

补肾益寿胶囊 HPLC 指纹图谱共有模式的建立及其在制剂质量控制中的应用

王欣¹, 辛龙涛², 罗维早¹, 李星颖¹, 余佳文², 彭涛², 覃瑶^{2*}

¹重庆市中药研究院, 重庆 400065; ²太极集团有限公司, 重庆 401147

摘要: 本文建立补肾益寿胶囊的 HPLC 指纹图谱共有模式, 为该制剂的质量控制提供更为科学全面的新方法。采用 HPLC 分析方法, 选择 14 批次补肾益寿胶囊样品的 HPLC 指纹图谱, 进行峰位校正和谱峰匹配, 建立补肾益寿胶囊的 HPLC 指纹图谱共有模式, 并确认相关药材在指纹图谱共有模式中的归属。该方法的精密度、稳定性和重现性良好; 指纹图谱共有模式可为产品质量合格标准提供依据。HPLC 指纹图谱方法为补肾益寿胶囊的质量控制提供更全面的信息。

关键词: 补肾益寿胶囊; 指纹图谱; 淫羊藿苷; 含量测定

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

Establishment and application in quality control of the HPLC fingerprint characteristic mode of Bushen Yishou Capsule

WANG Xin¹, XIN Long-tao², LUO Wei-zao¹, LI Xing-ying¹, YU Jia-wen², PENG Tao², QIN Yao^{2*}

¹Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China; ²Taiji Group, Chongqing 401147, China

Abstract: To establish the HPLC fingerprint characteristic mode of Bushen Yishou Capsule for providing new quality control method of the medicine. Select 14 batches of certified products to set up the HPLC fingerprint characteristic mode of Bushen Yishou Capsule by retention time and peak position correction and confirm the attribution of related medicinal material in the HPLC fingerprint characteristic mode. Good precision, stability and characteristic mode of Bushen Yishou Capsule. The method could provide more comprehensive information for the quality control of Bushen Yishou Capsule.

Key words: Bushen Yishou Capsule; HPLC fingerprint; Icariin; contents determination

补肾益寿胶囊收载于《部颁标准》中药第 14 册, 具有补肾益气, 调节老年人免疫功能趋于正常, 用于失眠, 耳鸣, 腰酸, 健忘, 倦怠, 胸闷气短, 夜尿频数^[1]。为了完整的反映补肾益寿胶囊的内在质量, 本研究采用国家药典委员会的“中药色谱相似度评价系统”(2004 A 版) 对 14 批次太极集团重庆涪陵制药厂生产的补肾益寿胶囊进行相似度分析, 并进行了指纹图谱的研究, 初步探讨补肾益寿胶囊 HPLC 图谱中各色谱峰的归属情况。对 20 批次的补肾益寿胶囊进行了检测, 探讨了补肾益寿胶囊的 HPLC 指纹图谱共有模式在其质量控制中的运用。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

岛津 DGU-20A 型液相色谱仪(含自动进样器, LC solutions 色谱系统); KQ250DB 型数控超声波清洗器(巩义市予华仪器有限责任公司); AUW220D 型电子天平(十万分之一, 日本岛津公司); BS224S 型电子天平(万分之一, 德国赛多利斯公司); Anke TGL-16G 型离心机(上海安亭科学仪器厂); KQ250DB 型数控超声波清洗器(巩义市予华仪器有限责任公司)。

1.2 试剂与试剂

试剂: 不同批次补肾益寿胶囊, 淫羊藿(制)、丹参(制)、何首乌(制)、甘草(制)、枸杞、林芝等药材, 以上样品均由太极集团重庆涪陵制药厂提供; 试剂: 乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为超纯水。

收稿日期: 2014-03-27

接受日期: 2014-05-16

基金项目: 国家科技部“十一五”科技重大专项“重大新药创制”项目(2009ZX09313-037); 重庆市科研院所创新能力建设计划(cstc2012pt-kyys10004); 重庆市科研院所创新能力建设计划(cstc2012pt-kyys10001)

* 通讯作者 Tel: 86-23-89029026; E-mail: trowal1982@126.com

2 方法与结果

2.1 样品的制备

2.1.1 对照品溶液的制备

取淫羊藿苷适量,精密称定,用甲醇制成每 1 mL 含 0.1026 mg 的对照品溶液。

2.1.2 样品溶液的制备

取补肾益寿胶囊内容物 0.15 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 乙醇 25 mL,密塞,称重,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)30 min,放冷后再称定重量,50% 乙醇补足失重,摇匀,离心 10 min (10000 r · min⁻¹),即得。

