

降糖通络颗粒 HPLC 指纹图谱研究

刘丽侠^{1,2}, 申林卉^{1,2}, 傅予², 刘庆焕², 陶遵威^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 300073

2. 天津市医药科学研究所, 天津 300020

摘要:目的 建立降糖通络颗粒 HPLC 指纹图谱,为科学地评价降糖通络颗粒的质量提供依据。方法 样品测定采用 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.2%磷酸水为流动相进行梯度洗脱, 采集 230 nm 特征吸收波长下的信号, 记录 10 批样品的 HPLC 特征图谱; 采用“中药色谱指纹图谱超信息特征数字化评价系统”对图谱进行分析。结果 以丹酚酸 B 为参照物, 10 批样品所得特征图谱共标定 18 个共有峰, 相似度均在 0.93 以上。方法的精密性、稳定性和重复性良好。结论 本试验建立的方法克服了单含量测定时信息量有限的缺点, 能较全面、真实地揭示中药材的内在质量特征, 可为降糖通络颗粒的质量控制和评价提供依据。

关键词: 降糖通络颗粒; 指纹图谱; HPLC; 丹酚酸 B

中图分类号: R943.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2014)02-0145-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.02.011

HPLC Fingerprint of Jiangtang Tongluo Granule

LIU Li-xia^{1,2}, SHEN Lin-hui^{1,2}, FU Yu², LIU Qing-huan², TAO Zun-wei²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300073, China

2. Tianjin Institute of Medical Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint analysis for the quality control of Jiangtang Tongluo Granule. **Methods** The HPLC analysis was performed on an Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); Acetonitrile-0.2% orthophosphoric acid aqueous solution was used as the mobile phase eluted gradiently; UV-detector was used to collect the signals at 230 nm wavelength. The HPLC characteristic chromatograms of ten batches of samples were determined. The characteristic chromatograms were comprehensively evaluated by the *Digitized Evaluation System of the Chinese Materia Medica Fingerprint with the Super-information Characteristics*. **Results** Eighteen common peaks were identified in the HPLC characteristic chromatograms of ten batches of Jiangtang Tongluo Granule by using the peak of salvianolic acid B as referential peak. The similarity of the ten batches of samples was over 0.93. The methodological validation results were good. **Conclusion** The fingerprint could effectively control the quality of Jiangtang Tongluo Granule, overcome the limited information of single content determination, and offer the guarantee for revealing the characteristics of traditional Chinese medicinal materials, which could provide the evidence for the identification and quality control of Jiangtang Tongluo Granule.

Key words: Jiangtang Tongluo Granule; fingerprint; HPLC; salvianolic acid B

降糖通络颗粒由赤白芍、丹参、川芎、木瓜等 12 味中药组成, 是天津市武清区中医院制剂, 具有降糖通络、活血调经的作用。从组成方剂的 12 味中药中提取出的成分包括芍药苷、丹酚酸 B、阿魏酸、齐墩果酸等有效成分, 文献中有报道这些成分单含量测定方法^[1-5], 但是本方剂药味多, 成分复杂, 个

别成分的测定不能有效地综合评价复方制剂的内在质量, 且许多中药制剂的药效表明中药是多组分、多靶点共同作用的。HPLC 指纹图谱是评价多组分复杂中药样品整体质量的有效手段^[6], 因此, 本试验尝试采用指纹图谱技术为降糖通络颗粒的质量控制和评价提供依据。

收稿日期: 2013-11-21

基金项目: 天津市中医药管理局中医、中西医结合科研课题项目资助 (11083)

作者简介: 刘丽侠 (1987—), 河北唐山人, 在读硕士研究生, 主要从事中药制剂分析研究。Tel: 15222525911 E-mail: 875716943@qq.com

