

津力达颗粒 UPLC 指纹图谱

姜新刚¹, 贾继明^{2*}, 李叶双²

(1. 河北以岭医药研究院有限公司, 石家庄 050091;
2. 北京以岭药业有限公司, 石家庄 050035)

[摘要] 目的:采用超高效液相色谱(UPLC)法建立津力达颗粒的指纹图谱。方法:采用 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),流动相乙腈-0.1%磷酸水,梯度洗脱,流速 0.3 mL·min⁻¹,柱温 40 °C,检测波长 203 nm。结果:建立了津力达颗粒的 UPLC 指纹图谱,共标定了 50 个共有峰,指认了其中 9 个共有峰,10 批津力达颗粒指纹图谱的相似度均在 0.991 ~ 1.000。结论:该方法具有良好的精密度、稳定性和重复性,可有效控制津力达颗粒质量。

[关键词] 超高效液相色谱; 指纹图谱; 津力达颗粒

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0126-04

UPLC Fingerprints of Jinlida Granule

JIANG Xin-gang¹, JIA Ji-ming^{2*}, LI Ye-shuang²

(1. Hebei Yiling Pharmaceutical Research Institute Co. Ltd., Shijiazhuang 050091, China;
2. Beijing Yiling Pharmaceutical Co. Ltd., Shijiazhuang 050035, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an ultra performance liquid chromatography (UPLC) method for fingerprints of Jinlida granule. **Method:** The Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) column was used. Acetonitrile and water containing 0.1% phosphoric acid were used as mobile phase with gradient elution. The detection wavelength was set at 203 nm. Flow rate was set at 0.3 mL·min⁻¹ and column temperature was maintained at 40 °C. **Result:** UPLC fingerprint was established with 50 common peaks, nine of 50 common peaks were identified, and the similar degrees of the UPLC fingerprints of Jinlida granule from 10 batches were between 0.991 and 1.000. **Conclusion:** The method of fingerprints has acceptable precision, reproducibility and stability, which can be used as a new means for the quality control of Jinlida granule.

[Key words] UPLC; fingerprints; Jinlida granule

津力达颗粒是在络病理论指导下,由人参、黄精、炒苍术、苦参、麦冬、地黄、制何首乌、山茱萸、茯苓、佩兰、黄连、知母、制淫羊藿、丹参、粉葛、荔枝核、地骨皮共 17 味药组成,具有益气养阴、健脾运津的功效,用于 II 型糖尿病气阴两虚证的治疗,临床研究

表明津力达颗粒联合西药能有效保护胰岛 β 细胞功能,延缓其衰退,缓解高血糖毒性,对糖尿病周围神经病变有显著的治疗作用,同时能显著降低西药的用量及不良反应,大大提高患者的生活质量^[1-4]。津力达颗粒的研究文献较少,迄今为止作者未见其有关指纹图谱的研究报导。UPLC 与 HPLC 相比具有高分离度、高速度、高灵敏度的特性^[5],近几年广泛应用于中药指纹图谱的研究^[6-8],本文采用超高效液相色谱法建立了津力达颗粒的指纹图谱。

1 仪器与试剂

ACQUITY UPLC H CLASS(美国 Waters 公司,包括四元高压梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、Empower3 色谱工作站);

[收稿日期] 20120619(011)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2012CB518606);国家十二五“重大新药创制”科技重大专项(2011ZX09401-020)。

[第一作者] 姜新刚,硕士,工程师,从事中药创新药物研究与开发,Tel: 13832182543, E-mail: jxglyh@126.com

[通讯作者] * 贾继明, Tel: 0311-85901304, E-mail: jjm_0451@163.com

KQ5200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);AG135 型分析天平(METTLER TO-LEDO);LXJ-II B型低速大容量多管离心机(上海安亭科学仪器厂)。

