原儿茶醛(批号 110810-200506)对照品均购自中国药品生物制品检定所。丹酚酸 A(批号 080412)购自上海融禾医药科技有限公司,麦冬皂苷 D'(批号 PS09060801,纯度为 98.9%)成都普思生物科技有限公司。

2 方法

2.1 色谱条件 Dikma 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 柱号 8132726);以 0.4% 冰乙酸为流动相 A,以乙腈为流动相 B。以 3% 乙腈为起始比例,以 100% 乙腈为结束比例。洗脱程序如表 1 所示;流速 1.0 mL·min⁻¹;柱温 30 ℃;检测波长 270 nm;进样量为 10 μL。

表 1 糖脉康颗粒测定洗脱程序

t/min	0.4% 冰乙酸/%	乙腈/%
0	97	3
5	94	6
10	88	12
25	86	14
30	80	20
50	70	30
55	55	45
65	0	100
70	0	100

2.2 对照品溶液的制备 精密称取芍药苷、葛根素、淫羊藿苷、芦丁对照品、盐酸小檗碱、丹酚酸 B、原儿茶醛 0.5 mg,置 2 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜过滤后,即得。

2.3 供试品溶液的制备 精密称定糖脉康颗粒 2.5 g,加入甲醇 25 mL,精密称重,超声 40 min,补充甲醇至原质量,取上清液的续滤液过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度考察 取同一样品按指纹图谱的色谱条件,等量重复进样 6 次,以 9 号峰的保留时间和峰面积为参照,根据样品共有峰的相对保留时间和相对峰面积,计算 RSD。结果显示,各共有峰的相对保留时间 RSD 为 0.03% ~ 0.15%,相对峰面积的

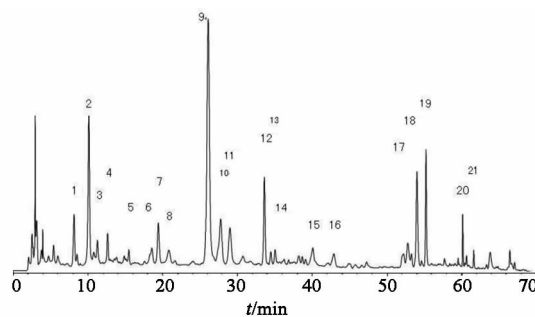
RSD 为 0.82% ~ 2.28%,采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”计算其相似度 > 0.999,表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性考察 取同一样品平行制备 6 份供试品溶液,检测指纹图谱。测得各共有峰相对保留时间的 RSD 0.05% ~ 0.76%,相对峰面积的 RSD 为 0.48% ~ 1.86%,计算其相似度 > 0.999,表明其重复性良好。

2.4.3 稳定性考察 取同一样品制备供试品溶液,在室温下分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样,检测指纹图谱。测得各共有峰相对保留时间的 RSD 0.04% ~ 0.82%,相对峰面积的 RSD 为 1.47% ~ 2.53%,计算其相似度在 0.999 以上表明在密封、避光条件下供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

3 结果

3.1 指纹图谱的建立 按 2.3 项下操作,制备 14 批次糖脉康颗粒的供试品溶液,并在上述的色谱条件下,精密吸取各供试品溶液和对照品溶液 10 μL,注入高效液相色谱仪,记录 70 min 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 21 个特征峰构成糖脉康颗粒的指纹图谱,其共有峰峰面积占总峰面积的 90% 以上,非共有峰面积百分比在 3.755% ~ 9.37%,符合指纹图谱的有关规定。葛根素为糖脉康颗粒中的主要活性成分之一,出峰时间适中,色谱响应值高,因此选择葛根素为参照峰。见图 1, 2。



6. 原儿茶醛;9. 葛根素;16. 盐酸小檗碱;
17. 丹酚酸 B;18. 淫羊藿苷

图 1 糖脉康颗粒 HPLC-DAD 指纹图谱

3.2 相似度评价 采用国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》^[4]评价 14 批糖脉康颗粒的指纹图谱,以均值法生成对照指纹图谱,建立共有模式。测得各批次样品与共有模式间的相似度,结果均 > 0.88,见表 2。

