

白头翁配方颗粒的 HPLC 指纹图谱研究

江洁怡^{1*}, 胥爱丽¹, 毕晓黎^{1,2}, 李养学¹, 李素梅¹

(1. 广东省中医研究所, 广州 510095; 2. 广州中医药大学, 广州 510405)

[摘要] **目的:**建立白头翁配方颗粒的高效液相指纹图谱,为白头翁配方颗粒的鉴别、质量评价与控制提供实验依据。**方法:**采用高效液相色谱(HPLC)法, Waters Xbridge™ C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)为色谱柱;乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱,检测波长 210 nm,柱温 40 °C,流速 0.8 mL·min⁻¹。**结果:**建立了白头翁配方颗粒的高效液相指纹图谱,以白头翁皂苷 B₄为参照,确定了 12 个共有峰为特征峰,对照指纹图谱色谱峰丰富,分离度高,相似性好。**结论:**该方法可用于白头翁配方颗粒的鉴别、质量评价与控制。

[关键词] 白头翁配方颗粒; 高效液相色谱; 指纹图谱; 白头翁皂苷 B₄

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0085-04

[doi] 10.11653/syfyj2013150085

Study on HPLC Fingerprint Analysis of Radix Pulsatillae Formula Granules

JIANG Jie-yi^{1*}, XU Ai-li¹, BI Xiao-li^{1,2}, LI Yang-xue¹, LI Su-mei¹

(1. Guangdong Province Institute of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095, China;

2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the fingerprint of Radix Pulsatillae Formula Granules for identifying and evaluating its quality by HPLC. **Method:** The HPLC analysis was carried out in Waters Xbridge™ C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with a mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric by gradient elution. The detection wavelength was set at 210 nm; the column temperature was kept at 40 °C and the flow rate was 0.8 mL ·

[收稿日期] 20130228(015)

[基金项目] 广东省教育部科技部产学研结合项目(2011A091000005)

[通讯作者] * 江洁怡, 硕士, 中药师, 从事中药质量标准研究, Tel:020-83501292, E-mail: blpz. jiang@ yahoo. com. cn

- [4] 韩铁锁, 王亚军, 王新, 等. 东北林蛙油化学成分和药理作用的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2008, (4):17.
- [5] 季怡萍. 哈士蟆油中脂肪酸的 GC、GC-MS 分析[J]. 分析测试学报, 1999, 18(3):80.
- [6] 卢立明, 宋少江, 徐绥绪, 等. 哈士蟆卵油化学成分研究[J]. 中国药物化学杂志, 2001, 11(4):224.
- [7] 李成义, 金子, 王琳. GC/MS 分析吉林产哈士蟆卵油的脂肪酸[J]. 中国药学杂志, 1994, 29(1):18.
- [8] 韩娜, 赵建邦, 宋平顺. 气相色谱法测定火麻仁中亚油酸及 α-亚麻酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3):83.
- [9] 卢淑君, 杨燕云, 许亮, 等. 气相色谱法测定牛蒡子脂肪油中 3 种脂肪酸含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(20):56.
- [10] 张辰露, 吴三桥, 秦文娟, 等. GC-MS 法分析中药索骨丹中脂肪酸成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3):56.
- [11] 傅渝滨, 景淑华. 亚麻籽油中 α-亚麻酸等不饱和脂肪酸的 HPLC 测定[J]. 重庆医科大学学报, 1996, 21(3):223.
- [12] 秦建平, 陆艳芹, 罗雪磊, 等. HPLC 同时测定火麻仁中 α-亚麻酸、亚油酸和油酸含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7):71.
- [13] 辛海量, 侯银环, 盛佳钰, 等. 高效液相色谱法测定马齿苋中不饱和脂肪酸的含量[J]. 解放军药学报, 2011, 27(1):52.

[责任编辑 顾雪竹]

min⁻¹. **Result:** Eighteen peaks were selected as the character fingerprint peaks of Radix Pulsatillae Formula Granules with the identified of pulchinoside B₄. Good similarities were found in the established fingerprint through similarity analysis and the resolution was good. **Conclusion:** The method can be used as the quality control for Radix Pulsatillae Formula Granules.

