驴胶补血颗粒 HPLC 指纹图谱研究

谷陟欣[1,2,3]，张妮瑜[2,3]，梁逸曾[1]，朱丽[2,3]，欧金秀[2,3]，麻印莲[4]，于定荣[4*]
（1. 中南大学中药现代化研究中心，长沙 410083；2. 九芝堂股份有限公司，长沙 410021；
3. 湖南省中药固体制剂工程技术研究中心，长沙 410021；
4. 中国中医科学院中药研究所，北京 100700）

[摘要] 目的：建立驴胶补血颗粒的 HPLC 指纹图谱，为科学评价其质量提供依据。方法：Inertsil ODS_2-C_{18} 色谱柱，流动相 0.1% 磷酸-乙腈组成的梯度洗脱液，检测波长 215 nm，柱温 30 ℃，流速 1.0 mL·min^{-1}，分析时间 95 min；对 12 批样品进行测定，并进行相似度评价。结果：12 批驴胶补血颗粒样品的 HPLC 指纹图谱有 25 个共有峰，相似度均在 0.9 以上，符合规定。结论：该方法稳定，可靠，可用于驴胶补血颗粒的质量控制。

[关键词] 驴胶补血颗粒；HPLC；指纹图谱
[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)22-0080-03

Study on HPLC Fingerprint of Lvjiao Buxue Granules

GU Zhi-xin[1,2,3], *ZHANG Ni-yu*[2,3], *LIANG Yi-zeng*[1], *ZHU Li*[2,3],
OU Jin-xiu[2,3], *MA Yin-lian*[4], *YU Ding-rong*[4*]
(1. *Research Center of Modernization of Chinese Medicines, Central South University, Changsha* 410083, *China*;
2. *Jiuzhitang Co. Ltd. Hunan, Changsha* 410021, *China*; 3. *Hunan Chinese Medicine Solid Preparations Engineering Research Center, Changsha* 410021, *China*; 4. *Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing* 100700, *China*)

[**Abstract**] **Objective:** To establish HPLC fingerprint of Lvjiao Buxue granules for quality control of them. **Method:** An inertsil ODS_2-C_{18} analytical column was used. The mobile phase A was 0.1% H_3PO_4 and mobile B was acetonitrile. The elution was in gradient mode and detection wavelength was set at 215 nm. The flow rate was 1.0 mL·min^{-1} and the column temperature at 30 ℃. The analysis time was 95 min. **Result:** The similarity of 12 batches of Lvjiao Buxue granules was not lower than 0.90. **Conclusion:** This method is available for quality evaluation and can control the quality of Lvjiao Buxue granules.

[**Key words**] Lvjiao Buxue granules; HPLC; fingerprint; quality control

驴胶补血颗粒为阿胶、黄芪、党参、熟地黄、白术、当归等中药组成的复方制剂，具有滋阴补血、健脾益气、调经活血功效，用于久病体虚、气虚血亏型月经不调等妇科疾患。由于驴胶补血颗粒化学成分复杂，为了保证其质量的稳定以及临床用药的安全有效，有必要建立一种有效的质量控制和评价方法。中药指纹图谱因具有整体性、特征性和稳定性等特点，能有效地反映药材中化学成分及其相对含量，已被广泛应用于中药材及其各制剂的质量控制[1]。本研究根据国家药典委员会颁布的《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求（暂行）》[2]，对驴胶补血颗粒 HPLC 指纹图谱进行了研究，并对 12 批成品进行了相似度评价，为其质量控制提供依据。

[收稿日期] 20110704(001)
[第一作者] 谷陟欣，硕士，工程师，从事新药开发研究，Tel: 0731-85353897，E-mail: gzx@hnjzt.com
[通讯作者] * 于定荣，博士，助理研究员，从事中药炮制及制剂研究，Tel: 13436821953，E-mail: yudingrong0826@sina.com

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料

12 批驴胶补血颗粒(含糖型,九芝堂股份有限公司陡岭生产基地提供);橙皮苷对照品(批号 110721-200512)购自中国药品生物制品检定所,供含量测定用。乙腈为色谱纯(上海陆都化学试剂厂),水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

