

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.07.032

金莲花颗粒的高效液相指纹图谱研究*

孙秀漫¹,周楚娟¹,杨佳彬¹,杜淑雯²,曾彩芳^{1△}

(1. 广州医科大学附属第二医院, 广东 广州 511447; 2. 广州医科大学, 广东 广州 511436)

摘要:目的 建立金莲花颗粒的高效液相色谱(HPLC)特征图谱分析方法,控制不同批次金莲花颗粒的质量。方法 以10批次金莲花颗粒为研究对象,采用HPLC法,色谱柱为Agilent C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,4.0 μm),流动相为0.1% HAc水-乙腈(梯度洗脱),检测波长为254 nm,流速为0.6 mL/min,柱温为30℃,进样量为10 μL。采用中药色谱指纹图谱相似度评价软件系统(2004 A版)对10批次样品的指纹图谱进行相似度评价。结果 金莲花颗粒HPLC特征图谱共标示出21个特征共有峰,10批次金莲花颗粒的特征图谱与对照图谱相似度均超过0.994。结论 建立了金莲花颗粒的HPLC特征图谱,该方法稳定,重复性好,可用于金莲花颗粒的质量控制。

关键词:金莲花颗粒;指纹图谱;高效液相色谱法;相似度评价;质量控制

中图分类号:R932;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)07-0113-04

HPLC Characteristic Spectrum of Jinlianhua Granules

SUN Xiuman¹, ZHOU Chujuan¹, YANG Jiabin¹, DU Shuwen², ZENG Caifang¹

(1. The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, China 511477; 2. Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, China 511436)

Abstract: Objective To establish a high performance liquid chromatography(HPLC) method for the analysis of Jinlianhua Granules, and to control the quality of Jinlianhua Granules in different batches. **Methods** Ten batches of Jinlianhua Granules with different batches were used in this study. HPLC method was applied, and the chromatographic column was Agilent - C₁₈ column(250 mm×4.6 mm,4.0 μm), the mobile phase was 0.1% HAc water - acetonitrile solution by gradient elution. The detection wavelength was 254 nm, the flow rate was 0.6 mL/min, the column temperature was 30℃, and the injection volume was 10 μL. The similarity of fingerprints was evaluated according to the software system 2004A issued by the State Pharmacopoeia Committee. **Results** The characteristic spectrum of Jinlianhua Granules was established, and a total of 21 common characteristic peaks were identified. The similarities between the characteristic spectrums and the control spectrum of 10 batches of Jinlianhua granules was all above 0.994. **Conclusion** The established method of the HPLC characteristic spectrum of Jinlianhua Granules is stable and reproducible, which can be used for the quality evaluation of Jinlianhua Granules.

Key words: Jinlianhua Granules; fingerprint; high performance liquid chromatography; similarity evaluation; quality control

金莲花颗粒为毛茛科金莲花属草本植物金莲花的中药制剂,浅棕黄色,味甜、微苦,临床应用广,常用于治疗风热邪毒袭肺,以及高热引起的上呼吸道感染、扁桃体炎及咽炎。金莲花颗粒收录于2015年版《中国药典(一部)》^[1],但其仅记载了金莲花相关制剂的含量测定方法,未记载其指纹图谱的分析方法。目前鲜有关于金莲花颗粒指纹图谱研究的文献报道,主要集中在其临床药效研究^[2-6]。为保证该药的安全性和有效性,有必要建立其质量控制方法。而化学成分复杂的中药材,单一的活性成分不能成为有效评价中药优劣真伪的指标,单一成分的质量控制也难以体现整体质量,指纹图谱是目前较适合的质量控制方法^[7-9]。金莲花颗粒、金莲花胶囊均为金莲花相关制剂,关于金莲花药材及金莲花胶囊的指纹图谱均有报道^[10-13]。不同制剂工艺对金莲花药材有效成分影响不同,故本研究中采用高效液相色谱(HPLC)法建立金莲花颗粒特征图谱,旨在为金莲花颗

