

33(1): 100-102.

[7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 66-67, 72, 265, 338-339.

[8] 康 凯, 窦德强, 康廷国, 等. 牛蒡不同部位、牛蒡子不同产地中牛蒡苷和牛蒡苷元含量比较及指纹图谱分析[J]. 中国现代中药, 2009, 11(4): 23-26, 37.

[9] 朱汀滢, 丛海建, 赵 婷, 等. 牛蒡子中牛蒡苷测定方法的优化[J]. 中成药, 2016, 38(4): 846-850.

[10] 吴文玲, 陈佳佳, 刘守金, 等. HPLC 同时测定前胡中 3 种香豆素成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(9):

1121-1123.

[11] 赵万晴, 戚继红. 高效液相色谱法同时测定止咳片中白花前胡甲素和白花前胡乙素含量[J]. 中国药业, 2016, 25(21): 60-63.

[12] 周 敏. HPLC 法同时测定散风宁嗽糖浆中 7 种成分[J]. 中成药, 2017, 39(11): 2301-2304.

[13] 饶君凤, 占小珺. 高效液相色谱法测定 3 种不同产地五味子中五味子醇甲含量[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(10): 2441-2442.

[14] 黄萌萌, 陈 彦, 刘聪燕, 等. 排石颗粒中 5 种指标成分和总黄酮的测定[J]. 中成药, 2017, 39(1): 85-89.

六味葛蓝降脂片 HPLC 指纹图谱建立及 5 种成分测定

周雅琪, 蒋 林*, 魏博伟, 李晓梅, 李芳婵, 随家宁, 郭勇秀
(广西中医药大学药学院, 广西南宁 530001)

摘要: **目的** 建立六味葛蓝降脂片(火麻仁、决明子、葛根等) HPLC 指纹图谱, 并测定葛根素、大豆苷、大豆苷元、橙黄决明素、大黄酚的含有量。**方法** 该药物甲醇提取液的分析采用 Phenomenex Gemini C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.1% 磷酸, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 280 nm。**结果** 10 批样品中有 12 个共有峰, 相似度大于 0.997。5 种成分在各自范围内线性关系良好 ($r>0.999\ 50$), 平均加样回收率 96.0%~102.6%, RSD 0.54%~1.7%。**结论** 该方法简便准确, 可用于六味葛蓝降脂片的质量控制。
关键词: 六味葛蓝降脂片; 指纹图谱; 葛根素; 大豆苷; 大豆苷元; 橙黄决明素; 大黄酚; HPLC
中图分类号: R927.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2019)07-1510-05
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.07.007

Establishment of HPLC fingerprints of Liuwei Gelan Jiangzhi Tablets and determination of five constituents

ZHOU Ya-qi, JIANG Lin*, WEI Bo-wei, LI Xiao-mei, LI Fang-chan, SUI Jia-ning, GUO Yong-xiu
(College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish the HPLC fingerprints of Liuwei Gelan Jiangzhi Tablets (*Cannabis Fructus*, *Cassiae Semen*, *Puerariae lobatae Radix*, etc.) and to determine the contents of puerarin, daidzin, daidzein, auranthio-obtusin, chrysophanol. **METHODS** The analysis of methanol extract of this drug was performed on a 30 ℃ thermostatic Phenomenex Gemini C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.1% phosphoric acid flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 280 nm. **RESULTS** There were twelve common peaks in the fingerprints of ten batches of samples with the similarities of more than 0.997. Five constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r>$

收稿日期: 2018-10-11
基金项目: 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 14124004-2-7); 广西技术创新项目(桂工信科技[2014] 852); 南宁市青秀区科学研究与技术开发计划项目(2015S15)
作者简介: 周雅琪(1993—), 女, 硕士生, 从事药品及保健食品的新产品研发。Tel: 18947876780, E-mail: 371737143@qq.com
* **通信作者:** 蒋 林(1965—), 男, 教授级高级工程师, 从事药品及保健食品的新产品研发。Tel: 18677155109, E-mail: 2547138773@qq.com

