

· 化学与分析 ·

## 通塞脉微丸 HPLC 指纹图谱的研究

李伟东, 蔡宝昌\*, 狄留庆

(南京中医药大学江苏省中药炮制重点实验室, 南京 210029)

[摘要] 目的: 通过通塞脉微丸指纹图谱的研究, 建立该制剂稳定、可重复的质量控制手段。方法: 以 Zorbax 80A Extend-C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱, 流动相为乙腈-0.1% 磷酸溶剂系统, 线形梯度洗脱, 检测波长为 276 nm, 柱温 30 ℃; 采用指纹图谱相似度软件进行数据分析。结果: 建立了通塞脉微丸的 HPLC 对照指纹图谱, 标示了 21 个共有色谱峰, 通过与单味药及相应阴性制剂的比较确认了这 21 个色谱峰的归属; 10 批样品的色谱指纹图谱的整体相似度在 0.984 以上。结论: 通塞脉微丸 HPLC 指纹图谱的建立, 对有效控制通塞脉微丸成品制剂的质量具有重要意义。

[关键词] 通塞脉微丸; 指纹图谱; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)03-0016-04

## Research on HPLC Fingerprint of Tongsaimai Pellet

LI Wei-dong, CAI Bao-chang\*, DI Liu-qing

(Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Key Laboratory of Chinese Medicine Processing, Nanjing, Jiangsu Province 210029, China)

**[Abstract] Objective:** To establish the HPLC fingerprint of Tongsaimai pellet. **Method:** The separation was performed on Zorbax 80A Extend-C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with a mobile phase consisting of acetonitrile water with 0.1% phosphoric acid by gradient elution mode at the flow rate of 0.7 mL · min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was at 276 nm. The column temperature was at 30 ℃, the data were processed by fingerprint similarity evaluation software. **Results:** A standard HPLC fingerprint for Tongsaimai pellet with 21 common peaks was established. The similarity of 10 batches of Tongsaimai pellet was not lower than 0.984, The adscription of 21 common peaks was by comparing single herb or negative preparation with Tongsaimai pellet. **Conclusion:** This method can be used for quality control of Tongsaimai pellet.

**[Key words]** Tongsaimai pellet; fingerprint; HPLC

通塞脉微丸是在国家中药保护品种通塞脉片的基础上通过中成药 2 次开发而成的, 是以治疗缺血性脑中风为主的一种新型中药制剂。由黄芪、当归、金银花、玄参、石斛、甘草等中药组成, 具有清热养

阴、活血化瘀的功效。临床用于血栓闭塞性脉管炎、静脉血栓形成、动脉硬化闭塞症、脑血栓形成及其后遗症的治疗。

对于中药复方制剂仅通过测定其中几个有效成分的含量法尚不能完整、系统地反映该制剂的内在质量。本实验对通塞脉微丸进行 HPLC 色谱指纹图谱的研究, 创建通塞脉微丸典型的指纹图谱, 为该制剂提供稳定、可重现的质量控制手段<sup>[1]</sup>。

### 1 实验材料

**1.1 药材及制剂** 黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *As-*

[收稿日期] 2009-05-12

[基金项目] 国家 863 重大研究计划项目(2003AA2Z3247); 江苏省科技厅科技攻关重大项目(BK2001209)

[通讯作者] \* 蔡宝昌, Tel: (025) 86798281; E-mail: bccai@126.com

*tragalus membranaceus*( Fisch.) Bge. var. *mongholicus*( Bge.) Hsiao 的干燥根; 当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis*( Oliv.) Diels 的干燥根; 金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花; 玄参为玄参科植物玄参 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. 的干燥根; 石斛为兰科植物马鞭石斛 *Dendrobium fimbriatum* Hook. var. *oculatum* Hook. 干燥茎; 甘草为豆科植物甘草 *Clycyrrhiza uralensis* Fisch. 干燥根及根茎。以上药材由江苏南星药业有限责任公司提供, 经本校药学院中药鉴定教研室吴德康教授鉴定。通塞脉微丸( 10 批次, 批号: 031006, 031016, 031025、031028、031106、031112、031120、031208、031210、031216, 分别记为 S1、S2、S3、S4、S5、S6、S7、S8、S9 和 S10) 及通塞脉微丸阴性制剂, 由南京中医药大学中医药研究院制备。

**1.2 仪器与试剂** Agilent1100 液相色谱仪( 美国 Agilent 公司); AG285 型十万分之一电子天平( 瑞士 METTLER TOLEDO); KQ2250 型超声波清洗器( 昆山超声仪器有限公司); 《中药色谱指纹图相似度评价系统》<sup>[2]</sup>。乙腈( 美国 Tedia 公司, 色谱纯); 重蒸去离子水( 实验室制备); 乙醇( 上海化学试剂有限公司, 分析纯); 磷酸( 上海化学试剂有限公司, 分析纯); 甲醇( 上海化学试剂有限公司, 分析纯)。绿原酸( 批号: 110753-200212)、咖啡酸对照品( 批号: 885-200001), 阿魏酸对照品( 批号: 111698-200501)、甘草苷对照品( 批号: 1116102200604)、肉桂酸( 批号: 0786-9801) 购于中国药品生物制品检定所, 供含量测定用, 甘草素、甘草酸单铵盐( 自制), 经 UV、IR、MS、NMR 等结构测定, HPLC 检测为单一成分, 纯度均在 99% 以上。

