

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.10.015

郁金配方颗粒 HPLC 指纹图谱及指标成分含量测定研究*

姚瑶,赵淑淑[△],姚俊霞,黄琪,朱方剑,信文娟

(浙江佐力药业股份有限公司,浙江 湖州 313200)

摘要:目的 采用高效液相色谱(HPLC)法同时测定郁金配方颗粒中2种指标成分的含量,并建立该制剂的HPLC指纹图谱。方法 色谱柱为Welch Ultimate AQ-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇-0.1%磷酸二氢钾溶液(梯度洗脱),流速为0.8 mL/min,检测波长为260 nm,柱温为30℃。采用“中药色谱指纹图谱相似度软件(2012.130723版)”进行相似度评价,并确定共有峰。结果 15批煎剂及4批样品的HPLC图谱中有3个共有峰,1号峰为尿苷,3号峰为腺苷,相似度均大于0.85。尿苷、腺苷进样量分别在5.1~264.4 ng($r=0.9997$)和15.9~792.6 ng($r=0.9997$)范围内与峰面积线性关系良好;精密性、稳定性、重复性试验的RSD均小于2.00%($n=6$),平均加样回收率分别为93.65%及93.51%,RSD分别为1.84%及2.03%($n=6$)。结论 该方法操作简便、准确,重复性好,结合所建立的指纹图谱,可为郁金配方颗粒的质量评价提供参考。

关键词:郁金配方颗粒;指纹图谱;高效液相色谱法;尿苷;腺苷;含量;质量评价

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)10-0057-04

HPLC Fingerprint and Content Determination of Target Components of Yujin Dispensing Granules

YAO Yao, ZHAO Shushu, YAO Junxia, HUANG Qi, ZHU Fangjian, XIN Wenjuan

(Zhejiang Jolly Pharmaceutical Co., Ltd., Huzhou, Zhejiang, China 313200)

Abstract: Objective To simultaneously determine the contents of the two target components of Yujin Dispensing Granules by the high-performance liquid chromatography(HPLC) method, and to establish an HPLC fingerprint of the preparation. **Methods** The chromatographic column was Welch Ultimate AQ-C₁₈ column(250 mm×4.6 mm,5 μm), the mobile phase was methanol(A)-0.1% potassium dihydrogen phosphate solution with gradient elution, the flow rate was 0.8 mL/min, the detection wavelength was 260 nm, and the column temperature was 30℃. The Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM(version 2012.130723) software was used to evaluate the similarity and to determine the common peaks. **Results** There were three common peaks in the HPLC chromatograms of 15 batches of *Curcumae Radix* decoction and 4 batches of samples with similarities higher than 0.85, the peak I was uridine and peak III was adenosine. The linear ranges of uridine and adenosine were 5.1-264.4 ng($r=0.9997$) and 15.9-792.6 ng($r=0.9997$), respectively. The RSDs of the precision, stability and repeatability tests were less than 2.00% ($n=6$), and the average recoveries of uridine and adenosine were 93.65% ($RSD=1.84%$, $n=6$) and 93.51% ($RSD=2.03%$, $n=6$), respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate and reproducible, which can provide a reference for the quality evaluation of Yujin Dispensing Granules.

Key words: Yujin Dispensing Granules; fingerprint; HPLC; uridine; adenosine; content; quality evaluation

郁金为姜科植物温郁金 *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling、姜黄 *Curcuma longa* L.、广西莪术 *Curcuma kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang 或蓬莪术 *Curcuma phaeocaulis* Val. 的干燥块根^[1]。温郁金是浙八味的道地药材,具有行气解郁、活血止痛、利胆退黄等功效^[2]。现代研究表明,温郁金药材中含有0.3%的挥发油,主要成分有莪术醇、吉马酮、异龙脑、龙脑等^[3-5]。郁金配方颗粒以郁金药材为原料,经水提、浓缩、干燥等工序制备而成。目前,市场上郁金配方颗粒生产厂家较多,为保证其治疗效果稳定,需对产品进行质量控制。本研究中建立了郁金配方颗粒高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并

同时测定制剂中尿苷、腺苷的含量,为中药配方颗粒的质量研究提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260-G205 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);BT25S 型电子分析天平(瑞士 Sartorius 公司,精度为0.01 mg);KQ-500VDB 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

