

黔产苗药对坐叶药材 HPLC 指纹图谱研究[△]

冯 华^{1*}, 刘 亮^{2#}, 王祥培³, 刘顺美⁴(1. 遵义市食品药品检验所中药室, 贵州 遵义 563002; 2. 遵义医药高等专科学校药学系, 贵州 遵义 563000; 3. 贵阳中医学院药学院, 贵阳 550002; 4. 遵义市第一人民医院药房, 贵州 遵义 563002)

中图分类号 R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)02-0232-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.02.18

摘 要 目的: 建立黔产苗药对坐叶药材的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱。方法: 采用 HPLC 法。色谱柱为 Agilent Eclipse XDB C₁₈, 流动相为乙腈-0.2% 磷酸溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 235 nm, 柱温为 25 ℃, 进样量为 15 μL。以芦丁为参照, 测定 10 批贵州不同地区对坐叶药材的 HPLC 图谱, 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A 版)进行共有峰指认和相似度评价。结果: 10 批对坐叶药材的 HPLC 指纹图谱有 12 个共有峰, 相似度均大于 0.90。经验证, 10 批样品 HPLC 图谱与对照指纹图谱具有较好的一致性。结论: 本研究所建 HPLC 指纹图谱可为对坐叶药材的鉴别和质量评价提供参考。

关键词 黔产苗药; 对坐叶; 高效液相色谱法; 指纹图谱

Study on HPLC Fingerprint of Miao Medicine *Hedyotis uncinella* from Guizhou

FENG Hua¹, LIU Liang², WANG Xiangpei³, LIU Shunmei⁴(1. TCM Section, Zunyi Institute for Food and Drug Control, Guizhou Zunyi 563002, China; 2. Dept. of Pharmacy, Zunyi Medical and Pharmaceutical College, Guizhou Zunyi 563000, China; 3. School of Pharmacy, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China; 4. Pharmacy of Zunyi First People's Hospital, Guizhou Zunyi 563002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish HPLC fingerprint of Miao medicine *Hedyotis uncinella* from Guizhou. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent Eclipse XDB C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.2% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 235 nm, and column temperature was 25 ℃. The sample size was 15 μL. Using rutin as reference, HPLC chromatograms of 10 batches of *H. uncinella* from different areas of Guizhou province were determined. Similarity Evaluation System for TCM Chromatographic Fingerprints (2004A edition) was used to identify common peaks and evaluate similarity. RESULTS: There were 12 common peaks in HPLC fingerprints of 10 batches of *H. uncinella*, and the similarity was higher than 0.90. After validation, HPLC chromatograms of 10 batches of sample were in agreement with control fingerprints. CONCLUSIONS: Established HPLC fingerprints can provide reference for the identification and quality evaluation of *H. uncinella*.

KEYWORDS Miao medicine from Guizhou; *Hedyotis uncinella*; HPLC; Fingerprint

苗药对坐叶为茜草科植物对坐叶(*Hedyotis uncinella* Hook. et Arn.)的干燥全草, 为贵州苗药。对坐叶味辛、微苦, 性平, 具有清热解毒、调中止泻的功效, 可用于治疗腹泻、腹胀、腹痛、里急后重以及痢疾、急性胃炎。苗药解毒止泻胶囊, 由苗药对坐叶为主药组成中药复方制剂。目前该产品主要在遵义家诚药业生产, 苗药解毒止泻胶囊用于胃肠湿热所致的腹泻、腹胀、腹痛、急性肠炎等症状, 作为地方药材标准被收录于《贵州省中药材、民族药材质量标准》(2003 年版)^[1]。现行标准仅通过性

状、显微、薄层对对坐叶药材进行质量控制。本文对对坐叶药材进行高效液相色谱(HPLC)指纹图谱研究, 并对 10 批不同产地来源对坐叶药材进行了相似度评价比较, 建立 HPLC 指纹图共有模式, 以期对对坐叶药材的质量控制和有效识别提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-1260 型 HPLC 仪, 包括四元泵、二极管阵列检测器、柱温箱、自动进样器、Agilent 1260 工作站(美国 Agilent 公司); AB204-S 型电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司); KQ-500DV 型数控超声波清洗机(功率: 500 W, 频率: 60 kHz, 昆山市超声仪器有限公司); 111 型中药粉碎机(上海海久中药机械制造有限公司)。

