

银桑菊固体饮料的 HPLC 指纹图谱

李跃辉¹, 王银¹, 彭宇¹, 杨再江², 向丽^{2*}

(1. 湖南省中医药研究院 杨永华名老中医药专家传承工作室, 长沙 410006;
2. 重庆市秀山红星中药材开发有限公司, 重庆 409900)

[摘要] 目的: 银桑菊固体饮料的质量标准, 建立其 HPLC 指纹图谱。方法: 采用 HPLC 法对 10 批银桑菊固体饮料样品进行分析, 以 Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 为色谱柱, 乙腈-0.4% 磷酸溶液为流动相, 梯度洗脱, 检测波长 268 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 进样量 10 μL; 利用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2.0 版) 标定共有峰和相似度评价。结果: 建立了银桑菊固体饮料的 HPLC 指纹图谱, 标定了 20 个共有峰, 10 批样品的相似度均 > 0.9, 并指认了 3 个峰分别为绿原酸、甘草苷、木犀草苷。结论: 该法操作简便可靠, 所建立的 HPLC 指纹图谱重复性良好, 可用于银桑菊固体饮料的质量评价。

[关键词] 银桑菊固体饮料; 指纹图谱; 绿原酸; 甘草苷; 木犀草苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)18-0068-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016180068

HPLC Fingerprint of Yinsangju Solid Beverage

LI Yue-hui¹, WANG Yin¹, PENG Yu¹, YANG Zai-jiang², XIANG Li^{2*}

(1. Hunan Academy of Chinese Medicine, Yang Yonghua Inheritance Studio of the Famous TCIYI Experts, Changsha 410006, China; 2. Chongqing Xiushan Hongxing Traditional Chinese Medicine Development Co. Ltd., Chongqing 409900, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the HPLC fingerprint of Yinsangju solid beverage. **Method:** Ten batches of Yinsangju solid beverage were analyzed by HPLC method on Kromasil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile - 0.4% phosphoric acid solution as the mobile phase for gradient elution. The detection wavelength was 268 nm; flow rate was 1.0 mL·min⁻¹; column temperature was 35 °C and the injection volume was 10 μL. *The Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine* (version 2.0) was used to identify common peaks and evaluate similarity. **Result:** The HPLC fingerprint of Yinsangju solid beverage was established. Twenty common peaks were identified with similarity of more than 0.9 for 10 batches of samples. Three peaks were identified as chlorogenic acid, liquiritin, and luteolin glycosides. **Conclusion:** This reliable, available and quick method can be used in the quality evaluation of Yinsangju solid beverage.

[Key words] Yinsangju solid beverage; fingerprint; chlorogenic acid; liquiritin; luteolin glycosides

银桑菊固体饮料由金银花、桑叶、菊花、黄精、甘草等药食两用中药组成, 是具有增强免疫力功能的食品, 是应用较好的临床经验方, 后期开发为新产品。笔者前期研究中建立了其质量控制标准, 包括

感官、鉴别、理化指标、微生物限度及功效成分含量测定等。本品为中药复方制剂, 仅以单个或多个成分的定量测定作为其内在质量控制指标难以全面反映该方的整体性和有效性。中药指纹图谱技术是一

[收稿日期] 20160229(016)

[基金项目] 重庆市科技支撑示范工程项目(cstc2014fqzktjcsf10019)

[第一作者] 李跃辉, 副研究员, 从事中药制剂与分析研究, Tel:13755056665, E-mail:410256518@qq.com

[通讯作者] * 向丽, 中药师, 从事中药饮片质量控制及研发, Tel:18523532313, E-mail:410256518@qq.com

种可量化的、综合性的鉴定手段,是建立于中药化学成分系统研究基础上,用于评价中药材及中药复方制剂质量的真实性、优良性和稳定性,具有中药整体性和模糊性的特点,能较全面地反映复方制剂中各成分的种类和数量,常作为评价多组分中药复方整体质量控制的有效手段^[1-2]。本文在已有的质量标准基础上,采用 HPLC 法对其进行指纹图谱研究,以为产品的质量控制提供更全面的信息。

