

## 心速宁胶囊的 HPLC 指纹图谱分析

张霄潇<sup>1</sup>, 毛鹏<sup>2</sup>, 李正勇<sup>2</sup>, 马双成<sup>3\*</sup>

(1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102; 2. 陕西摩美得制药有限公司, 陕西 咸阳 712000;  
3. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

**[摘要]** 目的:建立心速宁胶囊的 HPLC 指纹图谱,为该制剂的质量控制提供参考。方法:采用 HPLC,以 Welch Xtimate C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm)分析,流动相乙腈-0.2% 甲酸水溶液(含 0.2% 氨水)梯度洗脱,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 254 nm,建立心速宁胶囊 HPLC 指纹图谱,运用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004 A 版)软件对 10 批市售制剂进行相似度评价,通过对照品保留时间比较指认指纹图谱的主要特征峰,通过心速宁胶囊组方单味药和复方的 HPLC 比较,初步分析复方中化学成分的来源和归属。结果:建立的心速宁胶囊 HPLC 指纹图谱专属性、精密度、重复性和稳定性均良好;共标定了 29 个共有色谱峰,指认了其中的 12 个色谱峰;10 批市售制剂的指纹图谱与对照指纹图谱的相似度在 0.980~0.998。在该色谱条件下,以黄连、枳实对全方的贡献率最大,二者贡献率均为 0.21,半夏和莲子心的贡献率最小,贡献率分别为 0.02 和 0.04。结论:建立的心速宁胶囊 HPLC 指纹图谱能全面反映其多成分的整体特征,建立的检测方法简便可行,适用于该制剂的质量评价。

**[关键词]** 心速宁胶囊; 指纹图谱; 质量控制; 相似度

**[中图分类号]** R283.6;R944.5;R284;R917 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)24-0051-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017240051

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170926.1016.012.html>

**[网络出版时间]** 2017-09-26 10:16

## HPLC Fingerprint Analysis of Xinsuning Capsules

ZHANG Xiao-xiao<sup>1</sup>, MAO Peng<sup>2</sup>, LI Zheng-yong<sup>2</sup>, MA Shuang-cheng<sup>3\*</sup>

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;  
2. Shaanxi Momentum Pharmaceutical Co. Ltd., Xianyang 712000, China;  
3. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the HPLC fingerprint of Xinsuning capsules. **Method:** HPLC was employed, Welch Xtimate C<sub>18</sub> column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used with acetonitrile-0.2% formic acid solution (containing 0.2% ammonium hydroxide) as the mobile phase in gradient elution. The flow rate was set at 1.0 mL·min<sup>-1</sup> and the detection wavelength was set at 254 nm. Ten batches Xinsuning capsules were collected to assess the similarities, the main peaks in the fingerprint were identified by comparing the retention time of reference substances, and the source and attribution of chemical components in this preparation were analyzed by comparing with single herb. **Result:** The established fingerprint of Xinsuning capsules was sensitive and specific. There were 29 common peaks in different batches of Xinsuning capsules and 12 peaks were identified. Compared with the reference fingerprint, the fingerprint similarities of ten batches of Xinsuning capsules were more than 0.98. A comparative analysis showed the contribution of Coptidis Rhizoma and Aurantii Fructus Immaturus was the highest, their contribution rates were 0.21. **Conclusion:** The analytical method of HPLC fingerprint is stable

**[收稿日期]** 20170418(014)

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2014ZX09304307-002)

**[第一作者]** 张霄潇,博士,从事中药化学及质量标准研究,Tel:010-64200488,E-mail:17590349@qq.com

**[通讯作者]** \* 马双成,研究员,从事中药化学及质量标准研究,Tel:010-67095272,E-mail:masc@nicpbp.org.cn

and reliable with fine repeatability, which provides a reference for study on material basis and quality control of Xinsuning capsules.

