

消渴清颗粒 UPLC-PDA-ELSD 指纹图谱的建立及 5 个主要成分的测定

王露黔^{1,2}, 王旭³, 佟玲², 李晓稳², 柳文媛^{1*}, 周水平², 孙鹤²

1. 中国药科大学 药物分析教研室, 南京 210009

2. 天津天士力集团研究院, 天津 300402

3. 国家药典委员会, 北京 100061

摘要: 目的 建立消渴清颗粒的 UPLC-PDA-ELSD 指纹图谱研究方法, 并对新芒果苷、芒果苷、知母皂苷 BII、巴马汀和小檗碱进行定量测定, 为消渴清颗粒的质量控制提供依据。方法 采用 RP-UPLC-PDA-ELSD 法, 分别以芒果苷和知母皂苷 BII 为参照峰, 确定了 23 个紫外检测共有指纹峰和 10 个蒸发光检测共有指纹峰, 建立了消渴清颗粒的数字化定量指纹图谱, 并以三级系统指纹定量法鉴定 28 批消渴清样品的质量等级。采用外标法, 测定了 28 批样品中新芒果苷、芒果苷、知母皂苷 BII、巴马汀和小檗碱的量。结果 19 批消渴清颗粒合格, 9 批不合格; 8 批消渴清颗粒中 5 个主要成分的量有异常, 定量测定与指纹图谱结果具有一致性。结论 UPLC 指纹图谱和 5 个成分的定量测定方法准确、稳定、简便, 可作为消渴清颗粒的质量控制依据。

关键词: 消渴清颗粒; 指纹图谱; 新芒果苷; 芒果苷; 知母皂苷 BII; 巴马汀; 小檗碱

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)24-3482-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.24.010

Establishment of UPLC-PDA-ELSD fingerprints of Xiaokeqing Granules and determination of its five main constituents

WANG Lu-qian^{1,2}, WANG Xu³, TONG Ling², LI Xiao-wen², LIU Wen-yuan¹, ZHOU Shui-ping², SUN He²

1. Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2. Tasly R&D Institute, Tianjin Tasly Group Co., Ltd., Tianjin 300402, China

3. Pharmacopoeia Committee of People's Republic of China, Beijing 100061, China

Abstract: Objective To establish a UPLC-PDA-ELSD method for the fingerprint of Xiaokeqing Granules (XG) and to determine the contents of neomangiferin, mangiferin, timosaponin BII, palmatine, and berberine so as to provide the basis for the quality control of XG. **Methods** The chromatographic fingerprints were determined by UPLC-PDA-ELSD using mangiferin and timosaponin BII peaks as the reference peaks, 23 PDA and 10 ELSD common peaks were selected, and the digital quantitative fingerprint of XG was established. Using the third systematic quantified fingerprint method, the quality levels of 28 batches of XG were assessed. The contents of neomangiferin, mangiferin, timosaponin BII, palmatine, and berberine in the 28 batches of samples were determined using external standard method. **Results** Twenty batches of XG were identified as qualified and eight batches were unqualified, in which there were differences in the five main constituents. The quantitative results were consistent with the fingerprint. **Conclusion** The method is accurate, stable, and simple, which could be applied to the quality control of XG.

Key words: Xiaokeqing Granules; fingerprint; neomangiferin; mangiferin; timosaponin BII; palmatine; berberine

消渴清颗粒 (Xiaokeqing Granules, XG) 是由知母、苍术、黄连、蒲黄及地锦草 5 味药组成, 具有滋阴清热、活血化瘀的功效^[1], 且对糖尿病周围神经病变有很好的疗效^[2], 可用于配合抗糖尿病化学药

品用于 2 型糖尿病属阴虚热盛挟血瘀证的治疗^[3]。目前, XG 质量标准定量测定项下仅对知母水解产物中的菝葜皂苷元进行了定量测定, 无法全面表征中药制剂的整体性和复杂性^[4-5]。本实验首次采用超

收稿日期: 2013-08-03

基金项目: “十二五”科技重大专项“重大新药创制”资助 (2013zx09402202)

作者简介: 王露黔 (1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为现代药物分析。Tel: 18322247557 E-mail: luqianwang2008@msn.cn

