文章编号:2095-7386(2020)02-0016-06
DOI:10.3969/j.issn.2095-7386.2020.02.004

兽用黄连解毒方剂UPLC指纹特征及三种成分含量测定

尹荣华,熊春红,叶 纯,邱银生
(武汉轻工大学 动物科学与营养工程学院,湖北 武汉 430023)

摘 要:建立兽用黄连解毒方剂UPLC指纹图谱及黄芩苷、小檗碱和栀子苷3种成分含量测定方法。采用UPLC-PDA法研究不同工艺下黄连解毒方剂指纹图谱,发现共有峰30个并指认了13个峰。用UPLC法对方剂中黄芩苷、小檗碱和栀子苷含量进行测定,结果显示黄芩苷(5.00—799.45 μg/mL)、小檗碱(5.64—360.67 μg/mL)和栀子苷(5.00—320.13 μg/mL)线性良好,精密度、稳定性、重复性和加样回收率试验均符合要求,并检验了3种工艺的黄连解毒方剂样品。本研究为兽用黄连解毒方剂的质量控制研究提供了参考依据。

关键词:黄连解毒方剂;指纹图谱;含量测定;UPLC
中图分类号:R 931.5 **文献标识码**:A

Study on fingerprints and quantitation of three components of Huanglianjiedu formula for veterinary use based on UPLC

YIN Rong-hua, XIONG Chun-hong, YE Chun, QIU Yin-sheng
(School of Animal Science and Nutritional Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: To establish the fingerprints and quantitation of three components of Huanglianjiedu formula (HLJDF) for veterinary use based on UPLC. UPLC-PDA was used to build the fingerprints of different process of HLJDF, 30 common peaks were found and 13 peaks were identified. Three main active ingredients in HLJDF (baicalin, berberine and geniposide) were quantified by UPLC. The linear relationship of baicalin (5.00 – 799.45 μg/mL), berberine (5.64 – 360.67 μg/mL), and geniposide (5.00 – 320.13 μg/mL) were good. Precision, stability, repeatability and recovery meet the requirements. At the same time, the content of these three components of different processes of HLJDF samples were detected. The study can be used for the quality control of HLJDF for veterinary use.

Key words: Huanglianjiedu formula; fingerprints; quantitation; UPLC

1 引言

黄连解毒方剂是经典的清热解毒复方,主治三焦湿热、疮黄肿毒[1]。该方剂中活性成分众多,药理作用广泛,主要为清热解毒,常用于动物疾病防治,可促进动物生长[2]。目前《中华人民共和国兽药典》中仅通过薄层色谱方法对其进行鉴别,缺少活性成分的定量分析方法,不利于黄连解毒方剂标准化、规范化的生产和产品的质量控制[3]。由于兽用黄连解毒方剂中的药材组成及比例(药材组成:

收稿日期:2020-04-01.
作者简介:尹荣华(1995-)男,硕士研究生,E-mail:yrh19950509@163.com.
通信作者:邱银生(1964-)男,教授,博士,E-mail:qiuyinsheng6405@aliyun.com.
基金项目:湖北省教育厅科研计划项目(Q20181805).

黄连、黄芩、黄柏、栀子,比例:2∶ 4∶ 4∶ 3)不同于人用黄连解毒方剂(药材组成:黄连、黄柏、黄芩、栀子;比例:3∶ 2∶ 2∶ 3),成分之间的相对含量变化会导致色谱行为的差异[4],所以,研究通用性好且适用于不同工艺兽用黄连解毒方剂的质量控制方法十分必要。研究表明,利用高效液相色谱法(High performance liquid chromatography,HPLC)进行黄连解毒方剂的主要成分含量测定耗时太长,通常需要 1 h 以上,而液质方法成本较高且过程复杂,通用性不强[4-6]。目前,超高效液相色谱法(Ultra performance liquid chromatography,UPLC)具有分析速度快、精密度高等优势,已广泛应用于中药复方的多成分分析中[7]。因此,本文采用 UPLC 法建立黄连解毒方剂不同工艺样品的指纹图谱并对其中的主要活性成分:黄芩苷、小檗碱和栀子苷进行定量分析,为该复方的质量控制研究提供了依据。

