

精制冠心颗粒复方中 4 味药材 HPLC 指纹图谱研究

胡燕¹, 宋力飞^{2*}, 李曼莎², 周绍春², 肖俊勇²(1.广州白云山奇星药业有限公司, 广州 510310; 2.广州泽力医药科技有限公司, 广州 510663)

摘要: 目的 利用 HPLC 建立精制冠心颗粒复方中 4 味药材指纹图谱。方法 运用 Agilent 1100 DAD-HPLC 高效液相色谱仪, 采用 Inertsil ODS-3(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱, 乙腈-0.1%磷酸梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 270 nm, 柱温 30 °C, 进样量: 10 μL, 对精制冠心颗粒复方四味药材进行试验。结果 10 批精制冠心颗粒复方中 4 味药材中共获得 22 个共有峰, 不同批次样品相似度均>0.90, 方法精密度、稳定性和重复性良好。结论 采用 HPLC 建立的精制冠心颗粒复方中 4 味药材指纹图谱, 方法稳定、可靠、简便, 色谱图展现的各峰分离度较好, 特征明显, 可作为精制冠心颗粒复方真伪鉴别标准。

关键词: 精制冠心颗粒复方; 指纹图谱; HPLC; 丹参酮 II A

中图分类号: R917.101; R282.5

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)07-0809-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.07.009

基金项目: “重大新药创制” 国家科技重大专项(2011ZX09401-404)

作者简介: 胡燕, 女, 硕士, 工程师 Tel: (020)66281648 E-mail: centuryhy@139.com *通信作者: 宋力飞, 男, 硕士, 高工 Tel: (020)32290971 E-mail: songlifei@21cn.com

Study on HPLC Fingerprint of Four Kinds of Drugs of Jingzhi Guanxin Keli Fufang

HU Yan¹, SONG Lifei^{2*}, LI Mansha², ZHOU Shaochun², XIAO Junyong²(1.Guangzhou Baiyunshan Qixing Pharmaceutical Co., Ltd, Guangzhou 510310, China; 2.Guangzhou Zeli Pharmatech Co., Ltd, Guangzhou 510663, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the chromatographic fingerprint of Jingzhi Guanxin Keli Fufang by HPLC. **METHODS** HPLC was performed on Jingzhi Guanxin Keli Fufang using Agilent 1100 DAD-HPLC. Inertsil ODS-3 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used; the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid for gradient elution; the flow rate was 1 mL·min⁻¹; the detection wavelength was 270 nm; the column temperature was 30 °C, and inject volume was 10 μL. **RESULTS** Twenty-two HPLC common peaks were acquired in the 10 batches of four kinds of drugs of Jingzhi Guanxin Keli Fufang, and their similarities were >0.90. Good precision, stability and repetition were showed. **CONCLUSION** A reliable method is provided for the quality identification of Jingzhi Guanxin Keli Fufang. And the chemical components of different germplasms of Jingzhi Guanxin Keli Fufang are different from each other; selection of germplasm is important in quality control of Jingzhi Guanxin Keli Fufang.

KEY WORDS: Jingzhi Guanxin Keli Fufang; fingerprint; HPLC; tanshinone II A

精制冠心颗粒是中国药典 2010 版一部收载品种, 由丹参、赤芍、川芎、红花、降香 5 味药材组成, 主要功能为行气活血, 化瘀通脉, 用于气滞血瘀、胸痹、心痛、舌赤瘀斑、脉弦, 对冠心病、心绞痛、心梗引起的乏力、心慌、胸闷、胸痛有很好的疗效^[1]。本课题组为全面控制精制冠心颗粒的质量及监测精制冠心颗粒中主要成分在工艺中的变化, 对 5 味药材组成的复方进行指纹图谱相关研究。红花单味药材的指纹图谱研究成果已公开发表^[2], 现介绍复方的其他 4 味药材指纹图谱的相关研究成果。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent): 自动脱气机, 四元泵, 自动进样器, 柱温箱, DAD 二极管阵列检测器; LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津); LC-10AT vp Plus 高效液相色谱仪(日本岛津); KQ-300VDE 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); TB-114 电子天平(美国丹佛); DF-15 台式连续投料粉碎机(温岭市林大机械有限公司)。

