

# 贞芪扶正颗粒的HPLC指纹图谱研究<sup>△</sup>

魏晓雨<sup>1\*</sup>,姜国栋<sup>2</sup>,陈泓<sup>2</sup>,王美慧<sup>1</sup>,徐杰<sup>1</sup>,边雨<sup>1</sup>,姜文月<sup>1#</sup>(1.吉林省现代中药工程研究中心有限公司,长春 130012;2.修正药业集团股份有限公司,吉林通化 134000)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)33-4691-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.33.23

**摘要** 目的:建立贞芪扶正颗粒的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱。方法:采用高效液相色谱-蒸发光散射检测法(HPLC-ELSD)。色谱柱为Agilent Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub>,流动相为乙腈-水(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,柱温为40 ℃,检测器蒸发光温度为50 ℃,进样量为10 μL。以特女贞苷为参照,测定7批贞芪扶正颗粒的HPLC图谱,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 A)版进行共有峰指认和相似度评价。结果:7批贞芪扶正颗粒的HPLC图谱有13个共有峰。经验证,7批样品HPLC图谱中有3批样品相似度>0.9,与对照指纹图谱具有较好一致性;4批样品相似度<0.9,与对照指纹图谱一致性较差。结论:该研究所建指纹图谱可为贞芪扶正颗粒的质量评价提供参考。

**关键词** 贞芪扶正颗粒;高效液相色谱-蒸发光散射检测法;指纹图谱;质量标准

## Study on HPLC Fingerprint of Zhenqi Fuzheng Granules

WEI Xiaoyu<sup>1</sup>,JIANG Guodong<sup>2</sup>,CHEN Hong<sup>2</sup>,WANG Meihui<sup>1</sup>,XU Jie<sup>1</sup>,BIAN Yu<sup>1</sup>,JIANG Wenyue<sup>1</sup>(1.Jilin Modern TCM Engineering and Research Center Co., Ltd., Changchun 130012, China; 2.Xiuzheng Pharmaceutical Group Co., Ltd, Jilin Tonghua 134000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish HPLC fingerprint of Zhenqi fuzheng granules. METHODS: HPLC-ELSD method was adopted. The determination was performed on Agilent Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min with column temperature of 40 ℃. The detector evaporation temperature was 50 ℃, and sample size was 10 μL. Using specnuezhenide as reference, HPLC chromatograms of 7 batches of Zhenqi fuzheng granules were determined. The identification and similarity evaluation of common peaks were conducted by using the *TCM Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System* (2004 A edition). RESULTS: There were 13 common peaks in HPLC chromatograms of 7 batches of samples. After validated, the similarity of 3 batches of samples in HPLC chromatograms of 7 batches of samples were higher than 0.9, which were in good agreement with control fingerprints. The similarity of 4 batches of samples were < 0.9, which were poorly same to control fingerprint. CONCLUSIONS: Established fingerprint can provide reference for quality evaluation of Zhenqi fuzheng granules.

**KEYWORDS** Zhenqi fuzheng granules; HPLC-ELSD; Fingerprint; Quality standard

贞芪扶正颗粒由女贞子和黄芪两味药材组成<sup>[1]</sup>,收载于《卫生部颁药品标准·中药成方制剂》(第20册),具有提高人体免疫力,保护骨髓及肾上腺皮质的功能<sup>[2-3]</sup>。大量药理学研究和临床应用已证实其可以作为癌症治疗的辅助药物<sup>[4-6]</sup>。目前全国注册在案的贞芪扶正颗粒生产企业共有11家,分为无糖型及有糖型两种,现行质量标准只对组方中黄芪药材所含的黄芪甲苷进行定性及定量分析<sup>[7]</sup>,而未对女贞子药材有任何限定。中药复方成分的复杂性为其质量控制增加了难度,只对单一成分或特征性成分研究不能全面控制其质量稳定性<sup>[8-11]</sup>,而

