

赤丹胶囊的 HPLC 指纹图谱研究

徐英宏, 姜清华, 菅凌燕, 李玉灵*

(中国医科大学附属盛京医院 药剂科, 辽宁 沈阳 110004)

摘要:目的 建立了赤丹胶囊制剂的 HPLC 指纹图谱, 用于控制赤丹胶囊的质量。方法 采用 HPLC 法。色谱柱为 Zorbax Extend-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水(磷酸调 pH 3.0), 梯度洗脱; 体积流量为 1 mL/min; 检测波长为 254 nm; 柱温为 20 ℃; 进样量为 10 μL。中药色谱指纹图谱相似度评价系统的操作规范(版本 2004A) 计算。结果 该制剂 10 批的指纹图谱相似度都达到 0.90 以上, 制剂生产工艺稳定可行。结论 本法可作为赤丹胶囊质量控制方法。

关键词: 赤丹胶囊; 指纹图谱; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)07-1069-02

赤丹丸是医院制剂, 由赤芍、丹参、黄芩、茯苓、三棱组成, 具有清热解毒、活血化瘀的功效, 用于治疗妇女慢性盆腔炎、附件炎, 临床应用 30 余年证明, 疗效确切。赤丹胶囊是在研究赤丹丸的基础上, 经过提取加工制成。赤丹胶囊成分复杂, 其药效并不仅仅取决于其中某几个有效成分, 而且由于药材的品种、产地、采集时间、加工方法等诸多因素都会影响中药质量的稳定性和一致性^[1,2]。所以为了更好地控制制剂质量, 本研究对赤丹胶囊的指纹图谱进行了研究, 达到全面控制其质量的目的。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 液相色谱仪(含 Agilent 1100 系列四元泵、VWD 检测器、Agilent Chemstation 色谱工作站)。

丹参、赤芍、黄芩、茯苓和三棱购自北京京兴中药饮片厂, 符合《中国药典》2005 年版一部规定; 赤芍胶囊由中国医科大学附属盛京医院中药制剂室提供。丹参素钠(批号 110855)、丹参酮(批号 0736-200118)、芍药苷(批号 110736-200630)、黄芩苷(批号 715-200010)、黄芩素(批号 111595-200604)、原儿茶酸(批号 809-200102)、咖啡酸(批号 110885-200102)、丹酚酸 B(批号 110857-200203) 对照品均由中国药品生物制品检定所提供; 山柰酚(Sigma 公司); 汉黄芩素、汉黄芩苷(沈阳药科大学)。甲醇、乙腈为色谱纯, 水为自制重蒸水, 其他均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 Zorbax Extend-C₁₈ 柱

(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水(磷酸调 pH 3.0), 梯度洗脱^[3,4], 0~20 min, 30:70, 20~25 min, 36:64, 25~40 min, 38:62, 40~60 min, 40:60, 60~90 min, 50:50, 90 min 以后, 70:30; 体积流量为 1 mL/min; 检测波长为 254 nm; 柱温为 20 ℃; 进样量为 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液的制备: 取本品 10 粒, 倒出内容物, 精密称取约 0.75 g, 置于锥形瓶中, 加入甲醇约 30 mL, 超声处理 30 min, 放冷, 4 500 r/min 离心 15 min, 挥干甲醇, 加入 10 mL 水溶解, 分别用 10 mL 正丁醇萃取 3 次, 弃去水层, 合并正丁醇层, 挥干正丁醇, 置 50 mL 量瓶中, 加入甲醇至刻度, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2.2 阴性样品溶液的制备: 除赤丹胶囊提取物外, 按处方比例称取各辅料, 按赤丹胶囊的制备工艺制成 10 粒, 作为阴性样品溶液。

2.3 记录时间的确定: 取供试品溶液 10 μL 注入液相色谱仪, 记录 150 min 的色谱图, 结果 130 min 后不再出峰, 故记录色谱时间定为 130 min。

2.4 方法学考察^[5]

2.4.1 精密度试验: 取同一份供试品溶液, 按上述优选的色谱条件连续进样 6 次, 每次 10 μL, 记录色谱图, 经中药色谱指纹图谱相似度评价系统的操作规范(版本 2004A) 计算, 6 张图谱之间的相似度均为 1.0, 说明测定方法的精密密度很好。

2.4.2 重现性试验: 取 1 号样品 50 粒, 倒出内容物, 研细, 混匀, 取 5 份, 每份精密称取约 0.75 g, 置

* 收稿日期: 2008-11-07

基金项目: 辽宁省科学技术基金资助项目(20042189)

作者简介: 徐英宏(1961—), 女, 山东莱阳人, 副教授, 1984 年毕业于沈阳药学院药学专业, 主持一项并参与多项省级课题研究项目, 完成论文 50 余篇, 主要研究方向为医院制剂研发。Tel: (024) 83946764 E-mail: xuyh@sj-hospital.org.cn

于锥形瓶中,制备供试品溶液,各取 10 μ L 注入液相色谱仪,记录 130 min 色谱图,经中药色谱指纹图谱相似度评价系统的操作规范(版本 2004A)计算,图谱之间的相似度均为 1.0。

