

补肾壮骨配方颗粒的HPLC指纹图谱研究^Δ

陈行愉*, 韩丽萍#, 邓伟民(广州军区广州总医院药剂科, 广州 510010)

中图分类号 R283.627;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)43-4075-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.43.15

摘要 目的:建立补肾壮骨配方颗粒的指纹图谱。方法:采用高效液相色谱(HPLC)法。色谱柱为Inertsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水(梯度洗脱),流速为1 ml/min,检测波长为285 nm。采用直观分析和相似度软件评价10批补肾壮骨配方颗粒指纹图谱的相似度。结果:建立了补肾壮骨配方颗粒的指纹图谱,10批样品共标定了9个共有峰,各色谱峰分离度较好、相似度较高,符合中药色谱指纹图谱研究的技术要求。结论:该方法准确、可靠,建立的HPLC指纹图谱可为补肾壮骨配方颗粒的质量控制提供科学准确的依据。

关键词 补肾壮骨配方颗粒;指纹图谱;高效液相色谱法

Study on HPLC Fingerprints of Bushen Zhuanggu Formula Granules

CHEN Xing-yu, HAN Li-ping, DENG Wei-min (Dept. of Pharmacy, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish HPLC fingerprint of Bushen zhuanggu formula granules. METHODS: HPLC method was adopted. The separation was performed on Inertsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (gradient elution) at the flow rate of 1 ml/min. The detection wavelength was set at 285 nm. The fingerprint similarity of 10 batches of Bushen zhuanggu formula granules was evaluated by visual analysis and similarity software. RESULTS: Fingerprint spectrum of Bushen zhuanggu formula granules was established. 10 batches of samples were detected and 9 peaks in the chromatogram were common. There was a high similarity and each chromatographic peak was obtained with good separation, which were in line with the technical requirements of fingerprint of TCM. CONCLUSIONS: This method is accurate and reliable, and HPLC fingerprint provides a scientific basis for the quality control of Bushen zhuanggu formula granules.

KEY WORDS Bushen zhuanggu formula granules; Fingerprint; HPLC

补肾壮骨颗粒为我院非标制剂,由淫羊藿、骨碎补等七味药材合煎,经浓缩、干燥、制粒等工序制成,具有补肾壮骨、健

脾和胃、祛瘀止痛的作用^[1]。方中淫羊藿、骨碎补为主药。前期研究发现,因市面上淫羊藿药材质量参差不齐,不同批次的

药物成分及成分含量的不同,故单纯控制挥发油的含量不能有效控制莪术的内在质量,否则会影响莪术相关产品的质量及临床应用的安全、有效。本试验利用HPLC的分离效能,采用梯度洗脱,首次对莪术中羟基异吉马呋内酯的含量进行检测,并对不同产地莪术中该成分的含量进行比较,所建方法具有准确、快速、重复性好、灵敏度高等特点,可为评价莪术中的倍半萜内酯类活性成分提供一种可靠的分析方法,同时可为进一步完善莪术的质量控制方法提供理论依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010: 257.
- [2] 成晓静, 刘华钢, 赖茂祥. 莪术的化学成分及药理作用研究概况[J]. 广西中医学院学报, 2007, 10(1): 79.

Δ 基金项目: 全军“十一五”军队中医药研发推广专项课题(No.2006062005); 广东省药学会骨质疏松合理用药专项(No.2012GS04)

* 药师。研究方向: 中药新药的开发与利用。电话: 020-88652005。E-mail: yjk_cxy@163.com

通信作者: 主任药师, 硕士。研究方向: 中药新药的开发与利用。电话: 020-88654456。E-mail: hanliping@163.com

- [3] 黄臣虎, 陆茵, 孙志广, 等. 莪术抗癌作用机制研究进展[J]. 中草药, 2010, 41(10): 1 745.
- [4] 李国栋, 许付, 沈爱军. 莪术油的研究进展[J]. 中国药学杂志, 2002, 37(11): 807.
- [5] 李勇, 孙秀燕, 林翠英, 等. 3个品种莪术挥发油化学成分的比较[J]. 中草药, 2005, 36(12): 1 786.
- [6] 彭炳先, 陈受惠. HPLC测定不同产地莪术中3种有效成分的含量[J]. 中国药学杂志, 2009, 44(22): 1 742.
- [7] 何欢, 马双成, 田颂九, 等. HPLC测定莪术油及其注射液中6种成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2010, 45(6): 461.
- [8] 张鹏, 祝明, 唐登峰, 等. HPLC同时测定莪术油中3种倍半萜类成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(11): 1 825.
- [9] 周欣, 梁光义, 沈万雁, 等. 不同产地莪术挥发油的研究[J]. 华西药学杂志, 2002, 17(3): 201.
- [10] 姜国非, 毛春芹, 陆兔林, 等. 不同产地醋莪术饮片中β-榄香烯的含量比较[J]. 中国药房, 2010, 21(39): 3 696.
- [11] 俞桂新, 王峥涛, 徐珞珊, 等. 乌药的化学成分及药理作用[J]. 中国野生植物资源, 2010, 18(3): 5.