*通信作者 陶遵威 Tel: (022)27236182 E-mail: taozunwei@yahoo.com.cn

1 仪器与试剂

LC-20AT 高效液相色谱仪 (PDA 检测器, 日本岛津公司); ABS135-S 型电子分析天平 (瑞士梅特勒-托利多公司); KQ-250B 型超声仪 (昆山市超声仪器有限公司) JJ200 型电子天平 (常熟双杰测试仪器厂)。芍药苷对照品 (批号 110736-201136)、桂皮醛对照品 (批号 110710-201016)、阿魏酸对照品 (批号 110733-200611)、齐墩果酸对照品 (批号 110709-200304)、丹酚酸 B 对照品 (批号 110766-200518) 均由中国食品药品检定研究院提供; 降糖通络颗粒, 批号 20120511-20120520, 天津市武清区中医院制剂, 乙腈、甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 乙腈-0.2%磷酸水为流动相, 梯度洗脱: 0~5 min 10%乙腈, 5~40 min 15%乙腈, 40~60 min 20%乙腈, 60~75 min 24%乙腈, 7~590 min 28%乙腈, 90~100 min 39%乙腈, 100~105 min 80%乙腈, 105~115 min 90%乙腈, 115~120 min 10%乙腈; 检测波长 230 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 分析时间 120 min, 平衡时间 10 min, 进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备

取芍药苷、丹酚酸 B、桂皮醛、阿魏酸、齐墩果酸对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解并定容, 制成质量浓度分别为 0.68、0.42、2.12、0.52、0.45 mg/mL 的对照品溶液, 即得。

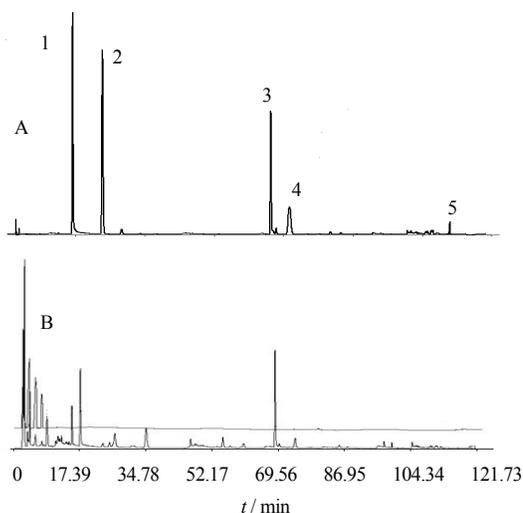
2.3 供试品溶液的制备

精密称取降糖通络颗粒 10.0 g, 精密称定, 加入 75%乙醇 100 mL, 称定质量, 超声提取 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 75%乙醇补足缺失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

3 方法学考察

3.1 系统适用性试验

精密吸取各对照品和供试品溶液分别进样, 记录 230 nm 色谱图。对比保留时间和紫外光谱图可知 3、4、11、12、18 号峰分别是芍药苷、阿魏酸、丹酚酸 B、桂皮醛和齐墩果酸。由丹酚酸 B 与相邻峰分离良好, 出峰时间适中且稳定, 峰面积较大, 因此选作参照物峰。在此系统条件下, 理论塔板数以丹酚酸 B 计算 > 2 000。



1-芍药苷; 2-阿魏酸; 3-丹酚酸 B; 4-桂皮醛; 5-齐墩果酸
1-paeoniflorin; 2-ferulic acid; 3-salvianolic acid B; 4-cinnamic aldehyde;
5-oleanolic acid

图 1 对照品 (A) 和样品 (B) HPLC 图谱

Fig.1 HPLC of reference substance (A) and sample (B)

3.2 精密度试验

精密吸取批号 20120511 的供试品溶液, 连续进样 5 次, 按上述试验方法项下的色谱条件测定, 考察各共有峰的相对保留时间及相对峰面积比值的一致性。结果各共有峰相对保留时间的 RSD < 1.0%, 相对峰面积的 RSD < 3.0%, 表明仪器精密度良好。

3.3 稳定性试验

精密吸取批号 20120511 的供试品溶液, 分别于 0、4、8、16、24、48 h 按上述色谱条件分别测定, 记录指纹图谱, 以丹酚酸 B 色谱峰为参照峰, 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的 RSD < 1.0%, 相对峰面积的 RSD < 3.0%, 表明供试品溶液常温下 48 h 内稳定。

3.4 重复性试验

取同一批号 (批号 20120511) 样品, 分别精密称取 5 份, 按照“2.3”下方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件分别测定, 记录色谱图, 以丹酚酸 B 色谱峰为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果各共有峰相对保留时间的 RSD < 1.0%, 相对峰面积的 RSD < 3.0%, 表明本方法重复性良好。

