生新发胶囊的 HPLC-PADA 指纹图谱研究

封丽彬，王诗用*，李 战
广西玉林制药集团有限责任公司，广西 玉林 537001

摘 要：目的 建立生新发胶囊（补骨脂、何首乌、女贞子、当归、天麻、黄精等）的指纹图谱，更好地控制生新发胶囊的质量。**方法** 采用 HPLC 法，二极管阵列检测器（PADA）；流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液，梯度洗脱；柱温 35 ℃；体积流量为 1.0 mL/min；检测波长 246 nm。**结果** HPLC-PADA 色谱图中有 13 个共有峰，采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2004A 版）”自动处理，11 批生新发胶囊的相似度均大于 0.99。**结论** 该方法准确可靠、简便、稳定，重复性好，可作为生新发胶囊的质量评价方法。

关键词：生新发胶囊；指纹图谱；HPLC-PADA；共有峰；相似度；质量评价
中图分类号：R286.02 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2013)14 - 1935 - 04
DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.14.013

HPLC-DAD fingerprint of Shengxinfa Capsules

FENG li-bin, WANG Shi-yong, LI Zhan
Guangxi Yulin Pharmaceutical Co., Ltd., Yulin 537001, China

Abstract: Objective To establish the fingerprint of Shengxinfa Capsules (consisted of *Psoraleae Fructus*, *Polygonui Multiflori Radix*, *Ligustri Lucidi Fructus*, *Angelicae Sinensis Radix*, *Gastrodiae Rhizoma*, *Polygonati Rhizoma*, etc.) for the quality evaluation. **Methods** The fingerprint was established by HPLC with Photodiode Array Detector (PADA). The acetonitrile -0.1% phosphoric acid (gradient elution) was employed as the mobile phase, column temperature was at 35 ℃, flow rate was 1.0 mL/min, and detection wavelength was at 246 nm. **Results** There were 13 common peaks appeared in the PADA fingerprint, which were defined by software published by the Chinese Pharmacopeia Committee. The similarity of 11 batches was more than 0.99. **Conclusion** The method is simple, accurate, and sensitive. It is suitable to be used for the quality evaluation of Shengxinfa Capsules.

Key words: Shengxinfa Capsules; fingerprint; HPLC-PADA; common peak; similarity; quality evaluation

生新发胶囊是由补骨脂、何首乌、女贞子、当归、天麻、黄精等中药经适宜的加工、炮制、提取而制成的中药复方制剂，具有补益肝肾，养血生发的作用。临床主要用于各种原因引起的脱发、秃顶等。补骨脂为豆科植物补骨脂的干燥成熟果实，其性辛、苦、温，归肾、脾经，具有温肾助阳、纳气平喘、温脾止泻之功效[1]。现代药理研究表明补骨脂的有效成分为补骨脂素和异补骨脂素[2]。中药指纹图谱是控制天然药物质量的有效方法之一，已日益成为国内外广泛接受的中药质量评价模式[3]，且应用于各种制剂的质量控制、提取分离、中药衍生物变化规律等方面的有效评价方法，为中药药效物质基础研究提供了很好的方法和技术手段[4-5]。本研究采用 HPLC 法，建立生新发胶囊指纹图谱，为生新发胶囊的质量评价提供理论依据，为其药效物质基础研究提供参考。

1 仪器与材料

Waters e2695 高效液相色谱仪，二极管阵列检测器（PADA）；GR—202 电子分析天平（精确度为十万分之一）；艾科普浦超纯水制备仪；BUG40 超声波清洗器。

对照品补骨脂素（批号 110739-200511）、异补骨脂素（批号 110738-200309）均购自中国食品药品检定研究院；芦荟大黄素（批号 110795-201007）、

收稿日期：2013-05-30
基金项目：广西壮族自治区科技公关项目（桂科攻 1099062-11）
作者简介：封丽彬（1970—），女，工程师，主要从事中药质量研究工作。Tel: (0775)3892057 E-mail: fenglib@126.com
*通信作者 王诗用（1958—），男，高级工程师，从事中药质量研究工作。Tel: (0775)3892017 E-mail: wsy2812@sina.com
网络出版时间：2013-07-05 网络出版地址：http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130705.1601.018.html

