

冠心舒通胶囊 HPLC 指纹图谱研究

周菲菲, 王彬杰, 张元媛, 毕开顺, 陈晓辉*, 张晖芬*

沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016

摘要:目的 建立冠心舒通胶囊的 HPLC 指纹图谱, 为其质量评价提供依据。方法 采用 Agilent TC-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 在 280 nm 波长下, 以 0.05% 磷酸水溶液-乙腈为流动相进行梯度洗脱, 柱温为 30 ℃, 体积流量为 1.0 mL/min。测定 10 批冠心舒通胶囊样品, 应用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2009 版) 建立冠心舒通胶囊 HPLC 指纹图谱, 并通过对照品对共有峰进行指认。结果 通过 10 批样品的测定, 建立冠心舒通胶囊 HPLC 指纹图谱, 相似度均在 0.95 以上, 共标定 45 个共有色谱峰, 34 个共有峰归属到各药材, 其中 5 个共有峰来源于广枣, 23 个共有峰来源于丹参, 7 个共有峰来源于丁香 (其中 1 号峰为广枣和丁香共有), 并通过对照品比较指认了其中 13 个色谱峰, 分别为没食子酸 (1 号峰)、丹参素 (3 号峰)、原儿茶酸 (5 号峰)、原儿茶醛 (6 号峰)、鞣花酸 (10 号峰)、迷迭香酸 (16 号峰)、丹酚酸 B (19 号峰)、丹酚酸 A (23 号峰)、丁香酚 (24 号峰)、二氢丹参酮 I (30 号峰)、隐丹参酮 (34 号峰)、丹参酮 I (35 号峰)、丹参酮 II_A (39 号峰)。结论 此方法专属性强、准确可靠、重复性好, 可为冠心舒通胶囊的质量控制提供依据。

关键词: 冠心舒通胶囊; HPLC; 指纹图谱; 质量控制; 没食子酸; 丹参素; 原儿茶酸; 原儿茶醛; 鞣花酸; 迷迭香酸; 丹酚酸 B; 丹酚酸 A; 丁香酚; 二氢丹参酮 I; 隐丹参酮; 丹参酮 I; 丹参酮 II_A

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)07-1137-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.07.013

HPLC fingerprint of Guanxin Shutong Capsule

ZHOU Fei-fei, WANG Bin-jie, ZHANG Yuan-yuan, BI Kai-shun, CHEN Xiao-hui, ZHANG Hui-fen

School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for fingerprint analysis of Guanxin Shutong Capsule (GSC) for its quality control. **Methods** The chromatographic behaviors were obtained by an Agilent TC-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with gradient elution using 0.05% phosphoric acid and acetonitrile as the mobile phase. The column temperature was set at 30 ℃ and the flow rate was 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 280 nm. The common mode of HPLC fingerprint for 10 batches of GSC was established with *Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine* (2009 edition) and the common peaks were identified by reference compounds. **Results** Fingerprints of 10 batches of GSC were established and the similarities to the common mode were above 0.95. Totally 45 common peaks were found, and 34 belonged to herbs. Five mutual peaks were from *Choerospondias axillaris*, 23 mutual peaks were from *Salvia miltiorrhiza*, and seven mutual peaks were from *Syzigium aromaticum*. Based on the retention time of reference substances, 13 constituents including gallic acid (peak 1), danshensu (peak 3), procatechuic acid (peak 5), procatechuic aldehyde (peak 6), ellagic acid (peak 10), rosmarinic acid (peak 16), salvianolic acid A (peak 19), salvianolic acid B (peak 23), eugenol (peak 24), dihydrotanshinone I (peak 30), cryptotanshinone (peak 34), tanshinone I (peak 35), and tanshinone II_A (peak 39) were identified. **Conclusion** This method is specific and reliable, which will be conducive to the quality control of GSC.

