

心痛泰颗粒 HPLC 指纹图谱研究

易丽娟, 李雅*, 柳兰, 邹苏兰, 郭志华

湖南中医药大学, 湖南长沙 410208

摘要: 目的 建立心痛泰颗粒的 HPLC 指纹图谱, 为其质量评价提供依据。方法 采用 Phenomenex Luna C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以 0.1% 甲酸溶液-甲醇为流动相, 检测波长为 280 nm, 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 30 °C。测定 10 批心痛泰颗粒样品, 应用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版) 建立心痛泰颗粒指纹图谱共有模式图, 并计算相似度, 再通过对照品色谱图对共有峰进行指认。**结果** 通过 10 批样品的测定, 建立心痛泰颗粒 HPLC 指纹图谱, 相似度均在 0.95 以上, 共标定 26 个共有色谱峰, 共有峰全部归属到各药材, 其中 3 个共有峰 (21、22、26 号峰) 为丹参专属, 8 个共有峰 (4~10、16 号峰) 为葛根专属, 7 个共有峰 (13、15、17~20、23 号峰) 为枳壳专属, 12 号峰为川芎专属, 14 号峰为甘草专属, 1 号峰为三七与甘草共有, 2 号峰为三七、木香与山楂共有, 3 号峰为川芎与木香共有, 11 号峰为葛根与郁金共有, 24 号峰为川芎与枳壳共有, 25 号峰为郁金与枳壳共有, 并通过对照品色谱图对共有峰进行指认, 7、12、22、26 号峰分别为葛根素、阿魏酸、丹酚酸 B、丹参酮 II_A。**结论** 10 批样品相似度结果表明该颗粒制备工艺方法稳定可行, 同时建立的 HPLC 指纹图谱方法稳定可靠, 可以用于衡量心痛泰颗粒生产过程的稳定性和成品质量的可控性。

关键词: 心痛泰颗粒; 指纹图谱; 质量控制; 丹酚酸 B; 丹参酮 II_A; 葛根素; 阿魏酸; 丹参; 葛根; 枳壳; 川芎; 甘草; 三七; 木香; 山楂; 郁金

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)22-5478-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.22.014

HPLC fingerprint of Xintongtai Granules

YI Li-juan, LI Ya, LIU Lan, ZOU Su-lan, GUO Zhi-hua

Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for fingerprint analysis of Xintongtai Granules (XG) for its quality control. **Methods** The chromatographic behaviors were obtained by a Phenomenex Luna C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with gradient elution using 0.1% formic acid solution-methanol as the mobile phase. The detection wavelength was 280 nm, the volume flow rate was 1.0 mL/min, and the column temperature was 30 °C. The samples of 10 batches of XG were determined, and the chromatographic fingerprint similarity evaluation system of Chinese medicine (2012 edition) was used to establish the common pattern of XG fingerprints, and the similarity was calculated. Then the common peaks were identified by the reference chromatogram. **Results** HPLC fingerprints of XG were established by the determination of 10 batches of samples. The similarity was above 0.95. A total of 26 common peaks were calibrated. Three mutual peaks (No. 21, 22, 26 peaks) were from *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*, eight mutual peaks (No. 4—10, 16 peaks) were from *Puerariae Lobatae Radix*, seven mutual peaks (No. 13, 15, 17—20, 23 peaks) were from *Aurantii Fructus*, No. 12 peak was from *Chuanxiong Rhizoma*, No. 14 peaks was from *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*, No. 1 peak was shared by *Notoginseng Radix et Rhizoma* and *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*, No. 2 peaks was shared by *Notoginseng Radix et Rhizoma*, *Aucklandiae Radix*, and *Crataegi Fructus*, No. 3 peaks was shared by *Chuanxiong Rhizoma* and *Aucklandiae Radix*, No. 11 peaks was shared by *Puerariae Lobatae Radix* and *Curcumae Radix*, the No. 24 peaks was shared by *Chuanxiong Rhizoma* and *Aurantii Fructus*, and No. 25 peaks was shared by *Curcumae Radix* and *Aurantii Fructus*. The common peaks were all assigned to each medicinal material and identified by reference chromatograms: No. 7, 12, 22, and 26 peaks were puerarin, ferulic acid, salvianolic acid

