

知柏地黄丸的 UPLC 指纹图谱研究

王常顺, 刘永利, 冯丽* (河北省药品检验研究院, 石家庄 050011)

摘要: 目的 建立知柏地黄丸 UPLC 指纹图谱的研究方法。方法 采用 Waters Acquity BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 流动相为乙腈-0.1%磷酸, 梯度洗脱, 检测波长 236 nm, 流速 0.4 mL·min⁻¹, 柱温 40 °C, 以丹皮酚作为参照物。结果 在 12 min 内完成指纹图谱分析, 标出 12 个共有峰, 对 6 个色谱峰进行了归属, 并进行了相似度评价。结论 UPLC 简便可行, 建立的指纹图谱可用于知柏地黄丸的质量控制。

关键词: 知柏地黄丸; 指纹图谱; UPLC; 相似度

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2017)10-1432-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.10.015

引用本文: 王常顺, 刘永利, 冯丽. 知柏地黄丸的 UPLC 指纹图谱研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(10): 1432-1436.

Study on UPLC Fingerprint of Zhibai Dihuang Pills

WANG Changshun, LIU Yongli, FENG Li* (Hebei Insititute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a method for fingerprint study of Zhibai Dihuang pills by UPLC. **METHODS** The chromatographic condition was as follows: Waters Acquity BEH C₁₈ column(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), using acetonitrile-0.1% H₃PO₄ as mobile phase, with a flow rate of 0.4 mL·min⁻¹, the detective wavelength was set at 236 nm and the column temperature was 40 °C. Paeonol was used as the reference substance. **RESULTS** The analysis time was 12 min. There were 12 common peaks in the fingerprints, 6 peaks were identified and the similarity of the fingerprint was compared. **CONCLUSION** The method is simple, feasible, and can be used for qulity control of Zhibai Dihuang pills.

KEY WORDS: Zhibai Dihuang pills; fingerprint; UPLC; similarity

知柏地黄丸源于明代著名医学家张景岳所著《景岳全书》, 原名为滋阴八味丸, 到清代董西园编著《医级》卷十二中更名为知柏地黄丸^[1], 由滋补肾阴经典名方“六味地黄丸”加知母、黄柏制成。方中熟地黄占处方比例的 27.6%, 益精填髓, 为君药; 山茱萸、山药助熟地黄滋肾补阴; 知母清虚热、滋肾阴; 黄柏泻虚火、坚真阴; 诸药合为臣药。茯苓健脾渗湿, 泽泻利水清热, 丹皮清热凉血, 三药合用共为佐药。诸药配合, 具有滋阴降火之功效^[2]。用于阴虚火旺, 潮热盗汗, 口干咽痛, 耳鸣遗精, 小便短赤^[3]。药理学研究表明, 知柏地黄丸在内分泌系统疾病、生殖系统疾病、泌尿系统疾病、儿科疾病、妇科疾病方面亦有较好疗效^[1]。知柏地黄丸成分复杂, 生产厂家众多, 法定检验标准仅测定了马钱苷和丹皮酚含量, 不足以全面评价其质量。中药指纹图谱是运用现代分析技术对中药化学信息以图形的方式进行表征并加以描述, 是一种综合分析多种成分的有效手

段^[4-7]。近年来, UPLC 广泛应用于中药分析领域^[8-17], 本研究 UPLC 与中药指纹图谱技术结合, 简便有效地为知柏地黄丸的质量控制提供科学依据。

1 仪器与试剂

Acquity UPLC 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司, 二元泵, 自动进样器, 柱温箱, 二极管阵列检测器); AE240、AE163 电子天平(瑞士 Mettler 公司)。

甲醇、乙腈(色谱纯, 德国 Merck 公司), 其他试剂为分析纯; 超纯水(美国 Millipore 公司)。莫诺昔(批号: 111998-201501, 含量以 96.8%计)、芒果昔(批号: 111607-201503, 含量以 98.4%计)、马钱昔(批号: 111640-201606, 含量以 98.3%计)、芍药昔(批号: 110736-201539, 含量以 96.4%计)、盐酸小檗碱(批号: 110713-201212, 含量以 86.7%计)、丹皮酚(批号: 110708-201407, 含量以 99.9%计)均为中国食品药品检定研究院提供。熟地黄、山茱萸、知母、黄柏、牡丹皮对照药材(批号分别为

作者简介: 王常顺, 硕士, 药师 Tel: 13473763144 E-mail: shunzi20080508@126.com

*通信作者: 冯丽, 女, 主任药师 Tel:

(0311)85210960 E-mail: Jianyan882@163.com

121196-201105, 121495-200702, 121070-201105, 121510-201105, 121490-201102, 中国食品药品检定研究院)。23 批样品来源于全国 8 个生产企业(规格: 大蜜丸, 每丸重 9 g), 详见表 1。

表 1 23 批知柏地黄丸样品信息

Tab. 1 Information of 23 batches of Zhibai Dihuang Pills

编号	生产企业	批号
S1	A	15010215
S2	A	15013373
S3	B	1603055
S4	C	150401
S5	A	15011127
S6	D	160401
S7	D	150903
S8	D	160402
S9	A	15013373
S10	A	15010215
S11	C	150201
S12	A	15012039
S13	E	16021006
S14	F	20160501
S15	A	15011127
S16	G	11160119
S17	B	1603058
S18	B	151220
S19	A	15012037
S20	H	5460066
S21	C	160301
S22	C	150301
S23	E	15051019

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Waters Acquity BEH C₁₈(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 以乙腈为流动相 A, 0.1%磷酸为流动相 B, 梯度洗脱: 0~4 min, 7%A; 4~8 min, 7%→13%A; 8~12 min, 13%→65%A; 检测波长: 236 nm; 流速: 0.4 mL·min⁻¹, 进样量: 1 μL。

2.2 对照品和对照药材溶液制备

精密称取对照品适量, 加 50%甲醇制成每 1 mL 含莫诺苷 12.44 μg、芒果苷 12.53 μg、马钱苷 22.02 μg、芍药苷 13.36 μg、盐酸小檗碱 29.35 μg、丹皮酚 23.98 μg 的混合溶液, 即得混合对照品溶液。再取熟地黄、山茱萸、黄柏、牡丹皮对照药材各 0.5 g, 精密加入 50%甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 加热回流 1 h, 放冷, 再称定质量, 用 50%甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得对照药材溶液。

2.3 供试品溶液制备

取质量差异项下的大蜜丸, 剪碎, 混匀, 取约 0.5 g, 精密称定。置具塞锥形瓶中, 精密加入 50%甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 加热回流 1 h, 放冷, 再称定质量, 用 50%甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 仪器精密度试验 取同一供试品溶液, 连续进样 6 次, 测得其各共有峰的相对保留时间 RSD 均<1.2%, 表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取同一批样品(批号: 150301), 分别精密称取 0.5, 1.0, 1.5 g 各 3 份, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 测得其各共有峰的相对保留时间 RSD 均<0.9%, 表明重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一供试品溶液, 按“2.1”项下方法分别在 0, 1, 3, 5, 7, 20, 24 h 进样测定, 测得其各共有峰的相对保留时间 RSD<1.3%, 表明样品在 24 h 内保持稳定。

2.5 样品测定

取 23 批大蜜丸样品, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 记录色谱图, 并标定出 12 个共有峰, 以峰 12 为参照峰, 各共有峰的相对保留时间分别为 0.12, 0.24, 0.27, 0.31, 0.57, 0.62, 0.65, 0.69, 0.73, 0.94, 0.97, 1.00。结果见图 1。

2.6 对照指纹图谱的建立与色谱峰指认

取不同生产企业的样品, 按“2.1”项下方法分别进样测定, 将不同企业合格样品色谱图导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版), 生成对照指纹图谱, 经与对照药材溶液图谱比对, 指纹图谱中峰 1 归属为熟地黄, 峰 3、5、6 归属为知母, 峰 2、4、7 归属为山茱萸, 峰 8、10 归属为黄柏, 峰 9、11、12 归属为牡丹皮。经与对照品溶液图谱比对, 峰 4、5、7、9、10、12 分别为莫诺苷、芒果苷、马钱苷、芍药苷、盐酸小檗碱、丹皮酚。结果见图 2。

2.7 指纹图谱分析

2.7.1 相似度考察 以“2.6”项下生成的对照指纹图谱为参照, 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版), 多点校正, 全峰匹配, 分别计算 23 批样品的相似度, 结果 23 批样品的相似度分别为 0.936, 0.962, 0.979, 0.986, 0.986, 0.981, 0.948,

0.968, 0.964, 0.964, 0.895, 0.965, 0.900, 0.979, 0.986, 0.897, 0.981, 0.965, 0.962, 0.953, 0.992, 0.976, 0.979。以样品编号为 X 轴, 相似度结果为 Y 轴, 绘制散点图, 结果见图 3。由图 3 可见, 样

品 S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S9, S10, S12, S14, S15, S17, S18, S19, S20, S21, S22, S23 的相似度均>0.93, 样品 S11, S13, S16 的相似度均<0.93。