*通信作者 柳文媛, 教授, 博士生导师。Tel: (025)83271038 E-mail: liuwenyuan8506@163.com

高效液相色谱-二极管阵列-蒸发光散色检测(UPLC-PDA-ELSD)法^[6]建立了XG的指纹图谱,同时对其中新芒果苷、芒果苷、知母皂苷BII、巴马汀和小檗碱进行了定量测定,为消渴清的整体质量的综合性评价提供依据。

1 仪器与材料

Acquity UPLC(美国Waters公司,包括四元高压梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、PDA检测器、Empower3色谱工作站),蒸发光散射检测器(ELSD, Alltech ELSD 2000), XS105型电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司), KQ-500DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), Millipore Simplicity超纯水系统。

乙腈、甲醇(色谱级, Merck); 冰乙酸(色谱纯, 天津康科德有限公司); 三乙胺(色谱纯, 天津市元立化工有限公司); 无水乙醇(分析纯, 利安隆博华天津医药化学有限公司); 对照品芒果苷(批号111607-200402, 质量分数>98%)、知母皂苷BII(批号222839-201102, 质量分数>98%)及小檗碱(批号110713-201212, 质量分数>86.8%)购自中国食品药品检定研究院; 对照品新芒果苷(批号pcm-aa-004-020, 质量分数>98%)及巴马汀(批号pcm-ht-001, 质量分数>97%)购自天津马克生物技术有限公司。

知母、苍术、黄连、蒲黄和地锦草均由天津天士力现代中药资源有限公司提供, 经中国药科大学中药院冯锋教授鉴定为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bunge 的干燥根茎, 菊科植物茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thumb.) DC. 的干燥根茎, 毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎, 香蒲科植物水烛香蒲 *Typha angustifolia* L. 的干燥花粉, 大戟科植物地锦 *Euphorbia humifusa* Willd. 的干燥全草。28批XG(编号S1~S28, 批号分别为130301、121101、120703、120702、120701、120601、120501、120201、111103、111102、111101、110802、110801、100502、100501、090601、090502、090501、090402、090401、090302、090301、080503、080502、080501、110803zs、110802zs、110801zs)由天津天士力制药集团股份有限公司提供。

2 方法和结果

2.1 指纹图谱分析

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Waters Acquity UPLC

HSS C₁₈柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为醋酸盐缓冲溶液(含0.5%乙酸及0.1%三乙胺)-乙腈, 梯度洗脱: 0~4 min, 5%~10%乙腈; 4~8 min, 10%~15%乙腈; 8~13 min, 15%~22%乙腈; 13~15 min, 22%~30%乙腈; 15~18 min, 30%乙腈; 18~20 min, 30%~80%乙腈; 20~23 min, 80%~5%乙腈; 柱温为30℃; 体积流量为0.2 mL/min; 进样量为3 μL; 检测波长为258 nm; ELSD空气体积流量为2.5 L/min; 漂移管温度为105℃, 增益值为1。

2.1.2 供试品溶液的制备 取XG约1.5 g, 研细, 精密称定, 置25 mL量瓶中, 加75%甲醇适量, 超声(功率500 W)30 min, 放置至室温, 加75%甲醇定容至刻度, 0.22 μm微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.3 对照品储备液的制备 取新芒果苷、芒果苷、知母皂苷BII、巴马汀和小檗碱对照品适量, 精密称定, 加75%甲醇溶解, 得到质量浓度分别为0.230、0.696、1.416、0.068、0.216 mg/mL的对照品储备液。

2.1.4 阴性对照溶液的制备 按XG处方与制备工艺, 分别制备缺知母、苍术、黄连、蒲黄和地锦草的阴性对照制剂, 按“2.1.2”项下方法操作, 制备阴性对照溶液。

2.1.5 系统适应性试验 取供试品(批号130301)溶液、对照品溶液(2.3 mL对照品储备液加75%甲醇定容至10 mL)及阴性对照溶液, 按照“2.1.1”项下色谱条件检测, 记录色谱图, 并确定共有峰, 见图1。比较紫外及蒸发光检测谱图确定供试品紫外色谱图(图1-A)中3号峰为新芒果苷、6号峰为芒果苷、19号峰为巴马汀、20号峰为小檗碱; ELSD色谱图(图1-B)中6*号峰为知母皂苷BII。因6和6*号峰响应值较大, 与相邻峰分离较好, 因此分别选作UV及ELSD检测下的参照峰, 并以此计算其他共有峰的相对保留时间及相对峰面积, 此系统条件6号峰理论塔板数≥120 000。

