

金匱腎氣丸醇提物 HPLC 特征指纹图谱的研究

程斌^{1,2},周爱珍¹,李文兰²

(1. 浙江医药高等专科学校,浙江 宁波 315100;

2. 哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究发展中心,哈尔滨 150076)

〔摘要〕 目的:建立金匱腎氣丸醇提物 RP-HPLC 指纹图谱的分析方法。方法:采用低压梯度洗脱的方法进行色谱分离,实验测定多批样品并记录指纹图谱,计算相似度。结果:共确定了 16 个峰为金匱腎氣丸的指纹特征峰,自制样品相似度良好,与不同厂家生产的样品相似度有一定的差异。结论:该法精密度高,重复性好,可为金匱腎氣丸的指纹图谱评价提供依据。

〔关键词〕 金匱腎氣丸;指纹图谱;高效液相色谱法

〔中图分类号〕 K284.1 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2011)06-0063-03

Study on HPLC Fingerprints of Alcohol Extract of Jinkui Shenqiwan

CHENG Bin^{1,2},ZHOU Ai-zhen¹,LI Wen-lan²

(1. Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100, China;

2. Center of Research and Development on Life Sciences and Environmental Sciences, Harbin University of Commerce,Harbin 150076, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To establish the chromatographic fingerprints of Jinkui Shenqiwan by RP-HPLC. **Method:** A gradient mobile system was applied in the experiment. The fingerprints of different samples were compared with similarity evaluation software published by committee codex. **Result:** Sixteen peaks were identified as the characteristic fingerprints. The samples made by ourselves had good similarity, but there were great differences among different producers. **Conclusion:** This method shows high precision and good repeatability; it can be used as the method to assess the quantity of Jin Kui Shenqiwan.

〔Key words〕 Jinkui Shenqiwan; fingerprints; HPLC

金匱腎氣丸又名“腎氣丸”、“八味地黄丸”,为《卫生部药品标准中药成方制剂》收录,用于治疗肾气虚弱所致的虚劳、消渴、痰饮、脚气等病证。现代临床实验证明:金匱腎氣丸能有效改善性激素分泌状况和精子质量,预防骨密度降低,具有显著的抗突变、抗衰老、抗自由基和细胞凋亡作用。其治疗范围涉及神经、内分泌、免疫、消化、循环、呼吸、泌尿、生殖等多个系统,充分体现出中药复方多系统、多靶

点、多途径的作用方式和治疗特点^[1-2]。

目前国内外对于金匱腎氣丸的研究多集中在药理作用的研究,缺乏综合评价和分析成药品质的方法。中药指纹图谱作为现代中药质量控制和鉴别的高新技术,为质量评价问题的解决提供了新的思路和方法^[3]。其优点在于尽可能全面反应中药及其复方中复杂的化学成分和其相对比例,在大多数中药有效成分尚未阐明的情况下,仍可有效地表征中药及复方的质量

本实验采用 RP-HPLC 的方法,建立金匱腎氣丸醇提物的指纹图谱,并对不同生产厂家的金匱腎氣丸进行分析比较,为金匱腎氣丸的综合质量控制提供参考^[4]。

〔收稿日期〕 20100822(004)

〔基金项目〕 黑龙江省科技厅攻关项目(GC05C31601);黑龙江省教育厅振兴老工业基地项目(1151gzd25)

〔第一作者〕 程斌,讲师,硕士,研究方向:中药质量标准及中药化学, Tel: 0574-88223013, E-mail: 44418972@qq.com

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1100 series 系列高效液相色谱仪(包括:在线脱气机、四元泵、自动进样器,DAD 检测器),HP 化学工作站。

1.2 试药 试剂:超纯水、乙腈(色谱纯,上海德正化工有限公司)、甲醇(分析纯,上海德正化工有限公司)、冰醋酸(分析纯,天津市鑫源化工有限公司);马钱苷、芍药苷、桂皮醛、丹皮酚对照品均购自中国药品生物制品检定所;金匱肾气丸样品来源 1-7(取处方量按照大蜜丸制备方法自制)、8(北京同仁堂,20070726)、9(沈阳中药制药有限公司,20070621)、10(山东方健制药有限公司,20070312)。