2　仪器与材料

2.1　仪器

Waters ACQUITY UPLC H-Class 系统(在线脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱、PDA 检测器、Empower3 色谱工作站);XFB-400 高速中药粉碎机(吉首市中诚制药机械厂);标准筛:20 目、40 目、60 目、80 目、100 目、200 目、300 目、400 目、500 目(绍兴市上虞张兴纱筛厂);KQ5200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Milli-Q Integral Water Purification System(美国 Millipore 公司)。

2.2　材料

黄芩苷(含量 93.5%,批号:110715—201619)、盐酸小檗碱(含量 86.8%,批号:110713—201613)、栀子苷(含量 97.6%,批号:110749—201718)、盐酸巴马汀(含量 86.8%,批号:110732—201611)、黄芩素(含量 98.5%,批号:111595—201607)、盐酸黄连碱(含量 95.1%,批号:112026—201601)、绿原酸(含量 99.3%,批号:110753—201716)、汉黄芩苷(含量 98.5%,批号:112002—201702)、盐酸药根碱(含量 89.5%,批号:110733—201609)、野黄芩苷(含量 91.7%,批号:110842—201709)均购自中国食品药品检定研究院;木兰花碱(含量≥98%,Lot:170913)、汉黄芩素(含量≥98%,Lot:161221)、表小檗碱(含量≥98%,Lot:161221)均购自南京森贝伽生物科技有限公司。黄连解毒超微粉 500 目(C500)和 300 目(C300)购于福建中农牧生物药业有限公司;鸡爪黄连药材(产地:四川)购于湖北晨翼畜牧科技有限公司;黄柏枝皮药材(产地:四川)购于湖北晨翼畜牧科技有限公司;栀子饮片(产地:江西)购于湖北晨翼畜牧科技有限公司;黄芩饮片(产地:甘肃)购于安徽石田中药饮片有限公司)。甲醇、乙腈、三乙胺(HPLC 级,赛默飞,美国);甲酸(LC/MS 级,赛默飞,美国);超纯水由 Milli-Q Integral Water Purification System(美国 Millipore 公司)制备。

3　方法

3.1　样品的制备

黄连解毒自制微粉(S100、S200、S300、S400 和 S500):将单味药材分别粉碎,将标准筛从上至下按 80 目、100 目、200 目、300 目、400 目、500 目的顺序组成套筛,依次过筛,分别收集各层粉末。除栀子只能过 100 目外,其余三味药材均能过筛。按黄连∶黄柏∶ 黄芩∶ 栀子,2∶ 4∶ 4∶ 3 的比例分别精确称取 100 目、200 目、300 目、400 目、500 目三味药材药粉与 100 目栀子药粉混匀,制成 100 目(S100)、200 目(S200)、300 目(S300)、400 目(S400)及 500 目(S500)黄连解毒散。

黄连解毒 60% 乙醇样品(CT):将药材分为两组,黄连、黄柏一组;黄芩、栀子一组,分别提取。黄连、黄柏组精确称取黄连 15 g,黄柏 30 g,于 1000 mL 圆底烧瓶,加入料液比 12 倍 60% 乙醇(即 540 mL),加热回流 2 h,200 目滤布过滤,取滤液用旋蒸仪浓缩至大约 100 mL,转移至蒸发皿,60 ℃蒸至不可流动,放烘箱 60 ℃烘至基本干燥再放真空干燥箱 60 ℃过夜。黄芩、栀子组精确称取黄芩 30 g,栀子 22.5 g,于 1000 mL 圆底烧瓶,加入料液比 6 倍 60% 乙醇(即 315 mL),加热回流 2 h,提取 2 次,合并 2 次滤液,200 目滤布过滤,取滤液用旋蒸仪浓缩至大约 100 mL,转移至蒸发皿,60 ℃蒸至不可流动,60 ℃真空干燥。收集样品,放干燥器备用。

黄连解毒水提取样品(ST):精确称取黄连 7.5 g,黄柏 15 g,黄芩 15 g,栀子 11.25 g,加入料液比 10 倍水(即 487.5 mL),加热回流 2 h,提取 2 次,合并 2 次滤液,200 目滤布过滤,取滤液用旋蒸仪浓缩至大约 100 mL,转移至蒸发皿,60 ℃蒸至不可流动,放烘箱 60 ℃烘至基本干燥再放真空干燥箱 60 ℃过夜。收集样品,放干燥器备用。