2.1.6 精密度试验 取供试品溶液(批号130301), 连续进样5次, 分别对共有峰相对保留时间和相对峰面积进行考察。供试品中共有峰相对保留时间的RSD<0.1%, 相对峰面积的RSD<3.9%, 表明仪器精密度良好。

2.1.7 重复性试验 取样品(批号为130301)5份, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下方法进行检测, 分别对共有峰的相对保留时间

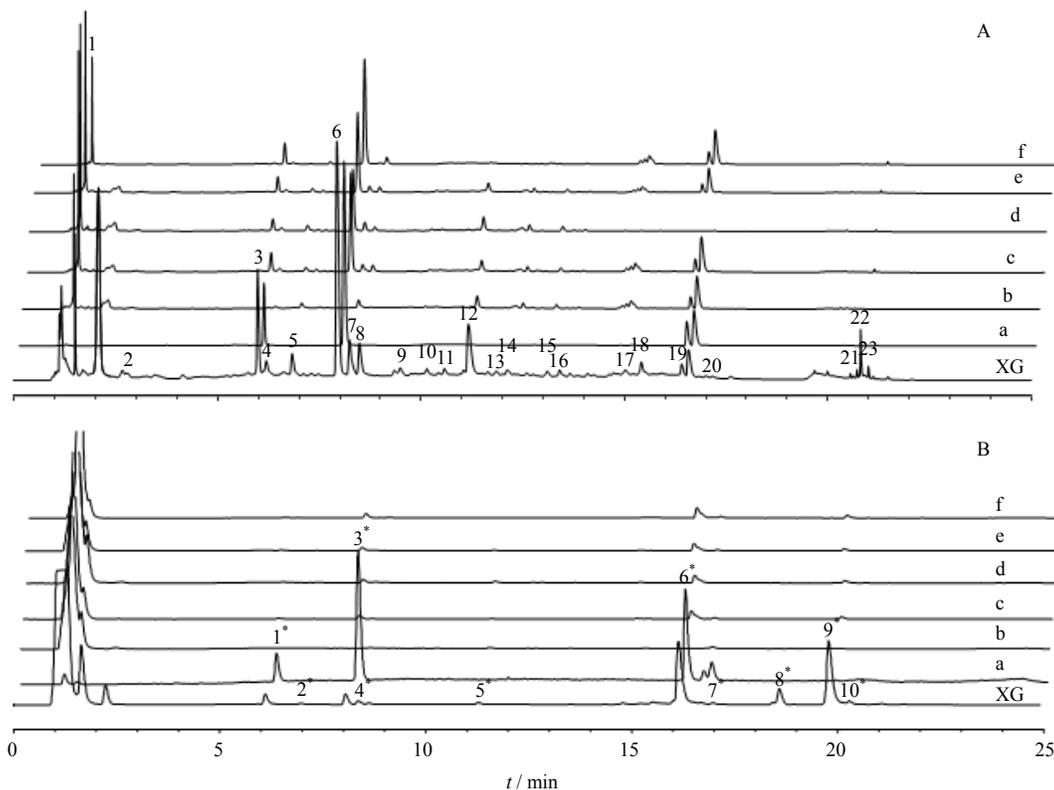


图 1 XG、混合对照品 (a)、阴性对照 [缺知母 (b)、缺黄连 (c)、缺苍术 (d)、缺蒲黄 (e)、缺地锦草 (f)] 的 UPLC-PDA (A) 和 ELSD 色谱图 (B)

Fig. 1 UPLC-PDA (A) and ELSD (B) of XG, reference substances (a), and negative samples [XG without *Anemarrhenae Rhizoma* (b), *Coptidis Rhizoma* (c), *Atractylodis Rhizoma* (d), *Typhae Pollen* (e), or *Euphorbiae Humifusae Herba* (f)]

