

扶正固本颗粒 HPLC 指纹图谱建立

仝立国, 牛艳艳, 吉海杰, 宋美卿, 杨 钐, 冯玛莉, 汪欣文*
(山西省中医药研究院, 山西 太原 030012)

摘要: 目的 建立扶正固本颗粒(黄芩、淫羊藿、女贞子等) HPLC 指纹图谱。方法 该药物 80% 甲醇提取液的分析采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相甲醇-0.1% 磷酸, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 250、260、275、285、320 nm; 柱温 25 ℃。结果 10 批样品 HPLC 指纹图谱中有 36 个共有峰, 相似度均大于 0.99, 并确定了其中 8 种成分(2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯基葡萄糖苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、淫羊藿苷、汉黄芩素、宝藿苷 I、大黄素)的结构。结论 该方法分离度、精密性、稳定性、重复性良好, 可用于扶正固本颗粒的质量控制。

关键词: 扶正固本颗粒; HPLC 指纹图谱; 质量控制

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)01-0211-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.01.040

扶正固本颗粒由黄芩、淫羊藿、女贞子、何首乌、地黄、茜草等 8 味中药组成, 具有益气养阴、凉血解毒的功效, 适用于对食管癌、胃寒气阴两虚兼热毒症患者放疗时合并用药, 收载于国家药品监督管理局标准(WS-5250(B-0250)-2002)^[1], 但目前该制剂质量控制方法仍以单一成分为指标, 难以全面确保其质量稳定性。

中药指纹图谱具有信息量大、特征性强等特点, 能从整体上把握其质量, 在评价质量一致性及产品稳定性方面具有明显的优势^[2]。前期已有很多对中药药味指纹图谱、含量测定及成分分析的报道^[3-10], 本实验在此基础上建立扶正固本颗粒 HPLC 指纹图谱, 以为后续制定与该制剂功效相关的多成分含量测定方法提供依据, 也为建立其系统全面的质量标准奠定基础。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), 配置 G1322A 真空脱气机、G1311A 四元泵、G1329A 自动进样器、G1316A 柱温箱、G1315D DAD 二极管阵列检测器、HP Chemstation 色谱工作站; 超高效液相色谱-高分辨质谱系统(美国 Waters 公司), 包括 ACQUITY UPLC I Class-G2-XS QTOF、MassLynx V4.1 质谱工作站、ESI 离子源。XS105 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司); 超纯水器(美国 Millipore 公司); S60H 超声波清洗机(德国艾尔玛公司)。

1.2 试剂与药物 黄芩苷(110715-201318)、黄芩素(111595-200604)、淫羊藿苷(110737-201516)、宝藿苷 I

(111852-201603)、汉黄芩素(111514-201706)、汉黄芩苷对照品(112002-201702), 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯基葡萄糖苷对照品(110844-201109)、大黄素(110756-201512)对照品均购于中国食品药品检定研究院。黄芩、淫羊藿、女贞子、何首乌、地黄、茜草、黄精、人参均由山西振东开元制药有限公司提供, 经山西省药品检验所高天爱主任药师鉴定为正品。扶正固本颗粒共 10 批, 均来源于山西振东开元制药有限公司, 批号分别为 20160603、20161104、20170806、20170401、20171012、20180302、20180601、20181002、20190301、20190603。甲醇、乙腈为色谱纯(迪马科技公司); 其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相甲醇(A)-0.1% 磷酸(B), 梯度洗脱(0~20 min, 5%~40% A; 20~38 min, 40%~50% A; 38~62 min, 50% A; 62~68 min, 50%~65% A; 68~73 min, 65% A; 73~80 min, 65%~75% A; 80~85 min, 75%~80% A; 85~90 min, 80%~90% A; 90~98 min, 90% A; 98~100 min, 90%~5% A); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 ℃; 检测波长 0~9.25 min 275 nm, 9.25~10.5 min 285 nm, 10.5~12.5 min 260 nm, 12.5~14.5 min 250 nm, 14.5~24 min 275 nm, 24~25.5 min 320 nm, 25.5~100 min 275 nm; 进样量 10 μL。