[Key words] Xinsuning capsules; fingerprint; quality control; similarity

心速宁胶囊由黄连、半夏、茯苓、枳实、常山、莲子心、苦参、青蒿、人参、麦冬、甘草共 11 味中药组成,临床主要用于治疗清热化痰、宁心定悸。心速宁胶囊主治痰热扰心所致的心悸、胸闷、心烦、易惊、口干口苦、失眠多梦、眩晕、脉结代等,适用于冠心病、病毒性心肌炎引起的轻、中度室性过早搏动见上述症状者。2015 年版《中国药典》(一部)目前主要以黄连中的盐酸小檗碱、枳实中的柚皮苷、苦参中的槐定碱、甘草中的甘草次酸,人参中的人参皂苷  $Rg_1$  和人参皂苷  $Re$  为定性控制指标,盐酸小檗碱为定量控制指标<sup>[1]</sup>。但不足以表明中药整体质量信息,也较难全面反映中药的有效性和安全性<sup>[2-6]</sup>。本实验拟更全面地反映心速宁胶囊的化学组成和质量状况,开展了心速宁胶囊 HPLC 指纹图谱研究,对指纹图谱中主要特征峰进行化学成分指认,以初步明确该制剂的主要物质基础;运用相似度评价、聚类分析等识别技术评价心速宁胶囊的内在质量,为制定全面而整体的心速宁胶囊质量控制方法提供实验依据。

## 1 材料

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司)。黄连、半夏、茯苓等药材购自北京同仁堂,经北京中医药大学魏胜利教授鉴定,均符合 2015 年版《中国药典》(一部)相关项下要求;心速宁胶囊(陕西摩美得制药有限公司,批号分别为 140502, 140703, 140704, 140801, 140802, 140804, 141201, 141202, 141203 和 141204, 编号依次为 S1 ~ S10, 分别倒出内容物,粉碎过 40 目筛,混匀,备用),新橙皮苷、甘草酸、苦参碱、槐定碱、苦参查尔酮、二氢小檗碱、药根碱、黄连碱、二氢黄连碱、小檗碱、表小檗碱、巴马汀、东莨菪亭、橙皮苷、川陈皮素、桔皮素、甘草素、异甘草素、苦参新醇  $O$  和 5-去甲川陈皮素对照品(实验室自制,经 HPLC 面积归一化法测定,纯度均 > 98%,可供含量测定用),水为娃哈哈纯净水,甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 采用 Welch Xtimate  $C_{18}$  色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu$ m),流动相乙腈(A)-0.2% 甲酸水溶液(含 0.2% 氨水)(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min, 5% ~ 10% A; 10 ~ 15 min, 10% ~ 15% A;

15 ~ 30 min, 15% ~ 28% A; 30 ~ 50 min, 28% ~ 40% A; 50 ~ 55 min, 40% ~ 100% A),检测波长 254 nm,柱温 30  $^{\circ}$ C,流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>,进样量 10  $\mu$ L。

**2.2 对照品溶液的制备** 取苦参碱,槐定碱,苦参查尔酮,苦参新醇  $O$ ,二氢小檗碱,药根碱,黄连碱,二氢黄连碱,小檗碱,表小檗碱,巴马汀,东莨菪亭,橙皮苷,新橙皮苷,川陈皮素,5-去甲川陈皮素,桔皮素,甘草酸,甘草素和异甘草素对照品适量,每个对照品分别加甲醇制成每 1 mL 含对照品 0.2 mg 的溶液,摇匀,于 4  $^{\circ}$ C 冰箱保存。

**2.3 供试品溶液的制备** 取本品内容物,混匀,研细,过 40 目筛,精密称取约 0.5 g,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 25 mL,密塞,称定质量,超声提取 30 min,放冷,密塞,称定质量,加 70% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,过 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜滤过,即得。

