

腹康胶囊 HPLC 指纹图谱研究

宿婷¹, 冯炳林², 相秉仁^{1*}, 赵陆华¹

(1. 中国药科大学分析测试中心, 江苏 南京 210009; 2. 武汉大学, 湖北 武汉 430072)

关键词: 腹康胶囊; HPLC; 指纹图谱

摘要: 目的: 建立腹康胶囊多波长 HPLC 指纹图谱的分析方法。方法: 色谱柱: Alltima C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1% 磷酸水溶液(三乙胺调 pH 值 3.0); 线性梯度洗脱; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 280 nm, 254 nm, 346 nm。结果: 建立了腹康胶囊 HPLC 指纹图谱, 标定出 19 个共有峰并鉴定出其中 6 个已知成分。结论: 该方法重现性好, 可为腹康胶囊的质量评价提供较全面的信息。

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-4528(2011)01-0010-04

腹康胶囊是由六味具有浓郁岭南特色的中药材组方配伍, 经现代制剂工艺精制而成的中药复方制剂, 具清热、利湿、止泻之功效。由于该制剂涉及的药材种类较多、化学成分相对复杂, 各味药材易受产地、药用部位、采收时间、提取工艺等因素的影响, 为有效的控制及评价该制剂的质量带来了一定的困难。鉴于指纹图谱技术是一种多组分复杂样品质量评价的有效方法^[1], 本试验拟建立该制剂的中药高效液相色谱(HPLC)指纹图谱。目前, 中药 HPLC 指纹图谱多以单一波长下指纹图谱为依据, 不能同时反映特征吸收波长不同的多指标成分的化学信息。为了能更深入的反映待测样品指纹信息整体性、特征性^[2], 更全面的控制该制剂的质量, 本试验采用多波长紫外检测法并初步确立了指纹峰的归属。本试验运用中药指纹图谱技术结合多指标成分定性分析, 建立了腹康胶囊的 HPLC 指纹图谱, 该方法简便易行、重现性良好, 为科学评价及有效控制该制剂的质量提供了可行的方法, 也为建立新型现代中药质量评价体系提供了参考^[3,4]。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

日本岛津 LC-40AD VP 高效液相色谱仪, 岛津 SPD-40A VP 紫外检测器, N2000 工作站(浙江大学智能信息工程研究所), Sartorius YDP02-OD 电子天平(德国赛多利斯公司), HB3120U 型数控超声波发生器(江苏汉邦科技有限公司)。

1.2 药品和试剂

葛根素(批号 110752200511)、金丝桃苷(批号 11521200303)、盐酸药根碱(批号 0733200004)、盐酸巴马汀(批号 07329604)、盐酸小檗碱(批号 110713200910)、槲皮素(批号 100819905)对照品购自于中国药品生物制品检定所。腹康胶囊 10 批(批号 080401, 080402, 080403, 080601, 080602, 080603, 081201, 081202, 081203, 081204)由广州固志医药科技有限公司提供。甲醇(色谱纯, 江苏汉邦科技有限公司), 乙腈(特级纯, 江苏汉邦科技有限公司), 水为乐百氏纯净水, 磷酸(分析纯, 南京化学试剂有限公司), 三乙胺(分析纯, 上海凌风化学试剂有限公司), 盐酸(分析纯, 南京化学试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Alltima C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(用三乙胺调 pH 值至 3.0)(B); 线性梯度洗脱: 0~10(B: 81% → 81%), 10~15 min(B: 81% → 70%), 15~40 min(B: 70% → 70%), 50~55 min(B: 70% → 60%); 流速为 1.0 mL/min; 柱温 30℃; 检测波长: 0~10(280 nm), 10~20 min(254 nm), 20~55(346 nm); 进样量: 20 μL。

2.2 对照品溶液的制备

分别取葛根素、金丝桃苷、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、槲皮素对照品适量, 精密称定, 置量瓶中, 加甲醇制成浓度分别为 516.3, 505.1,

收稿日期: 2010-01-18

作者简介: 宿婷(1985-), 女, 硕士生, 研究方向: 中药分析。

* 通讯作者: 相秉仁, Tel: (025)83271180 E-mail: xiangbr@cpu.edu.cn.