收稿日期: 2019-06-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81673955); 湖南省自然科学基金资助项目 (2017JJ2206); 湖南中医药大学中药学一流学科建设项目 (4901-0200002006); 湖南省大学生创新创业训练计划项目 (S201910541009)

作者简介: 易丽娟 (1995—), 女, 在读硕士研究生, 中药学专业。Tel: 15074861967 E-mail: 867117834@qq.com

*通信作者 李雅 (1973—), 女, 副教授, 硕士生导师, 从事中药新药研究与开发。Tel: 18229720816 E-mail: liya112@163.com

B, and tanshinone II_A. **Conclusion** The similarity results of 10 batches of samples indicate that the particle preparation process is stable and feasible, and the established HPLC fingerprint method is stable and reliable. It can be used to measure the stability of XG production process and the controllability of finished product quality.

Key words: Xintongtai Granule; fingerprint; quality control; salvianolic acid B; tanshinone II_A; puerarin; ferulic acid; *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*; *Puerariae Lobatae Radix*; *Aurantii Fructus*; *Chuanxiong Rhizoma*; *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; *Notoginseng Radix et Rhizoma*; *Aucklandiae Radix*; *Crataegi Fructus*; *Curcumae Radix*

冠状动脉粥样硬化性心脏病是指冠状动脉粥样硬化使血管腔狭窄或者阻塞,或因冠状动脉痉挛导致心肌缺血缺氧或坏死而引起的心脏病^[1],简称冠心病,各种心血管危险因素和发病机制与冠心病的心血管疾病有关^[2-3]。近年来,冠心病发病率增高并呈年轻化趋势^[4-5],所以冠心病的治疗已成为医学研究领域的一大热点。复方心痛泰是湖南中医药大学郭志华教授提供用于治疗冠心病的临床科研方^[6],该方主要由三七、丹参、川芎等 9 味药组成,方中川芎与丹参共为君药。郁金、木香、山楂、三七同为臣,一同辅助君药调畅气机、化瘀止痛,配以枳壳、葛根,一升一降,共同调理气机。诸药共同调配,得以活血化瘀、奏效理气止痛的功效^[6]。本课题组经前期大量临床及动物试验表明心痛泰颗粒(Xintongtai Granule, XG)具有确切的治疗冠心病的疗效^[7-9],本实验建立了 XG 的 HPLC 指纹图谱,运用相似度评价方法^[10-17]进行分析,为 XG 的全面质量评价和控制提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent Technologies 1200 Series 高效液相色谱仪, Agilent ChemStation 色谱工作站,美国安捷伦公司; DK-98-11A 电热恒温水浴锅,天津泰斯特仪器有限公司; YC-1800 喷雾干燥机,上海雅程仪器有限公司; CP114 电子天平,奥豪斯仪器有限公司; H1850R 高速离心机湘仪,湖南湘仪仪器有限公司; KQ-500DE 型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司。

1.2 试剂

对照品丹参酮 II_A (批号 110766-201520, 质量分数 98.9%)、阿魏酸 (批号 110773-201614, 质量分数 99.0%)、葛根素 (批号 110752-201615, 质量分数 95.5%), 购自中国食品药品检定研究院; 丹酚酸 B 对照品, 批号 B20261, 质量分数 98%, 购自上海源叶生物科技有限公司; 色谱级甲醇, 美国天地公司; 优级纯甲酸; 分析级甲醇、乙醇; 其他试剂均为分析纯。

