

复方石韦片 HPLC 指纹图谱的建立及其在制剂过程中的应用

褚莉^{1,2}, 段树卿², 宋佳², 李云霞^{2*}

1. 承德医学院, 河北承德 067000

2. 颈复康药业集团有限公司, 河北承德 067000

摘要: 目的 建立复方石韦片的 HPLC 指纹图谱测定方法, 并应用于其制剂过程中的质量控制。方法 采用 HPLC 法, 使用 Agilent 5 TC C₁₈ (2) 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.2% 磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长为 235 nm, 柱温为 25 °C, 进样量为 10 μL。对 14 批不同批次的复方石韦片及 3 批复方石韦片中间体 (浸膏、颗粒) 样品进行测定。结果 建立了复方石韦片 HPLC 指纹图谱共有模式, 标定了 18 个共有峰, 指出其中 5 个色谱峰, 各批次间共有峰相对保留时间 RSD 均 < 0.3%, 批次间相似度 > 0.990。相同批次的复方石韦片中间体 (浸膏、颗粒) 及其成品间相似度均 > 0.990, 相关性良好。结论 建立的复方石韦片 HPLC 指纹图谱方法简便、有效、重复性好, 并可应用于其制剂制备工艺过程中的中间体的质量控制, 为从整体上控制评价复方石韦片的质量提供依据。

关键词: 复方石韦片; HPLC; 指纹图谱; 中间体; 相似度

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)02-0396-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.02.018

Establishment of HPLC fingerprint of Compound Shiwei Tablets and application of its preparation process

CHU Li^{1,2}, DUAN Shu-qing², SONG Jia², LI Yun-xia²

1. Chengde Medical College, Chengde 067000, China

2. Jingfukang Pharmaceutical Group Co., Ltd., Chengde 067000, China

Abstract: Objective To establish an HPLC fingerprint determination method of Compound Shiwei Tablets (CST), and apply it to the quality control during its preparation. **Methods** Agilent 5 TC C₁₈ (2) (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was used for HPLC with a gradient elution of acetonitrile-0.2% phosphoric acid in mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min. The wavelength was 235 nm, the column temperature was 25 °C, and the injection volume was 10 μL. A total of 14 batches of CST and three batches of CST intermediates (extracts and granules) were measured. **Results** A common pattern of HPLC fingerprints of CST was established, and 18 common peaks were demarcated and five of them were identified. The relative peak retention time RSD of each batch was < 0.3%, and the similarity between batches was > 0.990. The similarity between the same batch of CST intermediate and its preparation was > 0.990, and the correlation was good. **Conclusion** The established HPLC fingerprint of CST is simple, effective, and reproducible, and can be applied to the quality control of intermediates in the preparation process of the preparations, which provides a basis for the overall quality control of CST.

Key words: Compound Shiwei Tablets; HPLC; fingerprint; intermediate; similarity

复方石韦片 (Compound Shiwei Tablets, CST) 是由石韦、黄芪、苦参、篇蓄等组成的中药复方制剂, 方由《证治汇补》中的石韦散化裁而来^[1], 为国家中药保护品种。其质量标准收载于《中国药典》2015 年版, 具有清热燥湿、利尿通淋的功能, 用于

下焦湿热所致的热淋, 症见小便不利、尿频、尿急、尿痛、下肢浮肿; 用于急性肾小球肾炎、肾盂肾炎、膀胱炎、尿道炎^[2-3]。CST 以其疗效独特深受临床医生的信赖和广大患者的欢迎, 具有很好的市场前景。

CST 现行标准中, “含量测定”项下采用黄芪

收稿日期: 2018-09-17

作者简介: 褚莉 (1993—), 女, 2016 级硕士研究生在读, 研究方向为中药质量控制。Tel: 18842654330 E-mail: 1071092557@qq.com