**2.4 各药材供试品溶液的制备** 取黄连、枳实、常山、莲子心、苦参药材适量,分别加 60% 乙醇回流提取 2 次,每次 1.5 h,合并提取液。滤过,滤液减压回收乙醇,继续浓缩至相对密度为 1.36 ~ 1.38(60  $^{\circ}$ C,下同)的稠膏,80  $^{\circ}$ C 干燥成干膏,粉碎成细粉,按 2.3 项下方法制备,即得。取人参、茯苓、半夏药材适量,分别加 70% 乙醇回流提取 2 次,每次 2 h,合并提取液,滤过,滤液减压回收乙醇,浓缩成相对密度 1.36 ~ 1.38 的稠膏,80  $^{\circ}$ C 干燥成干膏,粉碎成细粉,按 2.3 项下方法制备,即得。取适量麦冬、青蒿、甘草药材,分别加水煎煮 2 次,每次 1 h,合并煎液,滤过,滤液浓缩成相对密度 1.05 ~ 1.06(80  $^{\circ}$ C)的清膏,加乙醇使乙醇体积分数达 70%,搅匀,静置 24 h;取上清液,滤过,减压回收乙醇,浓缩成相对密度 1.36 ~ 1.38(60  $^{\circ}$ C)的稠膏,80  $^{\circ}$ C 干燥成干膏,粉碎成细粉,按 2.3 项下方法制备,即得。

## 2.5 方法学考察

**2.5.1 专属性试验** 取空白溶剂和心速宁胶囊供试品溶液各 1 份,按 2.1 项下条件测定,分别进样 10  $\mu$ L,记录色谱图。结果发现空白溶剂对供试品溶液的检测无干扰,说明该方法专属性良好。

**2.5.2 精密度试验** 取同一份心速宁胶囊的供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,记录色谱图,以 24 号峰为参照,计算其他主要色谱峰相对

保留时间的 RSD 在 0.02% ~ 0.6%, 相对峰面积的 RSD 在 1.1% ~ 4.3%, 表明仪器精密度良好。

**2.5.3 稳定性试验** 取同一份心速宁胶囊的供试品溶液, 分别于制备后 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 按 2.1 项下色谱条件测定, 以 24 号峰为参照, 计算其他主要色谱峰相对保留时间的 RSD 在 0.01% ~ 0.8%, 相对峰面积的 RSD 在 0.3% ~ 4.7%, 表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

**2.5.4 重复性试验** 取同一批心速宁胶囊, 分别按 2.3 项下平行制备 6 份供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 以 24 号峰为参照, 计算其他主要色谱峰相对保留时间的 RSD 在 0.01% ~ 0.8%, 相对峰面积的 RSD 在 0.3% ~ 3.8%, 表明该方法的重复性良好。

**2.6 HPLC 指纹图谱的比较** 运用上述分析方法建立 10 批心速宁胶囊的 HPLC 指纹图谱, 结果见图 1。

表 1 10 批心速宁胶囊样品的相似度分析

Table 1 Similarity analysis of 10 batches of Xinsuning capsules

样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照指纹图谱
S1	1.000	0.979	0.973	0.978	0.977	0.966	0.980	0.977	0.981	0.982	0.987
S2	0.979	1.000	0.990	0.989	0.987	0.979	0.981	0.968	0.980	0.979	0.991
S3	0.973	0.990	1.000	0.993	0.994	0.982	0.987	0.979	0.989	0.969	0.994
S4	0.978	0.989	0.993	1.000	0.999	0.995	0.993	0.975	0.989	0.966	0.997
S5	0.977	0.987	0.994	0.999	1.000	0.994	0.994	0.978	0.991	0.967	0.998
S6	0.966	0.979	0.982	0.995	0.994	1.000	0.989	0.959	0.977	0.946	0.989
S7	0.980	0.981	0.987	0.993	0.994	0.989	1.000	0.987	0.995	0.970	0.997
S8	0.977	0.968	0.979	0.975	0.978	0.959	0.987	1.000	0.993	0.979	0.987
S9	0.981	0.980	0.989	0.989	0.991	0.977	0.995	0.993	1.000	0.982	0.996
S10	0.982	0.979	0.969	0.966	0.967	0.946	0.970	0.979	0.982	1.000	0.980
对照指纹图谱	0.987	0.991	0.994	0.997	0.998	0.989	0.997	0.987	0.996	0.980	1.000

