

内标定量指纹图谱法筛选冠心苏合丸对照制剂

孙国祥*, 张 宇, 高嘉悦, 刘中博

沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016

摘 要: **目的** 建立冠心苏合丸(Guanxin Suhe Pill, GXSH) HPLC 内标定量指纹图谱, 用内标定量指纹图谱法选出冠心苏合丸对照制剂, 为冠心苏合丸的质量控制提供对照制剂控制法。**方法** 采用 Agilent Poroshell 120 SB C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 2.7 μm), 流动相为水-甲醇(均含 0.2%醋酸), 梯度洗脱, 体积流量 0.5 mL/min, 柱温(25.00±0.15)℃, 紫外检测波长为 275 nm, 进样量 5 μL。采用内标定量指纹法整体鉴定 12 批次 GXSH(S1~S12) 质量, 根据本方法评价结果选出冠心苏合丸对照制剂。**结果** 以内标物峰为参照峰, 确定 36 个共有指纹峰, 以加入固定浓度内标为基准建立了 GXSH-HPLC 内标定量指纹图谱。用内标定量指纹法鉴别出 S3、S5~S7、S9 质量极好, S4、S8、S10、S11 质量很好, S1、S2 质量好, S12 质量为劣, 根据该方法评价结果, 最终确定 S3、S5~S7、S9 可作为冠心苏合丸对照制剂。**结论** 内标定量指纹法可以减少对照品的使用, 校正指纹图谱变化, 提高测定结果的准确性, 选出的对照制剂生成冠心苏合丸对照制剂指纹图谱可用于大批量冠心苏合丸的质量控制, 具有重大的实际应用意义。

关键词: 冠心苏合丸; 对照制剂; 内标定量指纹法; 高效液相色谱指纹图谱; 定量分析; 系统指纹定量法

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2014)05-0642-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.05.009

Selection of Guanxin Suhe Pill reference preparation by internal standard quantified fingerprints method

SUN Guo-xiang, ZHANG Yu, GAO Jia-yue, LIU Zhong-bo

College of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: **Objective** To establish the Guanxin Suhe Pill (GXSH)-HPLC internal standard quantified fingerprints method (ISQFM) for selecting the reference preparation of GXSH by ISQFM and providing the quality control method of reference preparation. **Methods** Agilent Poroshell 120 SB C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 2.7 μm), 0.2% ethylic acid-water, and 0.2% ethylic acid-methanol were used as the mobile phases that were eluted with liner program. The flow rate was 0.5 mL/min, the UV absorbance was monitored at 275 nm by injecting 5 μL of the sample solution each time, and the column temperature was maintained at (25.00 ± 0.15) °C. The ISQFM was used to identify the quality and select the reference preparation. **Results** The 36 common peaks were marked by choosing IS as the referential peaks and the quality of 12 batches of GXSHs was identified by the ISQFM. The identification results were that the quality of five batches (S3, S5—S7, and S9) were best, four batches (S4, S8, S10, and S11) were better, two batches (S1 and S2) were good, and one batch (S12) was lower than good, according to the results of this method, S3, S5—S7, and S9 could be used as the reference preparation of GXSHs. **Conclusion** This method could reduce the use of reference substances and improve the accuracy of the measured results. The reference preparation of GXSHs, which is selected by this method, could be used for the quality control of large quantities of GXSHs with the great significance in practical production.

Key words: Guanxin Suhe Pill; reference preparation; internal standard quantified fingerprints method; HPLC fingerprints; quantified analysis; systematically quantified fingerprints method

中药化学成分具有多样性与复杂性, 其药效往往是多种化学成分协同作用结果。近年有关“一测

多评法”和“替代对照品法”研究报道较多, 但仍是以几个组分为定量测定指标, 无法全面反映中药

收稿日期: 2013-09-30

基金项目: 国家自然科学基金重大研究计划项目(No.90612002)

*通信作者 孙国祥(1962—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药指纹学体系及其信息学研究。

