

乐脉颗粒的 HPLC 指纹图谱及其成分鉴定

金莎丽¹, 焦豪妍^{2*}, 聂阳², 张现涛²

(1. 四川川大华西药业股份有限公司, 成都 510520;

2. 广东食品药品职业学院 广东省中药研究所, 广州 510520)

[摘要] 目的:建立乐脉颗粒的指纹图谱,并对主要有效成分进行鉴定和含量测定。方法:采用高效液相色谱法建立乐脉颗粒的 HPLC-DAD 指纹图谱,采用 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇(A)-水(B)梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 210 nm,柱温 30 ℃。结果:建立了乐脉颗粒的指纹图谱,确定了 16 个色谱峰为共有峰,10 批乐脉颗粒的指纹图谱相似度良好,并对 6 个化学成分进行了指认和含量测定。结论:该指纹图谱的建立可对该制剂规范药用资源及质量评价提供科学依据。

[关键词] 乐脉颗粒; 指纹图谱; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)23-0068-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015230068

HPLC Fingerprint and Components Identification of Lemai Granules JING Sha-li¹, JIAO Hao-yan^{2*}, NIE-Yang², ZHANG Xian-tao² (1. Sichuan Chuanda West China Pharmaceutical Co. Ltd., Chengdu 510520, China; 2. Guangdong Institute of Traditional Chinese Medicine of Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the HPLC fingerprint chromatography of Lemai granules and determine the content of six compounds. **Method:** HPLC-DAD fingerprints of Lemai granules were determined with high-performance liquid chromatography on Phenomenex Luna C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with the gradient solvent system consisting of methanol (A) and water (B). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹; the detection wavelength was set at 210 nm, and the column temperature was maintained at 30 ℃. **Result:** Fingerprints of Lemai granules were obtained. A total of 16 chromatographic peaks were common peaks, and the fingerprints of 10 batches of Lemai granules were identified with high similarity of fingerprints. Six chemical components were identified and their contents were determined. **Conclusion:** The establishment of HPLC fingerprints provide a scientific basis for specifying medicinal resources and quality evaluation of this formula.

[Key words] Lemai granules; HPLC; fingerprint

乐脉颗粒收载于《中国药典》^[1],是根据传统中医理论研制的治疗急、慢性心脑血管疾病的一类新型纯中药颗粒剂,由丹参、川芎、赤芍、红花等 7 味中药制成;具有行气活血、化瘀通脉之功效,常用于气滞血瘀所致的头痛、眩晕、胸痛、心悸、心绞痛、冠心病、多发性脑梗死的治疗^[1-3]。

《中国药典》中,仅对芍药苷进行了定量测定,乐脉颗粒以往的研究,也主要集中在含量测定方

面^[4-7],尚无其整体化学成分的指纹图谱研究,难以全面控制该颗粒剂的质量^[8-10]。本文按照中药指纹图谱研究技术要求,对华西药业生产的独家品种乐脉颗粒进行了 HPLC 指纹图谱研究,建立了稳定、可靠的指纹图谱;并对 6 种主要化学成分进行了指认和含量测定,为制剂的质量全面监控提供依据。

1 仪器与试剂

1200 系列高效液相色谱仪(包括 DAD 二极管

[收稿日期] 20141217(008)

[基金项目] 2012 年成都市企业自主创新一般项目(12GGYB149SW-001)

[第一作者] 金莎丽,副研究员,从事卫生检验工作, Tel:028-85136030, E-mail:1461901675@qq.com

[通讯作者] *焦豪妍,硕士,副主任中药师,从事药物现代仪器分析研究, Tel:020-28854995, E-mail:jiaohaoyan@sina.com

阵列检测器, Chemical Station 色谱工作站, Agilent), BP211D 型电子天平(德国赛多利斯集团)。

10 批乐脉颗粒(批号分别为 20130901, 20130904, 20130905, 20130906, 20131001, 20131003, 20131004, 20131005, 20131009, 20131010); 没食子酸、原儿茶醛、氧化芍药苷、芍药苷、紫草酸和丹酚酸 B 对照品均由本实验室分离获得(采用 UV, MS, ^1H 及 ^{13}C -NMR 等光谱方法确定其结构), 甲醇(色谱级, 天津四友精细化学品有限公司), 水为自制双重蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Phenomenex Luna C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇(A)-水(B)系统梯度洗脱(0 ~ 50 min, 15% ~ 85% A; 50 ~ 52 min, 85% A), 5 流速 1.0 mL \cdot min $^{-1}$, 检测波长 210 nm, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 10 μL 。

