

· 中药工业 ·

火麻仁标准汤剂的 UPLC 指纹图谱

陈锦霞, 曾杉*, 林碧珊, 陈伟钢, 吕豪辉

国药集团 广东环球制药有限公司, 广东 顺德 528303

[摘要] 目的: 建立火麻仁标准汤剂超高效液相色谱法(UPLC)指纹图谱。方法: 水溶性成分指纹图谱 I 采用以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的 CORTECS T3 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 1.6 μm); 乙腈-0.1% 甲酸溶液为流动相梯度洗脱。检测波长为 254 nm; 流速为 0.20 mL·min⁻¹; 柱温为 30 ℃。脂溶性成分指纹图谱 II 采用以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 乙腈-水为流动相梯度洗脱。检测波长为 205 nm; 流速为 0.25 mL·min⁻¹; 柱温为 30 ℃。结果: 建立火麻仁标准汤剂水溶性和脂溶性成分的指纹图谱, 水溶性成分标示出 6 个共有峰, 脂溶性成分标示出 4 个共有峰, 并分别对 20 批火麻仁标准汤剂 UPLC 指纹图谱进行相似度评价, 与对照指纹图谱相似度均在 0.90 以上。结论: 该方法简单、准确、重复性好, 为制定火麻仁配方颗粒的质量控制标准提供参考。

[关键词] 火麻仁标准汤剂; 超高效液相色谱法; 指纹图谱

[中图分类号] R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2020)12-2063-05

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20191205002

Study on UPLC Fingerprint Analysis of Cannabis Fructus Standard Decoction

CHEN Jin-xia, ZENG Shan*, LIN Bi-shan, CHEN Wei-gang, LYU Hao-hui

Sionpharm Group Guangdong Medi-word Pharmaceutical Co. Ltd., Shunde 528303, China

[Abstract] **Objective:** The fingerprint analysis method of Cannabis Fructus standard decoction was established. **Methods:** For water soluble constituents a CORTECS T3 column (150 mm×2.1 mm, 1.6 μm) was used with the column temperature maintained at 30 ℃. The mobile phase was acetonitrile-0.1% formic acid solution for gradient elution. The detection wavelength was at 254 nm and the flow rate was 0.2 mL·min⁻¹. For lipophilic constituents a C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) was used with the column temperature maintained at 30 ℃. The mobile phase was acetonitrile-water solution for gradient elution. The detection wavelength was at 205 nm and the flow rate was 0.25 mL·min⁻¹. **Results:** The Water soluble constituents and fat soluble constituents fingerprint spectrums of Cannabis Fructus standard decoction was obtained. There were 6 common peaks were identified in water soluble constituents. There were 4 common peaks were identified in fat soluble constituents. The similarity of fingerprint spectrum among 20 batches of standard decoction was also evaluated. The degree of identification with the control fingerprint was above 0.90. **Conclusion:** The fingerprint analysis method of Cannabis Fructus standard decoction is simple, accurate and reproducible, which provides a scientific reference for establishing the quality control specification of Cannabis Fructus formula granule.

[Keywords] Cannabis Fructus standard decoction; UPLC; fingerprint analysis

火麻仁为桑科植物大麻 *Cannabis sativa* L. 的干燥成熟果实^[1], 始载于《神农本草经》, 列为上品, 性平, 味甘。其具有润肠通便的作用, 多用于血虚津亏、肠燥便秘。近代药理研究表明, 火麻仁还具有杀虫、抗炎、抗血栓形成、抗心律失常、调血脂、抗肿瘤、抗溃疡等作用, 有一定的毒性, 临床常用于治疗便秘、术后胃肠功能恢复、神经性皮炎、高血压等^[2-6]。

标准汤剂是以中医药理论为指导、临床应用为基础, 经标准化工艺制备而成的单味中药饮片水煎液。火麻仁标准汤剂由火麻仁药材经炮制、提取、过滤、浓缩、干燥制备而成。本研究采用超高效液相色谱法(UPLC)建立了火麻仁标准汤剂的水溶性指纹图谱和脂溶性成分指纹图谱, 为制定火麻仁配方颗粒质量控制标准提供参考。

