

• 质量标准 •

# 乳块消片高效液相指纹图谱研究

展晓日, 史新元, 张 培, 乔延江\*

(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的: 建立乳块消片的高效液相色谱指纹图谱, 为科学客观地评价其质量提供可靠的方法。方法: 利用 HPLC-DAD 方法, 梯度洗脱, 测定了 12 批乳块消片的指纹图谱。色谱条件为: Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 采用甲醇(A)-3% 醋酸水(B) 体系; 流速: 1 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温: 30 °C; UV 检测波长: 280 nm。结果: 12 批乳块消片得到的色谱指纹图谱有 28 个共有峰, 通过与对照品的保留时间及紫外光谱的比对, 确定 3, 8, 25, 27 号峰分别为丹参素、原儿茶醛、橙皮苷、丹酚酸 B。结论: 乳块消片的指纹图谱特征性及专属性强, 可结合含量测定用于全面控制乳块消片的质量。

[关键词] 乳块消片; 高效液相色谱; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)04-0001-03

## Study on HPLC Fingerprinting of Rukuaixiao Tablets

ZHAN Xiao-ri, SHI Xin-yuan, Zhang Pei, QIAO Yan-jiang\*

(Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a sensitive and specific HPLC method for controlling the quality of Rukuaixiao tablets. **Methods:** The fingerprinting analysis of Rukuaixiao tablets was carried out on an Eclipse XDB-C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with methanol and containing water solution as mobile phases in a gradient mode. The flow rate was 1 mL·min<sup>-1</sup>, the column temperature was 30 °C, and the detection wavelength was 280 nm. **Result:** 28 characteristic peaks were found among 12 batches of samples and four peaks of them identified by being compared with the retention time and the UV spectra of reference substances. **Conclusion:** The method is accurate and reliable with high specificity and can be used for the quality control of Rukuaixiao tablets.

[Key words] Rukuaixiao tablets; HPLC; fingerprinting

乳块消片由丹参、橘叶、地龙、王不留行、皂角刺、川楝子 6 味中药组成。具有疏肝理气、活血化瘀、消散乳块之功效, 用于肝气郁结、气滞血瘀、乳腺增生、乳房肿胀<sup>[1]</sup>。方中君药为丹参和橘叶, 且在制剂过程中均采用水提取法, 丹参中水溶性有效成分主要是以丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 B 等为代表的水溶性酚酸类成分, 而橘叶中的橙皮苷是其重要的指

标性成分。故目前报道的文献<sup>[2~7]</sup>中, 主要对上述有效成分进行了含量测定。但由于中药复方成分复杂, 其药效不仅取决于某几个有效成分, 因此本研究在已有主要有效成分含量测定的基础上, 对乳块消片的指纹图谱进行研究, 以达到全面控制其质量的目的。

### 1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(HP 真空脱气泵, HP 四元泵, HP 自动进样器, HP 柱温箱, HP DAD 检测器)。甲醇为色谱纯, 冰醋酸为分析纯, 对照品丹参素、原儿茶醛、橙皮苷、丹酚酸 B(纯度均大于 98%) 购自中国药品生物制品检定所。12 批乳块消片由指定药厂提供。

[收稿日期] 2007-10-29

[基金项目] 北京市科技计划课题资助课题(D02050040040111)  
北京市“中药基础与新药研究重点实验室”资助课题

[通讯作者] \* 乔延江, Tel: (010) 84738601; E-mail: yjqiao@263.net

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件及系统适用性实验** 色谱柱: Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 采用甲醇(A)-3% 醋酸水(B) 体系, 梯度洗脱程序为 A: B (体积比) = 10: 90 (0 min) → 33: 67 (30 min) → 47: 53 (60 min); 流速: 1 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温: 30 °C; UV 检测波长: 280 nm, 进样体积: 5 μL。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 对照品溶液** 取橙皮苷、丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 B 对照品适量, 精密称定, 加 3% 醋酸甲醇 (体积比) 溶解并定容至刻度, 制得每 1 mL 分别含 0.136 0, 0.111 5, 0.107 5, 0.556 0 mg 的混合对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液** 取本品 15 片, 除去包衣, 研细混匀, 取 0.5 g, 精密称定, 于 50 mL 具塞三角瓶内, 精密加入 3% 醋酸甲醇溶液 25 mL, 称重, 超声 (50 W, 40 KHz) 提取 30 min, 放冷, 加入 3% 醋酸甲醇溶液补足失重, 微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 即得。

**2.3 精密度试验** 取同一份供试品溶液, 在上述液相条件下重复进样 6 次, 记录色谱图。结果表明, 各共有峰的相对保留时间的 RSD 均小于 0.3%, 相对峰面积的 RSD 均小于 0.8%, 进样精密度良好, 符合指纹图谱要求。