Tel: (024)23986286 E-mail: gxswmwys@163.com

材及制剂的内在质量^[1-4],且中药化学对照品分离难度大,价格较高,使中药多组分定量实验的应用受到很大限制。中药指纹图谱是一种能够全面反映中药材及其制剂中所含化学成分种类与数量,进而对中药材及中药制剂质量进行整体定性描述和定量评价的有效技术手段。本实验通过加入固定浓度内标结合中药定量指纹图谱,提出用内标定量指纹法控制中药材和制剂的整体质量控制模式,可以减少实验误差,校正不同仪器和不同时间测定的指纹图谱变化,提高测定结果的准确性,且选用的内标物为实验室易得对照品还可以大幅度降低实验成本。依据本方法评价结果合理选出对照制剂,用于中药材和复方制剂质量控制。

冠心苏合丸由苏合香、冰片、乳香、檀香、土木香5味中药加工精制而成^[5],依据宋代《和剂局方》苏合香丸简化而成,收载于《中国药典》2010年版一部,主治冠心病、心绞痛、胸闷憋气等症。苏合香和冰片芳香走窜、开窍豁痰止痛为君药;檀香、土木香理气宽胸,助君药解郁化浊为臣药;乳香活血化瘀止痛,为佐药;诸药相伍,芳香开窍,化浊散瘀,行气止痛。文献中有桂皮酸和冰片的测定方法^[6-9],未见用内标定量指纹法选择对照制剂控制中药质量。本实验方法具有简便、快速、有效和准确量化特点,为冠心苏合丸整体质量评价提供一种新思路和新模式,具有重大的实际应用意义。

1 仪器与材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪,配有 DAD 检测器,低压四元梯度泵,在线脱气装置,自动进样器,Chemstation 工作站,Agilent 科技有限公司; Sartorius BS110S 分析天平(北京赛多利斯天平有限公司),RE-52 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),KDM 型控温电热套(山东鄞城华鲁仪器公司),KS-120D 超声波清洗器(宁波科生仪器厂)。

内标物:头孢噻肟钠(哈药集团制药总厂),经峰面积归一化后,质量分数均 $\geq 98\%$ 。甲醇(色谱纯,山东禹王实业总公司),醋酸(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司),所用水为去离子水。

12 批冠心苏合丸(GXSHP)样品(S1~S12,市售,购于沈阳市药店),其中 S1~S6,沈阳红药制药有限公司,批号分别为 110504、110801、110901、110902、111002、111003; S7~S9,哈药集团世一堂制药厂,批号分别为 1105130、1108148、

1111113; S10、S11,北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂,批号为 1011485、1014635; S12,长春人民药业集团有限公司,批号为 20111101。

2 方法与结果

2.1 内标定量指纹法原理

中药指纹图谱的数据评价过程中最常见的方法是在指纹图谱中选择某一固有成分色谱峰作为参照物峰,将其他峰值数据与之相比得到相对值,再用于指纹图谱的比较。但是选择本身已经含有的指纹峰作为参照峰,在实际测定时由于 12 批样品的参照物的量不同,在进行相对指纹数据计算时,数据会有一定的偏差,在一定程度上影响实验评价结果。而内标定量指纹图谱法是在指纹图谱中合适位置加入固定浓度内标作为基准计算其他峰值数据相对值用于指纹图谱的比较,由于所加内标物的量和色谱峰面积一定,并且使用称样量校正因子和峰面积校正因子进行校正,使内标定量指纹图谱法在定量评价方面有很大改善,还可以减少实验误差,校正不同仪器和不同时间测定的指纹图谱变化,提高测定结果的准确性。

