

· 中药现代化研究专题 ·

**编者按:**辽宁中医药大学“现代中药研究”创新团队,是一支融合了化学物质组学、系统生物学、网络生物药理学、微流控细胞生物芯片技术等多学科人才的研究队伍。团队主要依托辽宁中医药大学质量分析实验室(国家中医药管理局中医药科研三级实验室)、辽宁省组分中药工程技术研究中心、辽宁省现代中药研究工程实验室及国内首家与安捷伦科技合作的现代中医药“多组学”研究合作实验室。团队在孟宪生教授的带领下,将现代科技手段与中药现代化发展紧密结合,多学科交叉,多技术融合,致力于中药大品种的二次开发和现代创新中药研究开发。

## 双莲方全时段多波长融合 HPLC 指纹图谱

李楠楠<sup>1</sup>, 陈宇<sup>1</sup>, 王帅<sup>1,2</sup>, 孟宪生<sup>1,2\*</sup>, 包永睿<sup>1,2</sup>, 李天骄<sup>1,2</sup>

(1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600;

2. 辽宁省组分中药工程技术研究中心, 辽宁省现代中药研究工程实验室, 辽宁大连 116600)

**[摘要]** **目的:**建立临床有效方剂双莲方的全时段多波长融合指纹图谱,为双莲方的质量控制提供依据。**方法:**采用高效液相色谱法, Welch Ultimate LP-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相 0.1% 甲酸水(A)-甲醇(B)进行梯度洗脱(0~20 min, 25%~60% A; 20~40 min, 60%~65% A; 40~70 min, 65%~45% A), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C, 检测波长 254, 300, 320, 365 nm。**结果:**以木犀草素的色谱峰为参照峰, 共确定 18 个色谱峰, 建立了临床有效方剂双莲方的全时段多波长指纹图谱。根据此图谱, 对其他成分进行相对定量, 规定双莲方中其他成分相对木犀草素的含量不得低于 0.39, 0.24, 0.46, 0.45, 0.73, 0.28, 0.16, 0.41, 0.51, 2.37, 0.77, 0.22, 0.60, 0.36, 0.62, 0.80, 0.52, 0.96。**结论:**该方法简单、准确、科学, 适用于双莲方的质量评价。

**[关键词]** 双莲方; 指纹图谱; 全时段多波长融合; 木犀草素

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)05-0071-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016050071

### HPLC Fingerprint of Shuanglianfang Based on Full-time Multi-wavelength Fusion Method

LI Nan-nan<sup>1</sup>, CHEN Yu<sup>1</sup>, WANG Shuai<sup>1,2</sup>, MENG Xian-sheng<sup>1,2\*</sup>, BAO Yong-rui<sup>1,2</sup>, LI Tian-jiao<sup>1,2</sup>

(1. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China;

2. Component Medicine Engineering Research Center of Liaoning Province,

Liaoning Province Modern Chinese Medicine Research Engineering Laboratory, Dalian 116600, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the fingerprints of Shuanglianfang based on full-time multi-wavelength fusion method, and provide basis for the quality control of Shuanglianfang. **Method:** High performance liquid chromatography (HPLC) method was used on Welch Ultimate LP-C<sub>18</sub> column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), at the mobile phase of 0.1% methanoic acid solution (A) and ethanol (B) for gradient elution (0-20 min, 25%~60% A; 20-40 min, 60%~65% A; 40-70 min, 65%~45% A). The flow rate was maintained at 1.0 mL·min<sup>-1</sup> and the temperature was maintained at 30 °C. Detector wavelengths were 254, 300, 320, 365 nm. **Result:** With the chromatographic peak of luteolin as the reference peak, 18 chromatographic peaks in total were identified, and the full-time multi-wavelength fusion fingerprints of Shuanglianfang were established. Based on the HPLC fingerprints,

**[收稿日期]** 20150914(002)

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09507005-004)

**[第一作者]** 李楠楠, 在读硕士, 从事中药组分配伍、代谢组学及药品质量分析研究, Tel:0411-85890185, E-mail:linannan-999@163.com

**[通讯作者]** \*孟宪生, 博士, 教授, 从事中药药效物质和作用机制研究, Tel:0411-85890185, E-mail:mxsxvv@126.com

relative quantification of other components in Shuanglianfang was conducted, and the content of other components in Shuanglianfang shall not be less than 0.39, 0.24, 0.46, 0.45, 0.73, 0.28, 0.16, 0.41, 0.51, 2.37, 0.77, 0.22, 0.60, 0.36, 0.62, 0.80, 0.52, and 0.96 relative to luteolin. **Conclusion:** This method is simple, accurate, scientific, and suitable for the quality evaluation of Shuanglianfang.

