

止动颗粒 UPLC 指纹图谱建立及 3 种成分测定

沈 晨^{1,2,3}, 魏婷婷^{1,2,3}, 韩园园^{2,3}, 钱长敏^{2,3}, 宋兆辉^{2,3,4*}

1. 中国药科大学, 江苏 南京 210009

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 300410

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 300410

4. 天津中医药大学, 天津 301617

摘要: **目的** 建立止动颗粒 UPLC 指纹图谱, 并测定其中 3 种成分的含量。**方法** 以黄芩苷为参照峰, 建立 11 批样品的 UPLC 指纹图谱, 采用 Acquity HSS T3 色谱柱 (150 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 流动相为 0.1% 甲酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱, 体积流量 0.3 mL/min, 柱温 40 °C, 检测波长 254 nm, 测定黄芩苷、栀子苷和芍药苷的含量。**结果** 建立了 UPLC 指纹图谱, 鉴定了没食子酸、车叶草苷、去乙酰车叶草苷酸甲酯、绿原酸、京尼平 1-β-D-龙胆双糖苷、栀子苷、芍药苷、白杨素-6-C-β-D-葡萄糖-8-C-α-L-阿拉伯糖苷、白杨素-6-C-α-L-阿拉伯吡喃糖-8-C-β-D-葡萄糖苷、白杨素-6-C-α-L-阿拉伯吡喃糖-8-C-β-D-葡萄糖苷异构体、黄芩苷、黄芩苷异构体、千层纸素 A-7-O-葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷、汉黄芩素、五味子醇甲 16 个成分, 11 批制剂相似度达到 0.98 以上。黄芩苷、栀子苷、芍药苷分别在 12.15~388.80 μg/mL、6.52~209.00 μg/mL、8.38~268.00 μg/mL 线性关系良好, 平均加样回收率 (RSD) 分别为 100.98% (3.04%)、100.49% (0.60%)、100.55% (2.73%)。11 批制剂中黄芩苷为 7.46~12.40 mg/g, 栀子苷为 7.01~13.27 mg/g, 芍药苷为 7.68~12.76 mg/g。**结论** 该方法准确简单, 稳定可靠, 可用于止动颗粒质量控制。

关键词: 止动颗粒; UPLC; 指纹图谱; 黄芩苷; 栀子苷; 芍药苷; 没食子酸; 车叶草苷; 绿原酸; 汉黄芩苷; 汉黄芩素; 五味子醇甲

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)02-0388-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.02.017

Establishment of UPLC fingerprints of Zhidong Granules and determination of three constituents

SHEN Chen^{1,2,3}, WEI Ting-ting^{1,2,3}, HAN Yuan-yuan^{2,3}, QIAN Chang-min^{2,3}, SONG Zhao-hui^{2,3,4}

1. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2. TCM Research Center, Tasly Holding Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China

3. State Key Laboratory of Critical Technology in Innovative Chinese Medicine, Tasly Pharmaceutical Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China

4. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Objective To establish the UPLC fingerprints of Zhidong Granules (ZG) and determine the content of three constituents.

Methods With baicalin as a reference peak, the UPLC fingerprints of 11 batches of samples were established. The analysis of ZG was performed on a 40 °C thermostatic Acquity HSS T3 column (150 mm × 2.1 mm, 1.8 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.1% formic acid flowing at 0.3 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 254 nm.

Results The UPLC fingerprint was established and 16 components were identified (gallic acid, asperuloside, methyl deacetylcyrrhizin, chlorogenic acid, genipin 1-gentiobioside, geniposide, paeoniflorin, chrysin-6-C-β-D-glucopyranosyl-8-C-α-L-arabinopyranoside, chrysin-6-C-α-L-arabopyranose-8-C-β-D-glucoside or isomer, baicalin, baicalin isomer, oroxylin A-7-O-glucuronide, wogonoside, wogonin, and schizandrin). The similarity of 11 batches of preparations were at least 0.98. Baicalin,

收稿日期: 2018-09-05

基金项目: 国家科技重大专项重大新药创制项目“面向国际的创新中药大平台建设”(2013ZX09402202)

作者简介: 沈 晨 (1994—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药物质基础及质量控制。Tel: 18602285731 E-mail: 1255352899@qq.com

*通信作者 宋兆辉 (1978—), 男, 高级工程师, 研究方向为中药新药开发与质量控制研究。Tel: (022)86343795 E-mail: songzh@tasly.com

paeoniflorin, and geniposide showed good linear relationships within the ranges of 12.15—388.80 $\mu\text{g/mL}$, 6.52—209.00 $\mu\text{g/mL}$, and 8.38—268.00 $\mu\text{g/mL}$, whose average recoveries (RSD) were 100.98% (3.04%), 100.49% (0.60%), and 100.55% (2.73%), respectively. The content of baicalin in the 11 batches of preparations was between 7.46 and 12.40 mg/g, the content of geniposide was between 7.01 and 13.27 mg/g, and the content of paeoniflorin was between 7.68 and 12.76 mg/g. **Conclusion** The method is accurate, simple, stable, and reliable, and can be used for quality control of ZG.

