

芪骨胶囊 HPLC 指纹图谱研究

范兴¹, 杨成梓^{1*}, 包侠萍², 南淑华²

1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122

2. 厦门中药厂有限公司, 福建 厦门 361100

摘要:目的 建立芪骨胶囊 HPLC 指纹图谱, 为评价其质量提供依据。方法 Platisil-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以甲醇-乙腈-水为流动相梯度洗脱; 柱温 30 ℃; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 270 nm。结果 建立了 15 批芪骨胶囊的对照指纹图谱, 确定了 16 个共有峰, 其中 15 个归属到各药材, 其相似度均大于 0.9。通过对照品对照、UFLC-ESI-MS/MS 鉴定了其中 8 个色谱峰的化学成分。通过聚类分析, 15 批芪骨胶囊可分为 3 类。结论 该方法操作简便、准确可靠、重复性较好, 为芪骨胶囊的质量控制提供了有效手段。

关键词: 芪骨胶囊; HPLC; 指纹图谱; UFLC-ESI-MS/MS; 聚类分析; 质量控制

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)09-1257-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.09.011

HPLC fingerprint of Qigu Capsules

FAN Xing¹, YANG Cheng-zi¹, BAO Xia-ping², NAN Shu-hua²

1. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

2. Xiamen Chinese Materia Medica Co., Ltd., Xiamen 361100, China

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint of Qigu Capsules for its quality control. **Methods** Platisil-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used with acetonitrile-methanol-water in gradient elution mode. The detective wavelength was 270 nm, the column temperature was set at 30 ℃, and the flow rate was 1.0 mL/min. **Results** Fingerprints of 15 batches of Qigu Capsules were established and 16 common peaks were identified, 15 of which belonged to herbs. The similarity was more than 0.9. Eight chemical compounds were identified by comparing the reference substance with UFLC-ESI-MS/MS. Sixteen samples were classified into three groups based on cluster analysis. **Conclusion** The method can be used for the quality control of Qigu Capsules with good precision, accuracy, and reproducibility.

Key words: Qigu Capsules; HPLC; fingerprint; UFLC-ESI-MS/MS; cluster analysis; quality control

芪骨胶囊是上海名中医石印玉教授在长期的临床实践中摸索出来的经验方。该药由淫羊藿、肉苁蓉、制首乌、骨碎补、黄芪、石斛、菊花 7 味中药组成, 具有补肾壮骨的功效, 主要适用于中医辨证属于肝肾不足证型的原发性骨质疏松症^[1]。

目前芪骨胶囊的企业质量控制方法采用 TLC 法对成品中黄芪等药材进行定性鉴别, 采用 HPLC 法对方中淫羊藿苷进行定量测定, 但由 7 味药物组成的芪骨胶囊成分复杂, 仅以一两种有效成分不能从整体上反应其内在质量。本实验对芪骨胶囊开展 HPLC 指纹图谱研究, 并对指纹图谱中主

要特征峰进行化学指认以及组方中药来源的初步确定, 综合运用相似度评价、聚类分析等识别技术, 为制定全面而整体的芪骨胶囊质量控制方法提供实验依据。

1 仪器与材料

HPLC—20AT 高效液相色谱分析仪、UFLC—20A 高效液相色谱仪, 日本岛津公司; API 3200 三重四极杆串联质谱仪 (美国 AB 公司); KQ—250E 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 电子分析天平 (北京赛多利斯天平有限公司)。

柚皮苷 (批号 20120221, 质量分数 ≥ 98%)、

收稿日期: 2013-11-14

基金项目: 福建省科技厅对外合作重点项目 (2012I0004)

作者简介: 范兴 (1987—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药资源及品质评价。Tel: 15806020326 E-mail: yunshuiyuan0123@126.com