Waters 2695 高效液相色谱仪,Waters 2998 PDA 检测器,CP225D 型电子天平(赛多利斯),SB3200 型超声仪,AWL-6000-U 型实验室微量无机型超纯水机。

2 方法

2.1 色谱条件 Inertsil ODS_2-C_{18} 色谱柱(4.60 mm×250 mm,5 μm),柱温 30 ℃,流速 1.0 mL·min^{-1} 检测波长 215 nm,进样量 10 μL,流动相 A 为 0.1% 磷酸水溶液,B 为乙腈;梯度洗脱程序为 0~15 min,100%~97% B;15~18 min,97%~95% B;18~35 min,95%~91% B;35~55 min,91%~84% B;55~65 min,84%~80% B;65~90 min,80%~72% B;90~95 min,72%~100% B。

2.2 对照品溶液的制备 取橙皮苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含 60 μg 的溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备 取驴胶补血颗粒适量,研细,取约 4 g,精密称定,加水 20 mL,超声处理(功率 250 W,频率 50 kHz)30 min,用水饱和的正丁醇提取 4 次,每次 20 mL,合并正丁醇液,用正丁醇饱和的水 50 mL 提取 1 次,弃去水液,正丁醇液蒸干,残渣精密加入橙皮苷对照品溶液(60 mg·L^{-1})1.0 mL,再用甲醇溶解转移至 2 mL 量瓶中,摇匀,过滤,即得。

3 结果

3.1 方法学考察

3.1.1 精密度试验 精密取同一供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件,连续进样 6 次,记录色谱图,计算各主要色谱峰相对保留时间的 RSD 为 0~1.11%,相对峰面积的 RSD 为 0~3%,表明精密度良好,符合指纹图谱的检测要求。

3.1.2 重复性考察 取同一批样品,按 2.3 项下方法制备 6 份供试液,按上述色谱条件测定指纹图谱,计算各色谱峰的相对保留时间、相对峰面积。结果相对保留时间的 RSD 为 0~0.99%,相对峰面积的 RSD 为 0~3%,表明重复性良好。

3.1.3 稳定性试验 取同一份供试品溶液,分别在 0,3,6,9,12,24 h 进样,记录色谱图,计算各主要色谱峰的相对保留时间、相对峰面积。结果各主要色谱峰相对保留时间的 RSD 为 0~1%,相对峰面积的 RSD 为 0~3%,表明样品 24 h 内稳定。

3.2 驴胶补血颗粒 HPLC 指纹图谱的建立

3.2.1 驴胶补血颗粒 HPLC 指纹图谱总体特征 按上述方法对 12 批不同驴胶补血颗粒进行测定,使用"中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)"软件进行评价,选取"时间窗"宽度为 0.5 min,以中位数的方法生成驴胶补血颗粒共有模式的对照指纹图谱,见图 1,经比较分析,确定了 25 个色谱峰为驴胶补血颗粒的共有峰,12 批驴胶补血颗粒样品的 HPLC 指纹图谱见图 2。

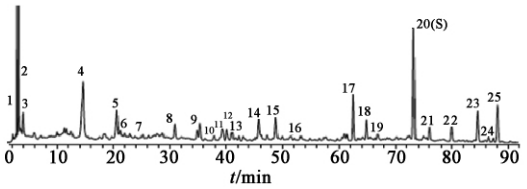

图 1 驴胶补血颗粒 HPLC 对照指纹图谱

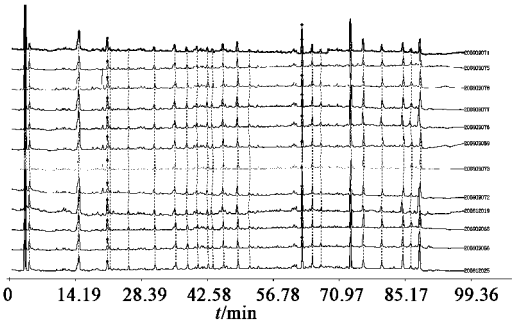

图 2 12 批驴胶补血颗粒样品 HPLC 指纹图谱叠加

3.2.2 参照峰的确定 在驴胶补血颗粒(含糖型)处方中,阿胶和蔗糖为主要组成部分,其余 5 味中药在处方中所占比例较少,且经过水提醇沉之后,其所含的有效成分含量更低。