郁金配方颗粒(4个不同厂家,批号分别为1906001, 191001, 1911003, Y20190411);尿苷对照品(批号为

*基金项目:浙江省中医药管理局中药配方颗粒科研专项[浙中医药(2017)11号]。

第一作者:姚瑶,大学本科,工程师,研究方向为药物成分分析及质量标准,(电子信箱)yaoyao0855@163.com。

[△]通信作者:赵淑淑,硕士研究生,工程师,研究方向为药物成分分析及质量标准,(电子信箱)tracy2937@163.com。

110887-201803, 含量为 99.5%), 腺苷对照品(批号为 110879-201703, 含量为 99.7%), 均购自中国食品药品检定研究院; 甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Welch Ultimate AQ-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇(A)-0.1% 磷酸二氢钾溶液(B), 梯度洗脱(0~10 min 时 0A, 10~20 min 时 0A→2%A, 20~30 min 时 2%A→10%A, 30~45 min 时 10%A→15%A, 45~55 min 时 15%A); 流速: 0.8 mL/min; 检测波长: 260 nm; 柱温: 30 ℃。

2.2 溶液制备

取尿苷、腺苷对照品各适量, 精密称定, 加水制成每 1 mL 分别含尿苷和腺苷各 10 μg 的混合对照品溶液。取样品(批号为 1906001)约 1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加水 25 mL, 称定质量, 超声(功率 500 W, 频率 40 kHz) 处理 30 min, 取出, 放冷, 再称定质量, 离心, 取上清液 5 mL, 蒸干, 残渣用 10% 甲醇溶解, 定容至 5 mL 容量瓶中, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。按郁金配方颗粒处方和工艺制备缺尿苷、腺苷的阴性样品, 同法制备阴性对照品溶液。

2.3 指纹图谱建立

2.3.1 方法学考察

精密度试验: 分别精密吸取供试品(批号为 1906001)溶液适量, 按 2.1 项下色谱条件进样测定 6 次, 以腺苷峰为参照峰, 计算各特征峰的相对保留时间及相对峰面积。结果各特征峰相对保留时间的 RSD 均小于 1.00%,

相对峰面积的 RSD 均小于 2.00% (n=6), 表明方法精密度良好。

稳定性试验: 取供试品(批号为 1906001)溶液适量, 分别于室温下放置 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 时按 2.1 项下色谱条件进样测定, 以腺苷峰为参照峰, 计算特征峰的相对保留时间及相对峰面积。结果各特征峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 2.00% (n=6), 表明供试品溶液在室温放置 24 h 内基本稳定。

重复性试验: 取样品(批号为 1906001)适量, 共 6 份, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 再按 2.1 项下色谱条件进样测定, 以腺苷峰为参照峰, 计算特征峰的相对保留时间及相对峰面积。结果各特征峰相对保留时间的 RSD 均小于 1.00%, 相对峰面积的 RSD 均小于 2.00% (n=6), 表明该方法重复性良好。

2.3.2 指纹图谱的建立及相似度评价

按郁金配方颗粒处方制备 15 批煎剂。按 2.1 项下色谱条件进样测定, 15 批煎剂 HPLC 叠加指纹图谱见图 1。根据结果, 采用 Chempattern 化学计量学软件分析数据, 设样品(批号为 1906001)的色谱图作为参照图谱, 其他样品的色谱峰与参照图谱进行自动匹配, 即得郁金配方颗粒 HPLC 对照指纹图谱, 详见图 2。将 15 批煎剂的色谱图录入“中药色谱指纹图谱相似度评价软件”, 确定 1 号峰为尿苷, 3 号峰为腺苷, 并计算相似度。相似度结果均大于 0.85, 说明 15 批煎剂间具有较好的相似性, 结果见表 1。