*通信作者 杨成梓 (1972—), 男, 副教授。Tel: 13600871781 E-mail: tiebaojin@163.com

松果菊苷(批号 20121125, 质量分数 $\geq 98\%$)、朝藿定 B(批号 20120928, 质量分数 $\geq 98\%$)、朝藿定 C(批号 20120618, 质量分数 $\geq 98\%$)、淫羊藿苷(批号 20120706, 质量分数 $\geq 98\%$), 均购自上海源叶生物科技有限公司; 15 批芪骨胶囊(批号 S1: 110101-1、S2: 110701、S3: 111101、S4: 120301、S5: 120401、S6: 120501、S7: 120503、S8: 120505、S9: 120701、S10: 121101、S11: 121201、S12: 130101、S13: 130102、S14: 130301、S15: 130302), 单味药以及阴性药均由厦门中药厂有限公司提供; 各单味药淫羊藿、肉苁蓉、制首乌、骨碎补、黄芪、石斛、菊花均经福建中医药大学药学院杨成梓副教授鉴定, 分别为小檗科淫羊藿属植物淫羊藿 *Epimedium brevicornum* Maxim. 的干燥叶、列当科肉苁蓉属植物肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Y. C. Ma 的干燥带鳞叶的肉质茎、蓼科何首乌属植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根的炮制加工品(符合《中国药典》2010 年版规定)、水龙骨科骨碎补属植物槲蕨 *Drynaria fortune* (Kunze) J. Sm. 的干燥根茎、豆科黄芪属植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge 的干燥根、兰科石斛属植物金钗石斛 *Dendrobium nobile* Lindl. 的干燥茎、菊科菊属植物菊 *Chrysanthemum morifolium* Ramat. 的干燥头状花序。

甲醇、乙腈为色谱纯, 水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Platisil-C₁₈ 柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 以甲醇-乙腈-水为流动相, 按表 1 程序进行梯度洗脱; 体积流量为 1 mL/min; 柱温为 30 $^{\circ}$ C; 检测波长为 270 nm; 进样量为 10 μ L。

2.2 质谱条件

离子源扫: ESI; 扫描方式: 正、负离子扫描; 减速电压(DP): 50 V; Q1 入口电压(EP): 10 V;

碰撞室入口电压(CEP): 10 V; 碰撞室出口电压(CXP): 2.0 V; 离子源电压(IS): 5 500 V; 碰撞电压(CAD): 8.0 V; 温度(TEM): 500 $^{\circ}$ C; 气帘气(CUR): 172.40 kPa; GS1: 344.80 kPa; GS2: 379.28 kPa; 碰撞离子强度 CE: 137.90 kPa。

2.3 对照品溶液的制备

取松果菊苷、柚皮苷、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇配成质量浓度分别为 310.73、62.99、37.78、86.33、97.59 μ g/mL 的混合对照品溶液, 过 0.45 μ m 微孔滤膜, 取续滤液作为混合对照品溶液, 即得。

2.4 供试品溶液的制备

取芪骨胶囊内容物约 0.55 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 30 mL 甲醇, 超声 30 min(50 $^{\circ}$ C, 250 W, 40 kHz), 放冷, 用甲醇补足减失的质量, 滤过, 取续滤液, 经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 备用。

2.5 单味药材与阴性供试液的制备

芪骨胶囊的各单味药材与阴性供试液的制备, 按芪骨胶囊的企业制备标准, 并按“2.4”项下的方法处理, 即得单味药材与阴性供试液。

2.6 精密度试验

精密称定芪骨胶囊内容物(批号 110101-1) 约 0.55 g, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下条件连续进样 6 次, 记录色谱图, 以淫羊藿苷为参照峰, 考察各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD。结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均 $< 0.12\%$, 相对峰面积的 RSD 均 $< 2.31\%$, 符合指纹图谱要求, 表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验

精密称定芪骨胶囊内容物(批号 110101-1) 约 0.55 g, 按“2.4”项下分别制备供试品 6 份, 按“2.1”项下条件进样分析, 以淫羊藿苷为参照峰, 结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均 $< 0.13\%$, 相对峰面积的 RSD 均 $< 3.65\%$, 符合指纹图谱要求, 表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验

精密称定芪骨胶囊内容物(批号 110101-1) 约 0.55 g, 按“2.4”项下制备供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样, 以淫羊藿苷为参照峰, 结果各峰相对保留时间的 RSD 均 $< 0.11\%$, 相对峰面积的 RSD 均 $< 2.59\%$, 符合指纹图谱技术要求, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

表 1 流动相梯度洗脱条件

Table 1 Gradient elution conditions of flow phase

t/min	甲醇 / 乙腈 / 水 /			t/min	甲醇 / 乙腈 / 水 /		
	%	%	%		%	%	%
0	4	1	95	47	17	26	57
10	11	7	82	57	25	34	41
33	13	19	68	67	50	33	17
37	13	22	65				

