

血栓心脉宁片 UPLC-PDA 指纹图谱研究

胡惠君^{1,2}, 林龙飞², 刘宇灵², 朱继忠³, 刘传贵³, 李 慧^{2*}, 龚千锋^{1*}

1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004

2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

3. 吉林华康药业股份有限公司, 吉林 敦化 133700

摘要: 目的 建立血栓心脉宁片(XXT)的UPLC-PDA指纹图谱,考察不同批次XXT质量的一致性,为XXT质量稳定性提供可靠的科学依据。方法 样品经甲醇提取,采用Waters Acquity UPLC HSS T3(50 mm×2.1 mm, 1.8 μm)色谱柱,以乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱,190~400 nm波长扫描,体积流量0.5 mL/min,进样量3 μL,柱温40 ℃;对30批XXT样品进行方法学考察、相似度计算和聚类分析;单味药材进行共有峰归属,并通过对照品对共有峰的化学成分进行指认。结果 建立了XXT UPLC-PDA指纹图谱,280 nm波长下标定28个共有峰,其中1、10、12~16、18、21~28号峰来自丹参,2~4、6、8、9、17号峰来自川芎,3、7、9、11、16号峰来自毛冬青、5号峰来自槐花,19、20号峰来自蟾酥,经对照品比对指认出4号峰为阿魏酸、5号峰为芦丁、13号峰为丹酚酸B、19号峰为酯蟾毒配基、20号峰为华蟾酥毒基、28号峰为丹参酮II_A;通过聚类分析30批XXT可分为2类,经中药色谱指纹图谱评价软件(2012版)计算得30批XXT相似度均大于0.960。结论 建立的XXT UPLC-PDA指纹图谱具有良好的精密度、稳定性和重复性,方法简便可靠,可为进一步完善XXT的质量评价提供参考依据。

关键词: 血栓心脉宁片; UPLC-PDA; 指纹图谱; 相似度; 药材归属; 聚类分析; 丹参; 川芎; 毛冬青; 槐花; 蟾酥; 阿魏酸; 芦丁; 丹酚酸B; 酯蟾毒配基; 华蟾酥毒基; 丹参酮II_A

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)20-4268-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.20.022

Study on UPLC-PDA fingerprint of Xueshuan Xinmaining Tablets

HU Hui-jun^{1,2}, LIN Long-fei², LIU Yu-ling², ZHU Ji-zhong³, LIU Chuan-gui³, LI Hui², GONG Qian-feng¹

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

3. Jilin Huakang Pharmaceutical Co., Ltd., Dunhua 133700, China

Abstract: Objective To assess the consistency of 30 batches of Xueshuan Xinmaining Tablets (XXT), we establish the UPLC-PDA fingerprint of XXT and provide reliable scientific basis for the Chinese medicine quality consistency. **Methods** Methanol was used to extract the XXT samples, and the extracts were measured by UPLC with the absorption wavelength at 280 nm. Waters Acquity UPLC HSS T3 reversed-phase column (50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) was used for determining the extracts at a flow rate of 0.5 mL/min and column temperature of 40 ℃. The mobile phase condition was acetonitrile-0.1% formic acid aqueous solution with gradient mode. The methodology, similarity calculation and cluster analysis of 30 batches of XXT samples were investigated. The common peak of XXT was belonged to single medicinal materials and common peaks were identified by comparing with the reference. **Results** The UPLC fingerprint of XXT was established. Twenty-seven common fingerprint peaks were indicated with wavelength 280 nm, Among them, peaks 1, 10, 12—16, 18, and 21—28 belonged to *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* (SMRR), peaks 2—4, 6, 8, 9, and 17 belonged to *Chuanxiong Rhizoma* (CR), peaks 3, 7, 9, 11, and 16 belonged to *Illicis Pubescentis Radix* (IPR), peak 5 belonged to *Sophora Flos* (SF), peaks 19 and 20 belonged to *Bufois Venenum* (BV). Peaks 4, 5, 13, 19, 20, and 28 were ferulic acid, rutin, salvianolic acid B,

收稿日期: 2017-04-26

基金项目: 国家中医药管理局中药标准化项目(ZYBZH-C-JL-25)

作者简介: 胡惠君(1992—),女,在读硕士,研究方向为中药制剂。Tel: 17801127691 E-mail: 292306117@qq.com

*通信作者 龚千锋,教授,博士生导师,研究方向为中药炮制工艺与机制。Tel: (0791)87118852 E-mail: gongqf2006@163.com

李 慧,博士,研究员,主要从事中药新剂型研究与新药开发研究。Tel: (010)64087076 E-mail: lihuiyiren@163.com

resibufogenin, cinobufagin, tanshinone II_A, respectively, compared with reference. The analyzed samples were classified into two classes and the similarity was greater than 0.960. **Conclusion** The method of XXT UPLC-PDA fingerprint was established with good precision, stability and repeatability, supplying helpful information for the comprehensive evaluation of XXT.

