

驴胶补血颗粒 HPLC 指纹图谱研究

谷陟欣^{1,2,3}, 张妮瑜^{2,3}, 梁逸曾¹, 朱丽^{2,3}, 欧金秀^{2,3}, 麻印莲⁴, 于定荣^{4*}

- (1. 中南大学中药现代化研究中心, 长沙 410083; 2. 九芝堂股份有限公司, 长沙 410021;
3. 湖南省中药固体制剂工程技术研究中心, 长沙 410021;
4. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立驴胶补血颗粒的 HPLC 指纹图谱, 为科学评价其质量提供依据。方法: Inertsil ODS₂-C₁₈ 色谱柱, 流动相 0.1% 磷酸-乙腈组成的梯度洗脱液, 检测波长 215 nm, 柱温 30 ℃, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 分析时间 95 min; 对 12 批样品进行测定, 并进行相似度评价。结果: 12 批驴胶补血颗粒样品的 HPLC 指纹图谱有 25 个共有峰, 相似度均在 0.9 以上, 符合规定。结论: 该方法稳定, 可靠, 可用于驴胶补血颗粒的质量控制。

[关键词] 驴胶补血颗粒; HPLC; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)22-0080-03

Study on HPLC Fingerprint of Lvjiao Buxue Granules

GU Zhi-xin^{1,2,3}, ZHANG Ni-yu^{2,3}, LIANG Yi-zeng¹, ZHU Li^{2,3},
OU Jin-xiu^{2,3}, MA Yin-lian⁴, YU Ding-rong^{4*}

- (1. Research Center of Modernization of Chinese Medicines, Central South University, Changsha 410083, China;
2. Jiuzhitang Co. Ltd. Hunan, Changsha 410021, China; 3. Hunan Chinese Medicine
Solid Preparations Engineering Research Center, Changsha 410021, China; 4. Institute of Chinese
Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish HPLC fingerprint of Lvjiao Buxue granules for quality control of them. **Method:** An inertsil ODS₂-C₁₈ analytical column was used. The mobile phase A was 0.1% H₃PO₄ and mobile B was acetonitrile. The elution was in gradient mode and detection wavelength was set at 215 nm. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the column temperature at 30 ℃. The analysis time was 95 min. **Result:** The similarity of 12 batches of Lvjiao Buxue granules was not lower than 0.90. **Conclusion:** This method is available for quality evaluation and can control the quality of Lvjiao Buxue granules.

[Key words] Lvjiao Buxue granules; HPLC; fingerprint; quality control

驴胶补血颗粒为阿胶、黄芪、党参、熟地黄、白术、当归等中药组成的复方制剂, 具有滋阴补血、健脾益气、调经活血功效, 用于久病体虚、气虚血亏型

月经不调等妇科疾病。由于驴胶补血颗粒化学成分复杂, 为了保证其质量的稳定以及临床用药的安全有效, 有必要建立一种有效的质量控制和评价方法。中药指纹图谱因具有整体性、特征性和稳定性等特点, 能有效地反映药材中化学成分及其相对含量, 已被广泛应用于中药材及其各制剂的质量控制^[1]。本研究根据国家药典委员会颁布的《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》^[2], 对驴胶补血颗粒 HPLC 指纹图谱进行了研究, 并对 12 批成品进行了相似度评价, 为其质量控制提供依据。

[收稿日期] 20110704(001)

[第一作者] 谷陟欣, 硕士, 工程师, 从事新药开发研究, Tel: 0731-85353897, E-mail: gzx@hnjzt.com

[通讯作者] * 于定荣, 博士, 助理研究员, 从事中药炮制及制剂研究, Tel: 13436821953, E-mail: yudingrong0826@sina.com

1 材料

12 批驴胶补血颗粒(含糖型,九芝堂股份有限公司陡岭生产基地提供);橙皮苷对照品(批号 110721-200512)购自中国药品生物制品检定所,供含量测定用。乙腈为色谱纯(上海陆都化学试剂厂),水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

Waters 2695 高效液相色谱仪, Waters 2998 PDA 检测器, CP225D 型电子天平(赛多利斯), SB3200 型超声仪, AWL-6000-U 型实验室微量无机型超纯水机。

