

复方金钱草颗粒的指纹图谱

邱宏聪^{1,2}, 马军花^{3*}, 陈露², 陈明生^{1,2}, 温幼敏³, 刘布鸣^{1,2}

(1. 广西中医药研究院, 南宁 530022; 2. 广西中药质量标准研究重点实验室, 南宁 530022;
3. 广西万通制药有限责任公司, 南宁 530003)

[摘要] 目的:建立复方金钱草颗粒 HPLC 指纹图谱,科学评价并有效控制其颗粒剂的质量,保证其生产的稳定性。方法:采用 ODS-BP 色谱柱,流动相乙腈(A)-0.2% 磷酸梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 20 μL,检测波长 350 nm,柱温 20 ℃。采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件”(2012. 130723 版)对 10 批复方金钱草颗粒制剂进行相似度评价,并对处方中 4 味药材进行相关性分析。结果:以芒果苷为参照峰,初步建立复方金钱草颗粒 HPLC 指纹图谱,10 批制剂的 HPLC 指纹图谱相似度在 0.961~0.997,标示出 20 个共有色谱峰,其中 19 个归属到各药材。结论:建立的方法分离效果好,灵敏、准确、简单,可作为复方金钱草颗粒质量评价的方法。

[关键词] 复方金钱草颗粒; 芒果苷; 相似度

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2016)01-0036-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016010036

HPLC Fingerprint of Fufang Jinqiancao Granules

QIU Hong-cong^{1,2}, MA Jun-hua^{3*}, CHEN Lu², CHEN Ming-sheng^{1,2}, WEN You-min³, LIU Bu-ming^{1,2}

(1. Guangxi Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Sciences, Nanning 530022, China;
2. Guangxi Key Laboratory of Tradititonal Chinese Medicaine Quality Stardands, Nanning 530022, China;
3. Guangxi Vantone Pharmaceutical Co. Ltd., Nanning 530003, China)

[Abstract] Objective: To establish the fingerprint of Fufang Jinqiancao granules for evaluating scientifically, controlling the quality and ensuring its production stability. Method: The RP-HPLC was performed on an ODS-BP column with acetonitrile-0.2% phosphoric acid solution as mobile phase, the flow rate was 1 mL·min⁻¹, injection volume was 20 μL, the wavelength was set at 350 nm. The temperature of column was maintained at 20 ℃. Fingerprint Similarity Evaluation Software (edition 2012. 130723) of Chinese Pharmacopoeia Commission was used to evaluate the similarity of the 10 batches of Fufang Jinqiancao granules, and to analyze the correlations of 4 ingredients in Fufang Jinqiancao granules. Result: Mangiferin was used as the reference peak, the common mode for the HPLC fingerprints was set up, with the similarities of the 10 batches ranging between 0.961 and 0.997. Altogether 20 common peaks in the chromatograms were found, of which 19 peaks were assigned to herbs. Conclusion: The method is sensitive, accurate and simple, and can be used for the quality control of Fufang Jinqiancao granules.

[Key words] Fufang Jinqiancao granules; mangiferin; similarity

复方金钱草颗粒由广金钱草、车前草、光石韦、通淋排石之功效,用于湿热下注所致的热淋、石淋,玉米须四味中药材经提取加工制成,具有清热利湿、症见尿频、尿急、尿痛、腰痛;泌尿结石、尿路感染见

[收稿日期] 20150511(013)

[基金项目] 广西科技攻关项目(桂科攻 1099062-4,桂科转 13109005,桂科转 13129006)

[第一作者] 邱宏聪,硕士,从事新药研发工作, Tel:0771-5883405, E-mail: qiu hongcong@163. com

[通讯作者] * 马军花,高级工程师,从事药品开发工作, Tel:0771-3172253, E-mail: majunhua63@163. com

上述证候者。课题组前期研究表明,该药具有排石,防止结石生成,利尿,减轻输尿管张力和抗炎作用,对泌尿系结石有良好的防治作用^[1],同时对代表性的革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌菌都有显著的抗菌作用^[2]。