**2.6.2 聚类分析** 将 10 批样品的指纹图谱导入 ChemPattern 软件中, 选用组间对比进行聚类分析, 选择欧式距离为样品的测度, 10 批样品和指定的代表性样品可以划为一类, 见图 2。

**2.7 指纹图谱中主要色谱峰的化学指认** 按 2.3 项下方法制备 1 份心速宁胶囊供试品溶液, 并取各对照品适量, 加甲醇溶解并制成对照品溶液。按 2.1 项下色谱条件测定, 见图 3。结果指认的主要色谱峰依次为 2 号峰(槐定碱), 10 号峰(东莨菪亭), 11 号峰(橙皮苷), 14 号峰(新橙皮苷), 16 号峰(表小檗碱), 17 号峰(二氢小檗碱), 18 号峰(药根碱), 19 号峰(黄连碱), 21 号峰(二氢黄连碱), 23 号峰(巴马汀), 24 号峰(小檗碱)和 29 号峰(甘草酸)。

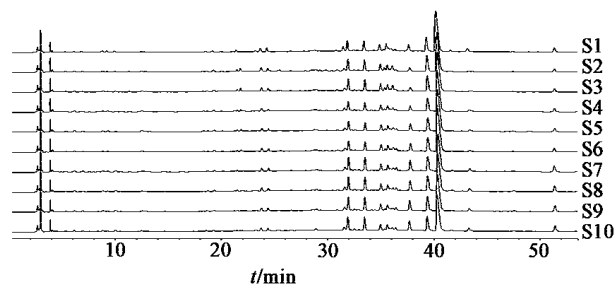


图 1 10 批心速宁胶囊的 HPLC 指纹谱

Fig. 1 HPLC fingerprint chromatograms of 10 batches of Xinsuning capsules

**2.6.1 相似度计算** 将指纹图谱导入国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004 A 版)软件, 以中位数生成心速宁胶囊对照指纹图谱, 将该对照指纹图谱的相似度值定为 1, 计算 10 批心速宁胶囊指纹图谱与对照指纹图谱的相似度, 见表 1。

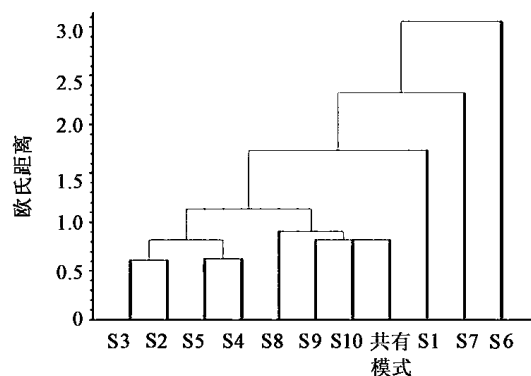


图 2 10 批心速宁胶囊样品的聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis of 10 batches of Xinsuning capsules

**2.8 心速宁胶囊与单味药材的 HPLC 对比分析** 取 11 味药材的样品溶液和心速宁胶囊的供试品溶

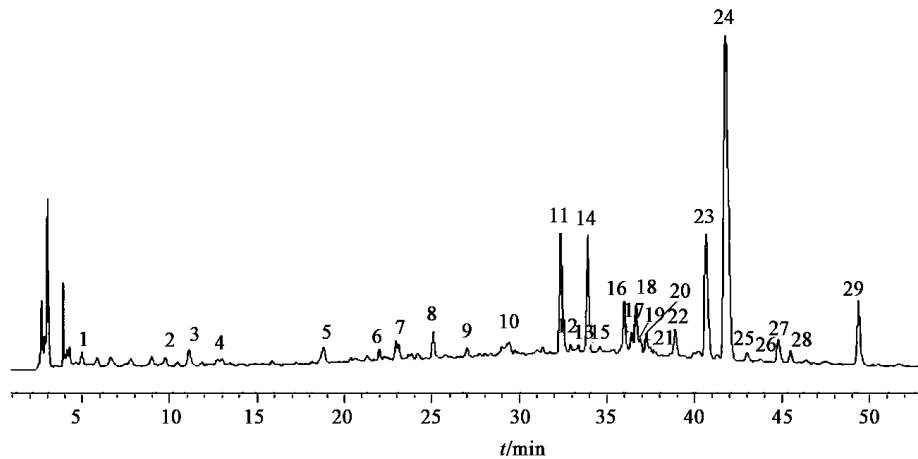


图 3 心速宁胶囊 HPLC 指纹谱及其色谱峰指认

Fig. 3 HPLC fingerprint of Xinsuning capsules and identification of these chromatographic peaks