指纹图谱技术能够全面呈现样品的复杂性,近年来被广泛应用于中药的质量评价体系中<sup>[12-13]</sup>。鉴于此,笔者采用高效液相色谱-蒸发光散射检测法(HPLC-ELSD)建立了贞芪扶正颗粒的HPLC图谱<sup>[14]</sup>,运用相似度评价方法对7批贞芪扶正颗粒的HPLC图谱进行了分析评价,并进行特征峰指认,以期完善该制剂的质量评价提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

RIGOL L-3000型HPLC仪,包括四元泵、自动进样器、柱温箱、蒸发光检测器(北京普源精电科技有限公司);ME204E型双量程电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);SB-5200D型超声波清洗机(宁夏新芝生物科技有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

贞芪扶正颗粒(A厂,批号:S1,无糖型,规格:5

△ 基金项目:国家中药标准化项目(No.ZYBZH-C-JL-26);吉林省医药健康产业发展专项引导资金项目(No.YYZX201503)

\* 助理工程师,硕士。研究方向:中药二次开发。E-mail: weixiaoyu1547@163.com

# 通信作者:工程师,博士。研究方向:新药及保健食品开发。电话:0431-89255017。E-mail:542030923@qq.com

g/袋;B厂,批号:S2,无糖型,规格:5 g/袋;C厂,批号:S3,无糖型,规格:5 g/袋;D厂,批号:S4,有糖型,规格:15 g/袋;E厂,批号:S5,有糖型,规格:15 g/袋;F厂,批号:S6,无糖型,规格:5 g/袋;G厂,批号:S7,有糖型,规格:15 g/袋);芒柄花素对照品(批号:111703-200501,纯度:98.8%)、红景天苷对照品(批号:110818-201206,纯度:93.4%)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品(批号:111920-201505,纯度:97.6%)、特女贞苷对照品(批号:111926-201404,纯度:93.3%)、黄芪甲苷对照品(批号:110781-201515,纯度:97.4%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

### 1.3 药材

试验用药材均购自某药店,经吉林农业大学中药材学院张连学教授鉴定为真品。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~10 min,95%→90% A;10~30 min,90%→78% A;30~40 min,78%→73% A;40~65 min,73%→48% A);流速:1.0 mL/min;柱温:40 ℃;检测器蒸发光温度:50 ℃;进样量:10 μL。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取芒柄花素对照品5.23 mg、红景天苷对照品4.45 mg、毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品4.67 mg、特女贞苷对照品5.34 mg、黄芪甲苷对照品5.64 mg,置于同一10 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成每1 mL分别含芒柄花素0.523 mg、红景天苷0.445 mg、毛蕊异黄酮葡萄糖苷0.467 mg、特女贞苷0.534 mg、黄芪甲苷0.564 mg的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取有糖型样品15 g(无糖型样品5 g),精密称定,精密加入甲醇50 mL,超声(功率:220 W,频率:33 kHz,下同)处理15 min,经0.45 μm微孔滤膜滤过,滤液水浴蒸干,残渣加水5 mL使溶解,通过D101大孔树脂(柱高:12 cm,内径:1.5 cm),以3倍柱体积的水进行洗脱,弃去水液;再分别用3倍柱体积的30%乙醇溶液、60%乙醇溶液、95%乙醇溶液依次洗脱,收集上述洗脱液,水浴蒸干,残渣加甲醇使溶解,并定容至10 mL,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 单味药材溶液 精密称取“1.3”项下黄芪药材粉末及女贞子药材粉末(过3号筛)各约1 g,按“2.2.2”项下

方法制得单味药材溶液。

### 2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,以特女贞苷的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果,13个共有峰相对保留时间的RSD<0.5%(n=6),相对峰面积的RSD<2.0%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:S1)适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8、10、12、16、20、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,以特女贞苷的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果,13个共有峰相对保留时间的RSD<0.5%(n=10),相对峰面积的RSD<2.0%(n=10),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 精密称取样品(批号:S1)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,以特女贞苷的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果,13个共有峰相对保留时间的RSD<0.5%(n=6),相对峰面积的RSD<2.0%(n=6),表明本方法重复性良好。