(收稿日期: 2013-05-27 修回日期: 2013-08-07)

补肾壮骨颗粒之间淫羊藿苷含量差异较大^[2],存在批间疗效不一的问题。中药配方颗粒既保留了中药饮片组方灵活、可随证加减的优点,又克服了其煎煮服用不便的缺点,越来越广泛地用于临床^[3]。因此,笔者按补肾壮骨颗粒的处方制备补肾壮骨配方颗粒,并建立其高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,考察该配方颗粒化学成分的变化,为其组方及质量控制提供依据。

1 材料

1.1 仪器

1100型HPLC仪,配有二元梯度泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器(DAD)、Chemstation色谱工作站(美国Agilent公司);BP211D型分析天平(德国Sartorius公司);KP-Q-1200型超声波清洗机(广州科普超声电子技术有限公司)。

1.2 药品与试剂

补肾壮骨配方颗粒由淫羊藿、骨碎补等单味配方颗粒粉碎后按处方量混合制粒而成;单味配方颗粒:鹿角胶颗粒(批号:0903037、0905068、0909093、1001070、1006388、1003173、1009108、1108724、1111090、1111753)、龟甲胶颗粒(批号:0903022、0907176、0910056、1002007、1005077、1012135、1005678、1105174、1105399、1111131)、淫羊藿颗粒(批号:0903128、0910060、0910609、1003163、1004199、1005120、1006254、1109717、1106078、1110037)、骨碎补颗粒(批号:0904130、0906178、0909180、1003603、1004145、1008276、1009057、1103172、1107396、1110835)、山药颗粒(批号:0902060、0904067、0906031、1002026、1004339、1005143、1006133、1106193、1106195、1107093)、水蛭颗粒(批号:0902032、0905180、0910137、1003119、1004160、1005354、1006055、1103035、1106113、1108406)、地黄颗粒(批号:0903168、0904173、0906063、1001138、1002036、1003064、1004118、1103162、1104339、1104075)均由广东一方制药有限公司提供;淫羊藿苷、柚皮苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110737-200415、110722-200610);朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号分别为A0228、A0229、A0230,纯度均 $\geq 98\%$);甲醇为分析纯,乙腈为色谱纯,水为重蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Inertsil C₁₈(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相:水(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~8 min, 25% B; >8~9 min, 25% B \rightarrow 30% B; >9~22 min, 30% B);检测波长:285 nm;流速:1 ml/min;柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ l。各色谱峰的理论板数均不低于3 000,与相邻峰的分度均 >1.5 。

2.2 混合对照品溶液的制备

取淫羊藿苷、朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C和柚皮苷对照品各适量,置于同一量瓶中,加甲醇溶解,用0.22 μ m微孔滤膜滤过,即得。

2.3 供试品溶液的制备

取补肾壮骨配方颗粒约2 g,置100 ml圆底烧瓶中,精密加入甲醇50 ml,称定质量,浸泡2 h,超声(功率:1 200 W,频率:40 kHz)提取30 min,再回流提取30 min,冷却至室温,再次称定质量,以甲醇补足减失的质量,滤过。精密吸取续滤液25 ml至蒸发皿中,水浴挥干溶剂,残渣用甲醇溶解并定容至10 ml

量瓶中,摇匀,以0.22 μ m微孔滤膜滤过,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 参照物色谱峰的鉴定和选择 分别吸取混合对照品溶液与供试品溶液各10 μ l注入HPLC仪,记录色谱图(见图1)。由图1可知,供试品图谱中有5个色谱峰的保留时间和光谱特征分别与柚皮苷、朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C、淫羊藿苷相一致。其中,淫羊藿苷色谱峰峰面积占总峰面积比例较大,且与相邻色谱峰分离较好,可更好地辨认和评价指纹图谱的特征,故选其作为参照峰。

2.4.2 精密度试验 取同一批供试品溶液适量,按上述色谱条件连续进样测定5次,记录指纹图谱。结果显示,以淫羊藿苷峰为参照峰,9个共有峰相对保留时间的RSD $<0.2\%$,相对峰面积的RSD $<3\%$,表明本方法精密度良好,符合指纹图谱技术要求。