和相对峰面积进行考察。供试品中共有峰的相对保留时间的 RSD<0.1%，峰面积的 RSD<3.9%，表明重复性良好。

2.1.8 稳定性试验 取 XG 供试品溶液 (批号为 130301)，分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样分析，分别对共有峰的相对保留时间和相对峰面积进行考察。结果表明，供试品中共有峰相对保留时间的 RSD<0.1%，相对峰面积的 RSD<3.9%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.9 指纹图谱质量评价依据 本实验用系统指纹定量法客观、准确地定量描述各化学物质对复方制剂化学指纹的贡献大小。把 XG-UPLC 指纹看作一个整体，用宏定性相似度 (S_m) 从整体监测 XG 的化学指纹数量和分布比例；用宏定量相似度 (P_m) 监测 XG 化学指纹整体含量情况；用样品指纹均化性变动系数 (α) 相对偏差的绝对值限定 XG-UPLC 指纹比例变异范围，其中 S_m 、 P_m 和 α 按文献方法^[7-9] 计算。采用表 1 中所示的系统指纹定量法标准，以 S_m 、 P_m 和 α 共同鉴定中药质量等级，通过上述等级

表 1 系统指纹定量法鉴定中药质量级别标准

Table 1 Standards of Chinese materia medica quality levels identified by system fingerprint quantitative method

等级	S_m	$P_m / \%$	α	质量
I	≥ 0.95	95~105	≤ 0.05	极好
II	0.90~0.95	90~110	0.05~0.10	很好
III	0.85~0.90	80~120	0.10~0.15	好
IV	0.80~0.85	75~125	0.15~0.20	良好
V	0.70~0.80	70~130	0.20~0.30	中
VI	0.60~0.70	60~140	0.30~0.40	一般
VII	0.50~0.60	50~150	0.40~0.50	差
VIII	< 0.5	0~ ∞	> 0.50	劣

划分，并以低于质量 V 级为不合格，对 28 批样品进行质量评价^[9]。

2.1.10 指纹图谱的建立与结果分析 取 28 批样品，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1.1”项下方法进行检测，分别以芒果苷 (6 号) 和知母皂苷 BII (6*号) 为参照物峰，按峰出线率 100%计，

确定 PDA 及 ELSD 检测共有峰个数分别为 23 和 10 个。将积分信号导入“中药色谱指纹图谱超信息特征数字化评价系统 3.0”软件^[9]，按平均值法计算生成标准对照指纹图谱 (PRFP)，计算 28 批样品 S_m 和 P_m 值。以 S_m 、 P_m 为层次聚类分析的变量，28 批样品编号为标记变量，用 SPSS 软件进行层次聚类分析^[10]，结果将 28 批 XG 分为 2 类，第 1 类是质量等级好的批次，第 2 类为质量等级低的批次，见图 2。以第 1 类样品的指纹图谱按平均值法生成对照指纹图谱 (RFP)，见图 3。将 28 批 XG 的图谱信息导入，与 RFP 进行比较，重新计算 S_m 、 P_m 和 α ，

得到最终指纹图谱，见图 4。采用系统指纹定量法，以低于质量 V 级为不合格，对 28 批样品进行质量评价。结果表明，S12、S13、S14、S18、S19、S22、S23、S24、S25 这 9 批次质量不合格，能较大程度的显示批次间差异，很好地区分出质量差异较大，生产批次较早的过期药品，该方法能较好的鉴定出药品质量，可用于对生产药品的质量进行检验。