Key words: Zhidong Granules; UPLC; fingerprints; baicalin; geniposide; paeoniflorin; gallic acid; asperuloside; chlorogenic acid; wogonoside; wogonin; schizandrin

止动颗粒是由白芍、天麻、栀子、黄芩、蒺藜、钩藤、灵芝、首乌藤、酸枣仁、醋五味子、胆南星 11 味药材制备而成的中成药, 辅料为糊精和阿司帕坦, 具有平肝息风、清火豁痰、宁心安神的功效, 用于以面部、头颈、四肢或躯干部位肌肉不自主的抽动伴有喉部发声为临床表现的抽动症具有显著疗效^[1]。为了能更好地控制该产品的质量, 保证临床疗效, 需建立全面评价该制剂质量的方法。中药指纹图谱技术能从整体层面全面准确地体现中药质量, 该技术具有系统性、特征性和重现性特点^[2], 是目前能够为国内外广泛接受的一种中药质量评价模式^[3-8]; 而 UPLC 相比 HPLC 具有分离度高、速度快、灵敏度高特点^[9]。因此本实验根据止动颗粒主要成分的特性, 以黄芩苷为参照峰, 建立了止动颗粒 UPLC 指纹图谱, 然后采用 Q-TOF-MS 鉴定 16 个共有峰成分, 并测定了 11 批样品, 为全面提升止动颗粒质量标准提供依据。现有质量标准只对单一成分为含量测定的指标, 没有突出中药多成分、多途径、多靶标的优点^[10], 根据本实验室药动学研究结果, 栀子苷、芍药苷和黄芩苷为止动颗粒的主要入血成分, 且含量较高, 并且为指纹图谱中的共有峰成分, 因此本实验拟通过建立多波长 UPLC^[11]法测定此 3 种成分的含量, 以进一步完善止动颗粒的质量标准。

1 仪器及材料

1.1 仪器

超高效液相系统 Acquity UPLC™ 系统, 包括二元梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、PDA 检测器, 美国 Waters 公司; Mettler Toledo Xs205 分析天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; Waters Q-TOF Premier 质谱仪, 英国 Waters MS Technologies 公司; KQ-500DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; Milli-Q 超纯水系统, 美国 Millipore 公司; ST16R 高速冷冻离心机, Thermo Fisher 公司。

1.2 试剂与样品

甲酸、乙腈为色谱纯, Merck 公司; 娃哈哈纯

净水。止动颗粒由天士力控股集团有限公司研究院提供, 共 11 批, 批号为 20110102、2014L01、140901S、20150701、150801、150802、150901、151001、151002、20171102、20180501, 分别编号为 S1~S11; 各阴性样品均由天士力控股集团有限公司研究院提供。对照品黄芩苷 (批号 110715-201318, 质量分数 93.3%)、栀子苷 (批号 110749-201718, 质量分数 97.6%)、芍药苷 (批号 110736-201741, 质量分数 95.7%)、没食子酸 (批号 110831-201204, 质量分数 89.9%)、绿原酸 (批号 110753-201415, 质量分数 96.4%), 均购自中国食品药品检定研究院。

2 方法与结果

2.1 UPLC 指纹图谱

2.1.1 色谱条件 Acquity HSS T3 色谱柱 (150 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水溶液-乙腈; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 2 μL ; 紫外检测波长 254 nm。梯度洗脱程序: 0~3 min, 3% 乙腈; 3~7 min, 3%~7% 乙腈; 7~13 min, 7%~14% 乙腈; 13~24 min, 14%~28% 乙腈; 24~27 min, 28%~35% 乙腈; 27~30 min, 35%~65% 乙腈; 30~32 min, 65%~90% 乙腈; 32~34 min, 90% 乙腈; 34~35 min, 90%~3% 乙腈。

2.1.2 质谱条件 采用电喷雾离子化源 (ESI), MS^E 扫描正负离子模式检测, 扫描范围 m/z 50~1 500, 用亮氨酸脑啡肽作校正液, 进行实时校正。毛细管电压负离子模式 2.5 kV, 正离子模式 2.8 kV, 锥孔电压为 40 V, 雾化气为高纯度氮气, 体积流量为 50 L/h, 碰撞气为氩气, 脱溶剂气体积流量 800 L/h, 脱溶剂温度为 350 $^{\circ}\text{C}$, 离子源温度为 110 $^{\circ}\text{C}$ 。高能量扫描时 trap 电压为 20~60 eV。

2.1.3 对照品溶液的制备 精密称取黄芩苷对照品 12.62 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 甲醇定容, 摇匀, 制成 126.2 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液, 0.22 μm 滤膜滤过, 备用。

2.1.4 供试品溶液的制备 称定止动颗粒粉末 0.5 g, 置于具塞锥形瓶中, 加入 10% 甲醇 50 mL, 称定

质量, 超声 15 min, 放冷, 补足减失的质量, 摇匀, 14 100 r/min 离心 10 min, 上清液用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液即得供试品溶液。

2.1.5 精密度试验 取供试品溶液 (S8) 连续进样 6 次, 以黄芩苷为参照峰, 记录色谱图, 计算各色谱峰相对保留时间、相对峰面积, 测得各色谱峰的相对保留时间 RSD 均小于 1%, 相对峰面积 RSD 均小于 5%, 结果表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 取同一批样品 (S8), 按“2.1.4”项下供试品制备方法制得 6 份供试品溶液, 以“2.1.1”项色谱条件进样, 以黄芩苷为参照峰, 记录色谱图, 计算各色谱峰相对保留时间、相对峰面积, 测得各色谱峰的相对保留时间 RSD < 1%, 相对峰面积 RSD < 5%。结果表明本方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 取同一批样品 (S8), 按“2.1.4”项下供试品制备方法制得供试品溶液, 以“2.1.1”项色谱条件, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样分析, 以黄芩苷为参照峰, 记录色谱图, 计算各色谱峰相对保留时间、相对峰面积, 测得各色谱峰的相

