

基于 UPLC 结合比色法的葛桑降糖胶囊质量控制研究

杜正彩¹, 夏中尚^{1,2#}, 韦曼¹, 张明哲¹, 韦棣婷¹, 陈章美¹, 韦林垚¹, 侯小涛^{1*}, 邓家刚^{1*}

1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530200

2. 成都中医药大学, 四川 成都 611137

摘要: **目的** 构建葛桑降糖胶囊的质量控制方法。**方法** 采用比色法测定葛桑降糖胶囊粗多糖、总皂苷和总黄酮含量; 采用 UPLC 建立葛桑降糖胶囊的指纹图谱, 测定了 10 个批次产品; 并利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版本) 进行相似度评价, 确定共有峰。**结果** 3 批次葛桑降糖胶囊中粗多糖平均质量分数为 4.56%, 总皂苷平均质量分数为 2.97%, 总黄酮平均质量分数为 2.61%; 建立了 10 批次葛桑降糖胶囊的 UPLC 指纹图谱, 确立 15 个共有峰, 经对照品指认出 7 个共有峰, 分别是葛根素、芦丁、三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、商陆苷、人参皂苷 Rb₁、商陆黄素, 对应 1、5、8、10、12、14、15 号峰。**结论** 此方法可用于葛桑降糖胶囊的质量控制。

关键词: 葛桑降糖胶囊; UPLC; 指纹图谱; 质量控制; 多糖; 总皂苷; 总黄酮; 相似度评价; 葛根素; 芦丁; 三七皂苷 R₁; 人参皂苷 Rg₁; 商陆苷; 人参皂苷 Rb₁; 商陆黄素

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)21-5266-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.21.020

Quality control research of Gesang Jiangtang Capsules based on UPLC fingerprint combined with colorimetry

DU Zheng-cai¹, XIA Zhong-shang^{1,2}, WEI Man¹, ZHANG Ming-zhe¹, WEI Yan-ting¹, CHEN Zhang-mei¹, WEI Lin-yao¹, HOU Xiao-tao¹, DENG Jia-gang¹

1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To establish the determination and fingerprint of Gesang Jiangtang Capsules (GJC) for its quality control. **Methods** UV spectrophotometric method was used for determining polysaccharides, total saponins, and total flavonoids of GJC. Ten batches of GJC were detected and recorded by UPLC. Similarity evaluation was performed by using Similarity Evaluation System for Fingerprint Chromatogram of TCM (2012) to confirm the common peaks. **Results** In three batches of GJC, average polysaccharides content, average total saponins content, and average total flavonoids content were 4.56%, 2.97%, and 2.61%, respectively. UPLC fingerprints of 10 batches of GJC were established and 15 common peaks were confirmed. Puerarin, rutin, notoginsenoside R₁, ginsenoside Rg₁, ombuoside, ginsenoside Rb₁, and ombuin were identified by chemical identification of the reference substance, corresponding to peaks 1, 5, 8, 10, 12, 14, and 15. **Conclusion** The methods can be used for the quality control of GJC with good precision, accuracy, and reproducibility.

Key words: Gesang Jiangtang Capsules; UPLC; fingerprint; quality control; polysaccharides; total saponins; total flavonoids; similarity evaluation; puerarin; rutin; notoginsenoside R₁; ginsenoside Rg₁; ombuoside; ginsenoside Rb₁; ombuin

收稿日期: 2019-05-28

基金项目: 广西科学研究与技术开发计划项目 (桂科 AB17292050); 南宁市科学研究与技术开发计划项目 (20175031-1); 广西重点实验室建设项目 (17-259-20); 广西中药药效研究重点实验室 (省级) 开放课题 (13-051-06-K1); 广西农作物废弃物功能成分研究协同创新中心建设

作者简介: 杜正彩, 副主任药师, 研究方向为中药药效筛选与新产品开发。E-mail: duzhengcai8@163.com

***通信作者** 邓家刚, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药理论及药效筛选、新药开发。E-mail: dengjg53@126.com

侯小涛, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药活性成分及质量控制。E-mail: xthou@126.com