2.2 定量测定

2.2.1 色谱条件 同“2.1.1”项。

2.2.2 供试品溶液和对照品储备液的制备 同“2.1.2”和“2.1.3”项。

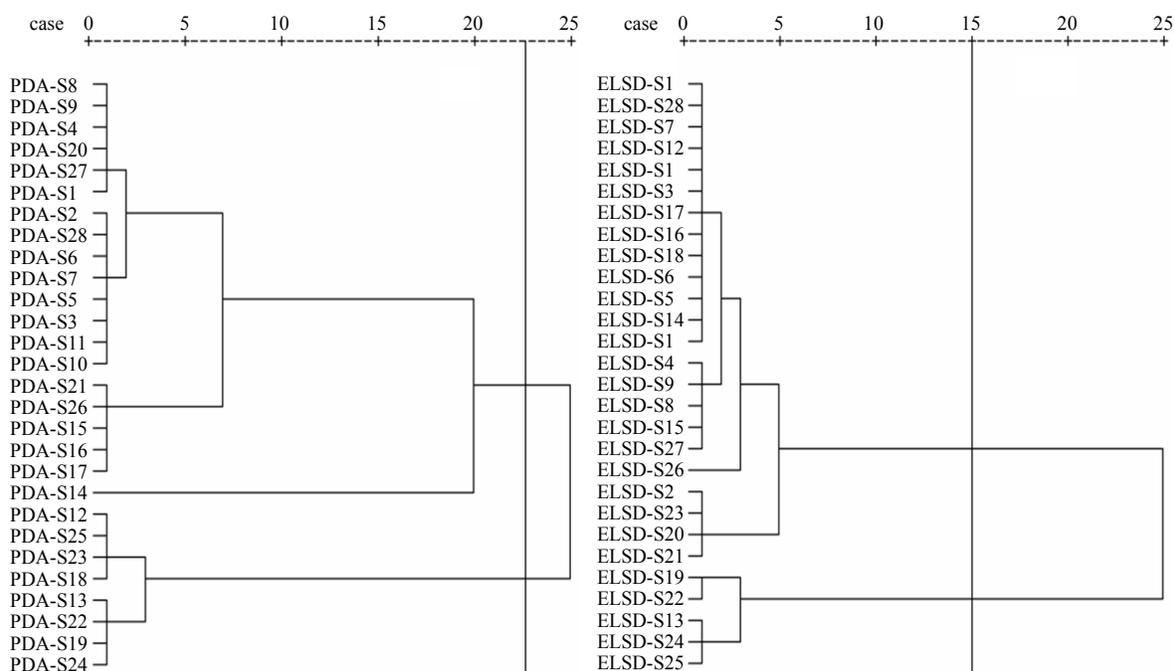


图 2 28 批 XG 的 UPLC-PDA 和 ELSD 聚类谱系图

Fig. 2 UPLC-PDA and ELSD hierarchical clustering dendrogram of 28 batches of XG

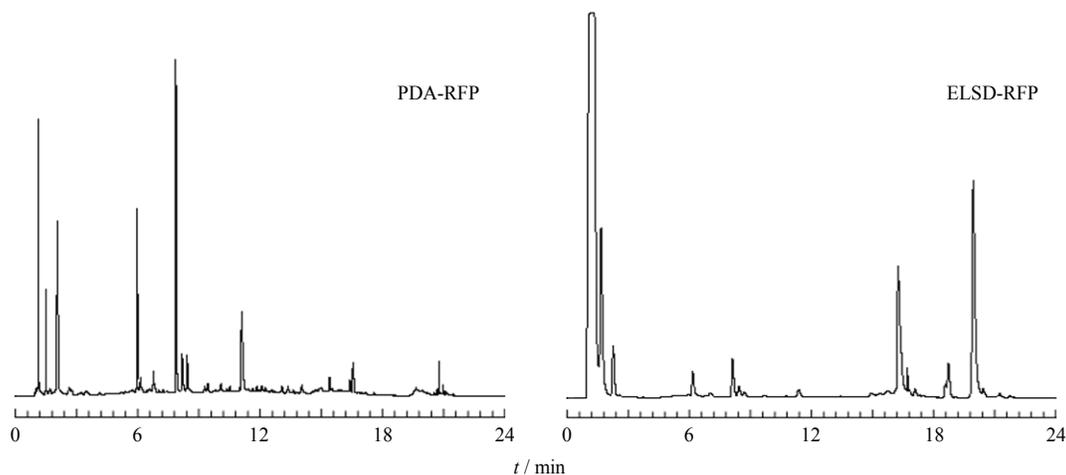


图 3 XG 的 UPLC-PDA 和 ELSD 对照指纹图谱

Fig. 3 UPLC-PDA and ELSD reference fingerprints of XG

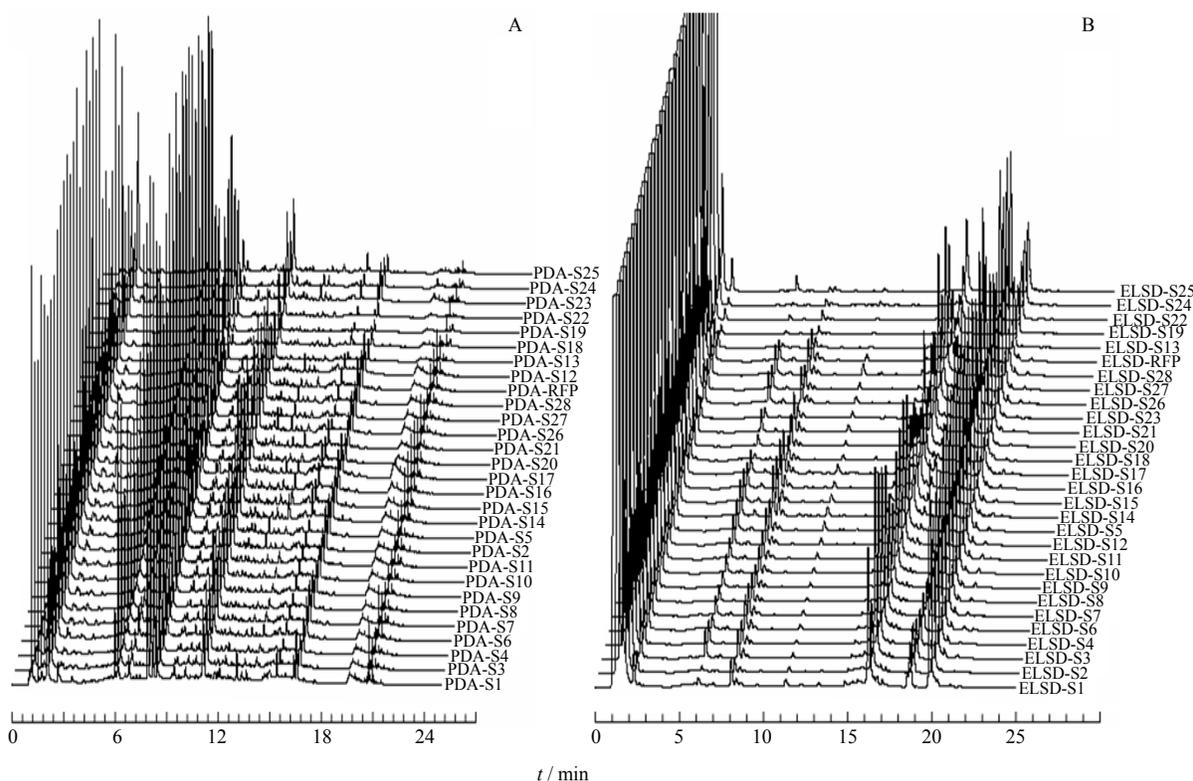


图4 28批XG的UPLC-PDA(A)和UPLC-ELSD(B)指纹图谱

Fig. 4 UPLC-PDA (A) and UPLC-ELSD (B) fingerprints of 28 batches of XG

