

DOI:CNKI:11-3495/R.20110314.0941.006

· 化学与分析 ·

三七配方颗粒的 HPLC 指纹图谱研究

毕晓黎^{1,2*}, 胥爱丽², 李养学²

(1. 广州中医药大学, 广州 510405; 2. 广东省中医研究所, 广州 510095)

[摘要] 目的:建立三七配方颗粒的 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-水为流动相梯度洗脱,检测波长 203 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃。结果:建立了三七配方颗粒的指纹图谱,确定了 18 个共有峰,各三七配方颗粒样品指纹图谱与对照指纹图谱相似度均在 0.9 以上,可用于三七配方颗粒的定性鉴别。结论:该方法简单、准确、重复性好,能有效地对三七配方颗粒的质量进行评价。

[关键词] 三七配方颗粒;高效液相色谱;指纹图谱

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)09-0054-04

Study on HPLC Fingerprint Analysis of Notoginseng Radix et Rhizoma Formula Granules

BI Xiao-li^{1,2*}, XU Ai-li², LI Yang-xue²

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

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

[Abstract] **Objective:** To establish a method of fingerprint analysis on Notoginseng Radix et Rhizoma Formula granules by HPLC and provide a reference for quality evaluation of Notoginseng Radix et Rhizoma 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 and the solvent system was composed of acetonitrile-water. The detective wavelength was set at 203 nm; the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the column temperature was maintained at 30 ℃. **Result:** Eighteen copossessing peaks were selected as the fingerprint peaks of Notoginseng Radix et Rhizoma Formula granules and good similarities with correlation coefficients higher than 0.9 were found in fingerprints between the different samples of Notoginseng Radix et Rhizoma 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 Notoginseng Radix et Rhizoma Formula granules.

[Key words] Notoginseng Radix et Rhizoma Formula granules; HPLC; fingerprints

[收稿日期] 20101220(002)

[基金项目] 国家科技部“十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAI21B10)

[通讯作者] *毕晓黎, 博士后, 副主任中药师, 从事中药质量分析, Tel:020-83501292, E-mail:bxl1130@yahoo.com.cn

[网络出版时间] 2011-03-14 09:41

三七为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根和根茎,具有散瘀止血,消肿定痛的作用。临床上多用于咯血、吐血、便血、崩漏、外伤出血、胸腹刺痛、跌扑肿痛^[1]。三七配方颗粒为由符合炮制规范的三七饮片经提取、浓缩、干燥、制粒等工序制成的新型饮片,它突破了传统中药饮片需要煎煮的服用模式,具有免煎易服,易储存,携带方便等优点^[2]。但是,中药配方颗粒已不具备中药饮片的外形,中药饮片所特有的“性状”及“显微鉴别”也不复存在,因此,建立切实可行的中药配方颗粒质量控制标准,是保证产品质量的关键环节。

对于三七饮片的分析目前采用较多的仍是 HPLC 法^[3]、HPLC-ELSD 法^[4],也有人采用 HPLC-MS/MS 法^[5]、近红外光谱法^[6]对三七进行鉴别,与这些方法相比,中药指纹图谱更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^[7]。因此本文采用高效液相法建立三七配方颗粒的指纹图谱分析方法,为解决中药配方颗粒在不具备饮片外形后的品种真伪鉴别和质量优劣的评价问题提供科学的方法。

1 材料

1.1 仪器 Waters 2695-2998 型高效液相色谱仪(美国);PDA 检测器,四元梯度泵,软件为 Empower2 数据处理软件系统;KQ5200DE 型数控超声波清洗器(昆山)。METTLER XS205DU 电子天平(瑞士)。

1.2 试药 三七配方颗粒(批号 0908049, 0804005, 0907126, 0708018, 0705099, 1003056, 0902023, 0807038, 0911034, 0912056)由广东一方制药有限公司提供(表 1)。对照品人参皂苷 R_{g_1} (110703-200425)、人参皂苷 R_{b_1} (110704-200420)、三七皂苷 R_1 (110745-200415)购于中国药品生物制品检定所。乙腈为色谱纯,液相用水为屈臣氏蒸馏水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱 Waters Xbridge C_{18} (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m)柱,流动相以乙腈为流动相 A,以水为流动相 B,按表 2 进行梯度洗脱,检测波长 203 nm,流速 1.0 mL · min⁻¹;柱温 30 $^{\circ}$ C,进样体积 10 μ L。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取人参皂苷 R_{g_1} 对照品 4.13 mg、人参皂苷 R_{b_1} 对照品 4.21 mg、三

表 1 三七配方颗粒测试样品批号

样品	批号	样品	批号
S ₁	0908049	S ₆	1003056
S ₂	0804005	S ₇	0902023
S ₃	0907126	S ₈	0807038
S ₄	0708018	S ₉	0911034
S ₅	0705099	S ₁₀	0912056

表 2 流动相洗脱条件

t/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0 ~ 12	15 ~ 30	85 ~ 70
12 ~ 45	30 ~ 80	70 ~ 20
45 ~ 55	80	20