#并列第一作者 夏中尚, 男, 在读博士, 研究方向为中药基础理论研究。E-mail: xiazhang@163.com

葛桑降糖胶囊 (Gesang Jiangtang Capsules, GJC) 是治疗糖尿病的临床验方加减而成, 由葛根、桑椹、三七、绞股蓝、螺旋藻、文蛤肉 6 味中药制成, 全方具有清热养阴、生津止渴、化痰行滞作用。前期药理研究表明, GJC 具有降血糖作用, 能显著降低四氧嘧啶诱导的高血糖模型小鼠的空腹血糖和改善糖耐量, 也能显著降低高脂高糖饲料结合小剂量链脲佐菌素诱导的高血糖模型大鼠的空腹血糖、改善脂质代谢和胰岛素分泌, 但对正常大鼠的空腹血糖无影响; 另外, 该胶囊中葛根、桑椹、三七、绞股蓝等配方药对糖尿病及其并发症有治疗作用^[1-18]。本研究利用 UPLC 建立 GJC 的指纹图谱, 且结合比色法测定 GJC 中粗多糖、总皂苷和总黄酮含量, 实现 GJC 快速、简便而准确地定性与定量控制, 为 GJC 的全面质量评价提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters Acquity UPLC 超高效液相色谱仪, Waters PDA 检测器, 美国沃特斯公司; Elmasonic P 超声波仪器, 德国 Elma 公司; Mettler EL204 电子天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; Sartorius BT125D 电子天平, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司; Infinite M200 Pro 多功能酶标仪, 瑞士奥地利有限公司; UPK-II-60L 优普系列超纯水器, 四川优普超纯科技有限公司。

1.2 材料

对照品葛根素, 质量分数为 99.71%, 批号 15012916, 北京世纪澳科生物技术有限公司; 对照品商陆苷(质量分数为 98%, 批号 X01F9L54299) 和商陆黄素(质量分数为 98%, 批号 W03F9Z54300) 均购于上海源叶生物有限科技公司; 人参皂苷 Rg₁ (Rg₁, 质量分数为 93.4%, 批号 110703-201128)、人参皂苷 Rb₁ (Rb₁, 质量分数为 93.7%, 批号 110745-201424)、三七皂苷 R₁ (R₁, 质量分数为 94.0%, 批号 110745-201318)、人参皂苷 Re (Re, 质量分数为 92.7%, 批号 110754-201324)、葡萄糖(质量分数为 100%, 批号 110833-200904)、芦丁(质量分数为 92.6%, 批号 10080-201409) 均购于中国食品药品检定研究院。

葛根、绞股蓝、三七等饮片均购买于广西中医药大学仁爱分院, 经广西中医药大学韦松基教授鉴定, 葛根为豆科葛根属植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi. 的干燥根, 绞股蓝为葫芦科绞股蓝属

植物绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Mak. 的全草, 三七为五加科人参属植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根和根茎, 桑椹为桑科桑属植物桑 *Morus alba* L. 的果穗, 螺旋藻为颤藻科螺旋藻属藻类钝顶螺旋藻 *Spirulina platensis* (Notdstedt) Geitler 的藻体, 文蛤肉为帘蛤科动物蛤蜊 *Meretrix meretrix* Linnaeus 的肉。GJC 样品由广西中医药大学制药厂提供, 10 个批次样品的批号分别为 150201、150301、150402、150501、150601、150702、150801、150901、151002、151101, 分别编号为 S1~S10。乙腈, 色谱纯, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 水为超纯水, 其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 比色法测定 GJC 中粗多糖含量

2.1.1 对照品溶液的制备 准确称取干燥恒定质量的葡萄糖对照品约 0.5 g, 精密称定, 加水溶解, 并定容至 50 mL, 得含葡萄糖 9.99 mg/mL 的对照品储备液, 用前稀释 100 倍为使用液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取装量差异项下的 GJC 内容物 1.5 g, 精密称定并置于 100 mL 带塞锥形瓶中, 准确加入 100.00 mL 水, 称定质量, 于沸水浴中加热 20 min, 再称定质量并补水到原质量, 摇匀后滤过, 弃去初滤液, 取续滤液(供沉淀粗多糖)。准确吸取续滤液 2.00 mL, 于 15 mL 离心管中, 加入无水乙醇 8 mL, 混匀, 于 4 °C 冰箱静置 4 h, 以 4 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 残渣用 80% 乙醇溶液数毫升洗涤, 离心后弃去上清液, 反复操作 3 次。残渣用水溶解后, 定容至 25 mL, 摇匀后得 GJC 粗多糖提取液。准确吸取 GJC 粗多糖提取液 0.50 mL, 置于 10 mL 带塞试管中, 补加水至 2.0 mL, 准确加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL, 混匀, 准确加入浓硫酸 5.0 mL, 小心混匀, 室温放置 10 min, 再置 40 °C 水浴保温 15 min, 取出, 冰水浴冷却至室温, 摇匀, 即得供试品溶液。准确吸取 200 μ L 加入酶标板中, 用酶标仪在 485 nm 波长处检测。

2.1.3 吸收波长的选择 分别取葡萄糖对照品溶液和供试品溶液适量, 以超纯水为空白对照, 进行全波长扫描。结果显示, 葡萄糖对照品溶液、供试品溶液在 485 nm 左右有共同吸收, 且空白对照无干扰, 故选择吸收波长为 485 nm 进行测定。