对保留时间 RSD < 1%, 相对峰面积 RSD < 5%。结果表明, 供试品溶液室温放置 24 h 内稳定。

2.1.8 指纹图谱的建立 将 11 批止动颗粒的供试品溶液依次进样分析, 采集色谱图。对各批次供试品图谱进行积分, 导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012 版本”软件, 以黄芩苷 (11 号峰) 为参照峰 (S), 计算各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积, 确定 254 nm 条件下 16 个共有峰, 并按均值法生成对照指纹图谱, 最终得到指纹图谱, 结果见图 1。

2.1.9 相似度评价 将 11 批止动颗粒制剂的 cdf. 格式图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012A 版相似度软件, 进行相似度评价, 结果 S1~S11 的相似度分别为 0.999、0.994、0.996、0.992、0.998、0.999、0.999、0.991、0.998、0.983、0.989。结果显示, 11 批制剂相似度均大于 0.98, 说明其相似度较好, 工艺稳定可控, 质量一致性较好。结果表明止动颗粒不同批次制剂质量稳定, 特征图谱可以用于止动颗粒质量的评价和控制。

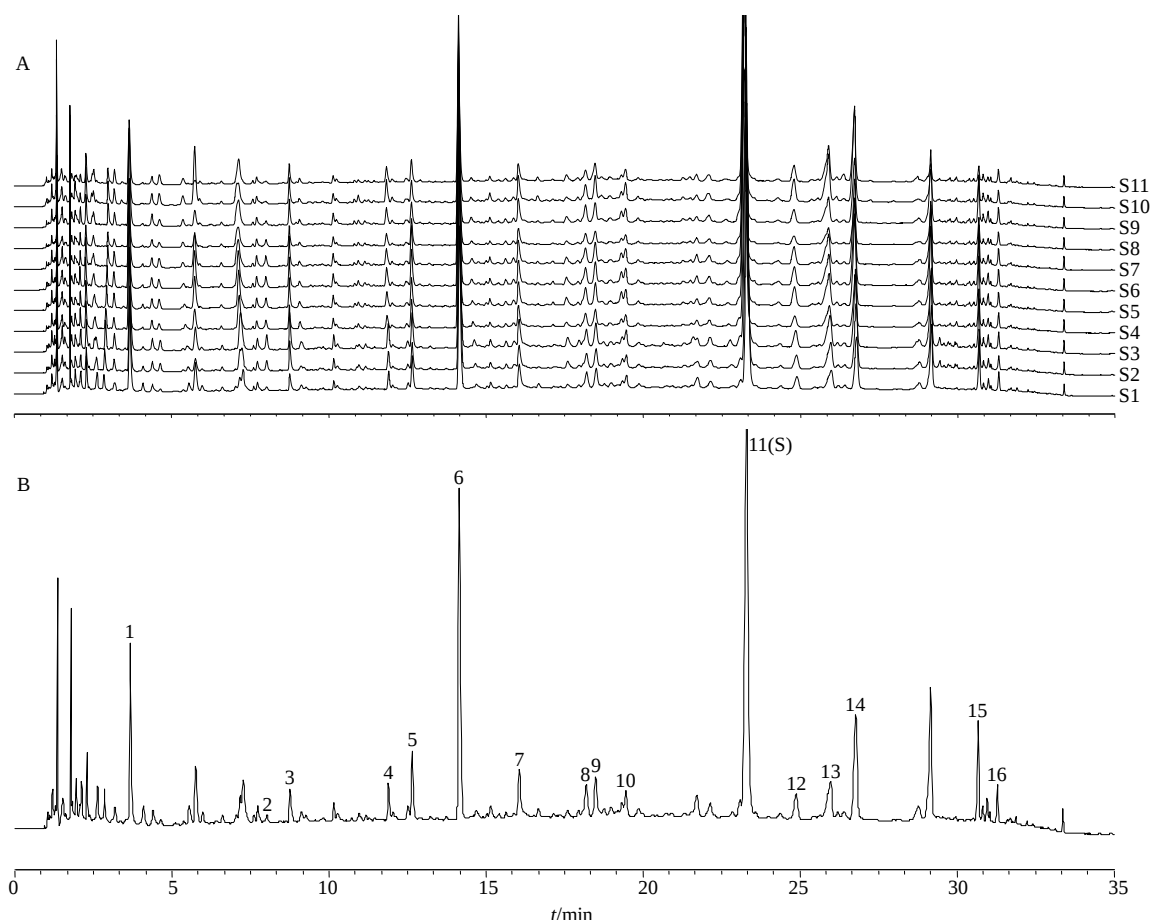


图 1 11 批止动颗粒的 UPLC 指纹图谱 (A) 及其对照指纹图谱 (B)

Fig. 1 UPLC fingerprints (A) and reference fingerprints (B) of 11 batches of Zhidong Granules

2.1.10 共有峰指认 按“2.1.4”项下方法制备供试品溶液,在“2.1.1”及“2.1.2”项条件下进样,得到正、负离子模式下全扫描 BPI 图(图 2)。以黄芩苷为参照峰,根据相对保留时间分析与 UPLC-DAD 色谱图对应的共有峰,根据文献建立组方药材的化学成分信息库,利用 Q-TOF-MS 获得精确相对分子质量,再应用 MassLynx 软件对成分进行推断,参考相关文献中的质谱裂解途径对色谱峰鉴定^[12-20],同时对色谱峰进行药材归属。以 7 号峰为例,进行解析,在负离子模式下一级碎片离子中,明显含有蒽烷基本骨架的芍药苷准分子离子 m/z 449.143 8 $[M-HCHO-H]^-$ 比 m/z 525.161 6 $[M+COOH]^-$ 响应强度更高。其碎片信息: m/z 479.152 3、449.143 8、327.104 8、165.042 8、121.024 7、77.039 9,其中 m/z 449.143 8 是母离子 $[M-H]^-$ m/z 479.152 3 断裂 1 分子甲醛 HCHO (30) 形成, m/z 327.104 8 $[M-H-$

