

复智散色谱指纹图谱的初步研究

赵敬堃^{1*}, 王德生¹, 王建秀¹, 段淑荣¹, 李文兰², 白晶²

(1. 哈尔滨医科大学附属第一医院, 黑龙江 哈尔滨 150001;
2. 哈尔滨商业大学药物研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

[摘要] 目的: 建立复智散反相高效液相色谱(RP-HPLC)指纹图谱的分析方法。方法: 采用 RP-HPLC 法, 线性梯度洗脱, 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液, 体积流量 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 335 nm, 柱温 30℃。实验测定多批样品并记录指纹图谱, 不同样品之间的相似度采用国家药典委员会中药色谱指纹图谱相似度评价系统研究版(2004A) 计算。结果: 精密性、重复性、稳定性试验中相对共有峰面积和相对保留时间的 RSD 均小于 2%。在选定的色谱条件下确定了 19 个峰为复智散的指纹特征峰, 自制样品平均相似度为 0.996。结论: 该法精密度高, 重复性好, 简便实用, 可为复智散的指纹图谱评价提供依据。

[关键词] 复智散; 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(2007)11-0004-04

Study on Fingerprinting of Fu Zhi San

ZHAO Jing-kun^{1*}, WANG De-sheng¹, WANG Jian-xiu¹, DUAN Shu-rong¹, LI Wen-lan², BAI Jing²

(1. First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China;
2. Harbin University of Commerce, Harbin 150086, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the chromatographic fingerprints of Fu Zhi San by RP-HPLC. **Methods:** By RP-HPLC, acetonitrile and water including 0.1% Phosphoric acid were mobile phase with gradient elution, flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the detection wavelength was 335 nm, and the temperature was 30℃. The fingerprints of different samples were compared with similarity evaluation software published by committee codex. **Results:** The RSD of relative peak areas and relative retention time of common peak in the test of precision, repeatability, and stability has not reached 2%, respectively. 19 peaks were identified as the characteristic fingerprints. Average similarity was 0.996. **Conclusion:** This method is precise, practicable, well-repeated and simple. It can be used as the method to judge the quality of Fu Zhi San.

[Key words] Fu Zhi San; fingerprints; HPLC

当今社会迅速步入老龄化状态, 痴呆已成为全球亟待解决的问题。资料显示全球(65~89)岁的人, 平均有 10% 会发生阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD), 85 岁以上的人, 有一半会发生不同程度的 AD, 严重影响了老年人的生活质量与生活独立

性^[1]。然而, 迄今国内外尚无能根本治疗 AD 的药物。复智散(FZS, 含黄芩、当归、红参、节菖蒲等 8 味药)自 1993 年组方, 并于次年应用于临床, 已证实在细胞水平、实验动物水平与临床水平疗效显著, 有治疗 AD 的作用^[2~4]。中药复方成分复杂, 要研制成分明确, 药理药效清楚, 疗效稳定, 有效成分含量可控的中成药, 须建立稳定的指纹图谱, 中药指纹图谱作为现代中药质量控制和鉴别的高新技术, 为质量评价问题的解决提供了新的思路和方法^[5]。本实验采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)方法, 建立 FZS 指纹

[收稿日期] 2007-03-26

[基金项目] 国家自然科学基金资助(30670726)

[通讯作者] * 赵敬堃, Tel: (0451) 53643849-5129; E-mail: zjk7486@yahoo.com.cn

图谱,对自制 10 批 FZS 进行分析比较,寻找各组分关系,建立 FZS 综合质控标准。

1 材料

1.1 仪器 Waters2695 高效液相色谱仪(四元梯度泵、在线脱气机、在线柱塞清洗装置、自动进样器、柱温箱);Empower 化学工作站;Waters2996 紫外全波长检测器;KQ5200DB 型超声震荡仪;R-201 旋转蒸发器;Milli-QA 超纯水机;AR1140 电子分析天平。

