

通心络胶囊 UPLC 指纹图谱研究

孟作环¹, 姜新刚¹, 赵韶华¹, 李叶双², 贾继明^{2*}, 马振嗣¹

(1. 河北以岭医药研究院有限公司, 石家庄 050035; 2. 北京以岭药业股份有限公司, 北京 102600)

[摘要] 目的:用超高效液相色谱法建立通心络胶囊指纹图谱测定方法,全面评价其内在质量。方法:Waters ACQUIT UPLC® BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),检测波长 203 nm,流动相乙腈-0.2% 磷酸水溶液,梯度洗脱,流速 0.45 mL·min⁻¹,分析时间 36 min,柱温 30 ℃。结果:建立了通心络胶囊指纹图谱,标示出 39 个共有峰,共有峰相似度 >0.96。结论:该方法准确、重复性好,可作为控制通心络胶囊的质量依据。

[关键词] 通心络胶囊; 超高效液相色谱; 指纹图谱; 相似度

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)03-0056-03

[doi] 10.11653/syjf2014030056

Study on UPLC Fingerprint of Tongxinluo Capsules

MENG Zuo-huan¹, JIANG Xin-gang¹, ZHAO Shao-hua¹, LI Ye-shuang², JIA Ji-ming^{2*}, MA Zhen-si¹

(1. Hebei Yiling Pharmacological Institute, Shijiazhuang 050035, China;

2. Beijing Yiling Pharmaceutical Co., Ltd., Beijing 102600, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a UPLC method for the determination of fingerprint chromatograms of Tongxinluo capsules, help its quality control and evaluate its internal quality. **Method:** A Waters ACQUIT UPLC® BEH C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) was used and acetonitrile-0.2% phosphoric acid solution as mobile phase at the flow rate of 0.45 mL·min⁻¹ with gradient elution; the detection wavelength was set at 203 nm; the column temperature was maintained at 30 ℃. **Result:** An UPLC method for the determination of fingerprint chromatograms of Tongxinluo capsules was established. It showed 39 common peaks and the similarity threshold was 0.96. **Conclusion:** The method was proved accurate and repeatable. It can be applied to the quality control of Tongxinluo capsules.

[Key words] Tongxinluo capsules; UPLC; fingerprint; similarity

通心络胶囊由人参、赤芍、降香、乳香、水蛭、全蝎、土鳖虫、蜈蚣、蝉蜕、冰片等中药组成的复方制剂^[1]。近年来,有关通心络胶囊治疗心脑血管疾病

的报道较多,质量控制方法有薄层法、高效液相色谱法和毛细管电泳法^[2-5]。采用超高效液相色谱法对通心络胶囊进行了指纹分析研究和对照品归属,对数据进行信息提取和统计,为通心络胶囊质量标准提高提供依据。

1 材料

超高效液相色谱仪(UPLC H-Class, PDA Detector, 美国 Waters 公司), AG135 型电子天平(Mettler Toledo), KQ5200B 型超声波清洗器(功率 200 W, 频率 40 kHz, 昆山市超声仪器有限公司), 飞鸽 TGL-16C 型离心机(上海安亭科学仪器厂), 相似度计算软件使用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版。

[收稿日期] 20130511(001)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973)项目(2012CB518606); 国家十二五“重大新药创制”科技重大专项(2011ZX09401-020)

[第一作者] 孟作环, 工程师, 从事中西药新药创新与开发研究, Tel: 0311-85901304, E-mail: mzh620@aliyun.com

[通讯作者] * 贾继明, 博士, 高级工程师, 从事中药新药研究与开发研究, Tel: 0311-85901304, E-mail: jjm_0451@163.com

乙腈(色谱纯,美国 Fisher Chemicals 公司),甲醇(色谱纯,美国 Fisher Chemicals 公司),屈臣氏蒸馏水(批号 20120319C,广州市屈臣氏食品饮料有限公司),磷酸(色谱纯,批号 20120104,天津市科密欧化学试剂有限公司)。

10 批通心络胶囊样品(石家庄以岭药业股份有限公司生产,批号 120229,120231,120233,1200304,1200308,120310,120712,120723,120727,120919,没食子酸对照品(批号 110831-200302),苯甲酸对照品(批号 110419-200301),芍药苷对照品(批号 120524-12)均为含量测定用,由中国药品生物制品检定所提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters ACQUIT UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),流动相乙腈(A)-0.2% 磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~2 min, 1% A; 2~3 min, 1%~9% A; 3~5 min, 9%~13% A; 5~20 min, 13%~36% A; 20~23 min, 36%~60% A; 23~35 min, 60%~100% A; 35~36 min, 100% A),流速 0.45 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,检测波长 203 nm,进样量均为 0.4 μL,见图 1。