1.2 药材、药品与试剂

[△] 基金项目: 贵州省科技计划项目(No. 黔科合 LH 字[2016]7419 号); 遵义市创新人才团队培养项目(No. 遵市科合[2016]7 号)

* 副主任药师, 硕士。研究方向: 药品检验及新药研究。E-mail: fenghua781014@163.com

通信作者: 副教授, 硕士。研究方向: 中药化学。E-mail: 289675130@qq.com

对坐叶药材采集于贵州各地区,经遵义医药高等专科学校刘亮副教授鉴定为茜草科植物对坐叶(*Hedyotis uncinella* Hook.et Arn.)的干燥全草。药材来源及信息见表1。芦丁对照品(批号:100080-200707,纯度:100%,购于中国食品药品检定研究院);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯水。

表1 药材来源及信息

Tab 1 Source and information of medicinal material

编号	产地	采集时间
S1	贵州省黔东南苗族侗族自治州黄平县	2017年7月28日
S2	贵州省铜仁市石阡县	2017年7月15日
S3	贵州省黔南布依族苗族自治州贵定县	2017年7月18日
S4	贵州省安顺市紫云县	2017年7月20日
S5	贵州省黔南布依族苗族自治州贵定县	2017年7月22日
S6	贵州省黔南布依族苗族自治州平塘县	2017年7月25日
S7	贵州省安顺市平坝县	2017年7月26日
S8	贵州省黔南布依族苗族自治州龙里县	2017年7月13日
S9	贵州省安顺市紫云县	2017年7月10日
S10	贵州省黔东南苗族侗族自治州普安县	2017年7月5日

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse XDB C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.2%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~5 min, 5% A→10% A; 5~15 min, 10% A→15% A; 15~25 min, 15% A→20% A; 25~35 min, 20% A→30% A; 35~40 min, 30% A→5% A; 40~45 min, 5% A);流速:1.0 mL/min;柱温:25 ℃;检测波长:235 nm;进样量为15 μL;运行时间:45 min^[2-6]。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取芦丁对照品适量,加甲醇溶解制成每1 mL含0.1 mg的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密称取对坐叶药材粉末(过3号筛)约1.0 g,置于锥形瓶中,加甲醇20 mL,密塞,称定质量,超声处理60 min,取出,放置至室温,再次称定质量,用甲醇补足质量,过滤,取续滤液,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取供试品溶液(编号:S4)适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,以14号峰芦丁为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,各共有峰相对保留时间和相对保留峰面积的RSD分别为1.5%和2.1%(n=6),表明本方法精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取供试品溶液(编号:S4)适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,以14号峰芦丁为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,各共有峰相对保留时间和相对保留峰面积的RSD分别为1.4%和2.0%(n=

6),表明供试品溶液在室温下放置12 h内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 取同一批样品(编号:S4)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,以14号峰芦丁为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,各共有峰相对保留时间和相对保留峰面积的RSD分别为1.7%和2.3%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.4 HPLC 指纹图谱的生成与相似度、共有峰相关数据分析

2.4.1 HPLC 指纹图谱生成 取10批对坐叶药材各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进行测定,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A版)对10批药材样品的HPLC图谱进行分析,得HPLC指纹图谱,详见图1~图3。

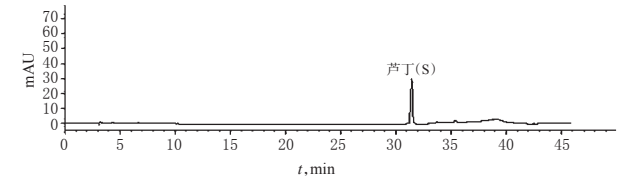


图1 芦丁对照 HPLC 图谱

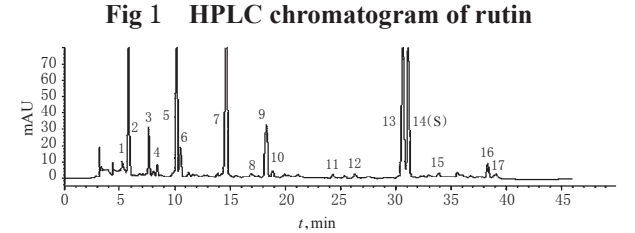
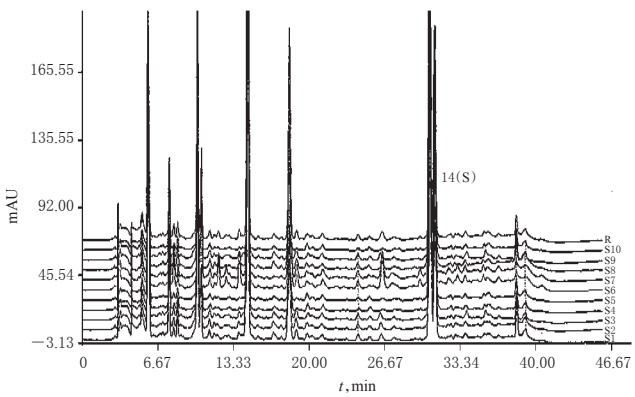