七皂苷 R_1 对照品 2.15 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,即得。

2.3 供试品溶液的制备 取上述 S₁ ~ S₁₀ 号三七配方颗粒约 0.5 g,精密称定,精密加入甲醇 25 mL,称重,超声处理 30 min,取出,放冷,补重,摇匀,滤过,取续滤液过 0.45 μ m 滤膜,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 重复性试验 取同一批号样品(0908049),分别精密称取 6 份,按照 2.3 项下方法制备供试品溶液,分别进样,以 4 号峰人参皂苷 R_{g_1} 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大于 0.99,表明方法重复性良好。

2.4.2 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 4 号峰人参皂苷 R_{g_1} 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 均小于 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大于 0.99,表明仪器稳定,精密度良好。

2.4.3 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 4 号峰人参皂苷 R_{g_1} 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 均小于 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大于 0.99,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5 指纹图谱的建立 精密吸取 2.2 项下的对照品溶液及 2.3 项下制备的供试品溶液各 10 μ L,注入高效液相色谱仪,得到 10 个批号三七配方颗粒

HPLC 指纹图谱,结果见图 1。通过与对照品的比较,确认 3 号峰为三七皂苷 R_1 ,4 号峰为人参皂苷 R_{g_1} ,7 号峰为人参皂苷 R_{b_1} ,其中 4 号峰人参皂苷 R_{g_1} 峰面积较大且较稳定,故选择此峰为参照峰。将 10 批三七配方颗粒指纹图谱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 2,所得对照指纹图谱见图 3。

以 4 号峰人参皂苷 R_{g_1} 为参照,去除溶剂峰后确定 18 个共有峰为构成三七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 3,4。10 批三七配方颗粒与对照指纹图谱相似度计算结果分别为 0.968,0.999,0.998,0.998,0.997,0.990,0.990,0.999,0.999,0.998。

