

· 论 著 ·

清脂胃舒佐餐茶 HPLC 法指纹图谱的研究及 4 个成分的含量测定

肖会敏, 何悦, 雷美娜, 王四旺 (空军军医大学药学院药物研究所, 陕西 西安 710032)

[摘要] **目的** 建立清脂胃舒佐餐茶水溶性成分的高效液相色谱(HPLC)法指纹图谱,并测定没食子酸、绿原酸、柚皮苷、橙皮苷的含量。**方法** 采用 HPLC 法,色谱条件:Kromasil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液,梯度洗脱;流速为 0.8 ml/min;检测波长为 300 nm;柱温为 35 ℃。**结果** 通过中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A),确定了清脂胃舒佐餐水溶性成分的 HPLC 指纹图谱共有模式,标定了 26 个共有峰,整体相识度为 0.934~0.995;并测定了 10 批制剂中绿原酸、柚皮苷、橙皮苷的含量分别为 0.672、0.194、1.247 和 0.532 mg/g,RSD 分别为 1.35%、1.89%、0.69% 和 0.79%。**结论** 清脂胃舒佐餐水溶性成分的 HPLC 指纹图谱及其中没食子酸、绿原酸、柚皮苷、橙皮苷的含量检测方法简便、稳定、科学,为本品的质量控制提供了科学依据。

[关键词] 清脂胃舒佐餐茶;高效液相色谱;指纹图谱;没食子酸;绿原酸;柚皮苷;橙皮苷

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2018)04-0324-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.04.008

Study on fingerprint of Qingzhiweizuocan Tea and assay of four components by HPLC method

XIAO Huimin, HE Yue, LEI Meina, WANG Siwang (Institute of Materia Medica, School of Pharmacy, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China)

[Abstract] **Objective** To establish HPLC fingerprint for water soluble components and assay gallic acid, chlorogenic acid, naringin, aurantiamarin in Qingzhiweizuocan Tea, **Methods** High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis was performed on Kromasil C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with a mixture of acetonitrile and 0.1% phosphoric acid solution as mobile phase in gradient elution. The flow rate was 0.8 ml/min, the detection wavelength at 300 nm and the column temperature at 35 ℃. **Results** Based on the chromatographic fingerprint similarity evaluation system (2004A) analysis, the characteristic fingerprint peak of the water-soluble components in Qingzhiweizuocan Tea was composed of 26 chromatographic peaks. The overall similarity degree is from 0.934 to 0.995. Ten batches of Qingzhiweizuocan Tea were assayed. The average content of gallic acid, chlorogenic acid, naringin, aurantiamarin were 0.672, 0.194, 1.247, 0.532 mg/g respectively. The RSDs (%) were 1.35, 1.89, 0.69, 0.79. **Conclusion** This method is simple, accurate and with good repeatability. This study provided a scientific foundation for quality evaluation and control of Qingzhiweizuocan Tea.

[Key words] Qingzhiweizuocan Tea; HPLC; fingerprint; gallic acid; chlorogenic acid; naringin; aurantiamarin

清脂胃舒佐餐茶由陈皮、山楂、炒麦芽、炒神曲、鸡内金、干姜、茯苓、甘草等八味药食同源中药组成,主要作用是清脂健胃。方中陈皮含柚皮苷、橙皮苷等成分^[1],具有调节肠平滑肌、强心、升压、免疫调节等作用^[2];山楂含有绿原酸、没食子酸等成分,具有调血脂、护肝、强心等功效^[3];炒麦芽含淀粉酶、没食子酸等成分,有助消化等作用^[4,5];神曲含有酵母

菌、酶类等成分,具有助消化等作用^[6];鸡内金具有健胃消食等功效^[7];干姜具有抗血小板聚集、抗肿瘤等活性^[8];茯苓具有降血糖、镇静催眠等作用^[9];甘草对消化系统、心血管系统、免疫系统等疾病具有良好的治疗作用^[10]。本处方原料药材经粉碎等工艺制成袋泡茶。为了表征本制剂中的水溶性成分,参照中药指纹图谱的有关技术要求^[11]进行研究;并采用 HPLC 法测定制剂中具有较好水溶性与药理作用的 4 个化学成分即没食子酸、绿原酸、柚皮苷、橙皮苷的含量。

[基金项目] 陕西省创新药物研究中心(现代中药新药研发)平台建设(2015SF2-08-01)