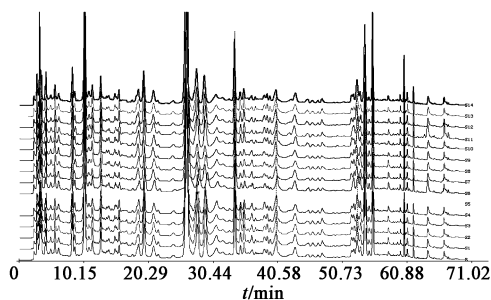


图2 14批糖脉康颗粒 HPLC-DAD 指纹图谱叠加

表2 14批糖脉康颗粒相似度评价

No.	批号	相似度	No.	批号	相似度
S ₁	081011	0.995	S ₈	090422	0.908
S ₂	081110	0.990	S ₉	090617	0.880
S ₃	081222	0.985	S ₁₀	090801	0.994
S ₄	090107	0.970	S ₁₁	081011	0.978
S ₅	090212	0.993	S ₁₂	090904	0.996
S ₆	090402	0.941	S ₁₃	090912	0.993
S ₇	090405	0.951	S ₁₄	090918	0.996

3.3 21个共有色谱峰的药材归属 分别精密称定药材阴性对照和阳性对照样品约0.50 g,按2.3项下制备样品供试液,按照糖脉康颗粒指纹图谱的色谱条件测定,得到各样品的图谱,进行药材与成品的色谱峰归属,结果见表3。通过对糖脉康颗粒、阴性制剂、组方药材及对照品的图谱进行比对,确定了糖脉康颗粒 HPLC-DAD 指纹图谱中21个色谱峰的药材归属,其中6,9,16,17,19号峰经过与相对应的对照品对照后确定:峰6为原儿茶醛(18.7 min)、峰9为葛根素(26.2 min)、峰16为盐酸小檗碱(43.8 min)、峰17为丹酚酸B(53.4 min)、峰19为淫羊藿苷(56.2 min)。

4 讨论

4.1 供试品处理方法选择 考察了D₁₀₁、AB-8型大孔树脂处理,正丁醇萃取,不同体积分数的甲醇和乙醇(100%,75%,50%,25%,5%)超声和回流提取等方法。以尽可能将处方中主要有效成分提取表征为原则,以色谱图的信息量及分离度为评价指标进行筛选,简便易行,最终确定直接以甲醇超声为处理方法。

4.2 色谱柱选择 考察了大连依利特C₁₈色谱柱(4.6 mm×150 mm,5 μm)、Welchrom C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm)和Diamonsil C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm)Dikma C₁₈色谱柱

表3 糖脉康颗粒 HPLC-DAD 指纹图谱 21个色谱峰归属

峰号	可能药材来源	标定对照品
1	麦冬、牛膝、生地等	-
2	赤芍	-
3	赤芍、麦冬、牛膝、生地、丹参	-
4	丹参	-
5	麦冬、淫羊藿	-
6	丹参	原儿茶醛
7	-	-
8	黄连、淫羊藿	-
9	葛根	葛根素
10-14	葛根	-
15	-	-
16	黄连	盐酸小檗碱
17	丹参	丹酚酸B
18-21	淫羊藿	-
19	淫羊藿	淫羊藿苷

(4.6 mm×250 mm,5 μm),按拟定的色谱条件使用四种色谱柱对同一样品进行分析,根据具体的分离情况,最终选择Dikma C₁₈色谱柱。

4.3 流动相的选定 考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.4%冰乙酸、乙腈-0.4%冰乙酸4个流动相系统。结果表明,甲醇-水系统谱图基线漂移,乙腈-水主要色谱峰分离度较差,而在水相加入0.4%冰乙酸后能明显使主要色谱峰的分离度提高,故最终确定流动相系统为0.4%冰乙酸-乙腈为流动相。样品90 min图谱显示,在70 min后无特征峰出现,因此最终确定采样时间为70 min。