2.2 对照品溶液制备 精密称取各对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 加 40% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 供试品溶液制备 对取乐脉颗粒样品 1 包, 精密称取 0.5 g, 置具塞锥形瓶(200 mL)中, 精密加入 40% 甲醇 100 mL, 称定质量, 超声 30 min(功率 280 W, 频率 40 kHz), 放置室温, 用 40% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 过 0.45 μm 的微孔滤膜, 取续滤液作为供试品溶液。

2.4 乐脉颗粒 HPLC 指纹图谱方法学

2.4.1 精密度试验 取乐脉颗粒(20130901)供试品溶液, 按照 2.1 项下色谱条件, 连续进样 6 次, 记录指纹图谱。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004A 版计算, 样品色谱指纹图谱的相似度均 >0.990 , 且计算得各主要色谱峰相对保留时间和其相对峰面积的 RSD $<3.0\%$, 说明仪器的精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取乐脉颗粒(20130901)供试品溶液, 在室温下放置, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48 h, 按照 2.1 项下色谱方法, 记录指纹图谱, 并采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004A 版计算, 所得指纹图谱的相似度均 >0.990 , 且计算得各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD $<3.0\%$, 说明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 取乐脉颗粒(20130901)样品, 按照 2.3 项下供试品溶液的制备方法, 平行制备 6 份, 按照 2.1 项下色谱方法, 记录指纹图谱, 采用

“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004A 版计算, 测得指纹图谱的相似度均 >0.990 , 计算得各主要色谱峰相对保留时间和其相对峰面积的 RSD $<3.0\%$, 说明该方法的重复性较好。

2.5 指纹图谱的建立

2.5.1 标准指纹图谱和共有指纹峰标定 用 2.1 项下的色谱条件测定了 10 批乐脉颗粒的指纹图谱, 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004A 版对指纹图谱数据进行评价, 结果见图 1, 制定优化的 10 批乐脉颗粒的标准指纹图谱(共有模式)见图 2, 确定的共有峰为 16 个, 经对照品鉴定其中 13 号峰为丹酚酸 B。

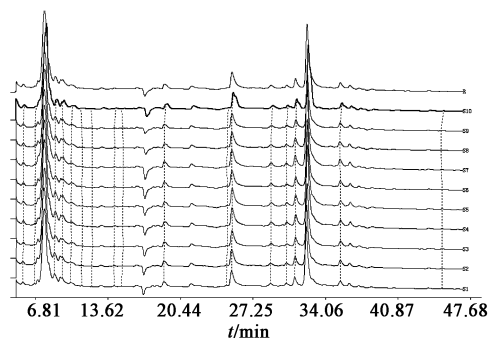


图 1 10 批次乐脉颗粒 HPLC

Fig. 1 Fingerprints of Lemai particles from 10 batches

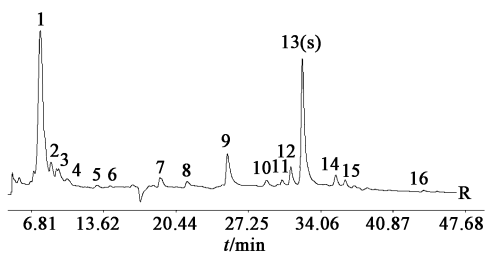


图 2 乐脉颗粒的 HPLC 标准指纹谱

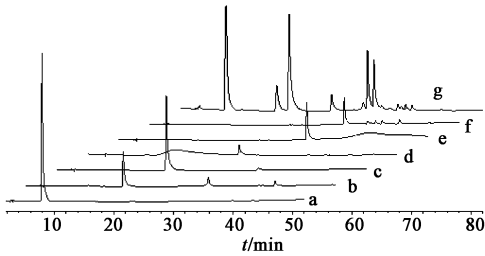
Fig. 2 Common mode of HPLC fingerprints of Lemai particles

2.5.2 相对峰面积和相对保留时间 样品以 13 号峰为标准峰, 计算其他各峰的相对峰面积和相对保留时间。结果表明, 各批样品之间共有指纹峰的相对峰面积存在一定的差异, 证明不同批次的样品在含量上存在一定的差异。而各批次乐脉颗粒中共有峰的相对保留时间非常相近, RSD 在 0.05% ~ 3.0%, 这也进一步证实了共有峰选择的准确性。

2.5.3 相似度计算 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004A 版分别对 10 批乐脉颗粒的指纹图谱进行相似度的分析。10 批乐脉颗粒的相似度分别为 0.995, 0.984, 0.991, 0.990, 0.996, 0.992, 0.989, 0.991, 0.988, 0.989。