30-122] 是母离子同时脱去母核 1 分子苯甲酸(122)和 1 分子甲醛产生, m/z 165.054 8 [pinane skeleton-H]⁻ 由分子离子峰 m/z 479.152 3 断裂形成的蒽烷基本骨架结构的羟基苯甲酸碎片信息, m/z 121.024 7 是 m/z 165.042 8 丢失 1 分子 COO⁻ 得到的苯甲酸碎片信息, m/z 77.039 9 是苯甲酸丢失 1 分子 COO⁻ 产生的碎片离子。正离子模式下,母离子 m/z 503.153 3 $[M+Na]^+$ 分别丢失 1 分子葡萄糖基(hexose residue, 162)和苯甲酸得到 m/z 341.116 2 $[M+Na-Glc]^+$, m/z 381.110 7 $[M+Na-benzoic\ acid]^+$, 故初步确定 7 号峰为芍药苷(图 3)。再经与芍药苷对照品比对,确认 7 号峰为芍药苷。根据文献信息及现有研究表明^[8-9],在本组方中,芍药苷是白芍中的成分,因此确定药材归属为白芍。以此类推,本实验共解析了止动颗粒色谱图中 16 个化学成分并分别归属于白芍、栀子、黄芩、醋五味子 4 味药材,结果见表 1。

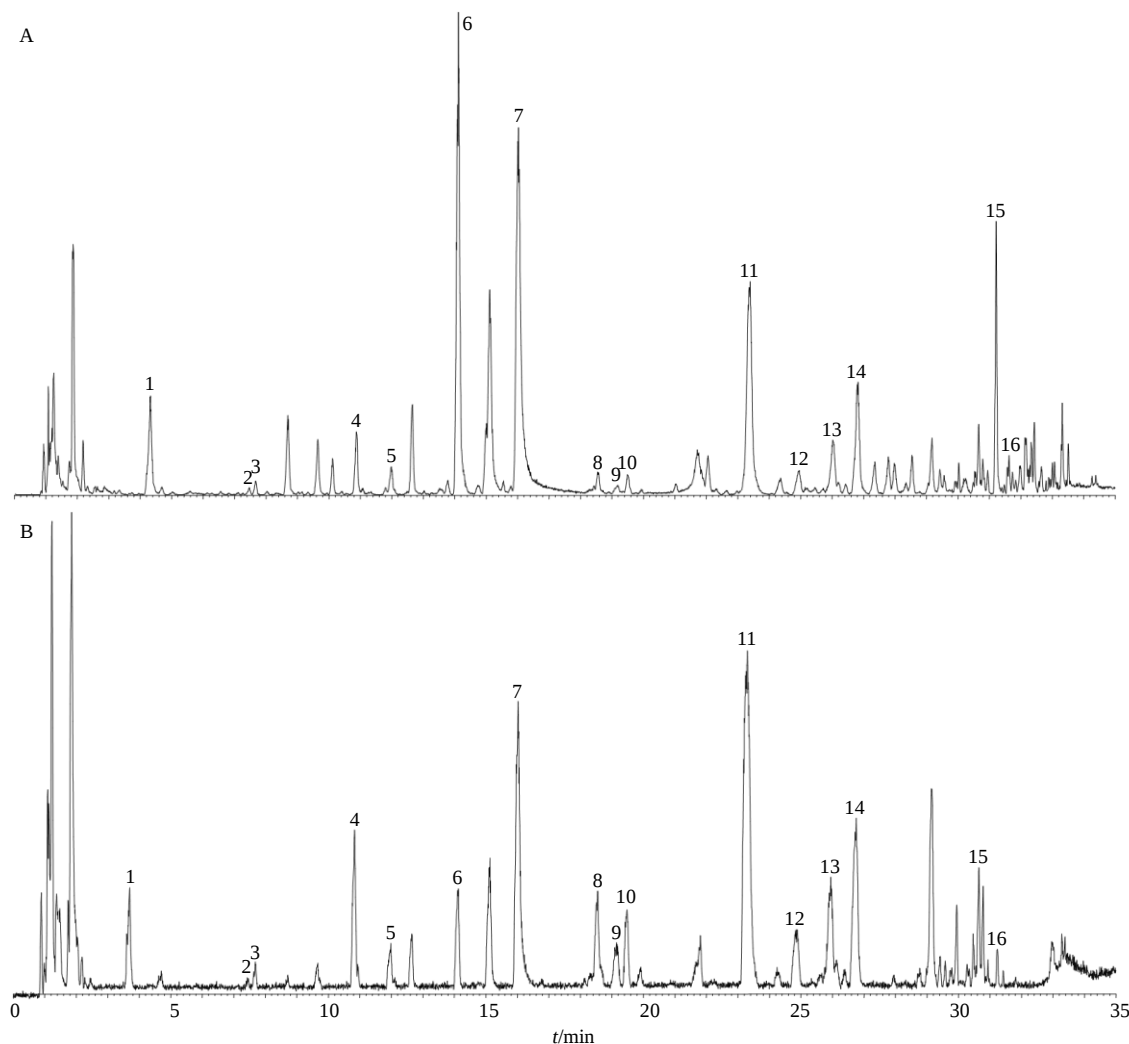


图 2 止动颗粒 UPLC-Q-TOF-MS 的正离子 (A) 和负离子 (B) 质谱基峰离子流图

Fig. 2 Positive (A) and negative (B) UPLC-Q-TOF-MS base peak ion flow chart of Zhidong Granules