大黄酸（批号 0757-200206）、大黄酚（批号 110796-201017）均购自中国药品生物制品检定所；11 批生新发胶囊为自制（广西玉林制药集团有限责任公司提供，批号分别为 110301、110602、110809、110203、120304、120605、121006、121012、121108、121225、130105，分别编号为 S1～S11），规格：0.5 g/粒；乙腈为色谱纯，水为纯化水，其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent TC-C_{18} 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液，梯度洗脱：0～5 min，8%～20%乙腈；5～15 min，20%～30%乙腈；15～25 min，30%～50%乙腈；25～60 min，50%乙腈；柱温 35 ℃；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 246 nm；进样量 10 μL。

2.2 供试品溶液和参照物对照溶液的制备

取生新发胶囊内容物 1.0 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加甲醇 25 mL，称定质量，超声（250 W，40 kHz）30 min，放冷，再称定质量，用甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，即得。

精密称取补骨脂素、异补骨脂素对照品适量，加甲醇制成质量浓度均为 20.0 μg/mL 的溶液，作为参照物对照溶液。精密称取芦荟大黄素、大黄酸、大黄酚对照品适量，加甲醇制成质量浓度分别为 20.0、16.0、18.0 μg/mL 的对照溶液，用以定位色谱峰位置。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 按“2.2”项下方法制备生新发胶囊（批号 110301）供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件，分别连续进样 6 次，以异补骨脂素为 HPLC-PADA 指纹图谱参照物，计算各色谱峰的相对保留时间及相对峰面积。结果表明，色谱图中 13 个共有峰的相对保留时间 RSD 为 0.25%～1.11%，相对峰面积 RSD 为 0.22%～1.05%，精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 按“2.2”项下方法制备生新发胶囊（批号 110301）供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 进行检测，以指纹图谱各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积为指标，采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2004A 版）”处理。结果表明，色谱图中 13 个共有峰的相对保留时间 RSD 为 0.05%～0.39%，相对峰面积 RSD 为 0.06%～1.27%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 按“2.2”项下方法制备生新发胶囊（批号 110301）供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件，取同一批号样品 6 份，平行操作。结果表明，色谱图中 13 个共有峰的相对保留时间 RSD 为 0.05%～0.49%，相对峰面积 RSD 为 0.08%～1.20%，表明该方法重复性良好。

2.4 指纹图谱研究

2.4.1 指纹图谱建立 采用指纹图谱评价系统，排除阴性对照色谱峰，确定 11 批指纹图谱中 13 个共有峰，计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积。选取色谱图中异补骨脂素色谱峰（峰 9）的相对保留时间和相对峰面积之分值 1，各共有峰的相对保留时间 RSD 为 0.25%～1.11%，相对峰面积 RSD 为 0.22%～1.00%，结果见表 1、2。

2.4.2 共有峰的标定 11 批生新发胶囊按“2.2”项下方法制备生新发胶囊供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定，记录色谱图进行分析，对照品异补骨脂素、11 批生新发胶囊指纹图谱重叠图及其生成的共有模式指纹图谱（R）见图 1。指纹图谱中 8、9、11、12、13 号特征峰与补骨脂素、异补骨脂素、芦荟大黄素、大黄酸、大黄酚对照品保留时间一致。由于异补骨脂素（峰 9）峰面积较大且稳定，故以其为 HPLC-PADA 指纹图谱参照物。11 批生新发胶囊指纹图谱经过采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2004A 版）”处理，结果表明，HPLC-PADA 指纹图谱中共有 35 个指纹峰，其共有峰 13 个，共有峰面积占总峰面积的 98.80%。

2.4.3 相似度评价 以 13 个共有峰峰面积均值做模板，采用相关系数法、夹角余弦法和改良程度相似度法[6]进行评价，结果见表 3。可以看出，11 批生新发胶囊样品的相似度均大于 0.994，说明样品的原料来源及制备工艺具有一致性，样品质量稳定。

3 讨论

供试品溶液制备比较了用不同体积分数的甲醇进行超声处理和水浴回流 2 种提取方法，结果表明甲醇为溶剂超声 30 min，简便快速、效果好。经试验优化确定以乙腈-0.1%磷酸水溶液为梯度洗脱系统的流动相。经采用 220、224、246、254、320 nm 等不同的检测波长检测及采用 PADA 分析，在 246 nm 波长处指纹峰较多，多数特征成分的响应值较大，而且基线较平稳，故选择 246 nm 波长作为指纹图谱检测波长。为显示图谱全貌通过制备不同质量浓度的供试品溶液进行分析比较，结果供试品溶

