

炒牛蒡子配方颗粒的 HPLC 指纹图谱研究

朱文荣, 李 松

江阴天江药业有限公司, 江苏 江阴 214434

摘要: 目的 建立炒牛蒡子配方颗粒的 HPLC 指纹图谱分析方法。方法 采用高效液相色谱法, 以 Hanbon Hadera C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱; 以乙腈 - 0.05% 磷酸溶液为流动相梯度洗脱; 检测波长 292 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C。结果 炒牛蒡子配方颗粒指纹图谱共有 18 个共有峰, 方法学考察结果良好, 各批炒牛蒡子配方颗粒样品指纹图谱与对照指纹图谱相似度均在 0.90 以上。结论 采用 HPLC 指纹图谱可实现全面和整体的评价, 为有效提高炒牛蒡子配方颗粒的质量控制提供参考。

关键词: 炒牛蒡子配方颗粒; 指纹图谱; 高效液相色谱

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1674 - 5515(2014)02 - 0158 - 04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.02.012

HPLC fingerprint analysis of stir-fried *Arctii Fructus* Formula Granule

ZHU Wen-rong, LI Song

Jiangyin Tianjiang Pharmaceutical Co., Ltd., Jiangyin 214434, China

Abstract: Objective To establish a method of fingerprint analysis on stir-fried *Arctii Fructus* Formula Granule by HPLC. **Methods** The fingerprints were obtained by HPLC with Hanbon Hadera C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) by gradient elution. The solvent system composed of acetonitrile-0.05% phosphoric solution. The detective wavelength was set at 292 nm, the flow rate was 1.0 mL/min, and the column temperature was maintained at 30 °C. **Results** The HPLC specific chromatogram of stir-fried *Arctii Fructus* Formula Granule showed 18 common peaks. The methodological results were good. The similarities of ten batches of samples were above 0.90. **Conclusion** The HPLC fingerprints could realize the comprehensive and overall evaluation on the formulas which could supply the references for improving the quality control of stir-fried *Arctii Fructus* Formula Granule.

Key words: stir-fried *Arctii Fructus* Formula Granule; fingerprints; HPLC

牛蒡子又名大力子、鼠粘子、蝙蝠刺, 为菊科植物牛蒡 *Arctium lappa* L. 的干燥成熟果实, 味辛苦、性寒, 归肺、胃经, 具有疏散风热、宣肺透疹、解毒利咽的功能, 常用于风热感冒、咳嗽痰多、麻疹、风疹、咽喉肿痛、疔腮丹毒、痈肿疮毒^[1]。牛蒡子主要含有木脂素类、脂肪油、糖、蛋白质、挥发油^[2], 其中木脂素类成分一直被认为是牛蒡子的主要活性成分, 该类成分主要包括牛蒡苷和牛蒡苷元^[3-4]。炒牛蒡子为牛蒡子的主要炮制加工品形式。炒牛蒡子配方颗粒以控制配方颗粒中牛蒡苷来评价质量, 显然该方法不能有效、全面地控制炒牛蒡子配方颗粒的质量。目前特征图谱是控制中药质量的有效手段之一, 高效液相色谱法的梯度洗脱程序能

够较好地分离炒牛蒡子中木脂素类各组分, 能够较全面地反映炒牛蒡子的整体信息^[5-6], 故选择 HPLC 作为炒牛蒡子配方颗粒特征图谱的测定方法。本实验采用高效液相色谱法建立炒牛蒡子配方颗粒的指纹图谱分析方法, 为了有效地控制其质量提供科学的方法, 达到从整体上控制炒牛蒡子配方颗粒质量的目的。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪, 包括 G1311C 四元泵、G1329B 进样器、G1315D DAD 检测器; Chemstation B.04.02 化学工作站; KQ—250B 型超声清洗机 (昆山超声电子设备有限公司)。

收稿日期: 2013-05-13

作者简介: 朱文荣 (1968—), 男, 从事中药工艺、质量标准的研究及管理工作。Tel: (0510) 86402819 E-mail: txzwr@sina.com.cn

1.2 试药

牛蒡苷对照品(批号 110819-200203)购于中国食品药品检定研究院。乙腈为色谱纯;水为娃哈哈纯净水;其它试剂均为分析纯。炒牛蒡子配方颗粒(批号 0607061、0702036、0705059、0802197、0807118、0901013、0910139、1003092、1008120、1012026;规格 1 g/袋)均由江阴天江药业有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Hanbon Hedera C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.05%磷酸溶液, 进行梯度洗脱, 见表 1。检测波长: 316 nm; 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样体积: 10 μL。在此色谱条件下, 按牛蒡苷峰计算理论塔板数不低于 5 000, 与其他色谱峰的分离度大于 1.5, 见图 1。

