

【 评价方法学 】

芪柏颗粒的 UPLC 特征图谱研究

张承盟^{1,2,3}, 钱长敏^{2,3}, 缪兴龙^{2,3}, 何毅^{2,3}, 李瑞明^{2,3*}

1. 中国药科大学 生药学研究室, 江苏 南京 211111

2. 天士力控股集团有限公司研究院 现代中药开发中心, 天津 300400

3. 天士力医药集团股份有限公司创新中药关键技术国家重点实验室, 天津 300400

摘要: 目的 建立芪柏颗粒的 UPLC 特征图谱, 为评价不同批次成品的质量提供参考。方法 采用 ACQUITY UPLC HSS T3 C18 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 作为色谱柱, 以乙腈-0.3%甲酸水为流动相, 梯度洗脱, 柱温 28 ℃, 波长 254 nm, 体积流量 0.4 mL/min。结果 建立芪柏颗粒的 UPLC 特征图谱, 12 批不同批次成品相似度均>0.92, 共标定 46 个共有峰, 筛选其中 25 个共有峰与单味药材进行比对并归属, 其中 4 个共有峰来源牡丹皮, 4 个共有峰来源甘草, 2 个共有峰来源炙黄芪, 2 个共有峰来源墨旱莲, 1 个共有峰来源卷柏, 12 个共有峰未进行归属。结论 成功建立芪柏颗粒的 UPLC 特征图谱分析方法, 其精密度、重复性和稳定性良好, 可为芪柏颗粒质量标准提升作参考。

关键词: 芪柏颗粒; UPLC; 特征图谱; 质量控制

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2018) 06- 1048- 05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.06.19

Characteristic Chromatogram Analysis of Qibai Granule by UPLC

ZHANG Chengmeng^{1,2,3}, QIAN Changmin^{2,3}, MIAO Xinglong^{2,3}, HE Yi^{2,3}, LI Ruiming^{2,3}

1. Research Department of Pharmacognosy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211111, China

2. TCM Research Center, Tasly Academy, Tasly Group Co., Ltd., Tianjin 300400, China

3. State Key Laboratory of Critical Technology in Innovative Chinese Medicine, Tasly Group Co., Ltd., Tianjin 300400, China

Abstract: **Objective** To establish a UPLC characteristic chromatogram of Qibai Granule for quality control. **Methods** The ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) was used with a mobile phase comprised of acetonitrile-0.3% formic acid for gradient elution. The column temperature was 28 ℃. The detection wavelength was 254 nm. The flow rate was 0.4 mL/min. **Results** The UPLC characteristic chromatogram of Qibai Granule was established. The similarities of 12 batches of Qibai Granule were above 0.92. A total of 46 common peaks were found, where 25 common peaks were filtered for belonging to seven medicinal herbs. Among them, four mutual peaks were from Moutan cortex, four mutual peaks were from Glycyrrhizae radix et rhizoma, two common peaks came from *Astragali radix praeparata cum melle*, two common peaks came from *Ecliptae herba*, one common peak came from *Selaginellae herba*, and twelve were unknown sources. **Conclusion** The method is accurate, repeatable and stable, which can provide the reference for the study of quality control.

Key words: Qibai Granule; UPLC; characteristic chromatogram; quality control

芪柏颗粒是由炙黄芪、牡丹皮、女贞子、卷柏、甘草等七味药组成, 具有益气滋阴、凉血止血之功效。经多年临床观察, 该方治疗慢性特发性血小板减少性紫癜效果显著, 可降低疾病复发率。芪柏颗粒为多种药材经提取、浓缩、粉碎、干燥、制粒、

整粒等多道工序制成, 具有易携带、易服用和易储存等优点。中药特征图谱包含各色谱峰保留时间、峰面积、出峰顺序等信息, 能有效体现中药整体性化学特征表征^[1], 可用于评价中药材质量的均一性和稳定性。因此为全面控制该产品的质量, 保证疗

收稿日期: 2017-11-27

第一作者: 张承盟 (1992—), 男, 在读硕士, 研究方向质量标准研究。Tel: 13672061242 E-mail: CMZhang2017@163.com

*通信作者: 李瑞明 (1977—), 男, 高级工程师, 研究方向新药开发与研究。Tel: (022)86343790 E-mail: lirui@tasly.com