**[Key words]** Shuanglianfang; fingerprints; full time multi-wavelength fusion; luteolin

双莲方由半枝莲、半边莲、夏枯草 3 味中药组成,具有清热解毒、活血祛瘀的功效,是临床用于治疗肝癌的有效方剂且应用广泛。双莲方(散剂)为本实验室根据组分中药的思想,将临床有效方剂双莲方中 3 味中药的各有效组分半枝莲总黄酮、半枝莲多糖、半边莲总黄酮、半边莲生物碱、夏枯草总黄酮按照最佳提取纯化工艺进行提取纯化,按照最佳配伍优化比例进行配伍而得到,本研究以双莲方(散剂)为研究对象,采用高效液相色谱法,结合本实验室自主研发的多波长融合技术<sup>[1-4]</sup>,开展双莲方的指纹图谱研究,在指纹峰成分不明、对照品不足的现有条件下,通过指纹图谱主要特征峰(木犀草素)与其他指纹峰比例的制定,确保样品质量的相对稳定,来控制中药复方的质量,为中药复方双莲方进一步开发利用和质量控制提供依据。

## 1 材料

1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),双莲方(10 批次双莲方,批号 20150125, 20150311, 20150324, 20150409, 20150423, 20150507, 20150519, 20150528, 20150610, 20150622, 本实验室自制),木犀草素对照品(中国食品药品检定研究院,批号 111520-200504)。

## 2 方法与结果

**2.1 供试品溶液的制备** 取双莲方(散剂)约 0.35 g,精密称定,置于 100 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,即得,作为供试品溶液。

**2.2 对照品溶液制备** 取木犀草素对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含木犀草素 0.032 mg 的溶液,即得对照品溶液。

**2.3 色谱条件** Welch Ultimate LP-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 0.1% 甲酸水(A)-甲醇(B)梯度洗脱(0 ~ 20 min, 25% ~ 60% A; 20 ~ 40 min, 60% ~ 65% A; 40 ~ 70 min, 65% ~ 45% A),柱温 30 °C,检测波长 254, 300, 320, 365 nm,流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>。

### 2.4 方法学考察

**2.4.1 精密度** 取同一对照品溶液 10 μL,重复进样 6 次,测定各色谱峰峰面积,结果色谱峰相对峰面

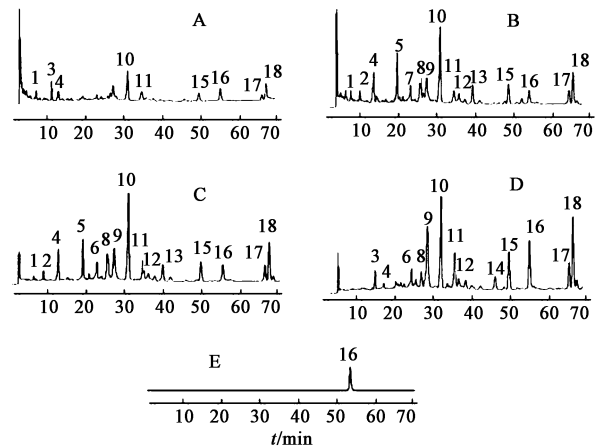
积 RSD 在 0.2% ~ 1.2%,相对保留时间 RSD 在 0.09% ~ 1.4%,表明仪器精密度良好。

**2.4.2 重复性** 取同一批次双莲方(批号 20150610),按照 2.1 项下方法制备供试品溶液 6 份,测定各色谱峰峰面积,结果色谱峰相对峰面积 RSD 在 0.3% ~ 2.3%,相对保留时间 RSD 在 0.5% ~ 2.0%,表明所建立的方法重复性良好。

**2.4.3 稳定性** 取同一供试品溶液 10 μL(批号 20150610),于 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 测定各色谱峰峰面积,结果色谱峰相对峰面积 RSD 在 0.6% ~ 2.7%,相对保留时间 RSD 在 0.2% ~ 2.0%,结果表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

### 2.5 双莲方指纹图谱的建立

**2.5.1 双莲方各波长色谱峰** 精密吸取供试品溶液各 10 μL,注入高效液相色谱仪,分别记录 254, 300, 320, 356 nm 波长下 70 min 内的色谱峰<sup>[5-8]</sup>,结果见图 1。



A. 254 nm; B. 300 nm; C. 320 nm; D. 356 nm; E. 300 nm; 16. 木犀草素  
图 1 双莲方不同波长色谱

Fig. 1 Different wavelength chromatogram of Shuanglianfang

**2.5.2 多波长融合指纹图谱** 根据扫描结果确定融合波长为 254, 300, 320, 365 nm。分别从 Agilent 1100 色谱工作站中导出 254, 300, 320, 365 nm 的数据文件,使用 Matlab 软件进行编程,对数据进行全时段多波长融合,结果见图 2。