2.1.3 药材样品溶液的制备

淫羊藿(制)、丹参(制)、何首乌(制)、甘草(制)、枸杞、灵芝、珍珠粉、黄精、红参,分别按《中国药典》2010 年版一部中各药材含测项下称样量,精密称定,精密加入 50% 乙醇 25 mL,密塞,称重,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)30 min,放冷后再称定重量,50% 乙醇补足失重,摇匀,离心(10000 r · min⁻¹),即得。

2.2 色谱条件

色谱柱: Diamonsil[®] C₁₈ (5 μm, 4.6 × 250 mm) (SN: 8034612); 检测波长: 270 nm; 流速: 1 mL/min; 进样量: 20 μL; 柱温: 30 °C, 流动相: A 乙腈-B 水, 梯度洗脱: 0 ~ 20 min (98% ~ 90% B), 20 ~ 40 min (90% ~ 80% B), 40 ~ 55 min (80% ~ 75% B), 55 ~ 80 min (75% ~ 70% B), 80 ~ 85 min (70% ~ 10% B)。

2.3 方法学考察

2.3.1 系统适应性试验

取淫羊藿苷对照品溶液,按 2.2 项下色谱条件进样,理论塔板数以淫羊藿苷计,不小于 150000。

2.3.2 精密度试验

取同一供试品溶液(批号: 12110125),按 2.2 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峰面积的 RSD 为 0.23 ~ 1.60%, 相对保留时间 RSD 为 0.08 ~ 0.34%, 结果表明仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性试验

取同一份供试品溶液(批号: 12110125),按 2.2 项下色谱条件,分别在 0、3、6、9、12 和 24 h 进样,记录色谱图,计算各主要色谱峰相对峰面积的 RSD 为 0.20% ~ 1.75%, 相对保留时间 RSD 为 0.05% ~

0.17%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.3.4 重现性试验

取同一批样品 6 份(批号: 12110125),按供试品溶液制备方法制备供试品溶液,按 2.2 项下色谱条件进样,记录色谱图,结果各主要色谱峰(峰面积/称样量)相对值的 RSD 为 0.29% ~ 1.83%, 相对保留时间 RSD 为 0.02% ~ 0.44%, 结果表明重现性良好。

2.4 样品测定

取 14 批次补肾益寿胶囊合格样品,按 2.1 项下样品制备方法制备供试品溶液,按 2.2 项下色谱条件,精密吸取各供试品溶液 20 μL,注入高效液相色谱仪,记录 85 min 色谱图(见图 1)。对不同批次样品的 HPLC 图谱中的色谱峰进行比较和编号,并结合药材的 HPLC 图谱中的色谱峰信息,最终选定具有代表性的 13 个色谱峰作为共有峰,共有峰峰面积之和占总峰面积 95% 以上,其中 13 号色谱峰为淫羊藿苷,因淫羊藿为君药,有效成分为淫羊藿苷,且分离度较好,无干扰杂质,峰面积较大,故确定其为内参照峰(S),将其保留时间(77.619 min)和峰面积/称样量(19 062 834)定为 1.0, 计算其他各色谱峰的相对保留时间和相对(峰面积/称样量)的比值,结果见表 1。

从表 1 可知:选定的 13 个共有峰中,各色谱峰与内参照峰的相对保留时间的 RSD 在 0.08% ~ 0.52%, 说明相对保留时间波动较小,各批次样品 HPLC 图谱中相应色谱峰的保留时间较一致。峰面积/称样量 相对值的 RSD 在 14.09% ~ 52.84%, 峰号 2、7、11、13 的峰面积占总峰面积的比值都大于 5%, 其峰面积/称样量 相对值的 RSD 分别为 47.85%、24.35%、20.39%、14.09%, 峰号 13 的峰面积/称样量 相对值的 RSD 值最小,说明不同批次间淫羊藿苷含量波动最小,且淫羊藿为君药,淫羊藿苷为淫羊藿的有效成分,峰号 13 作为内参照峰(S)较合适;其余 9 个色谱峰的峰面积占总峰面积的比

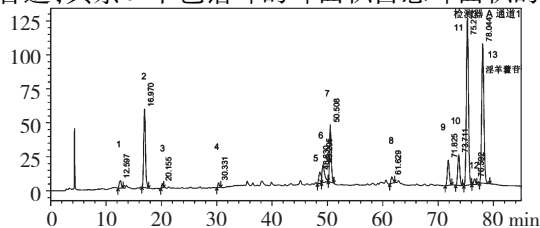


图 1 补肾益寿胶囊 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatogram of Bushen Yishou Capsule

表 1 HPLC 图谱中色谱峰保留情况 ($n = 14$)Table 1 Retention of chromatographic peak from HPLC chromatogram ($n = 14$)

