

DOI:CNKI:11-3495/R. 20110221. 1133. 006

复方降糖滴丸 HPLC 指纹图谱的研究

袁强^{1*}, 李兰², 毛蕾², 何岚¹

(1. 浙江中医药大学附属第二医院, 杭州 310005; 2. 浙江中医药大学药学院, 杭州 310053)

[摘要] 目的:建立复方降糖滴丸的 HPLC 指纹图谱,为科学评价及有效控制制剂的质量提供有效可靠的方法。方法:采用 HPLC 梯度洗脱方法对样品进行分离分析,色谱柱: BDS C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相水-乙腈梯度洗脱, 检测波长 238 nm, 柱温 30 °C。结果: 10 批样品得到的色谱指纹图谱有 5 个共有峰, 相似度均在 0.99 以上。方法精密性、稳定性和重复性良好。结论: 本方法为复方降糖滴丸的质量评价提供了依据。

[关键词] 复方降糖滴丸; 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)08-0079-03

Studies on HPLC Fingerprint of Compound Jiangtang Dripping Pills

YUAN Qiang^{1*}, LI Lan², MAO Lei², HE Lan¹

(1. The Second Affiliated Hospital of Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310005, China;

2. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a sensitive HPLC fingerprint method for controlling the quality of compound Jiangtang dripping pills (CJDP). **Method:** HPLC analysis was performed on a Hypersil BDS 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 238 nm, and column temperature was 30 °C. **Result:** Five peaks were identified in the HPLC fingerprint of CJDP and their similarities were more than 0.99. Good precision, stability and repetition were showed. **Conclusion:** This method provides an evidence to quality evaluation of CJDP.

[Key words] compound Jiangtang dripping pill; HPLC; fingerprint

复方降糖滴丸由栀子、绞股蓝、山药、玉竹等 4 味中药组成, 处方中栀子的主要有效成分栀子苷具有很强的降血糖作用^[1-2]; 绞股蓝的主要有效成分是具有降血糖作用的绞股蓝总皂苷^[3-4]; 山药、玉竹的为多糖类成分对糖尿病具有治疗作用^[5-6]。全方清热生津, 益气养阴, 临床上主要用于 II 型糖尿病的防

治。本文在参考文献[7-10]的基础上, 建立了复方降糖滴丸的 HPLC 指纹图谱, 为复方降糖滴丸的质量控制提供依据。

1 仪器与试剂

岛津 LC-20A 型高效液相色谱仪, 岛津 UV-2550 型紫外-可见分光光度计; Sartorius-BS110S 型分析天平(北京赛多利斯天平有限公司), AB135-型 1/10 万电子天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司)。

栀子苷对照品(批号 110749-200613)、人参皂苷 Rb₁ 对照品(批号 110704-200420)均由中国药品生物制品检定所提供。复方降糖滴丸由巢湖今辰药厂生产; 乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

[收稿日期] 20101205(003)

[基金项目] 浙江省科技厅社会发展重点项目(2007C23019)

[通讯作者] *袁强, 教授, 医学博士, 博士生导师, 浙江省高校中青年学科带头人, Tel: 0571-86613778, E-mail: yuanqiang0825@sina.com

[网络出版时间] 2011-02-21 11:33

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为大连依利特 Hypersil BDS C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 采用梯度洗脱, 流动相乙腈-水 (0 ~ 10 min, 5% ~ 10% 乙腈; 10 ~ 15 min, 10% ~ 15% 乙腈; 15 ~ 20 min, 15% ~ 20% 乙腈; 20 ~ 30 min, 20% ~ 25% 乙腈; 30 ~ 60 min, 25% 乙

腈), 流速 1 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 238 nm, 进样量 20 μL。按栀子苷峰计算理论塔板数不低于 1 500, 所有组分均在 60 min 内洗脱出柱。

2.2 对照品、供试品、阴性溶液的制备 (图 1)