* [通信作者] 曾杉, 药学工程师, 研究方向: 中药配方颗粒与经典名方; Tel: (0757)28387063, E-mail: 309381753@qq.com

1 仪器与试药

1.1 仪器

H class 型超高效液相色谱仪(沃特世公司); MS105DU 型十万分之一天平、万分之一天平(梅特勒-托利多公司); KQ-500DE 型超声清洗机(昆山市超声仪器有限公司); Synergy UV 型超纯水系统(默克股份有限公司); YMW 型机械分体煎药壶(深圳一枚王有限公司)。

1.2 试药

火麻仁对照药材(批号: 121097-201605)、对照品 α -亚麻酸(批号: 111631-201605, 纯度: 99.8%)、亚油酸(批号: 111622-201203, 纯度: 99.8%)均购于中国食品药品检定研究院; 磷酸、甲酸、乙腈、甲醇为色谱纯; 乙醇为分析纯; 水为超纯水。

参考《中华人民共和国药典》2015年版火麻仁项下炮制方法制成火麻仁饮片^[1], 药材经广东一方制药有限公司质量中心鉴定, 为桑科植物大麻 *Cannabis sativa* L. 的干燥果实, 具体信息见表1。

表1 火麻仁药材信息

产地	批号	样品编号
山西省晋城市陵川县	HMR01Y	S1
	HMR02Y	S2
	HMR03Y	S3
山西省吕梁市中阳县	HMR04Y	S4
	HMR05Y	S5
	HMR06Y	S6
河南省新乡市辉县	HMR07Y	S7
	HMR08Y	S8
	HMR09Y	S9
陕西省商洛市柞水县	HMR10Y	S10
	HMR11Y	S11
	HMR12Y	S12
甘肃省陇南市成县	HMR13Y	S13
	HMR14Y	S14
	HMR15Y	S15
	HMR16Y	S16
陕西省榆林市府谷县	21804768	S17
	21804769	S18
	21804770	S19
	21804771	S20

2 方法与结果

2.1 火麻仁标准汤剂的制备

以国家中医药管理局发布的《医疗机构中药煎药室管理规范》为依据, 制备火麻仁标准汤剂。取火麻仁饮片100 g, 置于砂锅中, 加水煎煮2次。第一次煎煮加8倍水, 浸泡30 min, 武火煮沸后, 文火煎煮30 min, 趁热过200目筛滤过, 滤液迅速冷

却, 备用; 第二次煎煮加饮片量6倍水, 武火煮沸后, 文火煎煮20 min, 趁热过200目筛滤过, 滤液迅速冷却。合并2次滤液, 65℃减压浓缩, 浓缩至约200 g, 冷冻干燥, 即得。20批火麻仁标准汤剂样品编号为S1~S20。

2.2 火麻仁标准汤剂水溶性成分指纹图谱 I

2.2.1 色谱条件 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的CORTECS T3色谱柱(150 mm × 2.1 mm, 1.6 μm); 以乙腈为流动相A, 0.1%甲酸水溶液为流动相B, 梯度洗脱(0~5 min, 0% A; 5~15 min, 0%~14% A; 15~20 min, 14%~90% A; 20~20.1 min, 90%~0% A); 流速为0.20 mL·min⁻¹; 检测波长为254 nm; 柱温为30℃。

2.2.2 参照物溶液的制备 取火麻仁对照药材约0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加水10 mL, 称定质量, 加热回流60 min, 放冷, 用水补足减失的质量, 摇匀, 5000 r·min⁻¹离心5 min(离心半径为30 mm), 滤过, 即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 取火麻仁标准汤剂冻干粉约0.1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入10%甲醇水10 mL, 超声(功率: 500 W, 频率: 40 kHz)处理30 min, 取出, 放冷, 用10%甲醇水补足减失的质量, 摇匀, 用0.22 μm滤膜滤过, 即得。

2.2.4 方法学考察

2.2.4.1 精密度试验 取火麻仁标准汤剂(S13), 按2.2.3项下方法制备供试品溶液, 连续进样6次, 按2.2.1项下色谱条件测定。分别计算各特征峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果其RSD均小于2%, 表明仪器精密度良好。