Key words: Guanxin Shutong Capsule; HPLC; fingerprint; quality control; gallic acid; danshensu; procatechuic acid; procatechuic aldehyde; ellagic acid; rosmarinic acid; salvianolic acid B; salvianolic acid A; eugenol; dihydrotanshinone I; cryptotanshinone; tanshinone I; tanshinone II_A

收稿日期: 2015-09-18

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (81303197)

作者简介: 周菲菲, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药质量控制方法研究。Tel: (024)23986259 E-mail: zhouffsyk@163.com

*通信作者 张晖芬, 女, 博士, 研究方向为中药质量控制方法研究与药效物质基础研究。Tel: (024)23986259 E-mail: zhanghfsyk@163.com

陈晓辉, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药质量控制方法与药效物质基础研究。

Tel: (024)23986259 E-mail: cxh_syphu@hotmail.com

冠心舒通胶囊为蒙古验方,由广枣、丹参、丁香、天竺黄、冰片 5 味药材制成,具有活血化瘀、通经活络、行气止痛的功效,临床用于治疗心绞痛引起的胸痛、胸闷、心慌、气短等症^[1]。药理实验表明,冠心舒通胶囊可以降低动脉粥样硬化大鼠的血脂水平,调节血液流变学指标,从而保护血管,起到抗动脉粥样硬化的作用^[2];对大鼠脑缺血再灌注和心肌缺血再灌注损伤具有保护作用^[3-4];具有明显的保护心肌、改善心肌缺血、心肌梗死的作用,并对心肌缺血、心肌梗死所致血液流变性改变具有良好的改善作用^[5];可通过抑制心肌组织基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 表达治疗慢性心力衰竭^[6]。目前,关于冠心舒通胶囊的研究多为药理实验和临床试验,关于其有效成分的研究则很少^[7-8],而其指纹图谱方面的研究尚未见报道。指纹图谱可以全面地反映药物所含化学成分的种类和数量,从而对中药质量进行有效地评价和控制^[9-11]。本实验建立了冠心舒通胶囊 HPLC 指纹图谱,运用相似度评价方法进行分析,为冠心舒通胶囊的全面质量评价和控制提供依据。

1 仪器与材料

日本岛津 LC-30AD UFLC 色谱仪系统,包括二元高压梯度泵、在线真空脱气机、自动进样装置、SPD-20A 型紫外检测器、柱温箱,Lab Solutions 色谱工作站;AB135-S 十万分之一天平,瑞士 Mettler Toledo 仪器有限公司;BP 201S 万分之一天平,德国 Sartorius 仪器有限公司;KH-5200B 型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司。

冠心舒通胶囊(批号分别为 130306、130604、130708、130806、130807、131113、140101、140102、140103、140104)和各单味药材均由陕西步长制药有限公司提供。单味药材广枣、丹参、丁香、天然冰片(右旋龙脑)、天竺黄经沈阳药科大学中药学院路金才教授鉴定,分别为漆树科南酸枣属植物南酸枣 *Choerospondias axillaris* (Roxb.) Burt et Hill 的干燥成熟果实、唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎、桃金娘科蒲桃属植物丁香 *Eugenia caryophyllata* Thunb. 的干燥花蕾、樟科植物樟 *Cinnamomum camphora* (L.) Presl 的新鲜枝叶经水蒸气蒸馏及重结晶加工制成的结晶、禾本科箬竹属植物青皮竹 *Bambusa textilis* McClure 秆内的分泌液干燥后的块状物。对照品没食子酸(批号 FY14810605)、丹参素(批号 FY11710802)、原儿茶酸(批号 FY17830102)、原

儿茶醛(批号 FY17840403)、鞣花酸(批号 FY15671105)、迷迭香酸(批号 FY14831103)、丹酚酸 B(批号 FY11670512)、丹酚酸 A(批号 FY11660819)、丁香酚(批号 FY11801012)、二氢丹参酮 I(批号 FY15600305)、隐丹参酮(批号 FY17541218)、丹参酮 I(批号 FY11620728)、丹参酮 II_A(批号 FY11630705)购于江苏南通飞宇生物科技有限公司,各对照品质量分数均大于 98%。