2.2 质谱条件 参考文献[11]报道。XEVO G2-XS ESI 离子源, 正/负离子模式; 锥孔电压 40 V; 离子源温度

收稿日期: 2020-04-03

基金项目: 山西省科技攻关项目——山西省中药现代化关键技术研究振东专项(2016ZD0302); 山西省卫生健康委员会“四个一批”科技兴医创新计划(2020SYS06)

作者简介: 仝立国(1981—), 男, 硕士, 副主任药师, 从事中药药效物质基础及质量标准研究。Tel: (0351) 4174328, E-mail: dboy-007@163.com

*通信作者: 汪欣文(1973—), 女, 硕士, 副主任医师, 研究方向为中医肿瘤学。Tel: 15935617108, E-mail: zf-xfdy@163.com

100 ℃；脱溶剂气温度 400 ℃；锥孔气体积流量 50 L/h；脱溶剂气体积流量 700 L/h；扫描范围 m/z 100~1 500；校正液亮氨酸-脑啡肽, $[M+H]^+$ 556.277 1, $[M-H]^-$ 554.261 5。采用 Masslynx4.1 工作软件,在 MS^E Continuum 模式采集质谱数据,扫描速率 0.2/s,碰撞能量 20~35 V。

2.3 供试品溶液制备 取本品约 2.0 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入 25 mL 80% 甲醇,称定质量,超声(250 W、40 Hz)处理 30 min,放冷,80% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 对照品溶液制备 精密称取黄芩苷、淫羊藿苷、汉黄芩素、汉黄芩苷、2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯葡萄糖苷、大黄素对照品适量,甲醇溶解,即得。

2.5 单味药材溶液制备 称取黄芩、淫羊藿、何首乌、女贞子、生地黄、茜草、黄精、人参适量,粉碎为粗粉,提取 2 次,第 1 次加 10 倍量水,第 2 次加 8 倍量水,每次 1 h,合并提取液,浓缩,80 ℃ 干燥。称取上述提取物适量,按“2.3”项下方法制备,精密吸取 2 mL 至 10 mL 量瓶中,80% 甲醇定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.6 阴性样品溶液制备 分别称取缺黄芩、缺淫羊藿、缺何首乌、缺女贞子、缺生地黄、缺茜草、缺黄精、缺人参阴性样品适量,按“2.3”项下方法制备,精密吸取 2 mL 至 10 mL 量瓶中,80% 甲醇定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.7 方法学考察

2.7.1 精密度试验 取同一批本品(批号 20170806)适量,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定 7 次,以黄芩苷为参照,测得各共有峰相对保留时间 RSD 在 0~0.14% 范围内,相对峰面积 RSD 在 0~2.83% 范围内,表明仪器精密度良好。

2.7.2 重复性试验 取同一批本品(批号 20170806)适

量,按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定,以黄芩苷为参照,测得各共有峰相对保留时间 RSD 在 0~0.08% 范围内,相对峰面积 RSD 在 0~2.40% 范围内,表明该方法重复性良好。

2.7.3 稳定性试验 取同一批本品(批号 20170806)适量,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,于 0、3.5、7、10.5、14、19、24、30、36 h 在“2.1”项色谱条件下进样测定,以黄芩苷为参照,测得各共有峰相对保留时间 RSD 在 0~0.18% 范围内,相对峰面积 RSD 在 0~2.37% 范围内,表明溶液在 36 h 内稳定性良好。

2.7.4 耐用性试验 采用 Dimak Diamonsil C₁₈、TIANHE Kromasil C₁₈、ELITE SinaChrom C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),在“2.1”项色谱条件下进样测定,以黄芩苷为参照,测得各共有峰相对保留时间 RSD 在 0~3.52% 范围内,相对峰面积 RSD 在 0~2.33% 范围内,表明色谱柱耐用性良好。

2.8 HPLC 指纹图谱建立 参考文献[2, 12]报道,取 10 批样品,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定,将所得图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012.130723 版),设定 S1 样品图谱作为参照,采用平均数法,设定时间窗宽度为 0.1,经过多点校正后自动匹配,共有 36 个共有峰,见图 1~2。

