

· 研究报告 ·

用超高效液相色谱蒸发光散射检测桔梗流浸膏指纹图谱的研究

笔雪艳¹, 胡 畔², 张胜波³, 张清波¹ (1. 黑龙江省食品药品检验检测所, 黑龙江 哈尔滨 150001; 2. 鞍山市药品检验所, 辽宁 鞍山 114000; 3. 济宁市药品检验所, 山东 济宁 272025)

[摘要] 目的 建立桔梗流浸膏的指纹图谱检测方法, 以达到质量的均一和稳定。方法 采用 UPLC-ELSD 法, 乙腈-水梯度洗脱, 色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 柱温: 30 °C, 流速: 0.2 ml/min, 在 20 min 内, 得到 11 个分离度良好的色谱峰。结果 采用中药色谱指纹图谱相似度软件计算, 桔梗流浸膏样品相似度均大于 0.90, 符合指纹图谱要求。结论 该方法经稳定性、重复性、精密性考察, 是一种快速、准确的中药质量评价方法。

[关键词] 桔梗; 流浸膏; 超高效液相色谱; 蒸发光散射检测; 指纹图谱

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2015)02-0153-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.02.016

Research on fingerprint analysis of platycodonis liquid extract by UPLC-ELSD

BI Xuayan¹, HU Pan², ZHANG Shengbo³, ZHANG Qingbo¹ (1. Heilongjiang Institute for Food and Drug Control, Harbin 150001, China; 2. Anshan Institute for Drug Control, Anshan 114000, China; 3. Jining Institute for Drug Control, Jining 272025, China)

[Abstract] **Objective** To develop a stable method for fingerprint analysis of extractum platycodi liquidum to ensure its uniformity and stability. **Methods** UPLC-ELSD was applied to obtain a chromatogram with 11 well separated peaks, and the chromatographic condition was as follows: mobile phase was gradient elution by acetonitrile-water, column was ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1×100 mm, 1.7 μm) with the column temperature of 30 °C and the flow rate of 0.2 ml/min. **Results** The chromatographic fingerprints were analyzed with similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of TCM. Similarities were all greater than 0.90, which could meet the requirement for chromatographic fingerprint of TCM. **Conclusion** The stability, repeatability and precision of the developed method were all validated, and the chromatographic fingerprint analysis was a rapid and accurate method for the quality evaluation of traditional Chinese medicine.

[Key words] Platycodonis; liquid extract; UPLC; ELSD; fingerprint

桔梗流浸膏作为中成药中投料用的一种原料, 其质量标准收载于国家卫生部药品标准中药成方制剂(第 11 册)^[1]。我国现有桔梗流浸膏批准文号的生产企业为 5 家, 以桔梗流浸膏作为处方投料的中成药品种有 14 个, 其中 6 个品种在制剂中收录的桔梗流浸膏制法与上述标准基本相同。涉及到以桔梗流浸膏投料的中成药厂家有 300 多家。在这些成方制剂的标准中, 均无对桔梗流浸膏的质量控制。而现行标准缺乏专属性的质量控制指标。目前在桔梗的研究中, 对其中药材及饮片的研究比较多^[2-8], 但

对桔梗流浸膏的指纹图谱研究目前还未见报道。本实验应用超高效液相色谱(UPLC)蒸发光散射检测(ELSD)器建立桔梗流浸膏的指纹图谱检查方法, 从而对桔梗提取物的质量标准进行有效控制。

1 仪器与试剂

ACQUITY 超高效液相色谱仪: 美国 Waters 公司(配有二元高压梯度泵、自动进样器、低噪音空气泵、柱温箱、蒸发光检测器以及 Empower 数据处理工作站); 对照品: 桔梗皂苷 D(批号: 111851-201001, 中国药品生物制品检定所); 乙腈为色谱纯(美国 Burdick & Jackson 公司); 水为娃哈哈纯净水; 其余试剂均为分析纯。