课题组已建立该药的质量控制方法^[3]。已有研究报道建立了广金钱草药材指纹图谱^[4-6],并标定了 11 个共有峰;建立光石韦药材指纹图谱^[7],并标定了 12 个共有峰。目前复方金钱草颗粒制剂的指纹图谱研究未见报道,本文建立复方金钱草颗粒指纹图谱,为其质量控制提供更多参考依据。

1 材料

1525 型高效液相色谱仪(2998 型二极管阵列检测器,Empower 色谱工作站,美国 Waters),XS-205 型电子天平(瑞士梅特勒)。芒果苷(批号 111607-200402),夏佛塔苷(批号 111533-200701)对照品均由中国食品药品检定研究院提供。乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。10 批复方金钱草颗粒,批号分别为 090108(S1),090206(S2),090609(S3),090825(S4),100126(S5),100221(S6),100315(S7),100415(S8),100519(S9),100623(S10),由广西万通制药有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 依利特 Sino Chrom ODS-BP 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 350 nm,柱温 20℃,进样量 20 μL,流动相乙腈(A)-0.2%磷酸(B)梯度洗脱(0~8 min,7%~13.5%A;8~26 min,13.5%~15%A;26~54 min,15%~27%A;54~55 min,27%~7%A)。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取芒果苷、夏佛塔苷对照品适量,置于 50 mL 量瓶中,加 50% 甲醇溶解并定容至刻度,制成 20 mg·L⁻¹的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取样品适量,研细,取约 2.0 g,精密称定,置 100 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 50% 乙醇 25 mL,称定质量,超声处理 10 min,放冷,再称定质量,用 50% 乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 10 mL,水浴蒸干,残渣加流动相溶解,并转移至 5 mL 量瓶中,流动相定容至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.4 方法学考察

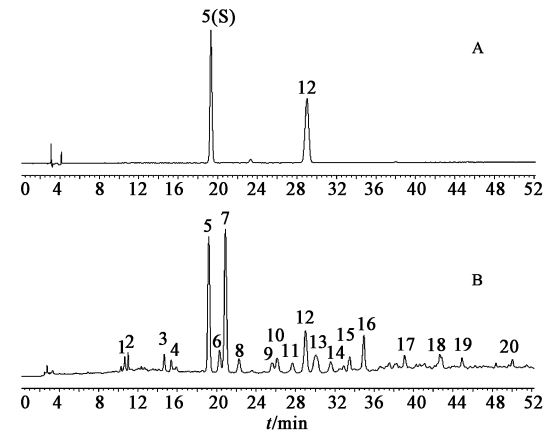
2.4.1 精密度试验 取供试品溶液(S5),连续进样 6 次,以芒果苷色谱峰为参照,计算 20 个共有峰相对保留时间和相对峰面积,RSD 均<3%,表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取供试品溶液(S5),分别于 0,1,3,6,12,24 h 进样,以芒果苷色谱峰为参照,计算 20 个共有峰相对保留时间和相对峰面积,结果 RSD 均<3%,表明供试品在 24 h 内保持稳定。

2.4.3 重复性试验 取 S5 样品,制备 6 份供试品溶液,分别进样测定,以芒果苷色谱峰为参照,计算 20 个共有峰相对保留时间和相对峰面积,结果 RSD 均<3%,表明方法重复性良好。

2.5 指纹图谱的建立与分析

2.5.1 指纹图谱的建立 按上述色谱条件进行测定,得到 S1~S10 供试品的 HPLC 指纹图谱,根据色谱图中各色谱峰的相对保留时间,确定共有峰,并选取 20 个共有峰为特征指纹峰,以分离度好,出峰时间适中,峰面积较大且稳定的芒果苷峰作为参照峰,标记为 S。确认 5 号峰为芒果苷(光石韦中有效成分),12 号峰为夏佛塔苷(广金钱草中有效成分),其他共有峰为未知成分,见图 1。



A. 对照品;B. 样品;5. 芒果苷;12. 夏佛塔苷

图 1 复方金钱草颗粒 HPLC

Fig.1 HPLC chromatogram of Fufang Jinqiancao granules

2.5.2 共有峰的标定 以 5 号(S)芒果苷色谱峰为参照,计算各共有峰的相对保留时间、相对峰面积值,共有指纹峰特征参数见表 1,2。

2.5.3 指纹图谱的相似度评价 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价软件”2004A 版(国家药典委员会)对 10 批复方金钱草颗粒进行相似度评价,指纹图谱叠加见图 2,S1~S10 相似度分别为 0.963,0.961,0.996,0.995,0.997,0.997,0.997,0.994,0.978,0.991。