2 方法

2.1 色谱条件 Inertsil ODS₂-C₁₈ 色谱柱(4.60 mm×250 mm, 5 μm), 柱温 30 ℃, 流速 1.0 mL·min⁻¹ 检测波长 215 nm, 进样量 10 μL, 流动相 A 为 0.1% 磷酸水溶液, B 为乙腈; 梯度洗脱程序为 0~15 min, 100%~97% B; 15~18 min, 97%~95% B; 18~35 min, 95%~91% B; 35~55 min, 91%~84% B; 55~65 min, 84%~80% B; 65~90 min, 80%~72% B; 90~95 min, 72%~100% B。

2.2 对照品溶液的制备 取橙皮苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含 60 μg 的溶液, 即得。

2.3 供试品溶液的制备 取驴胶补血颗粒适量, 研细, 取约 4 g, 精密称定, 加水 20 mL, 超声处理(功率 250 W, 频率 50 kHz) 30 min, 用水饱和的正丁醇提取 4 次, 每次 20 mL, 合并正丁醇液, 用正丁醇饱和的水 50 mL 提取 1 次, 弃去水液, 正丁醇液蒸干, 残渣精密加入橙皮苷对照品溶液(60 mg·L⁻¹) 1.0 mL, 再用甲醇溶解转移至 2 mL 量瓶中, 摇匀, 过滤, 即得。

3 结果

3.1 方法学考察

3.1.1 精密度试验 精密取同一供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件, 连续进样 6 次, 记录色谱图, 计算各主要色谱峰相对保留时间的 RSD 为 0~1.11%, 相对峰面积的 RSD 为 0~3%, 表明精密度良好, 符合指纹图谱的检测要求。

3.1.2 重复性考察 取同一批样品, 按 2.3 项下方法制备 6 份供试液, 按上述色谱条件测定指纹图谱, 计算各色谱峰的相对保留时间、相对峰面积。结果相对保留时间的 RSD 为 0~0.99%, 相对峰面积的 RSD 为 0~3%, 表明重复性良好。

3.1.3 稳定性试验 取同一份供试品溶液, 分别在 0, 3, 6, 9, 12, 24 h 进样, 记录色谱图, 计算各主要色

谱峰的相对保留时间、相对峰面积。结果各主要色谱峰相对保留时间的 RSD 为 0~1%, 相对峰面积的 RSD 为 0~3%, 表明样品 24 h 内稳定。

3.2 驴胶补血颗粒 HPLC 指纹图谱的建立

3.2.1 驴胶补血颗粒 HPLC 指纹图谱总体特征 按上述方法对 12 批不同驴胶补血颗粒进行测定, 使用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)”软件进行评价, 选取“时间窗”宽度为 0.5 min, 以中位数的方法生成驴胶补血颗粒共有模式的对照指纹图谱, 见图 1, 经比较分析, 确定了 25 个色谱峰为驴胶补血颗粒的共有峰, 12 批驴胶补血颗粒样品的 HPLC 指纹图谱见图 2。

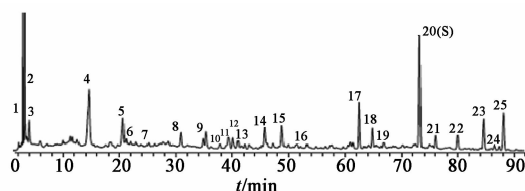


图 1 驴胶补血颗粒 HPLC 对照指纹图谱

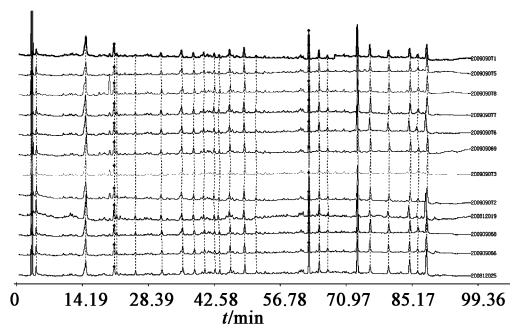


图 2 12 批驴胶补血颗粒样品 HPLC 指纹图谱叠加

3.2.2 参照峰的确定 在驴胶补血颗粒(含糖型)处方中, 阿胶和蔗糖为主要组成部分, 其余 5 味中药在处方中所占比例较少, 且经过水提醇沉之后, 其所含的有效成分含量更低。