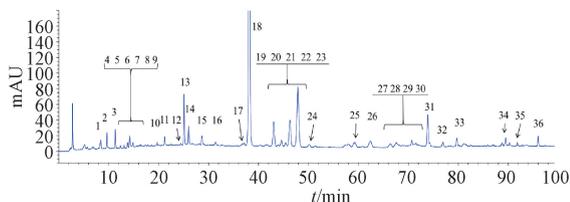


图 1 对照指纹图谱

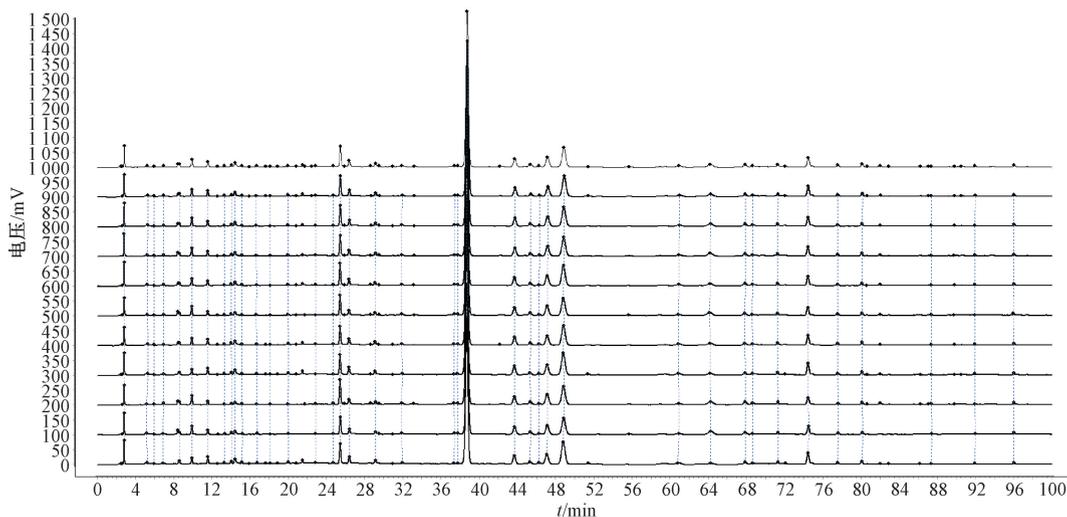


图 2 10 批样品 HPLC 指纹图谱

再取供试品、对照品、单味药材溶液适量,在“2.1”项色谱条件下进样测定,通过保留时间和紫外吸收光谱数据对各共有峰进行归属,在“2.2”项质谱条件下对其进行

指认。

3 结果

3.1 相似度评价 10 批样品相似度均大于 0.99,表明各

批之间成分一致,质量稳定。

3.2 共有峰归属及成分分析 图3显示,12号峰为2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯基葡萄糖苷(m/z 405.120 8, M-H),17号峰为黄芩苷(m/z 455.091 3, M-H),23号峰为汉黄芩苷(m/z 459.104 9, M-H),25号峰为黄芩素(m/z 269.049 7, M-H),26号峰淫羊藿苷(m/z 721.231 4, M-

H),31号峰为汉黄芩素(m/z 283.065 1, M-H),33号峰为宝藿苷I(m/z 513.181 5, M-H),35号峰为大黄素(m/z 269.049 7, M-H)。各单味药材成分与颗粒成分基本对应,其中黄芩、淫羊藿、何首乌、女贞子对共有峰的贡献较大,地黄、人参、茜草、黄精贡献较小,见图4、表1。