2.3.3 样品相似度评价

取 4 批市售样品, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 并计算

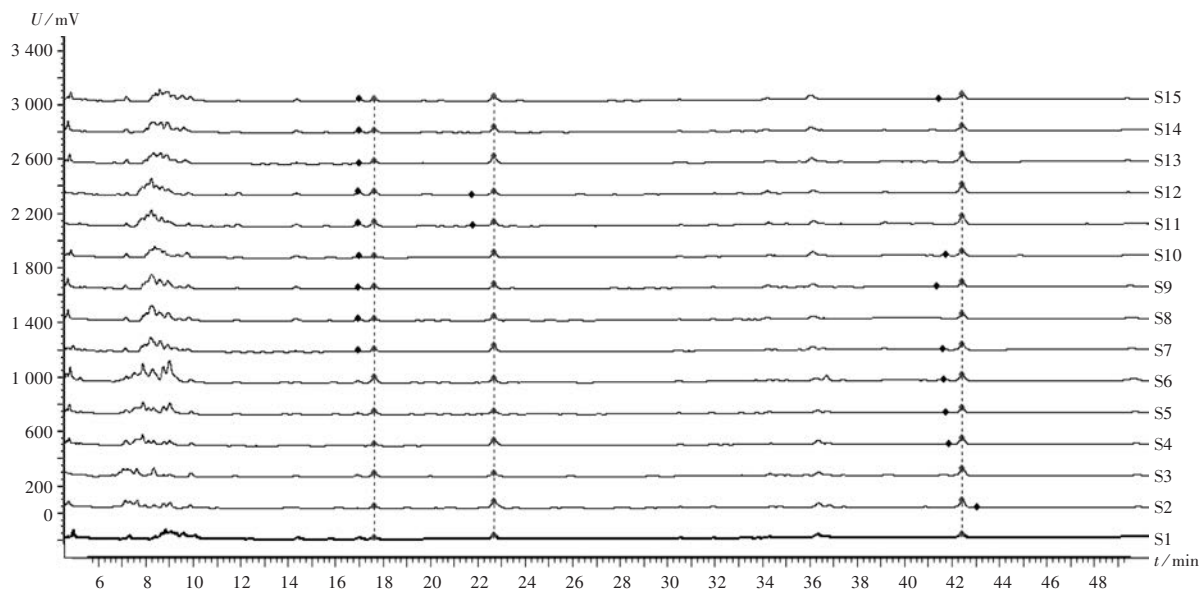


图 1 15 批标准煎剂高效液相色谱重叠指纹图谱

Fig. 1 HPLC overlapping fingerprint of 15 batches of *Curcumae Radix* standard decoction

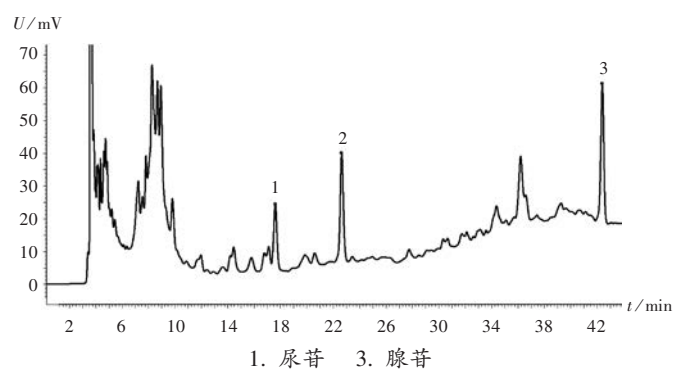


图2 郁金配方颗粒高效液相色谱对照指纹图谱

1. Uridine 3. Adenosine

Fig.2 HPLC reference fingerprint of Yujin Dispensing Granules

表1 15批煎剂相似度评价结果

Tab.1 Similarity of 15 batches of decoction

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	对照
S1	1.000	1.000	0.957	0.999	0.968	0.907	0.997	0.993	0.993	0.999	0.955	0.928	0.999	0.982	0.999	0.989
S2	1.000	1.000	0.947	0.997	0.961	0.895	0.995	0.988	0.989	0.998	0.946	0.917	0.997	0.976	0.998	0.984
S3	0.957	0.947	1.000	0.964	0.990	0.973	0.964	0.982	0.983	0.967	0.998	0.993	0.968	0.994	0.966	0.989
S4	0.999	0.997	0.964	1.000	0.978	0.925	0.999	0.996	0.996	1.000	0.960	0.934	0.999	0.986	0.998	0.993
S5	0.968	0.961	0.990	0.978	1.000	0.984	0.981	0.991	0.991	0.977	0.981	0.967	0.976	0.991	0.971	0.992
S6	0.907	0.895	0.973	0.925	0.984	1.000	0.933	0.951	0.950	0.922	0.957	0.953	0.920	0.956	0.913	0.955
S7	0.997	0.995	0.964	0.999	0.981	0.933	1.000	0.997	0.996	0.998	0.957	0.930	0.997	0.985	0.995	0.992
S8	0.993	0.988	0.982	0.996	0.991	0.951	0.997	1.000	1.000	0.996	0.977	0.957	0.996	0.995	0.994	0.999
S9	0.993	0.989	0.983	0.996	0.991	0.950	0.996	1.000	1.000	0.997	0.979	0.959	0.996	0.996	0.995	0.999
S10	0.999	0.998	0.967	1.000	0.977	0.922	0.998	0.996	0.997	1.000	0.964	0.940	1.000	0.988	0.999	0.994
S11	0.955	0.946	0.998	0.960	0.981	0.957	0.957	0.977	0.979	0.964	1.000	0.997	0.967	0.993	0.965	0.986
S12	0.928	0.917	0.993	0.934	0.967	0.953	0.930	0.957	0.959	0.940	0.997	1.000	0.943	0.980	0.941	0.969
S13	0.999	0.997	0.968	0.999	0.976	0.920	0.997	0.996	0.996	1.000	0.967	0.943	1.000	0.989	1.000	0.994
S14	0.982	0.976	0.994	0.986	0.991	0.956	0.985	0.995	0.996	0.988	0.993	0.980	0.989	1.000	0.988	0.999
S15	0.999	0.998	0.966	0.998	0.971	0.913	0.995	0.994	0.995	0.999	0.965	0.941	1.000	0.988	1.000	0.992
对照	0.989	0.984	0.989	0.993	0.992	0.955	0.992	0.999	0.999	0.994	0.986	0.969	0.994	0.999	0.992	1.000

