

芪归糖痛宁颗粒的UPLC指纹图谱研究^Δ

吴健^{1,2*}, 高家荣^{1,2#}, 韩燕全², 李颖²(1.安徽中医药大学药学院, 合肥 230032; 2.安徽中医药大学第一附属医院, 合肥 230031)

中图分类号 R283.625; R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)11-1022-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.11.22

摘要 目的:建立芪归糖痛宁颗粒的UPLC指纹图谱。方法:色谱柱为Acquity BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm),流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液(梯度洗脱),柱温为26℃,流速为0.25 ml/min,检测波长为254 nm。利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A版)对10批样品的相似度进行评价。结果:芪归糖痛宁颗粒的UPLC指纹图谱共有13个共有峰,方法测定的重复性、精密度和稳定性良好;10批样品的相似度均>0.99。结论:所建指纹图谱可用于芪归糖痛宁颗粒的质量控制。

关键词 芪归糖痛宁颗粒;超高效液相色谱法;指纹图谱

Study on UPLC Fingerprints of Qiguitang Tongning Granules

WU Jian^{1,2}, GAO Jia-rong^{1,2}, HAN Yan-quan², LI Ying²(1.College of Pharmacy, Anhui University of TCM, Hefei 230032, China; 2. The First Affiliated Hospital of Anhui University of TCM, Hefei 230031, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish UPLC fingerprints of Qiguitang tongning granules. METHODS: The determination was performed on Acquity BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.05% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 0.25 ml/min. The column temperature was set at 26 °C and detection wavelength was 254 nm. The similarity of 10 batches of samples was evaluated by using *TCM Fingerprints Similarity Evaluation System* (2004 A edition). RESULTS: In this chromatography condition, 13 common peaks were separated on UPLC fingerprints of Qiguitang tongning granules. Each peak showed great repeatability, precision and stability among the samples. The similarity of 10 batches of samples was more than 0.99. CONCLUSIONS: Established fingerprints can be used for quality control of Qiguitang tongning granules.

KEYWORDS Qiguitang tongning granules; UPLC; Fingerprint

芪归糖痛宁颗粒为安徽中医药大学第一附属医院国家中医临床研究基地(糖尿病)特色医院制剂,处方由黄芪、当归、生地、葛根、延胡索、鸡血藤、威灵仙等七味中药组成,具有益气活血、化瘀通痹之功效,临床用于治疗糖尿病周围神经病变^[1-2]。中药复方制剂成分复杂,其质量随原药材产地、来源、种植方法、采收季节、炮制及贮藏条件等不同而差异很大^[3-5]。中药的整体作用特点决定了它不同于西药,中药的质量控制方法须对起效的全成分进行控制^[6-7]。中药色谱指纹图谱是一种综合的、量化的鉴别手段,是当前符合中药特色的评价中药真实性、稳定性和一致性的质量控制的主要模式之一^[8]。为系统、完整地反映芪归糖痛宁颗粒的内在质量,本研究采用超高效液相色谱(UPLC)法建立了其指纹图谱,以达到控制制剂质量、保证用药安全有效的目的。

1 材料

1.1 仪器

Acquity H-Class型UPLC仪,包括四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、Empower 2工作站(美国

Waters公司);KQ3200DB型超声仪(昆山市超声仪器有限公司);BP211D型电子天平(德国Sartorius公司)。

1.2 药品与试剂

芪归糖痛宁颗粒(安徽中医药大学第一附属医院制剂中心,批号:20110711、20110924、20111129、20120106、20120301、20120430、20120611、20120824、20121016、20130109);葛根素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110752-200511);乙腈、甲醇(色谱纯,美国Tedia公司);微孔滤膜(0.22 μm,上海陆纳生物科技有限公司);水为蒸馏水,磷酸等其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Acquity BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);柱温:26℃;流动相:乙腈-0.05%磷酸水溶液,梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:0.25 ml/min;检测波长:254 nm;进样量:1.0 μl。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution condition

时间, min	乙腈, %	0.05%磷酸水溶液, %	时间, min	乙腈, %	0.05%磷酸水溶液, %
0	3	97	17	30	70
2	5	95	19	40	60
5	12	88	22	60	40
8	14	86	23	3	97
12	16	84	25	3	97
13	25	75			

Δ 基金项目:“十二五”中医药重点学科(临床中医学)建设项目(No.国中医药人教发[2012]32号);安徽中医学院临床科学研究基金项目(No.2012LC-018B)