乙腈(色谱纯)购自美国 Sigma-Aldrich 公司,无水乙醇(分析纯)购于天津市富宇精细化工有限公司,磷酸(色谱纯)购自天津市科密欧化学试剂有限公司,水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent TC-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为 0.05%磷酸水溶液-乙腈,梯度洗脱:0~45 min, 5%~35%乙腈;45~50 min, 35%~60%乙腈;50~60 min, 60%乙腈;60~65 min, 60%~95%乙腈;65~75 min, 95%乙腈;检测波长为 280 nm,体积流量 1.0 mL/min,柱温 30 °C,进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 13 种对照品分别用甲醇溶解配制成储备液,精密吸取各对照品适量,配制成质量浓度分别为没食子酸 9.56 μg/mL、丹参素 79.6 μg/mL、原儿茶酸 10.65 μg/mL、原儿茶醛 10.35 μg/mL、鞣花酸 1.19 μg/mL、迷迭香酸 31.95 μg/mL、丹酚酸 B 800 μg/mL、丹酚酸 A 29.7 μg/mL、丁香酚 268.2 μg/mL、二氢丹参酮 I 10 μg/mL、隐丹参酮 15 μg/mL、丹参酮 I 30 μg/mL、丹参酮 II_A 30 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取冠心舒通胶囊粉末约 0.5 g,精密称定,置 50 mL 带塞锥形瓶中,精密加入 70%乙醇 25 mL,超声 30 min,用 70%乙醇补足减失的质量,经 0.22 μm 滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.2.3 各单味药材溶液的配制 取广枣、丹参、丁香药材粉末,各约 0.1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70%乙醇 25 mL,称定质量,超声提取 30 min,用 70%乙醇补足减失的质量,经 0.22 μm 滤膜滤过,取续滤液作为药材对照溶液。由于天竺黄和冰片的主要成分在“2.1”项色谱条件下无紫外吸收,故该 2 味药材不参与共有峰归属研究。

2.2.4 阴性对照溶液的配制 取按冠心舒通胶囊处

方比例分别制备的缺各味药材的阴性样品,按“2.2.2”项下方法制备,即得阴性对照溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取批号为 130306 的冠心舒通胶囊粉末 0.5 g,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,依据“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次,以相对保留时间和相对峰面积为指标,计算 RSD,考察进样精密度,结果显示共有峰的相对保留时间的 RSD 均小于 0.49%,相对峰面积的 RSD 均小于 2.93%。符合指纹图谱要求,表明仪器的精密度良好。

2.3.2 重复性试验 取批号为 130306 的冠心舒通胶囊粉末 0.5 g,按“2.2.2”项下方法平行制备供试品溶液 6 份,依据“2.1”项下色谱条件分别进样,以相对保留时间和相对峰面积为指标,计算 RSD,结果显示共有峰的相对保留时间的 RSD 均小于 0.58%,相对峰面积的 RSD 均小于 2.90%,符合指纹图谱要求,表明方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 取批号为 130306 的冠心舒通胶囊粉末 0.5 g,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,依据“2.1”项下色谱条件在 0、2、4、6、8、12 h 分别进样测定,以相对峰面积为指标,计算 RSD。结果显示共有峰的相对峰面积的 RSD 均小于 2.96%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.4 指纹图谱的建立及相似度计算

2.4.1 10 批冠心舒通胶囊 HPLC 指纹图谱的建立及相似度评价 依照“2.2.2”项下方法分别制备 10 批冠心舒通胶囊样品溶液,依据“2.1”项下色谱条件分别进样,记录色谱图。采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2009A)”对 10 批样品数据进行分析,采用多点校正后进行自动匹配(时间窗为 0.1 min),用中位数法生成指纹图谱和对照指纹图谱(图 1),并计算相似度,计算结果见表 1,各批之间相似度均在 0.95 以上。

2.4.2 主要色谱峰的指认 共标定 45 个色谱峰,通过与对照品对照,分别指认了 13 个色谱峰,其中 1 号峰为没食子酸,3 号峰为丹参素,5 号峰为原儿茶酸,6 号峰为原儿茶醛,10 号峰为鞣花酸,16 号峰为迷迭香酸,19 号峰为丹参酸 B,23 号峰为丹酚酸 A,24 号峰为丁香酚,30 号峰为二氢丹参酮 I,34 号峰为隐丹参酮,35 号峰为丹参酮 I,39 号峰为丹参酮 II_A,保留时间分别为 7.527、9.882、11.548、14.500、25.130、32.536、36.957、39.968、50.769、58.026、63.560、64.124、64.137 min。19 号峰(丹

酚酸 B)峰面积最大,分离良好,出峰时间适中,其量稳定,并且为冠心舒通胶囊的指标性成分,故选择此峰为参照峰。

2.4.3 共有峰的归属 按“2.2”项下方法分别制备冠心舒通胶囊供试品溶液、各单味药材供试品溶液、阴性对照溶液和混合对照品溶液,在相同色谱条件下进样分析,得到各样品的 HPLC 图谱,见图 2。比较各色谱图,对冠心舒通胶囊指纹图谱色谱峰进行归属。结果显示,冠心舒通胶囊指纹图谱的 45 个共有峰中,1、2、4、5、10 号峰来源于广枣,3、13~17、19、20、22、26~37、39、40 来源于丹参,1、7、8、9、11、24、25 来源于丁香。