2.5.4 各特征峰的药材归属 按 2.3 项下方法,分别制备处方中各药材供试品溶液,在拟定的指纹图谱条件下分别测定各药材的指纹图谱,与并样品色谱图进行比对,从而确认样品指纹图谱各特征峰的

表 1 10 批复方金钱草颗粒样品共有峰相对保留时间

Table 1 Relative retention times of common peaks in 10 batches

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.554 5	0.553 7	0.554 1	0.553 4	0.555 7	0.553 2	0.554 6	0.553 9	0.554 3	0.554 6
2	0.573 6	0.571 3	0.572 9	0.573 4	0.573 2	0.572 8	0.573 6	0.573 3	0.573 6	0.573 9
3	0.762 8	0.762 6	0.763 2	0.763 3	0.764 4	0.763 0	0.763 1	0.762 6	0.763 5	0.763 3
4	0.798 8	0.797 6	0.798 7	0.798 9	0.801 3	0.798 5	0.799 3	0.798 7	0.799 6	0.799 2
5(S)	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0
6	1.056 0	1.055 8	1.057 7	1.058 1	1.057 5	1.058 0	1.057 5	1.056 9	1.058 0	1.057 7
7	1.087 5	1.086 1	1.087 5	1.088 3	1.088 5	1.087 5	1.088 3	1.087 9	1.088 2	1.088 4
8	1.160 1	1.157 5	1.161 3	1.161 8	1.160 5	1.160 0	1.162 2	1.160 5	1.162 5	1.161 1
9	1.332 9	1.332 0	1.336 1	1.333 6	1.336 3	1.336 1	1.335 7	1.333 9	1.334 9	1.335 9
10	1.359 4	1.359 7	1.363 8	1.362 4	1.362 1	1.360 5	1.364 0	1.361 5	1.363 9	1.362 9
11	1.440 9	1.439 9	1.444 7	1.445 8	1.443 7	1.443 8	1.444 9	1.442 4	1.445 1	1.444 3
12	1.509 6	1.508 5	1.513 6	1.514 3	1.512 4	1.513 4	1.513 3	1.511 8	1.514 6	1.513 6
13	1.560 1	1.561 9	1.564 7	1.563 6	1.567 1	1.563 6	1.567 6	1.566 9	1.569 0	1.566 0
14	1.640 7	1.639 5	1.644 8	1.646 1	1.645 6	1.644 5	1.644 3	1.642 4	1.645 1	1.644 9
15	1.742 0	1.742 6	1.747 6	1.748 5	1.745 8	1.744 4	1.744 6	1.742 6	1.745 8	1.745 3
16	1.818 9	1.817 7	1.823 3	1.824 1	1.821 3	1.819 0	1.822 1	1.819 7	1.822 6	1.822 0
17	2.035 9	2.036 0	2.039 9	2.041 5	2.037 6	2.037 1	2.037 8	2.035 8	2.038 5	2.038 5
18	2.223 8	2.221 7	2.236 4	2.229 5	2.223 9	2.223 5	2.225 5	2.223 0	2.226 2	2.227 0
19	2.339 9	2.337 5	2.342 2	2.345 1	2.340 8	2.337 4	2.340 2	2.338 0	2.342 3	2.341 4
20	2.608 2	2.606 6	2.610 4	2.615 0	2.607 9	2.607 2	2.608 6	2.606 8	2.611 0	2.610 8