[作者简介] 肖会敏,硕士,副研究员,研究方向:中药、天然药物新药研发,Tel:(029)84772165,Email:xhm_0908@163.com

[通讯作者] 王四旺,硕士,博士生导师,教授,研究方向:中药学,Tel:(029)84772165,Email:wangsiw@fmmu.edu.cn

1 仪器与试药

岛津高效液相色谱仪(LC-2010CHT,LC/Lab-

soluion 色谱工作站,日本岛津公司);电子分析天平(型号 ME235S,德国塞多利斯公司);超声波发生器(型号 KQ5200DE 数控,昆山超声仪器有限公司)。乙腈、甲醇(色谱级,美国 Fish 公司);超纯水(由美国 Millipore 纯水仪制得,美国 millipore 公司);没食子酸(批号:110831-201605,含量 90.8%)、绿原酸(批号:110753-201415,含量 96.2%)、柚皮苷(批号:110722-201111,含量 93.2%)、橙皮苷(批号:110721-201617,含量 96.1%)对照品,均购自中国食品药品检定研究院;清脂胃舒佐餐茶:批号 20161106 (S1)、20161107 (S2)、20161108 (S3)、20161109 (S4)、20161110 (S5)、20161111 (S6)、20161112 (S7)、20161113 (S8)、20161114 (S9)、20161115 (S10),由陕西含光生物科技有限公司研制并提供。

2 指纹图谱测定方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Kromasil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B),梯度洗脱,0~20 min,95% → 85% B;20~40 min,85% → 75% B,40~45 min,75% → 70% B,45~90 min,70% → 40% B。记录时间为90 min。流速:0.8 ml/min;柱温:35 °C;检测波长:300 nm;进样量 20 μl。

2.2 参比物及供试品溶液的制备

2.2.1 参比物溶液

精密称取柚皮苷对照品 10.40 mg,于 10 ml 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液

取本品 3 袋,研细研匀,取 4.5 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,加温水 100 ml,密塞,称定重量,超声处理(功率 250 KW,频率 40 kHz)30 min,放凉,再称定重量,用水补足减失的重量,摇匀,静置,取上清液滤过,取续滤液,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验

取供试品溶液(批号:20161106),连续进样 5 次,分别对 26 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积进行分析。结果,各共有峰的相对保留时间与相对峰面积 RSD 值分别小于 1.0% 和 3.0%,表明该方法精密度良好。

2.3.2 稳定性试验

取供试品溶液(批号:20161106),分别于各时间点即 0、2、4、8、12、24 h 进样,考察共有峰的相对保

留时间和相对峰面积。结果各共有峰相对保留时间与相对峰面积 RSD 值分别小于 1.0%、3.0%,表明供试品溶液在 24 h 内具有良好的稳定性。

2.3.3 重复性试验

取 6 份供试品(批号:20161106),按供试品溶液的制备与色谱条件进行分析,分别对共有峰的相对保留时间和相对峰面积进行分析考察。结果各共有峰相对保留时间与相对峰面积 RSD 值分别小于 1.0% 和 3.0%,表明该方法重复性良好。

2.3.4 指纹图谱建立及相似度分析

取 10 批清脂胃舒佐餐茶样品,分别按供试品溶液的制备与色谱条件进行分析,进样量 20 μl,记录指纹图谱(图 1),峰 22 为柚皮苷即参比物,建立指纹图谱。10 批样品共有色谱峰的相对保留时间与相对峰面积的 RSD 值均分别小于 1.0%、3.0%,与指纹图谱研究技术的要求相符(图 1、2)。按照文献[11]要求,对 10 批清脂胃舒佐餐茶的指纹图谱进行相似度分析,将色谱工作站数据导入中药指纹图谱相似度计算软件,对选定 26 个共有色谱峰进行谱峰匹配,通过计算得出样品指纹图谱的共有模式,并以此共有模式为标准,进行整体相似度评价,结果相似度为 0.934~0.995;表明这 10 批清脂胃舒佐餐茶的化学成分一致性较好。