3.2　对照品溶液的制备

指纹图谱用对照品溶液:分别称取“2.2”项下适量各对照品,纯甲醇超声溶解,即得单一对照品溶

液。精密量取各对照品溶液 1 mL 混合均匀即得混合对照品溶液。分别用 0.22 μm 有机滤膜过滤,取续滤液于进样瓶,备用。

含量测定所用对照品溶液:分别精密称取栀子苷对照品 16.4 mg、黄芩苷对照品 41.9 mg 和小檗碱对照品 20.8 mg 于同一 50 mL 容量瓶中,加甲醇超声溶解,冷却至室温,定容,配得栀子苷、黄芩苷和小檗碱的混合对照品母液。

3.3 供试品溶液的制备

分别称取各规格自制微粉和超微粉适量于 50 mL容量瓶加 70% 甲醇超声 30 min 冷却至室温,定容。2000 rpm 离心 5 min,0.22 μm 有机滤膜过滤,取续滤液,即得。

水提样品粉碎机粉碎,称取细粉适量于 50 mL 容量瓶,加 70% 甲醇超声溶解,冷却至室温加 70% 甲醇定容,0.22 μm 有机滤膜过滤,取续滤液,即得。

醇提样品将分煎样品浸膏烘干、混合,然后用粉碎机粉碎,称取细粉适量于 50 mL 容量瓶,加 70% 甲醇超声溶解,冷却至室温加 70% 甲醇定容,0.22 μm有机滤膜过滤,取续滤液,即得。

3.4 色谱条件

色谱柱:ACQUITY UPLC HSS T3(2.1 × 100 mm,1.8 μm);流动相:水(0.25% 甲酸 +0.3% 三乙胺)(A) - 乙腈(0.25% 甲酸 +0.3% 三乙胺)(B),梯度洗脱(0 - 16 min,90% - 68% A;16 - 19 min,68% - 50% A;19 - 21 min,50% A;21 - 25 min,50% - 90% A);流速:0.21 mL/min;柱温:30 ℃;检测波长:260 nm;进样量 1 μL。

3.5 指纹图谱的建立

按“3.4”项的色谱条件,使用二极管阵列检测器(photo diode array,PDA)的 3D 通道,设置波长范围为 200—400 nm,检测自制微粉、水提取、60% 醇提样品以及市售 300 目、500 目超微粉。通过 3D 图比较不同波长下样品峰的响应情况,发现 254 nm 时检测到的峰最多,故导出各样品 254 nm 波长下的色谱图 AIA 文件,导入国家药典委员会开发的中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A 版),选取微粉样品的色谱图为参照图谱,为减小极端数据的影响,选择中位数法作为对照指纹图谱生成方法,时间窗宽度设为 0.1,运用多点校正方法对色谱峰进行全谱峰匹配,生成对照指纹图谱 R。使用软件计算相似度。采集每个工艺样品在对照指纹图谱中的共有峰的紫外吸收光谱,对比光谱图,排除非共有峰,优化指纹图谱。

3.6 方法学考察

3.6.1 线性关系考察

精密量取混合对照品母液并逐级稀释,配制成稀释 2 倍、4 倍、8 倍、16 倍、80 倍、160 倍的混合对照品稀释液。取各级混合对照品溶液适量过滤,取续滤液进样,进样记录 3 种对照品的峰面积。分别以对照品浓度为横坐标,相应峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程。

3.6.2 精密度试验

取稀释 8 倍混合对照品连续进样 6 次,测定峰面积并计算 RSD 值。

3.6.3 重复性试验

取第二批 200 目微粉样品,精密称取 6 份,按照“3.3”项制成供试品溶液,进样检测,记录峰面积,计算 RSD 值。

3.6.4 稳定性考察

取稀释 8 倍混合对照品贮备液于 0 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h 进样。记录色谱图中峰面积并计算 RSD 值。

3.6.5 加样回收率试验

精密称取已知含量的微粉样品 0.125 g 于 50 mL容量瓶中按照微粉中黄芩苷、小檗碱和栀子苷含量的 100% 加入黄芩苷、小檗碱和栀子苷混合对照品溶液,加 70% 甲醇超声 30 min,冷却至室温加甲醇定容。2000 rpm 离心 5 min 中,0.22 μm 有机滤膜过滤,取续滤液于进样瓶配制成微粉供试品。每个平行制备 6 份。记录峰面积,计算回收率。

3.7 不同工艺样品含量测定

按上述方法配制各批次 60% 乙醇提取样品、水提取样品及 500 目自制微粉样品溶液,每个样品平行配制 3 份,进样检测,记录峰面积,并计算结果。结果均以平均值 ± 标准差表示(mean ± SD)。

