

玫瑰花标准汤剂及配方颗粒指纹图谱和含量测定研究

韩慧琴, 徐 鹏, 贺丽霞, 尹贻珍

(张家口市食品药品检验中心, 河北 张家口 075000)

摘要:目的:建立玫瑰花标准汤剂 HPLC 指纹图谱及含量测定方法,并对市售配方颗粒进行测定,为玫瑰花配方颗粒的质量控制提供参考依据。方法:采用同一 HPLC 建立玫瑰花标准汤剂指纹图谱及槲皮素与山柰素的含量测定方法,以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以甲醇-0.4%磷酸溶液(45:55)为流动相;检测波长设为 360 nm,柱温设为 30 ℃,流速为 1.0 mL·min⁻¹。色谱数据采用国家药典委员会中药色谱指纹图谱相似度评价分析系统,生成标准指纹图谱。结果:槲皮素进样量在 0.2489~24.8939 μg·mL⁻¹ 呈良好的线性关系($r = 0.9999$),山柰素进样量在 0.2135~21.3538 μg·mL⁻¹ 呈良好的线性关系($r = 0.9999$),15 批样品有 5 个共有峰,相似度在 0.978~0.997 之间,且与市售配方颗粒一致,通过与对照品比对指出其中 2 个色谱峰。结论:建立的玫瑰花标准汤剂 HPLC 指纹图谱及含量测定方法,其特征性及专属性强,重现性好,可作为玫瑰花标准汤剂及配方颗粒的质量控制方法。

关键词:玫瑰花;标准汤剂;配方颗粒;HPLC;含量测定;指纹图谱

中图分类号:R177

文献标识码:B

文章编号:2095-512X(2022)01-0011-04

中药配方颗粒是通过现代制药技术,以中药饮片为原料,经提取、过滤、干燥、制粒等系列过程制备而成的颗粒剂,其有效成分、性味、归经、主治、功效和传统中药饮片完全一致,保持了传统中药饮片的全部特征,既能保证中医传统的“君、臣、佐、使”和辨证论治、灵活加减的特点,优于中成药,又免去了传统煎煮的麻烦,同时还可灵活地以单味颗粒冲服,卫生有效^[1-4]。中药配方颗粒在国内的应用时间还比较短,仍需大力推广^[5]。主要因为我们起步比较晚,大量的基础工作需要从头开始。从质量标准来看,目前检验项目还不是很全面,特别是安全性方面还有待提高。玫瑰花为蔷薇科植物玫瑰(*Rosa rugosa* Thunb)的干燥花蕾,具有行气解郁、和血、止痛的功效^[6,7],为常用药材。玫瑰花配方颗粒目前无统一的国家标准,关于特征图谱的研究有一篇报道^[8],但其以没食子酸为参照物。本实验参考有关文献^[9-11]以槲皮素为参照建立了指纹图谱和槲皮素与山柰素的含量测定方法。可为玫瑰花配方颗粒的质量评价和真伪鉴别提供依据。

1 仪器与试剂

岛津 LC-20AT-PDA 型高效液相色谱仪(日本岛津公司);Waters e2695-2998-PDA 型高效液相色谱

仪(美国沃特世公司);“药典委中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723 版本)”;SPSS-19.0 统计软件;CPA225D 型电子天平(德国赛多利斯,精度:0.01 mg);C9860A 型超声波清洗器(CBL Photo-electron technology);槲皮素标准品(批号:100081-201610)与山柰素标准品(批号:110861-202013)均购于中国食品药品检定研究院;甲醇及磷酸为色谱纯;水为超纯水。15 批饮片分别购自甘肃(3 批)、广东(3 批)、福建(3 批)、浙江(3 批)和山东(3 批)5 个省区,自制标准汤剂,批号分别为 TJ01-TJ15。收集玫瑰花配方颗粒 2 个厂家共 3 批样品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱均为 C18(5 μm, 250 mm × 4.6 mm I.D.), 分别采用 YMC-Pack、Waters Symmetry、Agilent、Inertsil 和 BOS HYPERSIL5 个生产厂家的色谱柱。流动相:甲醇-0.4%磷酸溶液(45:55)(见表 1)。