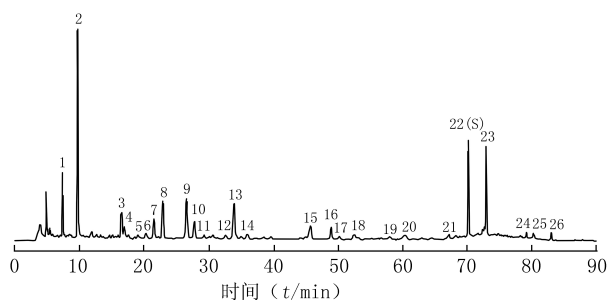


图 1 清脂胃舒佐餐茶水溶性成分 HPLC 指纹图谱

1~26. 特征指纹峰;1. 没食子酸;10. 绿原酸;
22. 柚皮苷(参照物的色谱峰);23. 橙皮苷

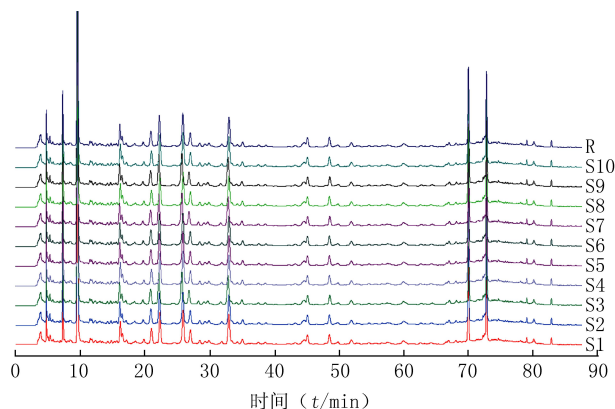


图 2 10 批清脂胃舒佐餐茶水溶性成分的 HPLC 指纹图谱

3 含量测定方法与结果

3.1 色谱条件同“2.1”项。

3.2 对照品溶液的配制

分别精密称取绿原酸 9.98 mg、柚皮苷 6.87 mg、橙皮苷 16.65 mg 置 50 ml 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得绿原酸、柚皮苷与橙皮苷对照品混合溶液(A 溶液);另精密称取没食子酸 10.57 mg 置 10 ml 量瓶中,加 A 溶液至刻度,摇匀,即得没食子酸、绿原酸、柚皮苷、橙皮苷浓度分别为 959.76、192.02、128.06、320.01 $\mu\text{g/ml}$ 作为储备液(B 溶液)。

3.3 供试品溶液的制备 参照“2.2.2”项。

3.4 阴性对照溶液的制备

依据处方,分别制备缺麦芽、山楂、陈皮药材的制剂;缺山楂、陈皮药材的制剂;缺陈皮药材的制剂,再依据“2.2.2”项分别制备没食子酸、绿原酸、柚皮苷和橙皮苷阴性对照溶液。

3.5 线性关系

分别精密量取储备液 0.015, 0.063, 0.125,

0.250 和 0.500 ml 置于各个 1 ml 量瓶中并加甲醇稀释至刻度,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,进样。以各对照品的质量浓度($X, \mu\text{g/ml}$)为横坐标,峰面积值(Y)为纵坐标,通过计算,得线性方程与相关系数(r),结果见表 1,表明各对照品在相应浓度范围内线性关系良好。

表 1 对照品的线性方程及其浓度范围

对照品	线性范围 ($\mu\text{g/ml}$)	线性方程	r
没食子酸	14.40~959.76	$Y_1=17\ 152X_1+11\ 736$	0.999 9
绿原酸	2.88~192.02	$Y_2=32\ 019 X_2+26\ 085$	0.999 7
柚皮苷	1.92~128.06	$Y_3=18\ 156X_3+661$	0.999 7
橙皮苷	4.80~320.01	$Y_4=27\ 095X_4-8\ 355$	0.999 8

