

葛花配方颗粒的UPLC指纹图谱研究^Δ

刘梦云^{1*}, 江洁怡², 毕晓黎^{1,2#}, 李素梅², 李养学² (1.广州中医药大学研究生院, 广州 510405; 2.广东省中医药工程技术研究院/广东省中医药研究开发重点实验室/中药配方颗粒生产关键技术重点实验室, 广州 510095)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)21-2978-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.21.27

摘要 目的:建立葛花配方颗粒的超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱。方法:采用UPLC法。色谱柱为Zorbax Eclipse XDB-C₁₈, 流动相为乙腈-水(梯度洗脱), 流速为0.5 mL/min, 检测波长为264 nm, 柱温为25 ℃, 进样体积为1 μL。以鸢尾苷元为参照物, 测定10批葛花配方颗粒的UPLC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:10批葛花配方颗粒的UPLC图谱有14个共有峰, 相似度均>0.90。经验证, 10批样品UPLC图谱与对照指纹图谱具有较好的一致性。结论:该研究所建UPLC指纹图谱可为葛花配方颗粒的鉴别和质量评价提供参考。

关键词 葛花配方颗粒; 超高效液相色谱法; 指纹图谱; 鸢尾苷元

Study on UPLC Fingerprint of Gehua Formula Granules

LIU Mengyun¹, JIANG Jieyi², BI Xiaoli^{1,2}, LI Sumei², LI Yangxue² (1.School of Graduate, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China; 2.Guangdong Engineering Technology Research Institute of TCM/Guangdong Key Laboratory of TCM Research and Development/Key Laboratory of Key Production Technology for TCM Formula Granule, Guangzhou 510095, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish UPLC fingerprint of Gehua formula granules. METHODS: UPLC method were adopted. The determination was performed on Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-water at the flow rate of 0.5 mL/min. The detection wavelength was set at 264 nm, column temperature was 25 ℃, and the sample size was 1 μL. Using tectorigenin as reference substance, UPLC chromatograms of 10 batches of Gehua formula granules were determined. The common peak identification and similarity evaluation were conducted by *TCM Chromatogram Fingerprint Similarity Evaluation System* (2004 A edition). RESULTS: 14 common peaks were identified in UPLC chromatograms of 10 batches of Gehua formula granules and similarities were all higher than 0.90. UPLC chromatograms of 10 batches of samples were in good agreement with control fingerprint. CONCLUSIONS: Established UPLC fingerprint can provide reference for identification and quality evaluation of Gehua formula granules.

KEYWORDS Gehua formula granules; UPLC; Fingerprint; Tectorigenin

葛花为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 或甘葛藤 *P. thomsonii* Benth. 的干燥花, 别名葛条花, 始载于《神农本草经》。现代中医认为, 葛花味甘、性凉、归脾胃经, 具有解酒醒脾、解肌退热、生津止渴、上泻治痢之功效^[1-2]。葛花配方颗粒是由葛花饮片经提取、浓缩、

干燥、制粒等现代制备工艺方法制成的一种新型制剂, 具有免煎易服、易储存、携带方便等优点, 但同时也失去了饮片原有的生物形态特征^[3]。因此, 只凭借单一指标成分已无法说明中药多组分、多靶点协同作用的特点, 而且也无法进行饮片真伪定性的鉴别和质量优劣的评

active compound in nonenzymatic browning. 1. Formation of browning active degradation products[J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(14): 3494-3500.
[8] 郭志辉, 韩丽, 杨明, 等. 中药多糖定量测定方法的探讨[J]. *中成药*, 2014, 36(10): 2172-2176.

[9] 王艳, 茹仙古丽·哈斯木, 韩艳春, 等. 苯酚-硫酸法测定维吾尔药核桃分心木多糖的含量[J]. *亚太传统医药*, 2012, 8(2): 35-37.
[10] 王文成. 茶多糖含量测定的干扰因素分析[J]. *粮食科技与经济*, 2011, 36(4): 43-44, 47.
[11] 于孟琦, 孙磊, 乔善义. 牡丹皮多糖的含量测定[J]. *国际药学研究杂志*, 2010, 37(2): 130-132.