磷酸(色谱级),甲醇(分析纯),乙腈(色谱级,Fisher),实验用水为超纯水。

津力达颗粒由石家庄以岭药业股份有限公司提供,共 10 批(批号 S1:120102, S2:120101, S3:111105, S4:120201, S5:120103, S6:120104, S7:120202, S8:111107, S9:110803, S10:110804);丹参素钠(批号 110855-200809)、葛根素(批号 110752-200912)、丹参酚酸 B(批号 111562-200605)、朝藿定 C(批号 111780-200801)、淫羊藿苷(批号 110737-20 0415)、人参皂苷 Rb₁(批号 110704-201122)、人参皂苷 Rb₂(批号 111715-200802)均购于中国药品生物制品检定所,朝藿定 B(110623-73-9)、人参皂苷 Rc(11021-14-0)均购于上海源叶生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),柱温 40 ℃,流速 0.3 mL·min⁻¹,检测波长 203 nm,进样 0.5 μL,流动相 B 为乙腈,D 为 0.1% 磷酸,梯度洗脱:0 ~ 1 min,4% ~ 4% B;1 ~ 3 min,4% ~ 7.5% B;3 ~ 12 min,7.5% ~ 17% B;12 ~ 13 min,17% ~ 20% B;13 ~ 20 min,20% ~ 32% B;20 ~ 21 min,32% ~ 40% B;21 ~ 25 min,40% ~ 56% B;25 ~ 29 min,56% ~ 90% B;29 ~ 35 min,90% ~ 90% B。

2.2 对照品溶液制备 分别取丹参素钠、葛根素、丹参酚酸 B、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rc、人参皂苷 Rb₂ 适量,精密称定,用甲醇配制成含丹参素钠 0.12 g·L⁻¹,葛根素 0.13 g·L⁻¹,丹参酚酸 B 0.09 g·L⁻¹,朝藿定 B 0.10 g·L⁻¹,朝藿定 C 0.13 g·L⁻¹,淫羊藿苷 0.15 g·L⁻¹,人参皂苷 Rb₁ 0.17 g·L⁻¹,人参皂苷 Rc 0.15 g·L⁻¹,人参皂苷 Rb₂ 0.18 g·L⁻¹ 的溶液,其中朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷为混标溶液,人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rc、人参皂苷 Rb₂ 为混标溶液,其余标准品溶液均为单独配制。

2.3 供试品溶液制备 取津力达颗粒 1.5 g,精密称定,加入 80% 甲醇 25 mL,称重,超声 40 min,放至室温,称重,用 80% 甲醇补足质量,混匀后离心 4 500 r·min⁻¹,15 min,取上清液,0.22 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,备用。

2.4 精密度试验 按 2.3 要求取 120201 批样品制备供试品溶液,在上述色谱条件下重复进样 5 次,直观观察各指纹图谱的全貌无明显变化,重叠良好,共有峰相对保留时间的 RSD < 2.0%,相对峰面积的 RSD < 2.8%,表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验 按 2.3 要求取 120201 批样品制备供试品溶液,在上述色谱条件下,分别在 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h 进样分析,直观观察各指纹图谱的全貌无明显变化,重叠良好,共有峰相对保留时间的 RSD < 1.7%,相对峰面积的 RSD < 2.5%,表明样品在 24 h 内稳定。

2.6 重复性试验 取 120201 批样品 5 份,按 2.3 要求分别制备供试品溶液,在上述色谱条件下进样分析,直观观察各指纹图谱的全貌无明显变化,重叠良好,共有峰相对保留时间的 RSD < 0.6%,相对峰面积的 RSD < 2.7%,表明方法重现性良好。

2.7 指纹图谱的建立及相似度分析

2.7.1 指纹图谱的建立 取 10 批津力达颗粒样品,按 2.7 要求制备供试品溶液,在上述色谱条件下进样分析,得到 10 批津力达颗粒的指纹图谱(图 1),并采用国家药典委员会开发的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”软件对 10 批样品的指纹图谱进行分析,以 S5 为参照指纹图谱(图 2),采用平均数相关系数法对各指纹图谱色谱峰进行了多点校正和自动匹配,其中共有色谱峰 50 个,用标准品指认了其中 9 个共有峰,分别为丹参素钠(4 号峰)、葛根素(17 号峰)、丹参酚酸 B(34 号峰)、朝藿定 B(37 号峰)、朝藿定 C(38 号峰)、淫羊藿苷(39 号峰)、人参皂苷 Rb₁(41 号峰)、人参皂苷 Rc(42 号峰)、人参皂苷 Rb₂(44 号峰),以出峰稳定,峰面积较大的 17 号色谱峰-葛根素为参照峰。

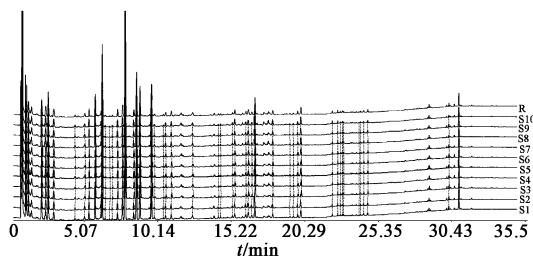


图 1 10 批津力达颗粒 UPLC 指纹图谱

2.7.2 指纹图谱相似度分析 采用国家药典委员会开发的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”软件对 10 批津力达颗粒的指纹图谱进行分析,以 S5 为参照指纹图谱(图 2),采用平均数相关系数法对各指纹图谱色谱峰进行了多点校正和自

