

丹七片 HPLC 指纹图谱

郑文忠¹, 邓红¹, 林华庆^{1*}, 刘军², 丘鹄原², 蒋文庆², 於美鸿²

(1. 广东药学院, 广东省药物新剂型重点实验室, 广州 510006;

2. 广州白云山奇星药业有限公司, 广州 510310)

[摘要] 目的:采用高效液相色谱法建立丹七片的指纹图谱。方法:资生堂 CAPCELL PARK C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.06% 磷酸溶液(梯度洗脱), 检测波长 210 nm, 柱温 30 °C, 流速为 1.0 mL·min⁻¹。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)”对 10 批丹七片指纹图谱进行分析。结果:10 批丹七片的 HPLC 指纹图谱有 15 个共有峰, 确认了其中 7 个色谱峰的成分分别为丹参素钠、原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸、人参皂苷 R_{g₁}、丹酚酸 B 和人参皂苷 R_{b₁}, 相似度 > 0.990。结论:该法操作简便, 精密度、重复性和稳定性良好, 为丹七片的质量控制提供了有效手段。

[关键词] 丹七片; 指纹图谱; 丹参素钠; 原儿茶醛; 迷迭香酸; 紫草酸; 人参皂苷 R_{g₁}; 丹酚酸 B; 人参皂苷 R_{b₁}

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)10-0080-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014100080

HPLC Fingerprint of Danqi Tablets

ZHENG Wen-zhong¹, DENG Hong¹, LIN Hua-qing^{1*}, LIU Jun²,

QIU Ling-yuan², JIANG Wen-qing², YU Mei-hong²

(1. Guangdong Pharmaceutical University, Guangdong Provincial Key Laboratory of

Advanced Drug Delivery, Guangzhou 510006, China;

2. Guangzhou Baiyunshan Qixing Pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou 510310, China)

[Abstract] **Objective:** To establish HPLC fingerprint of Danqi Tablets. **Method:** The separation was performed on Shiseido CAPCELL PARK C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with mobile phase of acetonitrile-0.06% phosphate (gradient elution) at flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. Column temperature was 30 °C and detection wavelength was set at 210 nm. Fingerprint of 10 batches of Danqi tablet was analysed by 2004A edition of chromatographic fingerprint similarity evaluation system **Result:** Fifteen common peaks were selected as the fingerprint peaks. from 10 batches of Danqi tablet and seven of these common peaks were identified as Salvianic acid A sodium, protocatechualdehyde, rosmarinic acid, alkannic acid, ginsenoside-R_{g₁}, salvianolic acid B and ginsenoside-R_{b₁}. **Conclusion:** The method established is simple, selective, accurate and reproducible, which can be used for the quality control of Danqi tablets.

[Key words] Danqi tablets; fingerprint; salvianic acid A sodium; protocatechualdehyde; rosmarinic acid; alkannic acid; ginsenoside-R_{g₁}; salvianolic acid B; ginsenoside-R_{b₁}

[收稿日期] 20131220(009)

[基金项目] 广州市重大科技项目(2009A1-E031-1)

[第一作者] 郑文忠, 硕士, 从事中药制剂和质量标准的研究工作, Tel: 13763323647, E-mail: happywen123456@126.com

[通讯作者] * 林华庆, 教授, 硕士生导师, 从事缓控释制剂和中药新剂型研究工作, Tel: 020-39352518, E-mail: huaqing_@vip.tom.com

丹七片收载于《中国药典》2010年版第一增补本中, 由丹参和三七两味药组成, 具有活血化瘀、通脉止痛的功效, 临床上用于瘀血闭阻所致的胸痹心痛, 眩晕头痛和经期腹痛^[1]。丹参药材主要含有丹参酮、二氢丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A、丹参酮 II_B、隐丹参酮等脂溶性成分和丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸、紫草酸、迷迭香酸、丹酚酸 A, B, C, D, E,

F,G 等水溶性成分^[2,4];三七药材主要含有人参皂苷 Rb₁, Rb₂, Rb₃, Rg₁, Rd, F2 和三七皂苷 R₁, R₂, R₄, R₆, Fa 等成分^[5]。本研究采用 HPLC 法,对丹七片的主要成分进行研究,建立了同一流动相下检测多个成分的丹七片指纹图谱,为丹七片的质量控制提供依据,以保证该产品质量的稳定和均一。

1 材料

Waters 2695 液相色谱仪(美国 waters), AG 245 型电子分析天平(上海 Sartorius), KQ-400KDE 型高功率数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), 405-D-1 型超纯水机(广州东锐科技有限公司)。