2.6 主要色谱峰的化学指认 取乐脉颗粒样品(20130901),按 2.3 项下方法制备供试品溶液;然后取本课题组从乐脉颗粒中分离得到的 6 个化学对照品适量,按 2.2 项下方法制备成对照品溶液;以 2.1 项下所述色谱条件分别进行检测,结果见图 3。乐脉颗粒样品 HPLC 指纹图谱中 1,6,7,9,12 和 13 号峰得到了明确的化学指认。按保留时间先后顺序,依次为没食子酸、原儿茶醛、氧化芍药苷、芍药苷、紫草酸、丹酚酸 B。所指认的色谱峰占总峰面积 75%,占共有峰面积 85%。

2.7 主要色谱峰含量测定方法学考察



a. 没食子酸; b. 原儿茶醛; c. 氧化芍药苷; d. 芍药苷; e. 紫草酸; f. 丹酚酸 B; g. 混合

图 3 6 个主要色谱峰对照品的 HPLC

Fig. 3 HPLC chromatograms of six reference substances

2.7.1 线性关系考察 精密吸取各对照品溶液

适量,用 40% 甲醇稀释成 6 个不同质量浓度的没食子酸、原儿茶醛、氧化芍药苷、芍药苷、紫草酸和丹酚酸 B 的混合对照品溶液,按照 2.1 项下的色谱方法进行测定,以峰面积为纵坐标 Y,相应的质量浓度为横坐标 X,绘制标准曲线,得回归方程,各样品标准曲线见表 1。

表 1 6 种成分的线性方程及相关系数(n=6)

Table 1 Results of linear relationship of 6 compounds (n=6)

成分	线性范围 /mg·L ⁻¹	回归方程	r
没食子酸	2.10 ~ 105	Y = 13 616X - 2 034	0.999 7
原儿茶醛	1.31 ~ 65.5	Y = 10 327X - 8 571	0.999 1
氧化芍药苷	2.46 ~ 123	Y = 6 557X - 387	0.999 5
芍药苷	0.518 ~ 25.9	Y = 9 579X + 1 642	0.999 9
紫草酸	0.515 ~ 25.8	Y = 21 846X - 3 760	0.999 6
丹酚酸 B	2.09 ~ 104.5	Y = 28 336X + 25 74	0.999 5

2.7.2 精密性、稳定性、重复性试验 同 2.4 项下指纹图谱方法。

2.7.3 加样回收率试验 取已知各成分含量的乐脉颗粒(20130901)样品 6 份,精密加入混合对照品溶液,按 2.3 项下方法处理供试品溶液,2.1 项下色谱条件进样,测定,结果见表 2。

表 2 乐脉颗粒中 6 种成分的加样回收率试验

Table 2 6 compounds recovery test results of Lemai particles

化合物	样品 中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%	化合物	样品 中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
没食子酸	3.427	3.420	7.274	106.23	105.03	1.0	芍药苷	2.011	2.011	4.126	101.31	103.57	1.6
	3.481	3.420	7.196	104.28				2.043	2.011	4.239	102.58		
	3.504	3.420	7.179	103.69				2.056	2.011	4.253	104.57		
	3.497	3.420	7.280	105.25				2.052	2.011	4.090	104.58		
	3.470	3.420	7.310	106.09				2.036	2.011	4.246	100.67		
	3.584	3.420	7.329	104.64				2.103	2.011	4.283	104.91		
原儿茶醛	0.022 8	0.022 0	0.044 9	100.25	101.28	1.6	紫草酸	0.048 2	0.048 0	0.096 1	99.86	100.67	0.8
	0.023 2	0.022 0	0.044 7	99.05				0.049 0	0.048 0	0.097 2	100.27		
	0.023 3	0.022 0	0.046 9	103.52				0.049 3	0.048 0	0.098 8	101.58		
	0.023 3	0.022 0	0.046 1	101.87				0.049 2	0.048 0	0.097 7	100.57		
	0.023 1	0.022 0	0.045 3	100.58				0.048 8	0.048 0	0.098 4	101.67		
	0.023 8	0.022 0	0.046 9	102.41				0.050 4	0.048 0	0.098 5	100.07		
氧化芍药苷	0.051 2	0.051 0	0.102 6	100.38	99.87	1.9	丹酚酸 B	4.617	4.600	9.556	103.68	104.58	1.8
	0.052 0	0.051 0	0.101 2	98.27				4.690	4.600	9.827	105.78		
	0.052 4	0.051 0	0.102 4	99.05				4.721	4.600	9.681	103.87		
	0.052 2	0.051 0	0.105 9	102.56				4.711	4.600	9.459	101.59		
	0.051 8	0.051 0	0.100 4	97.65				4.675	4.600	9.921	106.97		
	0.053 5	0.051 0	0.105 9	101.31				4.829	4.600	9.956	105.59		

