

血府逐瘀口服液的高效液相色谱指纹图谱研究

鄢燕^{1,3}, 汤宏敏^{1,3}, 饶毅^{1,2*}, 罗国安^{3*}, 梁琼麟³, 魏惠珍^{1,2}

(1. 江西中医学院, 江西 南昌 330006; 2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006;

3. 清华大学 中药现代化研究中心, 北京 100084)

摘要:目的 研究血府逐瘀口服液的 HPLC 指纹图谱。方法 采用高效液相色谱法。色谱柱为 Agilent HC C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.2% 甲酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 25 °C; 检测波长为 254、320、400 nm; 进样量: 10 μL。计算 10 批样品指纹图谱的数量相似度和程度相似度。结果 确定了 20 个共有峰, 10 批样品指纹图谱的数量相似度在 0.80 以上, 程度相似度在 0.57 以上。结论 程度相似度比数量相似度更能反映样品的内在差异。

关键词: 血府逐瘀口服液; 指纹图谱; 数量相似度; 程度相似度; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2009)04-0566-03

血府逐瘀口服液由红花、赤芍、当归、川芎、枳壳、甘草等 11 味药材经水提精制而成, 具有活血祛瘀、行气止痛的功效, 其中红花、赤芍、当归、川芎是活血化瘀的主要药物, 枳壳通畅血行, 甘草起到调合诸药的作用^[1]。自上市以来, 血府逐瘀口服液以其疗效可靠、服用方便等特点赢得了广大消费者的欢迎, 但由于方中药材众多, 成分十分复杂, 其质量控制水平仍处于较低的水平。为更好地控制质量, 本实验建立了血府逐瘀口服液的 HPLC 指纹图谱, 并对指纹图谱的两种相似度的计算方法进行了比较。

1 仪器与材料

Waters 2695 高效液相色谱仪, 2996 PAD 检测器, Empower Pro 工作站。Excellence Plus Xp 分析天平, Millipore 超纯水制备仪。

乙腈为色谱纯, 甲酸为分析纯, 水为超纯水。芍药苷(批号 110736-200628)、羟基红花黄色素 A(批号 110736-200628)、阿魏酸(批号 0773-9910)、甘草酸铵(批号 111637-200503)、柚皮苷(批号 110722-200309)对照品购自中国药品生物制品检定所。赤芍、红花、当归、川芎、甘草、枳壳药材和血府逐瘀口服液均由吉林敖东制药厂提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 Agilent HC C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.2% 甲酸水溶液

(A)-乙腈(B), 梯度洗脱: 5%B~25%B (0~55 min), 25%B~95%B (55~75 min); 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 25 °C; 检测波长为 254、320、400 nm; 进样量: 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取羟基红花黄色素 A 对照品适量, 加甲醇制成 0.08 mg/mL 的对照品溶液。同法分别配制 3.60 mg/mL 芍药苷, 0.04 mg/mL 阿魏酸, 2.39 mg/mL 柚皮苷, 0.38 mg/mL 甘草酸铵对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备: 取血府逐瘀口服液适量, 摇匀, 用 0.45 μm 滤膜滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液。

2.4 指纹图谱的建立: 将各供试品溶液注入高效液相色谱仪, 测定各样品的 HPLC 指纹图谱, 经比较分析, 确定 20 个色谱峰为各批样品共有峰。通过成药、水提液、对照品、药材、阴性的对比研究, 确定了 8 号峰为芍药苷, 14 号峰为柚皮苷, 18 号峰为甘草酸, 12、17 号峰分别为辅料苯甲酸钠、羟基乙酯。因 6 号峰(羟基红花黄色素 A)和 9 号峰(阿魏酸)分别在 400、320 nm 为最大吸收, 故得到 3 个波长下样品的 HPLC 指纹图谱, 其归属见图 1 和表 1。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验: 取批号 70104 血府逐瘀口服液, 制备供试品溶液, 连续进样 6 次, 以 3 号峰和 14

* 收稿日期: 2008-11-26

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAI08B04-01)

作者简介: 鄢燕(1984—), 女, 江西南昌人, 硕士研究生, 研究方向: 中药质量控制。

Tel: (010) 62772265 E-mail: yanyan65490227@126.com

* 通讯作者 饶毅 Tel: (0791) 7119609 E-mail: raoyi99@126.com

罗国安 Tel: (010) 62781688 E-mail: luoga@singhua.edu.cn

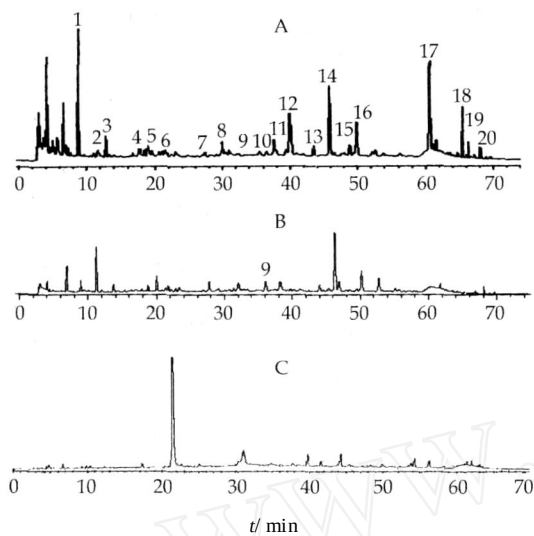


图 1 血府逐瘀口服液在 254 nm (A)、320 nm (B)、400 nm (C) 下的 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC Fingerprint of Xuefu Zhuyu Oral Liquid at 254 nm (A), 320 nm (B), and 400 nm (C)