表2 4个厂家郁金配方颗粒相似度评价结果

Tab.2 Similarity of Yujin Dispensing Granules from four manufacturers

编号	S1	S2	S3	S4	S5	对照
S1	1.000	0.968	0.984	0.996	0.881	0.988
S2	0.968	1.000	0.958	0.972	0.963	0.989
S3	0.984	0.958	1.000	0.995	0.907	0.990
S4	0.996	0.972	0.995	1.000	0.905	0.995
S5	0.881	0.963	0.907	0.905	1.000	0.941
对照	0.988	0.989	0.990	0.995	0.941	1.000

液,制成尿苷/腺苷质量浓度分别为 26.44/79.26, 13.22/39.63, 5.09/15.85, 3.05/9.51, 1.02/3.17, 0.51/1.59 $\mu\text{g/mL}$ 的系列混合对照品溶液。精密量取 10 μL ,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以进样量(X, ng)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性

相似度。结果,供试品特征图谱中呈现 3 个共有峰,并与参照物色谱峰中的保留时间相对应,供试品溶液与对照指纹图谱相似度均大于 0.85。结果见表 2。

2.4 指标成分含量测定

2.4.1 方法学考察

专属性试验:取 2.2 项下对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各适量,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图,见图 3。结果阴性对照品溶液色谱中,在与阿魏酸对照品溶液色谱相同保留时间处无干扰峰,表明专属性良好。

线性关系考察:精密量取 2.2 项下混合对照品溶

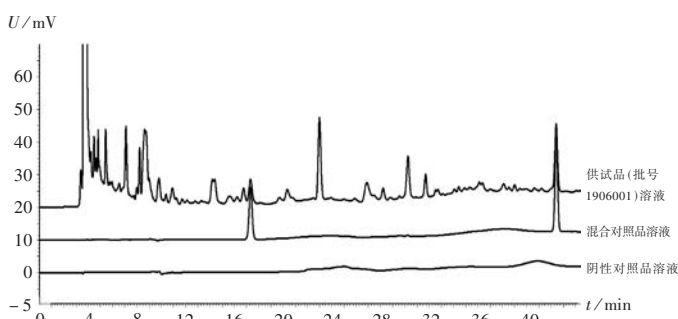


图3 高效液相色谱图

Fig.3 HPLC chromatograms

回归,得尿苷和腺苷的回归方程 $Y_1 = 2.3995X_1 + 4.0551$, $Y_2 = 3.2168X_2 + 7.6895$, r 均为 0.9997 ($n=6$)。结果表明,尿苷和腺苷进样量分别在 5.1~264.4 ng 和 15.9~792.6 ng 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取线性关系考察项下第一组混合对照

品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果尿苷和腺苷峰面积的RSD分别为0.25%和0.13% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取供试品溶液(批号为1906001)适量,分别于室温下放置0,2,4,8,12,18,24 h,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果尿苷和腺苷峰面积的RSD分别为1.70%和0.96% ($n=7$),表明供试品溶液在室温放置24 h内基本稳定。