表 2 10 批复方金钱草颗粒样品共有峰相对峰面积

Table 2 Relative areas of common peaks in 10 batches

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.144 8	0.162 9	0.074 5	0.070 5	0.057 8	0.056 2	0.042 7	0.065 5	0.037 3	0.068 6
2	0.124 9	0.112 6	0.064 4	0.075 1	0.052 2	0.039 1	0.049 4	0.057 5	0.047 4	0.112 3
3	0.196 2	0.184 9	0.120 4	0.090 9	0.091 3	0.068 8	0.070 1	0.115 4	0.063 1	0.098 3
4	0.128 3	0.123 4	0.071 9	0.057 3	0.051 6	0.037 2	0.040 1	0.064 2	0.030 5	0.061 7
5(S)	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0
6	0.401 5	0.373 9	0.142 0	0.193 9	0.183 5	0.156 0	0.148 5	0.244 8	0.086 2	0.201 2
7	1.589 7	1.699 5	1.064 3	1.103 1	1.203 3	0.984 8	0.998 6	1.238 2	0.972 6	1.227 8
8	0.251 2	0.241 6	0.104 0	0.098 0	0.127 7	0.098 6	0.099 3	0.166 0	0.041 8	0.102 7
9	0.232 7	0.194 9	0.099 0	0.085 1	0.098 4	0.090 4	0.083 6	0.136 6	0.042 6	0.077 8
10	0.301 6	0.250 4	0.108 5	0.130 8	0.143 1	0.124 5	0.116 8	0.178 5	0.054 5	0.110 6
11	0.069 8	0.122 0	0.056 0	0.065 7	0.077 9	0.030 2	0.040 9	0.099 6	0.072 0	0.044 9
12	0.923 5	0.900 5	0.331 9	0.406 3	0.446 1	0.373 2	0.353 7	0.559 0	0.171 0	0.346 7
13	0.543 5	0.592 9	0.277 0	0.391 4	0.278 7	0.260 2	0.286 0	0.372 8	0.201 8	0.307 3
14	0.191 1	0.192 6	0.100 3	0.095 8	0.100 4	0.060 5	0.092 3	0.111 5	0.077 9	0.114 7
15	0.235 3	0.231 1	0.090 0	0.122 6	0.113 1	0.113 8	0.092 9	0.144 9	0.044 6	0.097 7
16	0.513 3	0.568 2	0.212 1	0.236 5	0.267 2	0.232 3	0.198 7	0.313 0	0.096 2	0.195 7
17	0.208 2	0.119 5	0.066 4	0.083 1	0.088 9	0.054 5	0.061 8	0.079 2	0.050 1	0.078 4
18	0.209 5	0.237 3	0.087 1	0.129 8	0.122 8	0.106 9	0.100 8	0.163 0	0.096 8	0.191 2
19	0.113 9	0.132 4	0.061 0	0.086 0	0.068 7	0.053 8	0.075 1	0.083 9	0.039 6	0.117 1
20	0.068 5	0.120 1	0.039 5	0.050 2	0.047 2	0.045 9	0.043 5	0.048 6	0.051 2	0.065 2

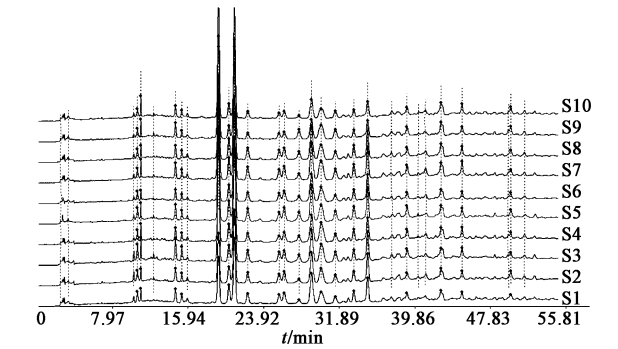


图 2 10 批复方金钱草颗粒 HPLC 指纹图谱共有模式
Fig.2 HPLC chromatogram of 10 batches of samples

归属,结果见表 3。从表中可以看出,除 4 号峰外,制剂中的共有峰均能在处方中的药材中找到相对应的指纹峰,4 号峰在制剂中含量低,可能为处方中各药材微量共有成分之和组成的共有峰。结果表明,在生产制剂过程中基本保留了原药材的成分特征。

表 3 指纹图谱中各特征峰的药材归属	
Table 3 Herbs belonging the characteristic peaks in the fingerprint	
峰号	药材
3,5,7,13,14	光石韦
6,7,8,9,10,12,13,15,16,17	广金钱草
3,6,10,11,13,18,19,20	车前草
1,2,6,15	玉米须