2 实验方法

2.1 检测波长的选择 用 DAD 检测器进行全波长扫描(200 ~ 400 nm),在 3D 图下选取最佳检测波长。结果表明 210 nm 下色谱图的基线不平,275 nm 以上色谱图吸光值较小,300 ~ 400 nm 色谱图吸光值随波长的增加而减小,248 nm 附近吸收度最好,出峰最多,故选取 248 nm 为检测波长。

2.2 色谱条件 色谱柱 Hydrosphere C₁₈(4.6 mm × 150 mm 5 μm);流动相乙腈-1% 冰醋酸水溶液,梯度洗脱程序见表 1;柱温 30 ℃;流速 1.0 mL·min⁻¹;检测波长 248 nm;进样量 20 μL。

表 1 指纹图谱流动相线性梯度表

t/min	乙腈/%	冰醋酸/%
0	10	90
20	20	80
40	40	60
95	80	20

2.3 对照品溶液的制备 精密称取马钱苷、芍药苷、桂皮醛、丹皮酚 0.5 mg,置于 2 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜过滤后,进样 20 μL,其保留时间分别是马钱苷 7.036 min、芍药苷 9.743 min、桂皮醛 32.304 min、丹皮酚 37.427 min。

2.4 供试品溶液的制备 称取金匱肾气丸样品 10 g,加 5 倍量的甲醇回流提取 1.5 h,提取液蒸干,残渣用甲醇分次溶解,转移并定容至 10 mL 量瓶中,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜过滤后,进样 20 μL,记录 95 min 的图谱。如图 1。

2.5 特征峰的认定和参照物的选择 保留时间在 37.492 min 的 13 号色谱峰是金匱肾气丸样品 HPLC

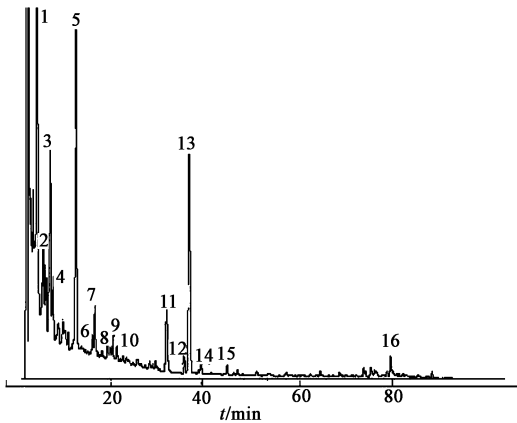


图 1 金匱肾气丸的 HPLC 指纹图谱

图谱中峰面积较大,出峰时间适中,峰形好并且很稳定的一个峰。其保留时间、紫外光谱图和最大吸收波长(276 nm)与丹皮酚标准品(37.427 min,276 nm)一致,故选择 13 号峰作为参照物。

将指纹图谱中其余的特征峰与马钱苷、芍药苷、桂皮醛标准品对比,发现除了 13 号峰是丹皮酚外,3 号峰的保留时间(7.015 min)、光谱图及其最大吸收波长(238 nm)与马钱苷标准品(7.036 min,236 nm)基本一致;11 号峰的保留时间(32.147 min)、光谱图及其最大吸收波长(290 nm)与桂皮醛标准品(32.304 min,292 nm)一致;样品中的芍药苷可能被其他杂质峰所掩盖,所以很难和标准品对出。

2.6 方法学考察

2.6.1 精密度试验 取同一供试品溶液,连续进样 5 次,检测指纹图谱。比较各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积,结果表明各共有峰相对保留时间的 RSD 在 0.26% ~ 0.82%,各共有峰相对峰面积的 RSD 在 0.22% ~ 0.89%,表明仪器的精密度良好。

2.6.2 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于 0,4,8,12,24 h 检测指纹图谱。比较各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积,结果表明各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD < 2%,表明供试品溶液在 24 h 内的稳定。

2.6.3 重复性试验 取同一批金匱肾气丸样品 5 份,按照 2.3 项下的方法制备供试品溶液,检测指纹图谱。比较各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积,结果表明各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD < 3%,表明方法的重现性良好。

3 指纹图谱的建立和分析

3.1 共有峰的确定 对 10 批样品进行测定,记录 95 min 色谱图,对不同供试品所得的指纹图谱进行

分析,选择稳定性和重现性好,吸收强,特征明显的色谱峰为共有峰,标定 16 个共有峰,(图 2)其中 3,4,8,10 号峰为主要特征峰。统计各共有特征峰峰面积相对含量,其中共有峰占总峰面积的 89%,非共有峰占 11%。各特征峰的相对保留时间和相对峰面积见表 2。