4 结果

4.1 共有峰的标定

对 10 批样品进行检测, 记录其色谱图, 比较分

析并以共有率 100%计, 确定共有峰为 18 个, 见图 1。10 批供试品 HPLC 图谱各共有峰相对保留时间 RSD%除 10 号峰 (RSD%=3.254) 和 12 号峰 (RSD%=1.121), 其余均 < 1.0, 符合中药指纹图谱要求。结果见表 1 和表 2。

4.2 指纹图谱共有模式的建立及相似度评价

将 10 批降糖通络颗粒 HPLC 色谱图原始信号导入“中药色谱指纹图谱超信息特征数字化评价系统”软件选择 S1 为参照, 用中位数法生成对照图谱及共有模式图谱, 见图 2。进行特征图谱相似度

计算, 结果见表 3。10 批降糖通络颗粒图谱与对照特征图谱的相似度计算结果均 > 0.93, 表明各批次降糖通络颗粒之间具有较好的一致性, 本方法可用于综合评价降糖通络颗粒的整体质量。

5 讨论

本方中有效提取出的有效成分中的芍药苷、齐墩果酸在紫外波长 215~230 nm 下有较大吸收, 阿魏酸、桂皮醛和丹酚酸 B 在 280~310 nm 处有较大吸收^[7]。因此对 215、230、280、310 nm 处的检测图谱比较发现, 在 230 nm 处各成分均有吸收, 且

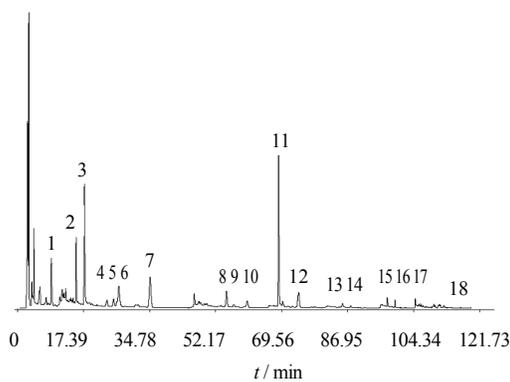


图 1 批号 1 供试品溶液 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC of test solution 1

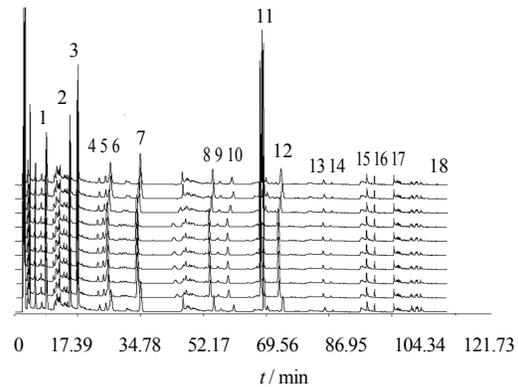


图 2 HPLC 指纹图谱共有模式
Fig. 2 HPLC fingerprints of common model

表 1 10 批降糖通络颗粒的共有峰的峰面积
Table 1 Common peaks area of 10 batches of Jiangtang Tongluo Granule