效,本研究采用 UPLC-PDA 法初步建立 12 批茛柏颗粒特征图谱,同时初步筛选共有峰进行各单味药材归属,为本方的化学成分物质基础研究提供了参考与依据^[2]。

1 材料

Waters UPLC (PDA) 超高压液相色谱仪 (美国沃特世公司); KQ-250E 型医用超声波仪器 (昆山市超声仪器有限公司); XS 205DY 电子分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); 高速冷冻离心机 ST16R (Thermo Fisher 公司)。

对照品甘草酸铵 (110731-201418)、穗花杉双黄酮 (批号 111902-201102)、甘草苷 (批号 111610-201106)、没食子酸 (批号 110831-200803),均由中国食品药品检定研究院提供; 4, 5-二咖啡酰奎宁酸 (批号 20130806)、芒柄花苷 (批号 20130612)、毛蕊异黄酮 (批号 20130408),均由天津士兰科有限公司提供; 茛柏颗粒成品由天士力研究院现代中药开发中心生产 (批号分别为: 20160926、20161130、20161202、20170406、20170408、20170409、20170410、20170412、20170601、20170602、20170606、20170607)。乙腈为色谱纯 (德国 Merck 公司), 超纯水为 Milli-Q 制备 (Millipore 公司), 其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 mm), 柱温 28 °C, 波长 254 nm, 流速 0.4 mL/min, 进样体积 2 μL, 流动相乙腈 (A)-0.3%甲酸水 (B), 梯度洗脱 (0~7 min, 5%~18% A; 7~9 min, 18%~20% A; 9~14 min, 20%~35% A; 14~16.5 min, 35%~45% A; 16.5~17.5 min, 45%~90% A; 17.5~19 min, 90%~90% A; 19~20 min, 90%~5% A)。

2.2 供试品溶液制备^[3-4]

取本品研细, 约 1.2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70%甲醇 20 mL, 称定质量, 超声提取 (40 kHz, 100 W) 30 min, 取出放至室温, 加 70%甲醇补足减失的质量, 摇匀, 12 000 r/min 离心 10 min, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。按处方比例分别称取各单味药材, 精密称定, 同法制备各单味药材。

2.3 对照品溶液制备^[5]

取对照品甘草酸铵、穗花杉双黄酮、甘草苷、

没食子酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、芒柄花苷、毛蕊异黄酮适量, 精密称定, 分别加甲醇制成浓度为 0.1~1 g/L 的对照品溶液, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取批号 20161130 的茛柏颗粒按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 精密吸取 2 μL, 在 2.1 项色谱条件下连续 6 次进样分析, 记录色谱峰面积, 结果测得各共有峰对参比峰的相对保留时间 RSD<0.5%和相对峰面积 RSD<2.7%, 结果表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取批号 20161130 的茛柏颗粒按 2.2 项下平行制备 6 份供试品溶液, 精密吸取 2 μL, 在 2.1 项色谱条件下分别进样分析, 记录色谱峰面积, 结果测得各共有峰对参比峰的相对保留时间 RSD<0.7%和相对峰面积 RSD<4.3%, 结果表明, 本方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取批号 20161130 的茛柏颗粒按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 精密吸取 2 μL, 在按 2.1 项色谱条件下分别在 0、2、4、8、12、24 h 取样分析, 记录色谱峰面积, 结果测得各共有峰对参比峰的相对保留时间 RSD<0.6%和相对峰面积 RSD<4.7%, 结果表明, 供试品溶液室温放置 24 h 内稳定。

2.5 特征图谱的建立^[6]

2.5.1 特征图谱的建立 将 12 批茛柏颗粒成品编号为 S1~S12 (批号分别为: 20160926、20161130、20161202、20170406、20170408、20170409、20170410、20170412、20170601、20170602、20170606、20170607), 照 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项色谱条件精密吸取 2 μL 进样检测, 记录色谱图, 见图 1。

2.5.2 参比峰选择和主要共有峰标定 在 12 批样品图谱中, 45 号色谱峰分离度较好, 峰响应最大, 峰面积较大、较稳定, 且为所有批次样品共有峰, 经与对照品对照鉴定为甘草酸, 因此确定甘草酸为参照色谱峰 (S)。12 批样品的特征图谱进行分析, 根据色谱峰中各相对保留时间, 20 min 内选取并确定 46 个共有峰作为特征峰, 建立特征图谱的共有模式, 见图 2。