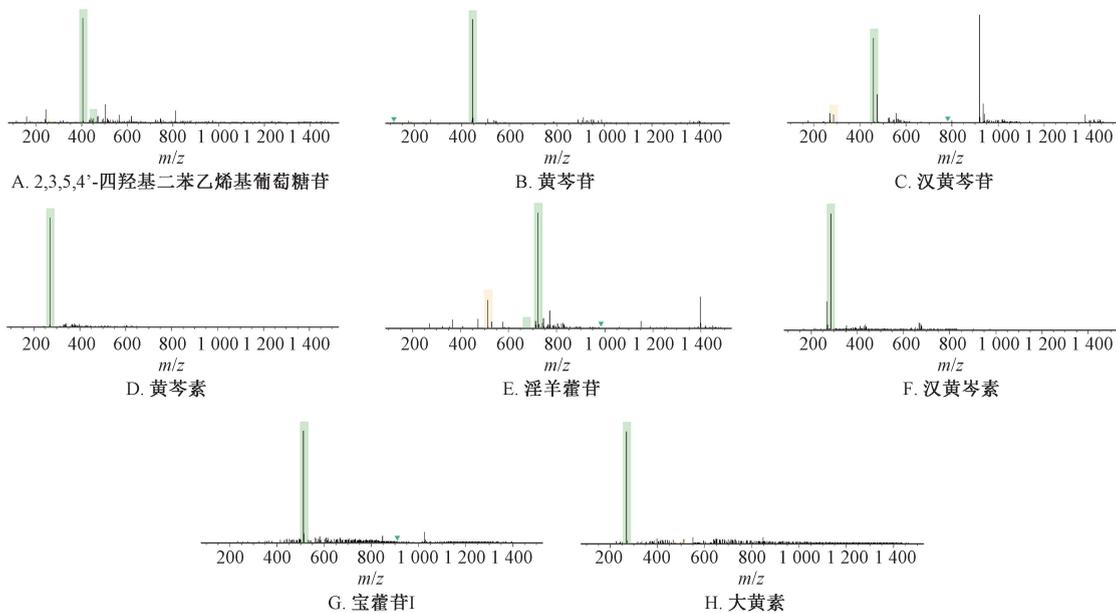


图3 各成分质谱图

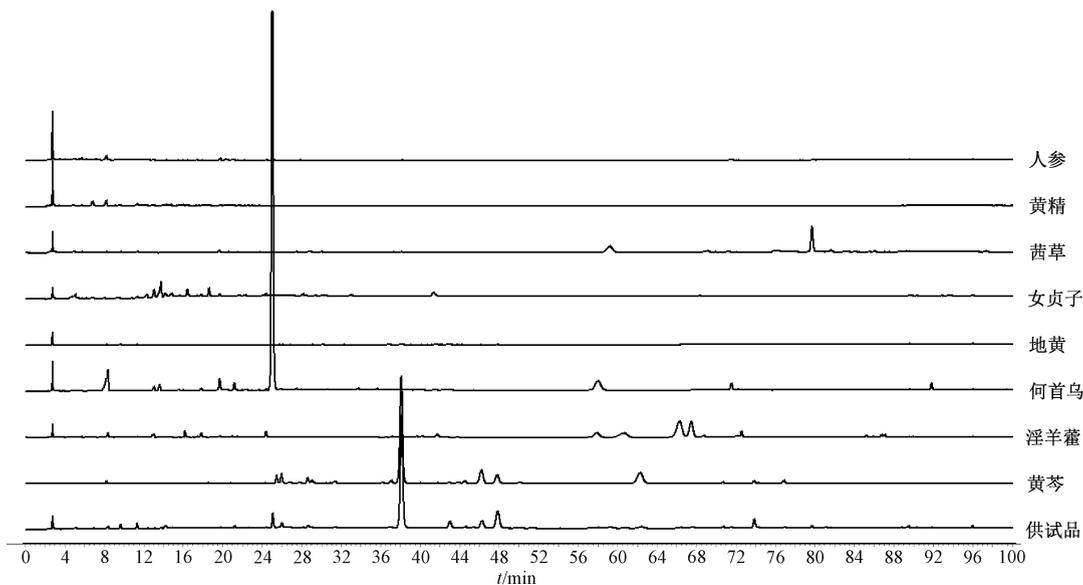


图4 供试品、单味药材溶液 HPLC 色谱图

4 讨论

4.1 提取溶剂优化 本实验比较了50%甲醇、80%甲醇、甲醇所制备供试品溶液的指纹图谱,发现50%、80%甲醇对2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯基葡萄糖苷的提取较充分,而3种溶剂对其他成分的提取均无明显差异。由于50%甲醇黏度大于80%甲醇,微孔滤膜过滤时耗费时间较长,故最终确定80%甲醇作为提取溶剂。

4.2 流动相优化 本实验曾采用乙腈-0.1%磷酸进行梯度洗脱,发现结构相似的色谱峰较集中,分离度较差,故最终确定洗脱能力较弱的甲醇作为流动相,取得了较为满意的分离度。