2.4.4 相似度分析 由相似度结果(表 1)可知,10 批冠心舒通胶囊之间有差异,可能是由于原药材因采收季节、加工过程和存储过程的影响,其质量有些不同。也有可能由产品在制备过程中生成的中间体的差异造成的。这些表明冠心舒通胶囊在制备和存储过程中对其进行质量控制是非常有必要的。

指纹图谱可以用来做一致性评价,也可以做质量鉴别,本实验同时计算了冠心舒通胶囊与缺广枣、缺丹参和缺丁香阴性对照液的相似度分别为 0.800、0.238 和 0.662,表明本实验建立的方法可以有效鉴别冠心舒通胶囊的真伪。

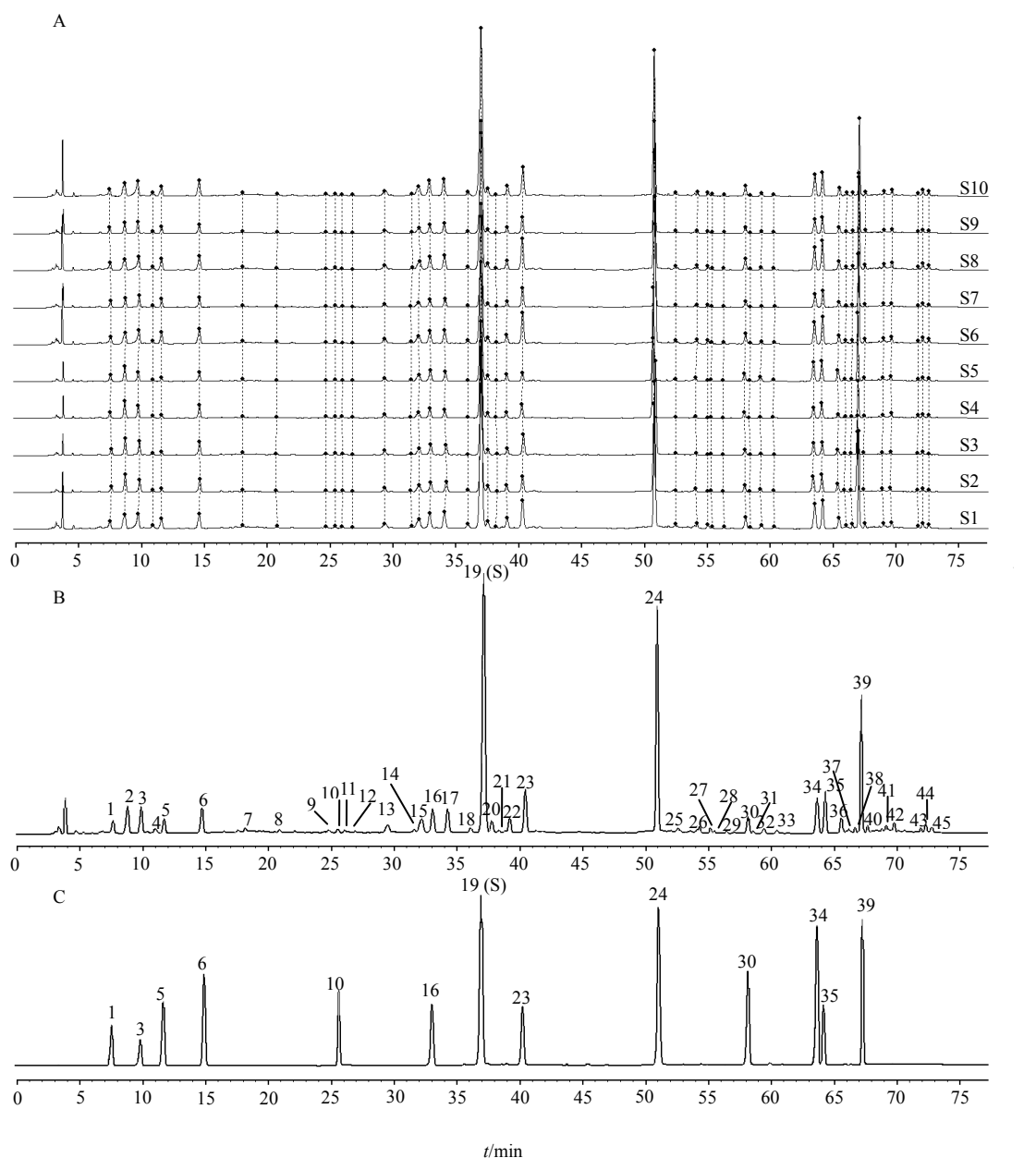
3 讨论

3.1 色谱条件的选择

考察了 Shimadzu XV-ODS (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、GL Inertsil ODS-SP (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Thermo ODS-2 Hypersil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 和 Agilent TC-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 4 种不同类型的色谱柱,结果表明 Agilent TC-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱分离效果好、柱效高,因此选用该色谱柱。