图2 药材 HPLC 对照指纹图谱

Fig 2 HPLC control fingerprint of medicinal material



注:S1~S10 为对坐叶;R 为共有模式

Note: S1-S10 were *H. uncinella*; R was common mode

图3 10批对坐叶药材样品 HPLC 指纹图谱

Fig 3 HPLC fingerprint of 10 batches of *H. uncinella*

2.4.2 相似度分析 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A版)进行相似度评价结果显示,10批对坐叶药材样品的相似度均大于0.90,且与对照指纹图谱具有较好的一致性,表明药材样品间差异较小,质量稳定性良好,详见表2~表4。

表2 10批样品HPLC图谱共有峰相对保留时间
Tab 2 Relative retention time of common peaks in HPLC fingerprints of 10 batches of samples

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	RSD,%
1	0.151	0.150	0.152	0.153	0.152	0.150	0.152	0.150	0.152	0.151	0.152
2	0.280	0.281	0.283	0.282	0.284	0.282	0.283	0.282	0.283	0.281	0.131
3	0.345	0.343	0.342	0.341	0.346	0.343	0.340	0.341	0.342	0.341	0.071
4	0.370	0.371	0.372	0.370	0.372	0.370	0.371	0.372	0.373	0.371	0.111
5	0.410	0.412	0.413	0.411	0.412	0.411	0.413	0.414	0.413	0.410	0.137
6	0.498	0.499	0.497	0.499	0.499	0.498	0.488	0.489	0.497	0.497	0.428
7	0.660	0.661	0.660	0.661	0.662	0.661	0.660	0.662	0.661	0.660	0.707
8	0.768	0.769	0.768	0.767	0.768	0.769	0.767	0.769	0.769	0.767	0.894
9	0.916	0.917	0.918	0.919	0.918	0.916	0.917	0.915	0.918	0.914	0.235
10	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
11	1.266	1.265	1.265	1.264	1.266	1.265	1.267	1.266	1.265	1.264	0.654
12	1.332	1.331	1.332	1.333	1.332	1.331	1.332	1.333	1.332	1.331	0.957

表3 10批样品HPLC图谱共有峰相对保留峰面积
Tab 3 Relative peak area of common peaks in HPLC fingerprints of 10 batches of samples

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	RSD,%
1	0.115	0.150	0.153	0.151	0.154	0.156	0.155	0.154	0.152	0.153	0.262
2	0.941	0.942	0.944	0.946	0.947	0.945	0.943	0.942	0.944	0.946	0.222
3	0.276	0.274	0.277	0.275	0.276	0.274	0.275	0.274	0.275	0.276	0.212
4	0.964	0.966	0.965	0.966	0.967	0.968	0.965	0.963	0.965	0.964	0.577
5	0.187	0.185	0.183	0.184	0.188	0.182	0.184	0.185	0.186	0.184	0.153
6	2.410	2.412	2.415	2.416	2.412	2.413	2.415	2.416	2.417	2.414	0.134
7	0.501	0.503	0.504	0.505	0.501	0.503	0.504	0.505	0.504	0.502	0.126
8	0.521	0.522	0.524	0.523	0.525	0.521	0.524	0.523	0.522	0.526	0.154
9	1.612	1.611	1.613	1.614	1.612	1.615	1.614	1.613	1.612	1.616	0.100
10	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
11	0.112	0.113	0.114	0.113	0.112	0.114	0.113	0.111	0.112	0.113	0.141
12	0.124	0.125	0.126	0.125	0.126	0.123	0.124	0.126	0.125	0.123	0.130