250.4 252.6 201.5 501.8 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品贮备溶液 精密吸取上述各溶液 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 制得混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取腹康胶囊内容物适量, 研匀后, 取 1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入盐酸-甲醇 (1 : 100) 混合溶液 100 mL, 称定重量, 冷浸 30 min, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定重量, 用盐酸-甲醇 (1 : 100) 混合溶液补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液经微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 作为供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 稳定性试验 取同一批号 (批号 080601) 的供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 测得各共有峰相对保留时间 $\text{RSD} \leq 2.5\%$ 。结果表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.4.2 精密度试验 取同一批号 (批号 080601) 的供试品溶液, 连续进样 6 次, 测得各共有峰相对保留时间的 $\text{RSD} \leq 1.0\%$ 。结果表明进样和仪器精密度良好。

2.4.3 重复性试验 取同一批号 (批号 080601) 样品 6 份, 按“2.3 供试品溶液的制备”项下操作, 进样分析, 测得各共有峰相对保留时间的 $\text{RSD} \leq 2.5\%$ 。结果表明方法重复性良好。

2.5 HPLC 指纹图谱的建立及分析

2.5.1 供试品测定 在上述色谱条件下, 测定 10 批腹康胶囊, 记录图谱。对 10 批供试品结果进行分

析、比较, 标定了 19 个共有指纹峰。典型色谱图见图 1, 10 批供试品指纹图谱见图 2。

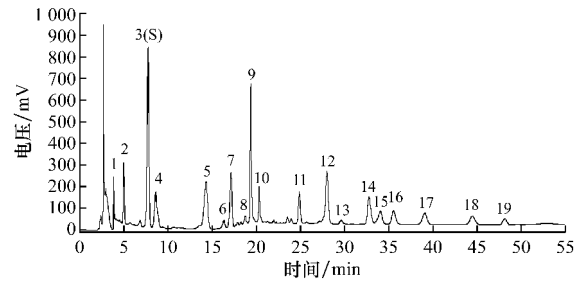


图 1 腹康胶囊典型 HPLC 指纹图谱

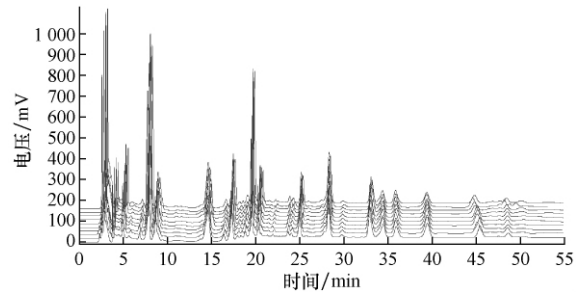


图 2 10 批供试品 HPLC 指纹图谱

2.5.2 参照峰的选择 经对照品叠加及阴性溶液比对, 确认 3 号峰为葛根素, 9 号峰为金丝桃苷, 11 号峰为盐酸药根碱, 14 号峰为盐酸巴马汀, 16 号峰为盐酸小檗碱, 18 号峰为槲皮素。选取峰面积稳定且分离度较好的 3 号峰作为参照峰 (s 峰), 以其保留时间和峰面积为 1.0, 计算各批指纹峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果见表 1。

