

## 二母颗粒 HPLC-ELSD 指纹图谱的建立

卢君蓉, 傅超美\*, 季宁平, 胡慧玲, 林俊芝, 徐晓秋

(成都中医药大学, 中药材标准化教育部重点实验室, 中药资源系统研究与开发  
利用省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

**[摘要]** 目的: 建立二母颗粒的 HPLC-ELSD 特征指纹图谱。方法: 采用 HPLC-ELSD, 选用 Global Chromatography C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 漂移管温度 45 °C, 增益值 1, 雾化空气流速 1.5 L·min<sup>-1</sup>。对 10 批二母颗粒样品进行 HPLC-ELSD 测定, 并与知母药材、知母浸膏的 HPLC-ELSD 图谱进行对比, 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004 年版 A 进行相似度评价。结果: 10 批二母颗粒样品与知母药材、知母稠膏的相似度较高(0.960 ~ 0.998)。结论: 二母颗粒的 HPLC-ELSD 指纹图谱能更加完善二母颗粒的质量评价体系, 为其他制剂品种的“原药材-中间体-成品”的全过程控制研究提供参考。

**[关键词]** 二母颗粒; HPLC-ELSD; 指纹图谱; 相似度评价

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0063-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013110063

## Establishment of HPLC-ELSD Fingerprint of Ermu Granules

LU Jun-rong, FU Chao-mei\*, JI Ning-ping, HU Hui-ling, LIN Jun-zhi, XU Xiao-qiu

(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Provincial and State Constructed Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research and Development of Chinese Herbal Medicine Resource, Chengdu 611137, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish HPLC-ELSD characteristic fingerprint for Ermu granules. **Method:** HPLC-ELSD was employed, separation was carried out on Global Chromatography C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), mobile phase of water-acetonitrile with gradient elution, flow rate 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, temperature of drift tube maintained at 45 °C, the gain value 1, flow rate of atomizing air set at 1.5 L·min<sup>-1</sup>. Ten batches of Ermu

**[收稿日期]** 20121205(010)

**[基金项目]** 国家“十一五”科技支撑计划重点项目(2006BAI06A13)

**[第一作者]** 卢君蓉, 硕士, 从事中药新制剂和新剂型研究, Tel: 13688167921, E-mail: 634589580@qq.com

**[通讯作者]** \* 傅超美, 教授, 博士, 博士生导师, 从事中药新制剂和新剂型研究, Tel: 028-61800236, E-mail: chaomeifu@126.com

- [2] 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: 176.
- [3] 钱俊臻, 王伯初. 橙皮苷的药理作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(3): 176.
- [4] 欧立娟, 刘启德. 陈皮药理作用研究进展[J]. 中国药房, 2006, 17(10): 787.
- [5] 张冬松, 高慧媛, 吴立军. 橙皮苷的药理活性研究进展[J]. 中国现代中药, 2006, 8(7): 25.
- [6] 杨华, 何希荣, 顾雪竹. HPLC 测定胆疏胶囊中橙皮苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10): 92.
- [7] 蔡梅超. HPLC 测定胃舒尔安颗粒中橙皮苷和柚皮苷的含量[J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(6): 213.
- [8] 吴宏华, 宋剑锋. RP-HPLC 法测定补中益气颗粒中橙皮苷含量[J]. 海峡药学, 2012, 24(6): 54.
- [9] 胡志军, 陈建秋. HPLC 测定不同基原陈皮药材中橙皮苷含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 95.
- [10] 戴敬, 郝培培, 杨晓婧, 等. HPLC 测定女金丸中橙皮苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 78.

[责任编辑 全燕]

granules were determined, and fingerprints of them were compared with raw materials of *Anemarrhena asphodeloides* and extracts of *A. asphodeloides*, similarity among them was analysed by 2004 Edition A of 'Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine'. **Result:** The similarity between ten batches of Ermu granules and raw materials of *A. asphodeloides*, extracts of *A. asphodeloides* were very high (0.960-0.998). **Conclusion:** HPLC-ELSD fingerprint of Ermu granules could make its quality evaluation system more completed, which could provide a reference for study of 'raw materials of Chinese medicine-intermediate materials-products' for the whole process control of other preparations varieties.