1.2 试剂

甲醇、乙腈(J. T. Baker 公司, 色谱纯); 磷酸、醋酸(分析纯, 天津市富宇精细化工有限公司, 批号分别为 20090903、20101213); 乙醇、甲醇(分析纯, 广州化学试剂厂, 批号分别为 20111002-2、20111004-2); 芍药苷(中国药品生物制品检定所, 批号: 110736-200423, 供含量测定用)、丹参酮 II A(中国药品生物制品检定所, 批号: 0766-9606, 供含量测定用); 丹酚酸 B(中国药品生物制品检定所, 批号: 111562-200605, 纯度: 98.5%); 丹参、

赤芍、川芎、降香药材均来自广州奇星药业有限公司, 并由该公司宋力飞高级工程师进行鉴定。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液的制备 精制冠心颗粒复方粉末的制备: 按照中国药典 2010 版一部中精制冠心颗粒处方, 除红花外 4 味药材按比例混合打粉后过二号筛, 即得精制冠心颗粒复方混合粉末。

精密称取 1.0 g 精制冠心颗粒复方混合粉末, 精密加入 50 mL 的 50%乙醇, 称定重量, 超声 60 min, 冷却后补足重量, 过滤, 滤液过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取适量丹参酮 II A 对照品, 置棕色量瓶中, 加入稀乙醇制成每 1 mL 含 0.044 mg 的丹参酮 II A 对照品溶液。

精密称取适量丹酚酸 B 对照品, 加 75%甲醇制成每 1 mL 含 0.2 mg 的丹参酮 II A 对照品溶液。

精密称取适量芍药苷对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的芍药苷对照品溶液。

2.1.3 药材溶液的制备 丹参药材溶液: 精密称取丹参细粉 0.428 g, 加入 50%乙醇 50 mL, 超声处理 1 h, 过滤, 续滤液过 0.45 μm 滤膜, 即得。

赤芍药材溶液: 精密称取赤芍粉末 0.215 g, 加入 50%乙醇 50 mL, 超声处理 1 h, 过滤, 续滤液过 0.45 μm 滤膜, 即得。

川芎药材溶液: 精密称取川芎粉末 0.215 g, 加入 50%乙醇 50 mL, 超声处理 1 h, 过滤, 续滤液过 0.45 μm 滤膜, 即得。

降香药材溶液: 精密称取降香粉末 0.142 g, 加入 50%乙醇 50 mL, 超声处理 1 h, 过滤, 续滤

液过 0.45 μm 滤膜, 即得。

2.1.4 阴性样品溶液的制备 丹参缺样样品溶液: 将赤芍、川芎、降香 3 味药材粉末按 3:3:2 比例混合, 取约 0.572 g, 精密称定, 加入 50%乙醇 50 mL, 超声处理 1 h, 过滤, 续滤液过 0.45 μm 滤膜, 即得。

赤芍缺样样品溶液: 将丹参、川芎、降香 3 味药材粉末按 6:3:2 比例混合, 取约 0.785 g, 精密称定, 加入 50%乙醇 50 mL, 超声处理 1 h, 过滤, 续滤液过 0.45 μm 滤膜, 即得。

川芎缺样样品溶液: 将丹参、赤芍、降香 3 味药材粉末按 6:3:2 比例混合, 取约 0.785 g, 精密称定, 加入 50%乙醇 50 mL, 超声处理 1 h, 过滤, 续滤液过 0.45 μm 滤膜, 即得。

降香缺样样品溶液: 将丹参、赤芍、川芎 3 味药材粉末按 2:1:1 比例混合, 取约 0.858 g, 精密称定, 加入 50%乙醇 50 mL, 超声处理 1 h, 过滤, 续滤液过 0.45 μm 滤膜, 即得。

