

24 h 进样测定,每次 60 μL ,计算峰面积的 RSD 值,结果绿原酸、吴茱萸内酯、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的分别为 1.64%、1.69%、1.58%、1.39%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.9 回收率试验:取批号为 080901 样品,精密称取 1 g,按样品溶液处理方法制备吴茱萸汁,重复 6 份,分别加入绿原酸、吴茱萸内酯、吴茱萸碱、吴茱萸次碱对照品 6.823、7.885、0.421、0.382 mg,按上述色谱条件测定,计算加样回收率,结果绿原酸、吴茱萸内酯、吴茱萸碱、吴茱萸次碱的回收率分别为 96.11%、109.86%、98.78%、98.65%,RSD 分别为 1.08%、2.16%、1.72%、2.06%。

2.10 样品测定:取 5 批样品,每批平行 3 份,制备供试品溶液,按上述色谱条件测定,外标法计算,各成分的测定结果见表 2。

表 2 吴茱萸汁中各成分的测定结果($n=3$)

Table 2 Determination of every component in Fructus Evodiae juice ($n=3$)

批号	绿原酸/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	吴茱萸内酯/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	吴茱萸碱/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	吴茱萸次碱/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
080901	6.855	7.969	0.407	0.391
080902	6.751	8.080	0.408	0.407
080903	6.300	8.259	0.447	0.403
080904	6.636	8.376	0.384	0.348
080905	6.646	8.479	0.383	0.351

3 讨论

实验中对绿原酸、吴茱萸内酯、吴茱萸碱、吴茱萸次碱进行全波长扫描发现,绿原酸在 324 nm 有最大吸收,吴茱萸内酯在 205 nm 有最大吸收,且在其他波长吸收很弱,吴茱萸碱和吴茱萸次碱在 225 nm 处有最大吸收;为便于检测,且考虑到样品中各成分含量不高,故选用 205、225、324 nm 同时测定

吴茱萸汁中成分。该方法准确、可靠、重现性好,可以用于辅料吴茱萸汁的质量控制。

在吴茱萸汁的制备过程中,采用了正交试验优选出的吴茱萸最佳水提工艺,即加入 16 倍量的水,提取 3 次,每次 1.5 h。实验中发现,不宜将吴茱萸药材粉得太细,否则在水煎煮过程中易起泡且会影响吴茱萸中有效成分的溶出,此结论也与文献报道一致^[7]。本实验中未粉碎,在提取前浸泡 30 min 后加热提取,效果较好。

萸黄连作为一种传统的炮制工艺,能一直沿用至今,可见其临床疗效确切;但是,迄今为止仍未有对萸黄连及其辅料进行质量控制的统一标准,这给辅料生产制备带来了随意性,工艺不规范、质量不明确,其质量好坏无从考证和判断。这样,严重影响了辅料的质量和其在主药中所发挥的作用。因此,为提高辅料的质量,开展辅料制备工艺规范化研究,并制定出切实可行的质量标准意义重大。本研究对吴茱萸汁进行成分分析和质量控制为萸黄连炮制辅料的质量标准的制定提供了重要依据。

参考文献:

- [1] 龚千锋. 中药炮制学[M]. 北京:中国中医药出版社,2005.
- [2] 王奇志,梁敬钰. 吴茱萸属植物化学成分和生理活性的研究近况[J]. 中草药,2004,35(8):7-10.
- [3] 周红祖,余惠,彭求贤. 黄连与吴茱萸及其不同配伍的化学成分、药理及药性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(9):75-77.
- [4] Chuang W C, Chu C Y, Sheu S J, et al. Determination of the alkaloids in *Evodiae Fructus* by high performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 1996, 727: 317-323.
- [5] 王世永,李小定. 吴茱萸中吴茱萸碱和次碱的提取及测定[J]. 湖北农业科学,2008,47(3):41-343.
- [6] 雷培海. 吴茱萸指纹图谱研究[D]. 贵阳:贵州大学,2006.
- [7] 廖庆文,罗杰英,鄢丹. 正交试验优选左金漂浮片中挥发油提取工艺研究[J]. 中国药业,2006,15(14):3-4.