3.6 专属性试验

取混合对照品 B 溶液、供试品溶液、3 种阴性对照品溶液各 20 μl 进样,记录色谱图。结果,各阴性对照均无干扰(图 3)。

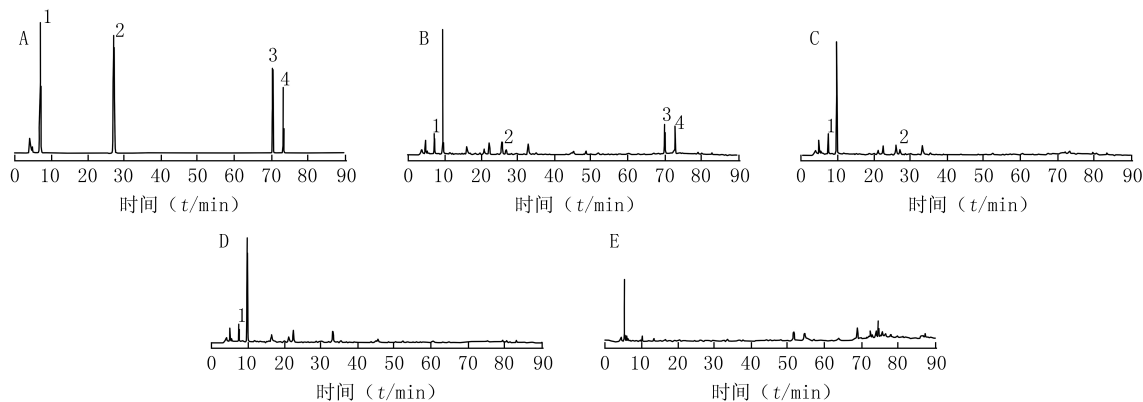


图 3 混合对照品 HPLC 图谱

A. 混合对照品; B. 清脂胃舒佐餐茶样品; C. 柚皮苷与橙皮苷阴性对照(缺陈皮药材); D. 绿原酸阴性对照(缺山楂和陈皮药材); E. 没食子酸阴性对照(缺炒麦芽、陈皮、山楂药材); 1. 没食子酸; 2. 绿原酸; 3. 柚皮苷; 4. 橙皮苷

3.7 精密度试验

精密吸取供试品溶液(批号:20161106),重复进样 5 次,测得没食子酸、绿原酸、柚皮苷、橙皮苷的 RSD 分别为 1.21%、1.16%、1.02%、0.98%,表明该方法精密度良好。

3.8 稳定性试验

精密吸取供试品溶液(批号:20161106),分别于 0、2、4、8、12 和 24 h 进样。结果没食子酸、绿原酸、柚皮苷、橙皮苷的峰面积的 RSD 值分别为 1.08%、1.19%、1.06%、1.03%,表明该溶液在 24 h 内稳定性。

3.9 重复性试验

精密称取 6 份样品(批号:20161106),分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“3.3”项下色谱条件进样测定。结果,没食子酸、绿原酸、柚皮苷和橙皮苷平均含量(mg/g)分别为 0.670、0.190、1.24 和 0.530 mg/g , RSD 值分别为 1.11%、1.52%、0.97%、1.25%、1.07%,表明该方法具有良好重复性。

3.10 加样回收率试验

精密量取清脂胃舒佐餐茶(批号:20161106,其中没食子酸、绿原酸、柚皮苷、橙皮苷分别为 0.670、0.190、1.240 和 0.530 mg/g)4.5 g,分别添加混合对照品溶液(精密称取没食子酸 16.52 mg、绿原酸

4.16 mg、柚皮苷 3.22 mg、橙皮苷 12.49 mg,置于 50 ml量瓶中,制成每 1ml 甲醇中含量分别为 0.30、0.08、0.06、0.24 mg)16.00 ml、20.00 ml、24.00 ml,再加水至刻度,按照“3.3”项下方法制备供试品溶液,共制备 9 份样品,按照“3.1”项下色谱条件进样测定。结果见表 2,表明该方法回收率良好。

3.11 含量测定

精密量取 10 批样品,分别按照“3.3”项下方法制备供试品,按照“3.1”项下色谱条件测定。各批样品中没食子酸、绿原酸、柚皮苷、橙皮苷的平均含量(mg/g)及 RSD 见表 3。