2.1.4 线性关系考察 分别精密吸取质量浓度为 99.9 μ g/mL 葡萄糖对照品溶液 0、0.10、0.20、0.40、

0.60、0.80、1.00 mL 至 10 mL 的具塞试管中,并加水至 2.0 mL,用移液枪分别准确加入 5%苯酚溶液 1.0 mL,混匀;准确加入浓硫酸 5.0 mL,小心混匀后,室温放置 10 min,再置 40 °C 水浴保温 15 min,取出,冰水浴冷却至室温。准确吸取 200 μ L 加入酶标板中,用酶标仪在 485 nm 波长处检测。以质量(M)为横坐标,吸光度(A)为纵坐标做标准曲线,进行线性回归分析,得回归方程 $A=2.460\ 2\ M+0.011\ 6$, $r=0.998\ 9$,表明葡萄糖在 0.999~9.990 μ g 与 A 呈良好线性关系。

2.1.5 稳定性试验 取同一供试品溶液,于 0、30、60、90、120、150 min 测定 A 值,计算 RSD。结果显示在 150 min 内 RSD 为 0.66%,表明供试品溶液稳定性良好。

2.1.6 精密度试验 取同一葡萄糖对照品溶液,连续 6 次测定 A 值,计算 RSD 值。结果显示 RSD 为 0.33%,说明本方法精密度良好。

2.1.7 重复性试验 取批号 150201 样品 6 份,按“2.1.4”项下测定 A 值,计算 RSD 值。结果显示,平行 6 份样品处理后, A 基本稳定,RSD 为 3.3%,说明本方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 取已知粗多糖含量的 GJC 6 份,各约 1.5 g,精密称定,置于 100 mL 带塞锥形瓶中,准确加入 100.00 mL 水,其余操作同“2.1.2”项供试品溶液的制备,得 6 份 GJC 粗多糖提取液,再分别准确量取 GJC 粗多糖提取液 0.25 mL,共 6 份,并准确加入葡萄糖对照品 1.00 mL (内含葡萄糖 13.5 μ g)置于 10 mL 的带塞试管中,再加水至 2 mL,准确加入 5%苯酚溶液 1.0 mL,混匀;其余操作同“2.1.4”项下方法测定 A 值,计算回收率,结果平均回收率为 100.9%,RSD 值为 1.7% (以葡萄糖计)。

2.1.9 样品测定 精密称取批号为 15020、150301、150402 的 3 批样品 9 份,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,测定 A 值,计算粗多糖量,平行 3 次实验,计算 RSD 值。结果表明,3 批样品中葡萄糖平均质量分数分别为 4.49%、4.70%、4.48%,且 $RSD < 5\%$,差异较小,均一度高。

2.2 比色法测定 GJC 中总皂苷含量

2.2.1 对照品溶液的制备 取 Re 对照品适量,精密称定,加甲醇制成含 Re 2.2 mg/mL 对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取装量差异项下的 GJC 内容物,约 0.6 g,精密称定置于 100 mL 带塞锥形

瓶中,准确加入 100.00 mL 水,称定质量,超声(功率 400 W,频率 37 kHz)处理 30 min 后,再次称定质量并补加水到原质量;摇匀,滤过,取续滤液过 D101-大孔吸附树脂柱进行柱色谱。准确吸取上述已处理好的样品溶液 1 mL 上柱,用 15 mL 水洗柱,弃去洗脱液,再用 20 mL 85%乙醇洗脱总皂苷;收集洗脱液于蒸发皿中,水浴上蒸干,以此作显色用。向上述已挥干的蒸发皿中准确加入 0.20 mL 5%香草醛冰乙酸溶液,使残渣均溶解,再准确加 0.80 mL 高氯酸,混匀后移入 10 mL 带塞试管中,塞紧塞子,于 55 °C 水浴上加热 15 min,取出,冰水浴冷却至室温后,准确加入冰乙酸 5.00 mL,摇匀后,准确吸取 200 μ L 加入酶标板中,用酶标仪在 560 nm 波长处检测。

2.2.3 吸收波长的选择 分别取 Re 对照品溶液和供试品溶液适量,以甲醇溶液为空白对照,进行全波长扫描。结果显示,供试品溶液、Re 对照品溶液在 560 nm 左右处有共同吸收,且空白对照无干扰,故选择吸收波长为 560 nm 进行测定。