1 材料

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津),KQ3200 型超声清洗仪(昆山市超声仪器有限公司),AL204 型分析天平(梅特勒-托利多有限公司);对照品绿原酸、甘草苷、木犀草苷(批号分别为 110753-200413, 111610-201106, 110720-201106, 纯度分别为 96.2%, 92.6%, 96.8%)均购于中国食品药品检定研究院;银桑菊固体饮料由本院实验室制备,批号分别为 20151001, 20151002, 20151003, 20151004, 20151005, 20151006, 20151007, 20151008, 20151009, 20151010, 记为 S1 ~ S10;乙腈色谱级,水为蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[3-4] Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),检测波长 268 nm,流动相乙腈(A)-0.4% 磷酸溶液(B),梯度洗脱(0 ~ 25 min, 10% ~ 18% A; 25 ~ 55 min, 18% ~ 36% A; 55 ~ 60 min, 36% ~ 95% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 35 °C。

2.2 溶液的制备

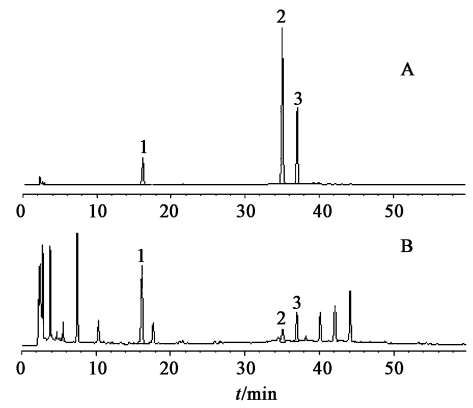
2.2.1 对照品溶液 精密称取绿原酸、甘草苷、木犀草苷对照品适量,置棕色量瓶中,用 50% 甲醇溶解并定容,配制质量浓度分别为 90, 100, 120 mg·L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取银桑菊固体饮料样品适量,研细,取约 0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 50 mL,称定质量,超声处理 30 min,放冷,再称定质量,用 50% 甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 5 mL,置 25 mL 棕色量瓶中,加 50% 甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 色谱系统适应性试验 精密吸取对照品溶液、供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪中,按照 2.2.1 项下色谱条件测定,采集 60 min 的色谱图。结果见图 1。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取同一批样品(批号 20151001),按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液。按



A. 对照品; B 供试品; 1. 绿原酸; 2. 甘草苷; 3. 木犀草苷

图 1 银桑菊固体饮料 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatogram of Yinsangju solid beverage

2.1 项下 色谱条件进样测定,连续 6 次,进样量 10 μL。测得样品各共有峰相对保留时间 RSD < 3.0%,相对峰面积 RSD < 5.0%,表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取同一批样品(批号 20151002),按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,分别于制备后 0, 2, 4, 8, 12, 16 h 进样,进样 10 μL,按 2.1 项下色谱条件测定。测得样品各共有峰的相对保留时间 RSD < 3.0%,相对峰面积 RSD < 5.0%,结果表明供试品溶液放置 16 h 稳定。

2.3.3 重复性试验 取同一批样品(批号 20151002),按 2.2.2 项下的方法,制备 6 份供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,测得样品各共有峰的相对保留时间 RSD < 3.0%,相对峰面积 RSD < 5.0%,表明该方法重复性良好。

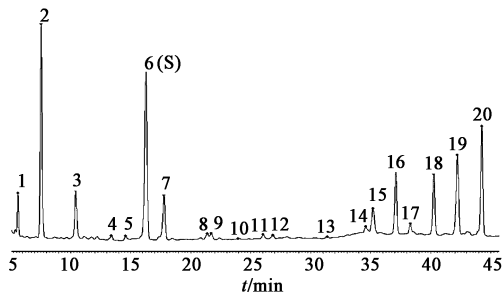
2.4 指纹图谱的建立及共有峰的标定

2.4.1 指纹图谱的建立 取 10 批银桑菊固体饮料适量,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图,标记 S0 ~ S10,其中 S0 为对照品色谱, S1 ~ S10 为银桑菊固体饮料色谱。