本实验考察了乙腈-甲酸水溶液、乙腈-冰乙酸水溶液、乙腈-磷酸水溶液、甲醇-甲酸水溶液、甲醇-冰乙酸溶液、甲醇-磷酸水溶液等不同体系流动相,结果表明选择乙腈-磷酸水溶液作为流动相色谱峰峰形尖锐,各峰之间分离度良好。并考察了乙腈-0.1%磷酸水溶液和乙腈-0.05%磷酸水溶液,结果表明 2 种流动相体系的分离效果相同,考虑到柱子的耐受能力,最终选择乙腈-0.05%磷酸水溶液作为流动相。

考察了 30、35、40 °C 柱温对分离效果的影响,结果表明柱温升高,色谱峰的分离效果变差,因此确定柱温为 30 °C。



1-没食子酸 3-丹参素 5-原儿茶酸 6-原儿茶醛 10-鞣花酸 16-迷迭香酸 19-丹酚酸 B 23-丹酚酸 A 24-丁香酚 30-二氢丹参酮 I
 34-隐丹参酮 35-丹参酮 I 39-丹参酮 II_A
 1-gallic acid 3-danshensu 5-protocatechuic acid 6-procatechuic aldehyde 10-ellagic acid 16-rosmarinic acid 19-salvianolic acid B
 23-salvianolic acid A 24-eugenol 30-dihydrotanshinone I 34-cryptotanshinone 35-tanshinone I 39-tanshinone II_A

图 1 10 批冠心舒通胶囊 HPLC 指纹图谱 (A)、对照指纹图谱 (B) 和混合对照品色谱图 (C)

Fig. 1 Fingerprint of 10 batches of GSC (A), reference fingerprint (B), and reference substance mixture solution (C)

3.2 提取条件的考察

本实验考察了超声和加热回流 2 种提取方法, 结果表明 2 种提取方法无明显差异, 故选择操作简便的超声提取, 并对超声时间 10、20、30、40、60 min) 进行了考察, 结果表明超声 30 min 提取效率最高, 已提取完全。

考察了甲醇和乙醇作为提取溶剂, 结果表明 2

种提取溶剂提取效果无显著差异, 考虑经济、安全, 选择乙醇为提取溶剂, 并考察了 50%、70%、100% 乙醇和 10、20、50、100 倍溶剂用量, 结果表明用 50 倍用量 70% 乙醇提取效率最高。

3.3 结果讨论

由共有峰的归属结果可知, 有些成分无法归属。可能是在生产过程中由其他物质转化生成, 例如 6

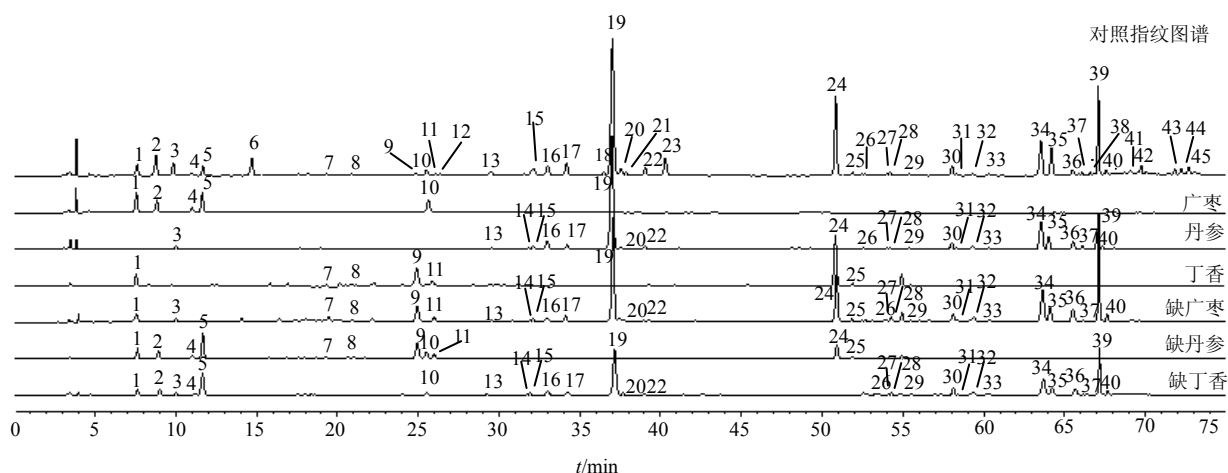


图 2 冠心舒通胶囊、各单味药材及阴性对照 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of GSC, single herb, and negative control decoction solution