2.2.4.2 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液(S13), 按2.2.1项下色谱条件, 分别在0、2、4、8、12、16、20、24 h进样。计算各特征峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果RSD均小于3%, 表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.2.4.3 重复性试验 取同一批号样品(S13), 分别精密称取6份, 按2.2.3项下方法制备供试品溶液, 按2.2.1项下色谱条件测定, 计算各特征峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果其RSD均少于2%, 表明本方法重复性良好。

2.2.5 火麻仁标准汤剂水溶性成分指纹图谱 I 的建立

2.2.5.1 20批火麻仁标准汤剂水溶性成分指纹图谱 I 的测定 分别精密吸取2.2.3项下制备的各批

次供试品溶液，按 2.2.1 项下色谱条件测定记录色谱图，结果见图 1。

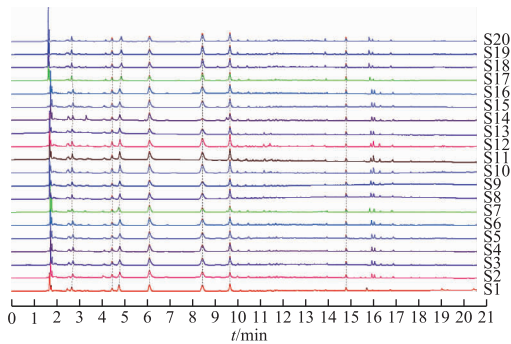


图 1 20 批火麻仁标准汤剂水溶性成分指纹图谱 I 叠加图

2.2.5.2 火麻仁标准汤剂水溶性成分对照指纹图谱 I 的建立 采用国家药典委员会推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版)对 20 批火麻仁标准汤剂水溶性成分指纹图谱 I 进行相似度分析，见图 2。以 3 号峰为参照峰，计算各共有峰的相对保留时间及相对峰面积，见表 2~3。结果表明，20 批火麻仁标准汤剂水溶性成分对照指纹图谱 I 相似度较好(>0.9)。

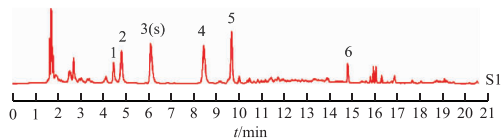


图 2 火麻仁标准汤剂水溶性成分指纹图谱 I

表 2 20 批火麻仁标准汤剂水溶性成分
指纹图谱 I 相对保留时间

编号	相对保留时间				
	峰 1	峰 2	峰 4	峰 5	峰 6
S1	0.742	0.788	1.396	1.625	2.476
S2	0.742	0.795	1.386	1.600	2.494
S3	0.742	0.794	1.388	1.607	2.503
S4	0.741	0.794	1.384	1.604	2.498
S5	0.740	0.793	1.386	1.603	2.490
S6	0.738	0.793	1.382	1.594	2.467
S7	0.746	0.792	1.421	1.649	2.561
S8	0.723	0.780	1.379	1.575	2.390
S9	0.723	0.780	1.377	1.576	2.393
S10	0.725	0.782	1.375	1.572	2.389
S11	0.726	0.782	1.376	1.583	2.414
S12	0.723	0.780	1.373	1.568	2.380
S13	0.724	0.779	1.376	1.579	2.397
S14	0.740	0.793	1.388	1.599	2.485
S15	0.741	0.793	1.387	1.606	2.498
S16	0.740	0.793	1.384	1.598	2.485
S17	0.719	0.788	1.380	1.544	2.480
S18	0.718	0.789	1.376	1.532	2.440
S19	0.719	0.789	1.378	1.536	2.449
S20	0.720	0.789	1.380	1.541	2.459