2.4.3 稳定性试验:取同一供试品溶液,分别于 0、3、6、9、12、18、24、36 h 测定,测定结果经中药色谱指纹图谱相似度评价系统的操作规范(版本 2004A)计算,相似度均为 1.0, RSD 为 0.12%,说明本品在 36 h 内是稳定的。

2.5 指纹图谱的建立与相似度分析:取 10 批样品按上述制备方法制备及色谱条件进样,测定每批次的色谱图,采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统研究版(2004A)进行评价,以 S1 为参照图谱,利用中位数法进行多点校正生成对照图谱 R,确定了 24 个共有峰,见图 1。10 批制剂的相似度均达到 0.903 以上,见图 2。从以上相似度评价结果看,符合国家药典委的要求,说明该制剂各批次相似度良好,制备方法稳定。

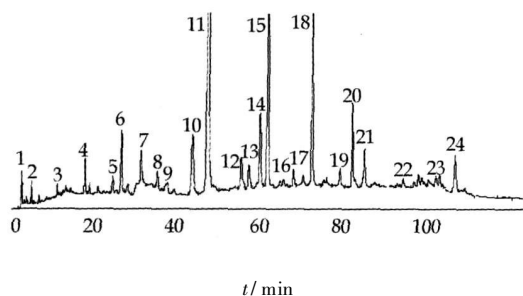


图 1 赤丹胶囊的指纹图谱色谱图

Fig 1 Fingerprint chromatogram of Chidan Capsula

2.6 药材与制剂指纹图谱相关性研究:分别制备处方中 5 味药材的供试品溶液及其相应的阴性溶液,取各药材供试品溶液,按上述色谱条件依次进行检测,各药材供试品峰与制剂指纹图谱峰——对照,可知共有峰中 1、2、6 号峰来源于处方中赤芍;2、4、7、10、24 号峰来源于方中丹参;11、15、18、20 号峰来源于方中黄芩。利用对照品鉴定共有峰,结果共有峰中的 2 号峰为咖啡酸,4 号峰为原儿茶酸,6 号峰为芍药苷,7 号峰为丹参素钠,10 号峰为丹酚酸 B,11 号峰为黄芩苷,15 号峰为黄芩素,18 号峰为汉黄芩

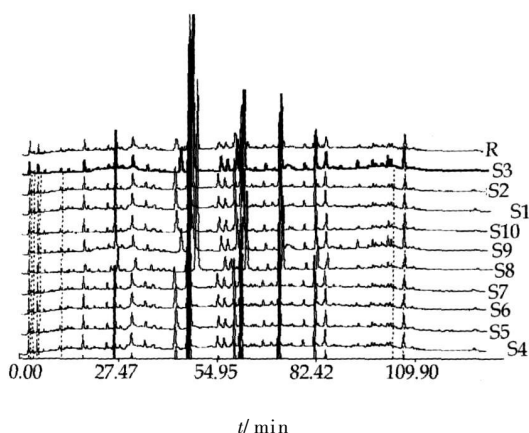


图 2 赤丹胶囊指纹图谱相似度评价结果

Fig 2 Fingerprint similarity of Chidan Capsula

素,19 号峰为山柰酚,20 号峰为汉黄芩苷,24 号峰为丹参酮 A_1 。

3 讨论

根据赤丹胶囊中各主要成分的吸收波长,本实验分别比较了 242、254、270、280 nm 波长下的色谱图,发现 242 nm 下虽然极性较大的峰相应值较高,但基线漂移严重,而 270 nm 和 254 nm 各峰分离度都较好,峰数较多且基线漂移低,考虑 254 nm 下各峰响应值较高,因此选择检测波长为 254 nm。

比较了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-水(乙酸调 pH 值)、甲醇-四氢呋喃-水、甲醇-水(磷酸调 pH 值)等不同体系。依据药材的流动相体系,最后选择甲醇-水(磷酸调 pH 3.0)体系,效果最好。

通过药材与制剂指纹图谱相关性研究表明,制剂指纹图谱中的色谱峰多为赤芍、黄芩和丹参的。

参考文献:

- [1] 晏永新,钟铁,张小娟,等.山银花不同产地加工品的 HPLC 指纹图谱研究[J].中草药,2007,38(11):1643-1645
- [2] 罗晓芳,莫必琪,叶颖雅,等.混合均一化法对复方丹参提取物质量控制的研究[J].中草药,2007,38(12):1817-1819
- [3] 杨广德,贺浪冲,李永茂.丹参有效部位指纹图谱定性和有效成分定量分析方法研究[J].药物分析杂志,2003,23(6):409-413
- [4] 中药注射剂色谱指纹图谱研究操作规程指南(试行)[S].2001
- [5] Niu F, Niu Z Q, Xie G B, et al. Development of an HPLC fingerprint for quality control of *Radix Semiaquilegiae* [J]. Chromatographia, 2006, 64(9/10): 593-597