2.5.3 相似度评价 将 12 批茛柏颗粒成品的 cdf 格式图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012 年 A 版相似度软件, 进行相似度评价, 结果见表 1。结果显示, 12 批成品样品相似度均>0.92,

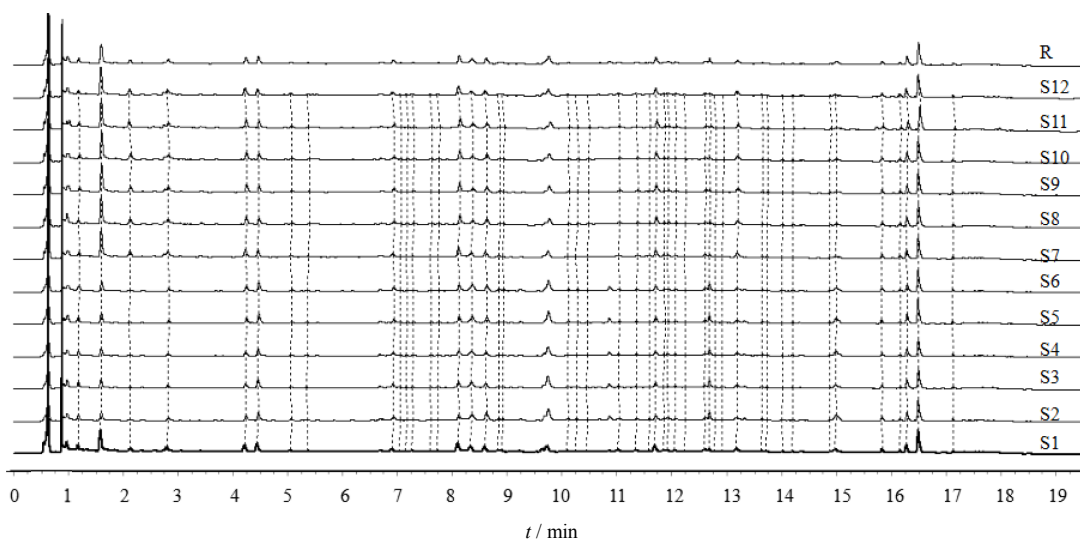


图1 12批芪柏颗粒UPLC特征图谱及对照特征图谱(R)

Fig. 1 UPLC characteristic chromatogram of 12 batches of Qibai Granule and common characteristic chromatogram (R)

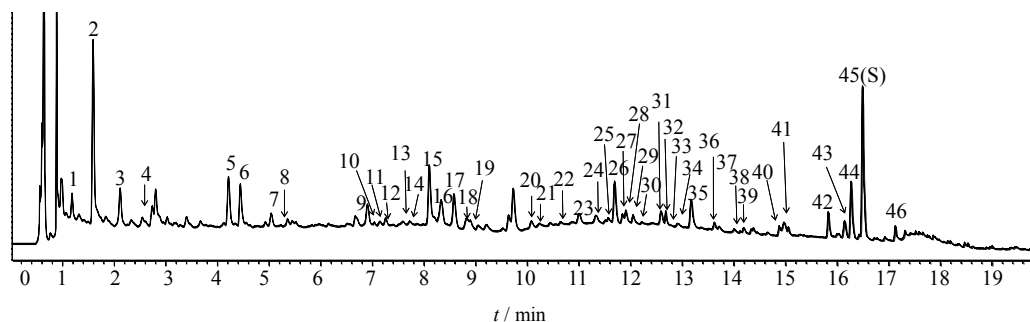


图2 芪柏颗粒特征图谱的共有模式图

Fig. 2 The common pattern chromatogram of characteristic chromatogram of Qibai Granule

表1 12批芪柏颗粒特征图谱的相似度

Table 1 The similarities of 12 batches characteristic chromatogram of Qibai Granule

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
相似度	0.928	0.937	0.948	0.95	0.944	0.945	0.97	0.963	0.961	0.965	0.958	0.972

说明其相似度较好,工艺较稳定,质量一致性较好。结果表明芪柏颗粒不同批次成品质量稳定,特征图谱技术可以用于芪柏颗粒质量的评价和控制。

2.5.4 成品与各单味药材相关性 通过成品批号为20161130 分别与处方中七味药材制备样品图谱相比对,结果显示芪柏颗粒特征图谱的化学成分主要来源于牡丹皮、甘草、女贞子、炙黄芪、墨旱莲、卷柏药材。由于部分共有峰峰面积较小,可能会影响药材归属的准确性,故筛选峰号2、3、4、5、6、9、15、16、17、18、20、23、24、25、26、28、29、31、32、34、35、41、42、44、45这25个主要色谱峰(各峰占总面积>1%^[7])进行药材归属。通过