本实验在选择参照峰的过程中,对芦丁、盐酸小檗碱、阿魏酸、绿原酸、葛根素、柚皮苷、橙皮苷等 7 个对照品分别进行了考察,结果表明橙皮苷保留时间合适,对成品无干扰,且峰面积较大,适合作为参照峰;而其他成分的峰面积较小,故选择橙皮苷作为内标物,结果见图 3~4。故本研究未采用各药味已知的化学成分作为参照峰,而是通过试验确定加入橙皮苷作为内标物,以橙皮苷对应的色谱峰(S)的相对保留时间和峰面积为 1,计算共有指纹峰的相对保留时间及峰面积比值。

3.2.3 指纹图谱相似度分析 指纹图谱相似度分

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

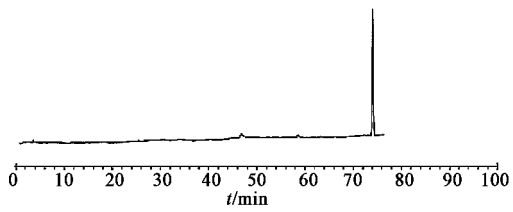

图 3 橙皮苷对照品 HPLC

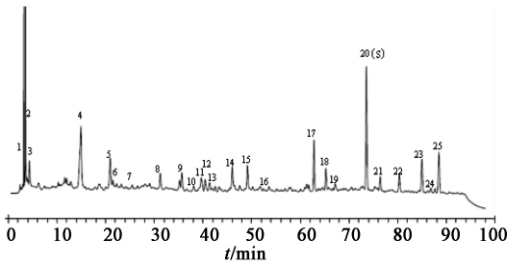

图 4 驴胶补血颗粒加内标物橙皮苷的 HPLC

析的目的在于通过对指纹图谱进行整体上的分析，来达到评价样品质量是否一致的目的[3]。各批驴胶补血颗粒与对照指纹图谱的相似度分别为 0.969，0.995，0.995，0.961，0.944，0.996，0.995，0.997，0.996，0.965，0.984，0.989，均在 0.9 以上，符合规定。

4 小结

4.1 提取方法的考察 驴胶补血颗粒所含成分主要为水溶性成分也有脂溶性物质。分别以甲醇、乙醇、水提正丁醇萃取制备供试品溶液，按选定的梯度洗脱系统分别进样，结果表明甲醇和乙醇提取的色谱峰较多，但分离度不好且基线较不平稳，故采用水提正丁醇萃取的方法进行提取。

4.2 流动相的选择 流动相以等度洗脱，当有机溶剂比例较高时，洗脱能力强，色谱图谱信息多，但色谱峰分离较差；当有机溶剂比例较低时，洗脱能力弱，色谱峰分离度得到改善，但色谱图谱信息减少，且洗脱时间延长。试验比较了乙腈-0.1% 磷酸溶液，甲醇-0.1% 磷酸溶液不同流动相体系，发现以乙腈-0.1% 磷酸溶液为流动相峰较多且吸收值较大，故选择乙腈-0.1% 磷酸溶液为流动相系统。不同比例的梯度洗脱结果表明，采用 2.1 项下色谱条件梯度洗脱，各色谱峰的分离度较好。

4.3 检测波长的选择 以 HPLC-DAD 检测，分别考察了 210，215，220，254，280，300 nm 波长下的 HPLC，结果表明 215 nm 下色谱峰信息较完整，分离度较好，基线平稳，故选择 215 nm 为检测波长。

4.4 采集时间的确定 按确定的供试品方法处理样品，在选定的色谱条件下进样，运行 200 min，结果表明 95 min 后无特征峰出现，故确定记录时间为 95 min。

[参考文献]

[1] 洪筱坤，王智华. 中药数字化色谱指纹图谱 [M]. 上海：上海科技出版社，2003：18.
[2] 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求（暂行） [S]. 中成药，2000，22(10)：671.
[3] 鄢燕，汤宏敏，饶毅，等. 血府逐瘀口服液的高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中草药，2009，31(3)：335.

[责任编辑 蔡仲德]

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net