0.999 50), whose average recoveries were 96.0%–102.6% with the RSDs of 0.54%–1.7%. **CONCLUSION** This simple and accurate method can be used for the quality control of Liuwei Gelan Jiangzhi Tablets. **KEY WORDS:** Liuwei Gelan Jiangzhi Tablets; fingerprints; puerarin; daidzin; daidzein; aurantio-obtusin; chrysophanol; HPLC

高脂血症为临床上的多发病及常见病,是引发脂肪肝、心脑血管疾病的重要病因之一^[1],中医药在防治该疾病上具有独特优势,可多靶点、多环节综合降脂,而且毒副作用小,相关中药或保健食品市场前景良好^[2-8]。

六味葛蓝降脂片是由广西中医药大学制药厂拟开发的具有辅助降血脂功效的保健食品,由绞股蓝、火麻仁、决明子、葛根、沙棘、荷叶 6 味药食两用药材配伍而成,通过扶正祛邪、补中益气来调节机体代谢机能,从而达到降血脂作用^[9-10]。方中葛根和决明子发挥主要作用,前者所含异黄酮是重要药效物质^[11],葛根素、大豆苷、大豆苷元等^[12]具有扩张冠状动脉血管、增加冠状动脉血流量作用,同时可降血脂^[13-14];后者具有降血脂、降血压等疗效,可抑制血清胆固醇,以降血脂效果更显著^[15-16],其主要有效成分为蒽醌^[17],代表性成分有橙黄决明素、大黄酚,为泻下、降血脂作用的主要成分^[18-19]。

本实验建立六味葛蓝降脂片 HPLC 指纹图谱,并测定其中葛根素、大豆苷、大豆苷元、橙黄决明素、大黄酚的含有量,为完善该制剂质量标准提供依据。

1 材料

Agilent 1260 高效液相色谱仪,配置 UV 型紫外检测器;TGL-16G 离心机(上海安亭科学仪器厂);KQ5200B 超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司);SQP 电子天平[百万分之一,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];超纯水(密思博超纯水机制备)。六味葛蓝降脂片共 10 批(批号 20170501、20170601、20170602、20170603、20170701、20170801、20170802、20170803、20170901、20171001),2 g/片,由广西中医药大学制药厂提供,原药材均购自广西玉林市祥生中药饮片有限责任公司,经广西中医药大学制药厂质量保证部专家鉴定为正品。葛根素对照品(170109,含有量>98%,上海融禾医药科技有限公司);大豆苷(MUST-17092780,含有量 99.46%)、大豆苷元(MUST-17101202,含有量 99.99%)、橙黄决明素(111900-201303,含有量 99.1%)、大黄酚

(MUST-17041310,含有量 99.50%)对照品(成都曼思特生物科技有限公司)。乙腈为色谱纯(美国 Fisher 公司);甲醇、磷酸为分析纯(国药集团化学试剂有限公司);水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Phenomenex Gemini C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相乙腈(A)-0.1%磷酸(B),梯度洗脱(0~8 min, 15% A; 8~20 min, 30% A; 20~40 min, 55% A; 40~45 min, 60% A; 45~55 min, 70% A; 55~60 min, 85% A);体积流量 1.0 mL/min;检测波长 280 nm;柱温 30 ℃;进样量 10 μL。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取葛根素、大豆苷、大豆苷元、橙黄决明素、大黄酚对照品适量,甲醇分别制成 1.210 0、0.750 0、0.635 0、0.570 0、0.315 0 mg/mL,取适量置于同一量瓶中,甲醇稀释,即得(质量浓度分别为 0.164 1、0.067 3、0.034 4、0.054 9、0.028 9 mg/mL),置于冰箱中贮存备用。

2.2.2 供试品溶液 取本品 20 片,研细,精密称取约 2 g,置于具塞锥形瓶中,精密加入 20 mL 甲醇,称定质量,超声(200 W、40 kHz) 30 min,冷却至室温,甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,续滤液离心,取上清液,即得。