为 70% 甲醇制成每 1 mL 含芍药苷对照品、没食子酸对照品、苯甲酸对照品分别为 0.21, 0.06, 0.14 mg 的溶液,分别精密吸取上述对照品溶液 0.50 mL 混匀,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 稳定性试验 取同一批号通心络胶囊供试品溶液 0.4 μL,分别于 0, 2, 4, 8, 16, 24 h 进样 6 次。结果在 203 nm 下测得各共有峰相对保留时间和峰面积的 RSD 均 < 3.0%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.2 精密度试验 取同一批号通心络胶囊供试品溶液 0.4 μL,连续进样 5 次,结果在 203 nm 下测得各共有峰相对保留时间和峰面积的 RSD 均 < 3.0%,表明供试品溶液精密度良好。

2.4.3 重复性试验 取同一批号通心络胶囊供试品溶液 0.4 μL,按 2.2 项方法,制备 5 份供试品溶液,分别进样。结果在 203 nm 下测得各共有峰相对保留时间和峰面积的 RSD 均 < 3.0%,表明该方法下供试品溶液重复性良好。

2.4.4 样品测定 按上述方法检测 10 批样品指纹图谱,同时生成对照峰,标示了指纹图谱中 39 个共有峰。并对指纹图谱中的部分共有峰进行了归属,4 号峰为没食子酸,11 号峰为芍药苷,13 号峰为苯甲酸均为赤芍中主要成分。其中 1, 2, 3, 4, 5, 11, 12, 13, 14, 21, 26, 30, 31 号共 13 个峰为强吸收峰。

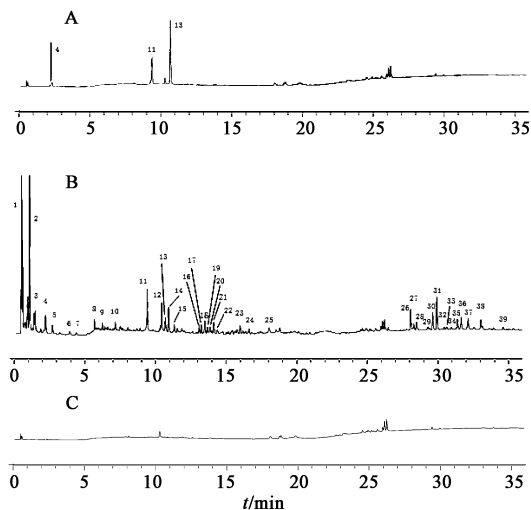
2.4.5 标准指纹图谱及技术参数 通心络胶囊指纹图谱共有模式确立利用中国药典“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”,将 1~10 批次通心络胶囊图谱数据导入,经数据自动匹配,以平均数法生成对照指纹图谱。相似度见表 1,指纹图谱见图 2。

2.4.6 相似度计算及分析 按照建立起来的指纹图谱对不同批次的通心络胶囊进行相似度分析,结果表明其 10 批样品相似度 > 0.96,具有很好的相似性。

3 讨论

3.1 检测波长的选择 在 191~400 nm 扫描,结果显示在 203 nm 下指纹图谱的色谱峰数目最多,峰的分离也较好,能够较完整的反应出通心络胶囊中各动植物药材有效成分的化学信息。

3.2 样品预处理方法的选择 分别以乙腈、无水甲醇、无水乙醇、三氯甲烷和不同体积分数的甲醇超声萃取考察。结果显示,用 70% 的甲醇提取的样品信息量大。对提取时间 15, 30, 60, 90 min 进行考察,



A. 对照品; B. 样品; C. 阴性;

4. 没食子酸; 11. 芍药苷; 13. 苯甲酸

图 1 通心络胶囊 UPLC 特征指纹图谱

2.2 供试品溶液的制备 精密称取通心络胶囊药粉 0.15 g 置 10 mL 离心管中,加入体积分数为 70% 的甲醇 5.0 mL 密封超声提取 60 min 后以 4 500 r·min⁻¹ 离心 20 min,取上清液用 0.20 μm 针孔滤膜滤过,即得。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取芍药苷对照品、没食子酸对照品、苯甲酸对照品适量,加入体积分数