丹七片 10 批(广州白云山奇星药业有限公司项目组自制,批号为 13001, 13002, 13003, 13004, 13005, 13006, 13007, 13008, 13009, 13010), 丹酚酸 B(批号 Y0001559, EDQM)、迷迭香酸(批号 Y0000786, EDQM)、紫草酸(批号 must-13082702)、丹参素钠(110855-201311)、原儿茶醛(110810-201007)、人参皂苷 Rg₁(110703-201128) 和人参皂苷 Rb₁(110704-201223) 对照品均购自中国食品药品检定研究院,甲酸(分析纯,广州化学试剂厂),甲醇(分析纯,天津市化学试剂一厂),磷酸(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司),乙腈(色谱纯, TEDIA),水为高纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 资生堂 CAPCELL PARK C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 A 为乙腈, B 为 0.06% 的磷酸溶液,洗脱程序见表 1,柱温 30 ℃,流速 1.0 mL · min⁻¹,检测波长 210 nm,进样体积 10 μL,运行时间 60 min。

表 1 梯度洗脱程序

t/min	A/%	B/%
0 ~ 10	10 ~ 18	90 ~ 82
10 ~ 35	18 ~ 25	82 ~ 75
35 ~ 45	25 ~ 35	75 ~ 65
45 ~ 60	35 ~ 70	65 ~ 30

2.2 HPLC 样品制备

2.2.1 对照品溶液制备 分别取丹酚酸 B、丹参素钠、原儿茶醛、紫草酸、迷迭香酸、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 对照品适量,置量瓶中,加 75% 甲醇配成每 1 mL 含有丹酚酸 B、丹参素钠、原儿茶醛、紫草酸、迷迭香酸、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 各 0.04 mg 的对照品溶液。

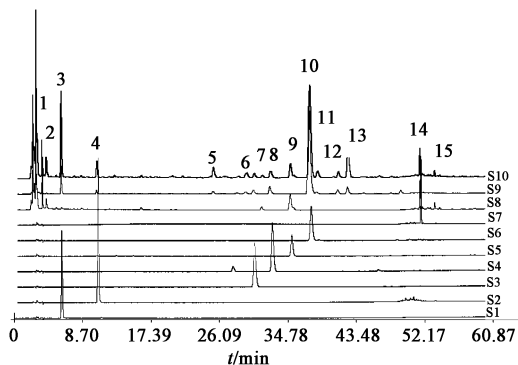
2.2.2 供试品溶液制备 取本品 20 片,研细,称取约 0.5 g,精密称定,置 25 mL 量瓶中,加 75% 甲醇适量。超声(功率 300 W,频率 50 kHz)处理 30 min,放冷,加 75% 甲醇定容至刻度,摇匀,过滤,滤液用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,作为供试品溶液。

2.2.3 丹参阴性对照品制备 按处方比例,称取除丹参的其余饮片,按《中国药典》工艺制成颗粒,按 2.2.2 项下方法制成丹参阴性供试品溶液。

2.2.4 三七阴性对照品制备 按处方比例,称取除三七的其余饮片,按《中国药典》工艺制成颗粒,按 2.2.2 项下方法制成三七阴性供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 取丹酚酸 B、丹参素钠、原儿茶醛、紫草酸、迷迭香酸、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 对照品溶液、供试品溶液、丹参和三七阴性对照品溶液分别进样,记录 HPLC 色谱图,结果见图 1。



S1. 丹参素钠对照品; S2. 原儿茶醛对照品; S3. 迷迭香酸对照品;
S4. 紫草酸对照品; S5. 人参皂苷 Rg₁ 对照品; S6. 丹酚酸 B 对照品;
S7. 人参皂苷 Rb₁ 对照品; S8. 丹参阴性对照品;
S9. 三七阴性对照品; S10. 丹七片供试品(图 2 同)

图 1 丹七片指纹谱

丹七片共检测出 15 个共有峰,其中 3,4,7,8,9,10,14 号色谱峰为丹参素钠、原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸、人参皂苷 Rg₁、丹酚酸 B 和人参皂苷 Rb₁,见图 2。1 号峰为丹参和三七共有的色谱峰,3,4,5,6,7,8,10,11,12,13 号色谱峰为丹参的归属色谱峰,2,9,14,15 号色谱峰为三七的归属色谱峰。