**2.4 重复性试验** 取同一批号的样品 (批号: 73040) 6 份, 按“2.2.2”项下方法制备样品溶液, 按上述色谱条件进行分析, 记录色谱图。结果表明, 各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.3%, 相对峰面积的 RSD 均小于 2%, 重复性良好, 符合指纹图谱的要求。

**2.5 稳定性试验** 取同一供试品溶液 (批号: 73040) 放置 0, 3, 6, 9, 12, 24 h 后按上述色谱条件进行分析, 记录色谱图。结果表明, 各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.1%, 相对峰面积的 RSD 均小于 0.8%, 供试品溶液在 24 h 内稳定。

### 3 主要色谱峰的鉴定

按与样品相同的色谱条件分析得到 4 种有效成分混合对照品的 HPLC 色谱图 (见图 1-A), 采用保留时间对照法和对照品追加法对样品中的 4 种有效成分进行初步定性, 进而用二极管阵列紫外检测技术采集各色谱峰的紫外光谱和三维图谱, 将所得图谱的形状、吸收带位置及相对强度与对照品图谱比较, 结果表明, 与指纹图谱中的 3, 8, 25, 27 号峰相对应

的成分分别为丹参素、原儿茶醛、橙皮苷、丹酚酸 B。

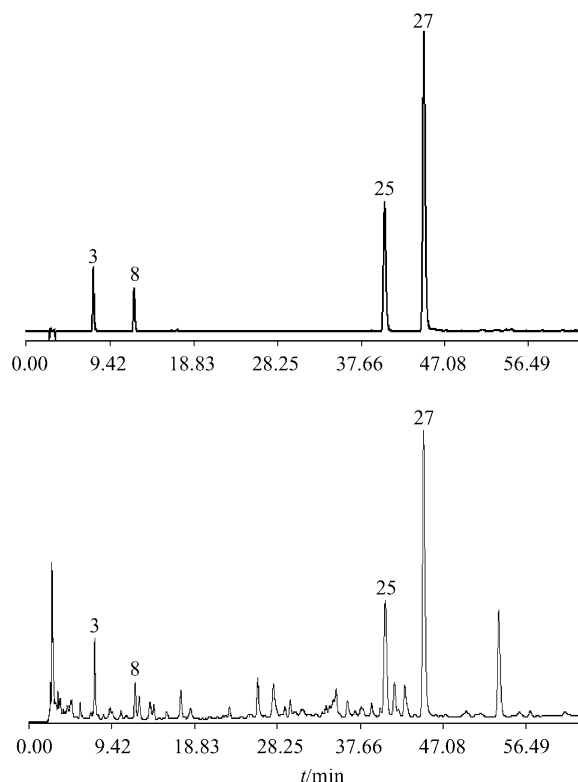


图 1 高效液相色谱图

A. 丹参素、原儿茶醛、橙皮苷、丹酚酸 B 混合对照品;  
B. 对照指纹图谱; 3. 丹参素; 8. 原儿茶醛; 25. 橙皮苷; 27. 丹酚酸 B

## 4 乳块消片指纹图谱的建立

取不同批次的乳块消片, 按“2.2.2”项下方法制备样品溶液, 按上述色谱条件进行分析, 记录色谱图 (见图 2), 共获得 28 个共有峰。其中 25 号峰橙皮苷作为参比峰, 以其相对保留时间及相对峰面积为 1, 计算各峰的相对保留时间和相对峰面积。

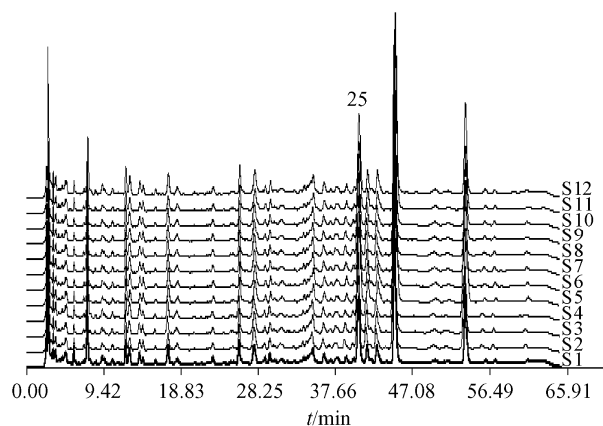


图 2 12 批乳块消片的 HPLC 指纹图谱  
25. 橙皮苷

采用药典委员会的色谱指纹图谱处理软件, 以批号 73002 的乳块消片的图谱为参照谱, 以中位数法生成对照指纹图谱 (见图 1-B), 可分为 3 部分: 保

留时间(0~ 15) min 有 10 个峰; 保留时间(15~ 30) min 有 8 个峰; 30~ 60 min 有 10 个峰。以上述色谱指纹图谱处理软件对指纹图谱的整体相似度进行评价分析, 计算得 12 批样品图谱与对照指纹图谱之间的相似度见表 1。