2.3 HPLC 指纹图谱建立

2.3.1 精密度试验 取供试品溶液(批号 20170501),在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次,以 7 号峰的保留时间和色谱峰面积为参照,测得其余 11 个共有峰的相对保留时间 RSD 在 0.05%~0.24%之间,相对峰面积 RSD 在 0.89%~2.0%之间,表明仪器精密度良好,符合相关要求和规定。

2.3.2 稳定性试验 取供试品溶液(批号 20170501),于 0、2、4、8、12、24 h 在“2.1”项色谱条件下进样测定,以 7 号峰保留时间和色谱峰面积为参照,测得其余 11 个共有峰的相对保留时间 RSD 在 0.09%~1.1%之间,相对峰面积 RSD 在 0.64%~2.0%之间,表明溶液在 24 h 内稳定性

良好，符合相关要求和规定。

2.3.3 重复性试验 取本品(批号20170501)约2 g,按“2.2.2”项下方法制备6份供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定,以7号峰保留时间和色谱峰面积为参照,测得其余11个共有峰的相对保留时间RSD在0.10%~0.34%之间,相对峰面积RSD在1.2%~1.9%之间,表明该方法重复性良好,符合相关要求和规定。

2.3.4 建立方法 取10批样品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定,见图1,再通过“中药指纹图谱相似度评价软件”(2012.130723版)进行分析,平均数法生成对照图谱,多点校正法建立指纹图谱,见图2。共标示出12个共有峰,由于7号峰(大豆苷元)保留时间适中,稳定性好,峰面积较大,故选择其作为参照峰(S);10批样品相似度均大于0.997,表明其质量相对稳定,共有成分基本一致,但含有量上有差异。

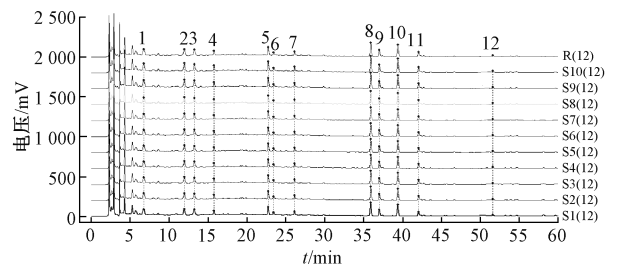


图1 10批样品HPLC指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of ten batches of samples

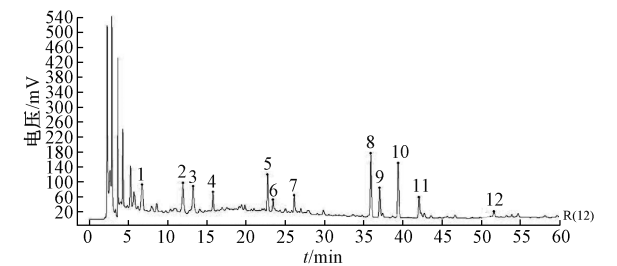


图2 共有峰HPLC色谱图

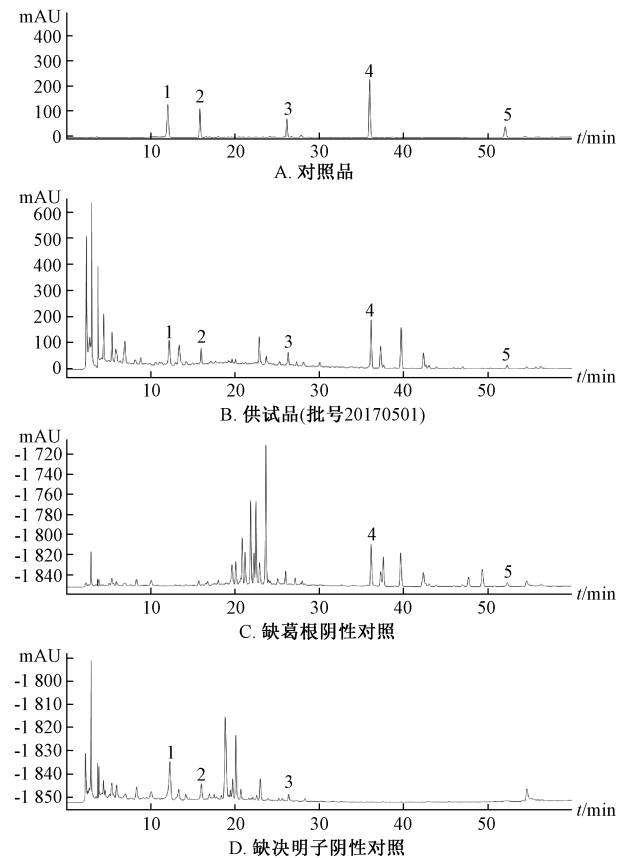
Fig. 2 HPLC chromatogram of common peaks

