

黄芪药材高效液相色谱 – 二级管阵列检测法指纹图谱的 色谱柱评价研究

王 敏, 王逢春, 郝影霞, 李 翔

[摘要] 目的 开展黄芪药材 HPLC-DAD 色谱指纹图谱多色谱柱评价研究。方法 色谱柱: 依利特 Hypersil ODS 2 柱 (A); 汉邦 Lichrospher C₁₈ 柱 (B); 迪马 Diamonsil™ C₁₈ 柱 (C); 流动相: A 相为乙腈 – 甲醇 (体积比 9: 1), B 相为水 梯度洗脱; 流速 1.0 ml/min; 柱温 25℃; 检测波长 260 nm; 进样量 20 μl。进行指纹图谱方法学考察, 并进行相似度计算和统计学分析。结果 黄芪药材 HPLC-DAD 色谱指纹图谱的方法学考察结果良好, 可以标定 11 个共有峰。A 柱和 B 柱色谱间相似度差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。而 C 柱与 A 柱和 B 柱间的相似度差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。从平均值可以看出, A 柱和 B 柱之间的相似度比较一致, 且均高于 C 柱。结论 相似度计算和统计学分析可以有效评价不同色谱柱在黄芪药材 HPLC-DAD 指纹图谱的适用性, 有利于选择合适的色谱柱, 建立完善的指纹图谱评价体系。

[关键词] 黄芪; HPLC-DAD; 指纹图谱; 色谱柱评价

[中国图书资料分类号] R931 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-140X(2013)01-0050-03

[DOI] 10.3969/j.issn.2095-140X.2013.01.017

Study of Column Evaluation with High-performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection (HPLC-DAD) Chromatographic Fingerprints of Radix Astragali

WANG Min^{1a}, WANG Feng-chun², HAO Ying-xia^{1b}, LI Xiang³ (1. 263 Clinical Department, The Military General Hospital of Beijing, a. Medical Department, b. Department of Pharmacy, Beijing 101149, China; 2. Medical Department, The Military General Hospital of Beijing, Beijing 100700, China; 3. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital, General Hospital of PLA, Beijing 100048, China)

[Abstract] **Objective** To complete column evaluation of HPLC-DAD chromatographic fingerprints of Radix astragali. **Methods** The chromatography conditions were with Hypersil ODS 2 column (A); Lichrospher C₁₈ column (B); Diamonsil™ C₁₈ column (C); mobile phase A: ACN-MeOH (9: 1 v/v), B: H₂O, gradient elution, flow speed was 1.0 ml/min, temperature of column was 25℃, detection wavelength 260 nm, inject volume 20 μl. The validation of the method was confirmed, and applied similarity calculation and statistics analysis. **Results** HPLC-DAD chromatographic fingerprints of Radix astragali was with better stability, precision and reproducibility, and 11 common peaks were demarcated. The results of similarity calculation showed no difference between column A and column B ($P > 0.05$), the statistics analysis showed column A and B were better than C ($P < 0.05$). **Conclusion** The similarity calculation and statistics analysis could effectively distinguish different column if HPLC-DAD chromatographic fingerprints of Radix astragali, which suite for the selection of column and establishment of consummate fingerprints evaluation system.

[Key words] Astragalus membranaceus; HPLC-DAD; Fingerprints; Column evaluation

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根, 主要有效成分为皂苷和黄酮类化合物, 其具有清除氧自由基, 抑制脂质过氧化和维持血中 NO 浓度, 保护缺血再灌注损伤等多种药理活

性^[1-3]。目前, 高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 指纹图谱在黄芪药材质量评价中的研究已经逐步深入, 发挥了重要的作用。前期的研究发现, 尽管采用相同的色谱条件和方法, 不同的色谱柱会使得到的 HPLC 指纹图谱产生一定的差异, 也将会影响相似度的计算结果^[4-7]。目前, 针对色谱柱在 HPLC 指纹图谱研究的作用及相应的评价开展较少, 尚未形成系统的研究理论和有效的评价方法, 故有待于进一步的研究^[8-9]。为保证色谱条件具有更好的耐用性和稳定性, 参照《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求 (暂行)》的

[作者单位] 101149 北京, 北京军区总医院 263 临床部医务处 (王敏), 药剂科 (郝影霞); 100700 北京, 北京军区总医院医务处 (王逢春); 100037 北京, 解放军总医院第一附属医院药剂药理科 (李翔)

相关规定,对黄芪药材高效液相色谱-二极管阵列检测法(HPLC-DAD)指纹图谱所采用的色谱柱进行考察,并结合统计学方法对相似度计算结果进行分析评价,以更好地保证黄芪药材 HPLC-DAD 指纹图谱的适用性和稳定性,提高黄芪药材指纹图谱的评价能力。现报告如下。