桔梗流浸膏样品(10 个批次): 实验室自制, 药材来源: 河北安国、大庆林甸、齐齐哈尔、安徽亳州、湖北、湖北磐山、山东淄博、吉林延吉、陕西、河南。

[基金项目] 国家药品标准提高暨 2015 版药典科研项目(TS-P021)

[作者简介] 笔雪艳, 硕士, 主任药师。研究方向: 中药质量标准研究。E-mail: hljbixueyan@sina.cn

[通讯作者] 张清波。E-mail: qingbo9118@sina.com

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 柱温: 30 °C; 流速: 0.2 ml/min, 检测器: ELSD; 气体压力: 40 psi; 漂移管温度: 80 °C; 雾化器方式: 冷却。流动相: 乙腈-水梯度洗脱: 0~5 min, 20:80; 5~18 min, 24:76; 18~20 min, 25:75; 进样量: 1 μl。

2.2 供试品溶液的制备 精密量取桔梗流浸膏样品 2 ml, 置蒸发皿中低温蒸至无醇味, 残渣加水 2 ml 使其溶解, 上于 D101 型大孔吸附树脂柱 (内径 2 cm, 长 15 cm), 分别以 200 ml 水和 150 ml 80% 乙醇洗脱, 收集醇液, 蒸干, 残渣加甲醇溶解, 定容至 10 ml 量瓶中, 摇匀, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 注入超高效液相色谱仪, 测定, 即得。

2.3 参照物溶液的制备 精密称取桔梗皂苷 D 对照品适量, 加甲醇制成每毫升含 0.2 mg 桔梗皂苷 D 的溶液作为参照物溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度 精密吸取同一批桔梗流浸膏样品溶液 1 μl, 按照上述色谱条件连续进样 5 次测定, 计算 11 个色谱峰的保留时间及峰面积的相对标准偏差 (RSD)。相对保留时间的 RSD 为 0.04%~0.70%, 相对峰面积的 RSD 为 0.19%~1.17%, 均 < 2.0%, 表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性 分别取同一批桔梗流浸膏 6 份, 按照“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按照所建立的 UPLC 指纹图谱分析条件进行分析, 结果显示, 桔梗流浸膏的主要色谱峰相对保留时间的 RSD 为 0.08%~0.48%, 相对峰面积的 RSD 为 0.44%~1.44%, 均 < 2.0%, 表明方法的重复性良好。

2.4.3 稳定性 取“2.4.2”项下制备的其中 1 份桔梗流浸膏供试品溶液于室温放置, 分别于 0、2、4、8、12、16、20、24 h 进样测定, 桔梗流浸膏的主要色谱峰相对保留时间的 RSD 为 0.06%~0.22%, 相对峰面积的 RSD 为 0.17%~1.25%, 均 < 2.0%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5 桔梗流浸膏指纹图谱的建立

2.5.1 样品的制备 采用 10 批不同产地的桔梗药材按文献[1]中制法制备桔梗流浸膏样品。

2.5.2 测定方法 取上述 10 批桔梗流浸膏按“2.2”项下制成供试品溶液, 精密吸取 1 μl, 注入液相色谱仪, 按“2.1”项下条件测定, 并用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”对其色谱图进行相似度评价, 建立桔梗流浸膏的指纹图谱, 并计算相似度。色谱图见图 1~3。