表 1 10 批供试品共有峰相对保留时间

峰号	样品批次										平均	RSD/%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	0.637	0.639	0.639	0.641	0.634	0.637	0.637	0.639	0.641	0.643	0.639	0.42
2	0.878	0.879	0.878	0.879	0.878	0.879	0.878	0.879	0.880	0.881	0.879	0.11
3	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
4	1.106	1.105	1.108	1.107	1.107	1.105	1.106	1.105	1.111	1.111	1.107	0.21
5	1.873	1.866	1.866	1.861	1.879	1.869	1.873	1.866	1.857	1.853	1.866	0.42
6	2.108	2.099	2.112	2.105	2.104	2.092	2.108	2.099	2.120	2.114	2.106	0.39
7	2.214	2.204	2.219	2.211	2.207	2.194	2.214	2.204	2.226	2.220	2.211	0.42
8	2.416	2.404	2.423	2.414	2.405	2.390	2.416	2.404	2.435	2.428	2.414	0.54
9	2.508	2.496	2.511	2.501	2.494	2.478	2.508	2.496	2.517	2.509	2.502	0.45
10	2.610	2.597	2.621	2.611	2.595	2.578	2.610	2.597	2.641	2.632	2.609	0.71
11	3.210	3.192	3.215	3.201	3.188	3.165	3.210	3.192	3.235	3.223	3.203	0.61
12	3.634	3.613	3.631	3.615	3.603	3.576	3.634	3.613	3.644	3.630	3.619	0.55
13	3.826	3.803	3.828	3.811	3.793	3.764	3.826	3.803	3.850	3.835	3.814	0.64
14	4.233	4.207	4.236	4.217	4.196	4.162	4.233	4.207	4.264	4.246	4.220	0.68
15	4.430	4.403	4.420	4.400	4.376	4.341	4.430	4.403	4.434	4.416	4.405	0.65
16	4.621	4.592	4.611	4.589	4.569	4.532	4.621	4.592	4.626	4.607	4.596	0.62
17	5.074	5.042	5.071	5.047	5.015	4.973	5.074	5.042	5.090	5.068	5.049	0.68
18	5.846	5.799	5.808	5.779	5.747	5.697	5.846	5.775	5.795	5.769	5.786	0.77
19	6.253	6.203	6.250	6.219	6.183	6.129	6.253	6.183	6.338	6.243	6.226	0.90

表 2

10 批供试品共有峰相对峰面积

峰号	样品批次										平均	RSD/%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	0.181	0.179	0.183	0.183	0.185	0.182	0.183	0.183	0.182	0.182	0.182	0.86
2	0.036	0.036	0.035	0.035	0.037	0.036	0.036	0.036	0.035	0.036	0.036	2.01
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
4	0.258	0.259	0.261	0.261	0.259	0.259	0.259	0.256	0.256	0.259	0.259	0.62
5	0.466	0.469	0.54	0.539	0.531	0.523	0.532	0.526	0.526	0.532	0.518	5.33
6	0.051	0.054	0.051	0.052	0.056	0.056	0.054	0.052	0.052	0.054	0.053	3.31
7	0.352	0.355	0.357	0.357	0.351	0.35	0.354	0.355	0.355	0.354	0.354	0.67
8	0.035	0.036	0.035	0.035	0.036	0.036	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	1.42
9	0.411	0.412	0.431	0.431	0.42	0.419	0.412	0.413	0.413	0.412	0.417	1.86
10	0.167	0.191	0.191	0.191	0.187	0.186	0.19	0.187	0.187	0.191	0.170	4.27
11	0.195	0.196	0.199	0.197	0.195	0.195	0.196	0.196	0.196	0.196	0.196	0.59
12	0.343	0.347	0.353	0.336	0.348	0.339	0.348	0.342	0.343	0.348	0.345	1.45
13	0.03	0.03	0.029	0.03	0.029	0.029	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	1.95
14	0.263	0.264	0.263	0.263	0.259	0.259	0.264	0.264	0.264	0.264	0.263	0.77
15	0.201	0.203	0.195	0.196	0.192	0.19	0.202	0.203	0.203	0.202	0.199	2.52
16	0.158	0.158	0.16	0.158	0.156	0.156	0.157	0.159	0.159	0.157	0.158	0.84
17	0.242	0.243	0.246	0.243	0.24	0.239	0.239	0.241	0.241	0.239	0.241	0.98
18	0.171	0.169	0.169	0.169	0.164	0.164	0.171	0.169	0.169	0.172	0.169	1.57
19	0.056	0.056	0.056	0.056	0.055	0.055	0.057	0.056	0.056	0.057	0.056	1.33
总出峰数	32	32	31	32	30	32	32	32	31	32	32	-
共有峰所占比例%	97.1	97.3	97.1	97.1	97.2	97.0	97.0	97.1	97.2	97.1	97.1	-