*通信作者 李云霞, 女, 正高级工程师, 硕士生导师, 长期从事中药生产工艺技术及质量管理、质量标准研究。

Tel: (0314)2292066 E-mail: cdjfk-lyx@163.com

中的黄芪甲苷和苦参中的苦参碱进行含量测定以控制其质量。笔者查阅相关文献也多对 CST 及其相关制剂中的 1 种或 2 种成分进行定性或定量研究^[4-12]。CST 属于中药复方制剂, 具有化学成分复杂性和整体治疗性等特点。指纹图谱作为一种多指标综合评价的质量控制模式, 可以较全面地对中药复方制剂所含化学成分进行定性及定量分析, 更具有科学性和全面性^[13-21]。本实验旨建立 CST 的 HPLC 指纹图谱, 使其质控指标由对单一成分的含量测定上升到制剂整体的质量控制, 并将建立的方法应用于 CST 制剂工艺过程中的质量控制, 以初步研究 CST 中间体和成品之间的相似度及化学成分变化情况^[22-24], 这对 CST 生产过程全方位质量控制具有重要意义。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪-VWD 检测器、Agilent 1260 型高效液相色谱仪-DAD 检测器, 美国 Agilent 公司; MS204TS/02 型电子天平、XSE205DU 十万分之一电子分析天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; KQ-500DE 数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; Milli-Q 超纯水系统, 美国 Millipore 公司。

1.2 试剂

对照品绿原酸(批号 110753-201716, 质量分数 99.3%)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号 111920-201606, 质量分数 97.6%)、没食子酸(批号 0831-950, 质量分数 100%)、杨梅苷(批号 111860-201102, 质量分数 93.8%), 均购于中国食品药品检定研究院; 对照品毛蕊异黄酮(批号 151208, 质量分数 ≥ 98%) 购于成都普菲德生物技术有限公司; 乙腈、甲醇, 色谱纯, 美国 Mreda 公司; 甲醇, 分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 磷酸, 优级纯, 天津欧博凯化工有限公司; 水为 Milli Q 超纯水。

CST, 颈复康药业集团有限公司, 批号分别为 630286、630076、730381、730385、730389、730390、730391、730425、730428、830117、830118、830121、830122、830182, 分别编号为 S1~S14; CST 中间体(浸膏、颗粒), 颈复康药业集团有限公司, 批号分别为 730389、730390、730391; 石韦为水龙骨科植物有柄石韦 *Pyrrosia petiolosa* (Christ) Ching. 的干燥叶、黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根、苦参为豆科植物苦参 *Sophora*

flavescens Ait. 的干燥根、萹蓄为蓼科植物萹蓄 *Polygonum aviculare* L. 的干燥地上部分, 以上药材均由颈复康药业集团有限公司提供, 并由颈复康药业集团有限公司工程师、中药鉴别师商春丽鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent 5 TC C₁₈ (2) 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈(A)-0.2%磷酸水(B)溶液, 梯度洗脱: 0~30 min, 3%~11%乙腈; 30~45 min, 11%~16%乙腈; 45~90 min, 16%~30%乙腈; 温度 25 °C; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 235 nm; 进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 称取没食子酸、绿原酸、杨梅苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和毛蕊异黄酮对照品适量, 精密称定, 加甲醇分别配制成含没食子酸 73 μg/mL、绿原酸 176 μg/mL、杨梅苷 8.57 μg/mL、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 32 μg/mL 和毛蕊异黄酮 17 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品, 除薄膜衣研细, 取粉末约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 60% 甲醇 20 mL, 称定质量, 超声(500 W, 40 kHz)提取 50 min, 放至室温, 再称定质量, 用 60% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

2.2.3 各单味药材溶液的制备 取黄芪、石韦、苦参、萹蓄 4 味药材细粉, 分别按处方比例及制剂工艺制备, 精密称定质量, 置具塞锥形瓶中, 按“2.2.2”项下方法制备各单味药材供试品溶液。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 按 CST 处方中的药味比例及制备工艺过程, 分别制备缺黄芪、苦参、石韦和萹蓄的阴性样品, 按“2.2.2”项下方法制备各阴性对照样品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 取空白溶液(60% 甲醇), 按“2.1”项下的色谱条件进样, 结果在溶剂色谱图中未出现干扰样品检测的杂峰, 表明 60% 甲醇溶剂对 CST 样品检测无干扰。

2.3.2 精密度试验 取同一批次 CST(批号 730389), 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 计算各共有峰相对保留时间及相对峰面积, 结果各共有峰相对保

留时间的 RSD 值均 < 0.3%；相对峰面积的 RSD 值均 < 2.2%，表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验 取同一批次 CST（批号 730389），按“2.2.2”项下方法平行制备供试品溶液 6 份，按“2.1”项下色谱条件进样，计算各共有峰相对保留时间及相对峰面积，结果各共有峰相对保留时间的 RSD 值均 < 0.3%；相对峰面积的 RSD 值均 < 2.7%，表明方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 取同一批次 CST（批号 730389），按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件，分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 进样，计算各共有峰相对保留时间及相对峰面积，结果各共有峰相对保留时间的 RSD 值均 < 0.3%；相对峰面积的 RSD 值均 < 2.5%，表明供试品溶液在 12 h 内保持稳定。