表 1 检测条件

检测波长(nm)	分析时间(min)	柱温(℃)	流速(mL·min ⁻¹)	进样量(μL)	理论板数
360	40	30	1.0	20	应不低于 2500

收稿日期:2021-11-30;修回日期:2021-12-10

基金项目:河北省市场监督管理局重点科研项目(2021ZD33)

作者简介:韩慧琴(1980-),女,张家口市食品药品检验中心副主任中药师。

2.2 标准汤剂及溶液制备

2.2.1 标准汤剂的制备 取15批次玫瑰花药材各200 g,分别加水2400 mL,浸泡30 min,煎煮20 min,过滤,取滤渣加水2000 mL,煎煮15 min,用100目筛过滤,合并滤液,于50 °C减压浓缩,低温干燥,得干浸膏,15批次平均出膏96.4 g,平均出膏率为48.2%。

2.2.2 对照品溶液 取槲皮素12.44 mg与山柰素10.67 mg,加甲醇制成每1 mL含槲皮素248.8 μg、山柰素213.4 μg的混合溶液。

2.2.3 供试品溶液 取标准汤剂或供试品,研细(过四号筛),取约0.4 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇50 mL,称定重量,超声处理(功率250 W,频率50 kHz)30 min放冷过滤,分别精密量取滤液5 mL,加入70%甲醇5 mL、25%盐酸溶液5 mL,加热回流1 h放冷,定容至25 mL量瓶中摇匀,滤过,取续滤液即得。

2.3 含量测定方法学考察

2.3.1 专属性实验 取对照品溶液、供试品溶液各20 μL注入液相色谱仪,结果槲皮素、山柰素与其他组分的分离度均>1.5,且峰型好(见图1)。

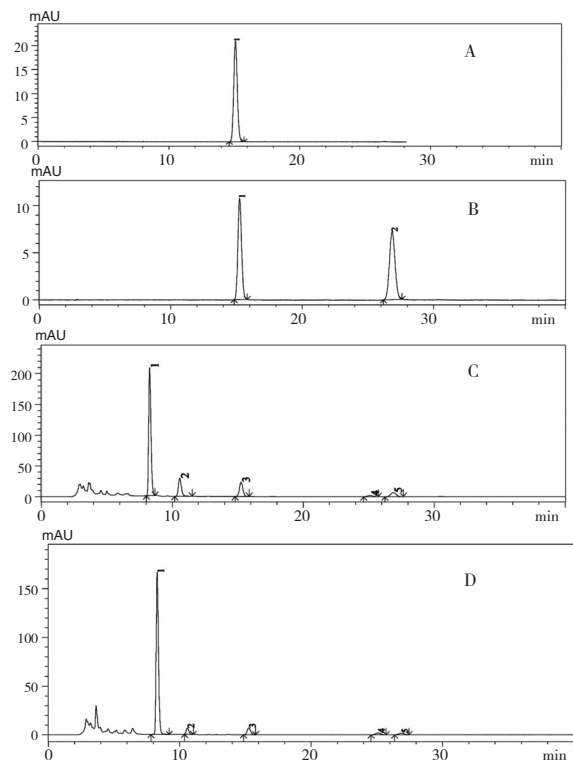


图1 HPLC 色谱图 (A)槲皮素 (B)槲皮素和山柰素混合对照品 (C)标准汤剂 (D)市售样品 3.槲皮素峰;5.山柰素峰

2.3.2 线性关系考察 精密量取“2.2.2”项下混合对照品溶液,用移液枪分别精密量取2、5、10、50、100 μL,分别加甲醇定容至1.0 mL,配制成系列浓度的标准

溶液。分别取20 μL注入液相色谱仪,以浓度C(μg·mL⁻¹)为横坐标、以峰面积A为纵坐标绘制标准曲线,槲皮素与山柰素的回归方程分别为A=75273C-95427(r=0.9999),A=72283C-24833(r=0.9999),槲皮素与山柰素的线性范围分别为0.4976~24.88 μg·mL⁻¹和0.4268~21.34 μg·mL⁻¹。

2.3.3 准确度实验 分别精密称取玫瑰花标准汤剂(批号:TJ01)9份,每份约0.6 g,分别加入一定量的槲皮素与山柰素对照品,按“2.2.3”项下的方法制成供试品溶液。按上述检测方法测定,计算回收率。结果表明,各指标成分回收率RSD值均<3.0%,实验数据见表2、表3。