Key words: Xueshuan Xinmaining Tablets; UPLC-PDA; fingerprint; similarity analysis; medicinal materials of belonging; cluster analysis; *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*; *Chuanxiong Rhizoma*; *Illicis Pubescentis Radix*; *Sophora Flos*; *Bufonis Venenum*; ferulic acid; rutin; salvianolic acid B; resibufogenin; cinobufagin; tanshinone II_A

血栓心脉宁片(Xueshuan Xinmaining Tablet, XXT)是吉林华康药业股份有限公司具有知识产权的独家品种,处方由川芎*Chuanxiong Rhizoma*、丹参*Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*、槐花*Sophora Flos*、毛冬青*Illicis Pubescentis Radix*、水蛭*Hirudo*、人工牛黄、人工麝香、冰片、蟾酥*Bufonis Venenum* 9味中药和人参茎叶总皂苷组成。其具有益气活血、开窍止痛的功效,主治脑血栓、冠心病、心绞痛等属于血瘀证。研究表明XXT中化学成分能够入血并对心脑血管方面的疾病有相关的治疗作用^[1-2],对大鼠急性心肌梗死、实验性脑缺血具有明显保护作用,可能是通过抑制脑缺血时自由基的氧化损伤,改善血小板黏附及聚集功能,防止乳酸酸中毒和细胞内钙超载等机制实现的^[3-4]。XXT对急性脑梗死患者血清同型半胱氨酸(Hcy)、超敏C反应蛋白(hs-CRP)水平有明显降低作用,对急性血瘀模型大鼠血液黏度、血小板聚集及血液流变学的异常变化有明显改善作用,有利于防治缺血性心脑血管疾病时的高黏状态,预防血栓形成以及动脉硬化的发生和发展^[5-6];还具有改善急性血瘀大鼠血液流变学及抗血栓形成的作用^[7]。临床研究表明使用XXT的冠心病患者治疗的有效率较不使用XXT的冠心病患者有效率高,可以提高冠心病患者的临床疗效^[8]。

目前,指纹图谱技术多用于对中药中的复杂化学成分进行全面和定性分析,是一种评价质量优劣、鉴别真伪、区分品种和确保中药质量一致性和稳定性的有效方法^[9]。关于XXT指纹图谱研究,已有相关报道通过HPLC-ELSD建立XXT指纹图谱^[10]。本研究采用UPLC-PDA建立XXT指纹图谱不仅能在相对较短分析时间内识别更多峰形较好的共有峰,且可在不同波长下比较XXT中各成分紫外吸收情况。本实验建立的方法能较全面反映出XXT中主要成分在不同波长下的变化情况以及产品的质量信息,从而更好地控制产品质量。

1 仪器与材料

Waters Acquity H-Class UPLC TM 超高效液相

色谱仪,包括四元溶剂管理器、真空脱气机、自动进样器、PDA 检测器、Empower 3 工作站,美国Waters公司;XP105 电子天平,Mettler Toledo公司;5510E-DTH 超声仪,美国Branson Ultrasonics公司;DK-98 电热恒温水浴锅,天津市泰斯特仪器有限公司;HC-2066 高速离心机,安徽中科中佳科学仪器有限公司。乙腈,色谱纯,Fisher公司,批号167508;甲醇(批号20160106)、甲酸(批号20160820),北京化工厂;其他试剂均为分析纯;水为娃哈哈纯净水,杭州娃哈哈有限公司,批号20161110。

30批XXT、药材饮片均由吉林华康股份有限公司提供,30批XXT批号分别为160904、160905、161001、161002、161003、161004、161005、161006、161007、161008、170205、170214、170215、170216、170301、170302、170303、170304、170305、170306、170307、170308、170309、170310、170311、170312、170401、170402、170403、170404,分别编号为S1~S30。

各味药材经中国中医科学院中药研究所李慧研究员鉴定,分别为伞形科植物川芎*Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎、唇形科植物丹参*Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎、豆科植物槐*Sophora japonica* L. 的干燥花及花蕾、毛冬青科植物毛冬青*Ilex pubescens* Hook. et. Arn. 干燥根、水蛭科动物水蛭*Hirudo nipponica* Whitman 的干燥全体、蟾蜍科动物中华大蟾蜍*Bufo bufo gargarizans* Cantor 的干燥分泌物。

阿魏酸对照品(批号110773-201012,质量分数≥99.60%),中国食品药品检定研究院;芦丁对照品(批号MUST-15091104,质量分数≥98.00%)、丹酚酸B对照品(批号MUST-15081916,质量分数以99.02%计)、丹参酮II_A对照品(批号MUST-15092512,质量分数以99.08%计),成都曼思特生物科技有限公司;华蟾酥毒基对照品(批号A0784,质量分数以99.72%计)、酯蟾毒配基对照品(批号160820,质量分数≥98%),成都曼思特生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Waters Acquity UPLC HSS T3 (50 mm×2.1 mm, 1.8 μ m) 色谱柱; 柱温 40 $^{\circ}$ C; 体积流量 0.5 mL/min; 进样量 3 μ L; 检测波长 280 nm; 流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0~1 min, 5% 乙腈; 1~8 min, 5%~12% 乙腈; 8~27 min, 12%~18% 乙腈; 27~30 min, 18%~25% 乙腈; 30~45 min, 25%~45% 乙腈; 47~60 min, 45%~50% 乙腈。理论塔板数按芦丁峰计算应不低于 2 000。