[**Key words**] Radix Pulsatillae Formula Granules; HPLC; fingerprints; pulchinoside B₄

白头翁为毛茛科植物白头翁的干燥根,为多年生草本植物,味苦、性寒,归胃、大肠经,具有清热解毒、凉血止痢、燥湿杀虫的功效^[1];临床上对热毒血痢、阴痒带下、慢性溃疡性结肠炎、结肠炎等有很好的治疗效果^[2]。研究表明,白头翁主要的化学成分有白头翁皂苷 B₄、白头翁素、白头翁英、白头翁灵、原白头翁素、常春藤酮酸、白桦酯酸、木脂素类以及一系列三萜类皂苷^[3-5],具有抗肿瘤、抗炎、杀菌、保肝及增强免疫功能等作用^[3,6-7]。

中药配方颗粒是以中药饮片为原料,通过运用加工提取、喷雾干燥等现代生产技术制成的颗粒状制剂^[8]。它与传统水煎剂具有基本相同疗效和药理作用,且具有免煎易服、方便携带保存等优点^[9]。但由于原药来源、提取工艺与制剂成型等的不同,会使配方颗粒的质量产生差异,这就要求建立一种可靠的对配方颗粒质量进行评价与控制的方法。而中药指纹图谱能够全面反映中药的化学组成,是被广泛接受的一种中药质量评价模式。本文采用高效液相色谱法,建立了白头翁配方颗粒的指纹图谱,为白头翁配方颗粒的鉴别、质量评价与控制提供依据。

1 材料

1.1 仪器 Waters e2695 Separation Module 高效液相色谱仪(Waters 2489 UV/Visible Detector 检测器,四元梯度泵,Empower Pro 色谱工作站,美国),METTLER XS205DU 型电子分析天平(瑞士-梅特勒),KQ5200DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版(国家药典委员会)。

1.2 试剂 乙腈等 HPLC 所用试剂(德国-默克)均为色谱纯试剂(一级),液相用水为屈臣氏蒸馏水(批号 20120723C),磷酸(广州化学试剂厂,批号 20120301-1)为分析纯;白头翁皂苷 B₄ 对照品(批号 B-029-120929)购于成都瑞芳思生物科技有限公司,12 批白头翁配方颗粒(批号 0910072, 1001080, 1005178, 1009405, 1104006, 1104305, 1106417, 1108421, 1109748, 1203424, 1204005, 1204702)均购于广东一方制药有限公司(表 1)。

表 1 白头翁配方颗粒来源

样品	批号	样品	批号
S1	0910072	S7	1106417
S2	1001080	S8	1108421
S3	1005178	S9	1109748
S4	1009405	S10	1203424
S5	1104006	S11	1204005
S6	1104305	S12	1204702

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters XbridgeTM C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸溶液(B),梯度洗脱(0 ~ 15 min, 5% ~ 8% A; 15 ~ 25 min, 8% ~ 15% A; 25 ~ 65 min, 15% ~ 25% A; 65 ~ 75 min, 25% ~ 30% A; 75 ~ 85 min, 30% ~ 40% A; 85 ~ 105 min, 40% ~ 80% A; 105 ~ 110 min, 80% ~ 90% A),检测波长 210 nm,柱温 40 °C,流速 0.8 mL · min⁻¹,进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液制备 精密称白头翁皂苷 B₄ 对照品 5.80 mg,置 25 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液,备用。

2.3 供试品溶液制备 取本品内容物,混匀,研细(过三号筛),取约 0.1 g,精密称定,置 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,称重,超声处理(功率 200 W,频率 40 kHz,40 °C)30 min,取出,放冷,加甲醇补充减失质量,摇匀,过 0.45 μm 滤膜,取续滤液,作为供试品溶液,备用。

2.4 测定法 分别精密吸取不同批次试品溶液及对照品溶液各 10 μL,注入高效液相色谱仪中,按 2.1 项下色谱条件测定,记录色谱图。见图 1。

2.5 系统适应性考察

2.5.1 精密度试验 精密吸取 S12 供试品溶液 10 μL,重复进样 6 次,以 10 号峰为参照峰,计算 12 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 均 < 2%,表明该色谱条件下,仪器精密度良好。

2.5.2 重复性试验 取同一批样品(S12),按 2.3 项下供试品溶液的制备方法分别制备 6 份供试液,分别进样 10 μL,以 10 号峰为参照峰,计算 12 个共