粒的质量控制及评估提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20A型高效液相色谱仪(日本岛津公司),包括LC-20AT型四元泵、DGU-20A5R型在线真空脱气机、SIL-20A型自动进样器、CTO-10Asvp型柱温箱、SPD-20A型紫外检测器、LC-Solution色谱工作站;80-2型离心机(上海手术机械厂);AUW220D型分析天平(日本岛津公司,精度为十万分之一);Centrifuge 5424 R型离心机(德国Eppendorf公司);XW-80A型旋涡混合仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);GM-0.33A型津腾隔膜真空泵(天津津腾实验设备有限公司);SB-3200DTN型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 试剂

甲醇、乙腈均为色谱纯(德国默克股份两合公司);

*基金项目:广州医科大学2016年度青年科研项目[2016A19]。

第一作者:孙秀漫,女,硕士研究生,初级药师,研究方向为治疗药物监测,(电子信箱)992322182@qq.com。

△通信作者:曾彩芳,女,大学本科,主任中药师,研究方向为医院制剂、医院药事管理,(电子信箱)gyfsyjk@126.com。

冰醋酸(分析纯,天津市恒兴化学试剂制剂有限公司);金莲花颗粒购自10个社会药房(S1批号为1802062,S2批号为1801023,S3批号为1804106,S4批号为1801011,S5批号为1707163,S6批号为1804134,S7批号为1710210,S8批号为1804105,S9批号为1804128,S10批号为1805153,承德天原股份有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,4.0 μm);检测波长:254 nm;柱温:30℃;流速:0.6 mL/min;进样量:10 μL;流动相:乙腈(A)-1% HAc水系统(B),梯度洗脱(0~15 min时10%→17% A,15~25.01 min时17%→25% A,25.01~60 min时25%→46% A,60~64.99 min时46%→10% A)。

2.2 溶液制备

取不同批次的金莲花颗粒2 g,精密称定,置150 mL具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50 mL,密塞,称定质量,超声30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.3 HPLC 指纹图谱的建立

精密度试验:吸取同一批(批号为1801011)样品1份,依法制备溶液10 μL,连续进样6次,测定峰面积,结果的RSD均小于2.0%(n=6)。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)软件进行相似度计算,以第1次进样所得色谱图作为参照,其余5次进样所得色谱图与之比较。结果显示,所得特征图谱与对照模式的相似度均大于0.99,表明试验精密度良好。

重复性试验:取同一批(批号为1801011)样品6份,依法制备供试品溶液,测定其指纹图谱,结果相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于2.0%(n=6)。采用同一软件进行相似度计算,以第1次进样所得色谱图作为参照,其余5次进样所得色谱图与之比较。结果显示6次所测得的特征图谱与所得共有模式的相似度均大于0.99,表明方法重复性良好。

稳定性试验:吸取同一供试品溶液(样品批号为1801011)10 μL,分别于0,2,4,8,12,24 h时进样,测定各指标成分峰面积,结果相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于2.0%(n=6)。采用同一软件进行相似度计算,以第1次进样所得色谱图作为参照,其余5次进样所得色谱图与之比较。结果所得色谱图整体特征相似,相似度均大于0.99,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.4 指纹图谱的建立及相似度分析

取10批次金莲花颗粒,依法平行制备供试品溶液10份,按拟订色谱条件进样测定,得10批次的金莲花颗粒HPLC特征图谱重叠图,详见图1。按中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)中进行相似度评价,以S1样品的指纹图谱为参照图谱,对照图谱的生成采用中位数法,时间窗宽度为0.1,生成金莲花颗粒特征图谱共有模式,详见图2。相似度为0.994~0.999,详见表1,表明金莲花颗粒不同批次质量较稳定。从10批次金莲花颗粒样品分析结果显示,根据特征峰的峰形、峰数、保留时间等共标示出21个特征共有峰,其中峰2、峰4为2个最强峰,其次为峰6、峰7、峰17。根据所得10批次金莲花颗粒样品的HPLC特征图谱,得出21