注：峰 3 相对保留时间均为 1.000。

表 3 20 批火麻仁标准汤剂水溶性成分
指纹图谱 I 相对峰面积

编号	相对峰面积				
	峰 1	峰 2	峰 4	峰 5	峰 6
S1	0.306	0.729	1.081	0.957	0.293
S2	0.269	0.615	0.826	0.422	0.187
S3	0.317	0.607	1.069	0.798	0.187
S4	0.341	0.623	1.090	0.836	0.194
S5	0.311	0.612	1.002	0.763	0.199
S6	0.275	0.593	0.899	0.677	0.202
S7	0.208	0.536	0.622	0.580	0.198
S8	0.370	0.632	1.041	1.043	0.220
S9	0.229	0.620	0.859	0.937	0.197
S10	0.380	0.705	1.199	1.069	0.145
S11	0.262	0.686	1.161	1.006	0.156
S12	0.479	0.818	1.494	1.325	0.175
S13	0.376	0.710	1.240	1.083	0.254
S14	0.297	0.604	0.284	0.591	0.206
S15	0.348	0.630	1.073	0.849	0.192
S16	0.364	0.607	1.076	0.862	0.211
S17	0.429	0.753	1.236	1.186	0.263
S18	0.443	0.741	1.270	0.970	0.251
S19	0.463	0.763	1.337	1.023	0.279
S20	0.449	0.759	1.267	0.986	0.274

注：峰 3 的相对峰面积均为 1.000。

2.3 火麻仁标准汤剂脂溶性成分指纹图谱 II

2.3.1 色谱条件 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的 CORTECS T3 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 以乙腈为流动相 A, 水为流动相 B, 梯度洗脱(0~5 min, 0%~25% A; 5~10 min, 25%~70% A; 10~18 min, 70%~100% A; 18~21 min, 100% A; 21~21.1 min, 100%~0% A); 流速为 0.25 mL·min⁻¹; 柱温为 30℃; 检测波长为 205 nm。

2.3.2 参照物溶液的制备 取火麻仁对照药材约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入水 10 mL, 称定质量, 加热回流 60 min, 取出, 放冷, 滤过, 滤液置水浴蒸干, 残渣加甲醇使溶解并转移至 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 滤过, 即得。另取对照品 α-亚麻酸、亚油酸适量, 精密称定, 加甲醇制成 10 μg·mL⁻¹ 的混合对照溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 取火麻仁标准汤剂冻干粉约 0.1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 10 mL, 超声(功率: 500 W, 频率: 40 kHz)处理 30 min, 取出, 放冷, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 用 0.22 μm 滤膜滤过, 即得。

2.3.4 方法学考察

2.3.4.1 精密度试验 取火麻仁标准汤剂(S11), 按 2.3.3 项下方法制备供试品溶液, 连续进样 6 次,

按 2.3.1 项下色谱条件测定。分别计算各特征峰的相对保留时间和相对峰面积,结果其 RSD 均小于 2%,表明仪器精密度良好。

2.3.4.2 稳定性试验 取火麻仁标准汤剂(S11),按 2.3.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.3.1 项下色谱条件,分别在 0、4、6、8、12、20、24 h 进样。计算各特征峰的相对保留时间和相对峰面积,结果 RSD 均小于 3%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.4.3 重复性试验 取同一批号样品(S11),分别精密称取 6 份,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算各特征峰的相对保留时间和相对峰面积,结果其 RSD 均少于 2%,表明本方法重复性良好。

2.3.5 火麻仁标准汤剂脂溶性成分指纹图谱 II 的建立

2.3.5.1 20 批火麻仁标准汤剂脂溶性成分指纹图谱 II 的测定 分别精密吸取 2.3.3 项下制备的各批次供试品溶液 1 μL,注入液相色谱仪,按照 2.3.1 项下色谱条件进行测定,结果见图 3。

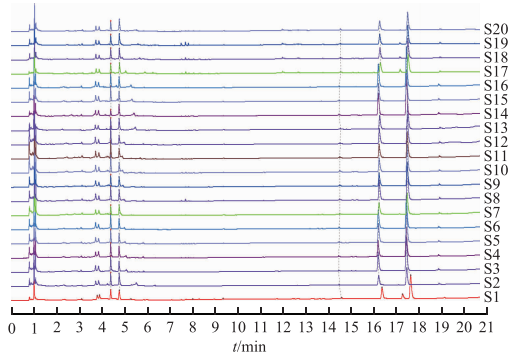
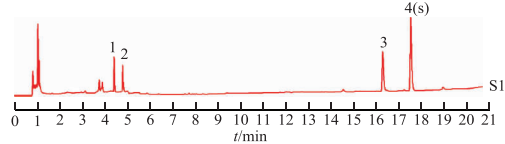