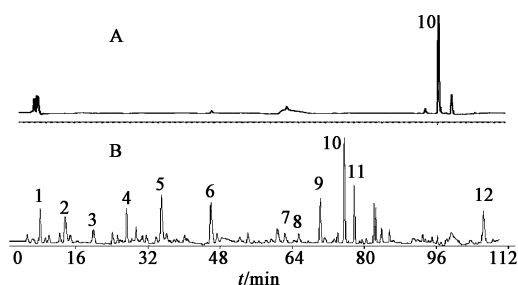
A. 对照品; B. 供试品; 10. 白头翁皂苷 B₄

图1 白头翁配方颗粒 HPLC

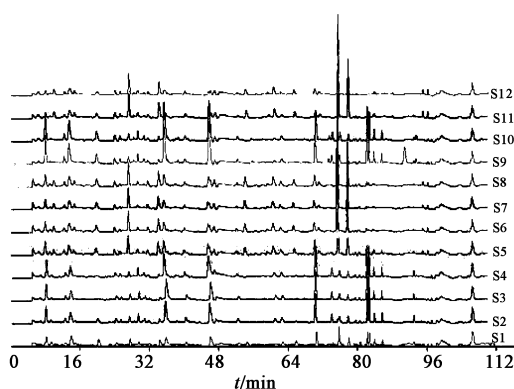


图2 12批白头翁配方颗粒匹配色谱

有峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 均 < 2% , 表明方法重复性良好。

2.5.3 稳定性试验 精密吸取 S12 供试品溶液 10 μ L, 照 2.1 项下色谱条件, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 重复进样, 以 10 号峰为参照峰, 计算 12 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 均 < 2% , 表明供试品溶液 24 h 内稳定。

2.6 白头翁配方颗粒指纹图谱的建立及相似度评价 分别精密吸取不同批次 (S1 ~ S12) 的白头翁配方颗粒供试品溶液及白头翁皂苷 B₄ 对照品溶液各 10 μ L, 注入高效液相色谱仪中, 按 2.1 项下色谱条件测定, 记录色谱图, 见图 1 ~ 2。将 12 批白头翁配方颗粒的实验数据导入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 2004 A 版”软件, 采用中位数法对不同批次白头翁配方颗粒的指纹图谱进行峰点校正, 数据匹配分析, 生成共有模式图, 见图 2。确认了 12 个共有峰为特征峰, 并通过与对照品图谱的比较确定了 10 号峰为白头翁皂苷 B₄。

以白头翁皂苷 B₄ 为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果见表 2 ~ 3。12 批白头翁配方颗粒与对照指纹图谱的相似度分别为 0.899, 0.791, 0.760, 0.778, 0.984, 0.960, 0.956, 0.959, 0.781, 0.799, 0.913, 0.914。相似度评价表明, 12 批供试品指纹图谱与对照指纹图谱的相关性良好, 除 S1, S2, S3, S4, S9, S10 相似度略低外, 其余样品的相似度均 > 0.90。对比相似度较小样品与其他样品的指纹图谱, 发现其共有峰相对保留时间比较一致, 主要差异表现在色谱峰的丰度上, 即含量的差异。分析表明, S1, S2, S3, S4 均为 2010 年以前的样品, 可能由于时间久远, 存放过程中样品主要成分发生变化; 而年限较近的 S9, S10 2 个样品的差异, 可能由于原药材来源, 加工工艺的不同及贮藏、运输过程中质量影响因素的波动等原因产生的样品主要成分性质改变而导致。

表2 12批白头翁配方颗粒共有峰的相对保留时间

峰号	相对保留时间												RSD /%
	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈	S ₉	S ₁₀	S ₁₁	S ₁₂	
1	0.109	0.108	0.108	0.109	0.106	0.106	0.107	0.106	0.106	0.105	0.106	0.106	1.31
2	0.185	0.182	0.183	0.182	0.178	0.179	0.180	0.179	0.178	0.178	0.180	0.181	1.25
3	0.268	0.265	0.267	0.264	0.261	0.263	0.263	0.263	0.261	0.261	0.263	0.264	0.85
4	0.364	0.362	0.364	0.360	0.359	0.361	0.361	0.360	0.358	0.358	0.361	0.361	0.52
5	0.473	0.471	0.474	0.466	0.467	0.452	0.452	0.452	0.466	0.466	0.453	0.453	1.93
6	0.609	0.605	0.608	0.602	0.604	0.605	0.604	0.605	0.603	0.602	0.625	0.624	1.29
7	0.808	0.804	0.807	0.800	0.803	0.803	0.803	0.803	0.802	0.800	0.805	0.803	0.30
8	0.829	0.824	0.827	0.823	0.826	0.826	0.825	0.826	0.824	0.822	0.828	0.826	0.24
9	0.932	0.926	0.928	0.927	0.931	0.929	0.929	0.930	0.927	0.927	0.931	0.930	0.20
10	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
11	1.031	1.026	1.026	1.026	1.031	1.031	1.031	1.031	1.026	1.026	1.031	1.031	0.26
12	1.406	1.403	1.404	1.403	1.411	1.413	1.412	1.411	1.403	1.401	1.409	1.411	0.31