2.5.3 相似度分析 相似度 (similarity) 是评价中药指纹图谱的一个重要参数,它是根据指纹图谱的整体相似程度来计算中药化学组成的整体波动程度,据此分析中药质量的稳定性^[5]。分别利用夹角余弦和相关系数法计算 10 批腹康胶囊供试品的相似度,结果见表 3。

结果表明,10 批腹康胶囊的相似度良好。

3 讨论

3.1 结果表明,Alltima 色谱柱分离度和重现性好,基线平稳,故选用 Alltima 色谱柱。

10 批供试品相似度数据表

	批 号									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
夹角余弦	0.997 9	0.998 1	0.989 5	0.995 1	0.993 6	0.990 1	0.999 2	0.999 0	0.997 2	0.994 2
相关系数	0.995 5	0.997 3	0.977 2	0.989 7	0.988 7	0.979 2	0.998 4	0.998 0	0.994 0	0.987 3

3.2 流动相的选择:对甲醇-水,乙腈-水,乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液(磷酸调 pH 值至 3.0),乙腈-0.1% 磷酸水溶液(三乙胺调 pH 值 3.0)等不同组成、不同比例的流动相体系进行试验。结果表明,乙腈-0.1% 磷酸水溶液(三乙胺调 pH 值 3.0)系统下,峰形良好,保留时间稳定且分离度较好,故选用该系统为流动相。

应较大。为获得更丰富且真实的化学成分信息,故本试验采用多波长紫外检测法。

本试验采用多波长 HPLC 法建立了腹康胶囊的指纹图谱,通过相似度计算发现,10 批样品的相似度良好,均具有相同的色谱特征峰,且保留时间稳定,说明所建立的指纹图谱具有较好稳定性和可控性,为腹康胶囊的质量评价提供了更丰富的信息。

3.3 洗脱梯度的设定:流动相确定后,进一步考察了等度和梯度洗脱下的结果。等度洗脱下出峰时间长且分离效果不理想,无法作为快速有效的检测方法。采用梯度洗脱后可在 60 min 内出峰,且分离效果好,有利于指纹图谱的分析。

参考文献:

3.4 检测波长的选择:曾用紫外检测器对不同波长下(254 nm, 280 nm, 310 nm, 346 nm)的指纹图谱进行考察。结果表明,0~10 min 色谱峰在 280 nm 信息较多,峰形好;10 min~20 min, 254 nm 处峰数较多且响应较大;20 min~55 min, 346 nm 处指纹峰响

[1] Zhao Luhua, Huang Chaoyu, Shan Zhen *et al.* Fingerprint analysis of *Psoralea corylifolia* L. by HPLC and LC-MS [J]. *J Chromatogr B* 2005 821:67-74.
 [2] 李 萍. 现代生药学[M]. 北京:科学出版社, 2006: 176.
 [3] 宋 敏, 杭太俊, 张正行. 丹参脂溶性成分指纹图谱标准的对照品对照法研究[J]. *药物分析杂志* 2007 27(1):8-12.
 [4] 赵陆华, 屠 颖, 吴孟华, 谭喜莹, 等. 肾宝合剂 HPLC 指纹图谱的研究[J]. *中国药科大学学报* 2005 36(2):134-136.
 [5] 陆红柳, 谭喜莹, 张 飞, 等. 急咳停颗粒指纹图谱研究[J]. *中成药* 2007 29(2):157-160.