表 1 梯度洗脱
Table 1 Gradient elution

t / min	乙腈 / %	0.05%磷酸 / %
0→5	10	90
5→10	10→15	90→85
10→12	15→20	85→80
12→35	20→32	80→68
35→55	32	68
55→65	32→45	68→55

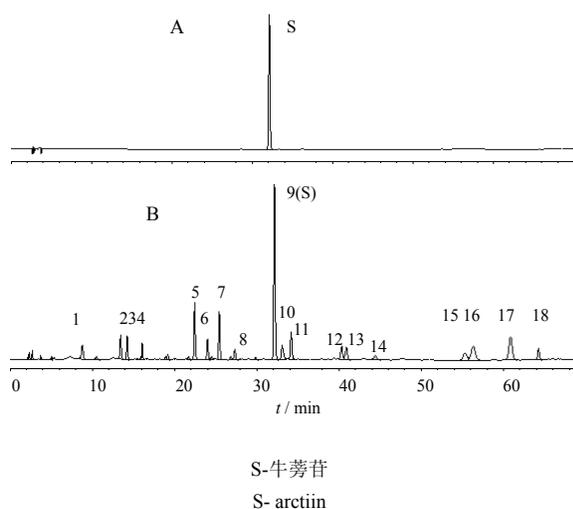


图 1 牛蒡苷对照品(A)和炒牛蒡子配方颗粒样品(B)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of arctiin reference substance (A) and stir-fried *Arctii Fructus* Formula Granule (B)

2.2 对照品溶液的制备

取牛蒡苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成 0.5 mg/mL 的溶液, 即得。

2.3 供试品溶液的制备

取装量差异项下的样品适量, 研细, 取约 0.2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称定质量, 超声处理(功率 250 W, 频率 50 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 加甲醇补足缺失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取批号 0901013 样品的供试品溶液, 连续进样 6 次, 以 9 号峰牛蒡苷为参照峰, 计算得 1~18 号共有峰指纹峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均小于 3%。

2.4.2 重复性试验 取批号 0901013 样品共 6 份, 制备供试品溶液, 进样分析。结果表明, 各主要特征色谱峰相对保留时间和其相对峰面积无明显变化, 以 9 号峰牛蒡苷为参照峰, 其 RSD 值均小于 3%。

2.4.3 稳定性试验 取批号 0901013 样品, 制备供试品溶液, 分别在 0、2、4、6、8、10 h 进样 10 μL, 以 9 号峰牛蒡苷为参照峰, 考察特征峰相对保留时间和相对峰面积的一致性, 结果 1~18 号共有峰指纹峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均小于 3%, 表明供试品溶液在 10 h 内稳定。

2.5 指纹图谱的建立

精密吸取供试品溶液各 10 μL 注入高效液相色谱仪, 将其导入采用药典委员会推荐的中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版), 进行色谱峰匹配, 结果见图 2。以 9 号峰牛蒡苷为参照峰, 确定 18 个共有峰为构成炒牛蒡子配方颗粒指纹图谱的特征峰。

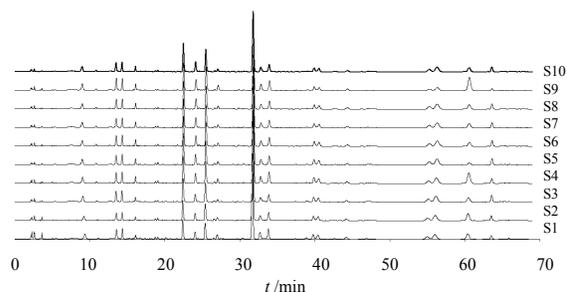


图 2 10 批炒牛蒡子配方颗粒的指纹图谱

Fig. 2 Fingerprints of 10 batches of stir-fried *Arctii Fructus* Formula Granule

不同批次的炒牛蒡子配方颗粒相对保留时间、相对峰面积见表 2、3，与对照指纹图谱相似度计算结果见表 4。结果表明不同批次样品的相似度基本

上均在 0.9 以上，相似度良好。建议按中药色谱指纹图谱相似度评价系统，供试品指纹图谱与对照指纹图谱相似度应不得低于 0.90。

表 2 炒牛蒡子配方颗粒的共有峰的相对保留时间 (n=2)