表2 槲皮素回收率实验结果(n=9)

序号	取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得总量(mg)	回收率(%)	平均(%)	RSD(%)
1	0.20523	1.3524	0.6589	2.0126	100.2		
2	0.20419	1.3455	0.6589	2.0007	99.4		
3	0.20310	1.3383	0.6589	1.9995	100.3		
4	0.20118	1.3257	1.3179	2.6446	100.1		
5	0.20145	1.3275	1.3179	2.6356	100.0	99.6	0.5
6	0.20121	1.3259	1.3179	2.6450	100.1		
7	0.20520	1.3522	1.9768	3.3412	100.6		
8	0.20114	1.3254	1.9768	3.3015	100.0		
9	0.20136	1.3269	1.9768	3.2893	99.6		

表3 山柰素回收率实验结果(n=9)

序号	取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得总量(mg)	回收率(%)	平均(%)	RSD(%)
1	0.20523	0.4046	0.1971	0.6006	99.5		
2	0.20419	0.4025	0.1971	0.6006	99.0		
3	0.20310	0.4004	0.1971	0.5884	99.0		
4	0.20118	0.3966	0.3942	0.7927	100.5		
5	0.20145	0.3971	0.3942	0.7933	100.5	99.36	1.6
6	0.20121	0.3966	0.3942	0.7918	100.2		
7	0.20520	0.4045	0.5913	0.9978	100.3		
8	0.20114	0.3965	0.5913	0.9858	99.7		
9	0.20036	0.3950	0.5913	0.9812	99.1		

2.3.4 精密度实验 取“2.2.3”项下的同一供试品溶液(批号:TJ01),连续进样6次,进行测定。槲皮素与山柰素峰面积的RSD分别为0.5%和0.4%,均<2.0%。

2.3.5 重复性实验 取同一批玫瑰花标准汤剂(批号:TJ01),照“2.2.3”项下的方法制备6份供试品溶

液进行分析。结果槲皮素和山柰素含量的RSD分别为0.2%和0.3%,均<2.0%。

2.3.6 稳定性实验 取同一批供试品溶液(批号:TJ01),分别于0、1、2、3、6、12、18、24、48 h进样9次,结果槲皮素含有量的RSD为0.6%,山柰素含量的RSD为0.2%,均<2.0%。

2.3.7 耐用性实验 采用2个厂家的高效液相色谱仪、5个厂家的色谱柱按拟定的方法测定,结果槲皮素含有量的RSD为1.2%,山柰素含量的RSD为1.4%,均<2.0%。

2.3.8 样品的测定 取15批玫瑰花标准汤剂及2个厂家的玫瑰花配方颗粒3批,按前述“2.2.3”项下的方法操作,制成供试品溶液,按上述检测方法测定,计算样品的含量,结果见表4。15批玫瑰花标准汤剂槲皮素含量为4.76~6.84 mg·g⁻¹,山柰素含量为1.56~2.13 mg·g⁻¹。

表4 样品测定结果(n=2)

产地	批号	含量(mg·g ⁻¹)		产地	批号	含量(mg·g ⁻¹)	
		槲皮素	山柰素			槲皮素	山柰素
甘肃	TJ01	6.59	1.97	福建	TJ09	5.66	1.95
甘肃	TJ02	6.84	1.84	浙江	TJ10	5.13	1.64
甘肃	TJ03	6.76	1.96	浙江	TJ11	5.86	1.87
广东	TJ04	4.80	1.64	浙江	TJ12	5.54	1.56
广东	TJ05	4.98	1.64	山东	TJ13	6.01	1.66
广东	TJ06	4.76	1.67	山东	TJ14	6.12	1.76
福建	TJ07	5.65	2.01	山东	TJ15	6.32	1.62
福建	TJ08	5.76	2.13	A厂家	2009 0801	5.90	1.65
A厂家	2009 0231	5.87	1.87	B厂家	2009 0783	5.78	2.01