峰号	样品批次										RSD/%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	
1	0.472 0	0.470 7	0.473 8	0.471 3	0.471 9	0.475 6	0.477 7	0.475 8	0.473 9	0.476 2	0.397
2	0.349 5	0.347 1	0.367 2	0.368 2	0.368 9	0.369 8	0.370 1	0.369 1	0.359 7	0.369 2	0.002
3	1.106 4	1.079 8	1.111 3	1.106 8	1.114 2	1.121 8	1.116 2	1.110 1	1.103 6	1.083 5	1.059
4	0.048 5	0.048 3	0.041 3	0.041 2	0.041 6	0.041 8	0.041 5	0.040 8	0.041 2	0.041 2	0.690
5	0.052 3	0.052 1	0.052 1	0.052 3	0.052 4	0.052 4	0.051 9	0.052 0	0.052 4	0.052 4	0.420
6	0.330 9	0.325 7	0.325 8	0.325 3	0.327 0	0.328 8	0.332 5	0.330 0	0.330 2	0.326 0	0.592
7	0.360 8	0.351 7	0.359 6	0.361 3	0.361 3	0.362 4	0.361 3	0.361 8	0.362 5	0.361 4	0.675
8	0.171 8	0.154 4	0.160 2	0.160 9	0.161 3	0.161 1	0.161 4	0.161 7	0.161 3	0.161 8	0.225
9	0.047 4	0.046 9	0.047 8	0.047 1	0.047 7	0.046 6	0.047 5	0.047 2	0.048 1	0.047 9	0.705
10	0.091 5	0.090 2	0.095 0	0.090 1	0.090 7	0.090 8	0.090 7	0.090 4	0.090 5	0.090 3	1.734
11 (S)	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.307
12	0.168 7	0.160 8	0.168 6	0.167 5	0.167 3	0.168 8	0.168 6	0.169 1	0.166 3	0.167 4	1.696
13	0.049 2	0.048 5	0.048 9	0.048 7	0.048 7	0.049 3	0.049 3	0.048 8	0.048 5	0.048 2	0.651
14	0.020 3	0.020 1	0.019 7	0.020 5	0.020 1	0.020 2	0.020 4	0.023 3	0.023 2	0.021 2	0.835
15	0.014 6	0.014 2	0.014 7	0.014 5	0.014 8	0.014 1	0.014 7	0.014 6	0.014 7	0.014 8	0.218
16	0.050 5	0.050 4	0.050 3	0.051 1	0.051 5	0.051 5	0.051 3	0.050 6	0.051 2	0.051 7	0.705
17	0.048 4	0.048 2	0.048 3	0.048 3	0.048 4	0.048 3	0.048 4	0.048 3	0.048 9	0.048 3	0.359
18	0.002 01	0.001 99	0.002 03	0.001 98	0.002 02	0.002 14	0.002 07	0.002 05	0.002 06	0.001 99	0.685

表2 10批降糖通络颗粒共有峰的保留时间

Table 2 Common peak retention time of 10 batches of Jiangtang Tongluo Granule

峰号	样品批号										RSD/%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	
1	0.127 2	0.127 1	0.127 3	0.126 9	0.127 4	0.126 8	0.127 7	0.126 5	0.126 6	0.126 3	0.129
2	0.224 0	0.224 7	0.225 4	0.225 6	0.225 0	0.224 9	0.225 4	0.225	0.224 5	0.224 9	0.216
3	0.255 4	0.254 9	0.254 8	0.252 7	0.251 7	0.255 5	0.251 1	0.259 5	0.257 0	0.256 5	0.999
4	0.340 4	0.340 5	0.341 4	0.345 4	0.344 4	0.342 4	0.343 4	0.345 4	0.339 9	0.338 9	0.685
5	0.363 7	0.363 5	0.364 1	0.363 6	0.363 3	0.364 5	0.357 6	0.365 2	0.364 5	0.364 9	0.595
6	0.382 4	0.382 4	0.381 9	0.382 5	0.383 4	0.379 9	0.378 8	0.388 8	0.384 8	0.377 8	0.819
7	0.502 4	0.511 1	0.509 8	0.507 5	0.501 1	0.505 2	0.500 0	0.498 5	0.501 3	0.502 3	0.851
8	0.796 4	0.796 9	0.796 8	0.794 5	0.794 9	0.793 4	0.795 4	0.792 3	0.796 8	0.797 9	0.221
9	0.828 7	0.823 3	0.824 1	0.821 4	0.822 2	0.825 1	0.822 9	0.824 2	0.823 5	0.821 2	0.262
10	0.872 5	0.866 7	0.899 7	0.875 7	0.910 0	0.889 0	0.807 0	0.881 7	0.872 4	0.899 8	3.254
11	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.000
12	1.055 6	1.078 9	1.057 6	1.059 9	1.068 7	1.069 8	1.068 8	1.094 7	1.057 0	1.065 7	1.121
13	1.251 9	1.242 5	1.250 4	1.250 2	1.250 5	1.259 9	1.248 9	1.251 5	1.240 8	1.249 5	0.417
14	1.283 4	1.277 8	1.298 9	1.284 8	1.278 8	1.279 8	1.282 8	1.285 8	1.283 8	1.279 8	0.470
15	1.402 8	1.394 0	1.389 4	1.406 4	1.398 4	1.394 0	1.405 4	1.407 4	1.401 5	1.434 0	0.878
16	1.426 4	1.445 2	1.424 2	1.427 2	1.424 2	1.427 6	1.426 2	1.428 2	1.425 4	1.434 2	0.448
17	1.536 0	1.534 3	1.537 3	1.538 3	1.537 6	1.533 3	1.537 7	1.535 6	1.534 9	1.537 6	0.110
18	1.674 1	1.677 7	1.675 4	1.679 0	1.677 6	1.673 4	1.674 6	1.675 9	1.674 4	1.673 5	0.116