对照品比对,确定2、16、23、26、35、44号峰分别为没食子酸、甘草苷、4,5-二咖啡酰奎宁酸、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、穗花杉双黄酮。其中2、3、9、20号峰来源牡丹皮^[8];16、28、42、45号峰来源甘草^[9];26、35来源炙黄芪^[10];23、24号峰来源墨旱莲^[11];44号峰来源卷柏^[12];4、5、6、15、17、18、25、29、31、32、34、41号峰因存在干扰峰未能归属药材,见图3。

3 讨论

3.1 提取条件考察

采用单因素考察方法,以色谱峰丰富度、峰形、分离度和峰数量等作为优选指标,分别对样品取样

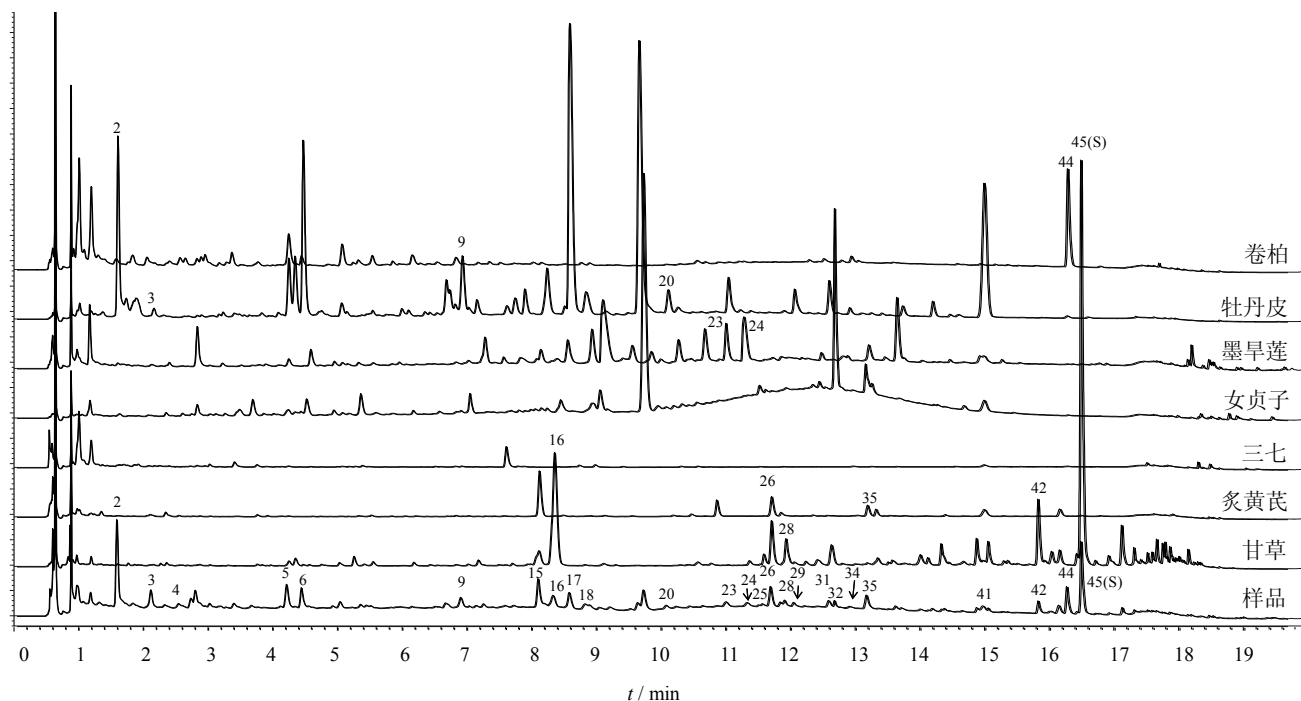


图3 芪柏颗粒特征图谱各共有峰归属色谱峰

Fig. 3 Each common peak of characteristic chromatogram in Qibai Granule

量(0.6、1.2、1.8、3 g)、提取溶剂(100%甲醇、70%甲醇、50%甲醇、水、100%乙醇、70%乙醇、50%乙醇)、提取方式(回流和超声)及提取时间(15、30、45、60 min)进行考察。最终确定供试品溶液制备方法为:样品取样量为1.2 g, 70%甲醇作为提取溶剂, 超声提取30 min。