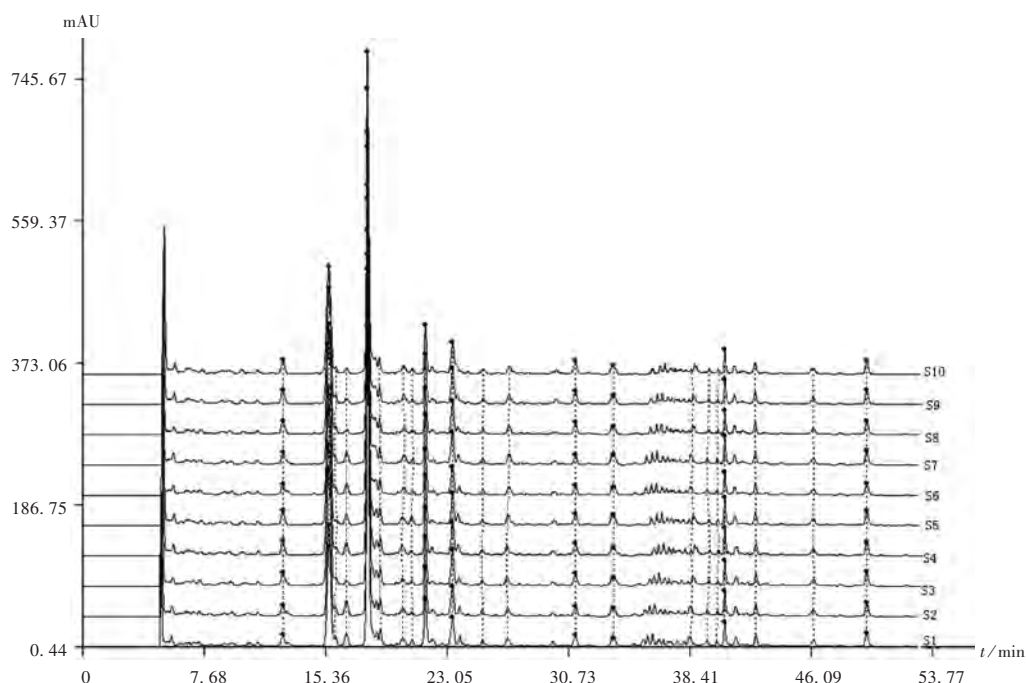


图1 10批次金莲花颗粒高效液相色谱特征图谱重叠图

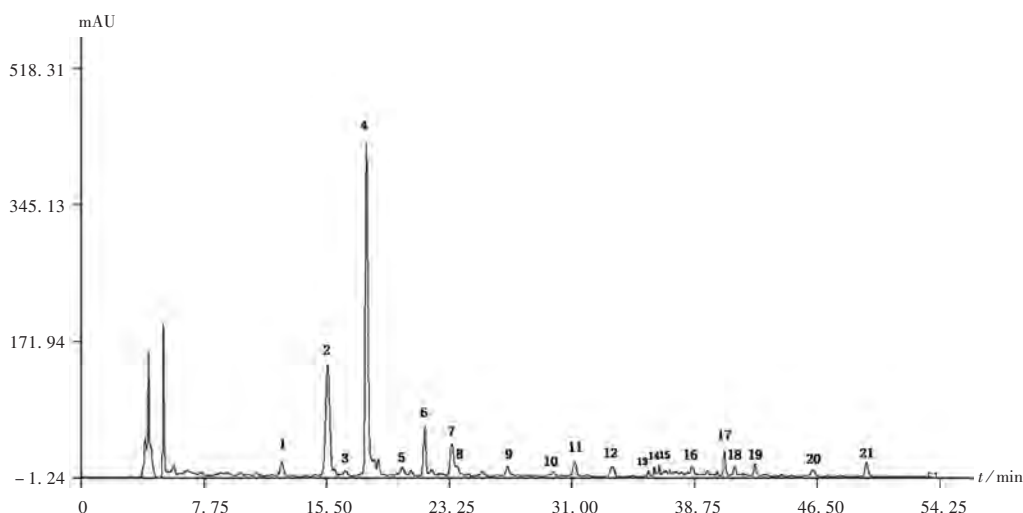


图2 金莲花颗粒高效液相色谱特征图谱共有模式图

个特征峰的绝对保留时间及绝对峰面积,以峰2为参照峰(S),分别计算各特征共有峰的相对保留时间、相对峰面积,以及各特征共有峰的平均相对保留时间及平均相对峰面积。结果表2。