动匹配,生成津力达颗粒共有模式的对照指纹图谱,然后进行了相似度计算,10 批津力达颗粒指纹图谱

与对照指纹图谱的相似度见表 1。

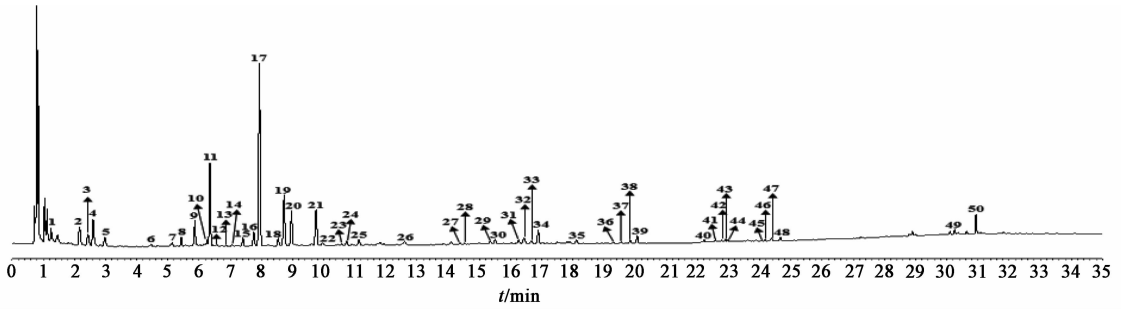


图 2 津力达颗粒 UPLC 参照指纹图谱 (S5)

表 1 10 批津力达颗粒指纹图谱相似度

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1.000	0.998	0.997	0.997	1.000	0.995	0.997	0.998	0.998	0.999	1.000
S2	0.998	1.000	0.994	0.992	0.998	0.992	0.995	0.999	0.995	0.999	0.998
S3	0.997	0.994	1.000	0.999	0.996	0.994	0.998	0.993	1.000	0.996	0.998
S4	0.997	0.992	0.999	1.000	0.995	0.994	0.996	0.991	0.999	0.995	0.998
S5	1.000	0.998	0.996	0.995	1.000	0.995	0.996	0.999	0.996	0.999	0.999
S6	0.995	0.992	0.994	0.994	0.995	1.000	0.997	0.992	0.994	0.993	0.996
S7	0.997	0.995	0.998	0.996	0.996	0.997	1.000	0.994	0.998	0.996	0.998
S8	0.998	0.999	0.993	0.991	0.999	0.992	0.994	1.000	0.994	1.000	0.998
S9	0.998	0.995	1.000	0.999	0.996	0.994	0.998	0.994	1.000	0.996	0.999
S10	0.999	0.999	0.996	0.995	0.999	0.993	0.996	1.000	0.996	1.000	0.999
R	1.000	0.998	0.998	0.998	0.999	0.996	0.998	0.998	0.999	0.999	1.000

3 讨论

考察了乙腈-水、甲醇-水、乙腈-0.1% 磷酸、甲醇-0.1% 磷酸、乙腈-0.1% 甲酸、甲醇-0.1% 甲酸、乙腈-0.2% 磷酸 7 个流动相系统,结果表明乙腈-0.1% 磷酸流动相系统的色谱图中出峰较多,各峰分离度较好,基线平稳,且条件温和有利于指纹图谱的分析,因此最终采用乙腈-0.1% 磷酸流动相系统。

分别考察了提取溶剂 60% 甲醇、80% 甲醇、甲醇,结果表明采用 80% 甲醇提取的样品色谱图中出峰较多,峰面积较大,故提取溶剂确定为 80% 甲醇;考察了超声、回流两种提取方式,结果表明二者提取效率相当,但超声提取操作简便,故选择超声提取;考察了 1.5 g 津力达颗粒分别用 25, 50, 75 mL 80% 甲醇提取,结果表明 25 mL 提取的色谱图与 50, 75 mL 提取的色谱图基本一致,所以确定提取溶剂用量为 1.5 g 津力达颗粒用 25 mL 80% 甲醇超声;考察了超声 20, 40, 60 min,结果表明超声 40, 60 min 提取效率相当,因此确定超声时间为 40 min,本实验考察了 203, 254, 280, 330 nm 的色谱图,结果表明 203

nm 的色谱图中色谱峰较多,故确定检测波长为 203 nm;还考察不同色谱柱温度:40, 50 °C,不同分析流速:0.3, 0.4, 0.5 mL·min⁻¹,结果表明色谱柱温度为 40 °C,流速为 0.3 mL·min⁻¹时色谱图中出峰较多,各峰分离度及峰形较好,分析时间适中。