表 2 清脂胃舒佐餐茶加样回收率试验结果

化合物	样品量 (m/g)	原有量 (m/mg)	加入量 (m/mg)	测定量 (m/mg)	回收率 (%)	平均 回收率 (%)	RSD (%)
没食子酸	4.510 2	3.021 8	2.40	5.381 5	98.319 4	97.57	0.84
	4.498 5	3.014 0	2.40	5.356 9	97.621 0		
	4.508 5	3.020 7	2.40	5.357 7	97.375 2		
	4.510 3	3.021 9	3.00	5.957 7	97.860 0		
	4.506 4	3.019 3	3.00	5.925 7	96.880 4		
	4.510 2	3.021 8	3.00	5.897 5	95.855 5		
	4.507 5	3.020 0	3.60	6.531 8	97.549 3		
	4.487 2	3.006 4	3.60	6.542 2	98.216 0		
	4.510 8	3.022 2	3.60	6.566 4	98.449 0		
	绿原酸	4.510 2	0.856 9	0.64	1.473 8	96.384 7	97.47
4.498 5		0.854 7	0.64	1.475 4	96.982 0		
4.508 5		0.856 6	0.64	1.482 9	97.857 0		
4.510 3		0.857 0	0.80	1.639 8	97.855 4		
4.506 4		0.856 2	0.80	1.645 3	98.635 5		
4.510 2		0.856 9	0.80	1.638 8	97.732 8		
4.507 5		0.856 4	9.60	10.128 1	96.579 9		
4.487 2		0.852 6	9.60	10.220 2	97.579 5		
4.510 8		0.857 1	9.60	10.232 4	97.659 9		
柚皮苷		4.510 2	5.592 6	0.48	6.063 6	98.115 0	97.07
	4.498 5	5.578 1	0.48	6.040 6	96.345 8		
	4.508 5	5.590 5	0.48	6.042 3	94.116 7		
	4.510 3	5.592 8	0.60	6.176 0	97.204 7		
	4.506 4	5.587 9	0.60	6.180 1	98.694 0		
	4.510 2	5.592 6	0.60	6.176 3	97.275 3		
	4.507 5	5.589 3	0.72	6.283 8	96.458 3		
	4.487 2	5.564 1	0.72	6.284 5	100.051 7		
	4.510 8	5.593 4	0.72	6.279 8	95.334 4		
	橙皮苷	4.510 2	2.390 4	1.92	4.242 8	96.478 9	97.34
4.498 5		2.384 2	1.92	4.249 2	97.135 2		
4.508 5		2.389 5	1.92	4.247 8	96.786 2		
4.510 3		2.390 5	2.40	4.715 3	96.868 4		
4.506 4		2.388 4	2.40	4.757 2	98.700 3		
4.510 2		2.390 4	2.40	4.716 9	96.937 3		
4.507 5		2.389 0	2.88	5.218 2	98.237 0		
4.487 2		2.378 2	2.88	5.182 0	97.353 6		
4.510 8		2.390 7	2.88	5.200 5	97.561 7		

表 3 清脂胃舒佐餐茶成分含量测定结果(n=3)

批号	含量(mg/g)			
	没食子酸	绿原酸	柚皮苷	橙皮苷
20161106	0.670	0.190	1.240	0.530
20161107	0.668	0.191	1.239	0.531
20161108	0.680	0.200	1.237	0.534
20161109	0.660	0.189	1.241	0.529
20161110	0.690	0.194	1.253	0.528
20161111	0.665	0.196	1.246	0.532
20161112	0.674	0.192	1.249	0.534
20161113	0.680	0.193	1.248	0.526
20161114	0.672	0.197	1.254	0.533
20161115	0.664	0.198	1.265	0.541
平均含量	0.672	0.194	1.247	0.532
RSD(%)	1.35	1.89	0.69	0.79

4 分析与讨论

4.1 色谱条件

采用二极管阵列检测器对清脂胃舒佐餐茶样品进行全波长测定,根据三维色谱图及对应波长下峰的信息量,结果 300 nm 时信息量较多,同时 4 个化合物与相邻各峰分离度良好。因此,将其作为 HPLC 指纹图谱的定性波长与 4 个化合物的定量波长。鉴于中药复方成分复杂,采用梯度洗脱的方法。对不同流动相系统甲醇-水、甲醇-磷酸水溶液(0.1%、0.2%、0.4%、0.8%)、乙腈-磷酸水溶液(0.1%、0.2%、0.4%、0.8%)、乙腈-醋酸水溶液、乙腈-水、进行比较,结果,乙腈-0.1%磷酸水溶液流动相理想。对不同柱温与流速进行比较,柱温超过或低于 35 °C,大部分色谱峰分离度小或不能分开;流速高于或低于 0.8 ml/min,大部分色谱峰分离度差;色谱记录时间,在 90 min 之后,无色谱峰出现。因此,选择便于控制的柱温 35 °C,流速 0.8 ml/min 和记录时间为 90 min。进样量比较:进样 5、10 μl 大多数色谱峰过小不便分析计算,进样 20 μl 较理想。

4.2 制样方法

本制剂为袋泡茶主要分析水溶性成分,所以使用温水作为溶剂,采用不同时间(5、10、15、20、25、35、45、60 min)泡、超声处理方法或加热回流,结果,加温水超声 30min 较理想。