2.1.1 第一实验场景条件 在样品溶液中通过加入固定质量浓度内标作基准,可以校正不同仪器和不同时间测定的指纹图谱变化。精密称取 m_s (g) 内标,制备样品溶液 V_0 (mL) 并含内标质量浓度为 C_s (g/mL 或 mg/ μ L) 的溶液。计算校正因子 (f_s),见 (1) 式,以内标为参照可得对照指纹图谱(reference fingerprint, RFP) 的 2 个特征技术向量,见 (2)、(3) 式,表征指纹含量时则得到指纹含量表观向量,见 (4) 式。恒定内标含量和固定样品质量浓度是准确定位系统相对含量的最关键因素。

$$f_s = C_s / y_s \quad (1)$$

$$\overrightarrow{RT_s} = (RT_{s1}, RT_{s2}, \dots, RT_{sn}) \quad (2)$$

$$\overrightarrow{RA_s} = (RA_{s1}, RA_{s2}, \dots, RA_{sn}) = (y_1, y_2, \dots, y_n) f_s / C_s \quad (3)$$

$$\overrightarrow{RC_s} = C_s (RA_1, RA_2, \dots, RA_n) = (C_1, C_2, \dots, C_n) = (y_1, y_2, \dots, y_n) f_s \quad (4)$$

2.1.2 第二实验场景条件 精密称取 m_i (g, $m_i \approx m_s$) 内标,制备内标溶液 V_0 (mL) 并含内标质量浓度为 C_i (g/mL 或 mg/ μ L) 溶液,计算校正因子 (f_i),见 (5) 式,以内标为参照 RFP 的 2 个特征技术向量,见 (6)、(7) 式,表征指纹含量时则得到指纹含量表观向量,见 (8) 式。

$$f_i = C_i / x_i \quad (5)$$

$$\overrightarrow{RT_i} = (RT_{i1}, RT_{i2}, \dots, RT_{in}) \quad (6)$$

$$\overrightarrow{RA_i} = (RA_{i1}, RA_{i2}, \dots, RA_{in}) = (x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{in}) f_i / C_i \quad (7)$$

$$\overrightarrow{RC_i} = C_i (RA_{i1}, RA_{i2}, \dots, RA_{in}) = (C_{i1}, C_{i2}, \dots, C_{in}) = (x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{in}) f_i \quad (8)$$

内标称样量误差通过称样量校正因子 (f_w) 校正, 见式 (9)。

$$f_w = m_s / m_i \quad (9)$$

同时内标质量浓度校正因子 (f_c), 见式 (10)。

$$f_c = C_s / C_i \quad (10)$$

内标在 2 次实验中峰面积校正因子 (f_A), 见 (11) 式, 内标相对重量校正因子 (f_{is}), 见 (12) 式, 三者关系见 (13) 式。

$$f_A = A_s / A_i \quad (11)$$

$$f_{is} = f_i / f_s = C_i A_s / C_s A_i = f_A / f_c \quad (12)$$

$$f_A = f_{is} f_c \quad (13)$$

可推导出宏定性相似度 (S_m)、变异系数 (α) 基本不变^[10], 校正后的宏定量相似度 (P_m) 计算方法见 (14) 式, 样品 RFP 具备标准指纹对照物特征, 可对照定量检测其他样品指纹图谱。

$$P_m = 0.5 \times (C + P) f_A f_w = 0.5 \times (C + P) f_w A_s / A_i = 0.5 \times \left(\sum_{i=1}^n x_i y_i / \sum_{i=1}^n y_i^2 + S_F \sum_{i=1}^n x_i / \sum_{i=1}^n y_i \right) f_{is} f_c f_w \quad (14)$$

2.2 方法

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent Poroshell 120 SB C₁₈ 柱 (150 mm × 4.6 mm, 2.7 μm); 流动相为 0.2% 醋酸甲醇溶液 (A) - 0.2% 醋酸水溶液 (B); 梯度洗脱程序: 0~7 min, 20%~27% A; 7~20 min, 27%~40% A; 20~35 min, 40%~55% A; 35~55 min, 55%~80% A; 55~70 min, 80%~100% A; 70~90 min, 100% A; 体积流量为 0.5 mL/min, 柱温为 (25.00 ± 0.15) °C, 紫外检测波长为 275 nm, 进样量 5 μL, 洗脱 90 min。