2.2.3 线性关系考察 精密量取“2.2.2”项下对照品储备液各5.0、3.8、2.3、1.2、0.7、0.4 mL置10 mL量瓶中，加75%甲醇精密稀释至刻度，得到6个不同质量浓度的对照品溶液，按照“2.1.1”项下色谱条件进样测定，新芒果苷、芒果苷、巴马汀和小檗碱以对照品质量浓度为横坐标(X)，峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归；知母皂苷BII以对照品质量浓度的对数值为横坐标(X)，峰面积的对数值为纵坐标(Y)进行线性回归，得回归方程：新芒果苷 $Y=2.71 \times 10^7 X - 4.27 \times 10^4$, $r=0.999\ 0$ ，线性范围9.2~115.0 mg/mL；芒果苷 $Y=3.96 \times 10^7 X - 1.81 \times 10^5$, $r=0.999\ 4$ ，线性范围27.8~348.0 mg/mL；知母皂苷BII $Y=1.10 X + 6.68$, $r=0.999\ 2$ ，线性范围56.6~708.0 mg/mL；巴马汀 $Y=4.79 \times 10^7 X - 2.66 \times 10^4$, $r=0.999\ 6$ ，线性范围2.7~34.0 mg/mL；小檗碱 $Y=3.17 \times 10^7 X - 7.25 \times 10^4$, $r=0.999\ 1$ ，线性范围8.6~108.0 mg/mL；表明在相应质量浓度范围内各对照品溶液线性关系良好。