* 主管药师, 硕士研究生。研究方向:中药制剂质量控制。电话:0551-62838553。E-mail:wujian7997@163.com

通信作者:主任药师, 硕士研究生导师, 硕士。研究方向:中药制剂与新药开发。电话:0551-62838553。E-mail:zyfygjr2006@163.com

2.2 对照品溶液的制备

精密称取葛根素对照品 2.80 mg, 置于 5 ml 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

分别取 10 批次芪归糖痛宁颗粒各适量, 研细, 取 0.5 g 置于 10 ml 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 超声处理 (功率: 100 W, 频率: 40 kHz) 20 min, 放冷, 再用甲醇定容, 摇匀, 取上清液, 滤过, 即为供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度的试验 取批号为 20110711 的供试品溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件重复进样测定 6 次, 记录色谱图。结果表明, 各共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.03%~0.53%, 相对峰面积的 RSD 为 0.10%~1.17%, 表明本方法精密度良好, 符合指纹图谱技术要求。

2.4.2 稳定性试验 取批号为 20110711 的供试品溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件分别于 0、2、4、8、12、16、24 h 进样测定, 记录色谱图。结果表明, 各共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.07%~0.88%, 相对峰面积的 RSD 为 0.08%~2.74%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.3 重复性试验 取批号为 20110711 的芪归糖痛宁颗粒适量, 按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果表明, 各共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.02%~0.35%, 相对峰面积的 RSD 为 0.23%~2.71%, 表明本方法重复性良好。

2.5 指纹图谱的构建与评价

2.5.1 指纹图谱的获得 取 10 批芪归糖痛宁颗粒各适量, 分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图。10 批芪归糖痛宁颗粒的 UPLC 指纹图谱见图 1。

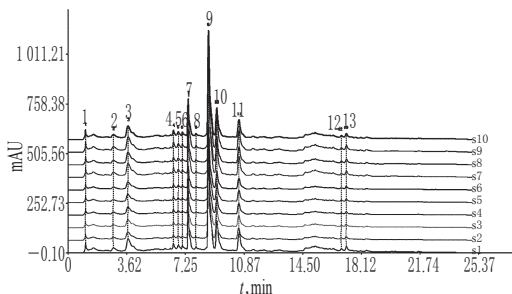


图 1 10 批芪归糖痛宁颗粒的 UPLC 指纹图谱

Fig 1 UPLC fingerprint of 10 batches of Qiguitang tongning granules

2.5.2 参照峰的选择 在保留时间为 8.60 min 附近的色谱峰峰面积最大、出峰时间适中且稳定, 经与对照品对照认定为葛根素的吸收峰, 因此选择其为参照物。色谱见图 2。

2.5.3 相似度评价 将 10 批样品的色谱峰导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A 版) 中进行数据处理, 各色谱峰进行自动匹配后共获得 13 个共有峰; 以最大共有峰 (9 号峰) 为参照峰 (S), 将各色谱峰保留时间和峰面积与同一图谱中参照物的保留时间和峰面积进行比较, 其比值为各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积, 详见表 2、表 3。以色谱峰的平均值建立对照指纹图谱^[9], 利用相关系数法计算指纹图谱的相似度, 均 > 0.99, 结果见表 4。

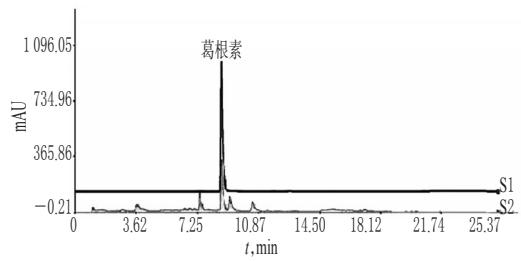


图 2 超高效液相色谱图

S1. 葛根素对照品; S2. 芪归糖痛宁颗粒

Fig 2 UPLC chromatograms

S1. puerarin control; S2. Qiguitang tongning granules

表 2 不同批次芪归糖痛宁颗粒的相对保留时间

Tab 2 The relative retention time of different batches of Qiguitang tongning granules