[**Key words**] Ermu granules; HPLC-ELSD; fingerprint; similarity evaluation

二母颗粒原方首见于《急救仙方》卷六之二母散项下<sup>[1]</sup>,由川贝母、知母等研末而成。为便于携带、服用,减少微生物污染,提高患者的顺应性,拟将其改制成颗粒剂。由于在颗粒制备过程中涉及提取、浓缩、干燥等环节,可能对知母皂苷等热敏性成分有所影响,为保证二母颗粒的质量,本实验采用 HPLC-ELSD 对 10 批二母颗粒成品的指纹图谱进行研究,并与知母药材、知母稠膏的图谱进行对比,按“原药材-提取物(稠膏)-成品”的制剂过程控制思路,探索制剂过程对半成品和成品质量的影响,以保证二母颗粒的安全有效、稳定可控。

## 1 材料

1200 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),3300 型蒸发光散射检测器(Alltech 公司),BP211D 型 1/10 万电子分析天平(德国 Sartorius 公司),BP121S 型 1/万电子分析天平(德国 Sartorius 公司),UPT-I-10T 型超纯水机(成都超纯科技有限公司)。

10 批川贝母、知母饮片(生)均购于成都国际商贸城中药材批发市场,依次经四川大学华西药学院王曙教授鉴定分别为百合科植物川贝母 *Fritillaria cirrhosa* D. Don 的干燥鳞茎,成都中医药大学药学院标本馆卢先明教授鉴定为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bge. 的干燥根茎。二母颗粒(实验室自制),知母稠膏(实验室自制),知母皂苷 B II 对照品(购于四川省维克奇生物科技有限公司,批号 201006,纯度 $\geq 98\%$ ),乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Global Chromatography C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0 ~ 5 min, 5% ~ 10% A; 5 ~ 10 min, 10% ~ 20% A; 10 ~ 30 min, 20% ~ 45% A; 30 ~ 40 min, 45% ~ 100% A; 40 ~ 45 min, 100% ~ 5% A),柱温 35 °C,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 10 μL,漂移管

温度 45 °C,增益 1,雾化气体流速 1.5 L·min<sup>-1</sup>。

**2.2 对照品溶液的制备** 取知母皂苷 B II 对照品适量,精密称定,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,制成 0.402 g·L<sup>-1</sup>的对照品溶液。

**2.3 供试品溶液的制备** 取各批次的二母颗粒样品粉末约 5.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 30 mL,称定质量,超声处理(250 W, 50 kHz) 30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取滤液,即得。

### 2.4 方法学考察

**2.4.1 精密度试验** 取同一供试品溶液,连续进样 6 次,结果各主要色谱峰的峰面积 RSD 均 < 5%,相对保留时间的 RSD 均 < 1%,符合特征指纹图谱要求。

**2.4.2 重复性试验** 取同一供试品溶液共 6 份,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,分别进行 HPLC 测定,结果各主要色谱峰相对峰面积的 RSD 均 < 5%,相对保留时间的 RSD 均 < 2%,说明该方法重复性良好。

**2.4.3 稳定性试验** 取同一供试品溶液,分别于 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h 进样分析,结果各主要色谱峰相对峰面积的 RSD 均 < 5%,相对保留时间的 RSD 均 < 1.5%,表明二母颗粒供试品溶液在 24 h 内稳定。

### 2.5 HPLC-ELSD 特征图谱及技术参数

**2.5.1 样品测定及共有特征峰的确定** 通过对 10 批二母颗粒样品的测定,应用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004 版 A 建立其 HPLC-ELSD 特征图谱(图 1)。结果各主要色谱峰的出峰时间基本一致,确定了蒸发光检测条件下峰面积较大的 10 个峰为其共有色谱峰,其中 7 号峰被确定为知母皂苷 B II。

**2.5.2 特征图谱分析** 在 HPLC-ELSD 特征图谱中选取峰面积较大、保留时间适中的 7 号峰(知母皂苷 B II)为参照峰(S),以其保留时间、峰面积为 1,

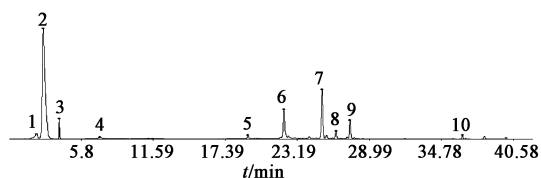


图1 二母颗粒的 HPLC-ELSD 特征图谱

计算其余各共有峰的相对保留时间及相对峰面积。结果 2.5.1 项下 10 个峰的相对保留时间(峰面积)均值依次为 0.090 (0.328), 0.110 (5.052), 0.160 (0.185), 0.285 (0.072), 0.763 (0.129), 0.878 (0.557), 1.000 (1.000), 1.044 (0.140), 1.089 (0.519), 1.446(0.049)。