Δ 基金项目: 广东省省级科技计划项目(No. 2015B070701010)
* 硕士研究生。研究方向: 中药制剂分析。E-mail: liumengyu n218@163.com

通信作者: 主任中药师, 硕士生导师, 博士后。研究方向: 中药质量评价。电话: 020-83501292。E-mail: 2335128654@qq.com

(收稿日期: 2016-07-31 修回日期: 2017-06-15)
(编辑: 周 箐)

价。中药指纹图谱技术是一种综合性的、量化的鉴定技术,它具有整体性、系统性、稳定性等特点,能较为全面地反映中药饮片或中药制剂的内在整体质量,而今已广泛应用于中药质量的评价。

目前,对葛花饮片的质量控制方面研究较多的是采用高效液相色谱法(HPLC)测定黄酮类化合物的含量等^[4-5],笔者尚未见对葛花配方颗粒质量进行整体性评价研究的文献报道。与HPLC法比较,超高效液相色谱法(UPLC)是一种具有分析时间短、分离效果好、灵敏度和分辨率较高以及试剂消耗少等优点的液相色谱法^[6-9]。本研究采用UPLC法建立了葛花配方颗粒的指纹图谱分析方法,对10批葛花配方颗粒进行研究并得出其指纹图谱共有模式,旨在为快速、有效地评价葛花配方颗粒的整体质量提供科学分析方法;同时,也为葛花配方颗粒临床用药安全提供依据。

1 材料

1.1 仪器

1290型UPLC仪,包括四元梯度泵、二极管阵列检测器(DAD)、在线脱气机、柱温箱和自动进样器(美国Agilent公司);KQ5200DE型数控超声波清洗器(昆山超声波仪器有限公司,功率:250 W,频率:40 kHz);XS205DU型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司)。

1.2 药品与试剂

葛花配方颗粒[广东佛山一方制药有限公司,批号:1506110、1504711、1504710、1505032、1504605、1504022、1505013、1505020、1505013、1506015(S1~S10),规格:2.0 g/袋];鸢尾苷对照品(批号:S-026-150421,纯度:>98%)、鸢尾苷元对照品(批号:S-027-150421,纯度:>98%)均购自成都瑞芬思生物科技有限公司;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Zorbax Eclipse XDB-C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm);流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~4.5 min, 0→10% A; 4.5~6.0 min, 10%→20% A; 6.0~7.5 min, 20%→25% A; 7.5~9.0 min, 25%→30% A; 9.0~12 min, 30%→40% A);流速:0.5 mL/min;检测波长:264 nm;柱温:25 ℃;进样体积:1 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取鸢尾苷对照品2.39 mg、鸢尾苷元对照品2.48 mg,置于同一50 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容,制成鸢尾苷、鸢尾苷元质量浓度分别为47.8、49.6 μg/mL的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密称取样品约1.0 g,精密加50%甲醇溶液50 mL,称定质量,超声处理30 min,取出,放冷,再次称定质量,用50%甲醇溶液补足减失的质量,摇匀,经0.22 μm的微孔滤膜滤过,取滤液,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度的试验 取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:1506110)适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,以鸢尾苷元峰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,14个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD<3.0%(n=6),表明方法精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:1506110)适量,分别于室温下放置0、4、8、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,以鸢尾苷元峰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,14个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD<3.0%(n=5),表明供试品溶液室温放置12 h内基本稳定。

2.3.3 重复性试验 精密称取同一批样品(批号:1506110)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,以鸢尾苷元峰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,14个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD<3.0%,表明本方法重复性良好。

2.4 UPLC指纹图谱的生成及共有峰的指认

2.4.1 UPLC指纹图谱的生成 取10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10批样品的UPLC图谱进行分析,得UPLC指纹图谱,详见图1、图2。

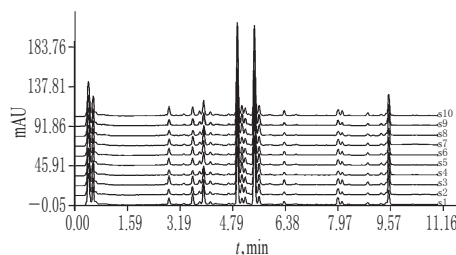


图1 10批样品UPLC叠加指纹图谱

Fig 1 UPLC superposed fingerprints of 10 batches of samples

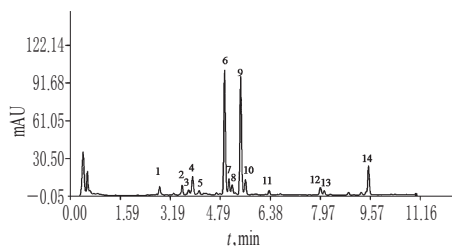


图2 样品UPLC对照指纹图谱

Fig 2 UPLC control chromatograms of samples

2.4.2 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10批样品的UPLC图谱进行比较分析。结果,10批样品与对照指纹