丹参、川芎、三七、葛根、木香、甘草、枳壳、山楂、郁金均购于湖南新汇制药股份有限公司, 经湖南中医药大学中药鉴定教研室龚力民副教授鉴定丹参为唇形科丹参属植物丹参 *Salviae miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎, 川芎为伞形科藁本属植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎, 三七为五加科人参属植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根和根茎, 葛根为豆科葛根属植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根, 木香为菊科植物木香 *Aucklandia lappa* Decne. 的干燥根, 甘草为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎, 枳壳为芸香科柑橘属植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的干燥未成熟果实, 山楂为蔷薇科山楂属植物山楂 *Crataegus pinnatifida* Bge. 的干燥成熟果实, 郁金为姜科姜黄属植物温郁金 *Curcuma zenyujin* Y. H. Chen et C. Ling 的干燥块根。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Phenomenex Luna C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水溶液-甲醇, 梯度洗脱: 0~15 min, 5%~20% 甲醇; 15~30 min, 20%~30% 甲醇; 30~60 min, 30%~45% 甲醇; 60~70 min, 45%~65% 甲醇; 70~80 min, 65%~100% 甲醇; 80~85 min, 100% 甲醇; 85~95 min, 100%~5% 甲醇; 95~100 min, 5% 甲醇; 检测波长为 280 nm; 进样量为 10 μL; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 30 °C; 理论塔板数按葛根素峰计算不低于 4 000。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取丹参酮 II_A、丹酚酸 B、阿魏酸、葛根素对照品适量, 加甲醇制成质量浓度分别为 6.5、100.0、12.5、100.0 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 将 10 批处方药材按 XG 的制备工艺制得 10 批成品, 精密称取每批 XG 1.5 g, 编号 S1~S10。加甲醇定容至 50 mL 量瓶中,

超声 2 h, 精密移取 7 mL 至离心管并加 3 mL 无水乙醇定容到 10 mL, 通过高速离心机 (12 000 r/min) 离心 8 min, 取上清液过微孔滤膜, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.2.3 各单味药材溶液的制备 取丹参、川芎、葛根、三七等 9 味药材, 分别按处方比例及制剂工艺制备, 精密称定质量, 置 50 mL 量瓶中, 按“2.2.2”项下方法制备各单味药材供试品溶液。

2.2.4 阴性对照样品溶液的制备 分别按处方比例及制剂工艺制备过程, 分别制备缺丹参、缺川芎、缺葛根阴性样品, 按“2.2.2”项下方法制备各阴性对照样品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 (S1), 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 以 7 号峰 (葛根素) 为参照, 计算得各共有峰的相对保留时间的 RSD 均小于 1.78%, 相对峰面积的 RSD 均小于 2.96%, 表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 (S1), 按“2.1”项下色谱条件分别于 0、3、6、12、18、24 h 进样, 以 7 号峰 (葛根素) 为参照, 计算得各共有峰的相对保留时间的 RSD 均小于 0.86%, 相对峰面积的 RSD 均小于 1.93%, 表明供试品溶液

在 24 h 内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 精密称定 6 份 XG, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 以 7 号峰 (葛根素) 为参照, 计算得各共有峰的相对保留时间的 RSD 均小于 1.91%, 相对峰面积 RSD 均小于 1.82%, 表明方法重复性良好。

2.4 XG HPLC 指纹图谱的建立

2.4.1 共有峰的确定 取 10 批 XG 各适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”对 10 批 XG HPLC 图谱进行分析, 选择分离度较好且含量较大的 26 个色谱峰作为 XG 的指纹图谱共有特征峰。

2.4.2 相似度评价 分别在“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件” (2012 版) 中导入 10 批成品的指纹图谱, 以 S1 为参照图谱, 0.1 min 为时间宽度, 中位法生成方法, 对色谱图进行多点校正, 自动匹配, 生成 10 批 XG 指纹图谱共有模式图 (图 1), 并计算相似度, 结果见表 1, 结果表明, 10 批成品指纹图谱的相似度均在 0.95 以上, 说明不同批次的药材成分基本一致, 该制备工艺下制备的 10 批 XG 质量稳定。在供试品色谱峰中 7 号峰 (葛根素) 峰面积和出峰时间适中, 分离度良好, 故选作参照峰。