建立了津力达颗粒的 UPLC 指纹图谱,并指认 9 个共有峰,为提高津力达颗粒的质量控制提供一种新方法。由于本实验只采用了二极管阵列检测器,一些无紫外吸收的成份无法检测,在今后的实验中应联合蒸发光散射检测器或质谱进行更加全面的分析。

[参考文献]

[1] 高怀林,张建军,吴以岭,等. 津力达颗粒对 2 型糖尿病胰岛 β 细胞功能的影响 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(5): 1119.

[2] 刘鹏,桂玉恒. 津力达颗粒联合甲钴胺治疗糖尿病周围神经病变的疗效 [J]. 中国当代医药, 2012, 19(5): 106.

[3] 高玉芳,丁来标,曹月香,等. 津力达颗粒配合西药治疗 2 型糖尿病及对高血糖毒性的影响 [J]. 陕西中医, 2009, 30(4): 420.

火焰原子吸收光谱法测定连翘中微量元素的含量

裴晓丽, 张淑蓉*, 柴艳秋
(山西中医学院, 太原 030024)

[摘要] 目的: 建立连翘中多种微量元素的含量测定方法。方法: 采用浓 $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ (4:1) 为消解剂进行湿法消解, 应用火焰原子吸收光谱法测定连翘中微量元素 Cu, Zn, Mn, Fe, Ca, Mg, K, Na 的含量。结果: 各元素方法线性关系良好, 相关系数均 > 0.9906 ; 重复性试验 ($n=6$) RSD 1.59% ~ 2.98%; 加样回收率 ($n=6$) 96.2% ~ 106.6%, RSD 1.4% ~ 3.9%。结论: 该方法简单、准确、灵敏, 为连翘中微量元素的测定提供了一种可靠方法。

[关键词] 火焰原子吸收光谱法; 连翘; 微量元素

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0129-03

Determination of Trace Elements in *Fructus Forsythiae* by Flame Atomic Absorption Spectrophotometry (FAAS)

PEI Xiao-li, ZHANG Shu-rong*, CHAI Yan-qiu
(Shanxi College of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a method of determination of trace elements in *Fructus Forsythiae*. **Method:** The content of Cu, Zn, Mn, Fe, Ca, Mg, K, Na in *Fructus Forsythiae* was directly determined by flame atomic absorption spectrophotometry after digestion with $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ (4:1) at heating and normal pressure. **Result:** All calibration curves showed good linearity ($r > 0.9906$). The RSD ($n=6$) of reproducibility was between 1.59% and 2.98%. The recoveries ($n=6$) were from 96.2% to 106.6%. The RSD ($n=6$) of recovery was between 1.4% and 3.9%. **Conclusion:** The method was simple, accurate and sensitivity. It is a reliable method for the determination of the trace elements in *Fructus Forsythiae*.

[Key words] FAAS; *Fructus Forsythiae*; trace elements

连翘为木犀科植物连翘的干燥果实, 具有清热解毒、消肿散结、疏散风热等功效, 是我国常用传统药材, 在中药制剂中广泛使用。目前文献中报道的

主要是连翘及制剂中连翘苷、连翘酯苷等有效成分的测定方法, 尚未见连翘中微量元素含量测定的报道。本文采用火焰原子吸收光谱法测定连翘中 Fe,

[收稿日期] 20120621(001)

[基金项目] 山西省科技攻关项目(20120313015-4)

[第一作者] 裴晓丽, 本科, 高级实验师, Tel:0351-2272145, E-mail:peixl@sina.com

[通讯作者] * 张淑蓉, 教授, Tel:0351-2272284, E-mail:zhangsr62@163.com

[4] 高玉芳, 卢秀昕, 曹月香, 等. 津力达颗粒联合诺和龙对 2 型糖尿病胰岛 β 细胞功能的影响[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(12): 3031.
[5] 周新, 陈会明, 白桦, 等. HPLC 与 UPLC 色谱条件转换方法研究[J]. 分析试验室, 2008, 27(4): 56.
[6] 张琦, 王振中, 萧伟, 等. 白芍药材 UPLC 特征指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 712.

[7] 马培, 许利嘉, 刘延泽, 等. 虎杖药材 UPLC 特征指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2): 72.
[8] 张琦, 王振中, 萧伟, 等. 茯苓 UPLC 特征指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(7): 966.

[责任编辑 顾雪竹]