2.4 指纹图谱的建立及相似度评价

分别精密吸取不同批次(TJ01-TJ15)的玫瑰花标准汤剂供试品溶液、玫瑰花配方颗粒3批样品供试品溶液、槲皮素与山柰素的混合对照品溶液各20 μL,注入液相色谱仪,按“2.1”的色谱条件测定,记录色谱图(见图1)。将15批样品的实验数据导入“药典委中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012.130723版本),采用中位数法对不同样品的指纹图谱进行峰点校正,数据匹配分析,生成对照指纹图谱(见图2、图3),指定5个共有峰为特征峰,并用对照品图谱进行定位,确定3号峰为槲皮素,5号峰为山柰素。以3号峰(槲皮素)为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积(结果见表5、表6)。15批玫瑰花标准汤剂与对照指纹图谱的

相似度分别为0.978、0.993、0.997、0.995、0.996、0.992、0.993、0.997、0.996、0.979、0.987、0.997、0.993、0.978、0.997。相似度评价表明,15批标准汤剂指纹图谱和对照品指纹图谱的相似度良好;3批玫瑰花配方颗粒与对照指纹图谱的相似度分别为0.993、0.997和0.987。

表5 15批玫瑰花标准汤剂共有峰的相对保留时间

批号	相对保留时间(relative retention time)				
	1	2	3	4	5
TJ01	0.544	0.692	1.000	1.643	1.756
TJ02	0.542	0.694	1.000	1.640	1.755
TJ03	0.543	0.693	1.000	1.646	1.761
TJ04	0.543	0.696	1.000	1.642	1.760
TJ05	0.542	0.693	1.000	1.644	1.762
TJ06	0.542	0.693	1.000	1.646	1.762
TJ07	0.542	0.693	1.000	1.645	1.761
TJ08	0.543	0.693	1.000	1.644	1.761
TJ09	0.543	0.694	1.000	1.644	1.761
TJ10	0.542	0.692	1.000	1.643	1.761
TJ11	0.542	0.692	1.000	1.642	1.763
TJ12	0.544	0.693	1.000	1.643	1.762
TJ13	0.543	0.694	1.000	1.643	1.763
TJ14	0.543	0.694	1.000	1.642	1.762
TJ15	0.542	0.692	1.000	1.643	1.762
RSD/%	0.13	0.16	0	0.10	0.13

表6 15批玫瑰花标准汤剂共有峰的相对峰面积

批号	相对峰面积(relative peak area)				
	1	2	3	4	5
TJ01	3.84	0.91	1.000	0.24	0.51
TJ02	4.01	1.10	1.000	0.32	0.52
TJ03	3.98	0.92	1.000	0.43	0.51
TJ04	5.80	1.11	1.000	0.11	0.54
TJ05	5.67	1.23	1.000	0.12	0.53
TJ06	5.91	1.32	1.000	0.12	0.56
TJ07	10.02	0.87	1.000	0.16	0.55
TJ08	9.98	0.79	1.000	0.15	0.55
TJ09	9.76	0.89	1.000	0.14	0.54
TJ10	7.16	1.21	1.000	0.23	0.53
TJ11	7.23	1.20	1.000	0.25	0.54
TJ12	7.14	1.19	1.000	0.25	0.53
TJ13	6.45	1.23	1.000	0.29	0.52
TJ14	6.65	1.24	1.000	0.26	0.52
TJ15	6.35	1.22	1.000	0.26	0.51

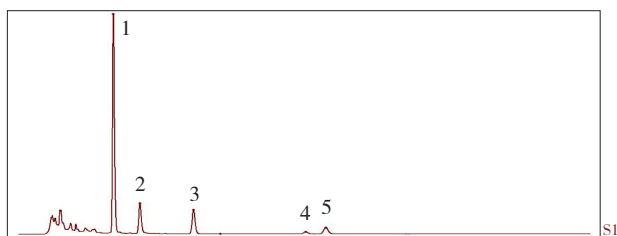


图2 15批玫瑰花标准汤剂对照指纹图谱

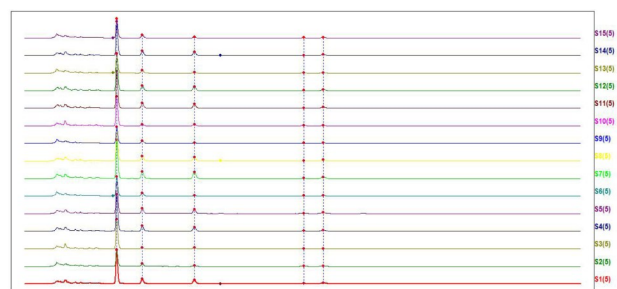


图3 15批玫瑰花标准汤剂指纹叠加图谱

2.5 指纹图谱方法学考查

2.5.1 精密度实验 取供试品溶液(批号:TJ01),连续测定6次,以3号峰(槲皮素)为参照峰计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD,结果5个共有峰的相对保留时间RSD与相对峰面积RSD均 $< 2.0\%$ 。