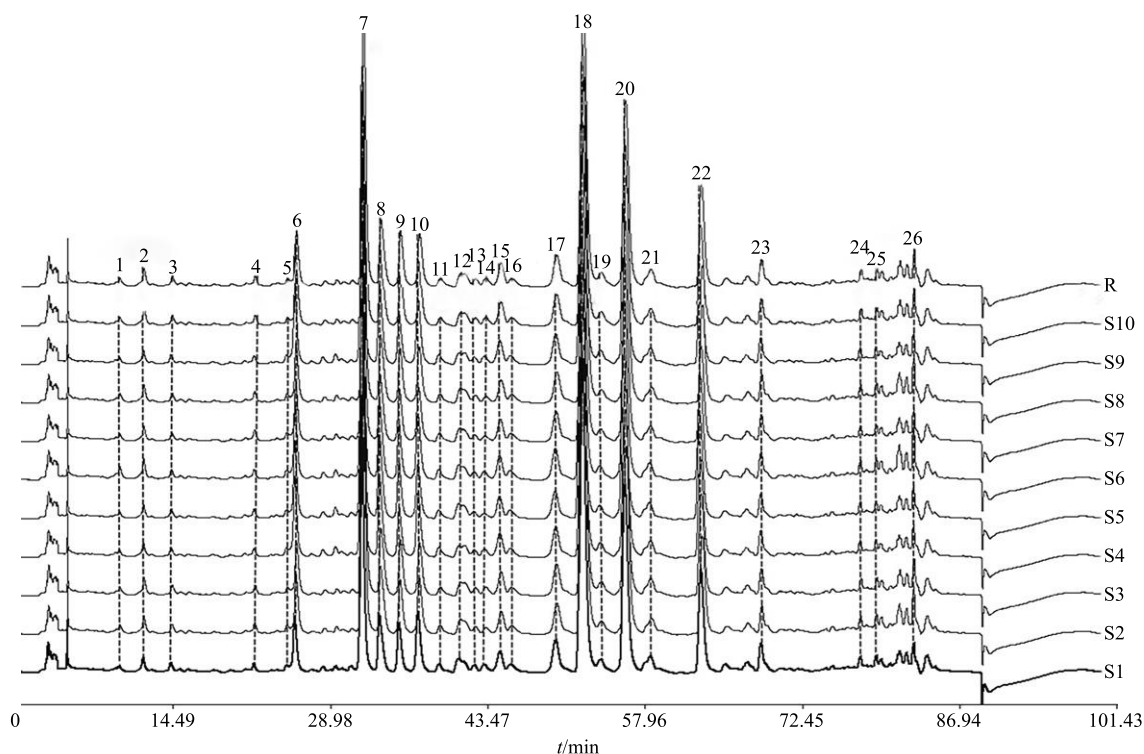


图 1 10 批 XG 的指纹图谱及其对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 Fingerprint of 10 batches of XG and its control fingerprint (R)

表 1 10 批 XG 指纹图谱相似度
Table 1 Fingerprint similarity of 10 batches of XG

样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1.000	0.997	0.994	0.994	0.949	0.997	0.987	0.988	0.992	0.991	0.994
S2	0.997	1.000	0.998	0.993	0.947	0.997	0.992	0.991	0.993	0.991	0.995
S3	0.994	0.998	1.000	0.994	0.941	0.997	0.993	0.990	0.992	0.992	0.994
S4	0.994	0.993	0.994	1.000	0.950	0.997	0.992	0.991	0.995	0.995	0.997
S5	0.949	0.947	0.941	0.950	1.000	0.950	0.943	0.947	0.951	0.951	0.951
S6	0.997	0.997	0.997	0.997	0.950	1.000	0.992	0.992	0.995	0.994	0.997
S7	0.987	0.992	0.993	0.992	0.943	0.992	1.000	0.998	0.998	0.997	0.997
S8	0.988	0.991	0.990	0.991	0.947	0.992	0.998	1.000	0.998	0.998	0.996
S9	0.992	0.993	0.992	0.995	0.951	0.995	0.998	0.998	1.000	0.999	0.999
S10	0.991	0.991	0.992	0.995	0.91	0.994	0.997	0.998	0.999	1.000	0.998
R	0.994	0.995	0.994	0.997	0.951	0.997	0.997	0.996	0.999	0.998	1.000