2.2.2 内标物溶液的制备 取内标物头孢噻肟钠约 62.5 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加蒸馏水溶解并稀释至刻度, 作为内标物溶液储备液。

2.2.3 供试品溶液制备 取 GXSH 3 丸, 剪碎, 取约 1/3 量, 精密称定, 加甲醇 30 mL, 回流提取 1 h, 滤过, 残渣加甲醇 30 mL 再次回流提取 1 h, 滤过, 合并 2 次滤液减压浓缩至约 16 mL, 精密吸取内标对照品储备液 5 mL 和上述 GXSH 浓缩液于 25 mL 量瓶中混合, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 作供试品溶液, 进样前用 0.45 μm 滤膜滤过。

2.3 结果与分析

2.3.1 系统适用性试验 取 S1 (批号为 110504) 供试品溶液 (加内标物)、S1 供试品溶液 (不加内标物)、内标物溶液分别进样 5 μL, 记录色谱图, 见图 1。如图可见内标物峰分离较好, 且峰形较好, 因此选定内标物峰作为参照物峰, 在此系统条件下计算其理论塔板数不低于 60 000。在相同检测条件下记录 100 min 空针色谱图, 基本无干扰。

2.3.2 精密度试验 精密吸取 S1 供试液 (加内标物) 5 μL, 重复进样 5 次, 记录色谱图。内标物峰保留时间 RSD 为 0.04%, 峰面积 RSD 为 1.34%, 以内标物峰为参照物峰, 计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积, 结果显示, 36 个共有峰相对保留时间 RSD 均 < 1.0%, 相对峰面积除个别小峰外 RSD 均 < 3.0%, 表明检测系统的进样精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 取 S1 新制备供试液 (加内标物), 分别于 0、3、4.5、6、8 h 进样分析, 记录色谱图。内标物峰保留时间 RSD 为 0.04%, 峰面积 RSD 为 1.62%, 以内标物峰为参照物峰, 计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积, 结果显示, 36 个共有峰相对保留时间 RSD 均 < 1.0%, 相对峰面积除个别小峰外 RSD 均 < 3.0%, 表明供试液在 8 h 内基本稳定。

2.3.4 重复性试验 取 S1 样品平行制备 5 份供试液 (加内标物), 分别吸取 5 μL 进样测定, 记录色谱图。内标物峰保留时间 RSD 为 0.14%, 峰面积 RSD 为 1.33%, 以内标物峰保留时间和峰面积为参照, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果各共有峰的相对保留时间 RSD 均 < 1.0%, 相对峰面积除个别小峰外 RSD 均 < 3.0%, 结果表明方法重复性良好。

2.3.5 GXSH-HPLC 内标定量指纹图谱建立^[11-13] 将 12 批 GXSH 供试液分别在 HPLC 仪上进样测定, 记录色谱图。以内标物峰为参照物峰, 按峰出现率 100% 计, 确定 36 个共有峰。以 S_m 为指标, 用 SPSS 16.0 软件对 12 批样品进行聚类分析 (HCA), 见图 2, 其中 S1~S11 为第 1 类, S12 为第 2 类, 表明第 1 类的 11 批化学成分种类、分布比例相似, 以此 11 批色谱图积分信号导入孙国祥等^[14]研制的“中药色谱指纹图谱超信息特征数字化评价系统 4.0”软件计算生成 RFP 来综合评价 GXSH 质量,