1 仪器和试剂

Dionex 高效液相色谱仪: P680 Pump 泵, PDA-100 二极管阵列紫外检测器, Dionex Chromleon 工作站, TCC-100 柱温箱, ASI-100 自动进样器; 上海淀久 DJ-04 药材粉碎机; METTLER AE240 电子天平; CQF-1-6 型超声仪。黄芪药材由上海华宇药业有限公司 GAP 试验基地提供并鉴定为膜荚黄芪的干燥根。甲醇和乙腈为色谱纯; 水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: A 柱: 依利特 Hypersil ODS 2 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 柱号: E1417176); B 柱: 汉邦 Lichrospher C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm 5 μm, 柱号: 03201255); C 柱: 迪马 Diamonsil™ C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm 5 μm, 柱号: 99903); 流动相: A 相为乙腈-甲醇(体积比 9:1), B 相为水, 梯度洗脱。A 相含量随时间的变化: 5% (0~5 min), 5%~20% (5~8 min), 20% (8~15 min), 20%~30% (15~18 min), 30%~45% (18~35 min), 45%~80% (35~38 min), 80%~95% (38~60 min); 流速 1.0 ml/min; 柱温为室温; 检测波长 260 nm; 进样量 20 μl, 进样前以流动相梯度初始条件平衡 15 min。

2.1 样品溶液的制备 取药材粗粉 2.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加甲醇 100 ml, 超声处理 20 min, 滤过, 滤渣用甲醇洗涤 3 次, 每次 20 ml, 合并滤液减压回收溶剂, 转移至 5 ml 量瓶中, 定容, 摇匀, 0.45 μm 滤膜滤过, 弃去初滤液, 取续滤液, 即得, 置于 4℃ 冰箱保存。

2.3 方法学考察

2.3.1 稳定性试验: 将黄芪药材样品溶液分别在 0、3、6、12、24、48 h 进样检测, 考察样品溶液的稳定性。结果表明, 色谱峰的相对保留时间、相对峰面积精密度(RSD)均 < 2.7%, 表明样品溶液在 48 h 内基本稳定。

2.3.2 精密度的试验: 将黄芪药材样品溶液连续进样 5 次, 考察精密度的。结果表明, 所有色谱峰的相对保留时间 RSD 均 ≤ 1.5%, 相对峰面积 RSD 均 ≤

1.8%, 表明仪器的 RSD 良好。

2.3.3 重复性试验: 制备 5 份黄芪药材样品溶液并进行检测, 考察方法的重现性。结果表明, 所有色谱峰的相对保留时间 RSD 均 < 1.5%, 相对峰面积 RSD 均 < 2.6%, 表明方法的重现性良好。

2.4 指纹图谱的建立 按照“2.2”项下方法制备黄芪药材样品溶液, 分别采用不同色谱柱依次进样, 记录色谱图, 按照《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》建立 HPLC-DAD 指纹图谱(图 1)。

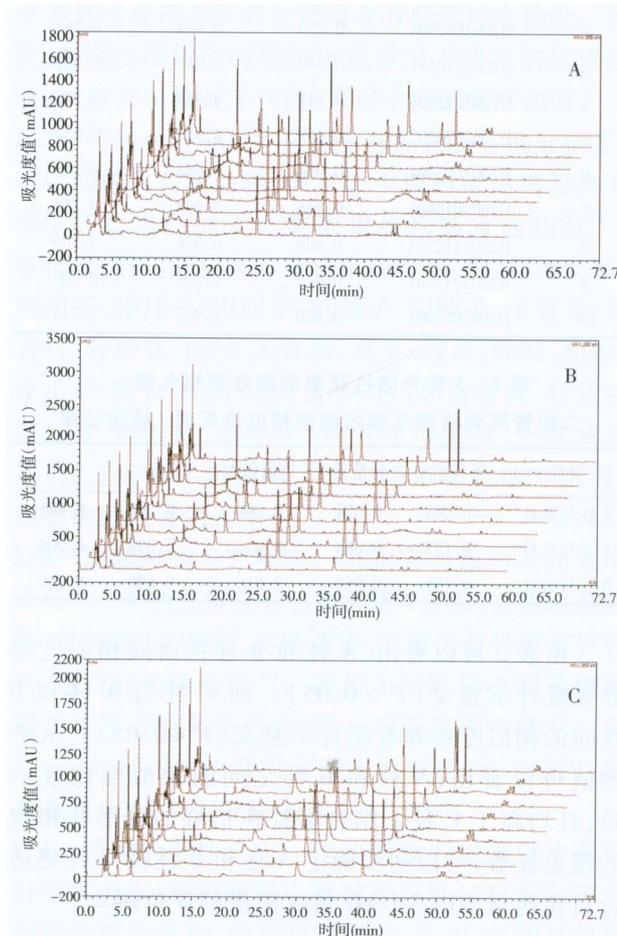


图 1 10 批次黄芪药材高效液相色谱-二极管阵列检测法 3 种色谱柱叠加色谱图 A. 依利特 Hypersil ODS 2 色谱柱 B. 汉邦 Lichrospher C₁₈ 色谱柱 C. 迪马 Diamonsil™ C₁₈ 色谱柱

由图 1 可以看出, 10 批次黄芪药材在 3 种色谱柱的图谱轮廓比较接近, 其相对保留时间和相对峰面积也基本一致, 具有较高的相似性。但从 C 柱的色谱图中可以发现其中部分色谱峰出现拖尾的情况, 其理论板数也低于 A 柱和 B 柱的相应色谱峰, 存在较为明显的差异。