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取栀子苷对照

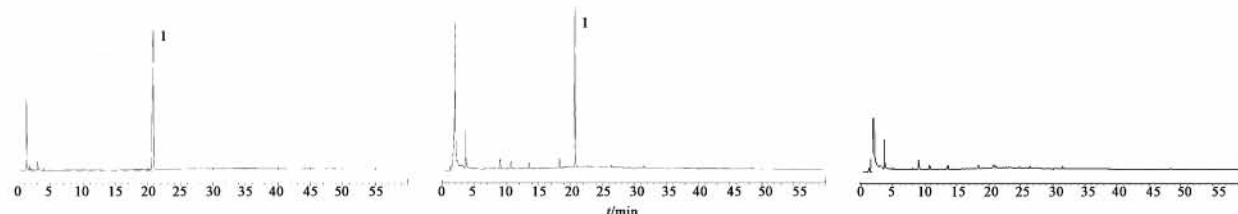


图 1 复方降糖滴丸高效液相色谱

A. 对照品; B. 样品; C. 阴性对照; 1. 栀子苷

品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.012 44 mg 的溶液, 作为对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取滴丸 5.0 g, 精密称定, 研细, 置 100 mL 具塞锥形瓶中, 加入甲醇 40 mL, 超声提取 30 min, 冷却, 置冰箱中冷藏 15 h, 抽滤, 滤液蒸干, 用水定容至 10 mL 量瓶中。取 1 mL 至 50 mL 量瓶中, 用水定容, 作为供试品溶液。

2.2.3 阴性溶液的制备 按处方比例取不含栀子的药材以生产工艺制备阴性制剂, 与供试品溶液的制备方法同处理测定阴性色谱图。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 分别精密吸取同一批供试品溶液, 连续进样 6 次, 每次 20 μL, 按上述实验方法项下的色谱条件测定, 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。采用国家药典委员会指纹图谱评价软件计算出相似度均在 0.99 以上, 各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 2.0%, 结果表明仪器精密度高。

2.4.2 稳定性试验 精密吸取同一批供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 8, 24 h 按上述色谱条件分别测定, 记录指纹图谱, 以栀子苷色谱峰 (指纹图谱中 5 号峰) 为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。计算结果相似度均在 0.99 以上, 各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%, 表明供试品溶液常温下 24 h 内稳定。

2.4.3 重复性试验 按供试品溶液的制备方法处理同一批样品 5 份, 按上述色谱条件分别测定, 记录指纹图谱, 以栀子苷色谱峰 (指纹图谱中 5 号峰) 为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面

积。计算结果相似度均在 0.99 以上, 各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%, 表明本方法重复性良好。

2.4.4 指纹图谱的建立 分别精密吸取 10 批供试品溶液各 20 μL, 按上述色谱条件分别测定, 记录指纹图谱, 确定栀子苷的色谱峰 (5 号峰)。

通过比较各峰的保留时间标定共有峰, 以栀子苷色谱峰 (指纹图谱中的 5 号峰) 为参照峰, 将各色谱峰保留时间与同一图谱中参照峰的保留时间比较, 其比值为各色谱峰相对保留时间, 10 批复方降糖滴丸样品的指纹图谱中各色谱峰相对保留时间表见表 1, 相对峰面积见表 2, 其中 5 个峰位样品所共有, 确定为共有指纹峰。将所得到的色谱图数据导入国家药典委员会指纹图谱评价系统, 进行色谱图匹配, 结果见图 2。由表 1, 2 可知 10 批样品基本均一稳定。

表 1 样品指纹图谱各共有峰的相对保留时间

样品	t _R /min				
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5 (S)
1	0.441 6	0.519 5	0.653 7	0.883 2	1.000 0
2	0.443 8	0.522 0	0.658 7	0.883 8	1.000 0
3	0.440 5	0.520 3	0.658 0	0.882 5	1.000 0
4	0.435 4	0.519 1	0.654 5	0.883 1	1.000 0
5	0.436 9	0.521 9	0.656 8	0.882 9	1.000 0
6	0.444 0	0.523 1	0.657 3	0.883 4	1.000 0
7	0.439 4	0.523 7	0.660 5	0.884 1	1.000 0
8	0.439 2	0.520 1	0.655 0	0.883 1	1.000 0
9	0.437 7	0.517 3	0.652 1	0.882 1	1.000 0
10	0.434 7	0.516 9	0.652 0	0.879 9	1.000 0
平均值	0.439 3	0.520 4	0.655 9	0.882 8	1.000 0
RSD/%	0.007 3	0.004 4	0.004 4	0.001 3	0

表2 样品指纹图谱中各共有峰的相对峰面积

样品	相对峰面积				
	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5(S)
1	0.090 4	0.051 1	0.039 9	0.069 3	1.000 0
2	0.094 1	0.053 1	0.040 5	0.066 8	1.000 0
3	0.093 2	0.050 2	0.040 6	0.064 0	1.000 0
4	0.094 8	0.052 0	0.040 5	0.064 8	1.000 0
5	0.091 2	0.052 4	0.040 9	0.066 1	1.000 0
6	0.090 9	0.050 7	0.040 6	0.063 4	1.000 0
7	0.093 3	0.052 9	0.040 6	0.064 4	1.000 0
8	0.090 8	0.051 2	0.042 4	0.065 0	1.000 0
9	0.088 9	0.054 6	0.041 6	0.066 2	1.000 0
10	0.088 1	0.053 6	0.041 3	0.064 7	1.000 0
平均值	0.091 6	0.052 2	0.040 9	0.065 5	1.000 0
RSD/%	2.43	2.67	1.72	2.61	0