化痰通脉汤的 HPLC 指纹图谱研究

马 瑛,刘 芳,柴士伟

(天津中医药大学第一附属医院,天津 300193)

摘要:目的 建立化痰通脉汤剂的高效液相色谱指纹图谱,以评价化痰通脉汤剂的质量。方法 采用大连依利特 Hypersil ODS2 C_{18} 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.05%甲酸,梯度洗脱;体积流量:1.0 mL/min;检测波长:280 nm;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;进样量:20 μL 。测定了 12 批化痰通脉汤剂并进行指纹图谱分析。结果 建立了丹参水溶性成分指纹图谱共有模式,显示 14 个共有峰,指认了阿魏酸、丹酚酸 B 2 个特征峰。结论 指纹图谱色谱图中

收稿日期:2009-10-30

作者简介:马 瑛(1969—),女,天津人,副主任药师,硕士,主要从事中药鉴定、临床药学等。

Tel:13821150121 E-mail:jubo@sohu.com

各个峰分离度较好,特征明显,可作为化瘀通脉汤的质量控制标准。

关键词:化瘀通脉汤;阿魏酸;丹酚酸 B;指纹图谱;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(2010)03-0398-03

化瘀通脉汤是天津中医药大学第一附属医院的医院制剂,由丹参、川芎、当归、鸡血藤组成,具有活血、化瘀、通脉的功效,在治疗神经性疼痛、不稳定性心绞痛、颈椎病、静脉血栓等具有良好疗效^[1-5]。药理实验表明化瘀通脉汤有降低血浆 ET-1、ICAM-1 及提高血浆 NO 水平的作用^[5]。近年来对化瘀通脉汤质量标准也进行了相关研究^[6]。指纹图谱用于中药制剂的质量控制的研究报道较多^[7,8]。本实验拟采用中药指纹图谱技术对化瘀通脉汤化学成分的数量、种类和各成分的量进行控制,从而实现从宏观和整体角度全面控制化瘀通脉汤的质量。

1 仪器与材料

Waters 600E 液相色谱仪(配有 UV 检测器、四元梯度泵、在线脱气装置、自动进样器,Empower 工作站,美国 Waters 公司)。AX205 分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。

甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为超纯水,丹酚酸 B、阿魏酸对照品购于中国药品生物制品检定所,化瘀通脉汤均来源于天津中医药大学第一附属医院煎药室。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备:精密称取阿魏酸对照品 5 mg,置 25 mL 量瓶中,用 50% 甲醇溶解,并稀释至刻度,摇匀,即得。精密称取丹酚酸 B 对照品 5 mg,置 25 mL 量瓶中,用水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2 供试品溶液的制备:取化瘀通脉汤 100 mL,减压浓缩至干,加 50% 甲醇溶解,定容至 25 mL。进样前用 0.45 μm 滤膜滤过。

2.3 色谱条件:大连依利特 Hypersil ODS2 C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.05% 甲酸(梯度洗脱);体积流量:1.0 mL/min;检测波长:280 nm;柱温:30;进样量:20 μL。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验:分别吸取供试品溶液(批号 090512)各 20 μL,连续进样 5 次,结果 14 个共有峰保留时间的 RSD 均小于 3%,相对峰面积的 RSD 均小于 3%。

2.4.2 稳定性试验:取供试品溶液(批号 090512) 20 μL,分别在 0、4、8、12、24、48 h 进样 6 次。结果 14 个共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 3%,相对峰面积的 RSD 均小于 5%,说明 48 h 内供试品溶液

稳定性较好。

2.4.3 重现性试验:取供试品溶液(批号 090512) 5 份,制备供试品溶液,取供试品溶液 20 μL,依法进样分析,结果 14 个共有峰保留时间的 RSD 均小于 3%,相对峰面积的 RSD 均小于 5%。

2.5 对照指纹图谱的绘制和相似度分析:对 12 批化瘀通脉汤进行指纹图谱分析,采用国家药监局推荐使用的“计算机辅助中药指纹图谱相似度计算软件”对测定结果进行拟合,得到化瘀通脉汤的指纹图谱共有模式(图 1、2)。所建立的对照指纹图谱包含 14 个共有峰。对 12 批样品进行相似度检测,结果表明样品的相似度均在 0.92 以上,见表 1。