2.4 CST 指纹图谱的建立与分析

2.4.1 指纹图谱的建立及相似度分析 取上述 14 批 CST，按“2.2.2”项下方法分别制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》（2012 年版）对测定结果进行评价，以 S7 为参考图谱，设定时间窗宽度为 0.1 min，选用多点校正法生成 CST 指纹图谱共有模式，采用中位数法得出对照指纹图谱（图 1），根据匹配结果共确定了 18 个共有峰，其中 7 号峰（绿原酸）的分离度及对称性良好且峰面积适中，故将其作为参照峰。对 14 批 CST 的指

纹图谱进行相似度计算，结果 S1~S14 样品的相似度分别为 0.998、0.996、0.998、0.997、0.998、0.999、0.999、0.999、0.997、0.998、0.999、0.999、0.999、0.998，结果表明 14 批 CST 的相似度均大于 0.990，相似度较高，说明 CST 成品质量稳定，建立的指纹图谱方法应用于其质量控制较可靠。

2.4.2 共有峰的归属 分别取供试品溶液、各阴性对照溶液及各单味药材溶液，按“2.1”项下色谱条件进行测定，记录色谱图，将其与成品色谱图中各色谱峰的相对保留时间及紫外吸收光谱进行比较，确定其共有峰的归属。结果显示（图 2），本研究建立的 CST 指纹图谱中 18 个共有峰均可在其药材中找到归属，其中 1、5、6、7、8、12、13、14 号色谱峰为石韦药材中的色谱峰，3、4、9、15、17 号峰为苦参药材中的色谱峰，10、16、18 号峰为黄芪药材中的色谱峰，2、11 号峰为篇蓄药材中的色谱峰。结果说明 CST 与其组方药材之间存在良好的相关性。

2.4.3 共有峰的指认 采用对照品对共有峰进行指认，经过对供试品和对照品色谱图相对保留时间及紫外吸收光谱 2 项指标的比对，确定了其中 5 个共有峰，分别为 2 号峰（没食子酸）、7 号峰（绿原酸）、10 号峰（毛蕊异黄酮葡萄糖苷）、11 号峰（杨梅苷）和 18 号峰（毛蕊异黄酮），结果见图 3。

2.5 CST 指纹图谱方法在其制剂过程中的应用

分别取相同批号的 CST 颗粒、浸膏和成品 3 批，

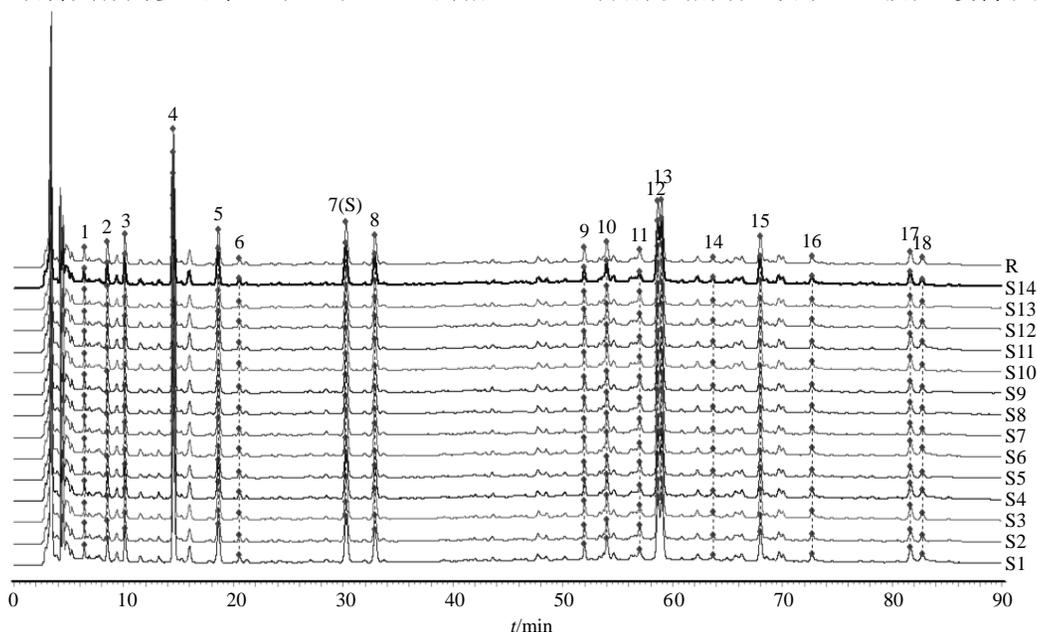


图 1 14 批 CST 指纹图谱及其对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 Fingerprint of 14 batches of CST and its reference fingerprint (R)