表1 10批次金莲花颗粒相似度

批次	批号	相似度	批次	批号	相似度
S1	1802062	0.998	S6	1804134	0.999
S2	1801023	0.994	S7	1710210	0.995
S3	1804106	0.999	S8	1804105	0.998
S4	1801011	0.999	S9	1804128	0.998
S5	1707163	0.999	S10	1805153	0.999

表2 10批金莲花颗粒高效液相色谱特征图谱共有峰分析结果
($\bar{X} \pm s, n=10$)

峰号	平均相对保留 时间(min)	平均相对峰 面积	峰号	平均相对保留 时间(min)	平均相对峰 面积
1	0.813 ± 0.0075	0.101 ± 0.0174	12	2.156 ± 0.0131	0.105 ± 0.0092
2(s)	1.000	1.000	13	2.303 ± 0.0354	0.034 ± 0.0040
3	1.072 ± 0.0024	0.080 ± 0.0303	14	2.325 ± 0.0403	0.040 ± 0.0058
4	1.157 ± 0.0052	1.957 ± 0.2415	15	2.344 ± 0.0418	0.046 ± 0.0106
5	1.303 ± 0.0092	0.080 ± 0.0149	16	2.477 ± 0.0446	0.031 ± 0.0045
6	1.393 ± 0.0109	0.280 ± 0.0260	17	2.603 ± 0.0411	0.091 ± 0.0262
7	1.503 ± 0.0167	0.216 ± 0.0188	18	2.652 ± 0.0481	0.044 ± 0.0060
8	1.526 ± 0.0131	0.052 ± 0.0133	19	2.734 ± 0.0497	0.069 ± 0.0069
9	1.709 ± 0.0401	0.069 ± 0.0156	20	2.970 ± 0.0548	0.058 ± 0.0091
10	1.879 ± 0.0714	0.043 ± 0.0152	21	3.187 ± 0.0592	0.099 ± 0.0108
11	2.002 ± 0.0139	0.090 ± 0.0086			

3 讨论

根据金莲花化学成分相关文献报道,选择了4组流动相,分为是甲醇-醋酸(0.1%~0.5%)、乙腈-醋酸(0.1%~0.5%)、甲醇-水和乙腈-水,按不同比例,分别进行梯度和等度洗脱。结果乙腈-醋酸(0.1%)系统梯度洗脱,各色谱峰分离度好,保留时间适中,故选择乙

腈-醋酸(0.1%)系统梯度洗脱为流动相。

对比了254,340,274 nm 3个波长下金莲花颗粒的HPLC色谱图。在340 nm波长下的出峰数较少,254 nm与274 nm波长下HPLC色谱图相似,与254 nm波长相比,274 nm波长处峰响应度较低,254 nm波长下检测的各色谱峰分离度好,出现的色谱峰多,基线平稳,故选取254 nm作为指纹图谱检测波长。同时对柱温(25,30,40℃)和流速(0.6,0.7,0.8,1.0 mL/min)进行了考察,结果表明,当柱温为30℃,流速为0.6 mL/min时,各色谱峰分离度好,保留时间适中。

收集的金莲花颗粒样品来自同一个厂家的不同包装,对不同批次金莲花颗粒进行了指纹图谱研究,并建立了金莲花颗粒特征图谱,共标定了21个共有指纹峰,10批次金莲花颗粒相似度为0.994~0.999,表明金莲花颗粒不同包装、不同批次间质量较稳定。

通过查阅金莲花药材及其制剂的文献^[13-15]可见,本研究中金莲花颗粒指纹图谱2~7号峰、11~12号峰与13~19号峰峰群与文献[11]报道的金莲花胶囊指纹图谱相似,表明2个制剂指纹图谱有相似性,这与2个制剂主要都是用金莲花药材制成有关。对比金莲花药材混合对照品图谱及本研究所得的金莲花颗粒特征图谱,推测本研究中共有模式图中峰2为荭草素-2"-O-β-L-半乳糖苷,峰4为荭草苷,峰7为牡荆苷。

综上所述,本研究建立了金莲花颗粒指纹图谱,且该方法稳定、重复性好,可为该药的质量控制提供参考。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2015:1081-1082.
- [2] 曾学文,林烈桔,麦朗君. 金莲花颗粒联合头孢克肟治疗小儿急性呼吸道感染的临床研究[J]. 现代药物与临床,2018,33(1):84-87.