

基于标准汤剂的酒女贞子配方颗粒 HPLC 指纹图谱研究

施之琪¹, 孟鹤^{2,3}, 陈桂生², 朱旭祥^{4*} (1.常州轻工职业技术学院, 江苏 常州 213164; 2.广州市香雪制药股份有限公司, 广州 510663; 3.广东省天然药物标准物质分离企业重点实验室, 广州 510663; 4.无锡市中医医院, 江苏 无锡 214071)

摘要: 目的 建立酒女贞子配方颗粒的 HPLC 指纹图谱, 并对其与饮片、标准汤剂、中间体的相关性进行评价。方法 采用 Agilent ZORBAX Eclipse C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 以甲醇-水作为流动相, 梯度洗脱; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长为 224 nm; 柱温为 30 ℃; 进样体积为 10 μL。结果 酒女贞子饮片、标准汤剂、中间体及配方颗粒指纹图谱均呈现 5 个共有特征峰, 呈良好的相关性, 在 5 个共有峰中辨认出山特女贞苷、齐墩果酸、熊果酸 3 个成分。酒女贞子饮片、标准汤剂、中间体、配方颗粒的主要化学成分组成基本相同。结论 该 HPLC 指纹图谱方法可用于酒女贞子配方颗粒的生产全过程的质量控制。

关键词: 酒女贞子; 指纹图谱; 相关性; 配方颗粒; 标准汤剂

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2019)15-1882-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.15.006

引用本文: 施之琪, 孟鹤, 陈桂生, 等. 基于标准汤剂的酒女贞子配方颗粒 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(15): 1882-1886.

HPLC Fingerprint Analysis of Wine-fried Ligustri Lucidi Fructus Formula Granules Based on Standard Decoction

SHI Zhiqi¹, MENG He^{2,3}, CHEN Guisheng², ZHU Xuxiang^{4*} (1.Changzhou Institute of Light Industry Technology, Changzhou 213164, China; 2.Guangzhou Xiangxue Pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou 510663, China; 3.Key Laboratory of Standard Material in Natural Medicine of Guangdong Province, Guangzhou 510663, China; 4.Wuxi TCM Hospital, Wuxi 214071, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the method of HPLC fingerprint on wine-fried Ligustri Lucidi Fructus formula granules compared with pieces, standard decoction and intermediates. **METHODS** The chromatographic separation was carried out on an Agilent ZORBAX Eclipse C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) by using with methanol-water as mobile phases which were eluted with gradient. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was 30 ℃ and the detection wavelength was set at 224 nm. The injection volume was 10 μL. **RESULTS** There were five common characteristic peaks which presented a good correlation in all fingerprint spectrum of pieces, standard decoction, intermediates and formula granules of wine-fried Ligustri Lucidi Fructus. In the five common characteristic peaks, three of them were distinguished as specnuezhenide, oleanolic acid, ursolic acid, respectively. The main chemical constituents of wine-fried Ligustri Lucidi Fructus pieces, standard decoction, intermediates and formula granules were basically identical. **CONCLUSION** The HPLC fingerprint method can be used for the total quality control of wine-fried Ligustri Lucidi Fructus formula granules.

KEYWORDS: wine-fried Ligustri Lucidi Fructus; fingerprint; correlation; formula granules; standard decoction

酒女贞子为木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的干燥成熟果实经酒蒸制后的炮制品, 呈黑褐色, 多数附有白色粉霜, 具有滋补肝肾、明目乌发的功效^[1]。现代药理研究表明, 酒女贞子具有抗炎、抗菌、抗氧化等作用^[2-3]。酒女贞子道地和大宗产地有湖北、浙江、福建、江苏等^[2-3], 化学成分主要是环烯醚萜苷类、三萜类、黄酮类等^[2-3]。酒女贞子配方颗粒是以酒女贞子饮片投料, 经提取、浓缩、干燥、制粒而成, 已经失去了饮片的外观形态。

如果仅用特女贞苷的含量限度作为质量控制指标, 较难全面地判断酒女贞子配方颗粒的真伪与优劣。2016 年国家药典委员会发布了《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》(征求意见稿), 该技术要求提出将标准汤剂作为中药配方颗粒是否与临床汤剂基本一致的标准参照物, 并指出中药材、饮片、中间体、配方颗粒特征或指纹图谱应具相关性。目前关于女贞子(或酒女贞子)的 HPLC 指纹图谱研究较多, 但都是单一研究药材、提取物、配方颗粒的指纹图谱^[4-6], 没有就酒