重复性试验:取样品(批号为1906001)适量,精密称定,共6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果尿苷和腺苷平均含量分别为0.0463,0.0912 mg/g, RSD分别为1.50%和1.90% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为1906001,尿苷含量为0.0465 mg/g、腺苷含量为0.0911 mg/g)适量,共6份,分别加入一定质量浓度的对照品溶液,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表3。

表3 加样回收试验结果($n=6$)

Tab.3 Results of the recovery tests($n=6$)

成分	取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
尿苷	0.5015	0.0233	0.0488	0.0688	93.24	93.65	1.84
	0.5099	0.0237	0.0488	0.0706	96.11		
	0.5069	0.0236	0.0488	0.0686	92.21		
	0.5001	0.0233	0.0488	0.0699	95.49		
	0.5079	0.0236	0.0488	0.0686	92.21		
	0.5072	0.0236	0.0488	0.0688	92.62		
腺苷	0.5015	0.0457	0.0503	0.0944	96.82	93.51	2.03
	0.5099	0.0465	0.0503	0.0933	93.04		
	0.5069	0.0462	0.0503	0.0931	93.24		
	0.5001	0.0456	0.0503	0.0923	92.84		
	0.5079	0.0463	0.0503	0.0921	91.05		
	0.5072	0.0462	0.0503	0.0935	94.04		

2.4.2 样品含量测定

取4批样品各适量,分别按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定,平行测定3次,记录峰面积,并计算样品含量。结果4批样品中尿苷含量分别为0.043,0.013,0.048,0.035 mg/g,腺苷含量分别为0.098,0.012,0.058,0.058 mg/g。

3 讨论

郁金的主要来源为温莪术根茎或郁金块茎,浙江是其主产区。郝敏等^[6]研究发现,不同品种郁金的指纹图

谱具有相似性,其挥发油指纹图谱中均含有吉马酮等化学成分。刘玉红等^[7]建立了4种不同基源的郁金挥发油指纹图谱方法,为郁金药材质量标准的制订提供了依据。目前,有关郁金含量测定研究主要集中于药材及其挥发油的研究,有关郁金配方颗粒中指标成分含量测定鲜有报道。本研究中采用HPLC法,比较不同波长、不同流动相(甲醇-0.1%甲酸、乙腈-水、醋酸-乙腈-水)^[8-10]对样品含量测定结果的影响,最终确定为以甲醇-0.1%磷酸二氢钾溶液为流动相进行梯度洗脱,测定波长为260 nm。

中药配方颗粒经过多道工序加工而成,失去了原有饮片的形态,在质量控制上缺少饮片性状等重要指标,因此在质量控制标准制订过程中应加强有效成分多元化测定及测定指标多样化。中药指纹图谱属中药质量控制的新技术,能有效且全面地反映其整体特性。本研究通过15批标准汤剂拟合出对照指纹图谱,并与市售4批样品比较,指认3个共有峰,且相似度均大于0.85。

综上所述,该方法操作简便、准确,重复性好,结合所建立的指纹图谱,可为郁金配方颗粒的质量评价提供参考。

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,2020:217.
- [2] 于孟娇. 温郁金中有效成分提取工艺研究[J]. 山东化工, 2017(15):53-54.
- [3] 姜程曦,秦宇雯,袁 玮,等. 不同蒸制加工方法对温郁金成分含量的影响[J]. 中药材,2019,42(10):2277-2279.
- [4] 张 敏. 不同种类中药郁金成分中姜黄素含量临床测定价值[J]. 中国处方药,2016,14(6):30-31.
- [5] 袁晓旭,杨明明,赵桂琴. 郁金化学成分及药理作用研究进展[J]. 承德医学院学报,2016,33(6):487-489.
- [6] 郝 敏,陆兔林,毛春芹,等. 3种温郁金根茎炮制品的UPLC指纹图谱与多成分含量测定研究[J]. 中国中药杂志,2018,43(11):2288-2294.
- [7] 刘玉红,刘倩伶,黄志芳,等. 不同基源郁金挥发油GC指纹图谱的比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(24):166-170.
- [8] 秦洛宜. 姜黄、莪术、郁金的化学成分与药理作用研究分析[J]. 临床研究,2019,27(2):3-4.
- [9] 张 琳,周福军,单 淇,等. 毛郁金药材HPLC指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(14):62-65.
- [10] 张立红,岳显可,张 云,等. 产地鲜切加工片姜黄HPLC指纹图谱分析及4个成分含量测定[J]. 亚太传统医药,2020,16(2):50-54.

(收稿日期:2020-08-28;修回日期:2020-11-18)