2.9 指纹图谱的建立与共有峰的确 定

分别制备 15 批芪骨胶囊供试品溶液，按“2.1”项色谱条件测定，记录色谱图。根据 15 批芪骨胶囊 HPLC 指纹图谱的检测结果，生成芪骨胶囊共有模式的对照指纹图谱。

分析 15 批芪骨胶囊 HPLC 色谱图，因为 16 号峰（淫羊藿苷）是淫羊藿的主要成分，也是其主要活性成分之一，且淫羊藿是复方的君药；淫羊藿

苷与相邻峰分离较好，其量较高且相对稳定，因此以 16 号峰（淫羊藿苷）为参照峰（S 峰），将各色谱峰保留时间和保留峰面积与同一图谱中 S 峰的保留时间和保留峰面积比值，即得到相对保留时间和相对峰面积，计算 15 批芪骨胶囊指纹图谱中各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积，确定芪骨胶囊指纹图谱中的 16 个色谱峰为其共有特征峰，见图 1。

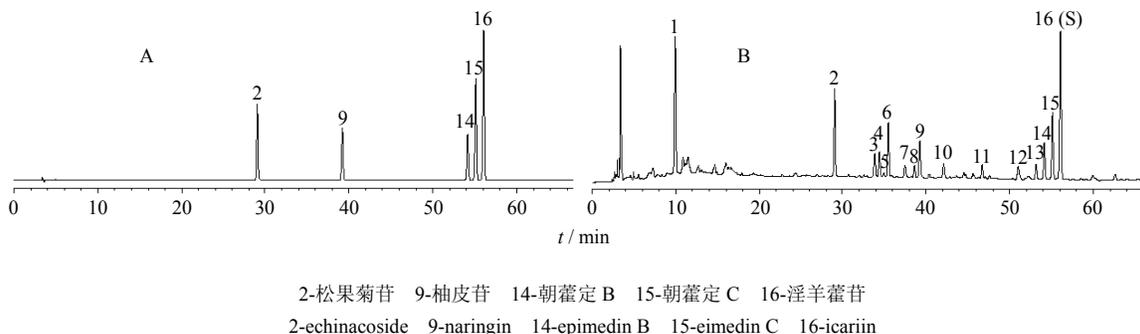


图 1 混合对照品 (A) 与对照指纹图谱 (B)

Fig. 1 Chromatogram of mixture reference substances (A) and reference fingerprint (B) of Qigu Capsules

2.10 指纹图谱的相似度评价

采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件（2004A 版）将 15 批不同批次芪骨胶囊指纹图谱数据导入，以第 15 批药材图谱作为参照谱进行指纹匹配，采用中位数法生成对照谱，匹配结果见图 2。得出 15 批芪骨胶囊的相似度计算结果，见表 2。从结果可以看出，相似度大于 0.9，表明 15 批胶囊的化学成分分布较稳定。

2.11 指纹图谱共有峰的归属

分别精密吸取单味药材及阴性缺味供试品溶液，注入液相色谱仪，采集色谱图。对保留时间一致且阴性样品图谱中未出现的色谱峰进行分析比较，并根据紫外光谱信息，确认指纹图谱共有峰的药材归属。通过对比分析，结果表明在 16 个共有峰中，峰 11、13、14、15、16 号峰来自淫羊藿药材；峰 2、5、8 来自肉苁蓉药材；峰 4、9 来自骨碎补药