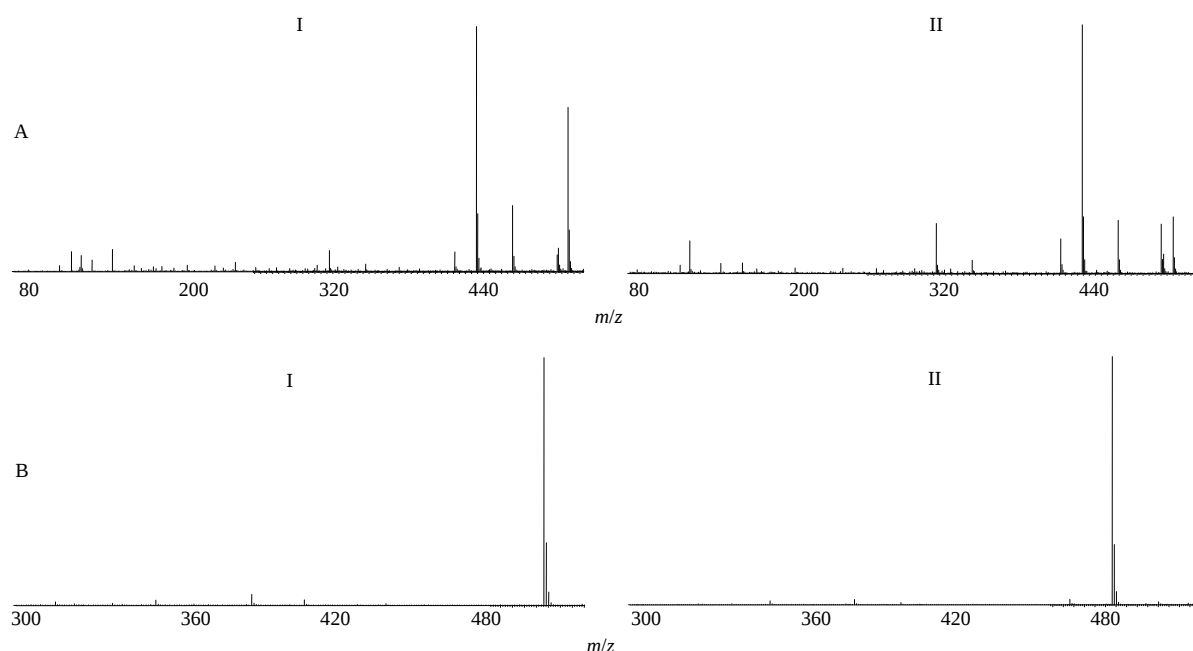


图 3 对照品溶液 (I) 和止动颗粒样品溶液 (II) 中芍药苷的 UPLC-Q-TOF-MS 负离子 (A) 和正离子 (B) 质谱图
Fig. 3 Negative (A) and positive (B) UPLC-Q-TOF-MS spectrum of paeoniflorin in reference solution (I) and Zhidong Granules sample solution (II)

表 1 共有峰鉴定结果

Table 1 Results of common peak identification

峰号	t_R/min	化合物	分子式	离子存在形式	实验值 m/z	理论值 m/z	误差值/ ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (m/z)	归属药材
1*	3.604	没食子酸	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	169.013 9	169.013 7	1.18	(-)-107.019 6, 125.025 2	白芍 ^[12]
2	7.958	京尼平苷酸	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	373.112 4	373.113 5	-2.95	(-)-105.017 1, 149.057 7	栀子 ^[13]
3	8.702	去乙酰车叶草苷酸甲酯	$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	427.122 0	427.121 6	0.85	265.095 8	栀子 ^[14]
4*	11.897	绿原酸	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	377.083 7	377.084 9	-3.06	(-)-191.055 1	栀子 ^[15-16]
5	12.626	京尼平 1- β -D-龙胆双糖苷	$\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_{15}$	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	573.179 3	573.179 5	-0.35	(-)-207.061 2, 225.074 8	栀子 ^[15-16]
6*	14.125	栀子苷	$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	411.127 7	411.126 7	2.38	775.186 2, 249.075 1, 224.897 9, 123.072 4	栀子 ^[13]
7*	16.029	芍药苷	$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	503.153 3	503.152 9	0.73	381.110 7, 341.116 2, 185.384 4, 219.069 4	白芍 ^[12]
8	18.178	白杨素-6-C- α -L-阿拉伯吡喃糖-8-C- β -D-葡萄糖苷	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{13}$	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	571.141 8	571.142 8	-1.69	531.151 6, 513.139 5, 495.116 6, 411.111 8, 393.186 5, 375.095 6	黄芩 ^[17-18]
9	18.503	白杨素-6-C- β -D-葡萄糖-8-C- α -L-阿拉伯糖苷	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{13}$	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	571.141 8	571.142 8	-1.69	531.147 8, 513.148 6, 495.135 5, 411.112 6, 393.206 7, 375.071 2	黄芩 ^[17-18]
10	19.875	白杨素-6-C- α -L-阿拉伯吡喃糖-8-C- β -D-葡萄糖苷/异构体	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{13}$	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	571.145 0	571.142 8	3.91	531.155 8, 513.161 4, 495.128 5, 411.115 5, 393.217 3, 375.062 2	黄芩 ^[17-18]
11*	23.417	黄芩苷	$\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	447.093 6	447.092 7	1.92	271.060 6, 253.051 0	黄芩 ^[17-18]
12	24.984	黄芩苷异构体	$\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	447.093 6	447.092 7	1.92	271.059 4, 253.029 2	黄芩 ^[18]
13	26.090	千层纸素 A-7-O-葡萄糖醛酸苷	$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	483.090 1	483.090 3	-0.48	285.077 1, 270.052 7	黄芩 ^[17-18]
14	26.873	汉黄芩苷	$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	483.090 1	483.090 3	-0.48	285.076 2, 270.052 4	黄芩 ^[18-19]
15	30.690	汉黄芩素	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	285.075 6	285.076 3	-2.46	270.052 8	黄芩 ^[18-19]
16	31.317	五味子醇甲	$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_7$	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	455.204 2	455.204 6	-0.82	400.194 3, 384.191 8	醋五味子 ^[20]