2.2 样品溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 取阿魏酸、芦丁、丹酚酸 B、丹参酮 II_A、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基对照品适量, 精密称定, 分别置于量瓶中, 甲醇溶解并定容, 即可; 精密量取各对照品溶液 1 mL 置于 10 mL 量瓶中, 摇匀, 甲醇定容, 即得混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取 XXT 适量, 研细, 取约 0.5 g, 精密称定, 置 25 mL 棕色量瓶中, 加甲醇约 20 mL, 超声处理 (功率 490 W, 频率 50 kHz) 30 min, 放冷, 甲醇稀释至刻度, 摇匀。提取液经高速离心机以 10 000 r/min 的转速离心 10 min, 取上清液经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 单味药材供试品溶液制备 取川芎、丹参、水蛭、毛冬青、槐花、蟾酥、冰片 7 味药材饮片, 分别按 XXT 制备工艺制备单味药材的浸膏粉^[1], 取 7 味药材浸膏粉以及人参茎叶总皂苷、麝香、人工牛黄粉末, 按“2.2.2”项下方法制备, 得单味药材供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取批号为 161001 的 XXT 粉末, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 精密吸取 3 μ L, 按“2.1”项下色谱条件测定, 连续进样 6 次, 在检测波长下共有峰保留时间 RSD 均小于 3.0%, 共有峰峰面积 RSD 均小于 5.0%, 表明本方法精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取“2.3.1”项下供试品溶液, 精密吸取 3 μ L, 按“2.1”项下色谱条件测定, 分别于 0、4、8、12、18、24 h 进样测定, 在检测波长下共有峰保留时间 RSD 均小于 3.0%, 共有峰峰面积 RSD 均小于 5.0%, 表明供试品溶液在 24 h 内具有良好的稳定性。

2.3.3 重复性试验 取批号为 161001 的 XXT 粉

末, 按“2.2.2”项下方法同时制备供试品溶液 6 份, 按“2.1”项下色谱条件分别进样测定, 在检测波长下各共有峰保留时间 RSD 均小于 3.0%, 共有峰峰面积 RSD 均小于 5.0%, 表明该方法重复性良好。

2.4 指纹图谱分析

2.4.1 指纹图谱的建立及共有峰的确定 取 30 个批次 XXT, 分别研细, 按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录 280 nm 波长下的色谱图。采用国家药典委员会颁布的《中药色谱指纹图谱相似度评价》(2012 版) 软件对 30 批 XXT 数据进行分析, 设置 S1 (批号为 160904) 为参照图谱, 采用多点校正方式 (时间窗宽度设为 0.1 min), 以中位数法建立对照指纹图谱 (R), 进行色谱峰匹配后生成对照图谱^[12]。得到 280 nm 波长下 30 批 XXT UPLC-PDA 指纹图谱。结果见图 1。确定 280 nm 波长下 28 个共有峰, 共有峰峰面积占总峰面积的 85% 以上, 峰面积相对较大, 峰形相对较好, 符合共有峰的选择原则。

2.4.2 相似度评价与系统聚类分析 通过国家药典委员会颁布的《中药色谱指纹图谱相似度评价》(2012 版) 软件对 30 批 XXT 的相似度进行分析, 结果见表 1。由表 1 可知, 30 批 XXT 的相似度在 280 nm 波长下均大于 0.960, 表明 30 批 XXT 质量较稳定。

对 280 nm 波长下 30 批 XXT 数据进行聚类分析。以标定的共有峰的峰面积为变量, 采用组间均联法, 以欧式距离的平方为测度^[13], 运用 SPSS 21.0 统计软件, 进行系统聚类分析, 分析结果见图 2。由图 2 峰面积聚类结果可以看出 30 批样品可分为 2 类, 批次 3、4、9、10 为一类, 其他批次为一类。结合相似度分析结果可知第一类共有峰的峰面积与其他批次共有峰的峰面积相比的有差异, 可能与原药材批次间差异有关^[14]。聚类分析得到样品之间的相关性与相似度的计算结果较为一致^[15]。

2.4.3 共有峰的指认与归属 通过与混合对照品图谱 (图 3) 相比较, 可以确定 4 号峰是阿魏酸、5 号峰是芦丁、13 号峰是丹酚酸 B、19 号峰是酯蟾毒配基、20 号峰是华蟾酥毒基、28 号峰是丹参酮 II_A, 结果见图 3。分析单味药材的数据, 根据保留时间和紫外光谱信息把各单味药材的图谱与 XXT 图谱分析比较, 确定指纹图谱共有峰的药材归属。在 280 nm 波长下, 指纹峰来自丹参 (1、10、12~16、18、21~28 号峰)、川芎 (2~4、6、8、9、17 号峰)、

