

糖脉康颗粒 HPLC-ELSD 指纹图谱

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-ELSD 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。Welch Material 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 0.1% 冰乙酸-乙腈梯度洗脱, 漂移管温度 55 °C, 气体流量 1.8 L·min⁻¹, 增益值为 1, 柱温 40 °C, 流速 0.8 mL·min⁻¹。结果: 14 批样品标定共有色谱峰 24 个, 标定 3 个对照品色谱峰, 14 批样品中 12 批样品相似度 > 0.80, 方法精密度、稳定性和重复性良好。结论: 方法可为糖脉康颗粒的质量控制提供参考。

【关键词】 糖脉康颗粒; 高效液相色谱-蒸发光散射; 指纹图谱

【中图分类号】 R284.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2011)20-0076-03

HPLC-ELSD Fingerprint of Compound Tangmaikang

ZHAO Qi-peng^{1,2}, ZHANG Yi³

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

【Abstract】 **Objective:** To establish a sensitive HPLC-ELSD fingerprint method for controlling the quality of Compound Tangmaikang. **Method:** HPLC analysis was performed on a Welch Material C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with a mixture of acetonitrile and water as mobile phase in gradient mode. The drift tube temperature was at 55 °C, gas flow was 1.8 L·min⁻¹, gain value was 1, and column temperature was at 40 °C. **Result:** Twenty-four peaks were identified in the HPLC fingerprint of Tangmaikang and their similarities were more than 0.80. Good precision, stability and repetition were showed. **Conclusion:** This method provides evidence to quality evaluation of Tangmaikang.

【Key words】 Tangmaikang; HPLC-ELSD; 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, 活血化痰, 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, 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), Alltech 3300 蒸发光散射检测器, HT-340K 柱温箱; Sartorius 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)。糖脉康颗粒由成都中汇制药有限公司生产; 黄芪、生地黄、赤芍、

【收稿日期】 20110528(005)

【基金项目】 国家十一五科技支撑计划(2007BAI40B03)

【第一作者】 赵启鹏, 博士, 讲师, 研究方向: 中药及民族药药效物质基础, Tel: 0951-6980585; E-mail: zhqp623@126.com

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;黄芪甲苷(批号 781-9003)、芍药苷(批号 110736-200526)、淫羊藿苷(批号 110737-200414)、芦丁(批号 100080-200707)、梓醇(批号 11080-200407),上述对照品均购自中国药品生物制品检定所。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 Ultimate XB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) (Welch Material, 柱号 2101.52), 漂移管温度 55 ℃, 气体流量 1.8 L·min⁻¹, 增益值为 1, 柱温 40 ℃, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 流动相 A 为 0.1% 冰乙酸, B 为乙腈, 进样量为 10 μL。梯度洗脱 (0 ~ 5 min, 5% ~ 15% B, 5 ~ 20 min, 15% ~ 25% B, 20 ~ 40 min, 25% ~ 35% B, 40 ~ 60 min, 35% ~ 60% B, 60 ~ 65 min, 60% ~ 100% B)。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取黄芪甲苷、芍药苷、淫羊藿苷、芦丁、梓醇、麦冬皂苷 D' 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 参照 2010 年版《中国药典》一部中糖脉康颗粒的黄芪甲苷测定方法, 进行部分调整, 取糖脉康颗粒样品 10 g, 加水 30 mL, 超声 40 min, 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液, 残渣用水 10 mL 分次洗涤 (3, 3, 4 mL), 同前法离心, 合并上清液, 用水饱和的正丁醇萃取 4 次, 每次 30 mL, 合并正丁醇液, 用 10% 氨水洗涤 4 次, 每次 30 mL, 合并正丁醇液, 水浴挥干, 残渣加甲醇 5 mL 溶解, 过 0.45 μm 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 21 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 0.05% ~ 0.19%, 相对峰面积的 RSD 为 0.62% ~ 2.03%, 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”计算其相似度在 0.999 以上, 表明仪器精密密度良好。