表 1 11 批生新发胶囊 HPLC 色谱指纹图中共有峰的相对保留时间

Table 1 Relative retention time of common peaks in 11 batches of Shengxinfa Capsules

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	平均值	RSD / %
1	0.128 0	0.128 1	0.127 8	0.127 6	0.128 9	0.128 5	0.127 1	0.127 3	0.128 9	0.128 8	0.128 4	0.128 1	0.49
2	0.162 6	0.162 7	0.162 3	0.162 7	0.168 5	0.162 9	0.162 3	0.163 0	0.161 9	0.162 8	0.163 2	0.163 2	1.11
3	0.463 3	0.469 1	0.468 1	0.468 9	0.468 2	0.469 7	0.468 2	0.467 2	0.469 2	0.463 3	0.464 2	0.467 2	0.52
4	0.474 5	0.479 9	0.475 6	0.478 1	0.474 3	0.479 6	0.478 2	0.479 9	0.478 5	0.477 9	0.479 4	0.477 8	0.44
5	0.495 1	0.496 8	0.496 7	0.498 2	0.499 1	0.495 7	0.497 5	0.495 9	0.493 2	0.494 8	0.494 2	0.496 1	0.36
6	0.561 2	0.562 4	0.563 3	0.561 8	0.568 3	0.567 2	0.561 6	0.568 1	0.562 3	0.568 9	0.568 2	0.564 8	0.57
7	0.592 3	0.592 1	0.596 2	0.596 7	0.592 5	0.597 3	0.591 2	0.597 5	0.593 3	0.598 2	0.599 4	0.595 2	0.49
8	0.968 7	0.969 1	0.952 8	0.967 3	0.956 5	0.968	0.950 1	0.963 7	0.975 4	0.967 5	0.968 3	0.964 3	0.81
9	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	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
10	1.353 2	1.352 8	1.337 8	1.348 9	1.359 8	1.351 5	1.358 6	1.358 9	1.362 8	1.352 4	1.359 1	1.335 9	0.52
11	1.420 1	1.430 1	1.427 6	1.420 3	1.425 9	1.428 3	1.426 5	1.425 8	1.420 1	1.427 6	1.426 3	1.425 3	0.25
12	1.538 4	1.526 2	1.531 4	1.523 8	1.542 3	1.540 6	1.547 6	1.531 6	1.543 2	1.530 1	1.541 0	1.536 0	0.50
13	1.593 1	1.583 2	1.585 1	1.566 2	1.583 2	1.586 5	1.578 6	1.587 3	1.592 5	1.572 4	1.582 6	1.582 8	0.51