**2.5.3 参照峰及特征峰的选择与确认** 取 10 批双

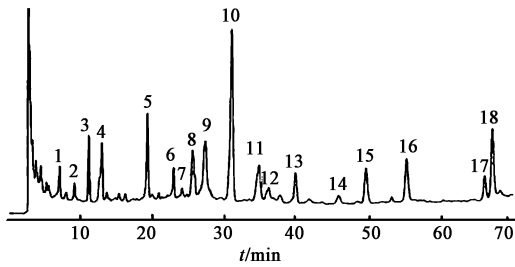


图 2 双莲方多波长融合指纹谱

Fig. 2 Full-time multi-wavelength fusion fingerprint of Shuanglianfang

莲方,按 2.1 项下方法制备供试品溶液,各取 10  $\mu\text{L}$ ,按 2.3 项下色谱条件进行测定,记录指纹图谱并进行全时段多波长融合,把 10 批双莲方全时段多波长融合指纹图谱导入“中药指纹图谱相似度评价系统”(2004A),相似度均  $>0.9$ , $\text{RSD} < 0.1\%$ ,10 批指纹图谱共有模式见图 3;对相对保留时间 0 ~ 70 min 的色谱峰进行分析,选择稳定性和重复性好特征明显的色谱峰为共有峰,共标定 18 个共有峰,共有峰面积占总峰面积的 95%,符合共有峰的要求,

表 1 10 批次双莲方中各成分的相对峰面积

Table 1 10 batches of Shuanglianfang relative peak area of each component

批次	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	17	18
1	0.49	0.29	0.59	0.55	0.90	0.35	0.20	0.51	0.64	2.32	0.98	0.27	0.74	0.45	0.78	0.66	1.20
2	0.48	0.28	0.58	0.55	0.89	0.35	0.20	0.50	0.63	2.28	0.95	0.26	0.73	0.44	0.76	0.64	1.18
3	0.48	0.31	0.58	0.56	0.89	0.34	0.20	0.51	0.65	2.29	0.96	0.27	0.74	0.44	0.77	0.64	1.18
4	0.50	0.29	0.59	0.57	0.92	0.36	0.19	0.51	0.65	2.31	0.97	0.26	0.77	0.46	0.77	0.66	1.21
5	0.47	0.31	0.59	0.57	0.91	0.36	0.20	0.52	0.63	2.30	0.95	0.27	0.76	0.44	0.77	0.67	1.20
6	0.49	0.30	0.59	0.58	0.91	0.33	0.20	0.52	0.63	2.27	0.95	0.26	0.73	0.46	0.79	0.66	1.18
7	0.51	0.28	0.56	0.56	0.89	0.34	0.20	0.51	0.64	2.31	0.97	0.28	0.77	0.45	0.77	0.66	1.22
8	0.47	0.28	0.57	0.57	0.92	0.33	0.21	0.49	0.64	2.30	0.95	0.26	0.74	0.44	0.78	0.64	1.19
9	0.47	0.30	0.57	0.54	0.92	0.35	0.20	0.50	0.65	2.30	0.97	0.27	0.75	0.44	0.78	0.64	1.20
10	0.50	0.31	0.58	0.59	0.91	0.35	0.21	0.50	0.65	2.27	0.96	0.25	0.74	0.46	0.79	0.65	1.21

注:16 号峰均为 1。

根据以上供试品中木犀草素与其他成分的相对含量的测定结果,规定含量限度不得低于测定结果的 80%,故确定双莲方中其他成分相对木犀草素的质量分数不得低于 0.39,0.24,0.46,0.45,0.73,0.28,0.16,0.41,0.51,2.37,0.77,0.22,0.60,0.36,0.62,0.80,0.52,0.96。

### 3 讨论

本研究采用高效液相色谱法,使用 Welch Ultimate LP-C<sub>18</sub> 色谱柱,甲醇-0.1% 甲酸水进行梯度洗脱,Welch Ultimate LP-C<sub>18</sub> 色谱柱在低 pH 下具有

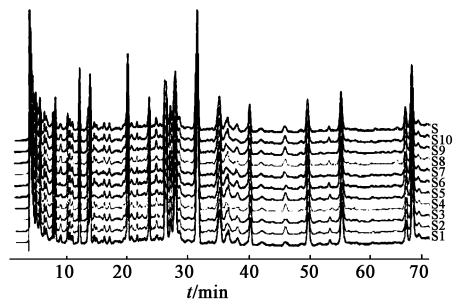


图 3 10 批次双莲方多波长融合指纹谱共有模式

Fig. 3 10 batches of Shuanglianfang multiple wavelength fusion fingerprint common model