2.2.4 精密度试验 精密吸取上述对照品溶液(2.3 mL对照品储备液加75%甲醇定容至10 mL)，连续进样5次，测得新芒果苷、芒果苷、知母皂苷BII、巴马汀和小檗碱峰面积的RSD分别为1.2%、1.1%、

1.4%、1.1%、1.2%，表明仪器精密度良好。

2.2.5 重复性试验 取样品(批号130301)5份，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1.1”项下方法进行检测，结果新芒果苷、芒果苷、知母皂苷BII、巴马汀和小檗碱的RSD分别为1.3%、1.3%、1.4%、1.6%、1.2%，表明该方法重复性良好。

2.2.6 稳定性试验 精密吸取上述对照品溶液(2.3 mL对照品储备液加75%甲醇定容至10 mL)，分别于0、2、4、8、12、24 h进样分析，结果新芒果苷、芒果苷、知母皂苷BII、巴马汀和小檗碱的RSD分别为1.7%、1.7%、2.3%、2.2%、1.7%，表明该溶液在24 h内稳定性良好。

2.2.7 加样回收率试验 取9份已知含量的消渴清颗粒(批号130301)，每份0.75 g，按照样品中每种待测成分量的80%、100%、120%定量加入适宜浓度的对照品溶液，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，得到3种不同质量浓度的溶液，各3份，按“2.1.1”项下色谱条件进行测定，计算回收率和RSD。结果测得新芒果苷的平均回收率为101.2%，RSD值为1.5%；芒果苷的平均回收率为99.2%，RSD值为1.0%；知母皂苷BII的平均回收率为100.4%，RSD值为0.9%；巴马汀的平均回收率为

102.4%, RSD 值为 1.5%; 小檗碱的平均回收率为 102.4%, RSD 值为 1.9%。

2.2.8 样品测定 精密称取 28 批样品, 分别按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件测定, 结果见表 2。

表 2 28 批样品中 5 种成分的测定结果
Table 2 Determination of five constituents in 28 batches of samples

编号	质量分数 / (mg·g ⁻¹)				
	新芒果苷	芒果苷	知母皂苷 BII	巴马汀	小檗碱
S1	0.388	1.165	6.306	0.172	0.239
S2	0.350	0.787	4.715	0.164	0.208
S3	1.381	1.448	10.199	0.117	0.161
S4	1.298	1.366	9.623	0.110	0.152
S5	0.804	1.742	9.237	0.150	0.211
S6	0.733	1.597	8.515	0.126	0.191
S7	1.018	1.584	8.188	0.136	0.212
S8	1.146	1.754	8.161	0.167	0.258
S9	0.997	1.384	6.463	0.065	0.278
S10	0.852	1.195	7.057	0.055	0.232
S11	1.043	1.448	8.148	0.065	0.286
S12	1.529	1.849	8.710	0.165	0.250
S13	1.474	1.785	8.388	0.161	0.239
S14	1.648	2.362	4.448	0.067	0.292
S15	1.898	2.599	5.351	0.178	0.262
S16	1.294	2.423	3.839	0.164	0.236
S17	1.292	2.290	4.114	0.166	0.227
S18	1.139	0.463	5.876	0.037	0.186
S19	0.976	2.103	3.837	0.083	0.322
S20	0.912	2.025	3.903	0.078	0.295
S21	1.279	2.096	4.399	0.073	0.270
S22	1.072	1.624	4.048	0.074	0.305
S23	0.697	0.819	5.768	0.055	0.304
S24	0.536	0.879	6.185	0.077	0.370
S25	0.524	0.229	4.497	0.016	0.087
S26	0.749	0.937	4.150	0.047	0.196
S27	0.860	0.913	4.574	0.053	0.214
S28	0.861	0.914	4.469	0.053	0.217