表 2 11 批生新发胶囊 HPLC 色谱指纹图中共有峰的相对蜂面积

Table 2 Relative peak area of common peaks in 11 batches of Shengxinfa Capsules

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	平均值	RSD / %
1	0.178 0	0.179 2	0.181 0	0.182 5	0.179 9	0.182 0	0.179 6	0.180 9	0.180 1	0.179 7	0.177 0	0.180 0	0.90
2	0.274 8	0.278 8	0.276 5	0.276 8	0.274 9	0.276 5	0.276 8	0.277 8	0.277 2	0.278 0	0.276 9	0.276 8	0.43
3	0.432 7	0.434 9	0.433 9	0.430 2	0.435 0	0.434 8	0.432 9	0.433 5	0.434 1	0.433 7	0.434 5	0.433 7	0.32
4	0.896 4	0.909 1	0.900 9	0.900 1	0.899 7	0.899 6	0.900 2	0.900 5	0.900 3	0.900 1	0.900 2	0.900 6	0.34
5	0.602 8	0.596 4	0.598 1	0.597 9	0.598 6	0.598 8	0.589 2	0.600 2	0.600 1	0.598 7	0.596 1	0.597 9	0.57
6	0.346 2	0.347 6	0.348 4	0.347 5	0.347 0	0.348 5	0.346 9	0.348 7	0.347 7	0.347 3	0.348 1	0.347 6	0.22
7	0.172 6	0.171 4	0.173 1	0.172 9	0.173 4	0.173 9	0.172 8	0.172 4	0.174 5	0.174 2	0.172 8	0.173 1	0.51
8	0.875 0	0.889 8	0.872 9	0.882 0	0.886 3	0.874 3	0.885 6	0.869 8	0.874 8	0.865 5	0.862 5	0.876 2	1.00
9	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	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
10	0.679 9	0.670 5	0.672 8	0.671 8	0.672 8	0.674 3	0.673 4	0.677 1	0.675 4	0.671 9	0.672 4	0.673 8	0.40
11	0.132 6	0.135 1	0.131 4	0.131 9	0.132 3	0.132 5	0.132 8	0.131 9	0.134 0	0.133 6	0.132 7	0.132 8	0.80
12	0.333 7	0.331 5	0.331 7	0.332 9	0.334	0.332 7	0.332 7	0.333 5	0.333 8	0.331 9	0.332 8	0.332 8	0.26
13	0.385 1	0.389 1	0.380 2	0.387 6	0.379 5	0.386 9	0.387 2	0.388 1	0.390 1	0.388 3	0.387 9	0.386 4	0.90

液为 0.04 g/mL 时，各共有峰的相对含量较稳定，色谱峰响应值较大，故确定供试品溶液的质量浓度为 0.04 g/mL。

按拟定的方法，测定 11 批生新发胶囊样品，共标出 13 个共有峰，均以 8、9、10 号为强峰，可初步拟定为生新发胶囊特征指纹峰。13 个共有峰面积的相对质量分数均较稳定，相似度为 0.994～0.999，说明不同批次的生新发胶囊质量相对较稳定。本生新发胶囊制剂的指纹图谱，采用“相关系数法”和“夹角余弦法”其相似度均在 0.999 9 以上，表明以此指纹图谱控制本制剂的内在质量，相似度很高，说明生新发胶囊的制备工艺稳定。本研究引入改良程度相似度法，进行相似度评价，结果 11 批生新发胶囊样品的相似度均在 0.98 以上。虽然相比“相关系数法”和“夹角余弦法”其相似度有所降低，但评价系统的可行性更高[7]，为本制剂的内在质量控制提供了方法。

本研究得到的对照指纹图谱 13 个共有峰中，不同批号的样品指纹图谱间的非共有峰存在一定差异，是因为工艺过程复杂及复方成分之间的相互作用等影响因素，使质量控制存在一定难度。为更加精确地评价生新发胶囊的内在质量，需进一步研究其制备工艺，同时进一步研究其谱效关系。