3 讨论

采用 DAD 检测器考察了 200 ~ 400 nm 的检测情况,重点考察 215,254,272,350 nm 4 个波长。在 350 nm 处色谱信息丰富,各成分均有较好吸收,响应值适中,各峰分离度较好,基线平稳,故选择 350 nm 作为检测波长。实验考察了柱温在 20,25,30 ℃ 下色谱峰的分离效果,20 ℃ 时各色谱峰分离较好,峰形较对称,其中芒果苷峰与相邻峰分离效果最佳,夏佛塔苷峰分离效果也较好,故选择柱温为 20 ℃。又考察了 0.8,1 mL·min⁻¹ 两个流速下的色谱峰分离情况,1 mL·min⁻¹ 时各色谱峰保留时间适宜,峰形较好,芒果苷色谱峰分离度最大,故选择 1 mL·min⁻¹ 作为最佳流速。比较了 30% 乙醇,50% 乙醇,80% 乙醇,无水乙醇各项提取溶剂超声提取的高效液相色谱图之间的差异,无水乙醇未提取出各类成分,30% 乙醇,50% 乙醇,80% 乙醇所提出的成分相差不大,而 50% 乙醇所提取芒果苷含量最高,故在此选择 50% 乙醇作为提取溶剂,由于采用 50% 乙醇作为溶剂所得液相色谱中各成分峰形较差,且分离度难达到,而将溶剂挥干后加流动相溶解样品残渣能使峰形尖锐,分离度好,基线也更平稳,故选择

将溶剂挥干后用流动相溶解来制备供试品溶液。也比较了 50% 乙醇超声提取 10,15,30,45 min 的提取效率,超声 10 min 便能将各成分提取完全,故选取超声 10 min 对样品进行提取。

本实验对 10 批复方金钱草颗粒指纹图谱进行研究,结果表明各样品的指纹图谱主要峰整体一致,确定 20 个共有峰,确认 5 号峰为芒果苷(光石韦中主要成分^[8-12]),12 号峰为夏佛塔苷(广金钱草中主要成分^[13-15]),通过软件得到本品的对照指纹图谱。本方法分离效果好,灵敏、准确、简单,为复方金钱草颗粒的鉴别、质量评价与控制提供了实验依据。

[参考文献]

[1] 周军,韦桂宁,吴超伟,等. 复方金钱草颗粒对肾结石的影响及其利尿、解痉、抗炎作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(18):206-209.

[2] 熊颖,王俊文,邓君. 金钱草和广金钱草的药理作用比较[J]. 中国中药杂志,2015,40(11):2106-2111.

[3] 马军花,邱宏聪,陈明生,等. 复方金钱草颗粒的质量控制研究[J]. 现代药物与临床,2014,29(4):269-272.

[4] 关洪月,李林,刘晓,等. 中药指纹图谱相似度计算方法探析[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(18):282-287.

[5] 詹雪艳,史新元,段天璇,等. 色谱指纹图谱相似度方法的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(2):248-251.

[6] 陈思妮,张振秋. 广金钱草 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中药材,2008,30(9):1249-1252.

[7] 黄艳,温幼敏,马军花,等. 光石韦药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(11):152-155.

[8] 包文芳,孟宪纾,周荣汉. 中国石韦属化学成分与分类学的研究[J]. 沈阳药科大学学报,1982,(15):62-71.

[9] 韩基善,王明时. 庐山石韦化学成分的研究[J]. 南京药学院学报,1984,15(1):40-44.

[10] 郑兴,许云龙,徐军. 西南石韦化学成分的研究[J]. 中国中药杂志,1998,23(2):98-99.

[11] 包文芳,席晓红,李斌. 光石韦的两个(口山)酮类化合物[J]. 西北药学杂志,1989,4(1):16-17.

[12] 郑兴,余麟,廖端芳,等. 光石韦化学成分的研究[J]. 中草药,1999,30(4):253-254.

[13] 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,2010:43-44.

[14] 王植柔,白先忠,刘锋,等. 广金钱草化学成分的研究[J]. 广西医科大学学报,1998,15(3):10-14.

[15] 杨全,桑雪雨,唐晓敏,等. 不同产地广金钱草夏佛塔苷含量比较[J]. 吉林农业大学学报,2013,35(3):308-311,323.

[责任编辑 顾雪竹]