以 7 号峰（葛根素）为基准，计算 10 批 XG 指纹图谱共有峰相对保留时间与相对峰面积，10 批 XG 中 26 个共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 2%，表明 26 个共有峰的出峰时间较稳定，相对峰面积的 RSD 相差较大，表明不同批次药材中的成分含量存在一定的差异。

2.5 色谱峰指认及谱峰归属研究

2.5.1 色谱峰指认 将混合对照品的色谱图与 XG 的指纹图谱叠加，对比二者的保留时间，可指认对照品色谱图与 XG 指纹图谱中 7、12、22、26 号峰分别为葛根素、阿魏酸、丹酚酸 B、丹参酮 II_A。见图 2。

2.5.2 共有峰与药材的相关性研究 将 XG 的各单味药材溶液、阴性对照样品溶液的色谱图进行叠加（图 3），结果见表 2。各药材的色谱峰与 XG 的对照图谱共有峰对应，表明药材-XG 的化学成分信息有良好的相关性和一致性。再将 10 批成品指纹图谱的共有峰追溯到各单味药材，发现 12（阿魏酸）号峰为川芎药材的专属峰；21、22（丹酚酸 B）、26（丹参酮 II_A）号峰为丹参的专属峰；14 号峰为甘草的专属峰；4~6、7（葛根素）、8~10、16 号峰为葛根的专属峰；13、15、17~20、23 号峰为枳壳的专属峰；1 号峰为三七、甘草的共有峰，2 号峰为三七、木香和山楂的共有峰，3 号峰为川芎和木香的共有峰，11 号峰为葛根和郁金的共有峰，24 号峰为川芎和枳壳的共有峰，25 号峰为郁金和枳壳的共有峰。

3 讨论

本实验分别采用了 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱

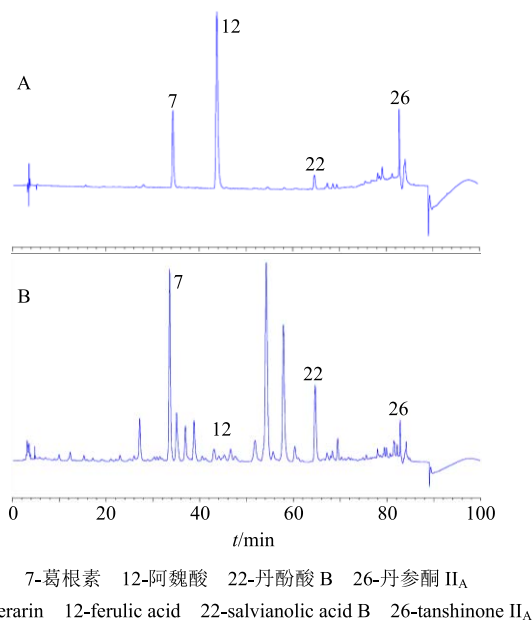


图 2 混合对照品 (A) 及 XG 供试品 (B) 的 HPLC 图
Fig. 2 HPLC of mixed reference substance (A) and XG test sample (B)

柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），Kromasi C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）3 个色谱柱进行实验，结果表明不同色谱柱的分离情况还是有所区别，相对于本研究的供试品在 Phenomenex Luna C₁₈ 进行含量测定，其柱效相对较高，分离度最好，故选择 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱。