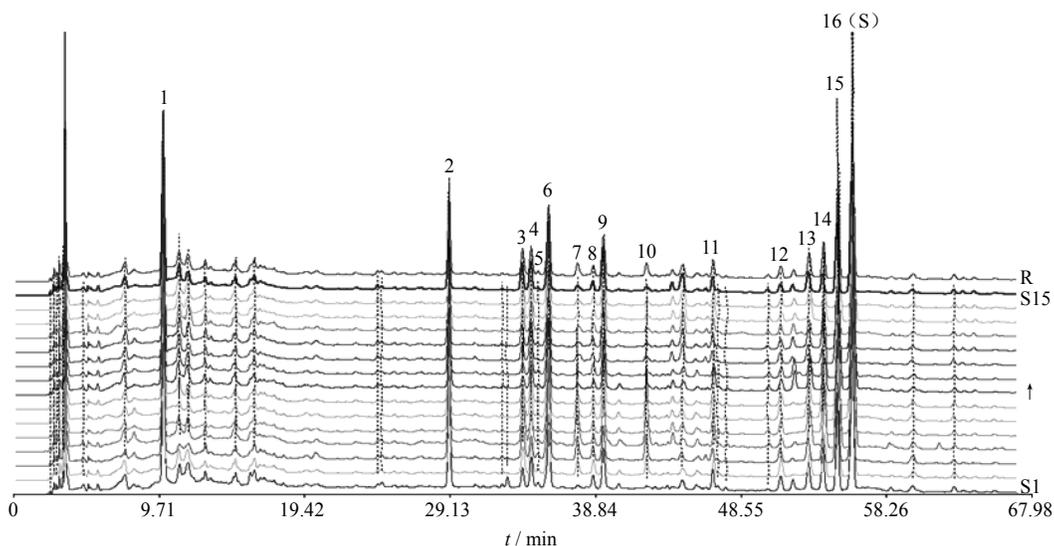


图 2 15 批芪骨胶囊的 HPLC 指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprints of 15 batches of Qigu Capsules

表 2 15 批芪骨胶囊的相似度结果

Table 2 Similarities of 15 batches of Qigu Capsules

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.971	S6	0.964	S11	0.992
S2	0.987	S7	0.996	S12	0.984
S3	0.95	S8	0.964	S13	0.993
S4	0.944	S9	0.967	S14	0.992
S5	0.967	S10	0.972	S15	0.992

材; 峰 3、12 来自黄芪药材; 峰 7、10 来自菊花药材; 峰 6 来自制首乌药材, 见图 3。

2.12 芪骨胶囊特征指纹峰的结构鉴定

2.12.1 对照品对照法 利用对照品对各峰的成分进行指认, 分别精密吸取供试品溶液、混合对照品溶液各 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 记录色谱图, 见图 1。通过各峰保留时间定位和化学成分的 PDA 光谱图信息对比, 对各峰进行指认。共指认了 5 个色谱峰, 分别为 2 号峰 (松果菊苷)、9 号峰 (柚皮苷)、14 号峰 (朝藿定 B)、15 号峰 (朝藿定 C)、16 号峰 (淫羊藿苷)。

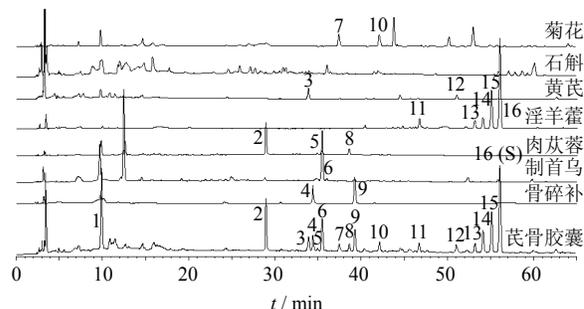


图 3 芪骨胶囊与各单味药 HPLC 图

Fig. 3 HPLC fingerprint of Qigu Capsules and its single herb medicine

2.12.2 UFLC-ESI-MS/MS 成分鉴别 为进一步阐明芪骨胶囊的化学组成, 采用 UFLC-ESI-MS/MS 技术对 HPLC 指纹图谱指认, 由于芪骨胶囊中的化学成分、结构差别较大, 故同时采用正、负离子模式进行扫描。通过质谱中分子离子峰和碎片离子峰分子量匹配, 结合紫外吸收光谱特征, 相关文献^[2-6]以及对照品对照, 鉴定了芪骨胶囊指纹图谱中 8 个色谱峰的化学成分, 结果见表 3。

表 3 芪骨胶囊指纹图谱化学成分质谱归属

Table 3 MS attribution of chemical components in HPLC fingerprint of Qigu Capsules

峰号	t / min	化合物	相对分子质量	准分子离子峰 [M-H] ⁻ / [M+H] ⁺	MS/MS (m/z)
2	29.06	松果菊苷	786	785.1	623.0、477.0
4	34.54	新北美圣草苷	596	597.0	451.5、435.1、289.0
5	34.99	毛蕊花糖苷	624	623.0	416.3、315.1
9	39.36	柚皮苷	580	581.1	527.1、419.3
13	53.09	朝藿定 A	838	839.0	531.1、369.1
14	54.05	朝藿定 B	808	809.3	531.4、369.2
15	55.02	朝藿定 C	822	823.4	531.1、369.1
16	55.99	淫羊藿苷	676	677.5	531.3、369.2