2.4.2 参照峰的选择 由前期研究可知绿原酸为银桑菊固体饮料的主要功效成分,经 HPLC 预试验分析可知其分离度好、出峰时间适中、峰面积较大且稳定、易于辨认,故选择其作为本品 HPLC 指纹图谱的参照峰。

2.4.3 共有峰的标定及共有模式的建立 将 10 批银桑菊固体饮料的色谱图导入国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2.0 版)软件中,选择 S4 作为参照图谱,采用中位数,时间窗为 0.1,对 10 批样品的色谱图进行匹配,标定了 20 个共有峰,采

用对照品色谱图指认 6 号峰为绿原酸,对样品色谱图进行校正、匹配,生成共有模式图,见图 2,3。



6(S). 绿原酸

图 2 银桑菊固体饮料的 HPLC 指纹谱共有模式

Fig. 2 Joint pattern mode of HPLC fingerprints of Yinsangju solid beverage

2.4.4 相似度的评价 以 6 号峰为参照峰(S),设其保留时间和峰面积为 1,计算样品的 20 个共有峰

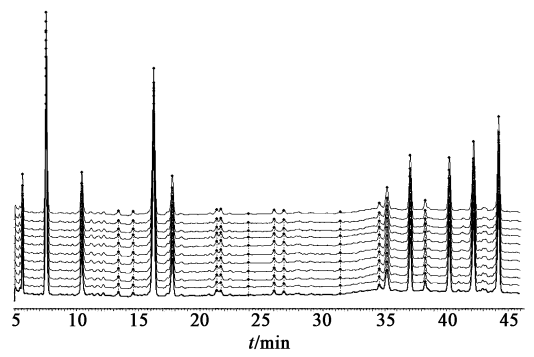


图 3 10 批银桑菊固体饮料 HPLC 指纹谱叠加

Fig. 3 HPLC fingerprint layout chart of 10 batches of Yinsangju solid beverage

的相对保留时间及相对峰面积,见表 1,2,借助“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2.0 版)软件对 10 批银桑菊固体饮料样品进行相似度评价,结果见表 3。

表 1 10 批银桑菊固体饮料样品的相对保留时间

Table 1 Relative retentive time of 10 batches of Yinsangju solid beverage

批号	1	2	3	4	5	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
S1	0.344	0.462	0.642	0.823	0.897	1.093	1.332	1.373	1.468	1.593	1.646	1.920	2.115	2.154	2.268	2.342	2.462	2.582	2.704
S2	0.344	0.462	0.642	0.824	0.896	1.093	1.332	1.375	1.467	1.590	1.648	1.992	2.117	2.157	2.269	2.345	2.464	2.585	2.707
S3	0.344	0.463	0.642	0.824	0.896	1.093	1.334	1.376	1.477	1.597	1.650	1.927	2.122	2.160	2.274	2.349	2.468	2.589	2.711
S4	0.344	0.462	0.641	0.823	0.896	1.092	1.333	1.375	1.476	1.596	1.648	1.926	2.120	2.159	2.273	2.347	2.467	2.588	2.710
S5	0.346	0.465	0.642	0.825	0.897	1.093	1.336	1.379	1.478	1.604	1.651	1.934	2.130	2.168	2.286	2.361	2.482	2.604	2.730
S6	0.347	0.465	0.642	0.825	0.897	1.092	1.335	1.378	1.477	1.603	1.649	1.933	2.128	2.166	2.283	2.358	2.479	2.601	2.726
S7	0.346	0.464	0.641	0.825	0.897	1.093	1.336	1.379	1.480	1.605	1.651	1.935	2.131	2.169	2.287	2.362	2.482	2.604	2.729
S8	0.348	0.466	0.643	0.826	0.899	1.093	1.336	1.379	1.479	1.605	1.651	1.935	2.131	2.169	2.287	2.361	2.482	2.603	2.729
S9	0.346	0.463	0.639	0.824	0.897	1.093	1.338	1.382	1.477	1.606	1.652	1.925	2.130	2.167	2.285	2.360	2.481	2.601	2.728
S10	0.346	0.464	0.639	0.824	0.897	1.093	1.338	1.383	1.483	1.606	1.652	1.934	2.130	2.167	2.285	2.360	2.481	2.601	2.728