峰号	相对保留时间										RSD, %
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	
1	0.124	0.124	0.124	0.124	0.124	0.125	0.125	0.124	0.125	0.124	0.048
2	0.321	0.320	0.321	0.321	0.322	0.322	0.322	0.323	0.322	0.321	0.085
3	0.426	0.426	0.426	0.425	0.426	0.427	0.426	0.427	0.427	0.427	0.068
4	0.751	0.750	0.750	0.750	0.750	0.750	0.750	0.750	0.750	0.750	0.032
5	0.784	0.784	0.784	0.784	0.785	0.784	0.784	0.785	0.785	0.784	0.048
6	0.814	0.813	0.813	0.813	0.814	0.813	0.813	0.813	0.813	0.813	0.042
7	0.855	0.855	0.854	0.855	0.855	0.855	0.855	0.855	0.855	0.854	0.042
8	0.910	0.909	0.910	0.909	0.910	0.909	0.910	0.909	0.910	0.909	0.053
9	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
10	1.059	1.059	1.059	1.059	1.059	1.059	1.059	1.059	1.059	1.058	0.032
11	1.216	1.215	1.216	1.216	1.216	1.216	1.215	1.217	1.216	1.217	0.067
12	1.945	1.944	1.945	1.944	1.936	1.944	1.944	1.944	1.943	1.944	0.263
13	1.982	1.980	1.980	1.980	1.979	1.980	1.980	1.979	1.980	1.979	0.088

表 3 不同批次芪归糖痛宁颗粒的相对峰面积

Tab 3 The relative peak area of different batches of Qiguitang tongning granules

峰号	相对峰面积										RSD, %
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	
1	0.042	0.042	0.041	0.042	0.042	0.041	0.044	0.039	0.040	0.039	0.162
2	0.046	0.046	0.047	0.047	0.048	0.046	0.050	0.043	0.045	0.045	0.198
3	0.227	0.227	0.232	0.232	0.237	0.220	0.245	0.230	0.226	0.227	0.710
4	0.034	0.034	0.033	0.033	0.034	0.034	0.030	0.022	0.033	0.032	0.371
5	0.025	0.025	0.025	0.025	0.022	0.027	0.030	0.026	0.026	0.026	0.207
6	0.042	0.021	0.022	0.022	0.022	0.021	0.023	0.020	0.022	0.021	0.644
7	0.273	0.276	0.269	0.275	0.269	0.276	0.259	0.276	0.266	0.261	0.642
8	0.012	0.012	0.013	0.013	0.013	0.013	0.015	0.012	0.013	0.013	0.069
9	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
10	0.292	0.293	0.288	0.291	0.287	0.292	0.282	0.295	0.284	0.279	0.530
11	0.223	0.224	0.220	0.221	0.219	0.214	0.220	0.205	0.211	0.218	0.585
12	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.013	0.011	0.012	0.012	0.039
13	0.032	0.032	0.031	0.031	0.031	0.031	0.033	0.029	0.031	0.032	0.113

表 4 10 批样品的相似度评价结果

Tab 4 Results of similarity evaluation of 10 batches of sample

批号	相似度	批号	相似度
20110711	0.993	20120430	0.996
20110924	0.991	20120611	0.995
20111129	0.996	20120824	0.992
20120106	0.991	20121016	0.994
20120301	0.996	20130109	0.991

3 讨论

3.1 提取条件的选择

本研究比较了加热回流与超声两种样品提取方法,结果发现两者没有明显差异,但超声提取法操作更简单、快捷且溶剂损耗少,故选取超声提取法作为本研究的提取方法。本研究也比较了不同提取溶剂的提取效果,分别采用70%甲醇、80%甲醇、甲醇作为提取溶剂,结果发现经甲醇提取后的溶液杂质较少且澄清,色谱图峰形好、基线平稳,故选取甲醇为提取溶剂。

3.2 色谱条件的选择

在色谱柱选择的过程中,笔者比较了Acquity BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)、Acquity BEH C₁₈(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm)和Acquity HSS T3(50 mm×2.1 mm, 1.8 μm)3种色谱柱及柱温、流速等条件,经优化得到本研究的色谱条件。

在选择检测波长时,笔者分别对黄芪甲苷、梓醇、阿魏酸、葛根素、延胡索乙素和齐墩果酸对照品的检测波长进行综合验证比较,由于黄芪甲苷在紫外区(200~400 nm波长处)无吸收;梓醇和延胡索乙素虽在紫外区有吸收,但在此波段下存在的吸收峰较少;齐墩果酸在紫外区存在末端吸收;阿魏酸分离效果不理想;而葛根素在紫外区不仅有吸收,而且通过对样品进行全波长扫描,发现其在254 nm波长处存在的吸收峰最多、检测的图谱信息量较多、峰形较好,且各色谱峰的分度度较好、基线较平稳,故选择254 nm作为检测波长。