Table 2 Relative retention times of common peaks for fingerprints of stir-fried *Arctii Fructus* Formula Granule (n=2)

批号	相对保留时间																	
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18
0607061	0.287	0.424	0.449	0.505	0.703	0.753	0.797	0.851	1	1.031	1.066	1.255	1.274	1.389	1.729	1.760	1.901	2.002
0702036	0.283	0.423	0.448	0.504	0.703	0.753	0.797	0.851	1	1.031	1.066	1.255	1.275	1.389	1.730	1.762	1.901	2.002
0705059	0.281	0.422	0.447	0.504	0.703	0.752	0.796	0.851	1	1.031	1.066	1.255	1.274	1.388	1.727	1.759	1.899	2.000
0802197	0.280	0.422	0.447	0.504	0.703	0.753	0.797	0.851	1	1.031	1.066	1.255	1.274	1.388	1.729	1.761	1.900	2.000
0807118	0.280	0.423	0.448	0.504	0.704	0.754	0.798	0.851	1	1.031	1.066	1.254	1.274	1.388	1.729	1.761	1.899	2.000
0901013	0.280	0.423	0.448	0.504	0.703	0.754	0.798	0.851	1	1.031	1.066	1.254	1.274	1.388	1.728	1.760	1.899	2.000
0910139	0.280	0.423	0.448	0.504	0.704	0.754	0.798	0.851	1	1.031	1.066	1.254	1.274	1.388	1.729	1.761	1.899	2.001
1003092	0.281	0.423	0.447	0.504	0.703	0.754	0.798	0.851	1	1.031	1.066	1.254	1.274	1.388	1.729	1.760	1.900	2.000
1008120	0.280	0.423	0.448	0.504	0.704	0.752	0.798	0.851	1	1.031	1.066	1.254	1.274	1.388	1.729	1.760	1.899	2.000
1012026	0.281	0.423	0.448	0.504	0.704	0.754	0.798	0.851	1	1.031	1.066	1.254	1.274	1.388	1.729	1.760	1.899	2.000
平均值	0.281	0.423	0.448	0.504	0.703	0.753	0.798	0.851	1	1.031	1.066	1.254	1.274	1.388	1.729	1.760	1.900	2.001
RSD/%	0.787	0.134	0.141	0.063	0.073	0.109	0.087	0	0	0	0	0.041	0.026	0.030	0.046	0.048	0.043	0.042

表 3 炒牛蒡子配方颗粒的共有峰的相对峰面积 (n=2)

Table 3 Relative peak areas of common peaks for fingerprints of stir-fried *Arctii Fructus* Formula Granule (n=2)

批号	相对峰面积																	
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18
0607061	0.352	0.488	0.227	0.115	0.104	0.116	0.178	0.255	1	0.544	0.400	1.569	1.861	0.037	0.714	0.313	0.728	0.282
0702036	0.204	0.303	0.201	0.104	0.122	0.093	0.185	0.203	1	0.579	0.405	1.548	1.770	0.036	0.684	0.278	0.707	0.266
0705059	0.177	0.205	0.140	0.089	0.102	0.089	0.217	0.209	1	0.596	0.346	1.132	2.303	0.034	0.695	0.341	0.753	0.393
0802197	0.135	0.212	0.158	0.113	0.101	0.080	0.189	0.196	1	0.792	0.521	1.494	2.134	0.051	0.826	0.366	0.830	0.347
0807118	0.499	0.613	0.277	0.158	0.114	0.127	0.287	0.349	1	0.871	0.558	1.476	2.235	0.037	0.869	0.383	0.875	0.370
0901013	0.172	0.142	0.107	0.086	0.111	0.069	0.169	0.210	1	0.676	0.405	1.348	1.405	0.044	0.574	0.220	0.584	0.219
0910139	0.151	0.222	0.165	0.117	0.099	0.080	0.222	0.362	1	0.714	0.424	1.502	1.476	0.036	0.588	0.218	0.615	0.217
1003092	0.170	0.255	0.177	0.110	0.110	0.091	0.233	0.367	1	0.715	0.424	1.497	1.459	0.036	0.580	0.214	0.607	0.213
1008120	0.151	0.222	0.165	0.117	0.099	0.080	0.182	0.264	1	0.666	0.440	1.488	1.498	0.043	0.594	0.235	0.623	0.225
1012026	0.177	0.242	0.188	0.093	0.153	0.084	0.288	0.353	1	0.604	0.547	1.612	1.663	0.038	0.744	0.337	0.754	0.253