表 1 血府逐瘀口服液的 HPLC 指纹图谱峰归属

Table 1 Peak assignments of HPLC fingerprint of Xuefu Zhuyu Oral Liquid

峰号	成分及药材归属	峰号	成分及药材归属
1	地黄、牛膝共有峰	12	苯甲酸钠
3	桃仁	13	枳壳
6	羟基红花黄色素 A (红花)	14	柚皮苷 (枳壳)
8	芍药苷 (赤芍)	15	枳壳
9	阿魏酸 (当归、川芎)	16	枳壳、柴胡共有峰
10	当归、川芎共有峰	17	羟苯乙酯
11	当归、川芎共有峰	18	甘草酸

号峰作为校正峰,计算共有峰的相对保留时间和相对保留面积^[2],结果共有峰的相对保留时间的 RSD 小于 0.62%,相对峰面积 RSD 在 1.47% 以下。

2.5.2 重现性试验:取批号 70104 血府逐瘀口服液,制备 6 份供试品溶液,分别进样,以 3 号峰和 14 号峰作为校正峰,计算共有峰的相对保留时间和相对保留面积^[2],结果共有峰的相对保留时间的 RSD 小于 0.74%,相对峰面积 RSD 在 1.59% 以下。

2.5.3 稳定性试验:取批号 70104 血府逐瘀口服液供试品溶液,分别在 0、6、12、18、24、48 h 进样,以 3 号峰和 14 号峰作为校正峰,计算共有峰的相对保留时间和相对保留面积^[2],结果共有峰的相对保留时间的 RSD 小于 0.52%,相对峰面积 RSD 在 1.94% 以下。

2.6 指纹图谱相似度评价:指纹图谱相似度评价的

目标在于通过对指纹图谱进行整体上的分析,来达到评价样品质量是否一致的目的。本实验运用了两个评价软件:国家药典委员会颁布的指纹图谱评价软件(数量相似度)和自行编制的软件(程度相似度)。

2.6.1 数量相似度(Q_n)评价:国家药典委员会的中药色谱指纹图谱相似度评价系统的相似度计算方法为夹角余弦法,其特点是强调定性而非定量。故其计算的相似度实质为数量相似度(由相似要素的数量决定的相似度)^[3]。采用国家药典委员会的色谱指纹图谱相似度计算软件,标记除 2、7、10、12、17 之外的 15 个峰,建立共有模式(由软件自动生成),计算 10 批样品指纹图谱的数量相似度,结果见表 2, RSD 为 3.709%。

2.6.2 程度相似度(Q_u)评价:程度相似度是由各相似要素的相似程度决定的相似度。采用本实验室相似度计算软件,其原理公式^[3]为:假设系统 A 由 K 个要素($a_1, a_2, a_3 \cdots a_i \cdots a_K$)组成,参照系统 B 由 L 个要素($b_1, b_2, b_3 \cdots b_j \cdots b_L$)组成,两个系统的相似要素有 n 个时,程度相似度 Q_u 为:

$$Q_u = 1 - \sum |1 - X_{ai} / X_{bi}| / n, X_{bi} \neq 0$$

其中 X_{ai} 为 A 色谱图中 a_i 峰的峰面积或峰高, X_{bi} 为参照色谱图 B (由软件自动生成) 中对应的色谱峰 b_i 的峰面积或峰高。以参照色谱图为标准,以计算数量相似度所用 15 个共有峰的峰面积为指标,评价 10 批血府逐瘀口服液指纹图谱的程度相似度,结果见表 2, RSD 为 9.589%。

表 2 10 批血府逐瘀口服液的数量相似度和程度相似度

Table 2 Numerical similarity and extent similarity of ten batches of Xuefu Zhuyu Oral Liquid

批次	数量相似度	程度相似度
41217	0.884	0.674
50108	0.858	0.744
50117	0.866	0.720
50406	0.891	0.708
61009	0.814	0.782
61106	0.801	0.751
70104	0.823	0.833
70115	0.841	0.579
70116	0.834	0.772
70117	0.812	0.691

由表 2 可见,10 批血府逐瘀口服液数量相似度

均在 0.8 以上,可以判定 10 批样品质量基本一致。但各批次间的程度相似度差别却很大,以批号为 41217、50406、70115、70117 样品尤为明显。