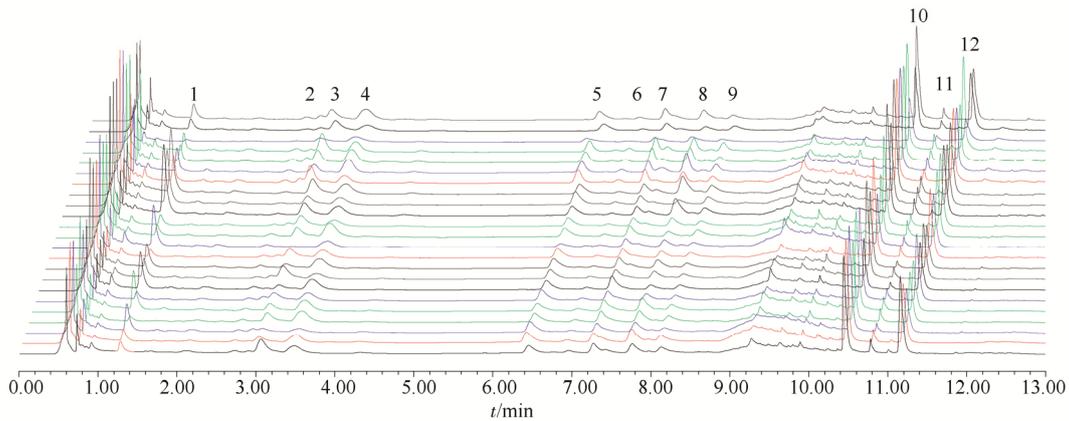


图 1 23 批知柏地黄丸 UPLC 指纹图谱

4-莫诺昔; 5-芒果昔; 7-马钱昔; 9-芍药昔; 10-盐酸小檗碱; 12-丹皮酚; 1~3, 6, 8, 11-共有峰。

Fig. 1 UPLC fingerprint overlap of 23 batches of Zhibai Dihuang pills

4-morroniside; 5-mangiferin; 7-loganin; 9-peoniflorin; 10-berberine; 12-paeonol; 1-3, 6, 8, 11-common peaks.

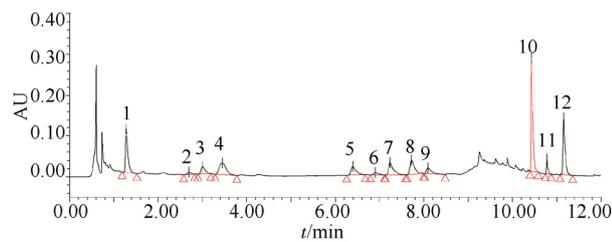


图 2 知柏地黄丸对照指纹图谱

4-莫诺昔; 5-芒果昔; 7-马钱昔; 9-芍药昔; 10-盐酸小檗碱; 12-丹皮酚; 1~3, 6, 8, 11-共有峰。

Fig. 2 Referential fingerprint chromatogram of Zhibai Dihuang pills

4-morroniside; 5-mangiferin; 7-loganin; 9-peoniflorin; 10-berberine; 12-paeonol; 1-3, 6, 8, 11-common peaks.

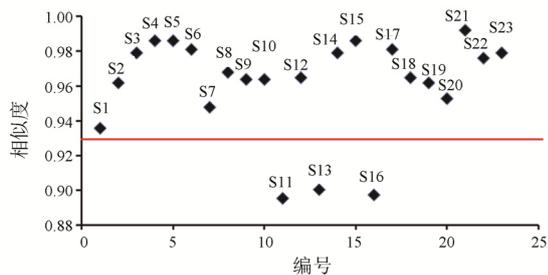


图 3 23 批样品相似度散点图

Fig. 3 Scatter plot of similarity analysis in 23 batches sample

2.7.2 聚类分析 以峰 12 为参照峰, 计算其他共有峰的相对峰面积, 将相对峰面积数据导入 SPSS 19.0, 对 23 批样品进行聚类分析, 聚类方法采用 Ward 法, 度量标准采用平方 Euclidean 距离, 结果