采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2.0 版》自动匹配 10 批次黄芪药材 HPLC-DAD 图谱的相关参数, 标定其中匹配数目为 10 的 11 个色谱峰为共有指纹峰, 共有指纹峰面积均 > 色谱峰总面积

的 90%。

2.5 相似度的计算及统计分析 采用夹角余弦法对 3 种色谱柱中黄芪药材的 HPLC-DAD 指纹图谱进行相似度计算,并采用 SPSS 16.0 统计软件进行配对 t 检验,结果见表 1、2。

表 1 10 批次黄芪药材高效液相色谱 - 二极管阵列检测法指纹图谱相似度计算结果

序号	批号	A 柱	B 柱	C 柱
1	H2003042903	0.926	0.958	0.772
2	H2003042904	0.959	0.959	0.762
3	H2002080501	0.940	0.914	0.636
4	H2003043008	0.941	0.959	0.826
5	H2003070802	0.963	0.927	0.753
6	H2003092201	0.956	0.944	0.802
7	H2002070901	0.866	0.903	0.764
8	H2003112801	0.908	0.926	0.809
9	H2003043001	0.825	0.838	0.705
10	H2003052001	0.920	0.937	0.844

表 2 3 种色谱柱获取的高效液相色谱 - 二极管阵列检测法指纹图谱相似度配对 t 检验结果

项目	平均值	标准差	均值误差	t	P
A 柱与 B 柱	-0.006	0.024	0.008	-0.799	0.445
A 柱与 C 柱	0.153	0.068	0.022	7.090	0.000
B 柱与 C 柱	0.159	0.052	0.016	9.606	0.000

由表 2 可以看出, A 柱和 B 柱色谱间相似度差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。而 C 柱与 A 柱和 B 柱间的相似度差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。从平均值可以看出, A 柱和 B 柱之间的相似度比较一致,且均高于 C 柱。结合特征色谱峰的峰形和相应的理论板数,可以初步确定 A 柱和 B 柱较 C 柱更适合黄芪药材 HPLC-DAD 指纹图谱的评价研究。

3 讨论

通过对黄芪药材 HPLC-DAD 指纹图谱的研究,可以确定色谱柱对指纹图谱获取的稳定性与重现性具有极其重要的作用。由于生产工艺的不同,即使填料相同的色谱柱也可能使相似度评价产生较大的差异。因此,采用 HPLC-DAD 指纹图谱技术进行中

药质量控制与评价,有必要在指纹图谱研究中增加特征色谱峰的理论板数和分离度等系统适应性试验要求,使用于指纹图谱研究的色谱方法更加完整和严谨,保证方法的准确性和稳定性。

采用统计学分析的方法对不同色谱柱获取的 HPLC-DAD 指纹图谱相似度进行比较和评价,减少了主观判断可能出现的错误,这种方法的科学性还有待于进一步的探讨和分析。

本实验对黄芪药材 HPLC-DAD 指纹图谱在不同色谱柱间的相似度差异进行了考察和评价,进一步保证指纹图谱相似度计算结果的准确可靠,为黄芪药材 HPLC-DAD 指纹图谱的广泛应用提供依据,有利于相关研究的顺利开展。

[参考文献]

- [1] 李阳革. 黄芪对心血管保护的药理作用和临床应用进展[J]. 中国实用医药 2009, 4(7): 149-150.
- [2] 张庆立. 黄芪加丹参治疗小儿病毒性心肌炎临床观察[J]. 华北国防医药 2002, 14(2): 139-140.
- [3] 陈雅, 余文华. 黄芪及其制剂的药理作用和临床应用进展[J]. 中国药业 2006, 15(3): 68-69.
- [4] 李翔, 王敏, 王逢春. 黄芪药材高效液相色谱 - 二极管阵列检测法指纹图谱最佳检测波长的选择[J]. 华北国防医药 2010, 22(5): 424-426.
- [5] 王敏, 潘书权, 李翔, 等. 高效液相色谱 - 二极管阵列检测法指纹图谱和聚类分析用于黄芪质量评价[J]. 华北国防医药 2010, 22(3): 219-221.
- [6] 王敏, 李翔, 王逢春. 黄芪及相关药材 HPLC-ELSD 色谱指纹图谱研究[J]. 华北国防医药 2010, 22(1): 32-34.
- [7] 田兰, 程海燕, 陈晓辉, 等. 黄芪药材的 HPLC 指纹图谱[J]. 沈阳药科大学学报 2008, 25(12): 979-982.
- [8] 赖宇红, 陈浩桢, 区卓莹, 等. 三七总皂苷指纹图谱及含量测定 HPLC 条件的耐用性考察[J]. 中国天然药物 2006, 4(2): 107-110.
- [9] 易伦朝, 梁逸曾, 谢培山, 等. 陈皮体系液相色谱柱兼容性考察[J]. 现代中药研究与实践 2004, 18(增刊): 64-66.

(收稿时间: 2012-08-12 修回时间: 2012-10-09)