4 结果与分析

4.1 不同工艺下黄连解毒方剂 UPLC 指纹图谱共有峰的确立及部分色谱峰的确认

取不同工艺黄连解毒方剂,按“3.3”项方法制备供试品溶液,将供试品溶液及对照品溶液在上述色谱条件下进样检测,得各样品的 UPLC 图谱(图 1)。结果显示,黄连解毒汤指纹图谱共有 30 个共有峰,与对照品比对后,确定了其中 13 个峰化学

结构。峰 1 是绿原酸,峰 4 是栀子苷,峰 6 是木兰花碱,峰 8 是野黄芩苷,峰 13 是黄芩苷,峰 15 是表小檗碱,峰 16 是药根碱,峰 17 是黄连碱,峰 23 是汉黄芩苷,峰 24 是巴马汀,峰 25 是小檗碱,峰 26 是黄芩素,峰 27 是汉黄芩素。

4.2　不同工艺黄连解毒方剂 UPLC 指纹图谱相似度评价及共有峰分析

《中华人民共和国药典(2015 版)》中记载的指纹图谱规定指纹图谱的相似度应高于 0.900,本试验自制样品间相似度在 0.990—0.999 之间,相似度高,符合规定。自制样品与市售超微粉间相似度大于 0.838,相似度偏低(表 1)。不同工艺黄连解毒方剂 UPLC 指纹图谱共有峰保留时间 RSD 为 0%—0.78%,说明共有峰保留时间一致。共有峰面积 RSD 为 10.81%—50.05%,说明共有峰之间成分含量差异较大。

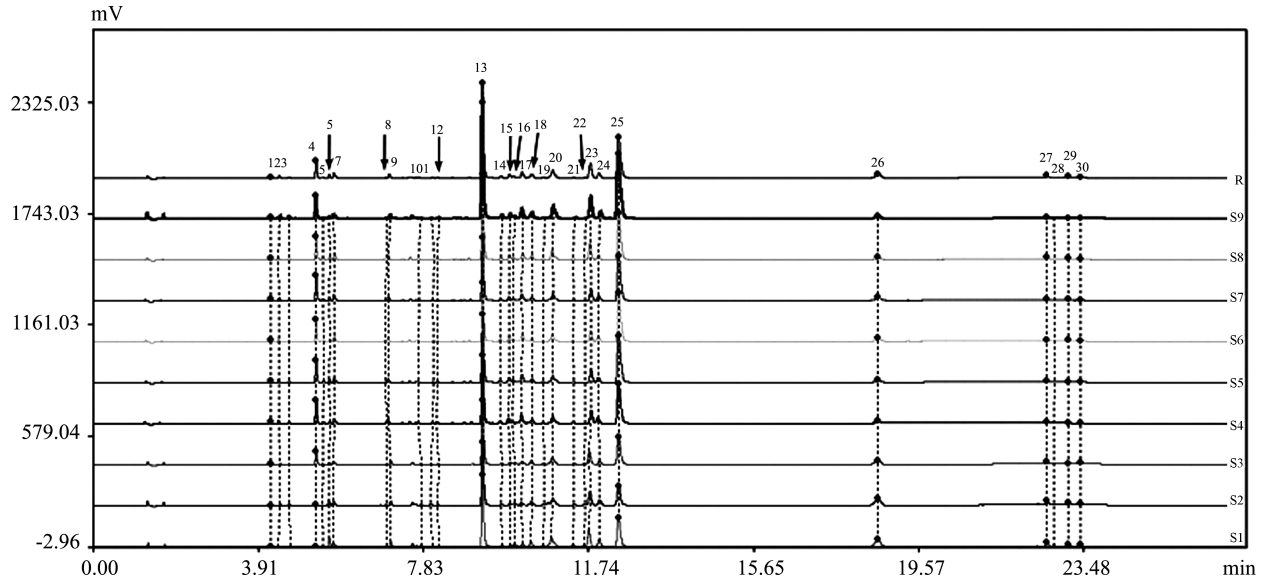

图 1　黄连解毒汤指纹图谱

(注:S1:超微粉 300 目;S2:超微粉 500 目;S3:60% 乙醇提取样品;S4:微粉 100 目;S5:微粉 200 目;S6:微粉 300 目;S7:微粉 400 目;S8:微粉 500 目;S9:水提取样品;R:对照指纹图谱;1:绿原酸;4:栀子苷;6:木兰花碱;8:野黄芩苷;13:黄芩苷;15:表小檗碱;16:药根碱;17:黄连碱;23:汉黄芩苷;24:巴马汀;25:小檗碱;26:黄芩素;27:汉黄芩素)