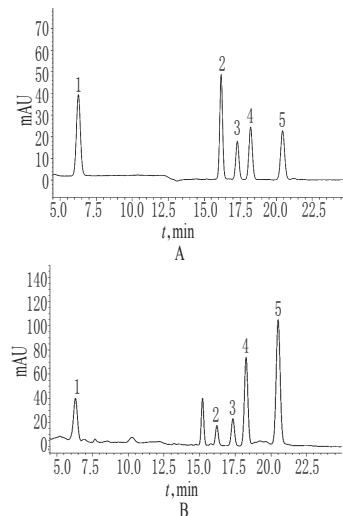


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;1.柚皮苷;2.朝藿定A;3.朝藿定B;4.朝藿定C;5.淫羊藿苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed control; B. test sample; 1. naringin; 2. epimedin A; 3. epimedin B; 4. epimedin C; 5. icariin

2.4.3 稳定性试验 取同一批供试品溶液适量,按上述色谱条件分别于0、6、12、24、48 h进样测定,记录指纹图谱。结果显示,以淫羊藿苷峰为参照峰,9个共有峰相对保留时间的RSD $<0.1\%$,相对峰面积的RSD $<3\%$,表明供试品溶液在48 h内稳定性良好,符合指纹图谱技术要求。

2.4.4 重复性试验 取同一批样品适量,按“2.3”项下方法平行制备6份供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录指纹图谱。结果显示,以淫羊藿苷峰为参照峰,9个共有峰相对保留时间的RSD $<0.3\%$,相对峰面积的RSD $<3\%$,表明本方法重复性良好,符合指纹图谱技术要求。

2.5 指纹图谱的建立及共用峰的标定

按上述色谱条件测定并记录10批补肾壮骨配方颗粒的指纹图谱(见图2)。由图2可知,样品中共有9个主要特征指纹峰,占总峰面积90%以上。经过鉴定,1号峰为骨碎补药材中柚皮苷色谱峰;4~9号峰为淫羊藿药材中的色谱峰,其中5号峰对应成分为朝藿定A,6号为朝藿定B,7号为朝藿定C,9号为淫羊藿苷。

1~9号峰在10批样品的色谱图中均有出现,所有指纹峰

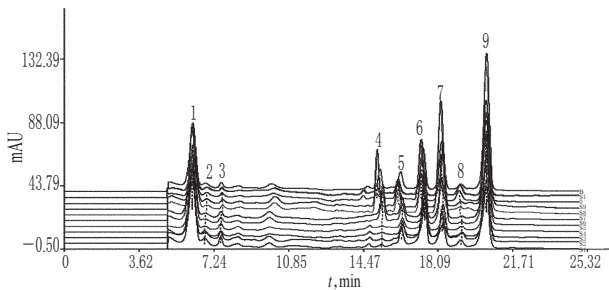


图2 不同批次补肾壮骨配方颗粒的HPLC指纹图谱

1.柚皮苷;5.朝藿定A;6.朝藿定B;7.朝藿定C;9.淫羊藿苷

Fig 2 HPLC fingerprints of different batches of Bushen zhuanggu formula granules

1. naringin; 5. epimedin A; 6. epimedin B; 7. epimedin C; 9. icariin
峰面积之和与总峰面积之比值均>90%。其中,9号峰(淫羊藿苷峰)占总峰面积30%以上,1号峰占总峰面积20%以上,6和7号峰分别占10%以上,2和3号峰分别占1%以上,4、6和7号峰的峰面积在不同样品中的差异较大。标定此9个峰为共有特征指纹峰,并据此建立补肾壮骨配方颗粒的HPLC指纹图谱。以9号峰为参照峰(S峰),计算各共有特征指纹峰的相对保留时间,发现RSD<1%,但相对峰面积仍有一定差异。补肾壮骨配方颗粒共有峰的相对保留时间和相对峰面积分别见表1、表2。

表1 补肾壮骨配方颗粒共有峰的相对保留时间

Tab 1 Relative retention time of common peaks of Bushen zhuanggu formula granules

编号	共有峰相对保留时间,s								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
S1	0.304	0.333	0.372	0.753	0.801	0.854	0.897	0.941	1.000
S2	0.303	0.332	0.371	0.753	0.802	0.854	0.898	0.942	1.000
S3	0.303	0.333	0.371	0.753	0.801	0.854	0.898	0.942	1.000
S4	0.303	0.333	0.371	0.753	0.802	0.854	0.898	0.942	1.000
S5	0.303	0.334	0.371	0.755	0.801	0.854	0.897	0.942	1.000
S6	0.304	0.334	0.371	0.755	0.801	0.854	0.897	0.942	1.000
S7	0.308	0.338	0.376	0.743	0.792	0.846	0.892	0.938	1.000
S8	0.307	0.337	0.375	0.741	0.790	0.845	0.891	0.939	1.000
S9	0.307	0.338	0.375	0.742	0.791	0.846	0.892	0.938	1.000
S10	0.307	0.338	0.374	0.742	0.792	0.846	0.892	0.938	1.000