2.3.5 主要特征峰归属 精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定,记录色谱图。结果,共指认出5个特征峰(2、4、7、8、12号),分别为葛根素、大豆苷、大豆苷元、橙黄决明素、大黄酚。

2.4 5种成分含有量测定

2.4.1 系统适用性试验 取对照品、供试品、阴性对照溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定,

结果见图3。由图可知,对照品、供试品在相同保留时间处都有特征色谱峰,而阴性对照未发现,拖尾因子均在0.95~1.05之间,表明其他成分对测定无干扰,理论塔板数以大豆苷元计为6 800。



1. 葛根素 2. 大豆苷 3. 大豆苷元 4. 橙黄决明素 5. 大黄酚
1. puerarin 2. daidzin 3. daidzein 4. aurantio-obtusin 5. chrysophanol

图3 各成分HPLC色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of various constituents

2.4.2 线性关系考察 精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液,甲醇稀释,制得含葛根素0.065 7、0.131 3、0.016 41、0.197 0、0.229 8、0.262 6 mg/mL,大豆苷0.026 9、0.053 8、0.067 3、0.080 7、0.094 2、0.107 6 mg/mL,大豆苷元0.013 8、0.027 5、0.034 4、0.041 3、0.048 2、0.010 76 mg/mL,橙黄决明素0.022 0、0.043 9、0.054 9、0.065 9、0.076 9、0.087 9 mg/mL,大黄酚0.011 6、0.023 2、0.028 9、0.034 7、0.040 5、0.046 3 mg/mL的对照品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定。以溶液质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行回归,结果见表1,可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表 1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/(mg·mL ⁻¹)
葛根素	<i>Y</i> =6 390. 418 7 <i>X</i> +8. 770 810 4	0. 999 65	0. 065 7~0. 262 6
大豆苷	<i>Y</i> =8 460. 174 14 <i>X</i> -0. 139 639	0. 999 62	0. 026 9~0. 107 6
大豆苷元	<i>Y</i> =11 133. 752 4 <i>X</i> +0. 384 342 2	0. 999 65	0. 013 8~0. 055 1
橙黄决明素	<i>Y</i> =29 597. 763 2 <i>X</i> +1. 615 786 4	0. 999 66	0. 022 0~0. 087 9
大黄酚	<i>Y</i> =10 576. 8 <i>X</i> -2. 111 255	0. 999 61	0. 011 6~0. 046 3

2. 4. 3 精密度试验 取“2. 2. 1”项下对照品溶液，在“2. 1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得葛根素、大豆苷、大豆苷元、橙黄决明素、大黄酚峰面积 RSD 分别为 1. 7%、1. 6%、1. 6%、1. 7%、1. 6%，表明仪器精密度良好。

2. 4. 4 稳定性试验 取本品（批号 20170501）适量，按“2. 2. 2”项下方法制备供试品溶液，于 0、2、4、8、12、24 h 在“2. 1”项色谱条件下进样测定，测得葛根素、大豆苷、大豆苷元、橙黄决明素、大黄酚峰面积 RSD 分别为 1. 3%、1. 1%、1. 9%、1. 9%、2. 0%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2. 4. 5 重复性试验 精密称取本品（批号 20170501）6 份，每份 2. 0 g，按“2. 2. 2”项下方法制备供试品溶液，在“2. 1”项色谱条件下进样测定，测得葛根素、大豆苷、大豆苷元、橙黄决明素、大黄酚含有量 RSD 分别为 0. 61%、1. 4%、

