

坤宁颗粒的 HPLC 指纹图谱研究

吴建雄, 秦建平, 刘峰, 刘光大

亿帆医药股份有限公司, 浙江 杭州 310000

摘要: 目的 建立坤宁颗粒 HPLC 指纹图谱, 为其质量控制提供依据。方法 采用 Kromasil 100-5 C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 - 0.1% 磷酸溶液, 梯度洗脱; 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长 0~12 min 为 280 nm, 12~55 min 为 230 nm; 柱温: 30℃; 进样量: 10 μL。对指纹图谱共有峰进行指认, 分析相似度, 并考察了药材与制剂的相关性。结果 测定了 10 批坤宁颗粒, 选择柚皮苷作为参照物, 提取 14 个色谱峰作为指纹图谱共有峰, 并将共有峰归属到各药材; 10 批样品相似度均大于 0.95。结论 该法重复性好, 简便可靠, 为坤宁颗粒的质量控制和评价提供了依据。

关键词: 坤宁颗粒; 指纹图谱; 柚皮苷; 共有峰; 相似度

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2020)03-0447-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.03.011

HPLC Fingerprint of Kunning Granules

WU Jian-xiong, QIN Jian-ping, LIU Feng, LIU Guang-da

Yifan Pharmaceutical Co. Ltd, Hangzhou 310000, China

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint for the quality control of Kunning Granules. **Methods** The Kromasil 100-5 C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used with a mobile phase of acetonitrile - 0.1% phosphoric acid for gradient elution. The flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 30 °C, and the detection wavelength was set at 280nm during 0 — 12 min and 230 nm during 12 — 55 min. The common peaks of fingerprints were identified, the similarity was analyzed, and the correlation between herbs and preparations was investigated. **Results** Fingerprints of 10 batches of Kunning Granules were analyzed, naringin was selected as reference, and 14 common peaks were marked and attributed to the herbs. The similarity degrees of 10 batches of the samples were above 0.95. **Conclusion** The method is reproducible, simple and reliable that it can be used for the quality control and evaluation of Kunning Granules.

Key words: Kunning Granules; fingerprint; naringin; common peak; similarity degree

坤宁颗粒是由益母草、当归、赤芍、丹参、郁金、牛膝、枳壳、木香、荆芥(炒炭)、干姜(炒炭)和茜草 11 味中药经提取、浓缩和干燥后加一定的赋形剂制成的中药颗粒剂, 具有活血行气、止血调经之功效, 用于气滞血瘀所致妇女月经过多、经期延长^[1-2]。目前, 该制剂的质量控制方法主要为薄层色谱法鉴别^[3]和盐酸水苏碱的含量测定^[4], 但难以全面控制制剂的内在质量。本实验采用 HPLC 波长切换法进行坤宁颗粒的指纹图谱研究, 为更合理地控制坤宁颗粒的质量、保证产品批间的一致性提供了依据, 也可作为全面控制坤宁颗粒质量的有效方法之一。

1 仪器和试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪、DAD 紫外检测器(安捷伦公司); KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); XP6 电子分析天平(瑞士梅特勒公司); Mettler AE240 电子分析天平(瑞士梅特勒公司); Centrifuge 5415D 高速离心机(德国 Eppendorf 公司)。

丹参素钠(批号 110855-201614, 质量分数 98.1%)、芍药苷(批号 110736-201842, 质量分数 97.4%)、柚皮苷(批号 110722-201815, 质量分数 91.7%)、新橙皮苷(批号 111857-201804, 质量分数 99.4%)、橙皮苷(批号 110721-201818, 质量分

收稿日期: 2020-01-17

基金项目: 安徽省科技重大专项 (18030801127)

作者简介: 吴建雄 (1979—), 男, 高级工程师, 研究方向为中药质量标准研究。Tel: (0551)81152321 E-mail: wujianx20@163.com

数 96.2%) 和丹酚酸 B (批号 111562-201716, 质量分数 94.1%) 对照品均购自中国食品药品检定研究院; 芍药内酯苷对照品 (批号 MUST-13112201, 质量分数 $\geq 98\%$) 购自成都曼思特生物科技有限公司; 乙腈 (色谱纯, 默克公司), 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

坤宁颗粒由宿州亿帆药业有限公司生产, 规格 8 g/袋, 相当于生药量 3.125 g/g, 批号分别为 180619、180620、180621、181001、181002、181003、181004、190801、190802、190803。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Kromasil 100-5 C_{18} 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈 (A) - 0.1% 磷酸溶液 (B), 梯度洗脱, 线性洗脱程序为 0~35 min 5% $\rightarrow$ 35% A, 35~55 min 35% $\rightarrow$ 95% A; 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长 0~12 min 为 280 nm, 12~55 min 为 230 nm; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样量: 10 μ L。