表 1　色谱指纹图谱相似度

C300	C500	CT	S100	S200	S300	S400	S500	ST	对照图谱
1	0.993	0.985	0.935	0.915	0.884	0.908	0.945	0.959	0.913
0.993	1	0.971	0.904	0.875	0.838	0.871	0.918	0.934	0.874
0.985	0.971	1	0.975	0.956	0.929	0.953	0.98	0.987	0.955
0.935	0.904	0.975	1	0.995	0.982	0.993	0.998	0.993	0.994
0.915	0.875	0.956	0.995	1	0.995	0.999	0.991	0.982	1
0.884	0.838	0.929	0.982	0.995	1	0.995	0.975	0.961	0.996
0.908	0.871	0.953	0.993	0.999	0.995	1	0.99	0.978	0.999
0.945	0.918	0.98	0.998	0.991	0.975	0.99	1	0.996	0.99
0.959	0.934	0.987	0.993	0.982	0.961	0.978	0.996	1	0.98
0.913	0.874	0.955	0.994	1	0.996	0.999	0.99	0.98	1

4.3　方法学考察结果

4.3.1　线性关系结果

结果表明(表 2),黄芩苷在 5.00—799.45 μg/mL(R^2 = 0.9998),小檗碱在 5.64—360.67 μg/mL(R^2 = 1),栀子苷在 5.00—320.13 μg/mL(R^2 = 1)范围内峰面积与浓度均相关,线性关系良好。

表 2 线性关系考察结果

成分	回归方程	线性范围/(μg/mL)	R^2
黄芩苷	Y = 9043.6X + 23685	5.00—799.45	0.9998
小檗碱	Y = 20112X + 10219	5.64—360.67	1
栀子苷	Y = 1860.4X + 1223.7	5.00—320.13	1

4.3.2 精密度试验结果

精密度试验结果显示,栀子苷峰面积 RSD 为 0.19%,黄芩苷峰面积 RSD 为 0.24%,小檗碱峰面积 RSD 为 0.37%,均小于 2%,说明仪器精密度良好。

4.3.3 重复性试验结果

结果表明,重复 6 次测试,栀子苷含量 RSD 为 1.6%,黄芩苷含量 RSD 为 1.29%,小檗碱含量 RSD 为 1.41%,均小于 2%,说明该方法重复性良好。

4.3.4 稳定性试验结果

结果表明,栀子苷在 24 h 内含量 RSD 为 0.84%,黄芩苷在 24 h 内含量 RSD 为 0.46%,小檗碱在 24 h 内含量 RSD 为 1.55%,均小于 2%,说明溶液在 24 h 内性质稳定。

4.3.5 回收率试验结果

结果表明,栀子苷回收率在 92.33%—93.46%,RSD 为 0.70%,黄芩苷回收率在 90.52%—94.09%,RSD 为 1.40%,小檗碱回收率在 96.47%—100.26%,RSD 为 1.68%,符合回收率要求。

4.4 含量测定结果

不同工艺黄连解毒方剂含量测定结果显示(表 3),60% 乙醇提取产品栀子苷含量 22.99—30.06 mg/g,黄芩苷 121.35—133.07 mg/g,小檗碱 37.29—44.48 mg/g;水提取产品栀子苷含量 27.49—31.71 mg/g,黄芩苷 31.65—52.76 mg/g,小檗碱 17.21—24.54 mg/g;500 目自制微粉栀子苷含量 16.26—16.58 mg/g,黄芩苷 45.50—46.72 mg/g,小檗碱 17.59—17.94 mg/g。

表 3 不同工艺样品含量测定结果(mg/g,n = 3)