基金项目: 广东省科技计划项目(2015B030301005); 常州市科技计划项目(CJ20189003); 常州轻工职业技术学院博士基金项目(BS201813101001)

作者简介: 施之琪, 男, 博士, 副主任中药师 Tel: 13760795679 E-mail: shi_mars@foxmail.com *通信作者: 朱旭祥, 男, 主任中药师 Tel: (0510)82724874 E-mail: TCM6048@yahoo.com

女贞子饮片、标准汤剂、中间体、配方颗粒 HPLC 指纹图谱相关性做进一步研究, 因此本研究利用 HPLC 建立了酒女贞子饮片、标准汤剂、中间体、配方颗粒指纹图谱, 对其相关性进行评价, 为酒女贞子配方颗粒制备全过程的质量控制提供实验依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent); MS204S 万分之一分析天平、XP205 十万分之一天平(瑞士梅特勒-托利多); JJ5000A 型电子天平(常熟市双杰测试仪器厂); KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); LGJ-12 低温冷冻干燥仪(北京松源华兴科技发展有限公司); SB-1100 旋转蒸发仪、A-1000S 真空泵均来自东京理化。

1.2 对照品

特女贞苷(批号: 111926-201605; 纯度: 93.3%)、齐墩果酸(批号: 110709-201607; 纯度: 91.1%)、熊果酸(批号: 110742-201622; 纯度: 94.7%)均购自中国食品药品检定研究院; 乙腈、甲醇为色谱纯; 水为屈臣氏纯净水、蒸馏水; 其他试剂均为分析纯。

1.3 药材

15 批酒女贞子饮片来源江西、湖北、湖南, 经广州中医药大学王洛临主任中药师和南京中医药大学附属无锡市中医院朱旭祥主任中药师鉴定, 均为木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的干燥成熟果实经酒蒸制后的炮制品, 呈黑褐色。由常州轻工职业技术学院实验室根据《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》(征求意见稿)制备酒女贞子的标准汤剂, 并制定酒女贞子标准汤剂的质量标准, 根据标准汤剂的标准, 优化酒女贞子的配方颗粒制备工艺, 制成同批号的 3 批中试中间体和配方颗粒样品。

2 方法与结果

2.1 酒女贞子饮片、标准汤剂、中间体、配方颗粒中特女贞苷含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-水(40:60)为流动相, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温为 30 °C, 检测波长为 224 nm, 进样量为 10 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备 取在 60 °C 减压干燥

4 h 的特女贞苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成 30 μg·mL⁻¹ 的特女贞苷对照品溶液, 备用。

2.1.3 供试品溶液的制备 酒女贞子饮片供试品溶液的制备同中国药典 2015 年版酒女贞子饮片项下方法^[1]。酒女贞子标准汤剂、中间体、配方颗粒供试品的制备: 取各样品粉末约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 取出, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

2.1.4 样品含量的测定 酒女贞子饮片中特女贞苷含量>0.70%, 符合中国药典 2015 年版要求, 结果见表 1。根据《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》(征求意见稿)的要求, 笔者前期研究了酒女贞子标准汤剂的质量标准, 确定出酒女贞子标准汤剂中浸膏得率范围为 15.1%~28.9%, 特女贞苷转移率范围为 38.59%~71.29%。该要求还指出中间体出膏率、含量、上下限范围以及指纹图谱等各项指标的合理性评价应当以标准汤剂为标准参照物。

从表 1 数据可见, 15 批酒女贞子标准汤剂中特女贞苷的平均含量为 4.721%, 研究制备的中间体和配方颗粒中特女贞苷的含量都在标准汤剂含量均值的±30%(3.304%~6.137%)范围内, 说明酒女贞子配方颗粒制备工艺合理。另外, 酒女贞子配方颗粒在制备时由于加了辅料, 故特女贞苷含量较中间体的稍偏低。

2.2 酒女贞子饮片、标准汤剂、中间体、配方颗粒 HPLC 指纹图谱的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-水为流动相, 梯度洗脱(0~65 min, 5%→70%甲醇)。流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温为 30 °C, 检测波长为 224 nm, 进样量为 10 μL。

2.2.2 混合对照品溶液的制备 精密称取特女贞苷、齐墩果酸、熊果酸各对照品适量, 加甲醇制成浓度分别为 0.512, 0.086, 0.118 mg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取酒女贞子饮片粉末、标准汤剂粉末、中间体粉末、配方颗粒粉末各约 0.25 g, 精密称定, 置 100 mL 锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声(功