2.3.2 精密度试验 分别精密吸取同一供试品溶液,连续进样 6 次,每次 10 μL,按上述方法色谱条件测定,记录 HPLC 色谱图,以丹酚酸 B 色谱峰作为参照峰,计算各特征峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD,结果显示所有色谱峰相对保留时间的 RSD 0.29% ~ 0.88%,相对峰面积的 RSD 0.27% ~ 1.81%,相似度为 1.000,表明仪器的精密度好。

2.3.3 重复性试验 取同一批丹七片,按 2.2.2 项

下方法制备供试品溶液 6 份,分别进样,每次 10 μ L,按上述方法色谱条件测定。记录 HPLC 色谱图,以丹酚酸 B 色谱峰作为参照峰,计算各特征峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD。结果显示所有色谱峰相对保留时间的 RSD 0.01% ~ 0.74%,相对峰面积的 RSD 0.41% ~ 2.34%,相似度 > 0.998,表明供试品溶液重复性好。

2.3.4 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,分别在 0,3,6,9,12,18,24 h 时进样,每次 10 μ L,按上述方法色谱条件测定。记录 HPLC 色谱图,以丹酚酸 B 色谱峰作为参照峰,计算各特征峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD。结果发现所有色谱峰相对保留时间的 RSD 0.04% ~ 0.55%,相对峰面积的 RSD 0.49% ~ 2.89%,相似度 > 0.996,结果表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.5 丹七片指纹图谱的构建

2.5.1 共有峰的标定 取 10 个批次的丹七片,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,分别进样,每次进

样 10 μ L,按上述方法色谱条件测定。记录 HPLC 色谱图。得 10 批丹七片的 HPLC 指纹图谱,见图 2。

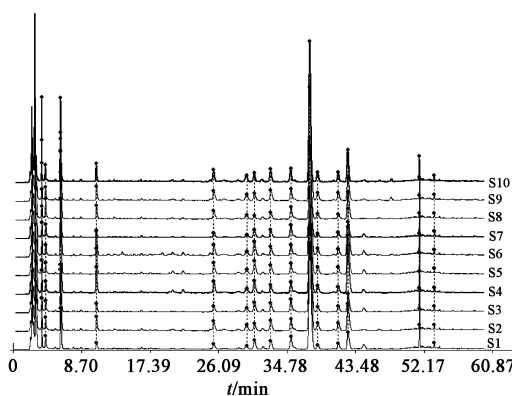


图 2 10 批丹七片 HPLC 指纹谱

2.5.2 相似度计算 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)”进行相似度计算,结果见表 2。结果发现,10 批丹七片的相似度均在 0.90 以上,相似度较高,表明本实验所建立的指纹图谱稳定性和可控性较好。

表 2 10 批丹七片相似度计算

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照指纹图谱
S1	1.000	0.993	1.000	0.937	0.952	0.957	0.999	0.961	0.993	0.992	0.986
S2	0.993	1.000	0.994	0.968	0.978	0.981	0.994	0.983	1.000	1.000	0.998
S3	1.000	0.994	1.000	0.938	0.953	0.958	0.999	0.960	0.994	0.993	0.987
S4	0.937	0.968	0.938	1.000	0.999	0.998	0.943	0.989	0.966	0.968	0.981
S5	0.952	0.978	0.953	0.999	1.000	1.000	0.957	0.990	0.976	0.978	0.989
S6	0.957	0.981	0.958	0.998	1.000	1.000	0.962	0.991	0.979	0.981	0.991
S7	0.999	0.994	0.999	0.943	0.957	0.962	1.000	0.968	0.994	0.993	0.989
S8	0.961	0.983	0.960	0.989	0.990	0.991	0.968	1.000	0.982	0.982	0.990
S9	0.993	1.000	0.994	0.966	0.976	0.979	0.994	0.982	1.000	1.000	0.997
S10	0.992	1.000	0.993	0.968	0.978	0.981	0.993	0.982	1.000	1.000	0.998
对照指纹图谱	0.986	0.998	0.987	0.981	0.989	0.991	0.989	0.990	0.997	0.998	1.000

3 讨论

3.1 测定波长的选择 采用二极管阵列检测器(PDA)考察丹七片在 200 ~ 400 nm 不同检测波长的 HPLC 图谱,结果发现,在 210 nm 处,图谱信息丰富,丹参和三七药材中的有效成分能同时被检出,故选择 210 nm 作为测定波长。

3.2 流动相的选择 试验中选取了多种流动相系统,乙腈-水、乙腈-0.06% 磷酸溶液、乙腈-0.06% 甲酸溶液进行梯度洗脱,结果发现,乙腈-0.06% 磷酸溶液进行梯度洗脱可以达到较好的分离效果。