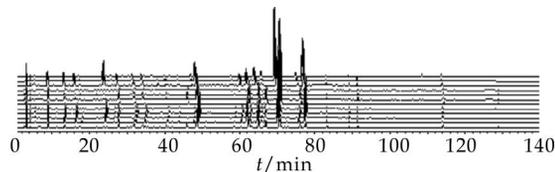


图 1 12 批化瘀通脉汤的指纹图谱

Fig. 1 Fingerprint of 12 batches of Huayu Tongmai Decoction

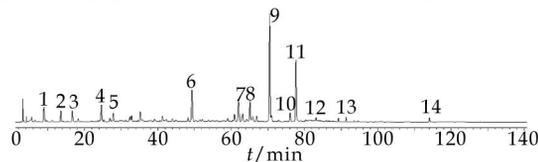


图 2 化瘀通脉汤共有模式图谱

Fig. 2 Common fingerprint of Huayu Tongmai Decoction

表 1 不同批次化瘀通脉汤指纹图谱与共有模式比较的相似度

Table 1 Comparison of Resemblance among Huayu Tongmai Decoction from different batches with mutual mode

批号	相似度	批号	相似度
1	0.921	7	0.932
2	0.937	8	0.956
3	0.921	9	0.967
4	0.988	10	0.921
5	0.981	11	0.927
6	0.926	12	0.974

2.6 指纹图谱的建立:分析 12 批化瘀通脉汤,第 4 号样品与对照指纹图谱有最好的相似性,相似度 0.988,表示可作为化瘀通脉汤的指纹图谱。色谱图中 6 号峰为阿魏酸,9 号峰为丹酚酸 B(图 3)。以图中 6 号峰为参照峰,12 批化瘀通脉汤 14 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积见表 2、3。

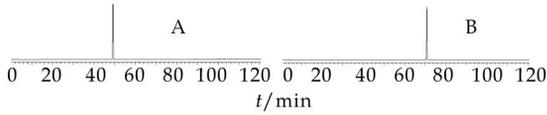


图 3 阿魏酸(A)和丹酚酸 B(B)对照品的 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC Chromatograms of ferulic acid (A) and salvianolic acid B reference substance (B)

3 讨论

在实验过程中,考察了 230、250、270、280、290 nm 的指纹色谱图,结果表明,在 280 nm 下检测到的色谱指纹图谱信息量大,特征性强,具有较好的代表性,且不同成分的响应值较为均匀,因此选择 280 nm 作为检测波长。

表 2 化瘀通脉汤指纹图谱中各共有峰的相对保留时间

Table 2 Relative retention time of common peaks in fingerprints of Huayu Tongmai Decoction

样品	各峰相对保留时间													
	1	2	3	4	5	6(s)	7	8	9	10	11	12	13	14
1	0.18	0.27	0.33	0.49	0.56	1.00	1.24	1.33	1.44	1.56	1.59	1.72	1.90	2.36
2	0.18	0.27	0.34	0.50	0.57	1.00	1.24	1.32	1.43	1.55	1.58	1.70	1.87	2.33
3	0.18	0.27	0.33	0.49	0.56	1.00	1.24	1.33	1.44	1.56	1.59	1.71	1.88	2.35
4	0.17	0.27	0.33	—	0.56	1.00	—	1.33	1.44	1.56	1.59	1.70	1.88	2.34
5	0.17	0.27	0.33	0.49	0.56	1.00	1.24	1.33	1.43	1.56	1.59	1.71	1.87	2.35
6	0.18	0.26	0.34	0.49	0.57	1.00	1.24	1.33	1.44	1.56	1.59	1.71	1.88	2.36
7	0.18	0.27	0.33	0.49	0.55	1.00	1.24	1.32	1.43	1.56	1.57	1.71	1.89	2.34
8	0.18	0.26	0.33	0.49	0.56	1.00	1.24	1.34	1.44	1.55	1.59	1.72	1.88	2.35
9	0.17	0.27	0.33	0.49	0.55	1.00	1.23	1.33	1.42	1.56	1.59	1.72	1.89	2.35
10	0.18	0.27	0.34	—	—	1.00	1.24	1.33	1.44	1.55	1.58	1.71	1.88	2.36
11	0.18	0.27	0.33	0.50	0.57	1.00	1.24	1.33	1.44	1.56	1.59	1.72	1.89	2.34
12	0.18	0.27	0.34	0.49	0.55	1.00	1.24	1.32	1.43	1.55	1.59	1.71	1.88	2.34
平均值	0.18	0.27	0.33	0.49	0.56	1.00	1.24	1.33	1.44	1.56	1.59	1.71	1.88	2.35