### 2.4 HPLC 指纹图谱的生成、共有峰的归属和指认及相关数据分析

2.4.1 HPLC 指纹图谱的生成 取7批样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 A版)对7批样品的HPLC图谱进行分析,得HPLC指纹图谱,详见图1、图2。

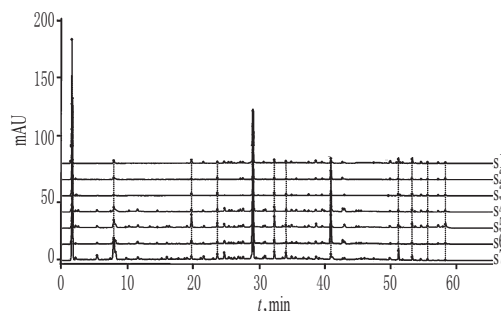


图1 7批样品的HPLC叠加指纹图谱

### Fig 1 HPLC superposed fingerprints of 7 batches of samples and control fingerprints

2.4.2 共有峰的归属和指认 比较图2中各色谱(其中5号为参照峰)并对HPLC图谱共有峰进行归属和指认。结果显示,样品HPLC图谱13个共有峰中1、2、4、5、6、7号峰来源于女贞子,3、8、9、10、11、12、13号来源于黄芪。共有峰中1、3、5、9、10号色谱峰分别指认为红景天

苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、特女贞苷、芒柄花素、黄芪甲苷,经统计上述5个色谱峰面积之和约占共有峰总面积的60%。

2.4.3 相似度与各共有峰相关数据分析 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 A版)对7批样品的HPLC图谱进行比较分析。结果,7批样品HPLC图谱中有3批样品相似度>0.9,4批样品相似度<0.9,详见表1;各共有峰的相对保留峰面积和相对保留时间见表2和表3。

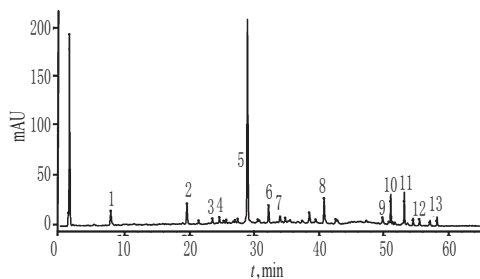


图2 样品HPLC对照指纹图谱

Fig 2 HPLC control fingerprints of samples

表1 7批样品相似度评价结果

Tab 1 Similarity evaluation of 7 batches of samples

样品批号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	对照指纹图谱
S1	1.000	0.785	0.896	0.790	0.284	0.838	0.646	0.893
S2	0.785	1.000	0.819	0.996	0.238	0.976	0.751	0.934
S3	0.896	0.819	1.000	0.825	0.234	0.858	0.628	0.899
S4	0.790	0.996	0.825	1.000	0.223	0.978	0.748	0.934
S5	0.284	0.238	0.234	0.223	1.000	0.340	0.672	0.480
S6	0.838	0.976	0.858	0.978	0.340	1.000	0.771	0.967
S7	0.646	0.751	0.628	0.748	0.672	0.771	1.000	0.853
对照指纹图谱	0.893	0.934	0.899	0.934	0.480	0.967	0.853	1.000

表2 7批样品HPLC图谱共有峰的相对峰面积

Tab 2 Relative peak areas of common peaks in HPLC fingerprints of 7 batches of samples