3.3 提取溶剂的选择 试验中选取了多种提取溶剂(水、乙醇、50% 甲醇、75% 甲醇和甲醇),结果显

示,75% 甲醇提取的供试品色谱峰较多,总峰面积最大,故选择 75% 甲醇作为提取溶剂。

3.4 参照峰的选择 丹七片指纹图谱中丹酚酸 B 色谱峰峰形适中,对称性较好、峰面积较大,且丹酚酸 B 为 2010 年版《中国药典》中丹参药材的含量控制指标之一,故选择丹酚酸 B 为参照峰。

经查阅相关文献,未有文献报道丹七片 HPLC 指纹图谱研究,本次实验采用乙腈-0.06% 磷酸溶液对丹七片进行梯度洗脱,共检出 15 个共有峰,确定了丹参素钠、原儿茶醛、迷迭香酸、人参皂苷 R_{g1}、丹酚酸 B、人参皂苷 R_{b1} 和紫草酸 7 个成分的色谱峰,该方法操作简便,专属性强、重复性好,为丹七片的

益智仁中挥发油成分的 GC-MS

余辉¹, 张森^{2,3}, 秦昆明^{2,4}, 蔡宝昌^{2,3,4*}

- (1. 张家港市中医医院, 江苏 张家港 215600; 2. 南京中医药大学 药学院, 南京 210023;
3. 南京中医药大学 国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心, 南京 210023;
4. 南京海昌中药集团有限公司 江苏省企业研究生工作站, 南京 210061)

[摘要] 目的:定性分析中药益智仁挥发油的主要化学成分,为今后的临床药效研究奠定基础。方法:采用水蒸气蒸馏法提取挥发油,使用 GC-MS 分析挥发油主要化学成分。结果:共分离出 122 个化学成分,其中 42 个化学成分匹配度在 85% 以上,占挥发油总量的 74.35%。其中含量高于 1% 的有 9 个成分,并以 1,2,4,5-四甲苯含量最高(42.96%)。结论:益智仁挥发油主要化学成分为 1,2,4,5-四甲苯(42.96%),桃金娘烯醛(4.66%),芳樟醇(4.34%),(-)-4-萜品醇(2.96%),萜品烯(2.21%),圆柚酮(1.48%), β -蒎烯(1.32%),右旋萜二烯(1.25%), (1S)-(+)-3-蒎烯(1.02%),多为不饱和烯烃以及醛、酮、酚类等不饱和和含氧化合物,且多是 15 个碳以下的小分子化合物。

[关键词] 益智仁, 挥发油, 气相色谱质谱联用

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)10-0083-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014100083

Chemical Constituents of Volatile Oil of Alpiniae Oxyphyllae Fructus by GC-MS

YU Hui¹, ZHANG Miao^{2,3}, QIN Kun-ming^{2,4}, CAI Bao-chang^{2,3,4*}

- (1. Zhangjiagang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhangjiagang, 215600, China;
2. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;

[收稿日期] 20130701(007)

[基金项目] 江苏省科技支撑计划工业项目(BE2011012);江苏省科技成果转化项目(BA2010024);南京市科技发展计划项目(201007005);南京市科技公共服务平台建设项目(201105007)

[第一作者] 余辉,副主任中药师,从事中药鉴定和中药炮制学研究, Tel:13962295613, E-mail:yuhuishi.2008@163.com

[通讯作者] *蔡宝昌,教授,博士生导师,从事中药炮制机理及中药炮制标准研究, Tel:025-85811112, E-mail:becai@126.com

质量控制提供了有效手段,有利于确保该产品质量的稳定和均一。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:70.
[2] Adams James D, Wang Rubin, Yang Jun, et al. Preclinical and clinical examinations of Salvia miltiorrhiza and its tanshinones in ischemic conditions [J]. Chin Medicine, 2006, 1(3):1.
[3] Cao Jun, Wei Yingjie, Qi Lianwen, et al. Determination of fifteen bioactive components in Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric

detection [J]. Biomed Chromatogr, 2008, 22(2):164.

- [4] Zhu Zhengyu, Zhang Hai, Zhao Liang, et al. Rapid separation and identification of phenolic and diterpenoid constituents from Radix Salvia miltiorrhizae by high-performance liquid chromatography diode-array detection, electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry and electrospray ionization quadrupole ion trap mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007, 21(12):1855.
[5] 鲍建才,刘刚,丛登立,等.三七的化学成分研究进展 [J]. 中成药, 2006 22(6):246.
[6] 余河水,张丽娟,宋新波,等.三七炮制品化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(22):3910.

[责任编辑 顾雪竹]