见图 4。23 批样品被分为 2 类, S6, S7, S8, S21, S22 聚为一类, 其余样品聚为一类。

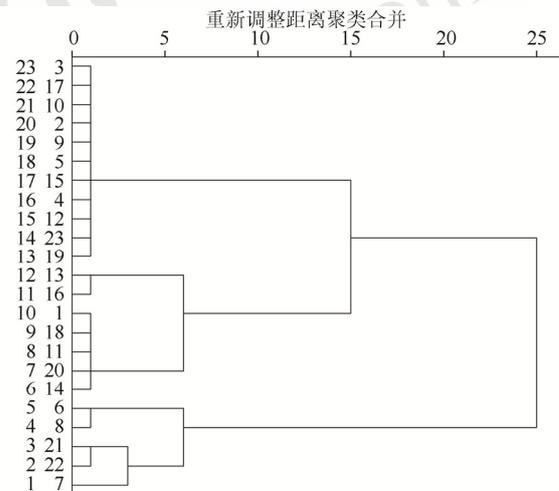


图 4 23 批样品树状聚类分析

Fig. 4 Result of clustering analysis

2.7.3 主成分分析 将共有峰相对峰面积数据导入 SPSS 19.0, 进行主成分分析, 结果提取了一个主成分, 以编号为 X 轴, 样品得分为 Y 轴, 绘制散点图, 见图 5。由图 5 可见, 样品 S6, S7, S8, S21, S22 聚为一类, 其余样品聚为一类, 与“2.7.2”聚类分析考察结果一致。样品 S6, S7, S8 为同一生产企业样品, S21, S22 为同一企业样品, 表明这 2 个企业样品与其他企业样品有较大差异。

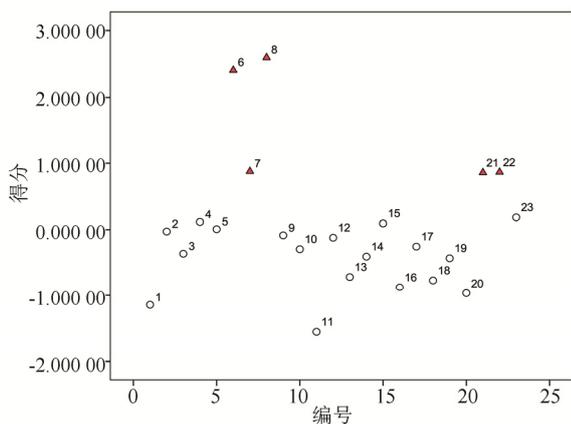


图5 23批样品主成分分析

Fig. 5 Result of principal component analysis in 23 batches sample

2.8 6成分含量测定

对23批样品进行了莫诺昔、芒果昔、马钱昔、芍药昔、盐酸小檗碱、丹皮酚6成分含量测定，测定结果见表2。

表2 样品中6种成分含量

编号	莫诺昔	芒果昔	马钱昔	芍药昔	盐酸小檗碱	丹皮酚
S1	0.79	0.32	0.68	0.83	1.02	1.25
S2	0.54	0.41	0.55	0.73	0.77	1.07
S3	0.75	0.31	0.63	0.76	0.98	1.24
S4	0.84	0.29	0.72	0.43	0.82	0.77
S5	0.76	0.28	0.7	0.44	0.87	0.86
S6	0.59	0.24	0.69	0.43	0.72	0.99
S7	0.88	0.29	0.71	0.66	0.80	0.90
S8	1.04	0.28	0.61	0.68	0.57	1.12
S9	0.82	0.33	0.67	0.67	1.25	0.88
S10	0.80	0.29	0.64	0.65	0.84	0.86
S11	0.38	0.23	0.50	0.51	0.74	1.07
S12	0.64	0.05	0.75	0.74	0.83	1.33
S13	0.45	0.29	0.59	0.44	0.87	1.00
S14	0.74	0.34	0.74	0.52	0.87	0.77
S15	0.53	0.26	0.63	0.58	0.81	1.31
S16	0.77	0.29	0.76	0.46	0.47	0.85
S17	0.43	0.27	0.54	0.52	0.86	1.27
S18	0.53	0.29	0.55	0.52	0.85	1.19
S19	0.37	0.29	0.55	0.43	0.81	0.97
S20	0.51	0.33	0.57	0.51	0.88	1.15
S21	0.50	0.11	0.59	0.44	0.57	0.93
S22	0.26	0.35	0.53	0.38	0.92	0.77
S23	0.57	0.34	0.64	0.64	0.89	1.03

3 讨论

3.1 供试品溶液制备的考察

考察了回流1h直接进样和回流后过中性氧化铝柱2种制备方法，结果过柱后特征峰减少，有效成分含量测定结果降低，故选择回流后直接进样。

3.2 色谱条件的选择

在200~400nm进行全波长扫描，结果在236nm处色谱峰大小适中，分离较好，所以选择其作为测定波长。试验时考察了乙腈-水，乙腈-0.1%磷酸水，乙腈-0.2%磷酸水系统，考察了0.3, 0.4 mL·min⁻¹等不同的流速，35℃和40℃等柱温条件，尝试了不同的流动相梯度洗脱，结果乙腈-0.1%磷酸水，0.4 mL·min⁻¹，40℃柱温下各色谱峰分离良好。考察了3根同型号Waters Acquity BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)，各共有峰相对保留时间变化差异较小。