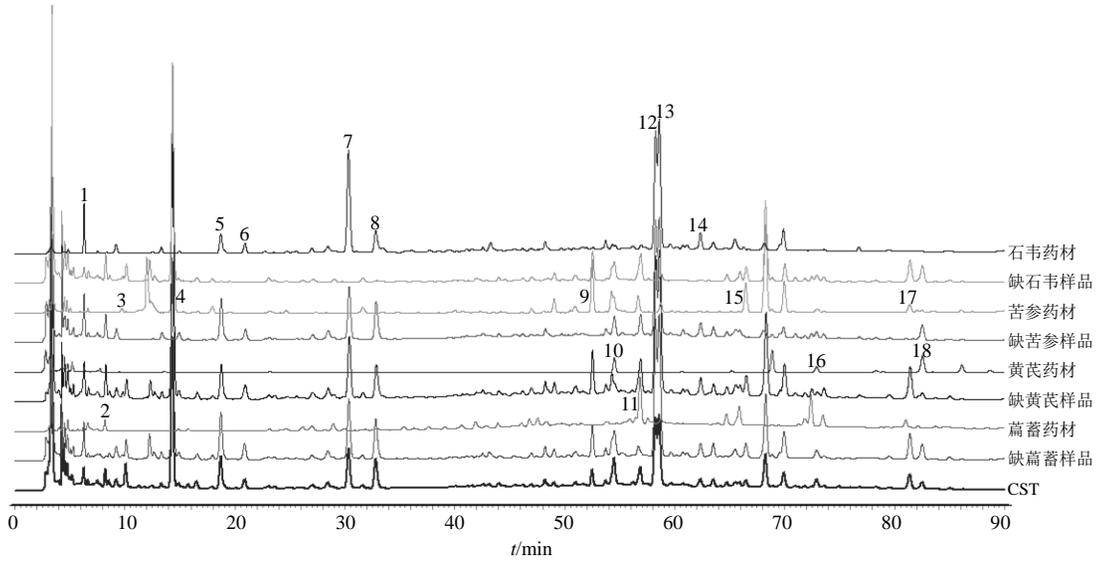
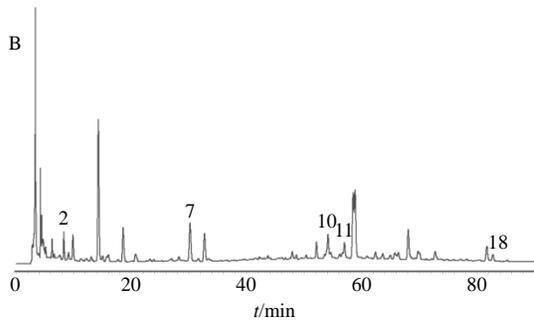
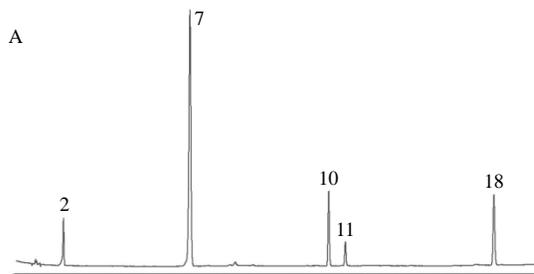


图 2 CST 指纹图谱中共有峰归属

Fig. 2 Common peak attribution map in fingerprint of CST

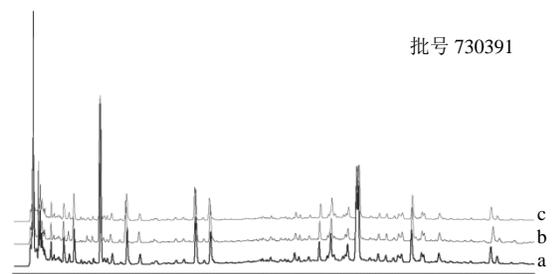
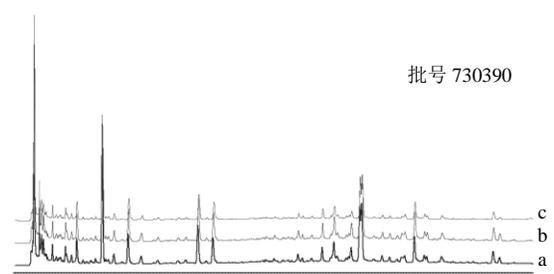
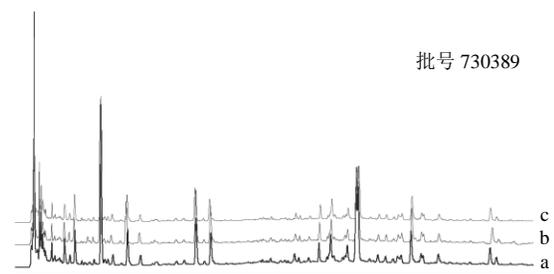