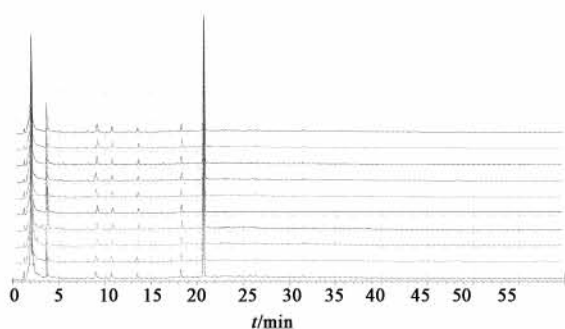


图2 10批样品的HPLC

3 相似度计算

采用药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统2004A版”进行相似度计算,将10批复方降糖滴丸的指纹图谱建立共有模式,然后选用中位法考察样品与共有模式之间的相似度,计算得出10批样品色谱指纹图谱的整体相似度。结果表明10批复方降糖滴丸指纹图谱相似,质量稳定。结果见表3。

表3 10批样品相似度评价

批次	相似度	批次	相似度
1	0.995	6	0.995
2	0.993	7	0.985
3	0.993	8	0.975
4	0.994	9	0.995
5	0.992	10	0.961

4 结论

通过上述研究确定了复方降糖滴丸供试品制备方法和色谱条件;建立了复方降糖滴丸指纹图谱,确定其中5个主要特征峰。从10批样品的HPLC指纹图谱整体来看,各批号样品间共有峰的相对保留

时间严格一致,各个共有峰的相对峰面积变化趋势也一致。因此,可以说明该复方降糖滴丸指纹图谱具有专属性。

5 讨论

用甲醇、乙醇、水作为提取溶剂对样品进行回流提取。结果发现水为提取溶剂所得的供试品溶液峰数虽多,但很难完全分离,且滴丸中辅料不易去除;乙醇为溶剂所得供试品溶液色谱峰与甲醇为溶剂所得供试品溶液色谱峰差别不大,但在经过冷藏除辅料PEG6000的过程时,甲醇提取液去除效果更好,故采用甲醇作为提取溶剂。

先后采用甲醇-水、乙腈-水、乙腈-磷酸水等不同流动相系统,以乙腈-水为流动相梯度洗脱得到的图谱中色谱峰峰形和分离度都较好且出峰最多。样品100 min图谱显示60 min后无特征峰出现,故确定分析时间为60 min。

取供试品溶液,进行210~400 nm扫描,并对各波长下的色谱图进行分析比较。结果表明,在238 nm下,各峰分离良好,特征峰明显且峰型较好。

[参考文献]

- [1] 王钢力,陈德冒,赵淑杰. 椴子属植物化学成分研究进展[J]. 中国中药杂志,1996,21(2):67.
- [2] 黄洪林,杨怀瑾,刘立超,等. 椴子降血糖作用的实验研究[J]. 中药新药与临床药理,2006,17(1):1.
- [3] 杨静. 绞股蓝化学成分研究[J]. 陕西中医,2000,21(8):377.
- [4] 黄萍,陈竞龙,张雷,等. 绞股蓝皂苷2型糖尿病肾病的血脂、微量白蛋白尿的影响[J]. 中国现代医学杂志,2007,17(2):206.
- [5] 邵红利,肖本见,梁文梅,等. 山药多糖对糖尿病小鼠降血糖作用[J]. 中国公共卫生,2006,22(7):804.
- [6] 季峰,魏贤勇,刘广龙,等. 玉竹多糖降血糖作用的实验研究[J]. 江苏中医药,2006,27(9):70.
- [7] 段朝辉,张红梅,朱恩圆,等. 吴茱萸质量标准研究-TLC指纹图谱鉴别及HPLC测定吴茱萸碱和吴茱萸次碱含量[J]. 上海中医药杂志,2008,4(5):86.
- [8] 甄攀,张利民,王治宝,等. 四神丸质量标准研究[J]. 中成药,2004,26(9):713.
- [9] 杨帆,王东升,石任兵,等. 椴子药材化学成分HPLC指纹图谱研究[J]. 中医研究,2008,21(3):25.
- [10] 苗爱东,孙殿甲. Excel 2002在中药指纹图谱相似度计算中的应用[J]. 药学进展,2003,27(1):51.

[责任编辑 邹晓翠]