表 1 冠心舒通胶囊相似度评价结果

Table 1 Similarities of 10 batches of GSC

样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
S1	1.000	0.984	0.997	0.994	0.998	0.984	0.992	0.985	0.988	0.995
S2	0.984	1.000	0.982	0.993	0.989	0.989	0.995	0.993	0.994	0.992
S3	0.997	0.982	1.000	0.990	0.997	0.978	0.988	0.978	0.983	0.990
S4	0.994	0.993	0.990	1.000	0.997	0.993	0.998	0.990	0.994	0.994
S5	0.998	0.989	0.997	0.997	1.000	0.987	0.995	0.986	0.991	0.994
S6	0.984	0.989	0.978	0.993	0.987	1.000	0.997	0.989	0.995	0.991
S7	0.992	0.995	0.988	0.998	0.995	0.997	1.000	0.993	0.997	0.996
S8	0.985	0.993	0.978	0.990	0.986	0.989	0.993	1.000	0.998	0.997
S9	0.988	0.994	0.983	0.994	0.991	0.995	0.997	0.998	1.000	0.998
S10	0.995	0.992	0.990	0.994	0.994	0.991	0.996	0.997	0.998	1.000
对照	0.995	0.995	0.992	0.998	0.997	0.994	0.999	0.995	0.998	0.998

号峰原儿茶醛和 23 号峰丹酚酸 A, 单味药材中并不存在, 可能是由原儿茶酸和丹酚酸 B 转化生成, 也可能是在制剂制备过程中 5 种药材共煎而产生的。

本实验首次建立了冠心舒通胶囊 HPLC 指纹图谱, 共标定 45 个共有峰, 并指认了其中 13 个色谱峰。采用相似度分析对不同批次冠心舒通胶囊指纹图谱进行评价。该方法稳定、可靠, 精密度、重复性好, 为冠心舒通胶囊的质量评价和控制提供了依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 国家药品标准 [S]. 2005.
- [2] 李 静, 王建榜, 王西辉. 冠心舒通胶囊预防急性心肌梗死 PCI 术后再狭窄的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2015, 30(4): 404-408.
- [3] 霍 煜, 姚天明, 梁 卓, 等. 冠心舒通胶囊对动脉粥样硬化大鼠血脂代谢及血液流变学指标的影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(11): 248-250.
- [4] 张 艳. 冠心舒通对大鼠脑缺血再灌注损伤保护作用的实验研究 [D]. 通辽: 内蒙古民族大学, 2011.
- [5] 姚天明, 梁 卓, 霍 煜. 冠心舒通胶囊对大鼠心肌缺

血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20(3): 243-245.

- [6] 奥·乌力吉, 孙志坚, 张特力根, 等. 冠心舒通胶囊对犬实验性心肌缺血、心肌梗塞和血液流变学的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 1998, 18(6): 9-11.
- [7] 张 艳, 廖佳丹, 王 辰. 冠心舒通胶囊对慢性心力衰竭大鼠心肌组织 MMP-9 的影响 [J]. 上海中医药大学学报, 2012, 26(6): 83-85.
- [8] 马久太, 单 娜, 卢新义, 等. HPLC 法测定冠心舒通胶囊中没食子酸的含量 [J]. 世界中医药, 2011, 6(4): 354-355.
- [9] 刘 峰, 马久太, 单 娜, 等. GC 法同时测定冠心舒通胶囊中丁香酚、龙脑和异龙脑 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 56-58.
- [10] 李 强, 杜思邈, 张忠亮, 等. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3095-3014.
- [11] 陈林伟, 秦昆明, 徐雪松, 等. 中药指纹图谱数据库的研究现状及展望 [J]. 中草药, 2014, 45(21): 3041-3047.
- [12] 刘 文, 蒋世云. 中药指纹图谱研究与应用发展 [J]. 中国药房, 2011, 22(19): 1819-1822.