注:6 号峰均为 1.000(表 2 同)。

表 2 10 批银桑菊固体饮料样品的相对峰面积

Table 2 Relative peak area of 10 batches of Yinsangju solid beverage

峰号	1	2	3	4	5	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
S1	0.178	0.976	0.259	0.034	0.036	0.263	0.034	0.019	0.018	0.031	0.025	0.011	0.094	0.207	0.330	0.065	0.356	0.496	0.574
S2	0.185	1.008	0.272	0.034	0.034	0.257	0.036	0.017	0.019	0.035	0.025	0.011	0.095	0.198	0.319	0.062	0.342	0.479	0.557
S3	0.188	0.972	0.250	0.033	0.033	0.256	0.035	0.017	0.018	0.028	0.022	0.009	0.094	0.207	0.356	0.057	0.327	0.516	0.578
S4	0.173	0.971	0.255	0.033	0.033	0.254	0.036	0.016	0.019	0.029	0.024	0.010	0.086	0.202	0.320	0.059	0.306	0.477	0.556
S5	0.180	0.959	0.254	0.032	0.030	0.255	0.039	0.016	0.016	0.031	0.029	0.009	0.102	0.210	0.338	0.060	0.308	0.470	0.547
S6	0.181	0.932	0.299	0.032	0.031	0.257	0.037	0.016	0.019	0.029	0.025	0.010	0.090	0.196	0.320	0.055	0.302	0.470	0.540
S7	0.185	0.947	0.255	0.030	0.031	0.258	0.037	0.017	0.018	0.035	0.027	0.009	0.099	0.206	0.336	0.054	0.321	0.514	0.572
S8	0.180	0.888	0.258	0.031	0.030	0.252	0.034	0.015	0.020	0.032	0.026	0.009	0.082	0.193	0.309	0.055	0.297	0.464	0.531
S9	0.193	1.126	0.288	0.036	0.037	0.262	0.039	0.019	0.021	0.030	0.026	0.011	0.105	0.231	0.365	0.066	0.343	0.488	0.559
S10	0.191	0.962	0.245	0.033	0.034	0.253	0.041	0.019	0.020	0.030	0.025	0.010	0.103	0.216	0.350	0.064	0.344	0.466	0.535

2.4.5 各特征峰的药材归属 按 2.2.2 项下方法,分别制备处方中金银花、菊花、黄精、甘草等药材的供试品溶液,再按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记

录色谱图,并与银桑菊固体饮料样品的指纹图谱进行比对,从而确认样品指纹图谱中各特征峰的归属,结果见图 4,表 4。

表 3 10 批银桑菊固体饮料样品相似度

Table 3 Similarity results of 10 batches of Yinsangju solid beverage

No.	样品批号	相似度	No.	样品批号	相似度
1	20151001	0.989	6	20151006	0.954
2	20151002	0.946	7	20151007	0.942
3	20151003	0.921	8	20151008	0.938
4	20151004	1.000	9	20151009	0.986
5	20151005	0.968	10	20151010	0.949

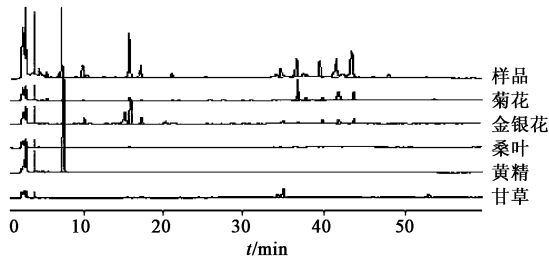


图 4 各药材 HPLC 叠加

Fig. 4 HPLC fingerprint layout chart of components

表 4 指纹图谱中各特征峰的归属

Table 4 Affiliation of characteristic peaks in fingerprints

峰号	药材
3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 18, 19, 20	金银花
2	黄精
1, 6, 16, 17, 18, 19, 20	菊花
14, 15	甘草