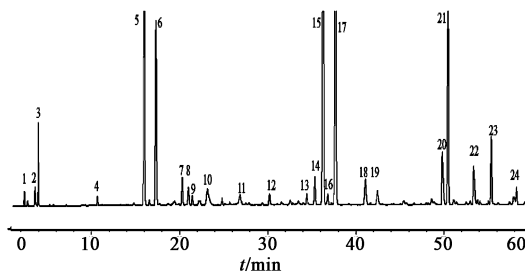
2.4.2 重复性考察 取同一样品平行制备 6 份供试品溶液, 检测指纹图谱。测得各共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.04% ~ 0.81%, 相对峰面积的 RSD

为 0.41% ~ 1.82%, 计算其相似度在 0.999 以上, 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 为 0.05% ~ 0.79%, 相对峰面积的 RSD 为 1.26% ~ 2.22%, 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 65 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 24 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, 非共有峰面积占 0.85% ~ 1.14%, 符合指纹图谱的有关规定。黄芪甲苷为糖脉康颗粒中的主要药效成分之一, 易于辨认, 分离度良好, 因此选择黄芪甲苷 (21 号色谱峰) 为指纹图谱的参照峰。见图 1, 2。



6. 芍药苷; 17. 淫羊藿苷; 21. 黄芪甲苷

图 1 糖脉康颗粒 HPLC-ELSD 指纹图谱

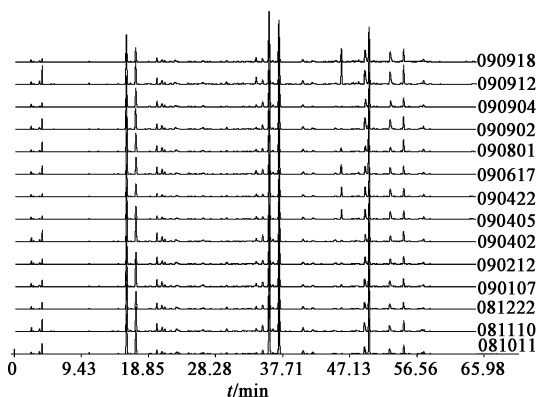


图 2 14 批糖脉康颗粒 HPLC-ELSD 指纹图谱叠加

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 >0.76,见表 1。

表 1 相似度评价

批次	相似度	批次	相似度
081011	0.926	090422	0.858
081110	0.771	090617	0.843
081222	0.912	090801	0.918
090107	0.906	090902	0.904
090212	0.911	090904	0.894
090402	0.760	090912	0.897
090405	0.858	090918	0.870

4 讨论

4.1 UV-DAD 和 ELSD 比较 目前指纹图谱研究主要采用 UV-DAD 和 ELSD 检测器两种方法。UV-DAD 检测器对紫外有吸收的物质响应好,灵敏度高,但对处方中黄芪、芍药等含有的苷类成分不灵敏;ELSD 检测器对紫外吸收强弱无要求,对黄芪甲苷等物质响应好,灵敏度高,是 UV-DAD 检测器的有力补充。

4.2 供试品制备方法说明 糖脉康颗粒处方组成中苷类成分较多,如黄芪含有以黄芪甲苷为代表的苷类成分;芍药苷(环烯醚萜苷类)是赤芍的主要活性成分;淫羊藿含有以淫羊藿苷为代表的黄酮类成分。且黄芪为方中君药,所以主要采用 2010 年《中国药典》中糖脉康颗粒黄芪甲苷的含测方法,富集苷

类成分进行 HPLC-ELSD 指纹图谱研究。

4.3 色谱柱选择 本实验考察了大连依利特 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm)、Welch 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(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),按拟定的色谱条件使用 4 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 Welch C₁₈ 色谱柱。

4.4 流动相的选定 本实验考查了乙腈-水、乙腈-0.1% 冰乙酸 2 个流动相系统。结果表明,乙腈-水系统主要色谱峰分离度较差,而在水相加入 0.1% 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以 0.1% 冰乙酸为流动相 A,以乙腈为流动相 B。样品 80 min 图谱显示,在 65 min 后无特征峰出现,因此最终确定采样时间为 65 min。

[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] 沈全鱼,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. 糖脉康颗粒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]