2-没食子酸 7-绿原酸 10-毛蕊异黄酮葡萄糖苷 11-杨梅苷 18-毛蕊异黄酮
 2-gallic acid 7-chlorogenic acid 10-calycosin-7-glucoside 11-myricitrin 18-calycosin

图 3 混合对照品 (A) 及供试品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 3 HPLC of mixed reference substances (A) and test sample (B)

按“2.2.2”项下方法分别制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图(图4),结果建立的 CST 指纹图谱中的共有峰在其颗粒及浸膏的色谱图中均有体现,将各批次 CST 颗粒、浸膏及成品色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 年版)对其进行相似度评价,结果见表 1,



a-成品 b-颗粒 c-浸膏
 a-CST b-granules c-extracts

图 4 730389、730390、730391 批 CST 成品-颗粒-浸膏指纹图谱

Fig. 4 Batch No. 730389, 730390, and 730391 of CST finished product-granules-extracts fingerprint

表 1 CST 成品-颗粒-浸膏指纹图谱相似度

Table 1 Similarity of CST finished product-granules-extracts fingerprint

批次	相似度		
	浸膏	颗粒	成品
730389	0.998	0.998	0.999
730390	0.998	0.997	0.999
730391	0.997	0.996	0.999

3 批 CST 颗粒、浸膏及成品指纹图谱间的相似度均大于 0.990, 相似度较高, 说明 CST 制备工艺过程稳定, 各主要成分由浸膏、颗粒到成品相关性良好。

3 讨论

3.1 供试品溶液制备条件的优化

3.1.1 提取溶剂考察 本研究考察了不同提取溶剂(甲醇、80%甲醇、60%甲醇、40%甲醇、乙醇、80%乙醇、60%乙醇、40%乙醇)对 CST 样品进行处理, 比较其色谱图, 结果显示使用 60% 甲醇作为提取溶剂, 各色谱峰分离效果好, 峰面积大, 提取较完全。

3.1.2 提取方法考察 本研究考察了超声和加热回流 2 种提取方法, 结果 2 种方法的色谱图峰面积及数目无明显差异, 考虑到超声法操作较简便, 因此选用超声法。

3.1.3 提取时间考察 本研究考察了不同超声时间(30、40、50、60 min), 结果显示超声 50 min 时与 60 min 各共有峰峰面积无明显差别, 且均高于超声 30、40 min, 说明超声 50 min 可提取完全, 因此超声时间定为 50 min。

3.2 色谱条件的优化

3.2.1 色谱柱的选择 分别考察了 Agilent 5 TC C₁₈ (2) (250 mm×4.6 mm, 5 μm), Agilent 5-HC C₁₈ (2) (250 mm×4.6 mm, 5 μm), Intersil ODS-3 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 3 种不同型号色谱柱, 结果表明采用 Agilent 5 TC C₁₈ (2) 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)时, 综合考虑指纹图谱的色谱峰峰形及分离度等方面均优于其他型号色谱柱, 故确定该色谱柱进行指纹图谱分析。

3.2.2 检测波长的选择 应用 DAD 检测器对供试样品进行 190~400 nm 的全波长扫描, 选取 225、235、265、285、300、320 nm 等处的检测波长进行比较分析, 结果表明在 235 nm 波长下所反映的色谱峰信息较多, 各峰分离较好、峰高比例协调且基线平稳, 故将检测波长设定为 235 nm。

3.3 辅料干扰考察

CST 中的辅料成分为淀粉, 为了排除淀粉对色谱图的影响, 将其按供试品溶液制备方法 & 色谱条件进行制备并测定, 结果色谱图中未观察到干扰样品检测的杂峰, 说明辅料淀粉对 CST 样品指纹图谱的检测无干扰。