2.2.4 线性关系考察 分别精密吸取质量浓度为 2.2 mg/mL 的 Re 对照品溶液 0、20、40、80、100、120、140 μ L,置 10 mL 具塞试管中,置于 60 °C 水浴中加热挥干甲醇,先准确加入 5%香草醛-冰醋酸溶液 0.20 mL,再准确加入高氯酸 0.80 mL,摇匀,密塞,置于 55 °C 水浴中加热 15 min,冰水浴冷却至室温后,加冰醋酸 5.0 mL,摇匀,即得显色后的液体;再用移液枪分别量取各显色液 200 μ L 于酶标板中,测定 A 值。以 A 值为纵坐标,Re 的质量(M)为横坐标,绘制标准曲线,计算得回归方程为 $A=3.365\ 4\ M-0.028\ 2$, $r=0.999\ 5$,结果显示 Re 在 0.044~0.308 mg 有良好的线性关系。

2.2.5 稳定性试验 取同一供试品溶液,于 0、5、10、15、20、25 min 测定 A 值,计算 RSD。结果显示在 25 min 内 RSD 为 4.6%,表明供试品溶液稳定性良好。

2.2.6 精密度试验 取同一 Re 对照品溶液,连续 6 次测定 A 值,计算 RSD 值。结果显示 RSD 为 0.13%,表明本方法精密度良好。

2.2.7 重复性试验 取批号 150201 样品 6 份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.4”项下方法测定 A 值,计算 RSD 值。结果显示,平行 6 份样品处理后, A 值基本稳定,RSD 为 3.8%,表明本方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 取已知总皂苷含量的 GJC 6 份, 各约 0.3 g, 精密称定置于 100 mL 带塞锥形瓶中, 准确加入 Re 对照品溶液 10 mL (内含 Re 8.72 mg), 再准确补加 90.00 mL 水, 其余操作同“2.2.2”项, 测定 A 值, 计算回收率; 结果平均回收率为 100.5%, RSD 值为 1.4% (以 Re 计)。

2.2.9 样品测定 精密称取批号为 15020、150301、150402 的 3 批样品 9 份, 按“2.2.2”项下方法操作, 测定 A 值, 计算总皂苷的含量, 平行 3 次实验, 计算 RSD 值。结果表明, 3 批样品中总皂苷质量分数分别为 2.91%、2.93%、3.08%, 且 $RSD < 5.0\%$, 差异较小, 均一度高。

2.3 比色法测定 GJC 中总黄酮含量

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取芦丁对照品 4.0 mg, 加 30%乙醇溶解并定容至 25 mL 量瓶中, 配成质量浓度为 0.16 mg/mL 的芦丁对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 取装量差异项下的 GJC 内容物约 0.5 g, 精密称定并置于 25 mL 带塞锥形瓶中, 准确加入 30%乙醇 10.00 mL, 称定质量, 超声 (功率 400 W, 频率 37 kHz) 处理 30 min, 再称定质量并补溶剂到原质量; 摇匀后滤过, 弃去初滤液, 收集续滤液。准确取上述续滤液 1 mL, 沿聚酰胺树脂柱 (采用湿法装柱并用水饱和) 慢慢滴入柱内, 放置一定时间, 待被充分吸附后, 用 20 mL 70%乙醇洗脱, 洗脱液接于 25 mL 量瓶中, 洗脱后定容至刻度。精确移取上述洗脱液 4.00 mL, 至 10 mL 量瓶中, 并加水至 5 mL, 先加 5%亚硝酸钠溶液 0.3 mL, 振摇后放置 6 min, 加入 10%硝酸铝溶液 0.3 mL, 摇匀后放置 6 min, 加 1.0 mol/L 氢氧化钠溶液 4 mL, 用水定容至刻度, 放置 15 min, 即得供试品溶液。准确吸取 200 μ L 加入酶标板中, 用酶标仪在 500 nm 波长处检测。

2.3.3 吸收波长的选择 分别取芦丁对照品溶液和供试品溶液适量, 以 30%乙醇为空白对照, 进行全波长扫描。结果显示, 供试品溶液、芦丁对照品溶液在 500 nm 左右处有共同吸收, 且空白对照无干扰, 故选择吸收波长为 500 nm 进行测定。

2.3.4 线性关系考察 分别精密吸取芦丁对照品溶液 0、0.5、1、2、3、4 mL 至 10 mL 量瓶中, 并加水至 5 mL, 各加 5%亚硝酸钠溶液 0.3 mL, 振摇后放置 5 min, 加入 10%硝酸铝溶液 0.3 mL, 摇匀后放置 6 min, 加 1.0 mol/L 氢氧化钠溶液 4 mL, 用水定容至刻度, 放置 15 min。以不加芦丁对照品溶液

为空白, 在 500 nm 处测定 A 值; 以 A 值为纵坐标, 芦丁质量 (M) 为横坐标, 绘制标准曲线, 计算得回归方程为 $A = 0.563\ 58\ M - 0.004\ 5$, $r = 0.999\ 5$, 结果显示芦丁在质量浓度为 8.2~65.3 mg 有良好的线性关系。