2.13 聚类分析

将峰面积数据标准化 (即对同一变量减去其均值, 再除以标准差, 以消除原始数据之间的量纲影响), 采用 SPSS 19.0 统计分析软件中的系统聚类法中的类间平均链锁法, 选取欧氏距离平方作为样品测度。利用此方法对 15 批芪骨胶囊进行系统聚类分析, 绘出树状图, 见图 4。由聚类结果可知: 15 批样品大体上分为 3 类, 批次 S1、S2 与 S5~S15 归为一类, 说明 13 个批次的样品均较接近, S3、S4 分别单独归为一类, 其中, S3 的 15 号峰比其他批次高, S4 的 3、7、10 号峰较高。而且 S3、S4 的相

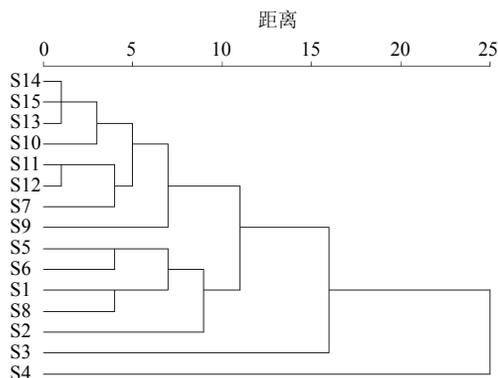


图 4 聚类分析树状图

Fig. 4 Dendrogram of cluster analysis

似度在 15 批次中相对较小,说明聚类和相似度分析结论基本一致,2 种方法得到了相互印证。

3 讨论

3.1 提取条件的优化

以 HPLC 图谱的出峰灵敏度和分离完整性为标准,通过对不同溶媒进行筛选,结果以甲醇溶液提取,效果较好。在提取方法上,对超声、回流与索氏提取方法作了平行比较,结果显示甲醇超声 30 min 的提取方法总峰面积较大,提取效率较高,最后选用甲醇超声 30 min 的提取方法。

3.2 色谱条件的优化

在流动相选择上,筛选了甲醇-乙腈与水、磷酸溶液、冰醋酸及甲酸溶液等组合,结果以甲醇-乙腈-水组合的梯度洗脱效果最佳。在检测波长选择方面关注了各药材主要有效成分,分别对 208、254、270、283、330 nm 进行筛选,确定检测波长 270 nm 比较适合,此时大部分色谱峰达到基线分离,各色谱峰的吸收较强。

本实验建立了芪骨胶囊的 HPLC 指纹图谱,通过相似度计算和聚类分析可知芪骨胶囊的批间稳定

性较高,故能够用来控制本品的质量,以保证不同批次产品质量的一致性,从而为芪骨胶囊制备工艺稳定性提供重要依据。

参考文献

- [1] 王和鸣,葛继荣,朱汉民,等. 芪骨胶囊治疗原发性骨质疏松症临床试验总结 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2010, 18(8): 12-15.
- [2] 岳春华,李顺祥. 从骨碎补中制备新北美圣草苷和柚皮苷对照品的研究 [J]. 中草药, 2008, 39(4): 529-531.
- [3] 刘孟华,刘海滨,苏薇薇,等. 从化州柚中提取的柚皮苷的杂质研究 [J]. 中药材, 2012, 35(1): 56-61.
- [4] 李丽,刘春明,刘志强,等. 肉苁蓉中苯乙醇苷类化合物的分离提取及电喷雾质谱研究 [J]. 质谱学报, 2006, 27(4): 232-236.
- [5] 王义明,张思巨,罗国安,等. 用 LC/ESI-MS/MS 研究肉苁蓉与其代用品中的苯乙醇苷类化合物 [J]. 药学学报, 2000, 35(11): 839-842.
- [6] 朱靖博,李丹凤,邱焕杰,等. HPLC/ESI-MS 分析淫羊藿黄酮苷类化合物 [J]. 大连工业大学学报, 2009, 28(5): 321-325.