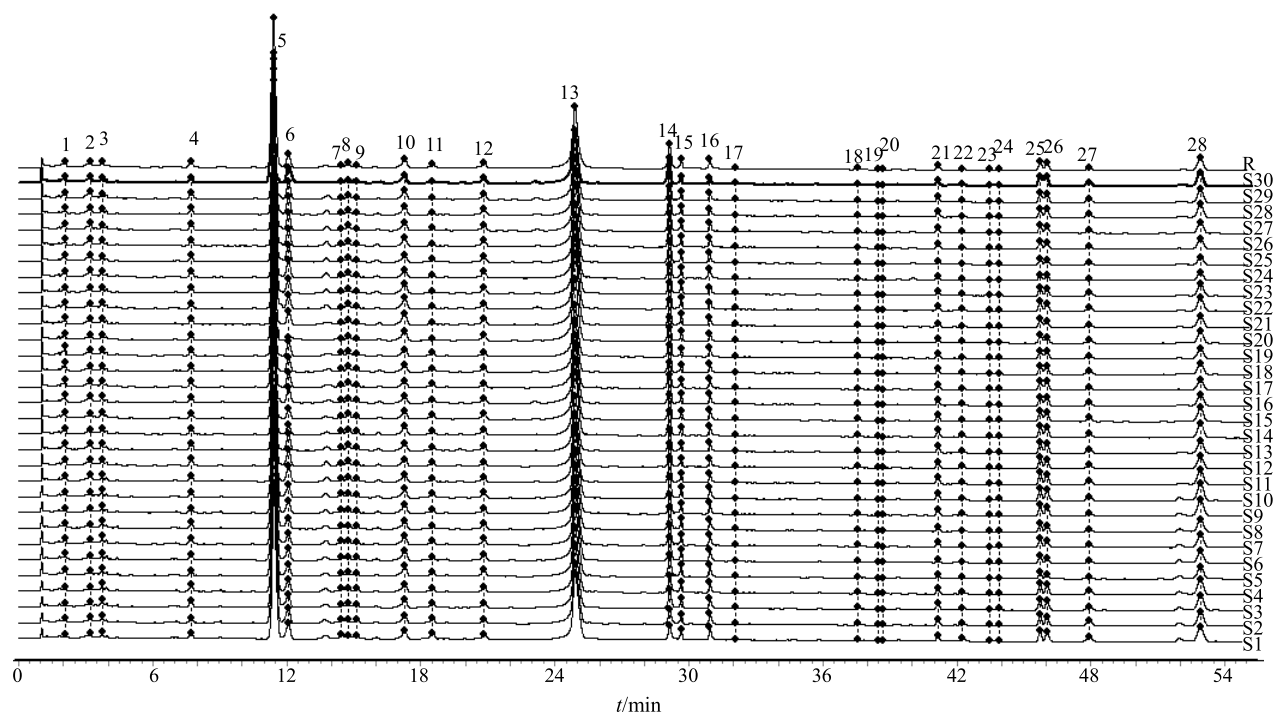


图 1 30 批 XXT 指纹图谱及对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 Fingerprints of 30 batches of XXT and control fingerprint (R)