见图 2。样品指纹图谱中的 16 号峰经对照品指认为木犀草素的色谱峰,其色谱峰较大,稳定性良好,故选择该峰为指纹图谱的参照峰<sup>[9-12]</sup>。

2.6 各成分含量限度的制定 以木犀草素为对照品来确定供试品溶液中木犀草素的色谱峰(视为 S 峰),记录供试品中 S 峰及各指纹峰的峰面积,以供试品中 S 峰木犀草素的峰面积为 1,计算各指纹峰的相对峰面积,结果见表 1。

极佳的峰型和很好的重复性,达到很好的分离效果。

双莲方中含有夏枯草总黄酮、半枝莲总黄酮、半枝莲多糖、半边莲总黄酮、半边莲生物碱 5 种组分,化学成分复杂,而且各成分紫外吸收不同,单一波长并不能全面反映双莲方中各类化学成分,因此本研究通过 DAD 全波长扫描,确定吸收波长为 254,300,320,356 nm,并利用 Matlab 软件对各波长的指纹图谱进行融合,得到可以全面反应双莲方中不同成分吸收的指纹图谱。采用多波长融合得到的双莲方指纹图谱中共指认出 18 个指纹峰,以木犀草素为

对照品的色谱峰来确定供试品溶液中木犀草素的色谱峰(16号峰),以供试品中木犀草素的色谱峰的峰面积为1,计算各峰的相对峰面积,确定双莲方中其他成分相对木犀草素的含量不得低于0.39,0.24,0.46,0.45,0.73,0.28,0.16,0.41,0.51,2.37,0.77,0.22,0.60,0.36,0.62,0.80,0.52,0.96。

双莲方由中药半枝莲、半边莲、夏枯草组成,对于方中半枝莲、半边莲中总黄酮、多糖、生物碱等成分的物质基础研究并不十分清晰,难以对指纹图谱中的各指纹峰进行一一指认,而且存在很多对照品价格昂贵或不易得到等问题,所以本研究采用廉价易得的木犀草素对照品,以木犀草素为指标,对其他成分进行相对定量分析,用此方法来在无对照品或中药复方化学成分不明确时对中药复方进行质量控制,来反应中药复方质量的整体性。本方法简单、科学,为全面、综合评价双莲方的质量提供实验依据。

#### [参考文献]

[1] 孟宪生,何晓霞,潘英,等.气滞胃痛颗粒全时段多波长融合指纹图谱测定方法:中国,ZL 2012 1 0223306.4[P].2013-12-14.

[2] 孟宪生,包永睿,姚东,等.甘草药材全时段多波长融合指纹图谱的建立方法:中国,ZL 2011 1 0202169.1[P].2013-06-19.

[3] 姚东,孟宪生,王帅,等.气滞胃痛颗粒全时段多波长融合指纹图谱研究及多成分定量分析[J].中国中药杂志,2013,38(10):1513-1517.

[4] 唐爽,包永睿,孟宪生,等.基于多波长覆盖融合指纹图谱的大川芎片主要成分研究[J].药学研究,2015,34(1):7-9,22.

[5] 甘秀海,梁志远,姜金仲,等.冷水花药材的HPLC指纹图谱研究及指标成分含量测定[J].中药材,2015,38(2):275-278.

[6] 李晓亮,易进海,刘云华,等.南五味子、五味子HPLC指纹图谱研究和木脂素成分测定[J].中成药,2011,33(6):920-924.

[7] 王莹,孟宪生,包永睿,等.白茅根水提物中绿原酸的含量测定[J].亚太传统医药,2011,7(3):22-24.

[8] 王添敏,孙晓丽,彭雪,等.胡桃楸的根、茎枝、叶和果皮中总鞣质的含量测定[J].中国中药杂志,2011,36(1):32-35.

[9] 方芳,王晶,方舟,等.复方黄白胶囊的多波长融合HPLC指纹图谱[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(7):113-116.

[10] 韩永成,刘伟,陈宁,等.不同产地金银花药材的UPLC指纹图谱分析[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(2):67-69.

[11] 陈丰连,张文进,徐鸿华.不同采收期及不同产地广金钱草地上部分HPLC指纹图谱研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(14):96-98.

[12] 彭锐,马鹏,李隆云,等.不同产地川党参药材的HPLC指纹图谱[J].中国中药杂志,2010,35(2):183-186.

[责任编辑 顾雪竹]