3.4 制剂过程质量控制的应用

将 CST 中间体(颗粒、浸膏)及对应成品的指纹图谱进行比较分析, 其中共有峰一致, 且同批次中间体和成品的色谱图相似度较好, 说明将建立 CST 指纹图谱方法应用于其制剂过程的质量控制稳定、可行。但由于实验批次较少, 得出结论代表性不足, 因此需要收集更多样品积累实验数据, 以深入探讨 CST 制剂过程的整体质量控制, 从而更科学、更有效地全面控制 CST 的质量。

参考文献

- [1] 李云章. 山庄牌复方石韦片 [J]. 中草药, 1997, 28(3): 190.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] 吴金英, 贾占红, 孙建宁, 等. 复方石韦片主要药效的实验研究 [J]. 浙江实用医学, 2005, 10(5): 311-313.
- [4] 李忠思, 李云霞, 商春丽. 复方石韦片的质量控制 [J]. 现代药物与临床, 2010, 25(3): 220-223.
- [5] 李代晓, 吕英超, 李云霞. 高效液相色谱蒸发光散射检测器测定复方石韦片中黄芪甲苷含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10): 93-95.
- [6] 刘振华, 李忠思, 商春丽, 等. 高效液相色谱法测定复方石韦薄膜衣片中苦参碱的含量 [J]. 承德医学院学报, 2010, 27(2): 123-125.
- [7] 江维克, 王 丽. HPLC 同时测定复方石韦片和苦参药材中苦参碱和氧化苦参碱的含量 [J]. 中成药, 2005, 27(1): 49-52.
- [8] 刘丽欣, 王 岳, 张敬晶. HPLC 法测定复方石韦片中绿原酸的含量 [J]. 现代中西医结合杂志, 2008, 17(26): 4130-4131.
- [9] 杨志欣, 王祺茹, 李 霞, 等. RP-HPLC-DAD 同时测定复方石韦胶囊中 4 个黄酮成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37(3): 427-431.
- [10] 施涵强. HPLC 法测定复方石韦胶囊中绿原酸的含量 [J]. 海峡药学, 2013, 25(6): 35-36.
- [11] 兰 炜. 复方石韦片中绿原酸在大鼠血浆中的测定及药代动力学研究 [J]. 海峡药学, 2011, 23(10): 40-42.
- [12] 苏静州, 刘明言, 董海荣. HPLC 法测定复方石韦片中苦参碱和氧化苦参碱的含量 [J]. 中草药, 2005, 36(3): 383-384.
- [13] 刘东方, 赵丽娜, 李银峰, 等. 中药指纹图谱技术的研

- 究进展及应用 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 4085-4094.
- [14] 李 莉, 李德坤, 鞠爱春. 注射用五味子提取物指纹图谱研究 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(3): 475-480.
- [15] Chen F F, Qi H Y, Shi Y P. Fingerprint analysis of *Codonopsis Radix* by HPLC coupled with chemometrics analysis [J]. *Chin Herb Med*, 2013, 5(4): 307-312.
- [16] 林 夏, 李 淼, 崔培超, 等. 基于小粒径色谱柱的哮喘颗粒 HPLC 指纹图谱研究及多成分快速测定 [J]. 中草药, 2017, 48(22): 4675-4681.
- [17] 吕志祥. 中药指纹图谱的研究进展 [J]. 求医问药 (下半月), 2013, 11(3): 175-176.
- [18] 聂 燕, 汪 滢, 赵 璐, 等. 中药及其复方指纹图谱的研究新进展 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(12): 3110-3112.
- [19] 胡惠君, 林龙飞, 刘宇灵, 等. 血栓心脉宁片 UPLC-PDA 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2017, 48(20): 4268-4274.
- [20] 秦建平, 吴建雄, 郎 悦, 等. 痛宁凝胶的 HPLC-MS 指纹图谱研究 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(4): 427-430.
- [21] 余一鸣, 胡永慧, 韩立云, 等. 中药质量控制的研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(12): 2557-2563.
- [22] 廖春玲, 吴燕红, 许 妍. 抗宫炎片指纹图谱在工艺控制中的应用 [J]. 江西中医药, 2018, 49(1): 71-74.
- [23] 赵 静, 何倩灵, 谭 琴, 等. 基于木蝴蝶药材特征图谱研究其主要成分在芪贞慢咽宁颗粒工艺过程中的含量变化 [J]. 中药材, 2017, 40(7): 1665-1669.
- [24] 佟志军, 魏晓雨, 王美慧, 等. 五味子糖浆原药材、中间体及成品的 HPLC 指纹图谱相关性研究 [J]. 中草药, 2016, 47(17): 3032-3038.