2.3.5 稳定性试验 取同一供试品溶液, 于 0、30、60、90、120、150 min 测定 A 值, 计算 RSD 值; 结果显示在 150 min 内 RSD 为 0.82%, 表明供试品溶液稳定性良好。

2.3.6 精密度试验 取同一芦丁对照品溶液, 连续 6 次测定 A 值, 计算 RSD 值; 结果显示 RSD 为 0.10%, 表明本方法精密度良好。

2.3.7 重复性试验 取批号 150201 样品 6 份, 按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 测定 A 值, 计算 RSD 值; 结果显示, 平行 6 份样品处理后, 总黄酮含量基本稳定, RSD 为 3.6%, 表明本方法重复性良好。

2.3.8 加样回收率试验 取已知总黄酮含量的 GJC 6 份, 各约 0.25 g, 精密称定并置于 25 mL 带塞锥形瓶中, 再准确加入 10.00 mL 芦丁对照品溶液 (内含芦丁 6.60 mg), 称定质量, 余下操作同“2.3.2”项, 测定 A 值, 计算回收率, 结果平均回收率为 99.41%, RSD 值为 1.1% (以芦丁计)。

2.3.9 样品测定 精密称取批号为 15020、150301、150402 的 3 批样品 9 份, 按“2.3.2”项下方法操作, 测定 A 值, 计算总黄酮含量, 平行 3 次实验, 计算 RSD 值, 结果表明, 3 批样品中总黄酮的质量分数分别为 2.64%、2.51%、2.70%, 且 $RSD < 5.0\%$, 差异较小, 均一度高。

2.4 UPLC 法建立 GJC 指纹图谱

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 Acquity BEH-C₁₈ 柱 (50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m), 流动相为水-乙腈, 梯度洗脱程序: 0~0.5 min, 5%乙腈; 0.5~5.5 min, 19%乙腈; 5.5~12 min, 19%~26.5%乙腈; 12~13 min, 50%乙腈; 13~14 min, 50%~90%乙腈; 14~18 min, 90%乙腈; 18~18.5 min, 90%~5%乙腈; 18.5~20.5 min, 5%乙腈; 检测波长 203 nm, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 体积流量 0.3 mL/min, 进样量 2 μ L; 理论塔板数按葛根素计算应不低于 80 000。

2.4.2 供试品溶液的制备 取装量差异项下的内容物 0.7 g, 精密称定并置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25.00 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 60 min (功率 100 W, 频率 37 kHz), 静置放冷, 再称定质量,

用甲醇弥补损失的质量,摇匀,滤过,弃去初滤液,取续滤液适量并过 0.2 μm 滤膜,装入液相进样品瓶中,即得供试品溶液。

2.4.3 对照品溶液制备 精密称取葛根素、芦丁、商陆苷、商陆黄素、 R_{gI} 、 R_{bI} 、 R_{I} 适量,分别加甲醇溶解并配成质量浓度分别为 260、300、350、300、100、100、120 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。

2.4.4 单味药材溶液制备 分别准确称取三七、葛根、绞股蓝 3 味药材,按处方工艺提取并按照“2.4.2”项下供试品溶液的制备步骤,制备单味药材溶液。

2.4.5 阴性参照溶液 将处方中的三七、葛根、绞股蓝剔除,再按处方工艺提取,并按照“2.4.2”项下供试品溶液的制备步骤,制备阴性参照溶液。

2.4.6 精密度试验 取批号 150201 样品的供试品溶液,按“2.4.1”项下色谱条件,重复进样 6 次,并记录色谱图。以葛根素(峰 1)峰为参照,测得各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.1%,相对峰面积的 RSD 均小于 2.6%,说明仪器精密度良好。

2.4.7 稳定性试验 取批号 150201 样品的供试品溶液 1 份,按“2.4.1”项下色谱条件,分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样,并记录色谱图。以葛根素(峰 1)峰为参照,结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.2%,相对峰面积的 RSD 均小于 2.7%,说明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.8 重复性试验 分别取批号 150201 样品 6 份,按“2.4.2”项制备供试品液 6 份,然后按“2.4.1”

项的色谱条件进样,并记录色谱图。以葛根素(峰 1)峰为参照,结果显示各共有峰相对保留时间 RSD 均小于 0.5%,相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%,说明此方法重复性良好。

2.4.9 指纹图谱的建立与相似度分析 取 10 批 GJC,按“2.4.2”项制备供试品溶液,然后按“2.4.1”项下色谱条件进样,并记录色谱图。将 10 批样品的图谱导入国家药典委员会的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版本)”软件进行处理,采用以 S1 号样品图谱为参照图谱和多点校正方法,得到对照指纹图谱,见图 1。