率 100 W, 频率 40 kHz)处理 30 min, 放冷, 用 50% 甲醇补足缺失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

表 1 酒女贞子饮片、标准汤剂、中试中间体和配方颗粒中的特女贞苷含量

Tab. 1 Contents of specnuezhenide in pieces, standard decoction, intermediates and formula granules of wine-fried Ligustri Lucidi Fructus

编号	产地	特女贞苷含量/%			
		饮片	标准汤剂	中间体	配方颗粒
1	江苏南通	3.579	7.012	—	—
2	江苏南通	2.486	4.101	—	—
3	江苏南通	2.774	4.100	—	—
4	浙江临安	1.522	3.574	—	—
5	浙江临安	1.658	3.371	—	—
6	浙江临安	2.250	2.882	—	—
7	浙江金华	0.917	1.350	—	—
8	浙江金华	2.612	5.175	—	—
9	浙江金华	1.418	3.327	—	—
10	福建南平	2.341	4.606	—	—
11	福建南平	3.052	6.357	—	—
12	福建南平	2.202	6.604	—	—
13	湖北随州	2.117	6.408	5.779	4.278
14	湖北随州	2.834	6.335	5.994	5.195
15	湖北随州	2.108	5.620	5.542	4.933
平均数		2.258	4.721	5.772	4.802

2.3 方法学考察

2.3.1 稳定性试验 取同一批次酒女贞子标准汤剂样品, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 h 进样, 结果各共有峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 均 $<3\%$, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.3.2 仪器精密度试验 取同一批次酒女贞子标准汤剂样品, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下条件连续进样 6 次, 结果各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。

2.3.3 重复性试验 取同一批次酒女贞子标准汤剂样品 6 份, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下条件测定, 结果各共有峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 均 $<3\%$, 表明重复性良好。

2.3.4 中间精密度 分别考察了不同分析人员、不同日期、不同设备对精密度的影响, 以 3 号峰特女贞苷峰为参照, 对各图谱共有峰的相对保留时间进行计算, 不同影响因素下各图谱共有峰相对保留时间的 RAD 值在 0~0.04%, 各主要色谱峰的相对保留时间无明显变化, 结果表明该方法精

密度良好, 随机变动因素不影响该方法的精密度。

2.3.5 耐用性试验 取同一批号女贞子标准汤剂样品, 分别使用 Welch Ultimate LP- C_{18} (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm , S.N.611602172)、Hitachi High-Tech LaChrom C_{18} (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm , S.N.27H5I-024)、Agilent ZORBAX Eclipse C_{18} (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm , S.N.USUXA04769)3 种型号的色谱柱, 测定女贞子标准汤剂的指纹图谱, 以 3 号峰特女贞苷峰为参照, 各主要色谱峰的相对保留时间无明显变化(RSD $<3\%$), 结果表明该方法耐用性良好。

2.4 样品的测定

取酒女贞子饮片、标准汤剂、中间体、配方颗粒供试品溶液 10 μL , 混合对照品溶液按“2.2.1”项下条件检测。酒女贞子饮片、标准汤剂、中间体和配方颗粒色谱图见图 1。