表3 10批降糖通络颗粒指纹图谱相似度计算结果

Table 3 Fingerprint's similarity of 10 batches of Jiangtang Tongluo Granule

样品批号	对应图谱号	相似度	
		参照图谱	对照图谱
1	S1	1.000	0.997
2	S2	0.993	0.997
3	S3	0.994	0.992
4	S4	0.995	0.996
5	S5	0.996	0.996
6	S6	0.997	0.995
7	S7	0.995	0.996
8	S8	0.994	0.997
9	S9	0.992	0.994
10	S10	0.995	0.993

信号较强,但在 280 nm 以上芍药苷几乎没有吸收,为使信息全面化和最大化,因此选择 230 nm 作为检测波长。

本文采用单因素试验对不同浓度提取溶剂(50%甲醇、75%甲醇、甲醇、稀乙醇、75%乙醇、95%乙醇)、不同提取时间(30、45、60、90、120

min)、不同提取方式(超声、回流)进行考察,最终确定在 75%乙醇超声 60 min 提取的条件下,出峰数最多。

由于样品组分复杂,采用等度洗脱各组分色谱峰分离不理想,因此采用梯度洗脱。试验先后采用甲醇-水、乙腈-水、乙腈-磷酸水等不同流动相系统,最终发现以乙腈-磷酸水为流动相梯度洗脱得到的图谱中色峰峰形和分离度均较好,且出峰最多。样品 150 min 图谱显示 120 min 后无特征峰出现,故确定分析时间为 120 min。

通过比较对照发现,3号峰是芍药苷对照品峰,为降糖通络颗粒主要成分赤芍的主成分峰,峰面积大,但由于其出峰时间不是特别稳定,不能作为参照物,11号峰为丹酚酸 B 峰,由于它与相邻峰分离良好,出峰时间适中且稳定,峰面积较大,因此选作参照峰。

本文建立了降糖通络颗粒的 HPLC 色谱指纹图谱,经指纹图谱分析,10批降糖通络颗粒的质量一致,稳定性好。本方法简便,重复性好,因此保证了建立的指纹图谱可以更有针对性地控制降糖通络颗粒的质量。

参考文献

- [1] 代冬梅, 陆萍, 江海亮, 等. 不同产地及引种栽培白芍药材指纹图谱研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(3): 717-719.
- [2] 任江剑, 陈斌龙, 俞旭平, 等. 不同白芍药材中芍药苷含量比较研究 [J]. 中国现代中药, 2010, 12(7): 22-24.
- [3] 杨丽, 胡昌江, 周维, 等. 川芎配方颗粒质量标准研究 [J]. 中国药业, 2012, 21(10): 28-29.
- [4] 何昱, 李晓如, 李冰心, 等. HPLC-DAD 法同时测定丹参中丹酚酸 B 和隐丹参酮的含量 [J]. 现代中药研究与实践, 2010, 24(5): 78-81.
- [5] 宋利辉, 张蓉, 万红菊, 等. HPLC 法测定桂枝茯苓片中桂皮醛的含量 [J]. 湖北中医学院学报, 2010, 12(2): 39-41.
- [6] 李文博, 韩建平, 高钧, 等. 养血清脑颗粒的高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 分析化学, 2011, 39(3): 387-391.
- [7] 中国药典 [S]. 一部. 2010.