另利用该软件进行相似度评价,10 批次样品与对照指纹图谱的相似度结果分别为 0.999、1.000、0.999、0.995、1.000、0.999、0.995、1.000、0.998、1.000,相似度均大于 0.95 以上,符合药典相关规定。

2.4.10 指纹图谱中共有峰的指认与归属 取制备好的混合对照品溶液、单味药材溶液和阴性参照溶液,按“2.4.1”项下色谱条件用 PDA 检测器测定,并记录色谱图,见图 2、3。

利用对照品外标法实验,指认出 7 个共有峰,分别是葛根素在 3.3 min 出峰(1 号峰),芦丁在 4.9 min 出峰(5 号峰), R_{I} 在 7.2 min 出峰(8 号峰), R_{gI} 在 7.5 min 出峰(10 号峰),商陆苷在 8.1 min 出峰(12 号峰), R_{bI} 在 9.6 min 出峰(14 号峰),商陆黄素在 11.3 min 出峰(15 号峰)。利用单味药材,比较分析各共有峰的保留时间和 PDA 光谱图,

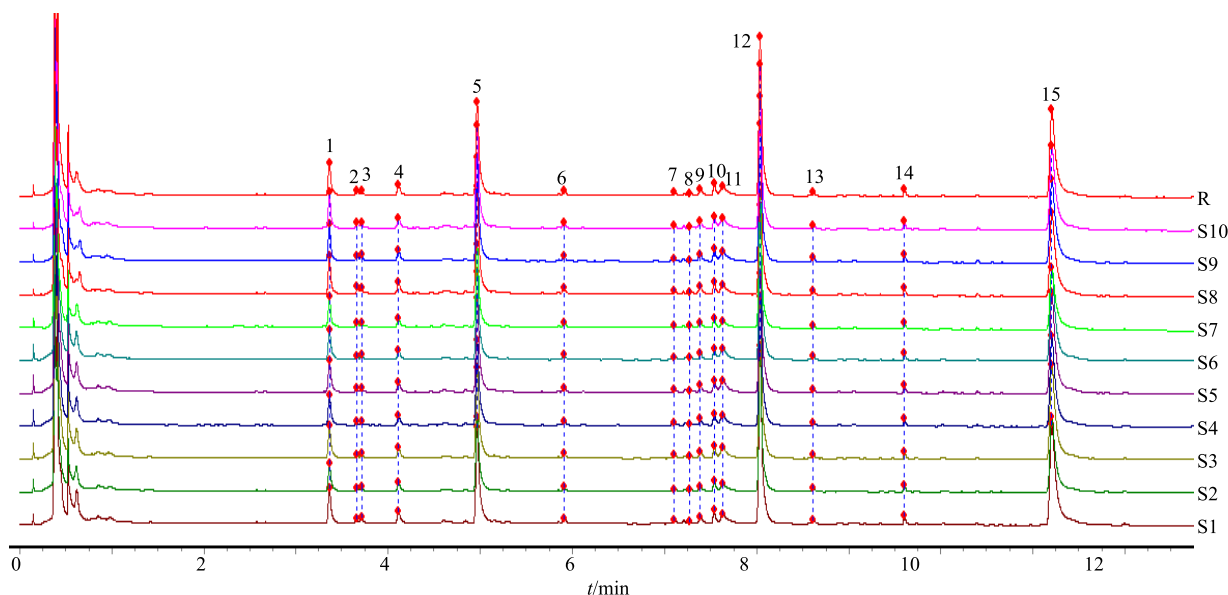


图 1 10 批 GJC 样品的 UPLC 指纹图谱及其对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 UPLC fingerprints and reference fingerprints of 10 batches of GJC (R)