1.2 药品和试剂 黄芩苷对照品(批号:110715)、阿魏酸对照品(批号 0776-9910)由中国生物制品药品检定所提供;实验室自制 FZS 生药 10 批;试剂:超纯水、乙腈(色谱纯)、甲醇(分析纯)、磷酸(分析纯)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:SymmetryShiedC₁₈(5 μm, 4.6 mm × 250 mm);流动相:乙腈-0.1% 磷酸水溶液,梯度洗脱程序见表 1;柱温:30 °C;流速:1.0 mL·min⁻¹;检测波长:335 nm;进样量:20 μL。

表 1 指纹图谱流动相线性梯度表

时间(min)	0.1% 磷酸水溶液(% , v/v)	乙腈(% , v/v)
0 → 35	85 → 70	15 → 30
35 → 70	70 → 60	30 → 40
70 → 90	60 → 20	40 → 80

2.2 对照品溶液的制备 精密称取阿魏酸 1 mg,黄芩苷 0.05 mg,分别定容于甲醇 1 mL,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜过滤后,进样 20 μL^[6]。其色谱图,如图 1~2。其保留时间分别为 20.56 min, 28.86 min。

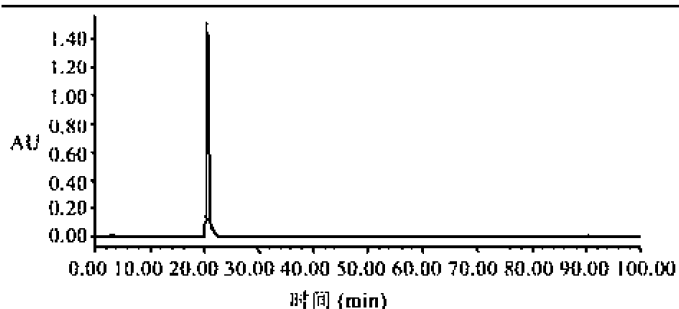


图 1 阿魏酸 HPLC 色谱图

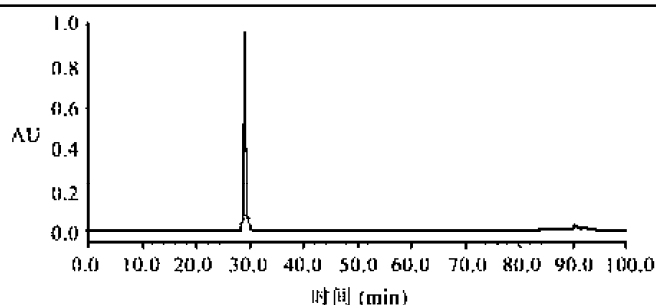


图 2 黄芩苷 HPLC 色谱图

2.3 供试品溶液的制备 称取 FZS 样品 12.5 g,加甲醇 250 mL 超声提取 30 min(250 w, 40 kHz),过滤,滤液减压回收溶剂至干,定容于甲醇 10 mL,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜过滤后,备用(浓度 1.25 g·mL⁻¹)。进样 20 μL 记录 90 min 的色谱如图 3。

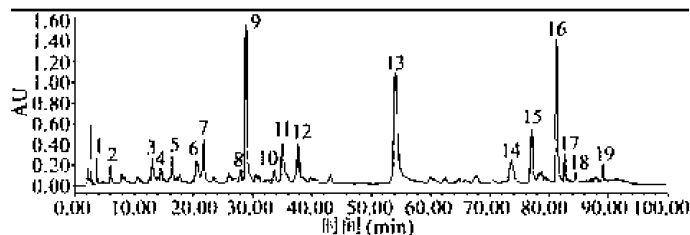


图 3 FZS HPLC 色谱图

2.4 特征峰认定与参照物的选择 保留时间在 28.86 min 的 9 号色谱峰是 FZS 样品 HPLC 图谱中峰面积较大,出峰时间适中,峰形好并且很稳定的一个峰。其保留时间、紫外光谱图和最大吸收波长(277.1 nm)与黄芩苷标准品(28.87 min, 277.1 nm)一致。故选择 9 号峰作为参照物。