3.2 流动相选择

本试验对流动相乙腈-0.3%甲酸水、乙腈-0.1%甲酸水、乙腈-水、甲醇-0.3%甲酸水、甲醇-0.1%甲酸水、甲醇-水进行考察, 最终选择乙腈-0.3%甲酸水作为流动相, 结果显示色谱峰峰形较好、基线平稳、峰数量较多、峰信息量更丰富和分离效果更佳。

3.3 其他色谱条件考察

本试验对样品进行190~400 nm全波长扫描, 体积流量(0.5、0.4、0.3 mL/min), 柱温(30、35、28 °C), 色谱柱(ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈, 100 mm×2.1 mm, 1.8 mm、ACQUITY UPLC BEH C₁₈, 100 mm×2.1 mm, 1.7 mm)进行考察, 最终确定检测波长为254 nm, 流速为0.4 mL/min、柱温为28 °C, 色谱柱选择ACQUITY UPLC HSS T3(100 mm×2.1 mm, 1.8 mm), 此条件下, 能够获得峰形对称、信息丰富、分离度较好和基线平稳的色谱峰。

综上所述, 本研究首次建立12批芪柏颗粒的

UPLC特征图谱, 该方法测定的12批芪柏颗粒相似度较好, 批次间无明显差异, 工艺稳定, 质量一致性好, 可用于该颗粒的质量评价和控制。结果显示, 该方法操作简便、重复性好、24 h内稳定性好、峰信息丰富、分离效果较好, 能较为全面反映全方主要物质成分。但在该特征图谱中三七在全处方中用量较少, 相关皂苷成分多为末端吸收, 现有检测条件未能检测。共有色谱峰归属上, 以45号峰甘草酸作为参照峰, 得到46个共有峰, 从中筛选25个共有峰(各峰占总峰面积>1%)进行初步药材归属, 现有研究仅分别归属了13种成分, 还有多个共有峰因为含量较低以及存在干扰等因素未能准确归属。后续将结合高分辨质谱, 对全方包括特征图谱46个共有峰在内的化学成分进行系统研究, 深入研究产品物质基础, 提升产品质量。

参考文献

- [1] 郭盛, 李益群, 严辉, 等. 基于HPLC-ELSD特征图谱及多元功效成分定量分析的炒酸枣仁配方颗粒质量标准研究[J]. 中药材, 2017(8): 1864-1869.
- [2] 张华锋, 许奇. 江淮地区春柴胡HPLC特征图谱研究[J]. 西北药学杂志, 2017, 32(5): 563-566.
- [3] 石朗, 顾媛媛, 焦丁宁, 等. 双黄连粉针中间体与制剂UPLC-MS指纹图谱相关性[J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2015, 31(6): 671-674.

- [4] 于桂芳, 闫显光, 殷洪梅, 等. 益心舒片的 HPLC 指纹图谱 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017(1): 69-74.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [6] 王钰乐, 刘文, 杨道斌, 等. 葛根芩连汤的 UPLC-MS/MS 指纹图谱研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2017(2): 206-211.
- [7] 王伟, 杨素德, 李家春, 等. 银翘清热片 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2016, 47(11): 1882-1889.
- [8] 胡云飞, 裴月梅, 吴虹, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术研究不同产地牡丹皮药材化学成分的差异 [J]. 中草药, 2016, 47(17): 2984-2992.
- [9] 段天璇, 马长华, 王文全, 等. HPLC-MS 法鉴定甘草的指纹图谱 [J]. 中国药师, 2009, 12(4): 414-417.
- [10] 肖满珊. 蜜炙黄芪化学成分分析及作用于脾气虚大鼠的药效学评价 [D]. 广州: 广东药学院, 2015.
- [11] Di G, Wang B, Huo Z, et al. Analysis of chemical constituents in an herbal formula Jitong Ning Tablet [J]. J Pharm Biomed Anal, 2017, 140: 301-312.
- [12] Yao H, Chen B, Zhang Y, et al. Analysis of the Total Biflavonoids Extract from *Selaginella doederleinii* by HPLC-QTOF-MS and its *in vitro* and *in vivo* anticancer effects [J]. Molecules, 2017, 22(2): 325.