2.2 对照品溶液的制备

分别取丹参素钠、芍药内酯苷、芍药苷、柚皮苷、新橙皮苷、橙皮苷和丹酚酸 B 对照品适量, 加 50% 甲醇制成约含 40 μ g/mL 的单一对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取坤宁颗粒样品研细, 取约 1 g, 精密称定, 精密加入 50% 甲醇 50 mL, 超声 (250 W, 40 kHz) 提取 30 min, 放冷, 离心, 取上清液, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取批号 180619 坤宁颗粒供试品溶液, 连续进样 6 次进行测定。以柚皮苷为参照峰, 计算指纹图谱中各共有峰的相对保留时间、相对峰面积。结果 14 个共有峰的相对保留时间 RSD 值均 $< 0.6\%$, 相对峰面积 RSD 值均 $< 2.8\%$ 。

2.4.2 稳定性试验 取批号 180619 坤宁颗粒供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、9、12 h 进样测定指纹图谱。以柚皮苷为参照峰, 计算指纹图谱中各共有峰的相对保留时间、相对峰面积。结果 14 个共有峰的相对保留时间 RSD 值 $< 0.6\%$, 相对峰面积 RSD 值 $< 3.3\%$, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 取批号 180619 坤宁颗粒 6 份, 制备供试品溶液, 进样测定, 记录色谱图。以柚皮苷为参照峰, 计算指纹图谱中各共有峰的相对保留时间、相对峰面积。结果 14 个共有峰的相对保留时间 RSD 值均 $< 0.5\%$, 相对峰面积 RSD 值均 $< 3.5\%$ 。

2.5 样品测定

取不同批次的坤宁颗粒, 制备供试品溶液, 进样测定, 分别得到 10 批样品的指纹图谱。见图 1。

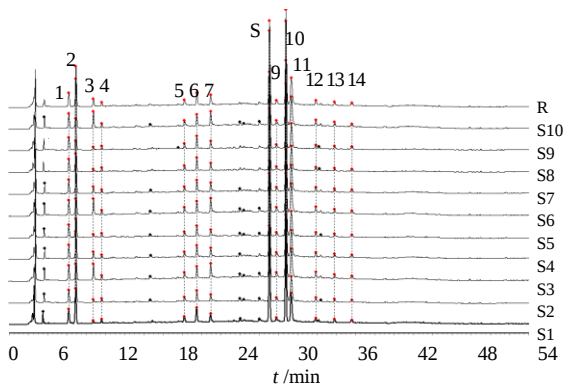


图 1 坤宁颗粒的指纹图谱

Fig. 1 Fingerprint of Kunning Granules

2.6 指纹图谱共有峰的指认

取坤宁颗粒, 制备供试品溶液; 取芍药苷、芍药内酯苷、新橙皮苷、柚皮苷、橙皮苷、丹酚酸 B 和丹参素钠对照品制备对照品溶液, 进样测定。对比各吸收峰的紫外吸收光谱和保留时间, 指认出 4 号峰为丹参素钠、6 号峰为芍药内酯苷、7 号峰为芍药苷、S 号峰为柚皮苷、9 号峰为橙皮苷、10 号峰为新橙皮苷、12 号峰为丹酚酸 B。

2.7 指纹图谱的建立和相似度分析

将 10 批坤宁颗粒色谱图采用国家药典委员会颁布的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012.130723 版》进行分析, 生成坤宁颗粒共有模式的对照指纹图谱, 标定 14 个共有峰, 去除溶剂峰后 14 个共有峰峰面积占总峰面积 90% 以上, 对照指纹图谱见图 2。10 批所测供试品色谱图与对照指纹图谱相似度分别为 0.998、0.999、0.988、0.993、0.981、0.992、0.998、0.985、0.990、0.987。结果表明 10 批坤宁颗粒样品的相似度均在 0.95 以上, 表明不同批次样品整体质量差异较小。

2.8 药材与制剂的相关性

取坤宁颗粒处方中 11 味药材和坤宁颗粒制备供试品溶液, 进样测定, 对比各吸收峰的紫外吸收光谱和相对保留时间, 得到坤宁颗粒指纹图谱中的 14 个特征峰在 11 味药材中的归属, 见图 3。结果表明 1、2、6、7、11 号峰来自赤芍, 4、12 号峰来自丹参, 5 号峰来自益母草, S、9、10 号峰来自枳壳, 3、13 号峰来自牛膝、14 号峰来自当归。提示 6 味药材对建立的坤宁颗粒指纹图谱有贡献, 其他药味