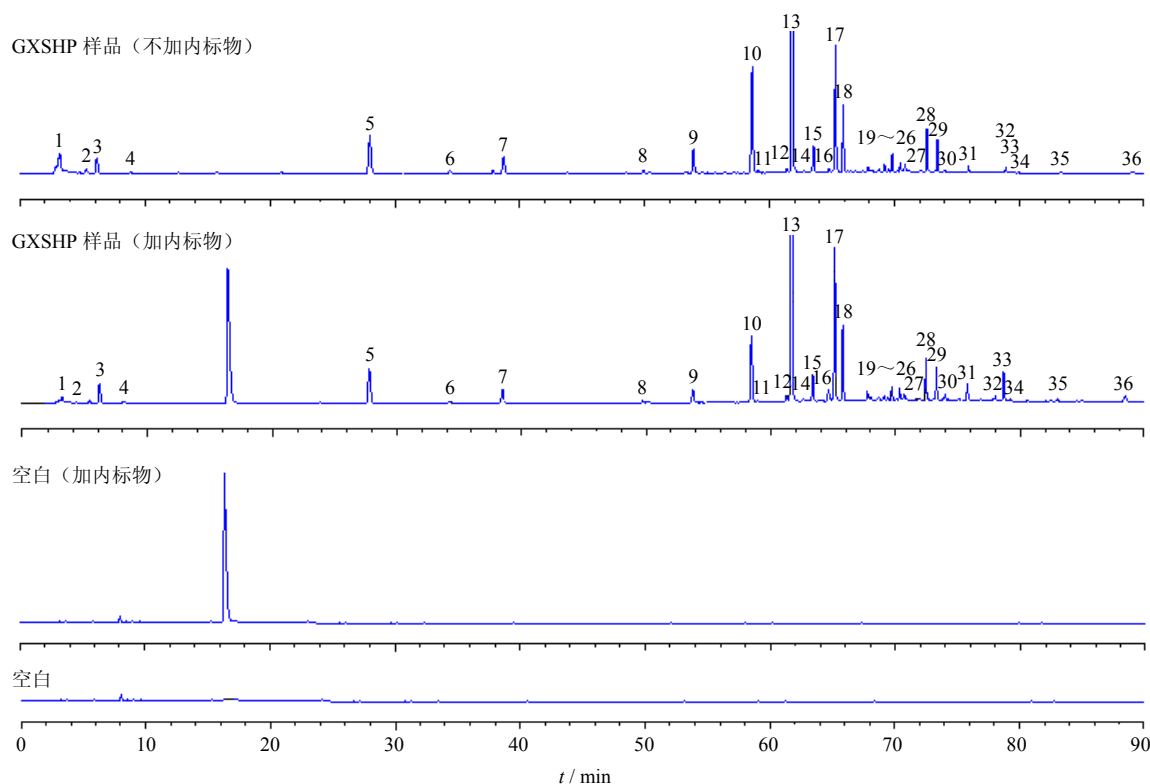


图 1 GXSHP 样品 (加内标物)、GXSHP 样品 (不加内标物)、内标物和空白 HPLC 图
Fig. 1 HPLC chromatograms of GXSHPs (with IS), GXSHPs (without IS), IS, and blank

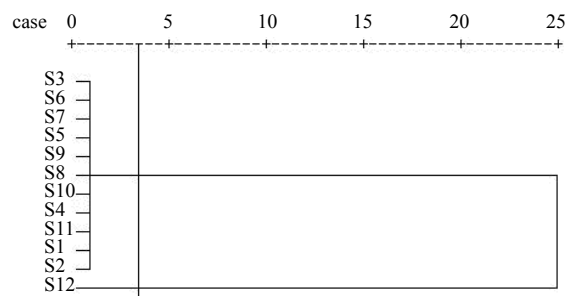


图 2 12 批 GXSHP 相似度聚类谱系图
Fig. 2 Clustering dendrogram of similarity of 12 batches of GXSHPs

见图 3。

2.3.6 内标定量指纹法评价 GXSHP 质量及冠心苏合丸对照制剂的选择 对于 GXSHP 含多种物质组分的复杂系统,用 S_m 整体鉴定样品化学指纹数量和含量分布比例与 RFP 差别,用 P_m 测定 GXSHP 化学指纹整体含量与 RFP 的差异;用指纹 α 判定样品指纹与 RFP 指纹的同态性,与系统指纹定量法相比,内标定量指纹法可以减少实验误差,校正不同仪器和不同时间测定的指纹图谱变化,提高测定结果的准确性。