4.4 检测波长的选择 采用二极管阵列检测器做全波长扫描,重点考察了220,254,270,320,360 nm处的谱图特征。结果表明220 nm处基线漂移严重,254 nm处主要色谱峰吸收较弱,320 nm处前段色谱峰有缺失,270 nm,360 nm处各成分具有较好的紫外吸收,色谱信息最为丰富,但270 nm处基线较平稳。因此选择270 nm为糖脉康颗粒指纹图谱的检测波长。

糖脉康颗粒 HPLC-DAD 指纹图谱与制剂的“完整全貌”糖脉康颗粒是由黄芪、葛根、丹参等11味药材组成。以确定的 HPLC-DAD 色谱方法对黄芪、黄精、桑叶药材进行测试未能检测出特征峰,可能与样品制备方法和检测器对药材成分响应值不高有关。

天麻饮片的 HPLC 指纹图谱鉴别

麻印莲, 肖永庆, 耿立冬, 张村*, 李丽, 于定荣, 顾雪竹
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 研究建立天麻饮片的 HPLC 指纹图谱鉴别方法。方法: 选择 HPLC-UV 指纹图谱法, Kromasil C₁₈ 柱; 流动相乙腈-0.5% 冰醋酸溶液线形梯度洗脱, 检测波长 270 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹。以指纹图谱软件计算相似度和图谱比较, 以聚类分析比较不同来源饮片的差异。结果: 建立了天麻饮片的标准指纹图谱, 6 个产地共 10 批次天麻饮片的指纹图谱基本一致, 共能检出 15 个共有峰, 10 个样品的平均相似度 >98%, 但相对峰面积有较大差异; 聚类分析结果与饮片产地基本一致。结论: 该方法重复性好, 结合聚类分析可用于天麻饮片的定性鉴别, 为天麻饮片的质量控制提供了科学依据。

[关键词] 天麻饮片; 指纹图谱; 鉴别

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)19-0104-04

HPLC Fingerprint Chromatograms for Processed Products of *Gastrodia elata*

MA Yin-lian, XIAO Yong-qing, GENG Li-dong, ZHANG Cun*, LI Li, YU Ding-rong, GU Xue-zhu
(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medicinal Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the HPLC fingerprint chromatogram identification of the processed products from *Gastrodia elata*. **Method:** HPLC procedure was performed on a chromatographic column of Kromasil C₁₈. Acetonitrile-glacial acetic acid water solution (0.5%) was used as mobile phase by gradient elution, and the detection wavelength was at 270 nm. The mobile phase flow rate was at 1.0 mL·min⁻¹. The similarity and the clustering analysis were carried out by fingerprint chromatogram software. **Result:** The standard HPLC Fingerprint chromatogram was established through the determination of 10 batches processed products from 6 different producing areas. 15 peaks can be detected and the average similarity was over 98% in 10 samples. The processed products were almost the same on the whole chromatograms but the relative peak areas had the differences. The cluster analysis was consistent with the processed origins. **Conclusion:** HPLC method can be used in quality control of *G. elata*.

[收稿日期] 2011-05-30

[通讯作者] * 张村, 博士, 研究员, 研究方向: 中药化学、中药炮制, Tel: 010-84018690, E-mail: zhc95@163.com

本方法对葛根、淫羊藿及丹参药材中的化学成分有较好的响应值, 而赤芍、麦冬、牛膝、生地药材的色谱均集中在 10 min 左右, 不能有效区分色谱峰的具体归属。本指纹图谱基本上反应了在 DAD 检测器条件下糖脉康颗粒化学成分的全貌, 其更完整的化学成分信息有待于利用其他检测方法进行补充。

[参考文献]

[1] 李永芝, 孟凡毅. 消渴[M]. 北京: 中国中医药出版社,

1995:3.

[2] 沈金鱼, 吴玉华. 消渴[M]. 太原: 山西科学教育出版社, 1986:3.

[3] 陈应辉, 曹洪义, 任欣. TMK 联合弥可保治疗糖尿病周围神经病变疗效分析[J]. 西南军医, 2008, 10(4):31.

[4] 国家药典委员会. 中药色谱指纹图谱相似度评价系统操作规范[S]. 2004A.

[责任编辑 蔡仲德]