图谱的相似度分别为0.983、0.998、0.999、0.997、1.000、0.997、0.995、0.999、1.000、0.999。其中,9号峰为鸢尾苷,14号峰为鸢尾苷元。本试验以14号(鸢尾苷元)峰为对照峰确定了葛花配方颗粒样品的14个指纹共有峰,并通过相似度计算软件得到10批葛花配方颗粒的对照图谱及各批样品与对照图谱之间的相似度,结果相似度均>0.9,表明各批葛花配方颗粒样品的色谱峰整体上基本一致、相关性良好。各共有峰的相对保留时间和相对峰面积见表1、表2。

表1 10批样品UPLC图谱共有峰的相对保留时间
Tab 1 Relative retention time of common peaks for UPLC fingerprints of 10 batches of samples

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.299 4	0.299 6	0.298 9	0.299 6	0.299 7	0.298 9	0.299 4	0.300 1	0.299 9	0.300 1
2	0.374 9	0.375 1	0.374 1	0.375 0	0.374 6	0.374 4	0.374 5	0.375 5	0.375 8	0.375 5
3	0.397 0	0.397 5	0.396 6	0.397 2	0.397 1	0.397 0	0.397 0	0.397 8	0.397 9	0.397 7
4	0.409 9	0.410 3	0.409 5	0.410 0	0.410 1	0.409 9	0.409 9	0.410 6	0.410 6	0.410 6
5	0.431 6	0.431 8	0.431 1	0.431 5	0.431 6	0.431 5	0.431 5	0.432 1	0.432 2	0.432 3
6	0.517 5	0.517 9	0.517 3	0.517 4	0.517 3	0.517 3	0.517 7	0.517 5	0.517 5	0.517 8
7	0.531 6	0.532 2	0.531 9	0.531 9	0.531 8	0.531 8	0.532 0	0.531 9	0.532 0	0.532 2
8	0.542 6	0.542 9	0.542 7	0.542 8	0.542 6	0.542 6	0.542 8	0.542 8	0.542 9	0.543 0
9	0.571 5	0.571 8	0.571 7	0.572 0	0.571 7	0.571 6	0.571 8	0.571 6	0.572 0	0.572 0
10	0.586 8	0.586 9	0.586 8	0.587 0	0.586 8	0.586 8	0.586 8	0.586 8	0.587 2	0.587 0
11	0.666 9	0.666 8	0.666 6	0.666 9	0.666 8	0.666 8	0.666 9	0.667 0	0.667 1	0.667 0
12	0.838 6	0.838 2	0.838 5	0.838 8	0.838 7	0.838 5	0.838 6	0.838 9	0.838 8	0.838 6
13	0.851 5	0.851 2	0.851 5	0.851 6	0.851 8	0.851 4	0.851 3	0.851 7	0.851 5	0.851 3
14	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

表2 10批样品UPLC图谱共有峰的相对峰面积
Tab 2 Relative peak area of common peaks for UPLC fingerprints of 10 batches of samples