**2.6 相似度评价** 运用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 版 A)”对 10 批二母颗粒样品的 HPLC-ELSD 特征图谱进行相似度评价,同时对相同方法处理所得的知母药材、知母稠膏的 HPLC-ELSD 特征图谱进行比较,见图 2~4,10 批二母颗粒样品与知母药材、知母稠膏的 HPLC-ELSD 特征图谱叠加见图 5。

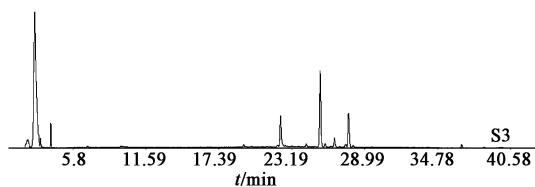


图2 二母颗粒(S3)的指纹图谱

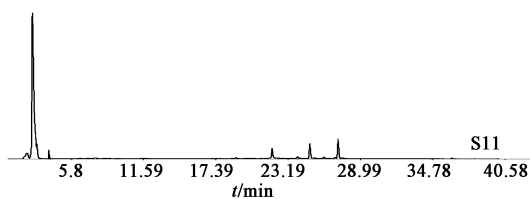


图3 知母浸膏(S11)的指纹图谱

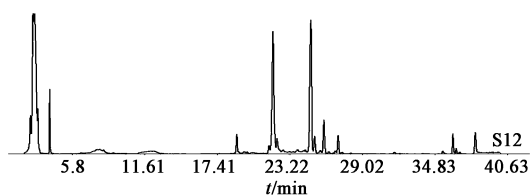


图4 知母药材(S12)的指纹图谱

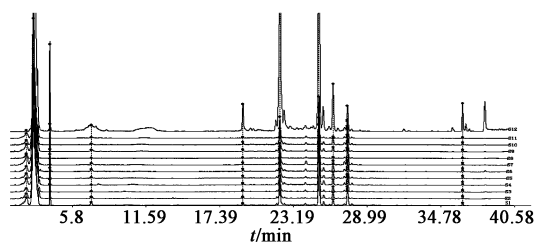


图5 10 批二母颗粒样品与知母药材、知母浸膏的 HPLC-ELSD 特征图谱叠加

以 S5 批二母颗粒样品的色谱图作为参照图谱,利用中位数法,时间窗 0.1 min,计算二母颗粒样品的相似度,结果见表 1。结果表明 10 批二母颗粒样品的 HPLC-ELSD 特征指纹图谱与知母稠膏、知母药材的 HPLC-ELSD 特征指纹图谱的相似度较高,达

表 1 二母颗粒样品的 HPLC-ELSD 特征指纹图谱相似度

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	对照指纹图谱
S1	1	0.996	0.985	0.996	0.996	0.996	0.993	0.982	0.996	0.994	0.989	0.923	0.993
S2	0.996	1	0.983	0.993	0.994	0.994	0.984	0.972	0.993	0.992	0.978	0.944	0.995
S3	0.985	0.983	1	0.993	0.988	0.99	0.984	0.986	0.982	0.988	0.967	0.947	0.992
S4	0.996	0.993	0.993	1	0.996	0.998	0.994	0.987	0.994	0.996	0.983	0.943	0.997
S5	0.996	0.994	0.988	0.996	1	0.997	0.993	0.983	0.995	0.996	0.985	0.937	0.996
S6	0.996	0.994	0.99	0.998	0.997	1	0.994	0.984	0.996	0.998	0.984	0.944	0.998
S7	0.993	0.984	0.984	0.994	0.993	0.994	1	0.988	0.993	0.993	0.99	0.919	0.990
S8	0.982	0.972	0.986	0.987	0.983	0.984	0.988	1	0.983	0.984	0.979	0.914	0.982
S9	0.996	0.993	0.982	0.994	0.995	0.996	0.993	0.983	1	0.997	0.993	0.923	0.992
S10	0.994	0.992	0.988	0.996	0.996	0.998	0.993	0.984	0.997	1	0.986	0.941	0.997
S11	0.989	0.978	0.967	0.983	0.985	0.984	0.99	0.979	0.993	0.986	1	0.886	0.978
S12	0.923	0.944	0.947	0.943	0.937	0.944	0.919	0.914	0.923	0.941	0.886	1	0.960
对照指纹图谱	0.993	0.995	0.992	0.997	0.996	0.998	0.99	0.982	0.992	0.997	0.978	0.96	1