图 3 20 批火麻仁标准汤剂脂溶性指纹图谱 II 叠加图

2.3.5.2 火麻仁标准汤剂脂溶性成分对照指纹图谱 II 的建立 采用国家药典委员会推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版)对 20 批火麻仁标准汤剂脂溶性成分 UPLC 图谱进行处理,自动校正后进行色谱法匹配,匹配结果见图 4。以 4 号峰亚油酸为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间及相对峰面积,见表 4~5。20 批火麻仁标准汤剂脂溶性成分指纹图谱与对照指纹图谱相似度较好(>0.9)。



注: 3. α-亚麻酸; 4(S). 亚油酸。

图 4 火麻仁标准汤剂脂溶性对照指纹图谱 II

表 4 20 批火麻仁标准汤剂脂溶性成分
指纹图谱 II 相对保留时间

编号	相对保留时间		
	峰 1	峰 2	峰 3
S1	0.259	0.280	0.929
S2	0.252	0.274	0.929
S3	0.253	0.274	0.929
S4	0.253	0.274	0.929
S5	0.252	0.273	0.929
S6	0.252	0.273	0.929
S7	0.251	0.273	0.929
S8	0.251	0.273	0.929
S9	0.252	0.273	0.929
S10	0.251	0.273	0.929
S11	0.252	0.273	0.929
S12	0.250	0.272	0.929
S13	0.251	0.272	0.929
S14	0.253	0.274	0.929
S15	0.253	0.274	0.929
S16	0.253	0.274	0.929
S17	0.250	0.272	0.930
S18	0.250	0.272	0.929
S19	0.251	0.272	0.929
S20	0.250	0.272	0.929

注: 峰 4 相对保留时间均为 1.000。

表 5 20 批火麻仁标准汤剂脂溶性成分
指纹图谱 II 相对峰面积

编号	相对峰面积		
	峰 1	峰 2	峰 3
S1	0.192	0.241	0.472
S2	0.374	0.463	0.514
S3	0.241	0.179	0.529
S4	0.271	0.216	0.527
S5	0.238	0.154	0.529
S6	0.265	0.168	0.530
S7	0.216	0.332	0.515
S8	0.167	0.168	0.526
S9	0.216	0.235	0.522
S10	0.330	0.172	0.492
S11	0.313	0.183	0.490
S12	0.265	0.157	0.493
S13	0.213	0.267	0.518
S14	0.073	0.203	0.537
S15	0.225	0.177	0.535
S16	0.170	0.148	0.535
S17	0.238	0.287	0.512
S18	0.255	0.277	0.513
S19	0.277	0.408	0.511
S20	0.261	0.422	0.507

注: 峰 4 相对峰面积均为 1.000。

3 讨论

3.1 火麻仁标准汤剂水溶性成分指纹图谱 I

3.1.1 色谱条件的选择 采用二极管阵列检测器

(PAD)对样品进行全波长扫描,通过对比不同检测波长色谱图发现,当检测波长为254 nm时,火麻仁标准汤剂水溶性成分色谱峰最多,且各色谱峰的响应值均较高,因此选择254 nm为检测波长。另考察了乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸水和乙腈-0.1%甲酸水3种流动相的分离效果,结果表明,在乙腈-0.1%甲酸水梯度洗脱下,色谱图基线平稳,色谱峰分离度良好。以峰3为参照峰,20批火麻仁标准汤剂水溶性成分指纹图谱的其余5个特征峰相对保留时间RSD为0.7%~0.9%,均小于3.0%。

3.1.2 水溶性指纹图谱I的评价 本研究标示了火麻仁标准汤剂水溶性成分的6个共有峰,并通过相似度评价软件计算出20批火麻仁标准汤剂的对照图谱的相似度,结果均大于0.90。各批次火麻仁标准汤剂水溶性成分的图谱整体上基本一致。