表 1 12 批乳块消片的相似度计算结果

样品号	批次	相似度
S1	73002	0.990
S2	73003	1.000
S3	73040	0.999
S4	73004	0.986
S5	73005	1.000
S6	73006	0.997
S7	73007	1.000
S8	73008	0.999
S9	73009	0.998
S10	73010	0.999
S11	73011	0.999
S12	73012	0.996

## 5 讨论

考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-醋酸水、乙腈-磷酸水体系作为流动相对分离的影响, 试验表明甲醇-醋酸水体系所得色谱图中色谱峰较多且分离度较好, 故选择甲醇-醋酸水体系, 又比较了甲醇-1%醋酸水和甲醇-3%醋酸水体系, 结果表明甲醇-3%醋酸水体系较好<sup>[8~10]</sup>。经试验研究, 最终确定采用流动相甲醇(A)-3%醋酸水(B)体系梯度洗脱, 0~ 30 min 时 A-B 从 10: 90 $\rightarrow$ 33: 67, 30~ 60 min 时 A-B 从 33: 67 $\rightarrow$ 47: 53; 在 60 min 内可使全部色谱峰流出, 且各峰分离较好。

采用二极管阵列检测器结合乳块消片指纹三维图谱, 考察了 232 nm 280 nm 286 nm 处的谱图特征, 结果表明, 波长在 280 nm 处, 峰数目较多且基线平滑, 故确定检测波长为 280 nm。

由于橙皮苷是君药橘叶中的主要成分, 且其保留时间及峰面积适中, 故选择橙皮苷为参比物, 这符合中药指纹图谱获取过程中参比物的选择原则<sup>[10]</sup>。

以药典委员会的色谱指纹图谱处理软件, 对指

纹图谱的整体相似度进行评价分析, 结果表明: 12 批乳块消片的样品图谱与对照指纹图谱之间的相似度均大于 0.98, 相似性良好。并且 12 批样品中丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 B 的相对峰面积范围分别为 0.26~ 0.39, 0.13~ 0.20, 1.77~ 2.44, 说明不同批次的乳块消片中 4 种主要成分的相对含量差异并不十分明显, 从而进一步证明了不同批次的乳块消片质量较稳定。但由于目前有研究表明, 指纹图谱处理软件所使用的相似度计算方法中采用相关系数和夹角余弦为指标, 灵敏度较低<sup>[11]</sup>, 因此, 本文所得的相似度结果是否能真正反映其质量, 还要进一步验证, 以便为指纹图谱用于质量控制提供科学合理的依据。

## [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部, 北京: 化学工业出版社, 2005. 500.
- [2] 赵希贤, 周海燕, 薄少英. 高效液相色谱法测定乳块消片中丹参素的含量[J]. 北京中医药大学学报, 2004, 27(9): 64.
- [3] 邵宪平, 杨广德. HPLC 法测定乳块消片中原儿茶醛含量[J]. 西北药学杂志, 2000, 15(2): 61.
- [4] 莫毅, 贺英菊, 闫根全. HPLC 测定乳块消分散片中橙皮苷的含量[J]. 华西药学杂志, 2006, 21(1): 88.
- [5] 兰秦, 南方, 侯向华, 等. RP-HPLC 法测定乳块消胶囊中橙皮苷的含量[J]. 西北药学杂志, 2004, 19(1): 8.
- [6] 徐苓, 余彦明, 朱卫. 乳块消胶囊质量控制方法探讨[J]. 西北药学杂志, 1998, 13(4): 158.
- [7] 刘媛文. HPLC 法测定乳块消片中丹参酮 IIA 的含量[J]. 广西中医学院学报, 2004, 7(1): 55.
- [8] 游勇基, 陈铭辉. 高效液相色谱法测定丹参中丹酚酸 B 等 3 种有效成分[J]. 中国药学杂志, 2003, 38(12): 951.
- [9] 潘英妮, 袁丹, 付文卫, 等. HPLC 法测定丹参类注射液中 4 种水溶性成分含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2004, 21(3): 196.
- [10] 谢培山. 中药色谱指纹图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005. 246, 109.
- [11] 刘永锁, 孟庆华, 蒋淑敏, 等. 相似系统理论用于中药色谱指纹图谱的相似度评价[J]. 色谱, 2005, 23(2): 158.