注:S1~S10 为 10 批二母颗粒样品,S11 为知母稠膏,S12 为知母药材。

0.960 ~ 0.998。

**2.7 主要色谱峰可能性成分的 LC-MS 鉴定** 为进一步分析二母颗粒 HPLC-ELSD 指纹图谱中可能成分,本实验采用灵敏度更高、检测限更低的 Bruker Micro Q II -TOF(四级杆-飞行时间质谱)对二母颗粒样品所含成分进行研究。在所选色谱条件下,以正离子模式,对  $m/z$  100 ~ 1 500 的成分进行扫描,通过文献研究和对分子量(精确到小数点后第 4 位)的分析(图 6),初步推断出二母颗粒的 HPLC-ELSD 特征指纹图谱中,除含有知母皂苷 B II (5)外,可能还有表征新芒果苷(1)、芒果苷(2)、贝母辛(3)、贝母素乙(4)、知母皂苷 B(6)和知母皂苷 A III(7)等成分,提示在下一步研究中,可通过购买这些可能成分的对照品、富集样品中生物碱类成分等办法,在特征指纹图谱中对更多的成分进行定位,同时可考虑选择这些成分以共同控制二母颗粒的质量。

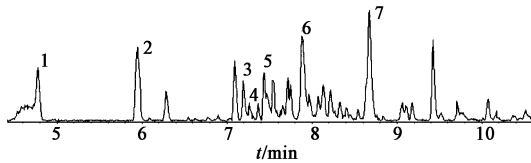


图 6 二母颗粒(S8)的 LC-MS

### 3 讨论

二母颗粒中川贝母主要含有以西贝母碱等为代表的生物碱类成分,知母主要含有以知母皂苷 B II 等为代表的皂苷类成分,这两大类成分在紫外均几无吸收,故本实验选择蒸发光散射检测器对二母颗粒进行特征指纹图谱研究。曾试图在二母颗粒的 HPLC-ELSD 中标定出与川贝母相关的生物碱类成分,采用西贝母碱、贝母素甲、贝母素乙对照品溶液进行定位,结果未能在 HPLC-ELSD 特征图谱中标定出相关成分。为探索该结果是否由于供试品为甲醇的提取液,在前期未经过碱化处理导致,参照《中国药典》2010 年版一部浙贝母项下含量测定方法<sup>[2]</sup>对供试品进行处理,并采用相应的色谱条件进行测定,结果发现在川贝母药材及二母颗粒样品中,单独测定西贝母碱、贝母素甲或贝母素乙成分的含量均低于检测限,故推断这可能是在二母颗粒的 HPLC-ELSD 中未能标定出代表性的生物碱类成分的主要原因。

特征指纹图谱能更加全面地反映样品的内在质量,体现中药研究的整体观思想,已被日益广泛运用于中药的相关研究<sup>[3]</sup>。在二母颗粒的制剂研究过程中,对知母进行了提取、纯化、浓缩等加工处理,由于知母所含皂苷类成分为热敏性成分,为更好地分析制剂过程对成品的影响,实验选择以 HPLC-ELSD 特征指纹图谱控制其“原药材-中间体-成品”的整个过程,以保证成品质量的稳定可控。实验中对阴性样品进行了测定,无干扰,各样品的相似度在 0.960 ~ 0.998,表明二母颗粒制剂设计合理,可保证相关成分从原药材到中间体到成品的转移,即采用 HPLC-ELSD 特征指纹图谱控制二母颗粒的质量是可行的。

从单张色谱图的角度看,知母药材的指纹图谱与二母颗粒、知母浸膏在图谱上有一定的差异,但由于指纹图谱主要为体现各图谱之间的相似性,且实验数据的处理采用多点校正法,故相似度仍很高,对于图谱间存在的差异性,可能仍与制剂过程某环节影响有关,在以后的研究中,拟引入代谢组学<sup>[4]</sup>的理念与研究方法。中药制剂质量控制问题一直是业内普遍关心的核心问题之一,严重影响着我国中药制剂现代化和国际化进程<sup>[5]</sup>,本实验采用特征图谱来控制“原药材-中间体-成品”全过程的思路与方法,对中药制剂品种的质量研究具有一定借鉴意义。

### [参考文献]

- [1] 卢君蓉,傅超美,陈秋薇,等. 二母颗粒中知母水提工艺优化[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(12):31.
- [2] 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,2010:274.
- [3] 高华荣,孙相民. 中药指纹图谱在现代中药制剂中的应用[J]. 中国实用医药,2009,4(14):240.
- [4] 高鹏飞,刘卫红,吴俊珠,等. 代谢组学在中医药研究中的应用进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(21):284.
- [5] 伍振峰,郑琴,杨明,等. 中药制剂质量控制的方法模式分析与研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(9):1332.

[责任编辑 仝燕]