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	平均值	RSD,%
1	0.311 0	0.106 5	0.178 1	0.087 6	0.399 8	0.245 6	0.785 4	0.302 0	79.52
2	0.487 7	0.069 8	0.246 8	0.093 1	0.074 3	0.083 4	0.099 0	0.164 9	94.06
3	0.070 1	0.031 7	0.227 2	0.017 8	0.131 4	0.015 2	0.103 5	0.085 3	89.78
4	0.103 7	0.032 2	0.128 8	0.017 4	0.264 6	0.032 7	0.026 4	0.086 5	103.39
5(S)	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.00
6	0.201 5	0.035 9	0.205 9	0.054 8	0.184 2	0.021 7	0.109 9	0.116 3	69.46
7	0.208 0	0.015 1	0.077 0	0.028 9	0.153 5	0.014 2	0.120 6	0.088 2	85.52
8	0.274 6	0.407 8	0.257 9	0.381 0	0.156 9	0.360 2	0.187 9	0.289 5	33.52
9	0.082 5	0.017 8	0.075 7	0.006 1	0.021 6	0.014 2	0.081 2	0.042 7	82.04
10	0.172 7	0.005 5	0.067 6	0.011 3	0.104 2	0.011 5	0.117 1	0.070 0	92.18
11	0.079 7	0.027 3	0.090 6	0.025 9	0.192 9	0.025 8	0.175 7	0.088 3	80.35
12	0.017 4	0.006 6	0.093 0	0.012 8	0.071 7	0.010 4	0.041 0	0.036 1	94.22
13	0.007 7	0.031 4	0.132 2	0.023 3	0.103 9	0.025 1	0.036 7	0.051 5	91.44

表3 7批样品HPLC共有峰的相对保留时间

Tab 3 Relative retention time of common peaks in HPLC fingerprints of 7 batches of samples

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	平均值	RSD,%
1	0.049 8	0.049 7	0.049 7	0.049 8	0.049 7	0.049 7	0.049 9	0.05	0.15
2	0.270 5	0.271 0	0.270 4	0.271 8	0.271 2	0.271 2	0.270 4	0.27	0.20
3	0.676 7	0.676 3	0.676 8	0.676 0	0.676 9	0.677 2	0.677 2	0.68	0.07
4	0.812 7	0.813 0	0.813 0	0.812 7	0.812 9	0.813 0	0.813 2	0.81	0.02
5(S)	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.00	0.00
6	1.112 4	1.112 5	1.112 8	1.112 5	1.112 6	1.112 6	1.113 0	1.11	0.02
7	1.173 4	1.173 7	1.173 5	1.173 4	1.173 5	1.173 5	1.173 8	1.17	0.01
8	1.408 1	1.408 4	1.408 1	1.408 2	1.408 4	1.408 5	1.408 8	1.41	0.02
9	1.719 0	1.719 6	1.719 3	1.719 1	1.719 7	1.719 5	1.719 8	1.72	0.02
10	1.762 7	1.762 9	1.763 0	1.762 9	1.762 9	1.763 0	1.763 1	1.76	0.01
11	1.834 5	1.835 0	1.834 9	1.834 8	1.835 0	1.835 1	1.835 3	1.83	0.01
12	1.915 8	1.916 2	1.916 2	1.916 1	1.916 2	1.916 4	1.916 6	1.92	0.01
13	2.009 0	2.009 5	2.009 4	2.009 3	2.009 5	2.009 6	2.009 9	2.01	0.01

### 3 讨论

#### 3.1 提取方式及提取溶剂的确定

本研究比较了加热回流与超声两种提取方式,结果发现两者没有明显差异,但超声提取法操作更简单、快



捷且溶剂损耗少,故选取超声提取法作为本研究的提取方法。本研究也比较了不同提取溶剂(80%甲醇溶液、甲醇)的提取效果,结果发现甲醇作为提取溶剂时,杂质较少且澄清,色谱峰形好、基线平稳,故选取甲醇为提取溶剂。

### 3.2 色谱柱和流动相的选择

本研究对比了 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm, 5 μm)与 ACE5-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm)两种色谱柱的分离效果,结果显示 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm, 5 μm)分离效果较好,因此选择上述色谱柱进行试验。还比较了甲醇-水、乙腈-水作为流动相进行梯度洗脱时的色谱分离情况,结果以乙腈-水为流动相进行梯度洗脱,所得色谱分离度较好,基线平稳,有利于各色谱峰的分析。因此,本试验选择乙腈-水为流动相。