*代表样品与对照品比对

*Confirmation in comparison with standard substances in MS spectra

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Acquity HSS T3 柱(150 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为 0.1%甲酸水溶液-乙腈; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 40 °C; 进样量 2 μL; 紫外检测波长 240、280 nm。梯度洗脱程序: 0~3 min, 3%乙腈; 3~7 min, 3%~7%乙腈; 7~13 min, 7%~14%乙腈; 13~24 min, 14%~28%乙腈; 24~27 min, 28%~35%乙腈; 27~30 min, 35%~65%乙腈; 30~32 min, 65%~90%乙腈; 32~34 min, 90%乙腈; 34~35 min, 90%~3%乙腈。在此条件下, 各色谱峰分离良好, 色谱图见图 4。

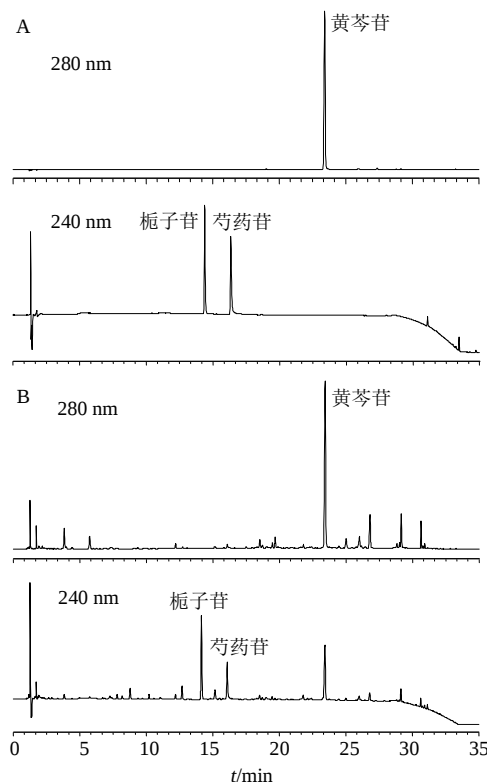


图 4 3 种成分对照品 (A) 及供试品 (B) 的 UPLC 图
Fig. 4 UPLC of three ingredients of reference and test sample

2.2.2 混合对照品溶液制备 分别取适量的黄芩苷、芍药苷、栀子苷对照品, 精密称定, 用甲醇分别配制成质量浓度为 388.8、209.0、268.0 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液及阴性样品溶液制备 称定止动颗粒粉末 0.5 g 及阴性样品 0.5 g, 分别置于具塞锥形瓶中, 加入 40%甲醇 50 mL, 称定质量, 超声 15 min, 放冷, 补足减失的质量, 摇匀, 14 100 r/min 离心 10 min, 上清液用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液即得供试品溶液和阴性样品溶液。

2.2.4 专属性考察 分别取空白溶剂、供试品和阴性供试品溶液, 按“2.2.1”项下方法分别进样分析, 验证专属性。由图 5 可见黄芩苷、芍药苷、栀子苷成分峰无其他杂峰干扰。

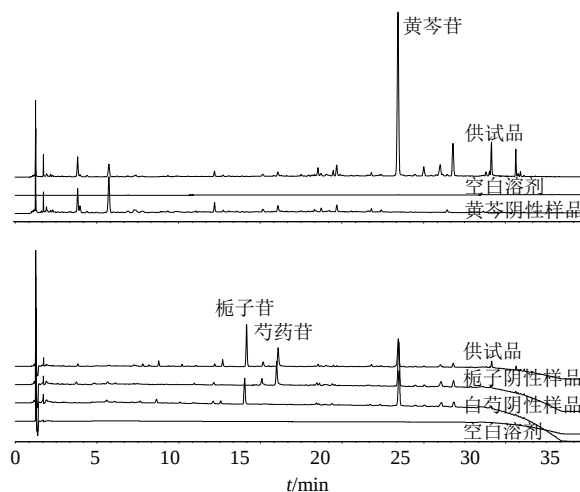


图 5 3 种成分专属性对比色谱图

Fig. 5 Specificity comparison chromatograms of three constituents

2.2.5 线性关系考察 分别从质量浓度为 388.8、209.0、268.0 μg/mL 的黄芩苷、芍药苷、栀子苷混合对照品溶液中精密移取 5 mL, 用甲醇于 10 mL 量瓶中进行倍比稀释, 得 6 个质量浓度的系列混合对照品溶液。按“2.2.1”项下色谱条件分别进样分析, 记录峰面积, 以对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 用最小二乘法进行线性回归, 以计算线性方差和相关系数 (r)。得回归方程分别为黄芩苷 $Y=24\,205\,475.7 X+15\,295.1$, $r=0.999\,9$, 线性范围 12.15~388.80 μg/mL; 栀子苷 $Y=10\,571\,885.8 X+204\,853$, $r=0.999\,7$, 线性范围 6.52~209.00 μg/mL; 芍药苷 $Y=7\,215\,471.9 X+8\,162.8$, $r=0.999\,9$, 线性范围 8.38~268.00 μg/mL。