将指纹图谱中其余的特征峰与阿魏酸标准品对比,发现 6 号峰的保留时间(20.51 min)、光谱图及其最大吸收波长(323.5 nm)与阿魏酸标准品(20.56 min, 323.5 nm)基本一致。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密密度实验 取同一供试品溶液,连续进样 5 次,检测指纹图谱。比较各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积,结果表明各共有峰相对保留时间的 RSD 在 0.03% ~ 0.24% 之间,各共有峰相对峰面积的 RSD 在 0.33% ~ 0.97% 之间,表明仪器的精密密度良好。

2.5.2 稳定性实验 取同一供试品溶液,分别于 0, 4, 8, 12, 24 h 检测指纹图谱。比较各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积,结果表明各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 小于 2%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5.3 重复性实验 取同一批 FZS 样品 5 份,按照“2.3”项下的方法制备供试品溶液,检测指纹图谱。比较各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积,结果表明各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 小于 2%,表明方法的重复性良好。

2.6 指纹图谱的建立和分析

2.6.1 共有峰的确定 对 10 批不同产地来源样品进行测定,记录 90 min 色谱图,对不同供试品所得的指纹图谱进行分析,选择稳定性和重复性好,吸收

强,特征明显的色谱峰为共有峰,标定 19 个共有峰(图 4),统计各共有特征峰相对峰面积,其中共有峰占总峰面积的 97%,非共有峰占 3%。各特征峰的平均相对保留时间和相对峰面积见表 2。

表 2 共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积

峰号	相对保留时间(min)	相对峰面积
1	0.127	0.032 5
2	0.208	0.095 2
3	0.454	0.148
4	0.505	0.082 1
5	0.568	0.152
6	0.711	0.196
7	0.752	0.256
8	0.968	0.081 8
9	1.00	1.00
10	1.16	0.098 1
11	1.21	0.382
12	1.87	1.20
14	2.55	0.260
15	2.67	0.416
16	2.81	0.801
17	2.86	0.118
18	2.93	0.054 0
19	3.09	0.080 7

2.6.2 相似度的计算 采用国家药典委员会开发的中药色谱指纹图谱相似度评价系统研究版(2004A),将色谱工作站中的数据导入该软件,选定上述 19 个特征峰进行谱峰匹配,通过中位数矢量计算得出 FZS10 批样品指纹图谱的共有模式,如图 5,并以此共有模式为标准,采用夹角余弦法计算各批样品的相似度,结果 10 批 FZS 样品平均相似度为 0.996(0.986~ 0.999)。