表4 10批样品相似度评价结果
Tab 4 Results of similarity evaluation for 10 batches of samples

编号	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	相似度
S1	0.959	0.984	0.955	0.956	0.915	0.915	0.999	0.958	0.956	0.998
S2	1	0.965	0.955	0.956	0.914	0.915	0.999	0.964	0.956	0.998
S3	0.958	1	0.957	0.958	0.913	0.913	0.998	0.987	0.958	0.998
S4	0.955	0.957	1	0.967	0.902	0.903	0.955	0.957	0.999	0.952
S5	0.956	0.958	0.962	1	0.782	0.921	0.956	0.958	0.999	0.953
S6	0.914	0.913	0.954	0.782	1	0.999	0.913	0.913	0.782	0.929
S7	0.915	0.913	0.781	0.783	0.999	1	0.915	0.913	0.783	0.931
S8	0.999	0.998	0.955	0.956	0.913	0.915	1	0.998	0.955	0.998
S9	0.988	0.984	0.957	0.958	0.913	0.913	0.998	1	0.958	0.998
S10	0.956	0.958	0.999	0.999	0.782	0.783	0.955	0.958	1	0.953

2.4.3 HPLC 指纹图谱相关分析 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A 版),对 10 批药材样品的 HPLC 指纹图谱进行比较分析。结果显示,10 批药材样品有 12 个共有峰,其中 14 号峰(芦丁)峰面积大,且为所有药材样品共有,确定其为参照峰。

3 讨论

3.1 检测波长的选择

采用 HPLC 仪的二极管阵列检测器在 200~400 nm 波长范围内进行扫描,以确定样品的吸收波长。结果,

在 225、235、254 nm 波长处吸收较强。采用多波长进样分析,结果在 235 nm 波长下所得基线较稳定、色谱峰较多、信息丰富,故选择 235 nm 为检测波长。

3.2 提取方法的选择

以甲醇为提取溶剂,分别考察超声提取、回流提取、浸渍提取这 3 种提取方法。分别进样后,从色谱图信息分析,3 种提取法制备的供试品溶液图谱信息未见明显差异。综合考虑,选定操作更简便的超声提取方法来制备供试品溶液。

3.3 流动相的选择

在对供试品溶液进行 HPLC 分析时,本课题组分别考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸溶液、乙腈-磷酸溶液等流动相体系对色谱分离过程的影响^[3-6]。结果显示,乙腈-0.20% 磷酸溶液的分离度高,峰形对称,基线稳定。

3.4 梯度洗脱的时间确定

以乙腈-0.20% 磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱,分别考察了样品在 40、50、60、70 min 洗脱时间的色谱图^[7]。结果显示,45 min 后图谱基线稳定,无其他峰出现,故选择梯度洗脱时间为 45 min 为宜。

3.5 产地的选择

通过查询全国中草药资源普查信息和课题组成员到贵州各地区药材采集信息情况,发现对坐叶药材主要分布在贵州安顺、黔东南州、黔南州、铜仁地区。由于药材生长受环境、气候、地理条件等影响,以及指纹图谱研究要求样本应在 10 批次以上,所以本试验研究采集样品 10 批,其中有 2 批是在同一个县不同乡镇采集。

3.6 参照峰的选择

对坐叶药材主要成分为黄酮类^[8-10],而黄酮类主要包括槲皮素、熊果酸、木犀草素、芦丁。通过色谱定位,14 号峰为芦丁,其峰面积大,且为所有药材样品共有,故确定其为参照峰。

3.7 指纹图谱分析

通过建立该指纹图谱,对 10 批对坐叶药材 HPLC 图谱进行比较,结果发现药材 HPLC 图谱的共有峰保留时间、相对峰面积非常吻合,与共有模式 R 比较,相似度均大于 0.90。从各峰面积大小来看,峰面积有很大的差异,可能与药材生长环境有关。从共有峰可以确定 10 批对坐叶药材有效成分具有一致性。

综上,本研究所建 HPLC 指纹图谱可为对坐叶药材的鉴别和质量评价提供参考。

参考文献

[1] 贵州省食品药品监督管理局.贵州省中药材、民族药材质量标准:2003 年版[S].贵阳:贵州科技出版社,2003:149.
[2] 周建良,齐炼文,李萍.色谱指纹图谱在中药质量控制中的应用[J].色谱,2008,26(2):153-159.
[3] 冯华,邓丽娟,吴林菁,等.酢浆草高效液相色谱指纹图谱的鉴别研究[J].时珍国医国药,2014,25(10):2414-2416.