12 批样品的 S_m 和 P_m 及 α 值见表 1,按内标定量指纹法鉴别出 S3、S5、S6、S7、S9 质量极好, S4、S8、S10、S11 质量很好, S1、S2 质量好, S12 质量为劣,并将系统指纹定量法^[15]评价结果与内标定量指纹法评价结果进行比较,见表 1 和图 4, 2 种方法评价的 S_m 、 α 相差不大,但 P_m 相差较大,因为加入内标能提高测定结果的准确性,校正不同仪器和不同时间测定的指纹图谱变化,因此在定量评价方面上内标定量指纹法比系统指纹定量法有一定的进步性。根据评价结果最终确定 S3、S5、S6、S7、S9 可作为冠心苏合丸对照制剂,其中 S5 为最佳,生成的冠心苏合丸对照制剂指纹图谱可用于大批量冠心苏合丸的质量控制。

本实验以头孢噻肟钠为内参照物峰,确定了冠心苏合丸样品的 36 个共有指纹峰,建立了 GXSHP-HPLC 内标定量指纹图谱。应用“中药色谱指纹图谱超信息特征数字化评价系统 4.0”软件,用内标定量指纹法定量评价 12 批 GXSHP 质量。与多组分含量测定、“一测多评法”和“替代对照品法”等中药质量控制方法相比,内标定量指纹法可以减少对照品的使用,降低实验成本,且内标定量指纹法与系