生新发胶囊中补骨脂[8]、何首乌[9]、女贞子[10]、

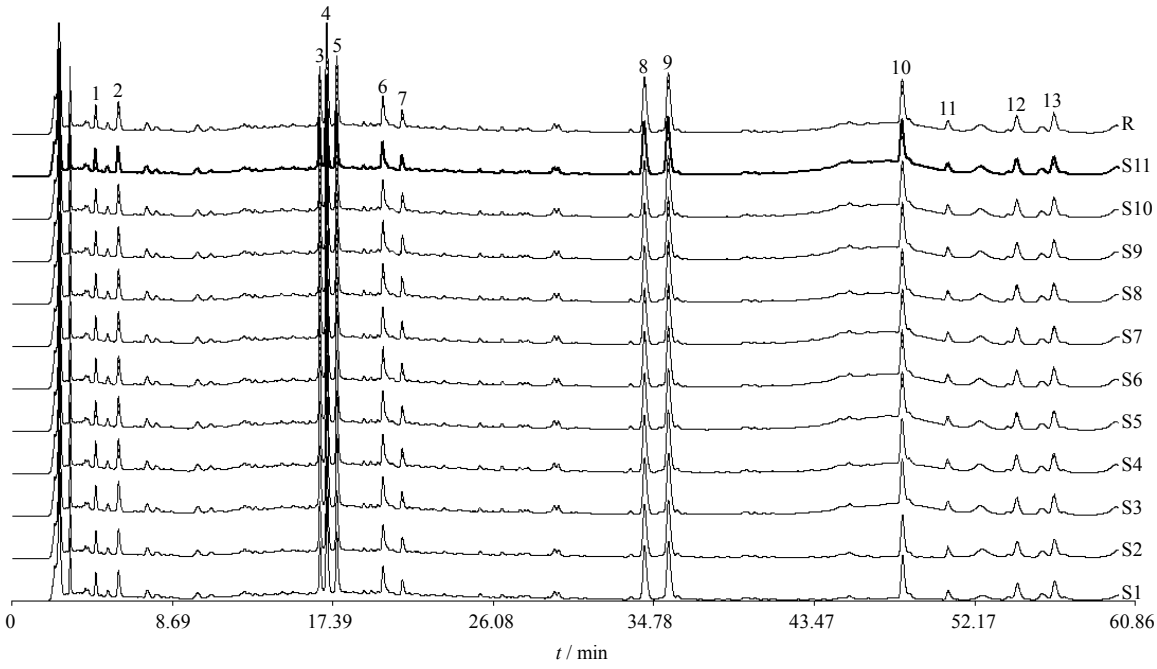

图 1　11 批生新发胶囊指纹图谱重叠图及共有模式指纹图谱

Fig. 1　Fingerprint overlap and generated mutual mode fingerpint of 11 batches of Shengxinfa Capsules

表 3　11 批生新发胶囊样品的相似度分析结果

Table 3　Similarity analysis on 11 batches of Shengxinfa Capsules

评价方法	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11
R	0.999 00	0.998 00	0.994 00	0.996 00	0.998 00	0.999 00	0.996 00	0.998 00	0.995 00	0.997 00	0.999 00
相关系数法	0.999 97	0.999 98	0.999 94	0.999 96	0.999 98	0.999 91	0.999 96	0.999 98	0.999 95	0.999 92	0.999 94
夹角余弦法	0.999 99	0.999 98	0.999 97	0.999 98	0.999 96	0.999 98	0.999 91	0.999 95	0.999 92	0.999 94	0.999 98
改良程度相似度法	0.991 68	0.995 92	0.989 94	0.993 95	0.996 92	0.989 84	0.992 95	0.999 02	0.995 94	0.997 98	0.999 01

当归[11]、天麻[12]等单味药材的指纹图谱，均已有研究报道，但本品为复方制剂，在制剂过程中会出现各药味的成分变化，因此，比较了本实验的指纹图谱和各单味药材的指纹图谱存在一定差异，而在其已知的有效成分保留方面则相对接近，如补骨脂中补骨脂素、异补骨脂素，何首乌中的芦荟大黄素、大黄酸、大黄酚等。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

[2] 颜冬梅, 高秀梅. 补骨脂化学成分研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(9): 96-99.

[3] 秦昆明, 方前波, 蔡宝昌, 等. 指纹图谱技术在方剂现代研究中的应用现状 [J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2009, 11(2): 287-293.

[4] 沈　岚, 张　梁, 冯　怡, 等. 芍药甘草复方效应组分谱效关系研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(22): 2658-2662.

[5] 崔佰吉, 张宏梅, 张秀荣, 等. HPLC 指纹图谱对延灯滴丸质量评价的研究 [J]. 中成药, 2012, 34(1): 3-7.

[6] 刘永锁, 孟庆华, 蒋淑敏, 等. 相似系统理论用于中药色谱指纹图谱的相似度评价 [J]. 色谱, 2005, 23(2): 158-163.

[7] 詹雪艳, 林兆洲, 段天璇, 等. 色谱指纹图谱相似度方法的适应性研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2012, 19(5): 61-64.

[8] 张秋海, 丁家欣, 张　玲, 等. 补骨脂HPLC指纹图谱研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2005, 11(12): 923-924.

[9] 王桂红, 聂　华, 胡俊杰, 等. 何首乌 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 湖北中医学院学报, 2010, 12(2): 29-32.

[10] 徐长根, 李　涛, 傅　强, 等. 女贞子药材 HPLC 指纹图谱的初步研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2005, 16(5): 368-371.

[11] 刘　毅, 刘素香, 龚苏晓, 等. 当归药材 HPLC 指纹图谱及其液相色谱-质谱联用分析 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(4): 259-262.

[12] 黄小玲, 杨春燕, 袁慧文, 等. 天麻药材高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中国药业, 2011, 20(2): 17-19.