表2 补肾壮骨配方颗粒共有峰的相对峰面积

Tab 2 Relative peak area of common peaks of Bushen zhuanggu formula granules

编号	共有峰相对峰面积								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
S1	1.015	0.122	0.084	0.024	0.231	0.719	0.400	0.107	1.000
S2	0.937	0.072	0.048	0.018	0.213	0.700	0.438	0.110	1.000
S3	1.124	0.050	0.061	0.045	0.142	0.532	0.220	0.054	1.000
S4	1.159	0.041	0.073	0.045	0.133	0.514	0.221	0.082	1.000
S5	0.965	0.045	0.037	0.206	0.149	0.152	0.589	0.009	1.000
S6	0.845	0.027	0.033	0.221	0.150	0.149	0.579	0.014	1.000
S7	0.412	0.041	0.019	0.231	0.112	0.167	0.616	0.046	1.000
S8	0.354	0.051	0.031	0.231	0.112	0.168	0.606	0.038	1.000
S9	0.764	0.057	0.025	0.133	0.182	0.709	0.254	0.181	1.000
S10	0.766	0.057	0.028	0.139	0.189	0.714	0.255	0.181	1.000

2.6 相似度评价

分别取10批供试品溶液各适量,按上述色谱条件进样10 μ l,记录色谱图,并导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)》对图谱及数据进行分析比较。以10批样品的指纹图谱生成对照指纹图谱,并以此对各批样品的指纹图谱进行相似度评价。结果显示,10批补肾壮骨配方颗粒的相似度>0.930,详见表3。

表3 10批补肾壮骨配方颗粒的相似度评价结果

Tab 3 Similarity evaluation of 10 batches of Bushen zhuanggu formula granule

相似度	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
均值	0.968	0.974	0.957	0.954	0.977	0.980	0.949	0.939	0.961	0.960
中位数	0.969	0.974	0.969	0.966	0.973	0.975	0.931	0.932	0.964	0.964

3 讨论

传统中药颗粒剂的制备大多将所有药材合煎,经浓缩、干燥、制粒等工序制成。而药材质量的参差不齐及制备工艺中存在的稳定等因素,均可影响成品的质量。中药配方颗粒因其成分明确、免煎煮、用量小、易于携带和服用方便等特点,越来越广泛地被临床所应用。相对于饮片,中药配方颗粒最大的优势在于质量的稳定可控;作为中药复方颗粒制备的原料,可随有效成分的含量灵活调整处方量,避免药材提取过程中诸多不可预测的影响因素,使产品质量稳定均一,从而使疗效得到保证。

本试验中,以补肾壮骨颗粒原处方量配制其配方颗粒,并建立其HPLC指纹图谱研究方法,以乙腈-水为流动相梯度洗脱,于285 nm波长下进行检测,获得的图谱可清晰反映主要药味骨碎补与淫羊藿药材的指纹特征。根据指纹图谱的相似度评价结果可见,其相似度较高(>0.930),且本方法简便、准确、重复性好,故可为补肾壮骨配方颗粒的质量控制提供科学依据。

由表2可见,各批样品之间共有指纹峰的相对峰面积仍存在一定差异。究其原因,是目前国家对中药配方颗粒的质量控制缺乏统一严格的标准^[4],各药企虽按照国家颁布的《中药配方颗粒质量标准研究的技术要求》制定了各自的质量控制标准,但因地域条件、用药习惯、原料来源、原料的炮制方法及制备工艺均有一些差异,导致了中药配方颗粒质量的良莠不齐。要解决这个问题,必须从根源上控制药材质量,建立原料采购标准;固定品种和基源,统一炮制工艺;建立针对药材、饮片、浸膏、中间体、成品等生产过程的现代化的理化检测方法及合理的制备工艺,使配方颗粒达到现代化中药制剂要求。

参考文献

- [1] 韩丽萍,刘志刚,梁达.补肾壮骨颗粒质量标准的研究[J].解放军药学学报,2009,25(2):145.
- [2] 韩丽萍,陈行愉,邓伟民.HPLC法同时测定补肾壮骨颗粒中淫羊藿苷及柚皮苷含量[J].中成药,2011,33(1):205.
- [3] 刘乔明,沈小莉,张辉.中药配方颗粒利弊分析与建议[J].中国中医药信息杂志,2008,25(2):145.
- [4] 雷孝义,郁相云,温小丽.单味中药配方颗粒质量状况分析[J].中国中医药现代远程教育,2010,8(17):85.

(收稿日期:2012-11-28 修回日期:2013-04-27)