3 讨论

3.1 提取条件和色谱条件的优化

分别比较了超声提取、加热回流和振摇提取等三种不同的提取方式，结果发现不同的提取方式对色谱峰的数目没有影响，考虑到实验操作的方便性，因此采用超声提取的方式作为供试品的提取方式。采用二极管阵列检测器对样品图谱进行全波长扫

描，结果在检测波长低于 290 nm 下的色谱峰中牛蒡苷的色谱峰比较突出，而其他峰均不明显，因此暂不考虑其作为检测波长。而在 292 nm 检测波长中，样品峰数比较丰富且样品中其他色谱峰均能达到基线分离，考虑到牛蒡苷作为参考峰，因此最终确定 292 nm 作为检测波长。在流动相系统选择中，分别以乙腈 - 水、乙腈 - 0.1% 醋酸、乙腈 - 0.05%

表4 10批炒牛蒡子配方颗粒相似评价

Table 4 Similarity evaluation of 10 batches of stir-fried *Arctii Fructus* Formula Granule

批号	0607061	0702036	0705059	0802197	0807118	0901013	0910139	1003092	1008120	1012026	对照图谱
0607061	1.000	0.994	0.993	0.984	0.984	0.983	0.976	0.980	0.917	0.976	0.982
0702036	0.994	1.000	0.994	0.994	0.985	0.987	0.984	0.988	0.923	0.984	0.988
0705059	0.993	0.994	1.000	0.985	0.995	0.994	0.990	0.992	0.900	0.990	0.994
0802197	0.984	0.994	0.985	1.000	0.976	0.986	0.986	0.988	0.956	0.986	0.988
0807118	0.984	0.985	0.995	0.976	1.000	0.997	0.994	0.995	0.891	0.994	0.996
0901013	0.983	0.987	0.994	0.986	0.997	1.000	0.999	1.000	0.920	0.999	1.000
0910139	0.976	0.984	0.990	0.986	0.994	0.999	1.000	0.999	0.930	1.000	0.999
1003092	0.980	0.988	0.992	0.988	0.995	1.000	0.999	1.000	0.929	0.999	1.000
1008120	0.917	0.923	0.900	0.956	0.891	0.920	0.930	0.929	1.000	0.93	0.925
1012026	0.986	0.984	0.990	0.986	0.994	0.999	1.000	0.999	0.930	1.000	0.998
对照图谱	0.982	0.988	0.994	0.988	0.996	1.000	0.999	1.000	0.925	0.999	1.000

磷酸等不同体积分数、不同比例的流动相系统进行等度和梯度洗脱试验。结果表明,用乙腈-0.05%磷酸进行梯度洗脱为佳,峰形尖锐且分离度较好,各峰的保留时间适中,因此确定采用乙腈-0.05%磷酸的不同体积比进行梯度洗脱。

3.2 结果分析

运用中药色谱指纹图谱相似度评价系统,取不同批次的炒牛蒡子配方颗粒,按上述供试品溶液的制备方法及其色谱条件进行检测,对数据进行分析,以不同批次的炒牛蒡子配方颗粒的均值生成对照指纹图谱,经相似度评价软件计算不同批次的配方颗粒与对照图谱之间的相似度,结果表明不同批次的相似度基本上均在0.9以上,说明不同批次的炒牛蒡子配方颗粒质量稳定,炒牛蒡子配方颗粒的指纹图谱作为一种现代分析手段,完全可以用于控制炒

牛蒡子配方颗粒的质量。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 2010年版. 一部. 2010: 145.
- [2] 李燕, 孙敬勇, 武海燕, 等. 牛蒡子化学成分及药理作用研究进展 [J]. 齐鲁药事, 2009, 28(12): 738-740.
- [3] 杜斌贝, 姚映苜, 王全权, 等. 中药牛蒡子的近期实验及临床研究 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(4): 649-650.
- [4] 周渭渭, 刘振国, 单淇, 等. 牛蒡子中牛蒡子苷元的分离及结构表征 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(4): 279-283.
- [5] 康凯, 窦德强, 许亮, 等. 牛蒡子炮制前后HPLC指纹图谱及牛蒡苷含量比较 [J]. 中国现代中药, 2009, 11(10): 22-25.
- [6] 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): 24-26, 37.