2.2.6 精密度试验 精密吸取对照品溶液, 按“2.2.1”项下方法连续进样 6 针, 记录峰面积, 测得黄芩苷、栀子苷、芍药苷 RSD 分别为 0.14%、0.20%、0.39%, 表明仪器精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 取供试品溶液分别于 0、8、16、24、32、46 h, 按“2.2.1”项下液相方法分别进样检测, 记录峰面积, 测得黄芩苷、栀子苷、芍药苷 RSD 分别为 0.56%、0.23%、1.81%; 表明供试品溶液在 46 h 内稳定性良好。

2.2.8 重复性试验 取 6 份 0.5 g 止动颗粒样品, 按“2.2.3”项下方法配制供试品溶液。按“2.2.1”

项下液相方法进样分析,记录峰面积,计算黄芩苷、栀子苷、芍药苷质量分数平均值分别为 8.68、8.51、7.60 mg/g, RSD 分别为 0.60%、0.55%、0.61%,表明该方法重复性良好。

2.2.9 加样回收率试验 取 9 份止动颗粒样品 0.25 g,精密称定,分别置于量瓶中,分别按 0.5:1、1:1、1.5:1 的低、中、高比例加入混合对照品溶液,平行 3 份,加入适量 40%甲醇,超声处理 30 min(功率 500 W,频率 40 kHz),冷却至室温,加 40%甲醇定容,摇匀,取适量,14 100 r/min 离心 10 min,上清液用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,按“2.2.1”项下液相方法进样分析,计算加样回收率。结果黄芩苷、栀子苷、芍药苷平均回收率分别为 100.98%、100.49%、100.55%, RSD 分别为 3.04%、0.60%、2.73%。

2.2.10 耐用性考察 取 3 份 0.5 g 止动颗粒样品,按“2.2.3”项下方法配制供试品溶液。按“2.2.1”项下液相方法进样分析,记录峰面积,考察不同体积流量(0.28、0.30、0.32 mL/min)定量测定结果,计算黄芩苷、栀子苷、芍药苷质量分数平均值分别为 8.43、8.61、7.20 mg/g, RSD 分别为 0.89%、0.58%、2.81%。考察不同柱温(30、35、40 $^{\circ}\text{C}$)定量测定结果,计算黄芩苷、栀子苷、芍药苷质量分数平均值分别为 8.51、8.60、7.21 mg/g, RSD 分别为 1.75%、0.49%、2.76%。

2.2.11 样品含量测定 取 11 批样品,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,平行 2 份,在“2.2.1”项色谱条件下测定,结果见表 2。

表 2 3 种成分含量测定结果 ($n=2$)

Table 2 Results of content determination of three constituents ($n=2$)

批号	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)		
	黄芩苷	栀子苷	芍药苷
20110102	7.54	8.19	11.38
2014L01	9.00	11.15	10.57
140901S	10.79	13.27	12.76
20150701	7.46	9.98	9.92
150801	12.40	10.98	11.33
150802	11.95	12.59	11.59
150901	11.33	12.84	11.35
151001	8.51	8.42	7.68
151002	8.78	8.37	11.19
20171102	12.02	7.37	12.06
20180501	9.37	7.01	8.17

3 讨论

在供试品制备方法的考察中,本研究分别对不同提取溶剂及其比例(甲醇、10%甲醇、40%甲醇、70%甲醇、40%乙醇、乙醇),不同提取方式(超声、热回流)和不同提取时间(15、30、45 min)进行了考察,10%甲醇超声 15 min 使指纹图谱信息更完整,最终确定此为指纹图谱的供试品制备方法,后经考察 40%甲醇时黄芩苷量最高,故最终确定 40%甲醇超声 15 min 为含量测定的供试品制备方法。

在指纹图谱色谱分析中,比较了止动颗粒在甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸水、乙腈-0.2%甲酸水的整体洗脱情况,乙腈-0.1%甲酸水分离效果最好,峰形对称,可与相邻色谱峰达到完全基线分离,基线较平,综合考虑,最终确定乙腈-0.1%甲酸水为本实验流动相。比较了 25、30、40 $^{\circ}\text{C}$,在 40 $^{\circ}\text{C}$ 下能够分离出更多的色谱峰,使指纹图谱更完全;考察了不同体积流量 0.35、0.30、0.25 mL/min 对止动颗粒样品分离的影响,0.30 mL/min 下峰形较窄,有更多的色谱峰信息;故选择在 40 $^{\circ}\text{C}$,0.30 mL/min 条件下对止动颗粒样品进行洗脱。

利用 UPLC/DAD 对止动颗粒样品在 190~400 nm 下进行紫外全波长扫描,254 nm 下色谱峰数最多,且均有较好吸收,尽可能地反映了指纹图谱有效信息,故选择 254 nm 为止动颗粒指纹图谱检测波长。黄芩苷的最大吸收波长是 280 nm,栀子苷及芍药苷在 240 nm 有较好吸收,响应较高,最终选择 240、280 nm 进行含量测定。