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.484 5	0.446 9	0.294 5	0.492 2	0.240 2	0.338 8	0.441 3	0.399 9	0.282 9	0.320 1
2	0.330 0	0.652 4	0.391 5	0.385 0	0.191 3	0.281 2	0.415 9	0.465 0	0.225 5	0.296 0
3	0.236 2	0.179 2	0.162 7	0.208 9	0.155 6	0.166 7	0.179 2	0.166 7	0.159 8	0.160 3
4	0.651 7	1.179 3	0.723 6	0.676 2	0.360 4	0.510 9	0.751 2	0.842 8	0.423 3	0.547 9
5	0.199 6	0.172 1	0.141 1	0.162 0	0.119 1	0.129 3	0.147 1	0.147 9	0.119 3	0.126 0
6	4.164 1	3.641 0	3.825 2	4.167 8	3.930 3	3.794 2	3.695 9	3.652 2	3.894 2	3.835 1
7	0.442 3	0.372 3	0.455 0	0.398 2	0.489 2	0.430 6	0.363 1	0.373 3	0.476 0	0.452 0
8	0.279 6	0.483 8	0.312 4	0.282 6	0.214 4	0.243 3	0.294 0	0.321 5	0.226 8	0.255 4
9	4.290 7	4.420 8	4.020 7	4.194 0	3.602 2	3.700 8	3.946 5	4.048 5	3.662 8	3.795 9
10	0.473 1	0.531 2	0.544 9	0.481 2	0.498 0	0.480 4	0.472 0	0.500 0	0.503 7	0.505 7
11	0.218 3	0.187 4	0.120 9	0.233 7	0.114 1	0.150 1	0.205 3	0.191 1	0.122 3	0.139 5
12	0.339 2	0.507 7	0.337 3	0.319 2	0.198 7	0.260 0	0.348 6	0.383 5	0.226 7	0.269 6
13	0.236 8	0.188 9	0.120 3	0.208 2	0.102 2	0.133 1	0.177 4	0.164 0	0.110 0	0.122 2
14	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

3 讨论

3.1 供试品溶剂的选择

结合葛花药材中所含的化学成分,本研究分别以70%乙醇溶液、乙醇、甲醇、50%甲醇溶液为溶剂进行提取,结果以50%甲醇溶液为溶剂所得的色谱峰峰形较好、分离度适中,所得的色谱能最大限度地反映葛花配

方颗粒的特征。

3.2 检测波长的选择

本研究采用二极管阵列检测器对指纹图谱进行全波长的扫描,并结合三维色谱图综合考虑了不同波长下色谱峰的分高度、数目、基线等因素,最后选用色谱峰信息较为丰富的264 nm波长作为检测波长。

3.3 流动相条件的优化

本研究分别考察了乙腈-水、甲醇-水流动相系统及其不同比例下的色谱行为,结果以乙腈-水流动相系统进行梯度洗脱,所得的色谱峰峰形较好、基线较平稳。

3.4 检测方法的优化

本试验首先通过HPLC仪对葛花配方颗粒的色谱条件进行摸索,结果发现分析时间为40 min左右。为了缩短分析时间,后期采用UPLC法对其色谱条件进行优化并建立了10批葛花配方颗粒指纹图谱共有模式,结果分析时间缩短至10 min内,大大提高了工作效率,同时节约了试剂、降低了成本。

综上所述,本研究所建UPLC指纹图谱可为葛花配方颗粒的鉴别和质量评价提供参考。

参考文献

- [1] 广东省食品药品监督管理局.广东省中药材标准:第一册[S].广州:广东科技出版社,2004:186.
- [2] 孙洋.葛花药理作用与临床应用研究[J].亚太传统医药,2014,10(8):52-53.
- [3] 孙冬梅,董玉娟,江洁怡,等.百部配方颗粒的高效液相色谱指纹图谱研究[J].时珍国医国药,2014,25(9):2158-2160.
- [4] 曾超,陆东,段伟昌,等.肉桂配方颗粒的HPLC指纹图谱研究[J].中国药房,2014,25(7):635-637.
- [5] 王金凤,魏颖,王芳,等.超高效液相色谱串联质谱法检测葛花中异黄酮[J].中成药,2014,36(10):2125-2126.
- [6] 毕晓黎,胥爱丽,李养学.三七配方颗粒的HPLC指纹图谱的研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(9):54-57.
- [7] 孙冬梅,董玉娟,江洁怡,等.白花蛇舌草配方颗粒的HPLC指纹图谱研究[J].广东药学院学报,2014,30(1):52-56.
- [8] 黄月纯,魏刚,刘翠玲,等.白芍HPLC特征指纹图谱的稳定性考察[J].中药新药与临床药理,2010,21(3):280-284.
- [9] 薛乾鑫,王晖,武拉斌,等.法半夏配方颗粒的高效液相色谱指纹图谱研究[J].中南药学,2016,14(2):170-174.

(收稿日期:2016-08-09 修回日期:2016-10-11)

(编辑:张 静)