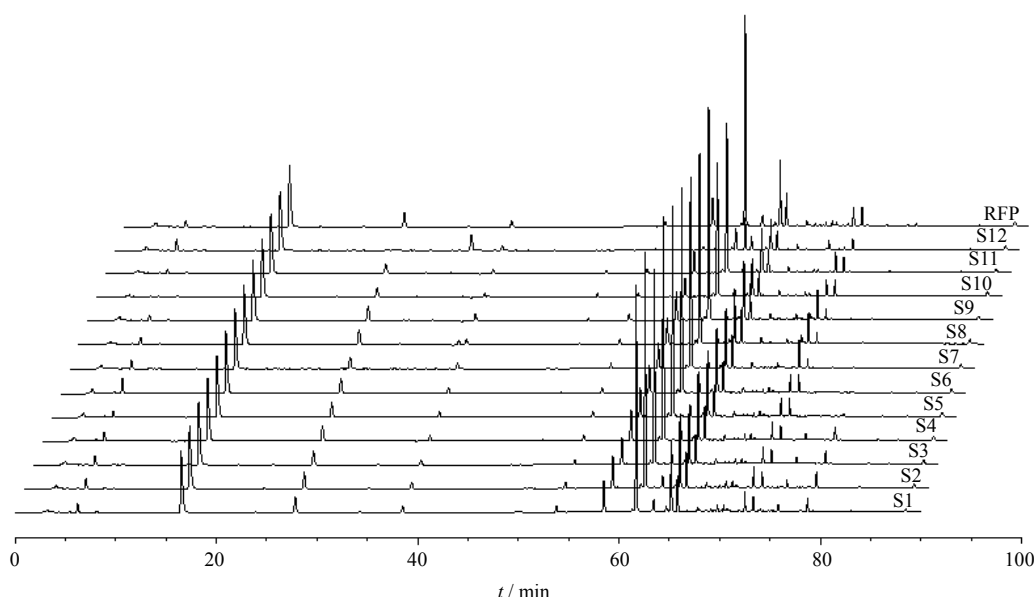


图3 12批GXSHP-HPLC内标定量指纹谱及其RFP

Fig. 3 HPLC fingerprints of 12 batches of GXSHPs and their RFP

表1 系统指纹定量法与内标定量指纹法评价12批GXSHPs结果

Table 1 Results of 12 batches of GXSHPs identified by SQFM and ISFQM

方法	参数	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
系统指纹定量法	S_m	0.96	0.96	0.96	0.97	0.98	0.96	0.97	0.90	0.96	0.96	0.96	0.41
	P_m^i	120.1	136.6	71.7	109.4	98.3	87.9	89.0	121.2	84.9	113.1	91.0	27.1
	α	0.00	0.02	0.00	0.05	0.04	0.02	0.03	0.05	0.01	0.03	0.03	0.61
	等级	4	6	5	2	1	3	3	7	3	3	2	8
	质量	良好	一般	中	很好	极好	好	好	差	好	好	很好	劣
内标定量指纹法	S_m	0.97	0.97	0.98	0.98	0.96	0.97	0.98	0.94	0.96	0.95	0.97	0.45
	P_m^i	114.1	118.4	99.0	108.2	100.1	97.7	100.5	94.3	101.4	93.5	106.6	27.2
	α	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.00	0.02	0.02	0.02	0.04	0.02	0.64
	等级	3	3	1	2	1	1	1	2	1	2	2	8
	质量	好	好	极好	很好	极好	极好	极好	很好	极好	很好	很好	劣

统指纹定量法相比还可以减少实验误差,校正不同仪器和不同时间测定的指纹图谱变化,提高测定结果的准确性,且操作相对简单、快速,选出的对照制剂生成对照制剂指纹图谱能够检验冠心苏合丸内在质量的整体变化和质量的均一程度,可用于大批量冠心苏合丸的质量控制,为冠心苏合丸的整体质量控制提供新的思路和方法,具有重大的实际应用意义。

3 讨论

3.1 内标物的选择

选取内标物时,对许多物质进行了测试。最终

选择头孢噻肟钠是因为其合适的保留时间,且附近没有其他干扰峰,加入固定质量浓度内标物作基准可降低实验成本,减少实验误差,提高测量结果的准确性。

3.2 对照制剂的选择

本实验采用内标定量指纹法选取对照制剂,而在中药实际生产过程中,制药厂家可根据实际情况和自身条件采用不同方法选取对照制剂,如根据药典处方自制严格的对照制剂,选取知名厂家生产的优等产品作为对照制剂,根据药效学研究选出对照制剂等,将对照制剂生成对照制剂指