表 1 指纹图谱相似度结果

Table 1 Similarity analysis results of fingerprint of 30 batches of XXT

批号	相似度															
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	R
S1	1.000	0.996	0.986	0.988	0.996	0.996	0.998	0.998	0.988	0.991	0.997	0.997	0.997	0.997	0.998	0.998
S2	0.996	1.000	0.996	0.997	0.988	0.990	0.995	0.992	0.997	0.998	0.998	0.996	0.997	0.992	0.994	0.996
S3	0.986	0.996	1.000	1.000	0.977	0.979	0.988	0.982	1.000	0.999	0.992	0.989	0.992	0.982	0.986	0.988
S4	0.988	0.997	1.000	1.000	0.979	0.982	0.990	0.984	1.000	1.000	0.993	0.990	0.993	0.985	0.988	0.990
S5	0.996	0.988	0.977	0.979	1.000	1.000	0.998	0.999	0.979	0.982	0.992	0.992	0.992	0.998	0.998	0.997
S6	0.996	0.990	0.979	0.982	1.000	1.000	0.999	1.000	0.982	0.984	0.993	0.993	0.993	0.998	0.998	0.998
S7	0.998	0.995	0.988	0.990	0.998	0.999	1.000	0.999	0.990	0.992	0.997	0.997	0.997	0.999	0.999	0.999
S8	0.998	0.992	0.982	0.984	0.999	1.000	0.999	1.000	0.984	0.987	0.995	0.995	0.995	0.999	0.999	0.999
S9	0.988	0.997	1.000	1.000	0.979	0.982	0.990	0.984	1.000	1.000	0.993	0.990	0.993	0.984	0.987	0.990
S10	0.991	0.998	0.999	1.000	0.982	0.984	0.992	0.987	1.000	1.000	0.995	0.992	0.994	0.987	0.990	0.992
S11	0.997	0.998	0.992	0.993	0.992	0.993	0.997	0.995	0.993	0.995	1.000	0.999	0.999	0.996	0.997	0.998
S12	0.997	0.996	0.989	0.990	0.992	0.993	0.997	0.995	0.990	0.992	0.999	1.000	1.000	0.996	0.997	0.998
S13	0.997	0.997	0.992	0.993	0.992	0.993	0.997	0.995	0.993	0.994	0.999	1.000	1.000	0.995	0.997	0.998
S14	0.997	0.992	0.982	0.985	0.998	0.998	0.999	0.999	0.984	0.987	0.996	0.996	0.995	1.000	0.999	0.999
S15	0.998	0.994	0.986	0.988	0.998	0.998	0.999	0.999	0.987	0.990	0.997	0.997	0.997	0.999	1.000	0.999
S16	0.989	0.977	0.960	0.963	0.995	0.994	0.990	0.994	0.962	0.967	0.985	0.987	0.984	0.994	0.992	0.991
S17	0.996	0.995	0.989	0.990	0.994	0.995	0.997	0.996	0.990	0.992	0.998	0.999	0.999	0.997	0.998	0.999
S18	0.994	0.996	0.992	0.993	0.992	0.993	0.997	0.994	0.992	0.994	0.998	0.998	0.999	0.995	0.997	0.998
S19	0.995	0.991	0.982	0.984	0.995	0.995	0.996	0.996	0.984	0.986	0.996	0.998	0.997	0.997	0.997	0.998
S20	0.993	0.987	0.977	0.980	0.998	0.998	0.997	0.998	0.980	0.983	0.991	0.991	0.991	0.998	0.998	0.997
S21	0.991	0.982	0.968	0.971	0.998	0.997	0.994	0.996	0.971	0.974	0.987	0.987	0.986	0.996	0.994	0.994

续表 1

批号	相似度															
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	R
S22	0.996	0.990	0.979	0.981	0.999	0.999	0.998	0.999	0.981	0.984	0.994	0.994	0.994	0.999	0.998	0.998
S23	0.996	0.990	0.980	0.982	0.999	0.999	0.998	0.999	0.982	0.985	0.994	0.995	0.994	0.999	0.999	0.999
S24	0.992	0.987	0.977	0.979	0.996	0.997	0.995	0.996	0.978	0.981	0.992	0.993	0.993	0.995	0.996	0.997
S25	0.992	0.989	0.982	0.983	0.995	0.996	0.995	0.995	0.983	0.984	0.993	0.995	0.995	0.995	0.996	0.997
S26	0.994	0.988	0.978	0.980	0.997	0.997	0.996	0.997	0.979	0.982	0.994	0.995	0.994	0.997	0.997	0.998
S27	0.995	0.991	0.982	0.984	0.997	0.997	0.997	0.997	0.984	0.986	0.996	0.996	0.996	0.997	0.998	0.999
S28	0.995	0.995	0.988	0.990	0.994	0.995	0.997	0.996	0.990	0.992	0.998	0.999	0.999	0.996	0.997	0.999
S29	0.995	0.990	0.978	0.980	0.996	0.996	0.996	0.997	0.980	0.984	0.996	0.995	0.994	0.998	0.997	0.998
S30	0.995	0.991	0.981	0.983	0.995	0.995	0.996	0.996	0.982	0.986	0.996	0.997	0.996	0.997	0.997	0.998
R	0.998	0.996	0.988	0.990	0.997	0.998	0.999	0.999	0.990	0.992	0.998	0.998	0.998	0.999	0.999	1.000