1. 6%、1. 6%、1. 0%，表明该方法重复性良好。

2. 4. 6 加样回收率试验 精密称取本品（批号 20170501）约 1. 0 g（葛根素、大豆苷、大豆苷元、橙黄决明素、大黄酚平均含有量分别为 1. 788 5、0. 616 9、0. 379 6、0. 603 3、0. 158 4 mg/g），共 6 份，分别精密加入葛根素、大豆苷、大豆苷元、橙黄决明素、大黄酚对照品 1. 800 0、0. 620 0、0. 380 0、0. 600 0、0. 160 0 mg，按“2. 2. 2”项下方法制备供试品溶液，在“2. 1”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，葛根素、大豆苷、大豆苷元、橙黄决明素、大黄酚平均加样回收率分别为 98. 1%、102. 6%、98. 0%、96. 0%、97. 7%，RSD 分别为 0. 72%、1. 1%、1. 7%、0. 54%、0. 72%。

2. 4. 7 样品含有量测定 精密称取 10 批片剂，每批约 2 g，按“2. 2. 2”项下方法制备供试品溶液，在“2. 1”项色谱条件下进样测定，计算含有量，结果见表 2。

表 2 各成分含有量测定结果（mg/g，*n*=2）

Tab. 2 Results of content determination of various consti-tuents（mg/g，*n*=2）

批号	葛根素	大豆苷	大豆苷元	橙黄决明素	大黄酚
20170501	1. 748 7	0. 622 2	0. 384 5	0. 586 8	0. 154 4
20170601	1. 692 6	0. 599 8	0. 372 6	0. 597 7	0. 165 2
20170602	1. 711 1	0. 620 4	0. 376 5	0. 601 6	0. 183 3
20170603	1. 679 6	0. 599 0	0. 363 5	0. 584 3	0. 187 9
20170701	1. 787 6	0. 625 9	0. 394 6	0. 615 5	0. 195 7
20170801	1. 760 9	0. 590 0	0. 379 4	0. 608 7	0. 194 0
20170802	1. 767 1	0. 627 3	0. 395 5	0. 630 8	0. 215 0
20170803	1. 798 9	0. 595 2	0. 390 0	0. 612 8	0. 219 7
20170901	1. 712 1	0. 598 4	0. 384 6	0. 603 7	0. 174 0
20171001	1. 894 3	0. 644 1	0. 391 7	0. 586 4	0. 234 9

3 讨论

本实验考察供试品溶液制备方法时，以甲醇、水、乙醇为提取溶剂，比较了超声、回流提取，以及提取时间、溶剂用量、提取次数对含有量测定的影响，发现在取样量 2 g、甲醇 20 mL、超声 30 min 条件下供试品溶液中 5 种成分总含有量较高，分离度较好，而且操作简便。然后，采用二极管阵列检测器分析不同波长下色谱图，发现在 280 nm 处各

成分较稳定，含有量较高，并与其他杂质峰达到良好的分离效果。

指纹图谱是一种具有整体性、模糊性、专属性等特点的质量控制和评价方法^[20]，能全面呈现样品复杂性，近年来广泛应用于中药研究中^[21]。本实验发现，10 批六味葛蓝降脂片 HPLC 指纹图谱相似度均大于 0. 9，具有很好的一致性。另外，中药材有着多成分、多功效的特点，只对其单一成分

或特征性成分进行研究无法全面控制其质量^[22-24]，故本实验采用 HPLC 法同时测定六味葛蓝降脂片中葛根素、大豆苷、大豆苷元、橙黄决明素、大黄酚含量，发现其均存在一定差异，可能是由于药材种植、地域等因素所致。因此，控制药材源头、规范生产工艺是保证保健食品质量稳定的重要措施。

4 结论

本实验建立六味葛蓝降脂片 HPLC 指纹图谱，并测定其中葛根素、大豆苷、大豆苷元、橙黄决明素、大黄酚的含有量，该方法简便、快速、准确，重复性好，专属性强，既考察了该制剂中多种有效成分的含有量，又通过指纹图谱整体相似度为其全面质量评价提供可靠依据。

参考文献：

[1] 朱智德, 蒋 林, 罗宇东, 等. 六味葛蓝降脂片对小鼠急性经口毒性及遗传毒性的试验研究[J]. 中国当代医药, 2016, 23(12): 4-7.