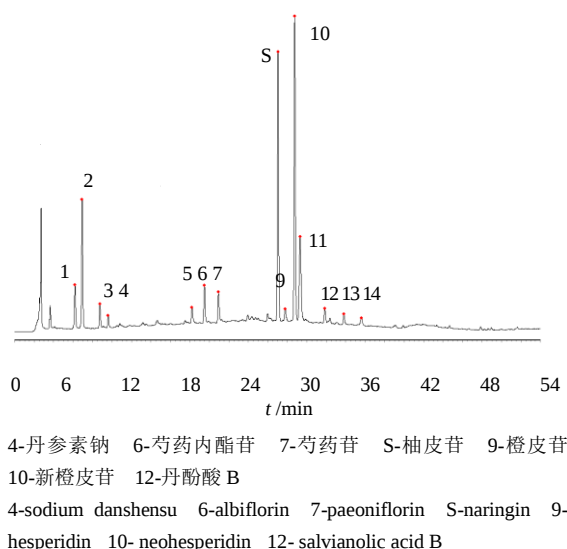


图 2 坤宁颗粒对照指纹图谱

Fig. 2 Reference fingerprint of Kunning Granules

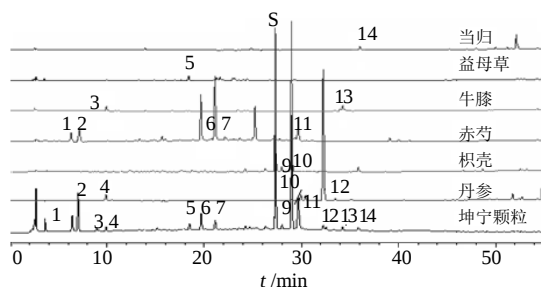


图 3 坤宁颗粒指纹图谱共有峰的药材归属

Fig. 3 HPLC fingerprint assignments of characteristic peaks in medicinal materials of Kunning Granules

如郁金、木香、荆芥（炒炭）、干姜（炒炭）和茜草中主要化学成分无紫外吸收或响应较低，在建立的指纹图谱中无体现。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

通过 DAD 检测器在 190~400 nm 全扫描，结果为 0~12 min 在 280 nm 下、12~55 min 在 230 nm 下测得的图谱能较全面地反映坤宁颗粒中的化学成分，且各色谱峰分离较好。为保证信息的全面，采用 280、230 nm 进行切换测定坤宁颗粒指纹图谱，尽可能在同一指纹图谱条件下反映了坤宁颗粒化学成分全貌。比较了乙腈 - 0.1% 磷酸溶液、乙腈 - 1%

乙酸溶液、乙腈 - 1% 甲酸溶液和乙腈 - 水流动相体系对坤宁颗粒指纹图谱的影响，结果乙腈 - 0.1% 磷酸系统所得指纹图谱中各色谱峰分离情况和峰形较好，基线平稳，因此坤宁颗粒指纹图谱流动相选择乙腈 - 0.1% 磷酸系统。选用 3 根不同厂家色谱柱进行实验，比较分离度和峰型，结果表明 Kromasil 100-5 C₁₈ 色谱柱较合适。同时比较了不同柱温和不同体积流量，最终确定了坤宁颗粒指纹图谱分析的最佳色谱条件。

3.2 供试品溶液制备方法的选择

分别以不同体积分数的乙醇和甲醇为提取溶剂，并比较超声和回流两种提取方式，结果表明 50% 甲醇提取时，供试品色谱图中色谱峰多且峰型较好；超声和回流提取得到的色谱图无明显差别。为操作简便，实验选择 50% 甲醇为提取溶剂进行超声提取。

3.3 参照物的选择

坤宁颗粒处方由益母草、当归、赤芍、丹参、郁金、牛膝、枳壳、木香、荆芥（炒炭）、干姜（炒炭）和茜草 11 味中药组成，根据对各药味的分析，其主要有效可测成分为芍药苷、芍药内酯苷、新橙皮苷、柚皮苷、橙皮苷、丹酚酸 B 和丹参素钠，其中柚皮苷含量较高，分离较好，保留时间较为适中，含量较稳定，因此选择柚皮苷作为参照物。

本研究建立的指纹图谱为坤宁颗粒的质量评价提供了依据，为工业化生产提供参考。为了更全面地反映坤宁颗粒中的化学成分，建议在今后的质量控制方法研究中采用 HPLC-ELSD 和 GC 法对其他成分进行考察，并严格控制处方中药材的质量，为全面控制坤宁颗粒质量提供依据。

参考文献

- [1] 夏光惠. 坤宁颗粒治疗妇科血证临床观察 [J]. 中医临床杂志, 2008, 20(5): 481-482.
- [2] 汪帆. 优思明联合坤宁颗粒用于人工流产后 90 例临床探讨 [J]. 中外医疗, 2015(33): 171-173.
- [3] 郑倩, 毕雪艳, 李显峰, 等. 坤宁颗粒的薄层色谱鉴别 [J]. 中国药业, 2011, 20(3): 24.
- [4] 郑倩, 毕雪艳, 李晓敏. HPLC 法测定坤宁颗粒中盐酸水苏碱的含量 [J]. 中国药事, 2010, 24(4): 392-393.