批号	相似度															
	S16	S17	S18	S19	S20	S21	S22	S23	S24	S25	S26	S27	S28	S29	S30	R
S1	0.989	0.996	0.994	0.995	0.993	0.991	0.996	0.996	0.992	0.992	0.994	0.995	0.995	0.995	0.995	0.998
S2	0.977	0.995	0.996	0.991	0.987	0.982	0.990	0.990	0.987	0.989	0.988	0.991	0.995	0.990	0.991	0.996
S3	0.960	0.989	0.992	0.982	0.977	0.968	0.979	0.980	0.977	0.982	0.978	0.982	0.988	0.978	0.981	0.988
S4	0.963	0.990	0.993	0.984	0.980	0.971	0.981	0.982	0.979	0.983	0.980	0.984	0.990	0.980	0.983	0.990
S5	0.995	0.994	0.992	0.995	0.998	0.998	0.999	0.999	0.996	0.995	0.997	0.997	0.994	0.996	0.995	0.997
S6	0.994	0.995	0.993	0.995	0.998	0.997	0.999	0.999	0.997	0.996	0.997	0.997	0.995	0.996	0.995	0.998
S7	0.990	0.997	0.997	0.996	0.997	0.994	0.998	0.998	0.995	0.995	0.996	0.997	0.997	0.996	0.996	0.999
S8	0.994	0.996	0.994	0.996	0.998	0.996	0.999	0.999	0.996	0.995	0.997	0.997	0.996	0.997	0.996	0.999
S9	0.962	0.990	0.992	0.984	0.980	0.971	0.981	0.982	0.978	0.983	0.979	0.984	0.990	0.980	0.982	0.990
S10	0.967	0.992	0.994	0.986	0.983	0.974	0.984	0.985	0.981	0.984	0.982	0.986	0.992	0.984	0.986	0.992
S11	0.985	0.998	0.998	0.996	0.991	0.987	0.994	0.994	0.992	0.993	0.994	0.996	0.998	0.996	0.996	0.998
S12	0.987	0.999	0.998	0.998	0.991	0.987	0.994	0.995	0.993	0.995	0.995	0.996	0.999	0.995	0.997	0.998
S13	0.984	0.999	0.999	0.997	0.991	0.986	0.994	0.994	0.993	0.995	0.994	0.996	0.999	0.994	0.996	0.998
S14	0.994	0.997	0.995	0.997	0.998	0.996	0.999	0.999	0.995	0.995	0.997	0.997	0.996	0.998	0.997	0.999
S15	0.992	0.998	0.997	0.997	0.998	0.994	0.998	0.999	0.996	0.996	0.997	0.998	0.997	0.997	0.997	0.999
S16	1.000	0.989	0.985	0.993	0.994	0.997	0.996	0.995	0.994	0.992	0.996	0.994	0.989	0.996	0.994	0.991
S17	0.989	1.000	0.999	0.999	0.994	0.991	0.996	0.997	0.997	0.998	0.998	0.999	0.999	0.997	0.998	0.999
S18	0.985	0.999	1.000	0.998	0.992	0.987	0.994	0.994	0.995	0.997	0.996	0.997	0.999	0.995	0.996	0.998
S19	0.993	0.999	0.998	1.000	0.994	0.992	0.997	0.997	0.998	0.998	0.999	0.999	0.999	0.998	0.999	0.998
S20	0.994	0.994	0.992	0.994	1.000	0.997	0.999	0.999	0.995	0.995	0.996	0.996	0.994	0.995	0.995	0.997
S21	0.997	0.991	0.987	0.992	0.997	1.000	0.998	0.998	0.995	0.993	0.996	0.995	0.990	0.996	0.994	0.994
S22	0.996	0.996	0.994	0.997	0.999	0.998	1.000	1.000	0.997	0.996	0.998	0.998	0.996	0.998	0.997	0.998
S23	0.995	0.997	0.994	0.997	0.999	0.998	1.000	1.000	0.997	0.997	0.998	0.998	0.997	0.998	0.997	0.999
S24	0.994	0.997	0.995	0.998	0.995	0.995	0.997	0.997	1.000	1.000	1.000	0.999	0.996	0.997	0.996	0.997
S25	0.992	0.998	0.997	0.998	0.995	0.993	0.996	0.997	1.000	1.000	0.999	0.999	0.998	0.997	0.996	0.997
S26	0.996	0.998	0.996	0.999	0.996	0.996	0.998	0.998	1.000	0.999	1.000	1.000	0.997	0.999	0.998	0.998
S27	0.994	0.999	0.997	0.999	0.996	0.995	0.998	0.998	0.999	0.999	1.000	1.000	0.999	0.999	0.999	0.999
S28	0.989	0.999	0.999	0.999	0.994	0.990	0.996	0.997	0.996	0.998	0.997	0.999	1.000	0.997	0.998	0.999
S29	0.996	0.997	0.995	0.998	0.995	0.996	0.998	0.998	0.997	0.997	0.999	0.999	0.997	1.000	0.999	0.998
S30	0.994	0.998	0.996	0.999	0.995	0.994	0.997	0.997	0.996	0.996	0.998	0.999	0.998	0.999	1.000	0.998
R	0.991	0.999	0.998	0.998	0.997	0.994	0.998	0.999	0.997	0.997	0.998	0.999	0.999	0.998	0.998	1.000