在流动相的选择中,笔者分别考察了甲醇-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.05%磷酸水溶液和乙腈-0.5%甲酸水溶液4个流动相系统的梯度洗脱条件,最终发现以乙腈-0.05%磷酸水溶液作为流动相系统时各峰的分度度较好,且基线平稳,有利于特征峰的分析,故选其作为流动相。

本研究在色谱条件的优化过程中,确定了在25 min内能把供试品溶液的各种物质洗脱完毕;然后不断地改变流动相(乙腈-0.05%磷酸水溶液)比例以调节其极性的变化,达到使

溶液中的物质被一一洗脱分离的目的,并且在检测波长下,基线较平稳、峰形与分度度较好,最终确定了本研究的梯度洗脱条件。

3.3 小结

本研究建立了芪归糖痛宁颗粒的UPLC指纹图谱,经方法学考察,精密度、稳定性和重复性试验结果相对保留时间和相对峰面积的RSD<3%,符合指纹图谱技术要求。并且,对10批芪归糖痛宁颗粒样品进行的相似度评价结果显示,其相似度均在0.99以上,也符合指纹图谱技术要求。综上,所建指纹图谱可用于芪归糖痛宁颗粒的质量控制。

参考文献

- [1] 季文博,高家荣,姜辉,等.芪归糖痛宁颗粒对大鼠糖尿病周围神经病变的影响[J].安徽中医学院学报,2012,31(6):55.
- [2] 方朝晖,赵进东.芪归糖痛宁颗粒治疗糖尿病周围神经病变临床观察[J].中医药临床,2012,24(2):126.
- [3] 肖花艳,易延途.中药材指纹图谱的研究概况[J].中国医药指南,2012,10(25):292.
- [4] 马天成,崔思娇,张靓琦,等.川芎的UPLC指纹图谱研究[J].中国药房,2013,24(15):1389.
- [5] 韩燕全,洪燕,左东,等.不同干燥工艺干姜的UPLC特征指纹图谱比较研究[J].中成药,2012,34(6):987.
- [6] 李强,李超.中药指纹图谱研究[J].齐鲁药事,2010,29(3):158.
- [7] 尹霞,孙国祥.朱砂安神丸高效液相色谱数字化指纹图谱研究[J].中南药学,2011,9(2):135.
- [8] 詹雪艳,林兆洲,段天璇,等.色谱指纹图谱相似度方法的适应性研究[J].中国中医药信息杂志,2012,19(5):61.
- [9] 李会娟,张宁,李秋红,等.逍遥散高效液相色谱指纹图谱的研究[J].中成药,2011,33(6):91.

(收稿日期:2013-06-06 修回日期:2013-08-26)

国家卫生和计划生育委员会副主任马晓伟调研医院临床专科发展和建设情况

本刊讯 2014年2月12日-14日,国家卫生和计划生育委员会(以下简称国家卫生计生委)副主任马晓伟带领医改医管局有关同志,赴江苏、山东两省调研医院临床专科发展和建设的有关情况。

马晓伟实地调研了南京军区总医院、江苏省人民医院、山东大学齐鲁医院和山东省肿瘤医院,认真听取了医院关于临床专科发展、重点专科建设情况和下一步发展思路,与部分专科的学科带头人进行了座谈,到临床科室实地了解医疗新技术的最新进展、新设备的应用情况和专业人员队伍建设,并看望、慰问了在临床做出突出贡献的院士、专家和临床一线医务人员。

马晓伟强调,临床专科建设是医院发展的核心和根本,要以满足临床需求和解决影响人民群众身体健康的重大疾病为主线,把临床专科做强、做精、做细,做到专科建设既有高度,

又有高峰。国家卫生计生委和财政部开展国家临床重点专科建设项目,就是要以发展优质资源为目标,打造一批具有核心竞争力的国家队,发挥其示范、引领、带动和辐射作用。因此,国家队医院的临床重点专科建设应当代表我国医学科学的最高水平,反映我国医学发展的最新成果,要紧跟世界医学发展步伐,为人民群众提供更高水平、更多选择的医疗卫生服务,使医学科学发展与我国经济社会发展相同步,与人民群众医疗服务需求相适应。在医院整体发展思路上,要控制规模,走内涵建设发展之路,不断提高专科水平和医疗质量,形成以技术和质量为核心的良性竞争,促进公立医院实现“三个转变”,即在发展方式上,从规模扩张型转向质量效益型;在管理模式上,从粗放式管理转向精细化、信息化管理;在投资方向上,从投资医院建设转向扩大分配、提高医务人员薪酬,从而实现提高效率、提高质量和提高待遇的“三个提高”。