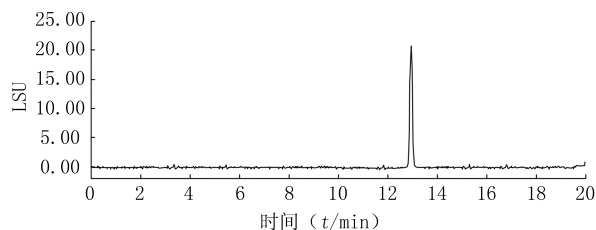


图 1 桔梗皂苷 D 的超高效液相色谱图

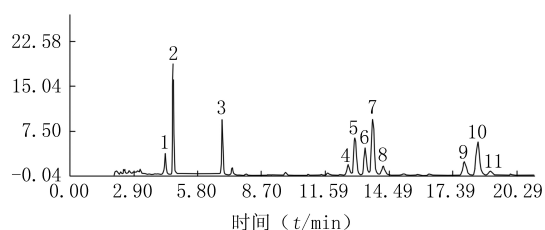


图 2 桔梗流浸膏的超高效液相色谱对照指纹图谱

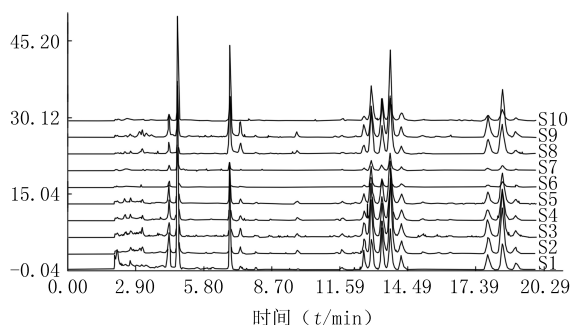


图 3 10 批桔梗流浸膏超高效液相色谱指纹图谱

2.5.3 共有峰的确定 为了准确有效地识别指纹图谱, 根据桔梗流浸膏指纹图谱中各色谱峰的分离情况确定 11 个指纹共有峰, 即图 2 中 1~11 号峰。通过与对照品对照, 确认 5 号峰为桔梗皂苷 D。

2.5.4 桔梗流浸膏相似度测定结果 依照本研究确定的 UPLC 指纹图谱条件对 10 批桔梗流浸膏样品进行测定, 并导入相似度评价系统进行比较分析。以 10 批样品的色谱图建立参照图谱, 以上述确定的 11 个共有峰作为校正点, 采用中位数法进行相似度的评价分析, 详见表 2。由相似度计算结果所示, 10 批桔梗流浸膏样品的相似度均 > 0.90。

3 讨论与分析

3.1 检测器的选择 由于桔梗中的有效成分为皂苷类, 其在紫外区均为末端吸收, 在使用紫外低波长检测时, 往往会受到溶剂干扰, 使结构相似的桔梗皂苷难以得到有效分离。因此采用蒸发光散射检测法。

3.2 流动相的选择 通过对乙腈 (V/V)-水 (V/V)、

表 2 10批桔梗流浸膏相似度计算结果

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1.000	0.905	0.959	0.900	0.925	0.903	0.922	0.905	0.938	0.974	0.949
S2	0.950	1.000	0.960	0.966	0.941	0.914	0.909	0.923	0.964	0.960	0.956
S3	0.904	0.960	1.000	0.945	0.917	0.914	0.902	0.912	0.965	0.919	0.949
S4	0.900	0.966	0.945	1.000	0.969	0.966	0.934	0.942	0.965	0.991	0.983
S5	0.925	0.911	0.907	0.969	1.000	0.965	0.952	0.981	0.901	0.948	0.947
S6	0.923	0.914	0.914	0.966	0.965	1.000	0.991	0.910	0.911	0.949	0.978
S7	0.902	0.919	0.990	0.934	0.952	0.991	1.000	0.986	0.939	0.909	0.958
S8	0.905	0.923	0.902	0.942	0.981	0.981	0.986	1.000	0.976	0.916	0.942
S9	0.943	0.964	0.965	0.965	0.941	0.911	0.959	0.976	1.000	0.959	0.954
S10	0.944	0.960	0.919	0.991	0.948	0.949	0.909	0.916	0.959	1.000	0.970
R	0.922	0.943	0.921	0.974	0.956	0.946	0.972	0.939	0.957	0.936	1.000