峰号 Peak	t (min)	t_R (min)	RSD (%)	峰面积/称样量		RSD (%)	总(峰面积/称样量)	占总(峰面积/称样量)比(%)
				Peak area/ Sample weight	量相对值 Peak area/ Sample weight Absolute value			
1	12.812	0.165 ± 0.001	0.23	759674	0.040 ± 0.034	29.09		1.32
2	17.403	0.224 ± 0.004	0.52	7325599	0.384 ± 0.621	47.85		12.70
3	20.813	0.268 ± 0.005	0.41	445658	0.023 ± 0.020	26.02		0.77
4	31.006	0.399 ± 0.005	0.28	403201	0.021 ± 0.010	14.20		0.70
5	49.220	0.634 ± 0.004	0.15	1831518	0.096 ± 0.068	20.87		3.18
6	49.925	0.643 ± 0.005	0.19	845317	0.044 ± 0.083	52.84		1.47
7	51.365	0.662 ± 0.005	0.20	4420173	0.232 ± 0.187	24.35	57681194	7.66
8	61.770	0.796 ± 0.002	0.08	1081885	0.057 ± 0.053	26.07		1.88
9	71.595	0.922 ± 0.003	0.11	2279481	0.120 ± 0.093	18.89		3.95
10	73.443	0.946 ± 0.004	0.12	2775409	0.146 ± 0.095	23.88		4.81
11	74.949	0.966 ± 0.004	0.13	20039687	1.051 ± 0.785	20.39		34.74
12	76.208	0.982 ± 0.005	0.14	549428	0.029 ± 0.049	44.39		0.95
13(S)	77.800	1.002 ± 0.004	0.12	14924163	0.783 ± 0.418	14.09		25.8

值都小于 5%, 其峰面积/称样量 相对值的 RSD 在 14.20% ~ 52.84%, 各批次样品中部分成分含量波动较大。

2.5 补肾益寿胶囊 HPLC 图谱共有模式的建立

运用国家药典委员会推荐的中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版对 14 个合格批次的补肾益寿胶囊的指纹图谱进行了相似度分析, 首先将色谱工作站的数据导入中药指纹图谱相似度计算软件中, 选定上述 13 个特征峰进行谱峰匹配(见图 1), 以批号 10060078 为参照谱, 通过均值法计算得出样品指纹图谱的共有模式, 各批次补肾益寿胶囊指纹图谱及共有模式见图 2。

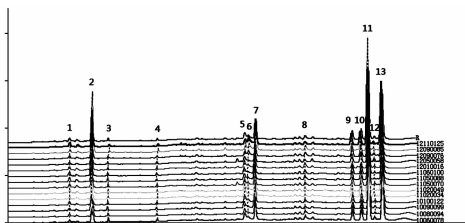


图 2 不同批次补肾益寿胶囊指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprint of BushenYishou Capsule from 14 batches

2.6 补肾益寿胶囊 HPLC 图谱中各色谱峰归属分析

参照各药材 HPLC 图谱和补肾益寿胶囊 HPLC 图谱中各色谱峰保留时间, 分析色谱峰的归属情况。

HPLC 图谱中, 具有代表其药材的特征峰共有 13 个(结果见表 3、特征峰图谱见图 1)。峰号 9 ~ 13, 对应药材为淫羊藿, 峰号 13 为淫羊藿苷查阅相关文献可知^[2-4], 9 ~ 11 号峰分别为朝藿定 A、B、C; 峰号 5、6, 对应药材为甘草; 峰号 4、7, 对应药材为何首乌。

2.7 补肾益寿胶囊 HPLC 图谱共有模式在产品质量控制中的应用

为了考察测得的指纹图谱共有模式的分辨能

表 3 色谱峰归属情况

Table 3 The ownership of chromatographic peak

峰号 Peaks	保留时间 Retention time (min)	对应药材 Materials	
		主要药材	次要药材
1	12.812	黄精、何首乌	枸杞、丹参
2	17.403	黄精、何首乌、红参	丹参、甘草
3	20.813	红参、何首乌	灵芝、甘草
4	31.006	何首乌	
5	49.220	甘草	
6	49.925	甘草	
7	51.365	何首乌	
8	61.770	甘草	淫羊藿
9	71.595	淫羊藿	
10	73.443	淫羊藿	
11	74.949	淫羊藿	
12	76.208	淫羊藿	
13(S)	77.800	淫羊藿苷(淫羊藿)	