表 3 12 批白头翁配方颗粒共有峰的相对峰面积

峰号	相对峰面积											
	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈	S ₉	S ₁₀	S ₁₁	S ₁₂
1	0.561	1.803	2.952	2.882	0.234	0.174	0.177	0.183	3.947	4.150	0.077	0.072
2	1.414	2.450	3.550	4.007	0.444	0.385	0.378	0.394	5.433	5.594	0.301	0.304
3	0.489	0.669	0.473	0.460	0.152	0.157	0.166	0.168	1.914	2.056	0.084	0.079
4	0.297	0.575	1.025	1.006	0.287	0.289	0.296	0.288	0.776	0.822	0.291	0.297
5	1.278	3.609	5.869	6.854	0.657	0.535	0.519	0.497	8.720	9.114	0.419	0.422
6	0.880	3.255	5.135	7.685	0.473	0.380	0.369	0.413	8.105	8.483	0.246	0.242
7	0.077	0.601	1.171	1.128	0.173	0.166	0.156	0.157	0.494	0.495	0.164	0.150
8	0.245	0.772	1.064	1.105	0.106	0.088	0.084	0.092	0.742	0.834	0.051	0.051
9	0.806	3.239	5.231	5.060	0.263	0.166	0.154	0.177	4.164	4.404	0.105	0.107
10	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
11	0.388	0.608	0.839	0.815	0.530	0.528	0.527	0.526	0.747	0.837	0.460	0.464
12	1.330	2.186	3.743	3.161	0.305	0.269	0.281	0.233	2.522	2.601	0.232	0.267

3 讨论

对白头翁的指纹图谱研究已有报道,方艳夕等^[10]建立了白头翁药材 HPLC 指纹图谱,并比较了我国不同产地白头翁中白头翁皂苷 B₄ 含量的差异。李海燕等^[11]采用高效液相色谱法分析和比较了不同来源朝鲜白头翁和白头翁的指纹图谱。但对白头翁配方颗粒的研究却未见文献报道,单味中药配方颗粒与传统汤剂虽主要药效物质种类相近,但在含量上差异较大^[12]。

考察了甲醇、乙醇、乙酸乙酯、50% 甲醇、80% 乙醇作为提取溶剂;全波长扫描考察了不同波长下供试品的指纹图谱;甲醇-0.1% 磷酸溶液、乙腈-0.1% 磷酸溶液、乙腈-水等流动相体系;最终得到 **2.1,2.3** 项下的最优条件,该条件下谱图色谱峰信息丰富,分离度好,稳定性高。

本实验对 12 批白头翁配方颗粒指纹图谱进行研究,结果表明各供试品的指纹图谱主要峰整体一致,指出了 12 个共有特征峰并确认了 10 号峰为白头翁皂苷 B₄,通过软件得到白头翁配方颗粒的对照指纹图谱。本方法稳定、可靠、重复性好,为白头翁配方颗粒的鉴别、质量评价与控制,特别是产品稳定性的研究,提供了实验依据。

[参考文献]

[1] 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, 2010:96.
[2] 冯果,刘文,冯勇. 复方白头翁汤结肠缓释片质量标

准研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(13):81.
[3] 李勇,林翠英. 白头翁属植物化学成分及活性研究概述[J]. 天津中医药,2005,22(6):526.
[4] 关树光,於文博,赵宏峰,等. 白头翁化学成分的研究 II [J]. 长春中医药大学学报,2006,22(3):45.
[5] 张晓琦,石宝俊. 白头翁地上部分的化学成分研究[J]. 中草药,2008,39(5):651.
[6] 王海侠,郑新勇. 白头翁皂苷 B₄ 体外抑制人肝癌细胞 HepG2 增殖并诱导其凋亡[J]. 上海交通大学学报:医学版,2011,31(10):1481.
[7] 阮殿清,史默怡,李建志,等. 12 种中草药对耐药与非耐药菌株抑菌活性的对比研究[J]. 中医药信息, 2011,28(3):52.
[8] 王智民,叶祖光,肖诗鹰,等. 对中药配方颗粒发展的几点建议和应用前景分析[J]. 中国中药杂志,2004, 29(1):1.
[9] 毕晓黎,胥爱丽,李养学,等. 三七配方颗粒的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(9):54.
[10] 方艳夕,潘勇,秦梅颂,等. 白头翁高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 宜春学院学报,2011,33(12):130.
[11] 唐博雅,杨义芳,黄春跃,等. 白头翁及其疑似品的 HPLC 指纹图谱法鉴别[J]. 中国医药工业杂志, 2013,44(3):281.
[12] 史蕙,黄蓓. HPLC 对戊己丸传统汤剂与其复方、配方颗粒汤剂的特征图谱比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(21):86.

[责任编辑 顾雪竹]