本实验考察了乙腈-水、甲醇-水、甲醇-磷酸水溶液、乙腈-甲酸水溶液、甲醇-甲酸水溶液等不同的流动相体系，结果表明，当有机相为乙腈时，各

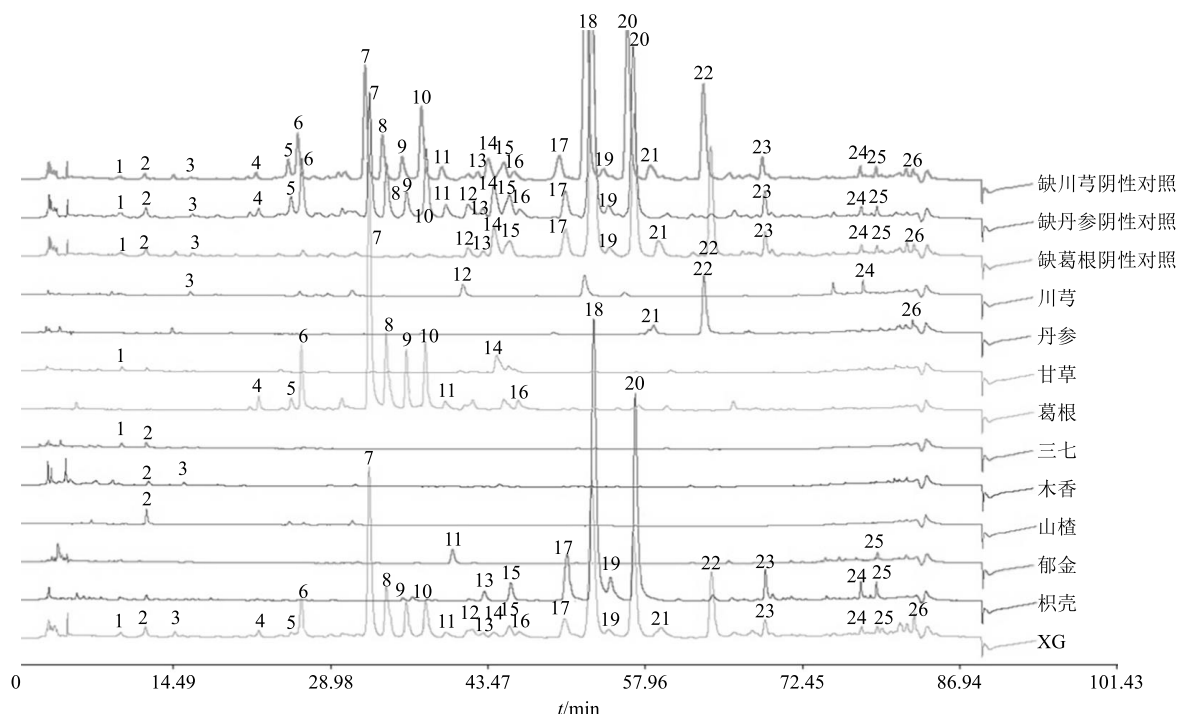


图 3 XG 指纹图谱中共有峰归属

Fig. 3 Common peaks in fingerprint of XG

表 2 谱峰归属结果

Table 2 Spectral peak attribution results

药材	共有峰归属
川芎	3、12、24
丹参	21、22、26
甘草	1、14
葛根	4、5、6、7、8、9、10、11、16
三七	1、2
木香	2、3
山楂	2
郁金	11、25
枳壳	13、15、17、18、19、20、23、24、25