在共有峰化学成分指认中,8、9、10 号峰均得到了 m/z 571 的分子离子峰,与成分数据库比对,推测 3 者互为白杨素-6-C- β -D-葡萄糖-8-C- α -L-阿拉伯糖苷异构体。3 者均得到相同的特征碎片峰,且 8 号峰与 9 号峰的色谱行为符合文献报道^[19-20]中的白杨素-6-C- α -L-阿拉伯吡喃糖-8-C- β -D-葡萄糖苷和白杨素-6-C- β -D-葡萄糖-8-C- α -L-阿拉伯糖苷的色谱行为,因此判断 8 号峰为白杨素-6-C- α -L-阿拉伯吡喃糖-8-C- β -D-葡萄糖苷,9 号峰为白杨素-6-C- β -D-葡萄糖-8-C- α -L-阿拉伯糖苷,10 号峰响应很低,分子离子峰以及碎片离子信息与 8、9 号峰相同,因此推断其为白杨素-6-C- β -D-葡萄糖-8-C- α -L-阿拉伯糖苷异构体。13 号与 14 号峰具有相同的分子离子峰以及碎片信息,通过与成分信息数据库比对,并和文献报道^[19-20]比对碎片信息,推断两者为千层纸素 A-7-O-葡萄糖醛酸苷或汉黄芩苷。并且 13 号与 14 号

峰色谱行为符合文献中千层纸素 A-7-O-葡萄糖醛酸苷和汉黄芩苷的色谱行为,因此判断 13 号峰为千层纸素 A-7-O-葡萄糖醛酸苷,14 号峰为汉黄芩苷。

4 结论

本实验建立的 UPLC 指纹图谱和 3 种成分的含量测定,有效地反映了中药复方制剂止动颗粒的定性特征和定量信息。从止动颗粒指纹图谱共有峰中筛选了 16 个峰面积占比较高,较稳定的成分峰作为共有峰,与标准图谱的相似度大于 0.98。采用 UPLC-Q-TOF-MS 联用技术对止动颗粒中共有峰化学成分进行鉴定,指认了分别来自于白芍、栀子、黄芩、醋五味子的 16 个特征成分。11 批制剂中黄芩苷为 7.46~12.40 mg/g,栀子苷为 7.01~13.27 mg/g,芍药苷为 7.68~12.76 mg/g,采用多波长梯度洗脱 UPLC 法对止动颗粒中的黄芩苷、栀子苷、芍药苷同时进行测定,方法准确可靠,可为该制剂制定新的检测方法。本实验表明了指纹图谱技术、UPLC 多波长检测技术以及液质联用技术有效用于中药复方的质量控制,为全面提升止动颗粒质量标准提供依据。

参考文献

- [1] 王丽霞,赵林,曹娜,等.多发性抽动症的免疫学研究概述[J].世界最新医学信息文摘,2017,17(45):31-32.
- [2] 杨书美.滇龙胆指纹图谱的研究[D].哈尔滨:哈尔滨商业大学,2015.
- [3] 夏菁,谢媛媛,张宗璇,等.骨通贴膏指纹图谱及化学成分研究[J].中成药,2014,36(3):571-576.
- [4] 史静超,张俊杰,高晓霞,等.龟龄集胶囊无机元素指纹图谱的建立及主成分分析[J].中草药,2018,49(15):3619-3624.
- [5] Xie R F, Zhao Q H, Li Z C, et al. Comparison on HPLC fingerprints between *Fraxini Cortex* and its eye drop [J]. *Chin Herb Med*, 2013, 5(4): 301-306.
- [6] 周桂荣,李响,赵桂铃,等.橘叶 UPLC 指纹图谱和化学模式识别研究[J].药物评价研究,2018,41(12):2237-2241.
- [7] 康建,周霖,孙志,等.基于 UPLC 指纹图谱结合化学模式识别的冠心丹参胶囊质量控制研究[J].中草药,2018,49(17):4051-4057.
- [8] 秦建平,吴建雄,郎悦,等.痛宁凝胶的 HPLC-MS 指纹图谱研究[J].现代药物与临床,2016,31(4):427-430.
- [9] 高青,刘颖,宋彬彬,等.超高效液相色谱与高效液相色谱方法转换及验证[J].药物分析杂志,2016,36(7):1279-1286.
- [10] 齐炼文,杨华,李会军,等.中药有效成分群发现与质量评价研究[A]//第三届中国天然药物研究与发展论坛论文集[C].南京:中国药学会,2013.
- [11] 陈晓虎,苏晶,王慧,等.UPLC 法同时测定栀子金花丸中 11 种成分[J].中草药,2014,45(7):955-959.
- [12] 孙东东,徐晓芳,崔九成,等.白芍水提部位化学成分 HPLC-ESI-Q-TOF-MS 分析[J].中国中药杂志,2013,38(11):1760-1765.
- [13] Wang L, Liu S, Zhang X, et al. A strategy for identification and structural characterization of compounds from *Gardenia jasminoides* by integrating macroporous resin column chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with ion-mobility spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1452(6): 47-57.
- [14] 娄素卉.中药材栀子的化学物质基础研究[D].上海:华东理工大学,2012.
- [15] 王晓燕,张丽,王添琦,等.栀子化学成分的 UHPLC-Q-TOFMS 分析[J].中药材,2013,36(3):407-410.
- [16] 严欢,左月明,袁恩,等.基于 UHPLC-Q-TOF-MS 技术分析栀子花中的化学成分[J].中药材,2018,41(6):1359-1364.
- [17] 邵怡,杨玉佩,陈林,等.HPLC-Q-TOF-MS/MS 分析防风芍药汤水煎液的化学成分[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(8):54-59.
- [18] 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.
- [19] 郑勇凤,王佳婧,傅超美,等.黄芩的化学成分与药理作用研究进展[J].中成药,2016,38(1):141-147.
- [20] 李伟,刘亚丽,宋永贵,等.UPLC-Q-TOF-MS^E 结合 OPLS-DA 模式快速鉴定南、北五味子化学成分与识别差异标志物[J].中草药,2015,46(15):2212-2218.