3.3 相似度评价

相似度<0.93的S11样品，1号峰(归属为熟地黄)峰高和峰面积明显低于其他样品，S13样品3号、5号(归属为知母)峰较小，S16样品10号峰(归属为黄柏)明显低于其他样品，经测定，10号峰盐酸小檗碱含量低于理论值，因此将0.93作为相似度评价的阈值，可有效对样品质量优劣进行评价。

3.4 聚类分析

聚类分析与主成分分析结果一致，但与相似度评价结果不同，因为相似度评价采用的是较好的10批合格样品生产的对照指纹图谱为参比，评价结果反映的是样品与对照的一致程度，而统计分析是通过统计学手段去发现所有样品的规律。

3.5 6成分含量测定

多数产品含量测定结果高于拟定限度，尤其是药典中有量化控制指标的山茱萸、牡丹皮，其莫诺昔、马钱昔、丹皮酚、芍药昔含量均较高，而知母、黄柏等未控制含量的处方药味，其主要活性成分芒果昔和盐酸小檗碱的测定均发现低于拟定限度样品，可能与知母、黄柏药材产地、采收期等原因有关。同一生产企业样品批间差异不大，不同生产企业样品差异亦在合理范围。

综上所述，本实验建立的知柏地黄丸UPLC指纹图谱研究方法高效准确、专属性强，为快速评价其质量提供了依据。

REFERENCES

- [1] WANG T T. The clinical application progression of Zhibaidihuang Pills [J]. Tradit Chin Med Res(中医研究), 2014, 27(10): 74-80.
- [2] 中国药典. 一部[S]. 临床用药须知, 中药成方制剂, 2010: 557.
- [3] 中国药典. 一部[S]. 2015: 1067-1068.

- [4] ZHU M, CHEN B L, SHI S M. Application of fingerprint technology on traditional chinese medicine in Chinese Pharmacopoeia(2015 Edition) Volume I [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2016, 33(5): 611-614.
- [5] LIU W, JIANG S Y. Progress in research and application of fingerprint [J]. China Pharm(中国药房), 2011, 22(19): 1819-1822.
- [6] WANG Q X, WANG C, LIU R X, et al. Component difference between traditional decoction and formula granules decoction of traditional Chinese medicine berberine[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2016, 25(12): 1378-1384.
- [7] GAO X B, SUN L, QIAO S Y, et al. HPLC fingerprint of Liuweidihuang concentrated Pills [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2012, 37(22): 3411-3415.
- [8] LIU G X, LI H, ZHANG J. Rapid evaluation on quality control of Ginkgo Leaves extract and preparations by UPLC fingerprint [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2017, 23(1): 64-68.
- [9] LIU Y, ZHOU J L, LI P. Applications of fast and ultra performance liquid chromatography in the analysis of Chinese herbal medicines [J]. Chin J Chrom(色谱), 2009, 27(5): 682-689.
- [10] SHI X, YANG Y, ZHANG X M, et al. Identification of metabolites of wilforine *in vivo* in mice by UPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2015, 35(24): 2175-2178.
- [11] ZHAO G X, LIU M, LI L C, et al. Simultaneous determination of 7 components in *Salviae miltiorrhizae* Radix et Rhizoma by UPLC-MS/MS [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2017, 23(1): 60-63.
- [12] TANG Y, YAN S M, WANG J J, et al. Quality evaluation of American ginseng using UPLC coupled with multivariate analysis[J].China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2016, 41(9): 1678-1684.
- [13] HOU X F, SUN S, WANG G, et al. Simultaneous determination of 8 main compounds in Eclipta Herba by UPLC [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2016, 41(21): 3982-3987.
- [14] ZHAO X L, DI L Q, CUI X B, et al. Content determination of chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, hesperidin, and linarin in Jinning oral liquid by UPLC [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med(南京中医药大学学报), 2011, 27(6): 570-572.
- [15] ZHANG H, AN R, XU R C, et al. UPLC rapid determination for six flavonoids of Gegenqinlian decoction in rat everted gut sacs [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2012, 32(1): 15-19.
- [16] ZHAO H Z, WANG J, JIANG M, et al. UPLC fingerprint and qualitative analysis study on Salvia total phenolic acids [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2012, 32(4): 620-622.
- [17] LUO J, FAN X H, CUI S J, et al. UPLC fingerprint of Anemarrhenae Rhizoma and its hierarchical cluster analysis [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2013, 30(1): 28-31.

收稿日期: 2017-02-27
 (本文责编: 李艳芳)