液,按 2.1 项下色谱条件测定,对保留时间一致的色谱峰进行分析与比较,根据紫外光谱信息,对全方与药材的指纹图谱相关峰进行指认,以确定特征峰的药材归属,见图 4。结果确认了心速宁胶囊 HPLC 指纹图谱 29 个特征峰的来源,其中 5,8,16,17,18,19,21,22,23,24,25,27 号峰均归属黄连,10,11,14 号峰归属枳实,20,28,29 号峰归属甘草,1 号峰归属半夏,3 号峰归属人参,9 号峰归属青蒿,26 号峰归属常山,2 号峰归属苦参,4 号峰可能来源于半夏、青蒿、人参、甘草,5 号峰可能来源于黄连、常山、青蒿,6 号峰可能来源于常山或莲子心,7 号峰可能来源于黄连或枳实,12 号峰可能来源于莲子心或苦参,13 和 15 号峰可能来源于苦参或麦冬。以心速宁胶囊作为参照样品(相似度计为 1)进行相似度计算,结果黄连、枳实、常山、青蒿、茯苓、苦参、麦冬、人参、甘草、莲子心、半夏的相似度分别为 0.21,0.21,0.14,0.14,0.12,0.10,0.10,0.08,0.06,0.04 和 0.02,说

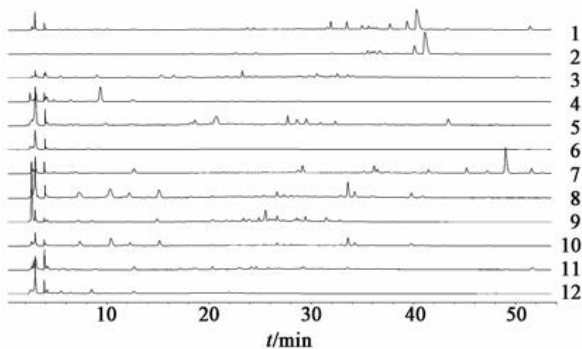
明枳实、黄连的贡献率较大,其次为常山和青蒿等。

### 3 讨论

**3.1 提取条件的考察** 中成药大多数是复方制剂,化学成分极为复杂。为尽可能地在色谱图上反映各组方中药的信息,本实验对提取溶剂(水、甲醇和乙醇)进行了比较,结果发现甲醇提取液的色谱峰最多。又考察了提取溶剂的体积分数(30% 甲醇,50% 甲醇,70% 甲醇和乙醇),结果表明 70% 甲醇提取后,在 254 nm 处基线平稳,色谱峰数量多且峰面积大,故选用 70% 甲醇作为提取溶剂。另外还考察了不同提取方法(冷浸法、加热回流法和超声法)和提取时间,结果发现超声法和加热回流法、冷浸法的色谱图相似,但超声法的操作更为方便易行,提取方法选用 70% 甲醇超声提取 30 min 的色谱图展示度最好,能最大限度反映该制剂的特征。

**3.2 色谱条件的优化** 在色谱条件优化过程中,应满足最大信息量化的原则。因此,尝试了不同的流动相系统,结果以乙腈-水(含 0.2% 甲酸和 0.2% 氨水)梯度洗脱得到的色谱峰峰形好且稳定。结合紫外检测器的检测结果,结果发现 254 nm 处检测的图谱,色谱成分检出最多、图谱展示度最好,主要成分的信息能直观、全面地反映心速宁胶囊的内在质量。在所建立的色谱条件下,色谱峰分离较理想,基线较为平稳,故选择检测波长 254 nm。

**3.3 心速宁胶囊的质量评价** 中药指纹图谱是一种多指标的质控模式,可以较全面地反映复方中的化学成分信息<sup>[5]</sup>,其已成了国内外广泛接受的中药质量评价模式。本研究建立的心速宁胶囊 HPLC 指纹图谱,覆盖了该制剂中全部组方药味的主要特征成分,共标定了 29 个共有指纹峰,并归属到各药材,