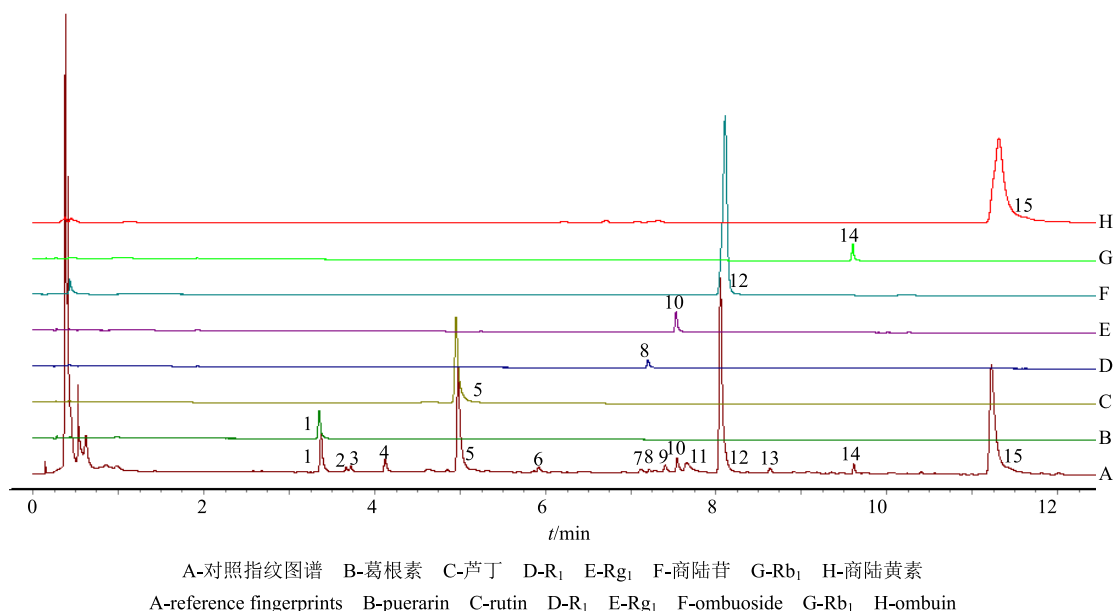


图 2 GJC 指纹图谱中各共有峰的对照品归属色谱图

Fig. 2 Common peak identification in fingerprint of GJC with reference substance

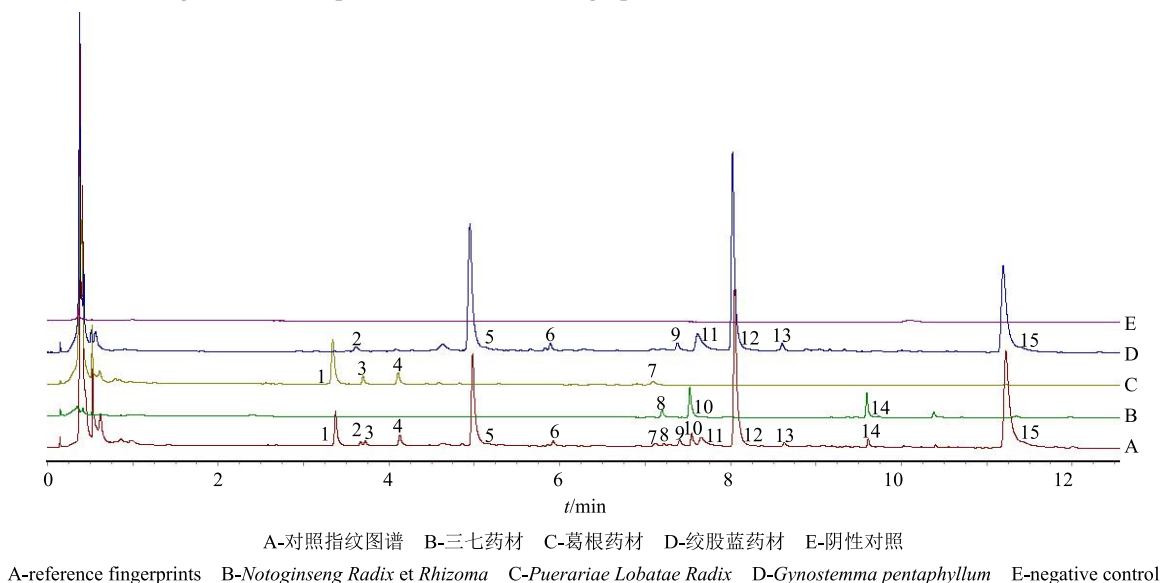


图 3 GJC 指纹图谱中各共有峰的药材归属色谱图

Fig. 3 Common peak identification in fingerprint of GJC with reference substance

可知 1、3、4、7 号峰归属于葛根药材；2、5、6、9、11~13、15 号峰归属于绞股蓝药材；8、10、14 号峰归属于三七药材；在指纹图谱中没有峰归属于桑椹等药材。

3 讨论

3.1 GJC UPLC 指纹图谱提取条件的优化

有关供试品提取方法的优化方面，通过分别对 70%、80%、90%、100% 甲醇为溶剂和 0.5、1.0、1.5、2.0 h 的超声时间考察，结果表明 25 mL 纯甲醇，超声 1.0 h 的提取效果较好。

3.2 GJC UPLC 指纹图谱色谱条件的优化

有关色谱条件的优化方面，主要考察了检测波长、柱温、体积流量 3 个因素。利用 PDA 检测器在 200~400 nm 进行检测，找出最佳吸收波长为 203 nm，在此波长检测时，大部分色谱峰达到基线分离，各色谱峰均有较好的吸收，且 GJC 中皂苷成分有好的吸收峰；对比了 25、30、35、40 °C 4 种柱温和 0.2、0.25、0.3、0.35 mL/min 4 种体积流量，发现用 30 °C 柱温和 0.3 mL/min 的体积流量基线较平稳、分离度好。