4.3 检测波长优化 本实验采用DAD检测器对供试品溶液中各色谱峰的紫外吸收进行全波长扫描,确定了每个指纹峰最大吸收波长,并采用不同时间改变最大吸收波长的

表1 各共有峰归属

编号	t_R /min	来源药材	编号	t_R /min	来源药材
1	8.433	何首乌、淫羊藿	19	44.561	黄芩
2	9.615	除黄芩以外全有	20	45.424	黄芩
3	11.347	除黄芩以外全有	21	46.258	黄芩
4	12.332	女贞子	22	47.848	黄芩
5	13.081	何首乌、淫羊藿、女贞子	23	50.138	黄芩
6	14.186	女贞子	24	59.205	茜草
7	14.836	女贞子	25	62.344	黄芩
8	16.477	女贞子	26	66.349	淫羊藿
9	19.720	何首乌、女贞子、茜草	27	67.532	淫羊藿
10	21.209	何首乌	28	70.696	黄芩
11	24.377	淫羊藿、女贞子	29	71.556	何首乌
12	25.142	何首乌	30	73.864	黄芩
13	25.948	黄芩	31	76.894	黄芩
14	28.679	黄芩、茜草	32	79.719	茜草
15	31.391	黄芩	33	87.073	淫羊藿
16	37.160	黄芩	34	89.515	除黄芩以外全有
17	38.105	黄芩	35	91.817	何首乌
18	43.007	黄芩	36	95.963	除黄芩以外全有

方法进行测定，发现指纹图谱中各指纹峰均能满足分析要求。

5 结论

本实验建立了10批扶正固本颗粒的HPLC指纹图谱，确定了36个共有峰，覆盖了方中5味中药主要特征成分，共有峰面积达90%以上，并对2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯葡萄糖苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、淫羊藿苷、汉黄芩素、宝藿苷I、大黄素进行了指认，能在整体上对该制剂质量进行控制，也为制定规范化、标准化的相关质量控制方法提供实验依据。

参考文献:

[1] 朱艳容, 李媛媛, 倪艳, 等. 扶正固本颗粒的质量标准研究[J]. 中国药房, 2011, 22(23): 2179-2181.

[2] 左雯雯, 吴鑫, 黄胜良, 等. 新生化颗粒的HPLC指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(18): 3676-3682.

[3] Han J, Ye M, Xu M, et al. Characterization of flavonoids in the traditional Chinese herbal medicine-Huangqin by liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 848(2): 355-362.

[4] Liu G Z, Ma J Y, Chen Y Z, et al. Investigation of flavonoid profile of *Scutellaria bacalensis* Georgi by high performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*,

2009, 1216(23): 4809-4814.

[5] 刘丽萍, 徐晓芳, 孙东东, 等. 淫羊藿水提部位化学成分的HPLC-ESI-Q-TOF-MS分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(19): 112-116.

[6] Zhu Z W, Li J, Gao X M, et al. Simultaneous determination of stilbenes, phenolic acids, flavonoids and anthraquinones in *Radix Polygoni multiflori* by LC-MS/MS[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 62: 162-166.

[7] 罗益远, 刘娟秀, 刘廷, 等. UPLC-MS/MS法同时测定何首乌中二苯乙烯、蒽醌、黄酮及酚酸类成分[J]. 质谱学报, 2016, 37(4): 327-335.

[8] Li H, Yao W F, Liu Q N, et al. Application of UHPLC-ESI-Q-TOF-MS to identify multiple constituents in processed products of the herbal medicine *Ligustri lucidi Fructus*[J]. *Molecules*, 2017, 22(5): 689.

[9] 龙红萍, 秦裕辉, 刘峥嵘, 等. UPLC-Q-TOF法分析双丹明目胶囊化学成分[J]. 中成药, 2017, 39(7): 1527-1531.

[10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2005年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 8; 45; 124; 175; 234; 301; 306; 327.

[11] 刘大伟, 闫广利, 方圆, 等. UPLC-ESI-TOF/MS应用于黄芩化学成分的快速分析[J]. 中医药信息, 2012, 29(4): 20-24.

[12] 宋霞, 林鹏程, 刘亚蓉, 等. 利肺片HPLC指纹图谱研究[J]. 中药材, 2017, 40(11): 2620-2624.