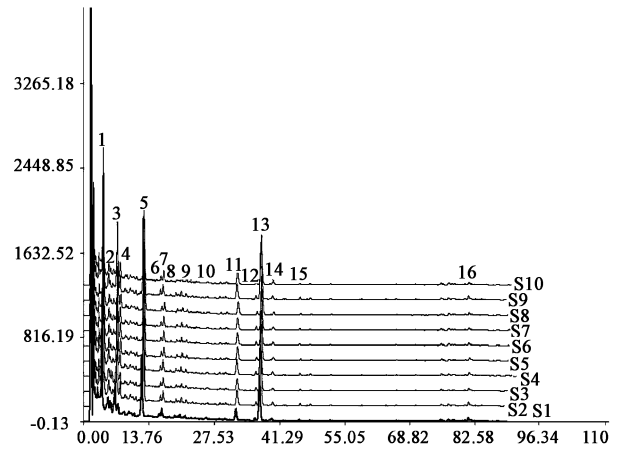


图 2 10 批金匱肾气丸样品 HPLC 指纹图谱

表 2 特征峰峰号,相对保留时间及相对峰面积

No.	t_R'	Area
1	0.113	2.175
2	0.144	0.504
3	0.195	0.931
4	0.210	0.412
5	0.344	1.123
6	0.441	0.239
7	0.457	0.268
8	0.497	0.120
9	0.530	0.164
10	0.557	0.158
11	0.867	0.329
12	0.973	0.090
13	1	1
14	1.067	0.089
15	1.218	0.061
16	2.162	0.060

3.2 相似度的计算 采用国家药典委员会开发的中药色谱指纹图谱相似度评价系统研究版(2004A),该软件具有生成对照图谱功能,相似度计算方法为夹角余弦法,支持多点校正功能。将色谱工作站中的数据导入该软件,选定上述 5~8 个特征

峰进行谱峰匹配,通过中位数矢量计算得出金匱肾气丸 10 批样品指纹图谱的共有模式,并以此共有模式为标准,采用夹角余弦法计算各批样品的相似度,结果分别为 0.945,0.981,0.979,0.995,0.994,0.990,0.956,0.874,0.855,0.821。

4 讨论

本次实验以尽可能多的体现金匱肾气丸中的主要成分为原则。故在实验过程中我们分别选取了 95% 的乙醇,70% 的乙醇,甲醇,70% 的甲醇,水作为提取溶剂,结果发现用甲醇制备的供试品溶液指纹图谱响应峰最多且样品各峰分离较好。并比较了超声提取和回流提取法,发现供试品溶液指纹图谱响应峰数目基本一致,但是回流提取法的各峰响应值较高。因此,本实验选用回流提取法,用甲醇作为提取溶剂。

实验过程中采用了多种流动相梯度洗脱①甲醇-水②乙腈-水③乙腈-1% 冰醋酸。由于醇-水系统的热力学和可压缩性等因素,在梯度洗脱时容易导致基线漂移且某些物质在甲醇-水系统下和固定相有较强的氢键作用,容易使色谱峰拖尾。乙腈相对较好,加酸后所得色谱峰数较多,故实验选取 3 号系统为流动相。

指纹图谱相似度评价通过相似度的计算我们不难发现自制的 1~7 批样品的相似度在 0.96 以上,表明自制的金匱肾气丸样品相似度良好,与不同厂家的样品相比相似度有所差异,但均具有相同的色谱特征峰。该法一次性进样即能得到众多的色谱峰,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控性。

[参考文献]

[1] 邵焕庆,王新玲. 金匱肾气丸抗衰老机制的初步研究[J]. 解放军保健医学杂志,2001,3(2):105.
[2] 马红,沈继译. 金匱肾气丸免疫调节作用的实验研究[J]. 中药药理与临床,2000,16(6):5.
[3] ZHO Y X. Technique on fingerprints on Chinese Triditional Medicine [M]. Beijing: Chemical industry press,2002: 31.
[4] LI X M, HE X R. HPLC fingerprints of geentiana straminea maxim [J]. Chin Tradit Pat Med, 2004, 26(1): 4.

[责任编辑 蔡仲德]