### 3.3 不同厂家贞芪扶正颗粒基于相似度的质量差异分析

本试验首次建立了贞芪扶正颗粒 HPLC 的指纹图谱,标定了 13 个共有峰,为有效控制贞芪扶正颗粒成品的质量提供了理论依据。本试验采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 A)对所得的 HPLC 指纹图谱进行相似度分析,并与所生成的对照图谱进行比较,结果 7 批样品 HPLC 指纹图谱中有 3 批样品相似度 > 0.9,与对照指纹图谱具有较好一致性;4 批样品相似度 < 0.9,与对照指纹图谱一致性较差。说明不同厂家样品在成分的比例上有所差异,而造成这种差异可能与成品原料质量有关。黄芪及女贞子属于广泛种植药材,地域等的不同可能造成药材成品间含量差异较大;其次,各厂家生产工艺也不尽相同,最终导致各厂家成分质量差异较大。因此,对中药制剂进行标准化研究是控制中药制剂质量稳定的重要措施,从药材源头进行控制,对生产工艺进行标准化规定,才能有效降低不同厂家同品种间疗效的差异。

综上所述,本研究所建指纹图谱可为贞芪扶正颗粒的鉴别质量评价提供参考。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会.卫生部颁药品标准:中药成方制剂:第 20 册[S].北京:中国医药科技出版社,2011:117.
- [2] 胡少明,董慧,涂胜豪,等.贞芪扶正颗粒联合化疗治疗胃癌的临床研究[J].中国药师,2005,8(9):761-763.
- [3] 张超贤,郭李柯,郭晓凤.电针联合贞芪扶正颗粒对肝纤维化大鼠自由基反应、NF-κB 活化、TGF-β<sub>1</sub> 和 CTGF mRNA 表达的影响[J].中国老年学杂志,2014,34(9):2512-2516.
- [4] 陈云.贞芪扶正颗粒对食管癌化疗患者生存质量及免疫功能的影响[J].吉林中医药,2015,35(10):1025-1027.
- [5] 江瑾,吴祥.贞芪扶正颗粒治疗胸部肿瘤三维适形放疗毒副反应 25 例[J].现代中医药,2014,34(3):37-38.
- [6] 陈康桂,肖波,黄群英.经穴自血疗法联合贞芪扶正颗粒防治缓解期小儿支气管哮喘临床研究[J].新中医,2016,48(2):21-23.
- [7] 国家药品监督管理局.国家药品标准:WS<sub>3</sub>-B-3831-98-2002[S].2002.
- [8] 吴杏梅,廖华卫,蔡先东,等.HPLC-ELSD 法测定贞芪扶正片黄芪甲苷的含量[J].中国现代药物应用,2008,2(10):1-2.
- [9] 刘俊有,慕杨娜,季雪,等.高效液相色谱法测定贞芪扶正颗粒特女贞苷含量[J].实用中医内科杂志,2015,29(3):135-136.
- [10] 胡芳弟,封士兰,赵健雄.RP-HPLC 测定贞芪扶正制剂中两种异黄酮类成分的含量[J].中成药,2004,26(9):19-21.
- [11] 程伟,石晓伟,张嫡群,等.贞芪扶正胶囊中黄芪甲苷和红景天苷的含量测定[J].中成药,2006,28(5):658-662.
- [12] 牛小花,陈洪源.清喉利咽颗粒的 UPLC 指纹图谱建立及主成分分析[J].中国药房,2017,28(6):826-830.
- [13] 吴健,高家荣,韩燕全,等.芪归糖痛宁颗粒的 UPLC 指纹图谱研究[J].中国药房,2014,25(11):1022-1024.
- [14] 陶金华,狄留庆,文红梅,等.中药指纹图谱谱效相关性研究思路探讨[J].中国中药杂志,2009,34(18):2410-2411.

(收稿日期:2017-06-16 修回日期:2017-09-15)

(编辑:刘柳)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊,欢迎投稿、订阅