2.2 色谱条件

色谱柱为 Inertsil ODS-3(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 检测波长 270 nm, 流速 1 mL \cdot min $^{-1}$, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 10 μL 。流动相详见表 1。

表 1 流动相比例

Tab. 1 Proportion of mobile phase

时间/min	0.1%磷酸/%	乙腈/%
0	80	20
5	80	20
10	70	30
15	70	30
20	60	40
35	50	50
40	45	55
60	0	100
65	80	20

2.3 方法学考察

在精制冠心病颗粒复方 4 味药材指纹图谱中共出现 75 个色谱峰, 通过观察选定色谱峰峰面积较大且分离度较高的色谱峰作为指纹图谱共有峰, 一共确定 22 个共有峰。

2.3.1 仪器精密度 取同一份精制冠心病颗粒复方供试品溶液连续进样 6 次, 记录色谱图, 以丹参酮 II A 为参照, 计算 22 个共有峰的相对保留时间、相对峰面积, 并用国家药典委员会的中药色谱指

纹图谱相似度评价系统 2004A 版对其色谱图进行相似度评价。结果相对保留时间 RSD 值均 $<0.2\%$, 相对峰面积 RSD 值 $<3\%$, 色谱图相似度 >0.998 , 表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性 用同一批药材, 按“2.1.1”项下方法制备 6 份供试品, 进行 HPLC 分析, 以丹参酮 II A 为参照, 按“2.3.1”项下方法操作, 结果相对保留时间 RSD $<0.1\%$, 相对峰面积 RSD $<5\%$, 色谱图相似度 >0.999 , 这表明方法重复性良好。

2.3.3 稳定性 取同一份供试品, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 记录色谱图, 以丹参酮 II A 为参照, 按“2.3.1”项下方法操作, 结果相对保留时间 RSD $<0.5\%$, 相对峰面积 RSD $<3\%$, 色谱图相似度 >0.998 , 这表明供试品在 24 h 内稳定。

2.4 精制冠心病颗粒复方指纹图谱缺样阴性试验

制备复方样品溶液, 及相关对应的缺样阴性样品溶液、单味药材样品溶液, 在指纹图谱上确定各个药材主要信息峰的归属。

2.4.1 丹参缺样阴性对照试验 分别取 10 μL 丹参药材溶液和丹参缺样样品溶液注入高效液相色谱仪测定, 结果见图 1。

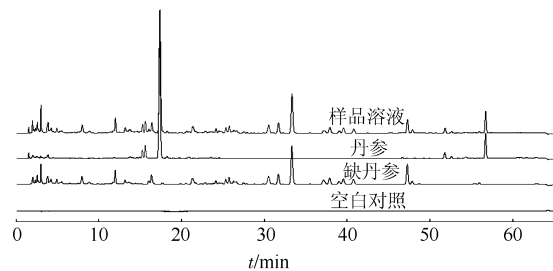


图 1 丹参缺样阴性谱图

Fig. 1 HPLC fingerprint of negative control without Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma

2.4.2 赤芍缺样阴性对照试验 分别取 10 μL 赤芍药材溶液和赤芍缺样样品溶液注入高效液相色谱仪测定, 结果见图 2。

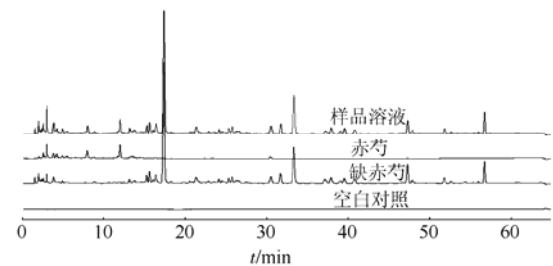


图 2 赤芍缺样阴性谱图

Fig. 2 HPLC fingerprint of negative control without Paeoniae Rubra Radix

2.4.3 川芎缺样阴性对照试验 分别取 10 μ l 川芎药材溶液和川芎缺样样品溶液注入高效液相色谱仪测定, 结果见图 3。

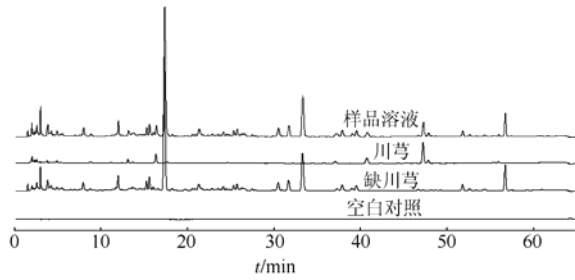


图 3 川芎缺样阴性谱图

Fig. 3 HPLC fingerprint of negative control without Chuanxiong Rhizoma

2.4.4 降香缺样阴性对照试验 取 10 μ L 注入高效液相色谱仪测定, 按“2.3.1”项下方法操作, 结果见图 4。

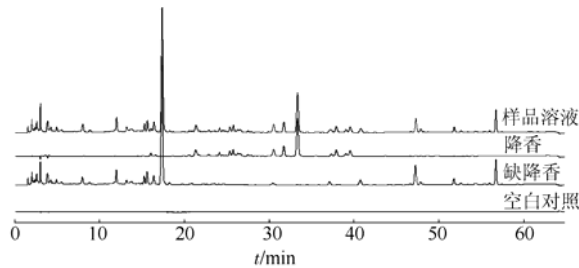


图 4 降香缺样阴性谱图

Fig. 4 HPLC fingerprint of negative control without Lignum Dalbergiae Odoriferae

通过缺样阴性试验对照共归属除红花药材之外 4 个药材共 32 个色谱峰, 各峰的归属见图 5 和表 2, 确定峰 4 为芍药苷, 峰 12 为丹酚酸 B, 峰 32 为丹参酮 II A。

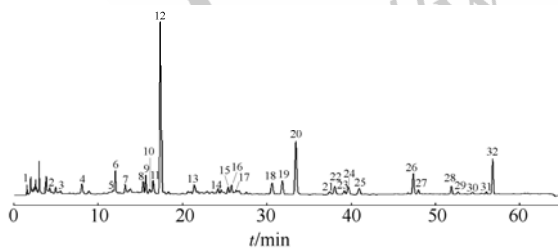


图 5 试验峰归属

Fig. 5 Identification of chromatographic peak

表 2 试验峰归属

Tab. 2 Identification of chromatographic peak

药材	峰号
丹参药材峰归属(8个)	1, 8, 9, 12, 28, 29, 30, 32
赤芍药材峰归属(5个)	2, 3, 4, 5, 6
川芎药材峰归属(7个)	7, 11, 21, 25, 26, 27, 31
降香药材峰归属(12个)	10, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24

2.5 相似度评价

将 10 批精制冠心颗粒复方 4 味药材粉末分别按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 注入高效液相色谱仪, 按“2.2”项下色谱条件进行分析、测定, 并用国家药典委员会的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)”对其色谱图进行相似度评价, 生成对照图谱, 见图 6。S1~S10 的相似度值分别为 0.979, 0.936, 0.961, 0.979, 0.912, 0.982, 0.956, 0.941, 0.979, 0.940。结果表明, 精制冠心颗粒复方 4 味药材指纹图谱相似度良好, 均>0.90。

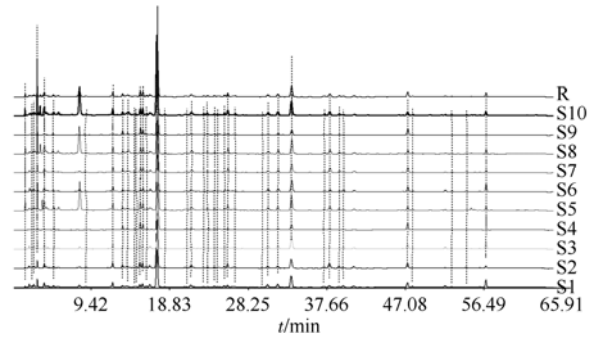


图 6 精制冠心颗粒复方 4 味药材 HPLC 指纹图谱共有模式
Fig. 6 The standard fingerprint chromatogram of four kinds of drugs in Jingzhi Guanxin Keli Fufang