4.3 成分分析

在指纹图谱中,1 号峰为没食子酸,在麦芽^[5]、山楂^[3]、陈皮^[13]药材等三味药材中均含有,因此,在定量制备阴性对照溶液时,均须去除。10 号为绿原酸,在山楂^[3]、陈皮^[13]药材等两味药材中均含有,同理,在定量制备阴性对照溶液时,均须去除。2 号

峰,在每个药材单独进样时均在该位置出峰,表明该峰是各个药材中峰的叠加,具体是何种成分或多种成分,将做进一步研究。

综上所述,通过对10批次的清脂胃舒佐餐茶样品进行相似度计算,结果数值介于0.934~0.995。同时4种成分定量结果含量均一稳定且阴性无干扰,表明笔者建立的清脂胃舒佐餐的HPLC指纹图谱方法与含量测定方法,具有良好的分析评价水溶性成分能力,具有简便、稳定可靠、准确等明显优势。因此,该方法可作为本制剂水溶性成分的评价方法。

【参考文献】

[1] 邱蓉丽,吴玉兰,乐巍. 陈皮、青皮中4种黄酮成分的比较研究[J]. 中成药, 2015, 37(1): 149-153.
 [2] 李晓芳,张健康,王慧鸾,等. 陈皮的研究进展[J]. 江西中医药, 2014, 45(3): 76-78.
 [3] 楼陆军,罗洁霞,高云. 山楂的化学成分和药理作用研究概述[J]. 中国药业, 2014, 23(3): 92-94.
 [4] 高颖,张云天,徐以亮,等. 炒麦芽配方颗粒的HPLC指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(20): 115-

118.

[5] 方向梅,吕红叶. 麦芽的研究进展[J]. 中国伤残医学, 2010, 18(5): 167-169.
 [6] 刘双,杨静,江振作,等. 中药“神曲”发酵工艺及质量标准研究进展[J]. 天津中医药, 2015, 32(5): 318-320.
 [7] 李传俊,楚胜. 鸡内金不同辅料炮制品的酶活性和氨基酸的含量测定[J]. 中国现代医生, 2009, 47(15): 74-75.
 [8] 孙凤娇,李振麟,钱士辉,等. 干姜化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2015, 34(3): 34-37.
 [9] 黄斯,潘雨薇,蓝海,等. 茯苓酸药理学研究进展[J]. 中成药, 2015, 37(12): 2719-2721.
 [10] 王兵,王亚新,赵红燕,等. 甘草的主要成分及其药理作用的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2013, 34(3): 215-218.
 [11] 中国药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)[J]. 中成药, 2000, 22(10): 671-675
 [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015年版(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015
 [13] 张华,周志钦,席万鹏. 15种柑橘果实主要酚类物质的体外抗氧化活性比较[J]. 食品科学, 2015, 36(11): 64-70.

[收稿日期] 2017-11-09 [修回日期] 2018-03-26

[本文编辑] 陈盛新

(上接第306页)

[35] YANG BB, KIDO MA, MS MMS, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of pegfilgrastim in subjects with various degrees of renal function[J]. J Clin Pharmacol, 2011, 50(5): 295-306.
 [36] TURECEK PL, BOSSARD MJ, GRANINGER M, et al. BAX 855, a PEGylated rFVIII product with prolonged half-life. Development, functional and structural characterisation [J]. Hamostaseologie, 2012, 32(Suppl 1): S29-S38.
 [37] WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Guidelines on the Quality, Safety, and Efficacy of Biological Medicinal Products Prepared by Recombinant DNA Technology. Switzerland: WHO Press, 2013. 91-92.
 [38] LI XL, LIU L, GAO JP, et al. Methods for identification of conjugation site on PEGylated protein[J]. Pharmaceutical Bi-

otechnology, 2013.

[39] YU W, YU C, WU L, et al. PEGylated recombinant human interferon- ω as a long-acting antiviral agent: structure, antiviral activity and pharmacokinetics [J]. Antiviral Res, 2014, 108: 142-147.
 [40] JOHN B, SWAPAN C, JOHNSTON D. Characterization of poly(ethylene glycol)-modified superoxide dismutase: Comparison of capillary electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry [J]. Analytical Chemistry, 1996, 68(18): 3258-3264.
 [41] 李晶,何辉,程速远,等. 荧光胺衍生化法测定3种聚乙二醇化重组人生长激素的平均修饰率[J]. 药物分析杂志, 2014(8): 1368-1373.

[收稿日期] 2017-11-23 [修回日期] 2018-03-30

[本文编辑] 陈盛新