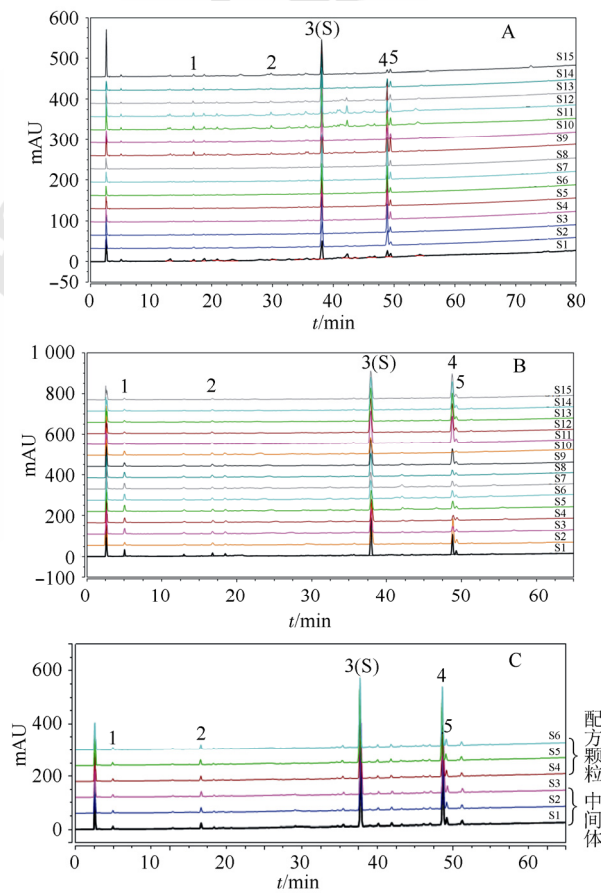


图 1 HPLC 指纹图谱

A-15 批酒女贞子饮片; B-15 批酒女贞子标准汤剂; C-3 批中间体和配方颗粒; 1-2-共有峰; 3(S)-特女贞苷; 4-齐墩果酸; 5-熊果酸。

Fig. 1 HPLC fingerprints

A-15 batches of wine-fried Ligustri Lucidi Fructus pieces; B-15 batches of wine-fried Ligustri Lucidi Fructus standard decoction; C-3 batches of wine-fried Ligustri Lucidi Fructus intermediates and formula granules; 1-2-common characteristic peaks; 3(S)-specnuezhenide; 4-oleanolic acid; 5-ursolic acid.

2.5 共有峰的标定

将酒女贞子饮片和标准汤剂 HPLC 指纹图谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版), 选择时间宽度为 0.1, 中位数法生成对照指纹图谱, 经比较分析后确定酒女贞子饮片和标准汤剂均有 5 个共有峰。同法采集酒女贞子中间体和配方颗粒的指纹图谱, 发现酒女贞子中间体和配方颗粒的 HPLC 指纹图谱与酒女贞子饮片和标准汤剂基本一致, 均有 5 个共有峰。与特女贞苷、齐墩果酸、熊果酸对照品色谱图进行对比, 确认配方颗粒 HPLC 指纹图谱中 3 号峰为特女贞苷, 4 号峰为齐墩果酸, 5 号峰为熊果酸, 图谱见图 2。

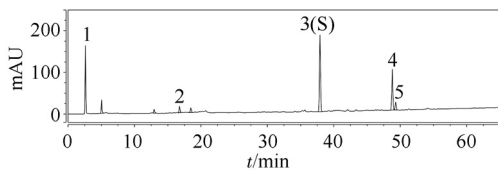


图 2 酒女贞子配方颗粒对照指纹图谱

3(S)-特女贞苷; 4-齐墩果酸; 5-熊果酸。

Fig. 2 Reference characteristic chromatograms of wine-fried Ligustri Lucidi Fructus formula granules

3(S)-specnuezhenide; 4-oleanolic acid; 5-ursolic acid.

2.6 相关性分析

酒女贞子饮片、标准汤剂、中间体、配方颗粒 HPLC 对照指纹图谱比较结果见图 3, 并采用相似度评价软件评价四者图谱的相似度, 结果见表 2。结果表明酒女贞子配方颗粒的 5 个共有特征峰在标准汤剂、饮片、中间体中均有显示, 对照指纹图谱相似度>0.99, 说明酒女贞子配方颗粒与酒女贞子饮片、中间体和标准汤剂的成分基本一致, 四者指纹图谱具有良好的相关性, 为采用 HPLC 指纹图谱对酒女贞子配方颗粒生产全过程进行控制提供实验依据。

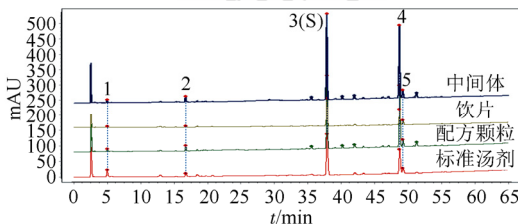


图 3 酒女贞子饮片、标准汤剂、中间体和配方颗粒对照指纹图谱叠加图

1~2-共有峰; 3(S)-特女贞苷; 4-齐墩果酸; 5-熊果酸。

Fig. 3 Comparison on HPLC fingerprints of pieces, standard decoction, intermediates and formula granules of wine-fried Ligustri Lucidi Fructus

1-2-common characteristic peaks; 3(S)-specnuezhenide; 4-oleanolic acid; 5-ursolic acid.