3 讨论

3.1 供试品提取工艺的研究

本试验曾对供试品提取溶剂、提取方法、提取时间、提取倍数均进行了考察。提取溶剂比较了甲醇、95%乙醇、70%乙醇、50%乙醇、水 5 种不同极性的溶剂, 结果显示水提取样品溶液在 50 min 之后没有紫外吸收, 且峰高较低; 甲醇、乙醇提取样品溶液所得色谱峰整体峰形相近, 峰信息量相差不大, 考虑甲醇有机溶剂毒性大于乙醇, 故以乙醇为提取溶剂为宜, 而比较谱图直观分析可知, 随着乙醇浓度的增大, 峰高反而有所降低, 同时考虑成本, 最终选择 50%乙醇为提取溶剂。比较了超声提取及回流提取 2 种方法, 提取时间设置了 30, 60, 120 min 这 3 个水平, 提取倍数设置了 20 倍, 50 倍, 100 倍, 200 倍 4 个水平, 结果显示样品超声提取 60 min, 加入溶剂为 50 倍时, 提取效果最佳。

3.2 参照物的选择

丹参具有活血调经, 祛瘀止痛, 凉血消痈, 清心除烦, 养血安神等工作, 同时丹参也是精制冠心颗粒复方的君药, 选择丹参酮 II A 作为参照

物主要是考虑到丹参酮 II A 是丹参的主要成分。

3.3 色谱条件的选择

3.3.1 检测波长的选择 采用二极管阵列检测器考察了不同吸收波长图谱,重点观察了 230, 254, 270, 286, 321 nm 的色谱图。结果表明,精制冠心病颗粒复方在 230 nm 时,峰高差距悬殊,在 270 nm 下对大部分成分有吸收,峰高合适,且峰信息量较 286 nm 及 321 nm 下的峰信息量大,基线也较其他波长平稳,故将 270 nm 确定为精制冠心病颗粒复方指纹图谱的检测波长。

3.3.2 流动相的选择 比较了乙腈-水,乙腈-0.1%磷酸,乙腈-1.0%醋酸和甲醇-水,甲醇-0.1%磷酸,甲醇-1.0%醋酸,共 6 种流动相系统,通过以峰形、峰信息量及峰面积为考察指标,含磷酸流动相要明显优于纯水及醋酸流动相,且乙腈-磷酸流动相要优于甲醇-磷酸流动相,故选择乙腈-0.1%磷酸作为精制冠心病颗粒复方指纹图谱的流动相系统。

3.3.3 色谱柱的选择 试验中考察 6 根不同的色

谱柱: Dikma Platisil ODS、Dikma diamonsil C₁₈(2)、Dikma diamonsil C₁₈、Kromasil 100-5C₁₈、Thermo ODS HYPERSIL、Inertsil ODS-3。结果表明,Inertsil ODS-3 柱对样品中各成分能实现更好的分离,因此,本实验采用 Inertsil ODS-3 色谱柱。

3.4 精制冠心病颗粒复方指纹图谱缺样阴性分析

通过缺样阴性试验,可以知道在指纹图谱的样品处理过程中,各药材成分间基本上不发生相互作用,峰未有减少或增多,部分峰的峰面积会有所变化,但变化并不显著。而在传统的加热条件下,各药材成分是否发生相互作用还有待于在进一步的工艺研究中进行相关考察。

REFERENCES

- [1] Ch.P(2010)Vol I(中国药典 2010 年版.一部) [S]. 2010: 1214.
- [2] HU Y, WANG W B, SONG L F, et al. Experimental study on high-performance liquid chromatography fingerprint of *Carthamus tinctorius* [J]. Hunan J Tradit Chin Med(湖南中医杂志), 2013, 29(3): 110-112.

收稿日期: 2013-09-03