3 讨论

3.1 提取方法考察

(1) 提取溶剂: 考察了 50% 甲醇和 50% 乙醇, 以成分个数和响应值为依据, 结果表明甲醇的提取

效果优于乙醇; (2) 提取方法: 对加热回流及超声提取 2 种不同提取方式进行了比较, 结果显示超声提取的结果更佳; (3) 提取溶剂用量: 考察提取溶剂用量 (10、25、50 mL), 经比较得出, 25 mL 的提取量高于 10 mL 的提取量, 而 25 mL 的提取量与 50 mL 的提取量无明显差别; 因此, 以 25 mL 甲醇超声提取。(4) 提取溶剂比例: 考察不同体积分数甲醇提取溶液, 分别为水及 25%、50%、75%、95%、100% 甲醇, 结果表明 75% 甲醇提取的成分的量较其他比例的多, 因此选定 75% 甲醇为提取溶剂; (5) 超声时间: 考察了超声时间 10、20、30、40 min, 结果表明超声时间为 30 min 的提取效果与 40 min 相当, 因此确定超声时间为 30 min; (6) 超声次数: 考察了超声提取 1 次和 2 次, 2 次提取的量与 1 次提取的量无明显差别, 结果表明提取 1 次即能把复方中成分提取出来。

3.2 色谱条件考察

考察了乙腈-水、甲醇-水、乙腈-0.1% 甲酸、甲醇-0.1% 甲酸、乙腈-1% 乙酸、乙腈-醋酸盐缓冲溶液 (含 0.1% 乙酸及 0.1% 三乙胺) 及乙腈-醋酸盐缓冲溶液 (含 0.5% 乙酸及 0.1% 三乙胺), 结果表明乙腈-醋酸盐缓冲溶液 (含 0.5% 乙酸及 0.1% 三乙胺) 进行梯度洗脱, 有助提高分离效率, 且能改善生物碱类物质的峰形。

3.3 检测器选择与条件优化

由于 XG 中含有皂苷类成分, 仅用紫外检测器不能完整地评价其质量标准, 因此, 选择 PDA 与 ELSD 检测器联用对复方制剂进行检测。使用 PDA 检测器对样品进行 200~400 nm 全波长扫描, 对各波长下的色谱图进行分析比较。结果表明在 258 nm 下检测到峰的数目较多、响应高、各峰分离良好, 特征峰明显且峰形较好, 因此选定 258 nm 为测定波长。

3.4 指纹图谱与定量测定结果比较

综合考察定量测定与指纹图谱的结果, 指纹图谱中不合格的批次在定量测定中显示 S12、S13、S14 中新芒果苷的量偏高; S18、S25 中芒果苷的量偏低; S19、S22、S23、S24 中小檗碱的量偏高, S25 中小檗碱的量偏低, 综合 2 种方法能对药品质量作出整体评价。

参考文献

- [1] 陈小铭, 倪立, 李金恒, 等. 消渴清的降糖作用 [J]. 中国医院药学杂志, 2005, 25(2): 33-35.

- [2] 尚靖智. 消渴清颗粒联合甲钴胺治疗 56 例糖尿病周围神经病变的疗效观察 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2012, 10(10): 1208-1209.
- [3] 张国民. 消渴清颗粒治疗糖尿病周围神经病变疗效分析 [J]. 西部中医药, 2012, 25(8): 66-67.
- [4] 孙海胜, 戴军平, 刘秀霞, 等. HPLC 法测定消渴清颗粒中菝葜皂苷元的含量 [J]. 西北药学杂志, 1998, 13(6): 246.
- [5] 刘占强, 章顺楠, 刘 彤, 等. 反相高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定消渴清颗粒中菝葜皂苷元的含量 [J]. 药物分析杂志, 2006, 26(9): 1284-1286.
- [6] Su Q, Shang P P, Zhang Y M, *et al.* HPLC Fingerprint and LC-TOF-MS analysis on extract from roots of *Gentiana macrophylla* [J]. *Chin Herb Med*, 2012, 4(3): 245-251.
- [7] 孙国祥, 侯志飞, 张春玲, 等. 色谱指纹图谱定性相似度和定量相似度的比较研究 [J]. 药学学报, 2007, 42(1): 75-80.
- [8] 孙国祥, 胡玥珊, 张春玲, 等. 构建中药数字化指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(1): 160-169.
- [9] 孙国祥, 智雪枝, 张春玲, 等. 中药色谱指纹图谱超信息特征数字化评价系统 [J]. 中南药学, 2007, 5(6): 549-555.
- [10] 孙国祥, 王荧荧, 孙金山. 三级系统指纹定量法评价丹参五波长 HPLC 指纹图谱 [J]. 中南药学, 2010, 8(11): 863-868.