3.3 GJC UPLC 指纹图谱监测情况

本实验所建立的指纹图谱未能监测到 GJC 中桑椹等药材的成分,可能是由于桑椹等药材用水提醇沉工艺进行提取,以得到的沉淀与其他药味混合制备得到 GJC,该工艺制备得到的提取物中主要含极性较大的多糖等化学成分,本实验采用反相色谱柱和紫外检测器构建指纹图谱不能分离或检出,需建立其他鉴别方法对其进行质量控制,因此本质量标准增加对该胶囊中的粗多糖含量测定,能够对桑椹等药材有一定程度的控制。

3.4 小结

本实验利用 UPLC 法建立 GJC 指纹图谱,并用比色法简便而准确地检测其粗多糖、总皂苷和总黄酮含量,此 2 种方法地有机结合,快速、简便而准确地实现 GJC 的质量控制。采用相似度分析对不同批次 GJC 指纹图谱进行评价,共标定 15 个共有峰,并指认了其中 7 个色谱峰,还有 8 个峰没有被指认出,有待进一步研究。本实验建立的鉴别和含量测定方法稳定性、精密度、重复性良好,能为 GJC 的质量评价和控制提供依据。

参考文献

- [1] 曾明,张汉明,郑水庆,等.葛根提取物对糖尿病大鼠血糖和血流动力学的影响[J].解放军药学报,2004,20(4):293-294.
- [2] 刘瑶,李伟.葛根素治疗糖尿病肾病的研究进展[J].中草药,2018,49(4):981-986.
- [3] 李会柏,魏亚超,刘娇梅.葛根素对链脲佐菌素诱导妊娠期糖尿病大鼠氧化应激损伤的保护作用[J].现代药物与临床,2015,30(7):774-778.
- [4] 陈秀芳,董敏,雷康福,等.葛根素对高血糖模型大鼠降糖作用的机制研究[J].中国药理学杂志,2010,45(16):1242-1246.
- [5] 王兴红,郑亚萍,孙曼利,等.槲皮素对糖尿病大鼠肾脏 p38 MAPK/NF- κ B 信号通路的影响[J].中药药理与临床,2016,32(1):79-82.
- [6] 苗建红,白静,李响,等.芦丁对 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢及肾功能的影响[J].中药药理与临床,2014,30(6):48-51.
- [7] 黄晓飞,宋烨,宋成武,等.绞股蓝不同组分的降血糖活性研究[J].湖北中医杂志,2013,35(6):67-69.
- [8] 欧守珍,莫燕娜,陈世民,等.海南绞股蓝乙醇提取物的降血糖作用[J].中国热带医学,2014,14(1):38-40.
- [9] 赵玲,柯亭羽,彭嘉睿,等.三七对糖尿病肾病大鼠保护作用的观察[J].中国糖尿病杂志,2013,21(10):931-934.
- [10] 钟振东,王春梅,汪为,等.三七总皂苷的抗糖尿病机理及其降血糖成分研究[J].四川大学学报:医学版,2014,45(2):235-239.
- [11] 高钧,卢守四,张蕾,等.人参皂苷 Re 促进胰高血糖素样肽-1 分泌的研究[J].中国药物与临床,2011,23(12):1383-1385.
- [12] 尚文斌,郭超,赵娟,等.人参皂苷 Rb₁ 通过上调脂肪组织葡萄糖转运体促进葡萄糖消耗[J].中国中药杂志,2014,32(22):4448-4452.
- [13] 史琳,赵红,张璐雅,等.绞股蓝药理作用的研究进展[J].药物评价研究,2011,34(2):125-129.
- [14] 王瑞坡,王珂,李姣,等.桑椹乙酸乙酯萃取物对链脲佐菌素致高血糖大鼠的降血糖作用[J].中成药,2011,33(10):1668-1672.
- [15] 张西珍,苏光悦,夏晓艳,等.天然达玛烷型皂苷降血糖作用的研究进展[J].中草药,2016,47(15):2758-2763.
- [16] 马丽丽,邹欣蓉,刘琼,等.桑树资源在预防和治疗 2 型糖尿病中的作用[J].中草药,2014,45(22):3337-3342.
- [17] 田春雨,薄海美,李继安.桑椹多糖对实验性 2 型糖尿病大鼠血糖及血脂的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(10):158-160.
- [18] 严晓丹,钱建瑛,许泓瑜,等.文蛤不同极性提取物对糖尿病小鼠降血糖作用的研究[J].中国海洋药物,2015,34(5):71-76.