表 2 酒女贞子饮片、标准汤剂、中间体和配方颗粒相似度结果

Tab. 2 Similarity of reference fingerprints of pieces, standard decoction, intermediates and formula granules of wine-fried Ligustri Lucidi Fructus

	标准汤剂 对照图谱	配方颗粒 对照图谱	中间体 对照图谱	饮片 对照图谱
标准汤剂对照图谱	1.000	0.993	0.991	0.995
配方颗粒对照图谱	0.993	1.000	1.000	0.991
中间体对照图谱	0.991	1.000	1.000	0.991
饮片共有模式对照图谱	0.995	0.991	0.991	1.000

3 讨论

本实验基于传统煎药工艺, 采用现代实验室方法制备酒女贞子饮片标准汤剂, 采用中试生产设备制备中间体和配方颗粒, 并对其进行质量标准研究。本研究所用酒女贞子饮片有江苏、浙江、福建、湖北 4 个产地, 涵盖了女贞子的道地和大宗产区, 特女贞苷含量经检测均符合中国药典 2015 年版要求, 在产地和质量上具有一定的代表性。本研究通过 15 批酒女贞子饮片和相应标准汤剂的考察, 再选择了源自大宗产区湖北随州的 3 批酒女贞子样品进行了配方颗粒中试研究试验。

本研究综合考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸水、甲醇-0.1%磷酸水几种流动相系统, 结果以甲醇-水系统分离效果比较好, 在该条件下, 各色谱峰分离度良好, 保留时间适中。样品检测时采用 DAD 检测器对酒女贞子配方颗粒供试品溶液进行了紫外 190~400 nm 扫描, 发现在 224 nm 下色谱峰数较多且各峰之间的分离度较好, 所以选择 224 nm 作为吸收波长。酒女贞子样品均为水提, 通过超声就能保证主要成分的溶出完全, 所以供试品制备方法选择超声提取。所用溶剂分别考察了 30%, 50%, 70%, 100% 甲醇和 35%, 70% 乙醇, 结果用 50% 甲醇作为提取溶剂时, 各峰分离良好, 峰形较好, 且特女贞苷的提取效率最高。

中药临床多用汤剂, 汤剂也是我国医药史上应用最早、最广泛的剂型, 随着中药剂型现代化的发展, 又增加了配方颗粒剂、中药破壁饮片等剂型^[7]。不同剂型之间存在标准不明确、剂量不统一、质量不均一等问题, 陈士林等^[8]提出采用中药饮片标准汤剂来标化不同用药形式, 以提高临床用药的准确性和疗效的一致性。中药配方颗粒应遵从传统中医药理论, 在融合现代工艺设备基础

上尽可能地保留传统汤剂中的主要成分。本研究通过对酒女贞子配方颗粒与饮片、中间体、标准汤剂的 HPLC 指纹图谱相关性研究, 阐明了酒女贞子配方颗粒与饮片、中间体、标准汤剂在化学成分上的相关性, 为酒女贞子配方颗粒的全过程质量控制提供了研究基础。

本实验采用 HPLC 建立了酒女贞子配方颗粒的指纹图谱, 克服了单一成分信息量不全的缺点, 可以更加全面可靠地控制酒女贞子配方颗粒的质量, 为酒女贞子配方颗粒的质量标准和临床用药提供科学的数据和多角度的研究思路。方法学考察中精密性、重复性、稳定性、耐用性和中间精密度的 RSD 值均 $<3\%$, 表明此方法准确、可行、重复性良好, 可用于酒女贞子配方颗粒的质量控制。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2015: 45-46.
- [2] WEI X Y, WANG G J, WANG H Y, et al. Research progress on the pharmacological activities of Fructus Ligustri Lucidi [J]. SH J Tradit Chin Med(上海中医药杂志), 2017, 51(8):

106-109.

- [3] LIU T T, WANG M. Research progress of chemical composition and pharmacological effects of Fructus Ligustri Lucidi [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2014, 20 (14): 228-235.
- [4] HUO Y J, YUE L, LIU Y, et al. Effect of processing with wine on content of main chemical components in Ligustri Lucidi Fructus decoction pieces [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2018, 24 (1): 26-31.
- [5] XU J, YOU F X, YUAN X H, et al. HPLC fingerprint and multi-component content determination of Ligustri lucidi Fructus [J]. Chin Tradit Herb Drug(中草药), 2017, 48(20): 4198-4203.
- [6] WU X H, SUN Z, YANG E L, et al. HPLC fingerprint of wine-fried Ligustri Lucidi Fructus and content determination of multi-components [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2016, 36(2): 273-277.
- [7] HOU J, MO C L, CHEN G, et al. Study on the HPLC fingerprint chromatogram of Cimicifugae Rhizoma and Cimicifuga Species Root Formula granules [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2018, 35(2): 252-255.
- [8] CHENG S L, LIU A, LI Q, et al. Research strategies in standard decoction of medicinal slices [J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2016, 41(8): 1367-1375.

收稿日期: 2018-10-18

(本文责编: 蔡珊珊)