[2] 卢 熠, 杨 悦. 降血脂药物的临床应用与展望[J]. 中国当代医药, 2014, 21(5): 180-182.

[3] 郭东杰, 袁肖寒, 蔡 曼, 等. 降血脂西药与中药研究现状与展望[J]. 黑龙江医药, 2014, 27(1): 31-37.

[4] 杜志澎. 高胆固醇与心血管危险因素相关性研究[J]. 中国当代医药, 2013, 20(2): 7-8.

[5] 苏 蓉, 于德水. 高脂血症的危害及防治[J]. 中国当代医药, 2009, 16(8): 128-129.

[6] 刘 石. 调血脂药物的研究进展[J]. 北方药学, 2013, 10(10): 94.

[7] 刁玉林, 刘 伟, 孟大利. 降血脂天然产物研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(12): 1008-1012.

[8] 辛丹丹, 宝贵荣, 博·格日勒图, 等. 国内外降脂药物的研究进展[J]. 内蒙古中医药, 2013, 32(21): 149-151.

[9] 农毅清, 蒋 林, 罗宇东, 等. 六味葛蓝降脂片质量标准研究[J]. 食品与药品, 2016, 18(3): 170-174.

[10] 罗宇东, 蒋 林, 朱智德, 等. 六味葛蓝降脂片大鼠 30d 喂养试验研究[J]. 中国当代医药, 2016, 23(9): 15-18.

[11] Du G, Zhao H Y, Song Y L, *et al.* Rapid simultaneous determination of isoflavones in *Radix puerariae* using high-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry with novel shell-type column [J]. *J Sep Sci*, 2011, 34 (19): 2576-2585.

[12] 金文姗, 谈钰元, 陈有根, 等. 高效液相色谱法测定不同产地葛根中葛根素、大豆苷及大豆苷元的含量[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(1): 49-51.

[13] 张仁岗, 刘福明. 葛根的心血管药理作用研究进展[J]. 中药材, 2001, 24(7): 535-537.

[14] 纪宝玉, 裴莉昕, 陈随清, 等. 野葛种质资源的随机扩增多态性 DNA 技术分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(16): 56-59.

[15] 郝延军, 桑育黎, 赵余庆, 等. 决明子的研究进展[J]. 中草药, 2001, 32(9): 858-859.

[16] 刘 斌, 巩鸿霞, 肖学风, 等. 决明子化学成分及药理作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2010, 33(4): 312-315.

[17] 王小华, 邓 斌, 张晓军, 等. 决明子黄酮类化合物的提取工艺研究[J]. 现代农业科技, 2008(24): 7-8, 11.

[18] 张启伟, 阴 健, 张 俊, 等. 生、炒决明子及其煎剂中部分活性成分的比较[J]. 中草药, 1996, 27(2): 79-81.

[19] 王晶彬, 周 旭, 胡志方, 等. 基于指标成分和 HPLC 指纹图谱检测的决明子化学品质评价研究[J]. 中草药, 2008, 39(6): 917-919.

[20] 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.

[21] 魏晓雨, 姜国栋, 陈 泓, 等. 贞芪扶正颗粒的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药房, 2017, 28(33): 4691-4694.

[22] 赵 路, 关琴笑, 路 丽, 等. UHPLC 法同时测定不同产地葛根中 5 种活性成分的含量[J]. 中药材, 2015, 38(3): 473-475.

[23] 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.

[24] 王 颖, 高 琨. 中药质量与质量控制方法综述[J]. 中国科技博览, 2013(15): 256.