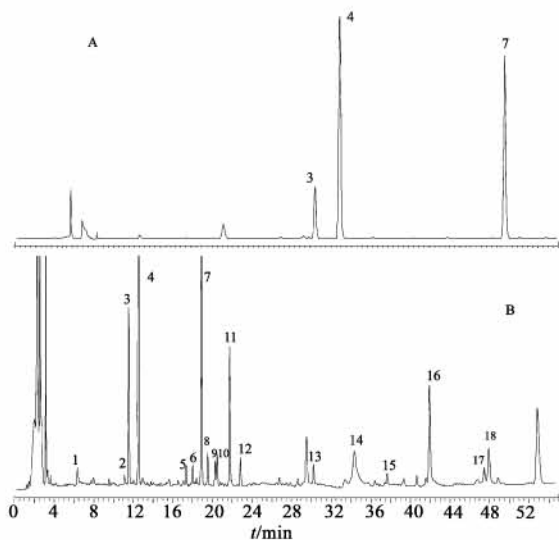


图 1 三七配方颗粒 HPLC

A. 对照品; B. 供试品;

3. 三七皂苷 R_1 ; 4. 人参皂苷 R_{g_1} ; 5. 人参皂苷 R_{b_1}

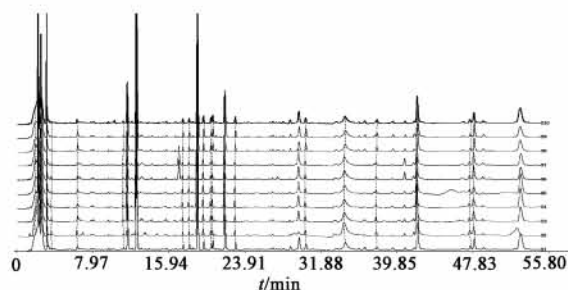


图 2 10 批样品匹配色谱

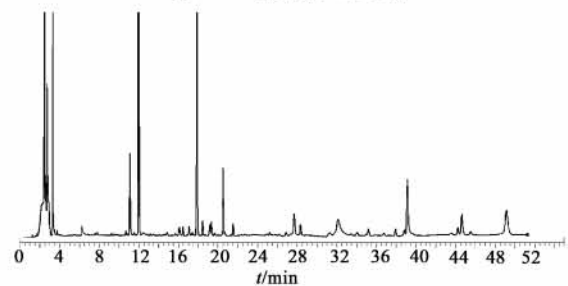


图 3 对照品指纹图谱

表 3 10 批三七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	0.502	0.509	0.508	0.509	0.509	0.509	0.509	0.506	0.505	0.505
2	0.889	0.889	0.890	0.889	0.889	0.890	0.889	0.889	0.889	0.889
3	0.924	0.924	0.923	0.924	0.924	0.924	0.923	0.924	0.924	0.924
4	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
5	1.384	1.387	1.388	1.388	1.387	1.388	1.387	1.386	1.387	1.387
6	1.435	1.439	1.440	1.440	1.439	1.440	1.439	1.438	1.439	1.439
7	1.504	1.508	1.510	1.510	1.509	1.510	1.509	1.508	1.509	1.508
8	1.555	1.559	1.560	1.560	1.559	1.560	1.558	1.558	1.559	1.558
9	1.616	1.621	1.623	1.622	1.622	1.622	1.621	1.620	1.621	1.620
10	1.632	1.636	1.638	1.637	1.637	1.637	1.636	1.635	1.636	1.635
11	1.731	1.737	1.739	1.738	1.738	1.738	1.737	1.735	1.737	1.735
12	1.818	1.824	1.827	1.826	1.825	1.826	1.824	1.822	1.824	1.822
13	2.405	2.415	2.416	2.415	2.413	2.414	2.411	2.408	2.411	2.408
14	2.727	2.736	2.745	2.743	2.741	2.742	2.739	2.736	2.739	2.736
15	2.997	3.004	3.012	3.010	3.008	3.010	3.003	2.999	3.006	3.000
16	3.337	3.345	3.353	3.350	3.348	3.350	3.343	3.339	3.344	3.339
17	3.777	3.787	3.796	3.792	3.790	3.792	3.783	3.778	3.784	3.778
18	3.812	3.822	3.831	3.827	3.825	3.827	3.818	3.812	3.818	3.812

表 4 10 批三七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	0.029	0.019	0.014	0.014	0.011	0.011	0.033	0.021	0.013	0.014
2	0.008	0.011	0.012	0.009	0.010	0.010	0.010	0.009	0.008	0.011
3	0.187	0.188	0.189	0.189	0.221	0.209	0.194	0.196	0.183	0.180
4	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
5	0.016	0.017	0.019	0.019	0.020	0.020	0.019	0.020	0.019	0.020
6	0.020	0.021	0.022	0.022	0.021	0.021	0.021	0.021	0.022	0.022
7	0.595	0.595	0.638	0.638	0.588	0.588	0.611	0.615	0.631	0.632
8	0.037	0.036	0.037	0.036	0.038	0.038	0.038	0.038	0.037	0.037
9	0.025	0.027	0.025	0.025	0.019	0.021	0.024	0.024	0.025	0.025
10	0.029	0.029	0.035	0.035	0.028	0.029	0.035	0.034	0.039	0.039
11	0.159	0.158	0.145	0.145	0.159	0.159	0.171	0.170	0.144	0.144
12	0.027	0.027	0.032	0.031	0.023	0.023	0.031	0.031	0.032	0.032
13	0.032	0.032	0.027	0.027	0.028	0.028	0.049	0.049	0.032	0.032
14	0.149	0.068	0.046	0.047	0.064	0.065	0.083	0.074	0.081	0.079
15	0.031	0.028	0.014	0.015	0.020	0.018	0.029	0.023	0.027	0.020
16	0.440	0.207	0.179	0.180	0.224	0.221	0.194	0.187	0.206	0.197
17	0.038	0.023	0.023	0.021	0.029	0.029	0.020	0.019	0.024	0.023
18	0.075	0.080	0.069	0.065	0.114	0.110	0.089	0.089	0.078	0.077

3 讨论

实验中对提取溶剂、检测波长、流动相系统进行了考察。曾采用水、50% 甲醇、甲醇作为提取溶剂,结果以水及 50% 甲醇为提取溶剂的供试品溶液峰形欠佳,分离度不高,以甲醇作为提取溶剂所得色谱峰峰形较好,故采用甲醇作为提取溶剂。采用二极管阵列检测器对图谱进行了全波长扫描,结果在 203 nm 下的色谱峰信息较为丰富,故选用 203 nm 作为测定波长。流动相条件优化时分别试验了甲醇-水、乙腈-水 2 种流动相系统,最后选取乙腈-水作为流动相,在此条件下色谱峰峰形较好。

以人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 R_{b₁}、三七皂苷 R₁ 为对照峰确定了三七配方颗粒的 18 个共有峰,并通过相似度计算软件得到 10 批三七配方颗粒的对照图谱及各批样品与对照图谱之间的相似度,结果均大于 0.9,表明三七原药材质量及三七配方颗粒的制备工艺稳定。对照图谱能提供较为全面的质量控制信息,可作为三七配方颗粒的质量评价方法之一。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2010:179.
- [2] 张建春,王少臣,胡浩.中药颗粒剂研究概况[J].中国现代医学与临床,2005,3(2):30.
- [3] 孟庆辉.HPLC 法测定三七丹参颗粒中的人参皂苷 R_{g₁} 及 R_{b₁} 含量[J].中医药学报,2010,38(2):108.
- [4] 满莹,宋铁兵,王玉华,等.HPLC-ELSD 法测定通迪胶囊中三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 R_{g₁}、R_{b₁} 的含量[J].中医药学报,2010,27(3):31.
- [5] 秦枫,于生兰,高彦慧,等.HPLC-MS/MS 法同时测定三七须根总皂苷中人参皂苷 R_{g₁} 和 R_e 的含量[J].中国药房,2010,21(31):2922.
- [6] 刘飞,邱武跃,刘刚.三七的傅里叶变换红外光谱鉴别技术[J].安徽农业科学,2010,38(17):8835,8850.
- [7] 柴逸峰,罗国安,黄晟,等.知母药材高效液相指纹图谱研究[J].分析试验室,2005,24(7):1.

[责任编辑 蔡仲德]