2.7.4 样品测定 取 10 批乐脉颗粒样品,分别测

定样品中没食子酸、原儿茶醛、氧化芍药苷、芍药苷、

紫草酸和丹酚酸 B 的含量,结果见表 3。

表 3 10 批乐脉颗粒中 6 种成分的含量测定

批号	没食子酸	原儿茶醛	氧化芍药苷	芍药苷	紫草酸	丹酚酸 B
20130901	6.854 3	0.045 6	0.102 3	4.021 8	0.096 4	9.235 8
20130904	6.368 3	0.049 8	0.114 6	4.587 5	0.085 4	10.058 9
20130905	6.467 0	0.050 4	0.098 7	3.963 8	0.087 3	10.123 9
20130906	5.877 7	0.049 3	0.099 2	3.821 7	0.098 7	9.851 4
20131001	5.915 7	0.051 9	0.106 4	3.583 1	0.095 7	9.675 3
20131003	6.567 3	0.050 7	0.123 6	4.395 7	0.099 6	10.257 9
20131004	6.367 1	0.048 5	0.110 8	4.538 1	0.089 4	10.692 7
20131005	6.029 8	0.052 9	0.099 5	3.789 1	0.091 3	9.886 1
20131009	6.125 4	0.050 8	0.099 2	4.238 7	0.100 8	9.752 3
20131010	5.981 3	0.047 9	0.098 8	3.651 7	0.088 6	9.651 4

3 讨论

乐脉颗粒的制法工艺采用水煎煮的方式,因此,成药中以水溶性化学成分为主,这些成分在反相色谱系统中的保留是较弱的,较难分离,试验比较了水甲醇体系、水乙腈体系、1% 乙酸甲醇体系和 1% 乙酸乙腈体系、磷酸盐甲醇系统和磷酸盐乙腈系统,作为流动相时乐脉颗粒的指纹图谱;发现水甲醇体系干扰小、峰形较好、峰数目多,经过流动相比率的摸索与调整,分离度较好,故而选用甲醇水体系。

根据乐脉颗粒中所含主要成分的性质,选择比较了甲醇、70% 甲醇、40% 甲醇、10% 甲醇和 95% 乙醇作为提取溶剂时乐脉颗粒的 HPLC 图谱,发现采用 40% 甲醇提取时,样品峰数目较多,含量较高。试验比较了 210,230,254,280 和 360 nm 等多个波长下的色谱指纹图谱,发现 210 nm 下,样品出峰较多,而且峰面积较大,因此选择 210 nm 为检测波长。

建立了色谱指纹图谱,该指纹图谱简便、稳定、可靠、重复性好,可以控制乐脉颗粒的质量,保证生产的稳定性。10 批次样品的指纹图谱相似度高,说明乐脉颗粒质量稳定。

课题组前期分离和鉴定了乐脉颗粒中的主要有

效成分,还采用课题组分离得到的对照品指认了 6 个主要有效成分,确定了其化合物结构,所指认的色谱峰占总峰面积 75%;并对鉴定出的 6 个指标成分进行了含量测定。

乐脉颗粒中以水溶性成分居多,本文对指纹图谱中的部分成分进行了鉴定,课题组将继续深入研究乐脉颗粒中的化学成分,采用先进的植物化学分离手段,争取分离鉴定出更多的化学成分,从而对共有峰进行更全面的化学指认和药材来源归属。

[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,2010:660-661.
- [2] 谢文萍,陈冈,洪明. 乐脉颗粒治疗 66 例不稳定性心绞痛的临床观察[J]. 华西药学杂志,2011,26(5):511-512.
- [3] 沈映君. 中药药理学[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:632.
- [4] 马彬峡,陈恒冲,吴春高,等. RP-HPLC 法同时测定乐脉颗粒中丹参素、原儿茶醛、芍药苷和阿魏酸的含量[J]. 药物分析杂志,2009,29(7):1122-1125.
- [5] 孟珺,付春梅,刘丽娟,等. HPLC 法测定乐脉颗粒中羟基红花黄色素 A 的含量[J]. 中国药事,2009,23(3):284-285.
- [6] 陈恒冲,马彬峡,吴春高,等. RP-HPLC 同时测定乐脉颗粒中阿魏酸和丹酚酸 B 含量[J]. 中成药,2009,31(4):554-557.
- [7] 王欣眉,蒋慧,徐小平. HPLC 同时测定乐脉颗粒中的丹酚酸 B 和丹参素钠 [J]. 华西药学杂志,2008,23(4):476-477.
- [8] 朱焕容,赵小宁,王秀芬,等. 小儿七星茶颗粒指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(13):93-96.
- [9] 叶耀辉,马越兴,应亚斌,等. 藏药桃儿七 HPLC 指纹图谱产地识别及质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(24):97-101.
- [10] 郑玉忠,张振霞,董婷霞,等. 余甘子药材 BCDE 指纹图谱及其没食子酸和鞣花酸含量分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(23):94-99.

[责任编辑 顾雪竹]