表 1 10 批次通心络胶囊指纹相似度

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照指纹
S1	1.000	0.980	0.973	0.977	0.982	0.975	0.979	0.971	0.988	0.985	0.992
S2	0.980	1.000	0.994	0.982	0.983	0.988	0.967	0.994	0.983	0.987	0.995
S3	0.973	0.994	1.000	0.974	0.979	0.978	0.961	0.988	0.972	0.977	0.989
S4	0.977	0.982	0.974	1.000	0.981	0.978	0.977	0.976	0.989	0.989	0.993
S5	0.982	0.983	0.979	0.981	1.000	0.978	0.961	0.971	0.972	0.969	0.987
S6	0.975	0.988	0.978	0.978	0.978	1.000	0.980	0.981	0.984	0.975	0.991
S7	0.979	0.967	0.961	0.977	0.992	0.980	1.000	0.963	0.988	0.970	0.983
S8	0.971	0.994	0.988	0.976	0.986	0.981	0.963	1.000	0.982	0.988	0.991
S9	0.988	0.983	0.972	0.989	0.990	0.984	0.988	0.982	1.000	0.991	0.994
S10	0.985	0.987	0.977	0.989	0.969	0.975	0.970	0.988	0.991	1.000	0.992
对照指纹	0.992	0.995	0.989	0.993	0.987	0.991	0.983	0.991	0.994	0.992	1.000

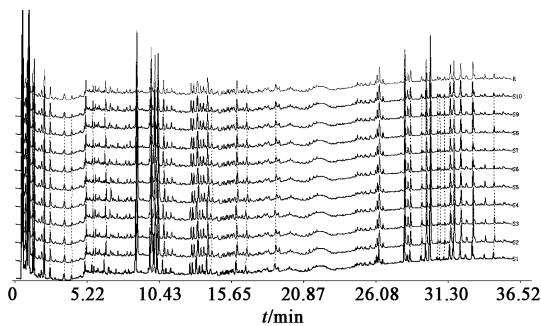


图 2 10 批通心络胶囊 UPLC 指纹图谱及对照指纹图谱

结果显示 60 min 已充分提取且效果佳,故采用 70% 的甲醇超声 60 min 提取。

3.3 流动相的选择 固定检测波长(203 nm)、流速(0.45 mL·min⁻¹)、柱温(30℃)、进样量(0.4 μL)和 UPLC 仪器等其他条件,分别以乙腈-水、甲醇-水,乙腈-磷酸水和甲醇-磷酸水等体系为流动相进行洗脱色谱分析,对所获取的供试品中所呈现的色谱峰的个数、强吸收峰的保留时间、面积百分比、理论塔板数、分离度、峰的对称性、选择性等参数进行比较和分析,结果用乙腈-0.2% 磷酸溶液 0.45 mL·min⁻¹的流速最好。

3.4 对照品的选择 已有文献报道通心络复方所含药材中含有人参皂苷、苈草苷、异苈草苷、儿茶素、甘草素、反式橙花叔醇等^[6-10],选出 3 个适合的对照品,相较 2010 年版《中国药典》增加了没食子酸、苯甲酸对照品。

结果显示用上述方法确立的通心络胶囊指纹图谱方法有较好的相关性,不同批次色谱图谱的相似度均 > 0.96,表明该方法准确、重复性好,可作为控

制通心络胶囊质量的依据。尽管指纹图谱能提供较多的峰信息,但这些成分的药效作用不完全清楚,在未来工作中,可结合液质技术追踪共有峰的药效作用。

[参考文献]

[1] 吴以岭. 脉络论[M]. 北京:中国科学技术出版社, 2010:1120.

[2] 张雪坤,英俊岐,刘红梅. 通心络对心脑血管作用研究进展[J]. 疑难病杂志,2005, 4(3):188.

[3] 冯绍华,张静. HPLC 法测定通心络胶囊中芍药苷的含量[J]. 现代医药卫生,2004, 20(21):2224.

[4] 董艳辉. 毛细管柱气相色谱法测定通心络胶囊中冰片的含量[J]. 广东化工,2013,40(9):176.

[5] 何玉川,崔巍,徐艳红. 通心络胶囊真伪品含量对比研究[J]. 中外医疗,2011(14):132.

[6] 赵祥升,魏建和,孟慧,等. 不同地区商品降香的指纹图谱及甘草素含量的比较[J]. 华西药理学杂志,2012, 27(1):86.

[7] Yukihiro Goda, Madoka katayama, Kazuo Ichikawa, et al. Inhibitors of prostaglandin biosynthesis from *Dalbergia odorifera* [J]. Chem Pharm Bull, 1985, 33 (12):5606.

[8] 翟为民,袁永生,周玉新,等. 人参、西洋参及三七参指纹图谱鉴别[J]. 中国中药杂志,2001,26(7):481.

[9] 闫冲,林励,徐道华,等. 檀香叶的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 广东药学院学报, 2012, 28(3):287.

[10] Adams R P. Identification of essential oil components by gaschromatography-mass spectrometry [M]. Illinois,IL, Allured Publishing Co., 1995.

[责任编辑 顾雪竹]