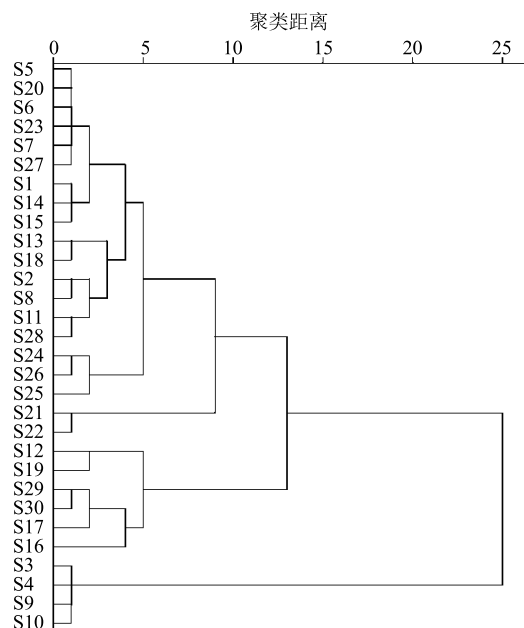


图 2 30 批 XXT 系统聚类分析

Fig. 2 Hierarchical cluster analysis of 30 batches of XXT

毛冬青 (3、7、9、11、16 号峰)、槐花 (5 号峰)、蟾酥 (19、20 号峰), 如图 3 所示。

3 讨论

3.1 波长考察

采用 PDA 检测器, 在 190~400 nm 波长下对 XXT 的供试品溶液进行扫描。在 280 nm 波长下各色谱峰紫外吸收较好, 基线平稳, 谱图较为平整, 共有峰较多且均匀分散^[16]。故综合以上因素选择 280 nm 作为检测波长。

3.2 取样量考察

称取 0.5、1.0、1.5、2.0 g 4 种不同的取样量, 按照“2.2.2”项下供试品溶液制备方法制备样品, 按照“2.1”项下色谱条件测定。通过对不同取样量下共有峰的种类及响应值进行对比发现取样量为 0.5 g 与取样量为 1.0、1.5、2.0 g 所显示色谱峰种类一致, 且取样量为 0.5 g 时的色谱峰也具有较好的响应值。故选择 0.5 g 作为最佳取样量。

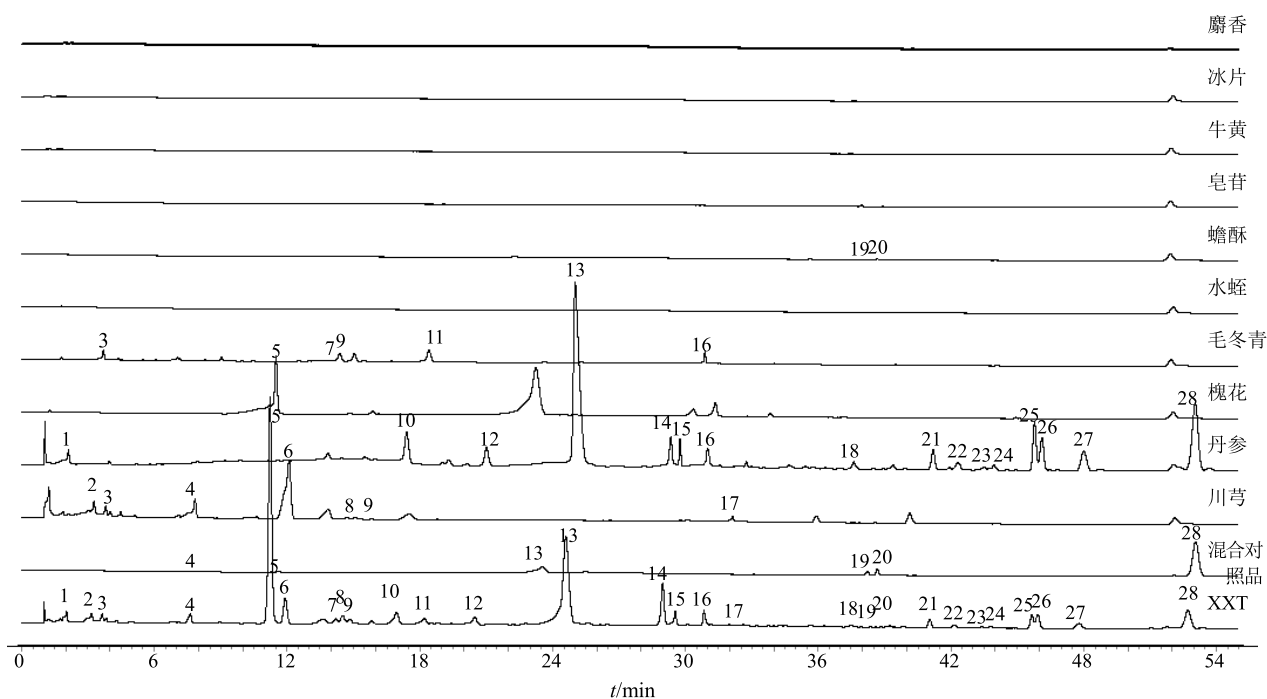


图 3 血栓心脉宁片指纹图谱中各共有峰的归属

Fig. 3 Chromatogram of each common peak attribution in fingerprint of XXT

3.3 提取方法和提取溶剂考察

提取方法分别比较了超声和加热回流 2 种不同的提取方式: 甲醇 25 mL 超声提取 30 min; 甲醇 25 mL 回流提取 30 min。按照“2.1”项下色谱条件测定。结果表明, 超声和回流 2 种不同的提取方法所得色谱峰的种类和峰面积均无明显差异, 所以为了