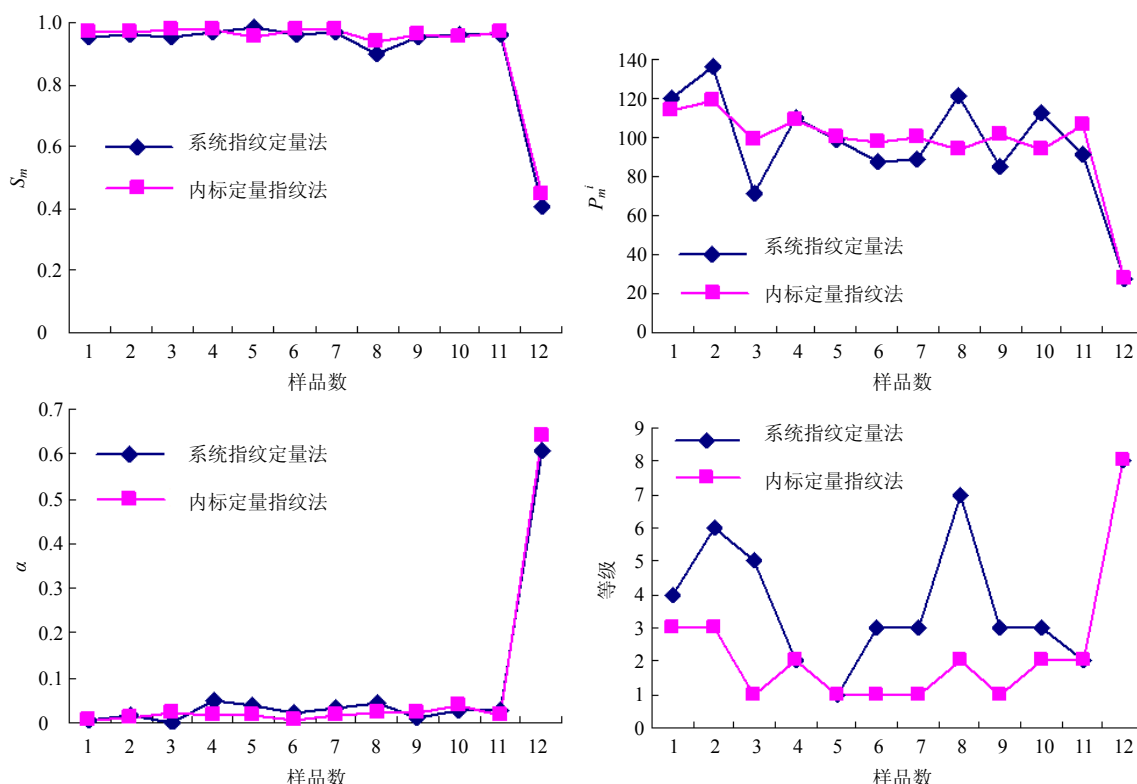


图 4 2 种评价方法 4 个参数的比较

Fig. 4 Comparison on four parameters by SQFM and ISQFM

纹图谱并应用“中药色谱指纹图谱超信息特征数字化评价系统 4.0”软件对样品指纹图谱与对照制剂指纹图谱进行对比最终达到控制中药材及其制剂质量的目的。

参考文献

- [1] 张红伟, 张振凌. “一测多评”法在中药质量控制中的研究进展 [J]. 海峡药学, 2010, 22(11): 88-89.
- [2] 罗祖良, 仇峰, 韦日伟, 等. 相对校正因子在中药多指标测定中的应用研究进展 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1448-1452.
- [3] 毕志明, 周小琴, 汤丹. 内标校正法在中药栀子多成分同时定量分析中的应用 [J]. 中国药科大学学报, 2010, 41(1): 50-54.
- [4] 许佳, 金红宇, 孙磊. 替代对照品法测定龙血竭原料中龙血素 A 和 B 的含量 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(11): 2058-2062.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [6] 王睿, 陈晓辉, 于治国, 等. HPLC 法测定冠心苏合丸和冠心苏合胶囊中桂皮酸的含量 [J]. 中草药, 2005, 36(3): 384-385.
- [7] 王维, 胡晓炜. 反相高效液相色谱法测定冠心苏合

丸中马兜铃酸 A 的含量 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2005, 22(4): 309-311.

- [8] 回瑞华, 侯冬岩, 李铁纯, 等. 冠心苏合丸中挥发性组分的分析及主成分冰片的测定 [J]. 分析测试学报, 2004, 23(5): 114-117.
- [9] 伍旭明. RP-HPLC 法测定冠心苏合丸中马兜铃酸 A 的含量 [J]. 浙江中医药大学学报, 2006, 30(5): 535-536.
- [10] 孙国祥, 张静娴. 系统指纹定量法鉴别龙胆泻肝丸质量 [J]. 分析化学, 2009, 36(8): 1183-1187.
- [11] 李闫飞, 孙国祥. 舒筋活血片高效液相色谱数字化定量指纹谱和对数指纹谱研究 [J]. 中南药学, 2012, 10(3): 224-228.
- [12] 殷瑞娟, 孙国祥. 柏子养心丸的高效液相色谱数字化指纹图谱研究 [J]. 中南药学, 2011, 9(11): 861-866.
- [13] 邵艳玲, 孙国祥, 李婷婷. HPLC 数字化定量指纹图谱评价维 C 银翘片的中药组分物质均一性 [J]. 中南药学, 2011, 9(8): 623-628.
- [14] 孙国祥, 智雪枝, 张春玲, 等. 中药色谱指纹图谱超信息特征数字化评价系统 [J]. 中南药学, 2007, 5(6): 549-555.
- [15] 孙国祥, 胡玥珊, 毕开顺. 系统指纹定量法评价牛黄解毒片质量 [J]. 药学报, 2009, 44(4): 401-405.