2.5.2 重复性实验 照“2.3”项下的方法制备供试品溶液6份进行分析。结果5个共有峰的相对保留时间与相对峰面积RSD均 $< 2.0\%$ 。

2.5.3 稳定性试验 取供试品溶液(批号:TJ01),照“2.1”项下色谱条件,分别于0、1、2、3、6、12、18、24、48 h进样9次,以3号槲皮素峰为参照峰,计算5个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD,结果均 $< 2.0\%$ 。

3 讨论

3.1 实验过程中考察了甲醇、乙醇、70%甲醇、70%乙醇4种提取溶剂的提取效率,比较了酸水解前后各成分的含量差异;考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.4%磷酸等流动相系统,考察了高效液相色谱仪和超高效液相色谱仪的检测效果,最终确定了文中的方法,该条件下色谱峰信息丰富、分离度好、稳定性高,可以作为控制玫瑰花配方颗粒的方法。

3.2 对比相似度较小样品与其他样品的指纹图谱,

发现其共有峰相对保留时间比较一致,主要差异表现在色谱峰的面积上,即含量的差异。这表明不同产地样品的质量有一定差异,同一产地样品质量无明显差异。

3.3 采用建立的含量测定方法和指纹图谱方法对市售2个厂家3批次样品进行检测,含量测定结果与标准汤剂一致,指纹图谱的相似度也与标准图谱一致,说明市售样品的质量较好。

3.4 从含量测定结果可知,相同产地槲皮素和山柰素的含量基本一致,不同产地的含量略有差别,可能与气候、土壤和生长环境有关。

3.5 本实验通过指纹图谱相似度评价对不同产地的玫瑰花标准汤剂的指纹图谱进行了定性、定量评价,并对市售样品进行测定,并评价其质量。研究结果表明,本方法具有良好的专属性和准确性,可作为玫瑰花配方颗粒的定性定量分析方法。

3.6 用建立的方法对市售2个厂家3批次样品进行测定,结果表明,不同厂家的样品指纹图谱比较一致,相似度都在0.98以上,但峰面积仍存在着差异,说明各厂家的生产工艺和药材来源可能不尽相同。

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,2020:209
- [2]徐玉玲,雷燕,莉曾立,等.中药配方颗粒品种统一标准的有关问题探讨[J].中草药,2020;51(20):5389-5394
- [3]董一蕾,许啸,张旭,等.HPLC测定北京妙峰山玫瑰花中芦丁的含量[J].中国现代中药,2017;19(10):1403-1405
- [4]唐亚楠,纪蕾.不同新技术应用于中药配方颗粒[J].中国处方药,2020;18(02):22-24
- [5]中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求(征求意见稿)[S].2016
- [6]吕朝耕,康传志,周良云,等.中药配方颗粒标准化研究现状与思路探讨[J].中国现代中药,2017;19(6):748-752
- [7]张强.中药配方颗粒的应用现状及前景[J].中国民康医学,2020;32(15):1-2+5
- [8]胡飞凤,吴美兰,孟祥瑞.基于标准汤剂的玫瑰花配方颗粒质量标准研究[J].浙江中医杂志,2020;55(11):844-845
- [9]吕露阳,张吉仲,张志锋,等.木香川木香药材UPLC特征指纹图谱建立及鉴别研究[J].中国中药杂志,2014;39(14):2699-2703
- [10]李力,张振秋,王冰,等.木香药材HPLC指纹图谱的研究[J].中成药,2011;33(06):925-928
- [11]江洁怡,胥爱丽,毕晓黎,等.白头翁配方颗粒的HPLC指纹图谱研究[J].中国实验方剂学,2013;19(15):85-88