本实验在选择参照峰的过程中, 对芦丁、盐酸小檗碱、阿魏酸、绿原酸、葛根素、柚皮苷、橙皮苷等 7 个对照品分别进行了考察, 结果表明橙皮苷保留时间合适, 对成品无干扰, 且峰面积较大, 适合作为参照峰; 而其他成分的峰面积较小, 故选择橙皮苷作为内标物, 结果见图 3~4。故本研究未采用各药味已知的化学成分作为参照峰, 而是通过试验确定加入橙皮苷作为内标物, 以橙皮苷对应的色谱峰(S)的相对保留时间和峰面积为 1, 计算共有指纹峰的相对保留时间及峰面积比值。

3.2.3 指纹图谱相似度分析 指纹图谱相似度分

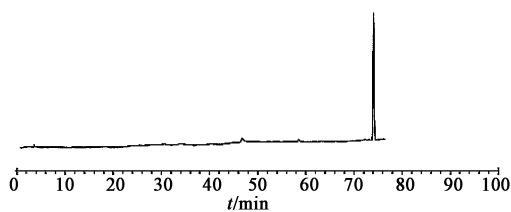


图 3 橙皮苷对照品 HPLC

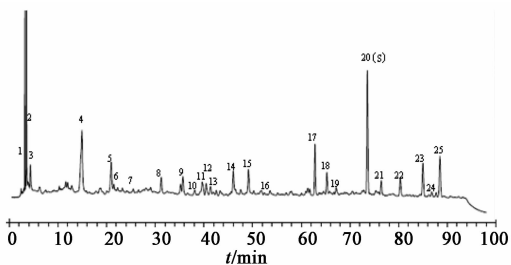


图 4 驴胶补血颗粒加内标物橙皮苷的 HPLC

析的目的在于通过对指纹图谱进行整体上的分析,来达到评价样品质量是否一致的目的^[3]。各批驴胶补血颗粒与对照指纹图谱的相似度分别为 0.969, 0.995, 0.995, 0.961, 0.944, 0.996, 0.995, 0.997, 0.996, 0.965, 0.984, 0.989, 均在 0.9 以上,符合规定。

4 小结

4.1 提取方法的考察 驴胶补血颗粒所含成分主要为水溶性成分也有脂溶性物质。分别以甲醇、乙醇、水提正丁醇萃取制备供试品溶液,按选定的梯度洗脱系统分别进样,结果表明甲醇和乙醇提取的色谱峰较多,但分离度不好且基线较不平稳,故采用水提正丁醇萃取的方法进行提取。

4.2 流动相的选择 流动相以等度洗脱,当有机溶剂比例较高时,洗脱能力强,色谱图谱信息多,但色谱峰分离较差;当有机溶剂比例较低时,洗脱能力弱,色谱峰分离度得到改善,但色谱图谱信息减少,且洗脱时间延长。试验比较了乙腈-0.1%磷酸溶液,甲醇-0.1%磷酸溶液不同流动相体系,发现以乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相峰较多且吸收值较大,故选择乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相系统。不同比例的梯度洗脱结果表明,采用 2.1 项下色谱条件梯度洗脱,各色谱峰的分离度较好。

4.3 检测波长的选择 以 HPLC-DAD 检测,分别考察了 210, 215, 220, 254, 280, 300 nm 波长下的 HPLC,结果表明 215 nm 下色谱峰信息较完整,分离度较好,基线平稳,故选择 215 nm 为检测波长。

4.4 采集时间的确定 按确定的供试品方法处理样品,在选定的色谱条件下进样,运行 200 min,结果表明 95 min 后无特征峰出现,故确定记录时间为 95 min。

[参考文献]

- [1] 洪筱坤,王智华. 中药数字化色谱指纹图谱[M]. 上海: 上海科技出版社,2003:18.
- [2] 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)[S]. 中成药,2000,22(10):671.
- [3] 鄢燕,汤宏敏,饶毅,等. 血府逐瘀口服液的高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中草药,2009,31(3):335.

[责任编辑 蔡仲德]