1. 心速宁胶囊;2. 黄连提取物;3. 枳实提取物;4. 半夏提取物;5. 常山提取物;6. 茯苓提取物;7. 甘草提取物;8. 苦参提取物;9. 莲子心提取物;10. 麦冬提取物;11. 青蒿提取物;12. 人参提取物

图 4 心速宁胶囊及其各组方药材的 HPLC 比较

Fig. 4 Comparison of HPLC chromatograms of Xinsuning capsules and single herb in this preparation

指认了其中 12 个主要的色谱峰,方法简便易行且稳定可靠、重复性好。采用相似度和聚类分析对指纹图谱进行评价,2 种方法的结果基本吻合。10 批样品的相似度计算结果显示,与共有模式比较,各自的相关系数均在 0.97~0.99,说明心速宁胶囊化学组成的一致性较好,表明建立的指纹图谱条件具有较好的适用性,可作为该制剂的质量控制和评价指标之一。

**3.4 心速宁胶囊与各单味药材的相关性分析** 通过比较发现,心速宁胶囊在 254 nm 处色谱峰较多、强度大,黄连、枳实提取物在 254 nm 吸收较强;半夏提取物、甘草提取物、莲子心提取物在 254 nm 处吸收很弱。比较了心速宁胶囊及单味药材的 HPLC 图谱,结果在该条件下,以黄连、枳实对全方色谱图的贡献率最大,二者均为 0.21,半夏和莲子心的贡献率最小,这和观察到的单味药材在 254 nm 处的吸收值相吻合。通过比较心速宁胶囊和单味药材的图谱发现其主要色谱峰来自黄连,这一结果也恰好印证了该方的君药是黄连。

根据“急则治其标,缓则求其本”的治疗方略,心速宁胶囊方中重用黄连,辅以枳实、常山、青蒿、苦参等清热化痰、开泄痰结,以治标;人参、麦冬、甘草、莲子心、茯苓等益气养阴、扶助心气,以求本。诸药合用,标本兼治,共同发挥清热化痰、宁心定悸、益气养阴等功效。除了黄连、枳实等单味药之外,半夏中的麻黄碱、莲子心中的去甲乌药碱等化学成分,虽然也有降压、增加冠脉血流量、心肌收缩振幅增加等作用,但也具有显著的中枢兴奋等副作用;常山在本方

中主要用于祛除胸中痰饮,但常山碱有催吐等副作用。因此,配伍之后这些化学成分在复方中的含量并不高。

现代药理研究表明心速宁胶囊其他辅药中的多种化学成分,如莲子心中的莲心碱、苦参中的苦参碱、人参中的人参皂苷类成分等,均具有显著的抗心律失常活性,但这些成分在 254 nm 处并无很大的吸收,这些成分的测定及质量控制还需要结合紫外吸收的其他波长(如 282 nm 等),甚至需要结合蒸发光散射检测器等其他质量型检测器进行分析。通过本实验初步明确了心速宁胶囊中 HPLC 色谱峰的来源组成,展示了心速宁胶囊不是 11 味单味药化学成分的简单相加,为完善心速宁胶囊的质量标准提供了实验依据,同时也为该复方配伍的物质基础及科学内涵研究奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:718-720.
- [2] 王海南. 中药有效成分研究与中药新药研发[J]. 中华中医药杂志,2007,22(5):268-270.
- [3] 韩晔华,霍飞凤,杨悠悠,等. 中药指纹图谱研究的某些进展与展望[J]. 色谱,2008,26(2):142-152.
- [4] 张霞,蓝苑元,任萃文. 中药复方制剂制备工艺研究进展[J]. 中国现代中药,2007,9(4):38-40.
- [5] 李跃辉,王银,彭宇,等. 银桑菊固体饮料的 HPLC 指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(18):68-71.
- [6] 李建银,刘文,邱德文. 中药复方指纹图谱的研究现状及其前景[J]. 武警医学,2004,15(1):59-61.

[责任编辑 刘德文]