同位素稀释-超高效液相色谱-串联质谱法测定人血浆中氟康唑的浓度^Δ

杨浩天*, 吴 茵, 宋浩静, 邱志宏, 董占军[#](河北省人民医院药学部, 石家庄 050051)

中图分类号 R927.2;R978.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)02-0235-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.02.19

摘 要 目的:建立测定人血浆中氟康唑浓度的方法。方法:血浆样品经乙腈沉淀蛋白后,以同位素氟康唑-*d*₄为内标,采用超高效液相色谱-串联质谱法测定。色谱柱为ACQUITY UPLC BEH C₁₈,流动相为0.1%甲酸溶液-乙腈(梯度洗脱),流速为0.3 mL/min,柱温为40 ℃,进样量为3 μL;采用电喷雾离子源,以多反应监测模式进行正离子扫描,用于定量分析的离子对分别为*m/z* 307.1→220.0(氟康唑)和*m/z* 311.1→223.0(内标)。结果:氟康唑血药浓度检测的线性范围为10~5 000 ng/mL(*r*=0.998 1),定量下限为10 ng/mL;日内、日间RSD均低于8%,准确度为95.8%~106.7%;提取回收率为97.3%~107.3%(RSD<5.0%,*n*=6),基质效应、稀释效应及残留效应均不影响待测物的定量分析。结论:该方法简便、快速、专属性强、准确度高,可用于氟康唑治疗药物监测及药动学研究。
关键词 氟康唑;同位素内标;超高效液相色谱-串联质谱法;血药浓度;治疗药物监测

Determination of Fluconazole in Human Plasma by UPLC-MS/MS with Isotopes Dilution
YANG Haotian, WU Yin, SONG Haojing, QIU Zhihong, DONG Zhanjun (Dept. of Pharmacy, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for determination of fluconazole concentration in human plasma. METHODS: UPLC-MS/MS method was adopted to determine plasma after precipitated with acetonitrile. Using isotope fluconazole-*d*₄ as internal standard, the determination was performed on ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column with mobile phase consisted of 0.1% formic acid-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 0.3 mL/min. The column temperature was 40 ℃, and the sample size was 3 μL. ESI was used for positive ion scanning by multiple reaction monitoring mode. The ion pairs for quantitative analysis were *m/z* 307.1→220.0 (fluconazole) and *m/z* 311.1→223.0 (internal standard). RESULTS: The linear range of fluconazole was 10-5 000 ng/mL (*r*=0.998 1). The limits of quantitation was 10 ng/mL. RSDs of intra-day and inter-day were less than 8%; accuracy ranged 95.8%-106.7%. The extraction recovery ranged 97.3%-107.3% (RSD<5.0%, *n*=6), and matrix effect, dilution effect and residual effect didn't influence quantitative analysis of the substance to be measured. CONCLUSIONS: The method is simple, rapid, specific and accurate, which can be used for therapeutic drug monitoring and pharmacokinetic study of fluconazole.
KEYWORDS Fluconazole; Isotope internal standard; UPLC-MS/MS; Plasma concentration; Therapeutic drug monitoring

[4] 冯华, 聂明华, 罗秀琼, 等. 土知母药材及其混淆品 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(6): 67-69.
[5] 冯华, 石尚友, 罗秀琼, 等. 黔产见血清药材薄层色谱与 HPLC 指纹图谱识别[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(10): 2423-2425.
[6] 冯华, 石尚友, 罗秀琼, 等. 黔产大菟丝子药材高效液相色谱指纹图谱的鉴别研究[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(3): 634-635.
[7] 冯华, 杨烨, 王祥培, 等. 艾纳香及其伪品假东风草的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药房, 2017, 28(9): 1257-1261.
[8] 刘亚华, 徐君, 李齐激, 等. 对坐叶化学成分研究[J]. 中成药, 2013, 35(3): 556-559.
[9] 徐君, 吴连花, 徐文芬, 等. HPLC 法测定对坐叶中齐墩果酸和熊果酸[J]. 中成药, 2012, 34(4): 765-767.
[10] 陈华国, 靳风云, 赵超, 等. HPLC 法测定对坐叶中木犀草素的含量[J]. 中国药房, 2009, 20(36): 2838-2839.

Δ 基金项目: 河北省药学会临床药学专项科研项目 (No. YX201503)
* 药师, 硕士。研究方向: 药物质量控制、药动学。电话: 0311-85988640。E-mail: yanghaotian0917@163.com
[#] 通信作者: 主任药师, 硕士。研究方向: 临床药学、临床药理学。电话: 0311-85988945。E-mail: 651405530@qq.com

(收稿日期: 2018-02-24 修回日期: 2018-11-08)
(编辑: 余庆华)