表 3 化瘀通脉汤指纹图谱中各共有峰的相对峰面积

Table 3 Relative peak area of common peaks in fingerprints of Huayu Tongmai Decoction

样品	各峰相对峰面积													
	1	2	3	4	5	6(s)	7	8	9	10	11	12	13	14
1	0.66	0.54	0.44	1.03	0.25	1.00	0.33	0.51	2.41	0.17	2.33	0.05	0.10	0.12
2	0.83	0.49	0.57	0.74	0.41	1.00	0.59	0.76	3.02	0.49	2.84	0.12	0.08	0.19
3	1.02	0.96	0.65	1.94	0.26	1.00	0.69	0.64	2.06	0.14	3.13	0.08	0.12	0.16
4	0.64	0.58	0.45	0.95	0.21	1.00	0.35	0.57	2.51	0.16	2.23	0.05	0.11	0.14
5	0.46	0.47	0.41	—	0.19	1.00	—	0.43	1.58	0.18	0.00	0.06	0.08	0.11
6	1.34	0.12	0.82	1.96	0.31	1.00	0.67	0.69	2.54	0.19	3.51	0.09	0.07	0.15
7	0.32	0.20	0.34	0.78	0.31	1.00	0.22	0.47	2.54	0.27	1.17	0.12	0.19	0.14
8	0.37	0.24	0.28	0.53	0.20	1.00	0.18	0.50	2.84	0.20	1.51	0.04	0.05	0.10
9	0.72	0.56	0.62	1.27	0.34	1.00	0.48	0.60	2.62	0.26	2.42	0.07	0.07	0.09
10	0.51	0.61	0.46	—	—	1.00	0.57	0.42	2.59	0.13	2.21	0.06	0.09	0.13
11	0.39	0.28	0.31	0.64	0.27	1.00	0.25	0.42	2.79	0.23	2.14	0.06	0.09	0.14
12	0.73	0.61	0.54	1.01	0.32	1.00	0.39	0.54	2.81	0.19	2.29	0.06	0.12	0.09

通过对化瘀通脉汤的 HPLC 指纹图谱研究,为化瘀通脉汤的物质基础提供了部分数据,同时为其汤剂中各水溶性成分的稳定性提供了参考,为化瘀通脉汤质量控制提供了科学和全面的方法。

参考文献:

[1] 冯 辉,沈 莉. 化瘀通脉汤剂配合针刺治疗神经性头痛 60 例[J]. 天津中医药,2007,24(4):331.
 [2] 曲 凡. 化瘀通脉液治疗不稳定性心绞痛 30 例[J]. 天津中医学院学报,2000,19(4):12.
 [3] 张宏达,田 苓. 手法并化瘀通脉口服液治疗椎动脉型颈椎病 480 例临床观察[J]. 天津中医学院学报,2004,23(4):201.

[4] 张学勇. 中西药治疗下肢深静脉血栓形成 82 例临床体会[J]. 天津中医药,2008,25(1):20-22.
 [5] 毛静远,张 宇,李 谈,等. 化瘀通脉注射液对大鼠主动脉球囊损伤后内皮素-1、一氧化氮、黏附分子-1 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(4):48-50.
 [6] 刘 芳,辛晓晶,柴士伟. 化瘀通脉汤剂质量标准的研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2009,11(6):228-229.
 [7] 鄢 燕,汤宏敏,饶 毅,等. 血府逐瘀口服液的高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中草药,2009,40(4):566-568.
 [8] 霍翠翠,徐兰兰,尚 强,等. 痛安注射液 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中草药,2009,40(4):569-571.