色谱峰不能完全分离，当水相为水时，峰形较差，故最终确定使用甲醇-0.1%甲酸水溶液作为洗脱系统，色谱峰的分度比较好，各峰形较好。

本实验考察了等度洗脱和梯度洗脱 2 种方式，使用等度洗脱时，色谱峰分离度较差，因此使用梯度洗脱，以色谱峰的保留时间、分离度为指标，最终确定流动相梯度。

为了完全提取和分离颗粒中的各种化学成分并将其呈现在相同的液相图谱上，考察了 203、250、270、280、286、310、321 nm 不同吸收波长，结果显示丹参酮 II_A、丹酚酸 B、阿魏酸、葛根素在 280

nm 处的响应值最高，并且 280 nm 波长峰数目较多，能够较多反映药物化学成分信息，故选择 280 nm 为检测波长。

目前，在质量标准研究中多采用薄层鉴别和含量测定作为制剂的质量标准，但其质量控制在生产监测过程中缺乏关联性和溯源性，而本研究采用 HPLC 法建立 XG 的指纹图谱，能简便地鉴别各药材，全面反映其制剂质量。

参考文献

[1] 陆再英, 钟南山. 内科学 [M]. 第 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010.

[2] Pant R, Marok R, Klein L W. Pathophysiology of coronary vascular remodeling: Relationship with traditional risk factors for coronary artery disease [J]. *Cardiol Rev*, 2014, 22(1): 13-16.

[3] Polovkova O G, Makeeva O A, Lezhnev A A, et al. Expression profiles of calcineurin pathway genes in myocardium in relation to ischemic heart remodeling in humans [J]. *Mol Biol*, 2013, 47(3): 382-388.

[4] 中国心血管病预防指南 (2017) 写作组, 中华心血管病杂志编辑委员会. 中国心血管病预防指南 (2017) [J]. *中华心血管病杂志*, 2018, 46(1): 10-25.

[5] 肖桥妹. 心脑血管疾病年轻化现状分析 [J]. *包头医学院学报*, 2016, 32(1): 162-164.

- [6] 肖劲锋. 心痛泰调节冠心病大鼠内皮功能的实验研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2015.
- [7] 吴钟琴, 李 雅, 郭志华, 等. 心痛泰干预心肌缺血大鼠心肌中 Notch1、Dll4 蛋白表达的研究 [J]. 中医药导报, 2019, 25(6): 31-36.
- [8] 李 雅, 郭志华, 郭慧芳, 等. 心痛泰对冠心病大鼠肾素-血管紧张素-醛固酮系统及血管重塑的调控作用 [J]. 湖南中医药大学学报, 2017, 37(9): 943-946.
- [9] 易 琼, 李 雅, 郭志华, 等. 心痛泰通过降低 Lp-PLA2、IL-6、hs-CRP、LOX-1 水平减轻兔动脉粥样硬化炎症反应 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2017, 25(8): 796-799.
- [10] 刘东方, 赵丽娜, 李银峰, 等. 中药指纹图谱技术的研究进展及应用 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 4085-4094.
- [11] 侯一哲, 黎 翩, 肖红敏, 等. 血塞通滴丸皂苷类成分含量测定及批次一致性评价研究 [J]. 中草药, 2019, 50(11): 2552-2559.
- [12] 邹纯才, 鄢海燕. 我国中药色谱指纹图谱相似度评价方法 30 年 (1988—2017 年) 研究进展与展望 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(10): 1969-1977.
- [13] 周菲菲, 王彬杰, 张元媛, 等. 冠心舒通胶囊 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2016, 47(7): 1137-1141.
- [14] 陈素娟, 聂 静, 张 旗, 等. 熟地黄饮片标准汤剂的质量标准研究 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(9): 2173-2177.
- [15] 沈 晨, 魏婷婷, 韩园园, 等. 止动颗粒 UPLC 指纹图谱建立及 3 种成分测定 [J]. 中草药, 2019, 50(2): 388-395.
- [16] 曾滢棱, 谭 宁, 高 艳, 等. 不同产地土贝母中皂苷类成分的 HPLC 特征图谱及 3 种主要皂苷的含量测定 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(10): 1816-1822.
- [17] 褚 莉, 段树卿, 宋 佳, 等. 复方石韦片 HPLC 指纹图谱的建立及其在制剂过程中的应用 [J]. 中草药, 2019, 50(2): 396-401.