样品	栀子苷	黄芩苷	小檗碱
CT-1	22.99 ± 0.53	121.35 ± 3.57	37.29 ± 4.49
CT-2	30.06 ± 0.36	128.97 ± 0.37	44.48 ± 0.45
CT-3	26.81 ± 0.36	133.07 ± 0.76	42.99 ± 1.10
ST-1	31.71 ± 1.76	31.65 ± 1.39	17.21 ± 0.24
ST-2	27.49 ± 0.31	52.76 ± 0.23	24.54 ± 0.06
ST-3	30.48 ± 0.4	37.48 ± 0.21	18.75 ± 0.13
S500-1	16.26 ± 0.06	46.72 ± 0.54	17.94 ± 0.11
S500-2	16.48 ± 0.16	46.6 ± 0.88	17.59 ± 0.56
S500-3	16.58 ± 0.49	45.50 ± 1.78	17.92 ± 0.33

5 讨论

本试验使用相同药材制备的不同工艺样品指纹图谱中成分数目差异较小,难以通过特征峰鉴别工艺,控制产品生产质量,但各工艺样品的成分峰面积之间差异较大,可通过主要成分的相对含量来鉴别不同的工艺。自制微粉与市售超微粉图谱相似度小于 0.900,说明药材之间成分差异较大。因此,在后续的研究中需购买不同产地不同批次药材来丰富和优化黄连解毒方剂的指纹图谱,通过建立不同工艺样品标准指纹图谱来控制不同工艺产品的质量。目前,中药指纹图谱结合主要活性成分定量来控制中药质量是中药现代化的发展趋势[8-10]。黄芩苷、小檗碱和栀子苷是黄连解毒方剂中主要的活性成分且含量较高,因此,可通过同时检测该 3 种成分的含量来控制产品质量。方法学考察结果表明:该方法适用于黄连解毒方剂中黄芩苷、小檗碱、栀子苷的含量测定。并应用该方法定量分析了 500 目自制微粉、60% 乙醇提取样品和水提取样品的主要成分含量。本研究为兽用黄连解毒方剂的质量控制研究提供了参考依据。

参考文献:

[1] 麦蕾蕾. 简述黄连解毒汤药理作用研究进展

[J]. 当代医药论丛,2013,11(12):134-135.
[2] 潘耀荣. 中草药在猪场的合理应用[J]. 兽医导刊,2014,(4):48-50.
[3] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典[S]. 北京:中国农业出版社,2015:709.
[4] Dou S, Liu L, Jiang P, et al. LC-DAD and LC-ESI-MS chromatographic fingerprinting and quantitative analysis for evaluation of the quality of Huang-Lian-Jie-Du-Tang[J]. Chromatographia,2009,69(7-8):659-664.
[5] 孙健. 黄连解毒汤各成分的 HPLC-UV/MS 定性与定量测定方法研究[J]. 药学学报,2006,41(4):380-384.
[6] Yang Y, Zhao H, Wang H, et al. Qualitative and quantitative analysis of four different polarity fractions from huanglianjiedu decoction by HPLC-DAD-ESI-MS/MS and their related neuroprotective effects[J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences,2013,22(4):334-341.
[7] Kim S G, Poudel A, Kim Y K, et al. Development of simultaneous analysis for marker constituents in Hwangryunhaedok-tang and its application in commercial herbal formulas[J]. Journal of Natural Medicines,2013,67(2):390-398.
[8] 刘娟,冯芮,蒲忠慧,等. 指纹图谱结合 HPLC 定量分析在中药川芎质量评价中的应用研究[J]. 中药材,2019,(2):353-357.
[9] 林艳,刘月新,李春,等. 生制何首乌 HPLC 指纹图谱结合模式识别与含量测定的质量控制研究[J]. 中国中医药信息杂志,2018,25(12):67-71.
[10] 陈巧华,范世明,许春芳,等. 白芍配方颗粒指纹图谱及 7 种主要成分含量测定研究[J]. 中外医学研究,2017,15(36):1-4.

(上接第 6 页)

[19] 周红,李疆,刘袁,张晓丽,王芳. 不同提取条件对生姜提取物抑菌效果的影响[J]. 四川食品与发酵,2008(02):60-62.
[20] 唐仕荣,宋慧,苗敬芝,施春花. 超声波技术提取姜辣素的工艺研究[J]. 中国调味品,2009,34(01):46-49.
[21] 蒋庭玉,杨亚,孟祥贤,孟凡君,崔红,张雪君. 拐芹当归提取物抗菌活性的研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(08):1878-1879.
[22] 谢丽玲,彭齐,蔡链纯,周亮,朱炎坤,韩光耀. 黄芩醇提物对副溶血性弧菌抑制机制的研究[J]. 生物技术通报,2015,31(08):159-165.