## 2 方法

**2.1 色谱条件** Zorbax 80A Extend-C<sub>18</sub> 柱( 250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。流动相系统及梯度洗脱条件见表 1。检测波长 276 nm, 柱温: 30 °C, 进样量 5 μL。

表 1 流动相梯度洗脱条件

时间( min)	乙腈( %)	0.1% 磷酸( %)	流速( mL · min <sup>-1</sup> )
0	8	92	0.7
10	14	86	0.7
18	14	86	0.7
20	15	85	0.7
30	15	85	0.7
62	32	68	0.7
75	60	40	0.7
78	60	40	0.7
80	8	92	0.7

**2.2 供试品溶液的制备** 取装量差异项下的通塞脉微丸混匀, 研细, 取 0.50 g, 精密称定, 置于 50 mL 容量瓶中, 加入约 40 mL 溶剂( 甲醇 水 = 50 : 50) 超声 30 min, 待冷却至室温后, 定容, 摇匀。取出适量离心( 12 000 r · min<sup>-1</sup>, 5 min) 后, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液即得供试品溶液。

**2.3 对照品溶液的制备** 取甘草苷适量, 精密称定, 加甲醇溶解, 制成 200 μg · mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液。

## 2.4 方法学考察

**2.4.1 精密度试验** 取批号为 031106 的通塞脉微丸供试品溶液, 按上述色谱条件连续进样 5 次, 记录各共有峰保留时间和面积, 以甘草苷的保留时间和峰面积为 1, 计算出各共有峰的相对保留时间和峰面积比值, 结果各共有峰的相对保留时间和单峰面积 / 5% 总峰面积的峰面积比值基本一致, 其 RSD 均小于 3%, 表明实验仪器的精密度良好。

**2.4.2 重复性试验** 取批号为 031106 的通塞脉微丸, 制备供试品溶液 5 份, 按上述色谱条件测定, 记录各共有峰保留时间和面积, 以甘草苷的保留时间和峰面积为 1, 计算出各共有峰的相对保留时间和峰面积比值, 结果各共有峰的相对保留时间和单峰面积 / 5% 总峰面积的峰面积比值基本一致, 其 RSD 均小于 3%, 表明本方法重复性良好。

**2.4.3 稳定性试验** 取批号 031106 的通塞脉微丸供试品溶液, 分别在 0, 1, 2, 4, 6, 12, 24 h 进样测定, 记录各共有峰保留时间和面积, 以甘草苷的保留时间和峰面积为 1, 计算出各共有峰的相对保留时间和峰面积比值, 结果各共有峰的相对保留时间和单峰面积 / 5% 总峰面积的峰面积比值基本一致, 其 RSD 均小于 3%, 表明供试品溶液在 24 h 之内稳定。

## 3 结果

**3.1 通塞脉微丸指纹图谱的建立** 将对照品和供试品溶液按 2.1 项下色谱条件测定, 得到 10 个样品的图谱, 根据《中药注射剂色谱指纹图谱实验研究技术指导( 试行) 》的要求, 采用计算机辅助相似性评价系统, 分析确定了通塞脉微丸 10 批样品迁移时间以及峰面积相对稳定的 21 个共有指纹峰, 甘草苷为通塞脉微丸中的主要活性成分, 且出峰时间适中, 色谱峰相应值高, 因此选择甘草苷为参照峰, 标号为 S, 其他特征峰依次标号为 1 ~ 21, 结果见图 1, 图 2。