实验操作简便, 选超声作为最佳提取方式。分别比较 5 种不同提取溶剂水、50%甲醇、甲醇、50%乙醇、80%乙醇的提取效果, 以指纹图谱共有峰的峰面积为指标进行考察^[17]。结果表明, 采用甲醇作为提取溶剂无论是极性大的成分还是极性小的成分均具有较好提取效果, 色谱峰数量相对于其他 4 种溶

剂较多, 所以选择甲醇作为最佳提取溶剂。

3.4 洗脱梯度考察

XXT 由九味中药和人参茎叶总皂苷组成, 成分复杂, 极性波动范围较宽, 所以选择梯度洗脱方式进行洗脱。本实验以共有峰的峰面积、共有峰的分度及样品溶液中的干扰成分为考察指标对多个梯度进行筛选, 最终确定了“2.1”项下的洗脱条件, 在此洗脱梯度条件下各共有峰分离效果相对较好, 基线相对平稳。

4 结论

本研究首次使用 UPLC 建立 XXT 指纹图谱, 在 60 min 内对 30 个批次 XXT 进行分析。其中在 280 nm 波长下标定 28 个共有峰, 标定的共有峰均归属到各药材, 并对其中 6 个色谱峰的化学成分进行指认。采用相似度评价和聚类分析对 XXT 指纹图谱进行评价, 2 种方法的结果基本吻合且 30 个批次间 XXT 相似度较好, 均大于 0.960, 说明不同批次血栓心脉宁的化学成分一致性良好。通过方法学考察表明所建立的指纹图谱方法精密度、稳定性、重复性均良好。综上所述, UPLC-PDA 指纹图谱能更全面表征多个批次 XXT 间质量的一致性和稳定性, 为其临床用药的安全性、有效性、稳定性提供科学依据。

参考文献

- [1] 明磊. 血栓心脉宁片药效物质基础研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2012.
- [2] 龚全友, 叶慧芳, 侯芳丽. 血栓心脉宁片联合银杏达莫治疗冠心病心绞痛的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2017, 32(1): 30-33.
- [3] 赵星宇, 睢大员, 于晓风, 等. 血栓心脉宁片对大鼠急性心肌梗死的保护作用及其机制 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2008, 6(2): 177-179.
- [4] 刘建伟, 曲绍春, 于晓风, 等. 血栓心脉宁片对大鼠实验性脑缺血的保护作用 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2011, 9(3): 333-334.
- [5] 罗向东, 曾宪容, 郭富强. 血栓心脉宁片对急性脑梗死

患者血清 Hcy、hs-CRP 的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2011, 9(9): 1070-1071.

- [6] 王宏, 曲绍春, 于晓风, 等. 血栓心脉宁片对急性血瘀模型大鼠血小板功能及血液流变学的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(22): 3335-3337.
- [7] 张晓天, 李敏, 胡亚, 等. 血栓心脉宁片抑制急性血瘀大鼠血栓形成的研究 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2012, 10(1): 78-79.
- [8] 李园, 谢雁鸣, 刘艳, 等. 运用倾向性评分方法探讨血栓心脉宁片对冠心病治疗结局的影响 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(24): 4791-4796.
- [9] Yang N, Xiong A Z, Wang R, et al. Quality evaluation of traditional Chinese medicine compounds in Xiaoyan Lidan Tablets: Fingerprint and quantitative analysis using UPLC-MS [J]. *Molecules*, 2016, doi:10.3390/molecules 21020083.
- [10] 明磊, 林美好, 张庆贺, 等. 血栓心脉宁片的 HPLC-ELSD 指纹图谱研究 [J]. 中国药房, 2013, 24(7): 639-641.
- [11] 孙冬梅, 林晓燕, 江洁怡, 等. 复方芪麻胶囊 UPLC 指纹图谱建立和同时测定 8 种成分研究 [J]. 中草药, 2016, 47(23): 4186-4191.
- [12] 杨莎, 周瑞, 唐志书, 等. 秦七风湿方 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2017, 48(5): 924-929.
- [13] Shi Y H, Xie Z Y, Wang R, et al. Quantitative and chemical fingerprint analysis for the quality evaluation of *Isatis indigotica* based on ultra-performance liquid chromatography with photodiode array detector combined with chemometric methods [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(12): 9035-9050.
- [14] 董自亮, 夏芳, 官柳, 等. 华盖散制剂-药材谱峰匹配指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2016, 47(3): 425-429.
- [15] 刘潇潇, 戴慧贤, 周颖仪, 等. 不同厂家香砂六君丸的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2015, 46(1): 67-72.
- [16] 曹勇, 郭倩, 田成旺, 等. 疏风解毒胶囊 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2034-2039.
- [17] 周卿意骏, 张水寒, 高尚, 等. 银黄清肺胶囊 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2015, 46(9): 1314-1320.