力,测定了20批补肾益寿胶囊产品的HPLC指纹图谱,然后以上述建立的HPLC指纹图谱共有模式为对照图谱,分别计算测得各指纹图谱的相识度,结果见表4。

表4 20批次补肾益寿胶囊产品的相似度($R=1.000$)

Table 4 the result of similarity degree($R=1.000$)

No.	相似度 Smilarity	No.	相似度 Smilarity
1	0.987	11	0.996
2	0.994	12	0.982
3	0.977	13	0.993
4	0.987	14	0.989
5	0.996	15	0.992
6	0.985	16	0.971
7	0.987	17	0.974
8	0.985	18	0.987
9	0.979	19	0.996
10	0.986	20	0.986

上述实验结果表明,20批样品的相似度均大于0.970,说明各批次样品的色谱特征峰其化学成分一致性较好。通过测定多批次样品的相似度,积累相似度数据,便可确定合理的相似度范围,可将其相似度作为产品质量控制的内控指标,与现行质量标准结合使用,将弥补现行质量标准在复方中成药中多成分质量控制分析的不足,为补肾益寿胶囊的质量控制提供更全面的信息。

3 结论及讨论

3.1 根据文献^[5]报道的测定补肾益寿胶囊中淫羊藿苷的色谱条件,对流动相组成及洗脱方式分别进行了考察优化。乙腈-水体系较环保,对仪器和色谱柱损耗小,可使大多数色谱峰峰形较好;等度洗脱时分离效果较差,梯度洗脱85 min内可使大部分的色谱峰得到基线分离。

3.2 本实验建立了补肾益寿胶囊的HPLC指纹图谱,共标定了13个共有峰(见图1),通过相似度计算,20批次补肾益寿胶囊样品的相似度均大于0.95,表明相似度良好,具有相同的色谱特征峰。

3.3 本方法通过一次性进样,即能得到多数的色谱峰,分离分析效率高,且各色谱特征峰保留时间稳定,所建立的指纹图谱具有稳定性和可靠性。

3.4 指纹图谱应用于中成药质量控制的研究已有

相关报道^[6-10]。本研究以建立的HPLC指纹图谱共有模式为基础,探讨HPLC指纹图谱在复方中成药中多成分质量控制分析的运用,它比现行质量标准要更全面、客观,该法为补肾益寿胶囊的质量控制提供了更全面的信息。

3.5 在此方中淫羊藿为君药,本研究建立的补肾益寿胶囊指纹图谱共有模式中淫羊藿药材的特点体现较多,成分明确;补肾益寿胶囊为大复方,药材共十多种,在生产中需煎煮和过大孔吸附树脂柱等工艺,有可能导致药材中成分发生变化或丢失,个别药材如灵芝药材的特点未体现。

参考文献

- 1 部颁标准第十四册. 补肾益寿胶囊(W53-B2715-97),73.
- 2 Zhang HF(张华峰), *et al.* Simultaneous determination of epimedin A, B, C and icariin in herba epimedii by high performance liquid chromatography. *J Instrum Analysis* (分析测试学报), 2007, 26:198-201.
- 3 Pei LK(裴利宽), Guo BL(郭宝林), Huang WH(黄文华). Studies on fingerprinting and identification of main species of Herba Epimedii. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2008, 33:1662-1668.
- 4 Chen Y(陈彦), Zhao YH(赵艳红), Jia XB(贾晓斌), *et al.* Simultaneous determination of five main flavonoids in herba epimedii from different species by RP-HPLC. *China Pharmacy* (中国药房), 2008, 19:431-433.
- 5 Lu YS(鲁寅生). Determination of Icariin in Bushenyishou Capsules by HPLC. *Qilu Pharmaceutical Affairs* (齐鲁药事), 2004, 23(9):30-31.
- 6 Zhai Y(翟宇), *et al.* Quality assessment of Fuzheng Huayu Capsule based on HPLC fingerprint and multi-components determination. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2012, 34:389-393.
- 7 Sun GX(孙国祥), Zhao ZY(赵梓余). Quantitative identification of Suxiao Jiuxin Pill by five wavelength HPLC fingerprints. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2012, 34:777-780.
- 8 Lai ZQ(赖正权), *et al.* Fingerprint research and multi-component quantitative analysis of Kumu injection by HPLC. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2011, 36:1739-1743.
- 9 Zhao HZ(赵洪芝), Meng XS(孟宪生), Ye TX(叶挺祥), *et al.* HPLC fingerprint and chemical pattern recognition of Liuwei Dihuang Pills. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2010, 41:48-51.
- 10 Su T(宿婷), Feng BL(冯炳林), Xiang BR(相秉仁), *et al.* Studies on HPLC fingerprint of Fukang Capsules. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2011, 33:10-12.