3.2 火麻仁标准汤剂脂溶性成分指纹图谱II

3.2.1 色谱条件的选择 火麻仁油脂类成分如亚油酸、 α -亚麻酸等成分分子结构中仅含有非共轭双键,因此只有末端吸收,在205 nm附近具有较强吸收,因此选择205 nm作为火麻仁脂溶性成分指纹图谱II的检测波长。另考察了乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸水和甲醇-水3种流动相的分离效果,结果在乙腈-水梯度洗脱下,色谱图基线平稳,色谱峰分离度良好。以峰4亚油酸为参照峰,20批火麻仁标准汤剂脂溶性成分指纹图谱的其余3个特征峰相对保留时间RSD

为0.2%~0.8%,均小于2.0%。

3.2.2 脂溶性指纹图谱II的评价 本研究标示了火麻仁标准汤剂脂溶性成分的4个共有峰,并通过相似度评价软件计算出20批火麻仁标准汤剂的对照图谱的相似度,结果均大于0.90。各批次火麻仁标准汤剂脂溶性成分的图谱整体上基本一致。

上述研究结果表明,不同产地火麻仁标准汤剂水溶性及脂溶性成分指纹图谱相似度均较高,说明不同产地火麻仁药材质量差异较小;研究建立的方法简单、重复性高,为评价火麻仁药材质量提供了新的方法,并为制定火麻仁配方颗粒质量标准提供了参考。

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,2015:80.
- [2] 贺海波. 火麻仁的化学成分和药理活性研究进展[D]. 宜昌:三峡大学医学院,2010.
- [3] 金贤兰. 火麻仁的药理作用与临床应用[J]. 现代医药卫生,2007,23(17):2624-2625.
- [4] 陈宁园. 火麻仁提取液对D-半乳糖致衰老大鼠空间学习和记忆的干预作用及其机制研究[D]. 南宁:广西医科大学,2017.
- [5] 陈成. 火麻仁抑制血管紧张素转化酶和抗氧化活性的研究[D]. 重庆:重庆大学,2015.
- [6] 杨素华,马子牧,马晓旋. 火麻仁馏油治疗116例神经性皮炎临床观察[J]. 临床皮肤科杂志,1997,26(1):30-31.

(收稿日期:2019-12-05 编辑:王笑辉)

(上接第2062页)

- [4] 陈晓玲,艾玲,王宇,等. 复方鱼腥草口服液联合利巴韦林治疗小儿手足口病的疗效观察[J]. 临床合理用药杂志,2012,5(1):5-6.
- [5] 王傲雪. 探讨复方鱼腥草口服液联用利巴韦林对患儿手足口病改善情况的优势[J]. 中国现代药物应用,2013,7(9):112-113.
- [6] 郭倩梅. 复方鱼腥草治疗流行性腮腺炎疗效观察[J]. 中原医刊,2003,30(13):39-40.
- [7] 刘潇,代金珠,张伟. 复方鱼腥草糖浆治疗儿童疱疹性咽峡炎的疗效分析[J]. 中国处方药,2017,15(12):109-110.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:512-513.
- [9] 刘春海,张妮瑜,欧金秀. HPLC测定乌鸡白凤丸(水蜜丸)中芍药苷含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(12):13-15.
- [10] 余芳,熊鑫. 通腑排气合剂 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药师,2019,22(5):857-860.
- [11] 刘敏,范蕾,陈桂云,等. 降脂舒心合剂 HPLC 指纹图谱的建立及制剂安全性项目的影响因素检测[J]. 中国医药导报,2019,16(9):117-122.
- [12] 熊鑫,程璐,黄传奇,等. 元通合剂的高效液相色谱指纹图谱[J]. 医药导报,2018,37(9):1115-1118.
- [13] 杨丽娜,曾棋平,蔡小辉,等. 复方首乌藤合剂高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中南药学,2018,16(1):27-30.

(收稿日期:2019-11-04 编辑:王笑辉)