3 讨论

3.1 PDA 波长的确定 本实验对 PDA 检测波长进行了选择,为同时兼顾峰数、分离度,选择 335 nm 作为检测波长。此波长下,色谱峰分离情况良好,各组分均有较大吸收,可以尽可能多地反映样品化学成分信息。

3.2 提取方法 本次实验以尽可能多地体现 FZS 中的主要成分为原则。故在实验过程中分别选取了 75% 乙醇,甲醇,正丁醇,水作为提取溶媒,结果发现

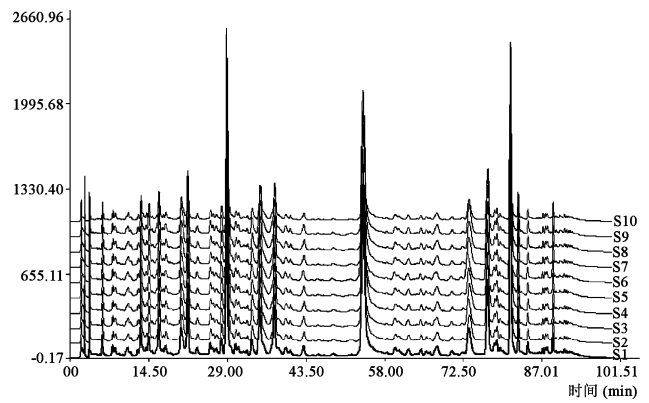


图 4 10 批 FZS 样品 HPLC 指纹图谱

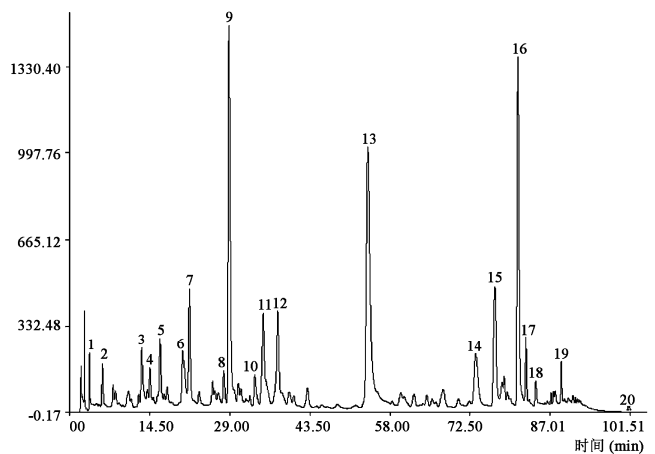


图 5 10 批 FZS 样品 HPLC 指纹图谱共有模式

用甲醇制备的供试品溶液指纹图谱响应峰最多且样品各峰分离较好,最终选定甲醇为提取溶剂。分别比较了加热回流和超声提取两种方法,结果发现二者提取效率基本一致,考虑到操作的方便,选择超声提取。

3.3 参照物的确定 在指纹图谱中黄芩苷为其主要色谱峰,峰位居中,含量亦较大,且黄芩苷对照品易得,最终选定黄芩苷为其参照物。

3.4 流动相的选择 该复方所含成分复杂,且各种类型的化合物极性差别较大,故采用梯度洗脱的方式。比较了甲醇-水系统、乙腈-水系统、乙腈-冰醋酸水溶液系统及乙腈-磷酸水溶液系统,结果发现乙腈-0.1% 磷酸水溶液系统可以使样品得到较好地分离,且色谱峰峰形较好,故选用该系统为流动相。

3.5 指纹图谱相似度评价 通过相似度的计算,不难发现自制 10 批样品的相似度在 0.99 以上,表明自制的 FZS 样品相似度良好,均具有相同的色谱特征峰。该法一次性进样即能得到众多的色谱峰,分离分析效率高,且各色谱特征峰保留时间稳定,所建立的指纹图谱具有稳定性和可控性。该法可用于 FZS 的质量控制,以保证药物的临床稳定疗效。

[参考文献]

- [1] Green MS, Kaye JA, Ball MJ, *et al.* The Oregon brain aging study. Neuropathology accompanying healthy aging in the oldest old[J]. *Neurology*, 2000, 54: 105-113.
- [2] 王德生, 徐晓云, 温世荣, 等. 复智散与尼莫地平、神经节苷脂治疗老年痴呆的实验和临床研究[J]. *中医药信息*, 1998, 6: 12.
- [3] 温世荣, 王德生, 张景艳, 等. 复智散对 SH-SY5Y 细胞生存状态的影响[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2003, 20(5): 431-433.
- [4] 温世荣, 王德生, 张景艳, 等. 复智散对神经细胞胞体面积和轴突长度变化的影响[J]. *中国临床康复*, 2005, 9(29): 241-243.
- [5] ZHO Y X. Technique on fingerprints on Chinese Traditional Medicine[M]. 1st. ed. Beijing: Chemical industry press, 2002. 31-40.
- [6] 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. 89, 211.