3 讨论

课题组采用紫外扫描法对银桑菊固体饮料供试品溶液在 200 ~ 400 nm 的紫外吸收进行了考察,重点考察了 208, 268, 327, 350 nm 4 个波长,结果表明在 268 nm 波长下,色谱信息丰富,各成分均有较好地吸收,各色谱峰分布均匀且峰形大小合适,基线较平稳,故选择 268 nm 作为检测波长^[5-6]。

本实验考察了以甲醇-不同浓度乙酸溶液、甲醇-不同浓度磷酸溶液、乙腈-不同浓度乙酸溶液、乙腈-不同浓度磷酸溶液作为流动相对样品成分分离效果的影响,结果表明以乙腈-0.4% 磷酸溶液作为流动相分离出的样品特征峰明显,峰形良好、分离效果较好,同时亦对该流动体系进行了等度洗脱和梯度洗脱两种洗脱方式的考察,结果发现梯度洗脱分离效果更好,故最终选定采用乙腈-0.4% 磷酸溶液作为流动相体系,梯度洗脱^[7-8]。

本实验对样品的提取方法及提取溶剂进行了考察,在以乙醇,甲醇,50% 甲醇,75% 乙醇为提取溶剂提取样品的过程中发现不同溶剂提取样品其色谱图

差异较大,以 50% 甲醇提取样品的色谱图特征峰较多且各成分分离均能达到要求,在以超声和回流 2 种提取方法考察发现超声处理后的样品经分析其色谱峰较回流方法多且分离效果良好,故选择用 50% 甲醇超声处理样品 30 min^[9]。

指纹图谱技术作为全面评价中药复方制剂内在质量的手段之一,具有模糊性、整体性等特点,相对于以某个单一成分作为对照而言,其提供的信息更全面,更有价值^[10-11]。本实验对 10 批银桑菊固体饮料进行了 HPLC 指纹图谱的研究,建立了其共有模式,标定了 20 个共有峰并指认了 3 个成分峰,10 批样品的相似度均在 0.9 以上,同时也对共有峰进行了归属,表明所建立的指纹图谱具有特征性,生产过程中基本保留了药材的成分特征,该法可作为银桑菊固体饮料质控指标之一^[12]。

[参考文献]

- [1] 秦裕辉,李跃辉,谭电波,等. 丹瓜养目膏的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药房, 2015, 26(36): 5128-5130.
- [2] 张前飞,杨玉琴,秦利芬,等. 降粘胶囊 HPLC 指纹图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(1): 77-81.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 311.
- [4] 周萍,胡俊扬,毛春芹,等. 金银花高效液相指纹图谱条件优化与建立[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(1): 97-99.
- [5] 杨欣欣,王帅,包永睿,等. 不同产地金银花指纹图谱研究[J]. 亚太传统医药, 2015, 11(5): 17-20.
- [6] 熊斌,苏杰雄,刘贤钊,等. 桑叶 HPLC 指纹图谱的优化及建立[J]. 广东药学院学报, 2015, 31(2): 203-206.
- [7] 张珺,程月发,张爱兵. 丹参胶囊水溶性成分的高效液相色谱指纹图谱分析[J]. 医药导报, 2015, 34(4): 89-94.
- [8] 王莎,王昌利,史亚军. 复方龙脉宁 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(1): 89-92.
- [9] 罗石任,王昭,李洁. 顽痹清丸 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2016, 23(1): 96-99.
- [10] 桑冉,王雷,陈卫东. 中药复方体内指纹图谱研究进展[J]. 蚌埠医学院学报, 2014, 39(4): 552-554.
- [11] 陈东东,周萍,白钢钢,等. 基于 HPLC 中药指纹图谱技术延胡索药材及其制剂的质量控制探讨[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(12): 2470-2473.
- [12] 邱宏聪,马军花,陈露,等. 复方金钱草颗粒的指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(1): 36-39.

[责任编辑 顾雪竹]