**3.2 通塞脉微丸指纹图谱相似度评价** 采用国家

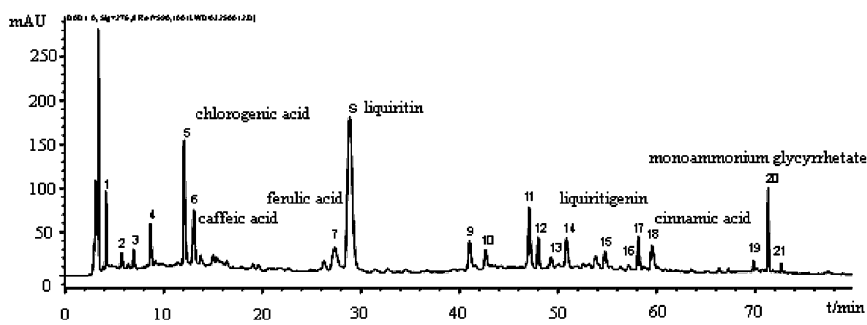


图 1 通塞脉微丸 HPLC 色谱指纹图谱

5. 绿原酸; 6. 咖啡酸; 7. 阿魏酸; 8. 甘草苷; 15. 甘草素; 18. 肉桂酸; 20. 甘草酸单铵盐

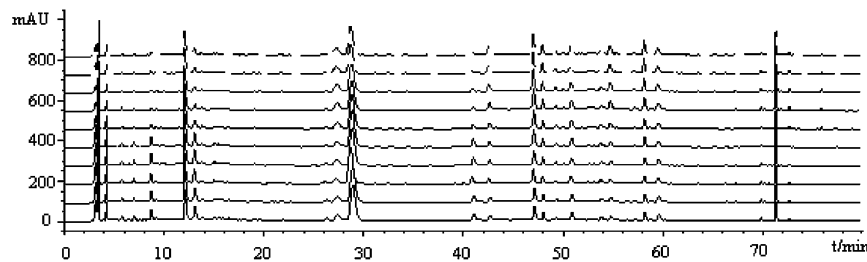


图 2 10 批通塞脉微丸 HPLC 色谱指纹图谱叠加图

药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》<sup>[2]</sup>评价 10 批通塞脉微丸的指纹图谱, 以均值法生成对照指纹图谱, 建立共有模式, 测得各批次样品与共有模式间的相似度, 结果均在 0.984 以上, 说明工艺较稳定, 见表 2。

表 2 10 批通塞脉微丸 HPLC 指纹图谱相似度

样品号	相似度	样品号	相似度
S1	0.994	S6	0.998
S2	0.995	S7	0.991
S3	0.995	S8	0.984
S4	0.993	S9	0.989
S5	0.996	S10	0.990

**3.3 药材与成品相关性的研究** 分别取药材阴性对照和阳性对照样品约 0.50g, 精密称定, 按 2.2 项下制备样品供试液。按照通塞脉微丸指纹图谱的色谱条件测定, 得到各样品的图谱, 进行药材与成品的相关性进行分析, 以确定各色谱峰的药材归属。结果见表 3。

通过对通塞脉微丸、阴性制剂及组方药材的 HPLC 指纹图谱相关性的研究, 确定了通塞脉微丸 HPLC 指纹图谱中 21 个色谱峰的药材归属, 其中 5、6、7、8、15、18、20 号峰经过与相对应的标准品对照后确定: 峰 5 为绿原酸 ( $t_R$  12.1 min)、峰 6 为咖啡酸 ( $t_R$  13.0 min)、峰 7 为阿魏酸 ( $t_R$  27.3 min)、峰 8 为甘草苷 ( $t_R$  28.8 min)、峰 15 为甘草素 ( $t_R$  54.7 min)、峰 18 为肉桂酸 ( $t_R$  59.5 min)、峰 20 为甘草酸铵

( $t_R$  71.3 min)。

表 3 通塞脉微丸和中药材指纹图谱的相关性

共有峰号	黄芪	当归	金银花	玄参	石斛	甘草
1	+	+		+	+	
2		+				
3		+		+	+	
4			+			
5(绿原酸)		+	+			
6(咖啡酸)			+			
7(阿魏酸)		+				
8(甘草苷)						
9			+			
10	+	+	+			
11		+	+			
12		+		+		
13				+		+
14	+					+
15(甘草素)						+
16	+					
17				+		
18(肉桂酸)				+		
19						+
20(甘草酸铵)						+
21						+

#### 4 讨论

**4.1 样品提取条件的考察** 以甘草苷的峰面积以及整体峰形为评价指标, 分别采用回流提取、超声提取以及索氏提取 3 种提取方法提取供试品, 3 种方式检测结果无明显差异, 故选择超声法, 操作简单快捷; 对供试品溶液制备方法进行考察, 如: 选择甲醇、无水乙醇、50% 甲醇、25% 甲醇、水等溶剂进行提取, 结果以 50% 甲醇提取的样品信息量较多、峰面积较大; 另考察了超声提取的时间和次数, 结果一次超声 30 min 即能提取完全。

**4.2 检测条件的选择** 对不同厂家或不同型号的色谱柱进行考察, 如: Kromasil  $C_{18}$  柱(天美公司)、Lichrospher  $C_{18}$  柱(汉邦公司)、Zorbax 80A Extend- $C_{18}$  柱(Agilent 公司)等。试验结果表明: Zorbax 80A Extend- $C_{18}$  色谱柱对通塞脉微丸洗脱出的色谱峰基线平稳, 峰数多且分离度好。对不同溶剂系统作为流动相进行试验<sup>[3]</sup>, 如: 乙腈-水, 甲醇-水, 乙腈-0.1%

(下转第 31 页)