甲醇(V/V)-水(V/V)和乙腈-0.5%甲酸水(V/V)系统的考察,结果表明:应用乙腈(V/V)-水(V/V)系统洗脱,可对桔梗流浸膏样品取得较好的分离。

3.3 色谱柱的选择 分别试用了 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)色谱柱、ACQUITY UPLC HSS C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)色谱柱和 ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)色谱柱,采用上述确定的流动相系统,进行桔梗流浸膏样品的 UPLC 分析。结果表明:应用 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)色谱柱,可对桔梗流浸膏样品得到较好的分离。

3.4 柱温的选择 实验考察了 30、35、40℃ 3 个柱温条件,结果表明:柱温 30℃ 时指纹图谱基线平稳,各成分分离效果好。

3.5 流速的选择 本实验设置了 0.1、0.2、0.3 ml/min 3 个流速。当流速为 0.3 ml/min 时,随着保留时间的缩短,有些色谱峰即重叠;流速为 0.2 或 0.1 ml/min 时,各成分的分离效果较好,本研究选择流速为 0.2 ml/min。

桔梗的成分十分复杂,且含有多对同分异构体。因采用 HPLC 的分析时间较长,故本实验采用 UPLC 色谱技术,它与传统的 HPLC 法相比,具有缩短

分析时间、增加峰容量、提高灵敏度等优点,因此是一种快速、准确的中药质量评价方法。

【参考文献】

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会.中华人民共和国卫生部药品标准[S].第11册.1996:149.
- [2] 许传莲,郑毅男,杨腊虎,等.HPLC法测定不同采收期及不同部位桔梗中桔梗皂苷D含量[J].吉林农业大学学报,2001,23(1):58-60,64.
- [3] 朱丹妮,舒变,郑慧,等.HPLC-ELSD法测定桔梗中桔梗皂苷D的含量[J].植物资源与环境学报,2001,10(4):11-13.
- [4] 许传莲,杨腊虎,郑毅男,等.应用RP-HPLC法测定不同产地桔梗中桔梗皂苷D[J].吉林农业大学学报,1999,21(4):35-38.
- [5] 黄樱,史春蕾,刘墨祥,等.HPLC-ELSD法测定桔梗饮片中8种桔梗皂苷的含量[J].扬州大学学报(自然科学版),2008,11(4):41-44.
- [6] 石俊英,王颖,巩丽丽,等.HPLC法测定桔梗不同部位、不同产地药材中桔梗皂苷D含量[J].山东中医药大学学报,2007,31(6):501-503.
- [7] 李喜凤,刘素梅,李振国.RP-HPLC法测定桔梗中桔梗皂苷D的含量[J].中华中医药学刊,2008,26(2):283-284.
- [8] 李文庭,祝明,马临科,等.桔梗的HPLC-ELSD指纹图谱研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(22):50-53.

[收稿日期] 2014-01-04 [修回日期] 2014-07-18

[本文编辑] 李睿琴

(上接第152页)

- [2] 王林泉,陈忠东.医院药剂科的绩效考核与收入分配体系的建立[J].中国药房,2008,19(31):2432-2434.
- [3] 王斌,钟明康,王大猷.医院调剂部门绩效管理体系的构建和实施[J].中国药房,2006,17(6):424-426.
- [4] 吴黎华,毛晨梅,马文进,等.医院药剂科绩效管理的探讨[J].中国中医药现代远程教育,2010,8(20):146-147.
- [5] 王林泉,陈忠东.医院药剂科的绩效考核与收入分配体系的建立[J].中国药房,2008,19(31):2432-2434.

- [6] 闫刚,刘永忠.以服务对象为考核目标的药剂科绩效管理[J].价值工程,2012,25:310-311.
- [7] 陈汝雪,周山,王宏,等.用KPI方法构建医院药剂科绩效考核体系[J].中国医院,2009,13(7):37-39.
- [8] 陆冰,刘加威,周洁,等.职务价值评估法等药剂科现代薪酬体系建立中的应用[J].中国药房,2011,22(25):2350-2353.

[收稿日期] 2013-10-10 [修回日期] 2013-12-25

[本文编辑] 李睿琴