2.7 质量浓度差值的比较:为了确定两种相似度的准确性,本实验对 10 批样品中羟基红花黄色素 A、芍药苷、柚皮苷、阿魏酸、甘草酸进行测定。以 10 批样品中 5 个活性成分的各平均质量浓度为标准,计算各批样品中各成分的质量浓度差值,质量浓度差值越大说明质量浓度差异越大,结果见表 3。质量浓度差值的结果与程度相似度计算结果相符,说明程度相似度比数量相似度更能反映样品的内在差异。

表 3 10 批血府逐瘀口服液成分的质量浓度差值

Table 3 Content difference of five ingredients in ten batches of Xuefu Zhuyu Oral Liquid

批号	质量浓度差/(mg·mL ⁻¹)					
	羟基红花黄色素 A	芍药苷	阿魏酸	柚皮苷	甘草酸	总差值
41217	0.39	0.13	0.87	0.43	0.21	2.03
50108	0.73	0.06	0.14	0.29	0.28	1.50
50117	0.76	0.02	0.40	0.43	0.08	1.69
50406	1.03	0.08	0.34	0.09	0.29	1.83
61009	0.43	0.06	0.10	0.29	0.54	1.42
61106	1.03	0.01	0.07	0.17	0.19	1.46
70104	0.22	0.14	0.02	0.09	0.34	0.81
70115	1.03	2.38	0.04	0.02	0.60	4.07
70116	0.64	0.13	0.23	0.22	0.24	1.45
70117	0.77	0.10	0.35	0.41	0.35	1.99

3 讨论

相似度评价是指纹图谱研究的一个重要组成部分,目前相似度的评价方法主要有距离系数法、相关系数法、夹角余弦法等,基本上都是针对指纹图谱的数量相似度而言。目前已有文献报道^[3~5]提出程度相似度或定量相似度,并将其用于评价中药材指纹图谱,显示出了其相对于数量相似度的优点。本实验随后对另外 20 个批次样品进行了指纹图谱分析和定量测定,并利用数量相似度和程度相似度进行了验证评价,其结果与以上 10 批样品相同,表现出程度相似度与多指标定量测定的数据有很好的一致性,因此以这种方法评价中药色谱指纹图谱具有可

行性。

本实验在程度相似度的计算中反映了共有峰的峰面积对色谱图差异的影响,没有考虑非共有峰对色谱图差异的影响;而国家药典委员会的色谱指纹图谱相似度计算软件侧重考虑的是当一张色谱图中存在峰缺失时,即非共有峰对色谱图差异的影响。故在实际运用中可以引入整体相似度 Q ,即 $Q = (Q_n + Q_u)/2$ 或 $Q = Q_n \times Q_u$,从而既从数和量的角度反映了色谱图差异,又同时考虑了共有峰和非共有峰对色谱图差异的影响。

6 号峰(羟基红花素 A)和 9 号峰(阿魏酸)分别体现了处方中红花和当归、川芎的药材质量,分别在 400 nm 和 320 nm 为最大吸收。所以在进行指纹图谱相似度评价时,采用了 3 个波长的 HPLC 数据,即 6 号峰(羟基红花素 A)采用波长 400 nm 的峰面积,9 号峰(阿魏酸)采用波长 320 nm 的峰面积,其余色谱峰采用波长 254 nm 的峰面积。

对流动相乙腈-0.2%甲酸溶液、甲醇-0.2%甲酸溶液、乙腈-0.1%甲酸溶液、乙腈-0.1%磷酸溶液梯度洗脱体系进行了考察,结果乙腈-0.2%甲酸溶液体系得到的色谱峰峰形和分离度较好。比较了 190~400 nm 波长下的色谱图,结果 254 nm 波长下,色谱峰信息最多,分离情况良好;样品中特征峰相对保留时间 RSD 均小于 3%,表明色谱峰在 HPLC 图谱中相对位置稳定,可作为制剂的特征峰。

参考文献:

- [1] 郭淑芹.血府逐瘀口服液研制应用概述[J].吉林中医药,2005,25(1):61-62.
- [2] Chai Y F, Luo G A, Qiao S J, et al. Retention Time Correction Method in the Similarity Calculation of the Chromatographic Fingerprints of Traditional Chinese Medicine [J]. Chin J Anal Chem, 2005, 33(11):1599-1602.
- [3] Liu Yong-suo, Wang Yi-ming, Luo Guo-an etc. Similarity System Theory to Evaluate the Similarity of High Performance Liquid Chromatography Fingerprint of Traditional Chinese Medicine Quantitative [J]. Chin J Anal Chem, 2006, 34(3):333-337.
- [4] 段和祥,刘永锁,罗国安,等.程度相似度结合聚类分析在金银花药材质量评价中的应用[J].中成药,2007,29(3):318-321.
- [5] 孙国祥,侯志飞,张春玲,等.色谱指纹图谱定性相似度和定量相似度的比较研究[J].药学报,2007,42(1):75-80.