

• 质量标准 •

四物微丸高效液相法指纹图谱的研究

伍勇¹, 贺福元^{1*}, 曹燕²

(1. 湖南中医药大学药学院药剂教研室, 湖南长沙 410007;

2. 岳阳职业技术学院药学检验系, 湖南岳阳 414000)

[摘要] 目的: 研究四物微丸的色谱指纹图谱测定方法。方法: 以梓醇、芍药苷、阿魏酸、川芎嗪为对照品, 色谱柱: Alltech Apollo C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1% 磷酸溶液(梯度洗脱); 柱温: 40 °C; 测定波长: 215 nm; 分析时间: 100 min; 流速: 1 mL·min⁻¹, 研究了四物微丸 HPLC 指纹图谱。结果: 标示出四物微丸有 17 个共有峰。结论: 该方法准确、重复性好, 为四物微丸的指纹图谱质量控制提供了依据。

[关键词] 四物微丸; 高效液相; 指纹图谱; 质量控制

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)02-0001-03

Study on HPLC Fingerprint of Siwu Pellet

WU Yong¹, HE Fu-yuan^{1*}, CAO Yan²

(1. School of Pharmacy, Hunan University of TCM, Changsha 410007, China;

2. Yueyang Vocational Technical College, Yueyang 414000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the fingerprint chromatogram of Siwu Pellet. **Methods:** The Analysis was carried out as on Alltech Apollo C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column eluted with acetonitrile and 0.1% phosphoric acid in a gradient elution. The detection wavelength was set at 215 nm. **Results:** 17 peaks consist of the HPLC fingerprint of Siwu Pellet. **Conclusion:** The method is simple and with a good reproducibility, and can be used as a quality control method for Siwu Pellet.

[Key words] Siwu Pellet; HPLC; Fingerprint; Quality control

四物汤是中医补血方剂的经典代表名方,最早出于《仙授理伤续断秘方》,由熟地、当归、白芍、川芎组成。熟地滋阴补血为君药,当归和血生血为臣药,白芍敛阴益血为佐药,川芎调和气血,行气化瘀为使药,具调益营卫、滋养气血之效,广泛用于治疗冲任虚损、月经不调、崩中漏下及血瘦、时发疼痛等^[1,2]。2005 版中国药典中以四物汤为基础所制成的制剂中仅以芍药苷的含量作为质量控制指标,虽然此方法简单易行,但尚不能全面控制四物汤改进制剂的内

在质量。为此,我们采用 HPLC 法建立了四物微丸的指纹图谱,所建立的指纹图谱研究方法其洗脱条件的极性变化范围宽,能让更多成分在图谱中加以体现,其次对指纹图谱相似度的计算,采用相关系数与夹角余弦法使计算结果更加真实准确,为探索多药物、多成分的系统化角度控制四物汤制剂的质量新途径。

1 实验仪器及材料

Waters 高效液相色谱仪, Waters 1500 泵, Waters 2487 双波长检测器, Breeze 工作站, (美国 Waters 公司); 熟地黄、当归、白芍、川芎药材均购于湖南中医药大学附属一院中药房,经湖南中医药大学药学院药植教研室周日宝教授鉴定为正品; 梓醇对照品(0808-9803)、芍药苷对照品(110736-200424)、阿魏酸

[收稿日期] 2006-06-09

[基金项目] 国家自然科学基金资助(3041799)

[通讯作者] * 贺福元, Tel: (0731) 5381372; E-mail: phamsharking@tom.com

对照品(0773-9910)、川芎嗪对照品(110817)均购于中国药品生物制品检定所;四物微丸为湖南中医药大学药剂教研室制备;乙腈、甲醇:HPLC级,美国迪马(DIKMA)试剂公司;其余试剂均为分析纯。

2 实验方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取梓醇、芍药苷、川芎嗪、阿魏酸对照品,加色谱甲醇配制成每 1 mL 分别含梓醇 0.65 mg、芍药苷 0.05 mg、盐酸川芎嗪 0.75 mg、阿魏酸 0.21 mg 的对照品溶液及由以上四种对照品溶液等量配成的混合对照品溶液。

2.2 四物微丸样品的制备 取 10 批四物微丸,各称取 1 g,用 15 mL 甲醇超声提取 2 次,每次各 15 min,滤过,合并滤液,滤液干燥后用甲醇定容至 5 mL,溶液过 0.45 μm 微孔滤膜即得。

2.3 指纹图谱测定流动相的选择及波长的确定 取四物微丸 1 g,分别配成水溶液、0.1% 磷酸溶液、0.1% 醋酸溶液后经 UV 扫描得图 1。从图 1 可知,三种不同溶液在 278 nm 处均有明显的吸收峰,而从 250 nm 到 200 nm,紫外吸收又有加强,对于四物微丸 0.1% 磷酸溶液在 215 nm 处有更强的吸收峰;因此选择 0.1% 磷酸溶液为水相,215 nm 作为检测波长,同时也对 278 nm 进行考察。

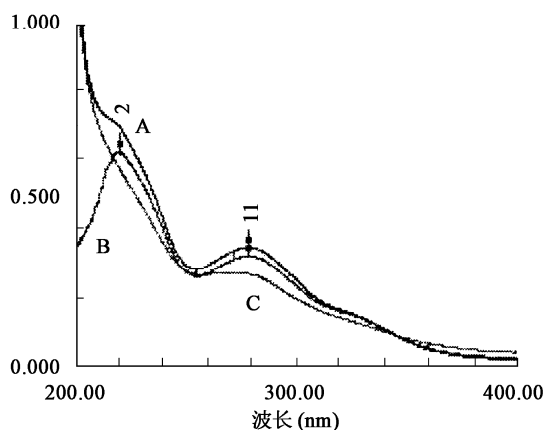


图 1 四物汤浸膏不同溶液紫外扫描图

A. 0.1% 醋酸溶液 B. 0.1% 磷酸溶液 C. 水溶液

2.4 指纹图谱测定条件的确定 Alltech Apollo C_{18} 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈、0.1% 磷酸,梯度洗脱:洗脱时间为 100 min, 0 min(0: 100, 乙腈: 0.1% 磷酸) \rightarrow 10 min(2: 98) \rightarrow 25 min(4: 96) \rightarrow 30 min(7.5: 92.5) \rightarrow 45 min(10: 90) \rightarrow 55 min(16: 84) \rightarrow 65 min(21: 79) \rightarrow 80 min(30: 70) \rightarrow 88 min(50: 50) \rightarrow 95 min(60: 40) \rightarrow 100 min(0: 100),流速 1 mL \cdot min $^{-1}$,UV 检测: 0 min(215 nm);温度: 40 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.5 四物微丸指纹图谱积分条件的确定 精密吸

取 20 μL 甲醇,按照 2.4 中色谱条件进样测得指纹图谱,分别以峰宽、响应率、最小峰面积、最小峰高^[3]为 0.01 s、0 $\mu\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$ 、0 $\mu\text{V} \cdot \text{s}$ 、0 μV 的仪器最低值进行积分,得空白甲醇全峰数 665 个,由于在进行梯度洗脱时,因洗脱剂的比例改变及甲醇的杂质所产生稳定的空白对照峰,分别再按峰宽、响应率、最小峰面积、最小峰高分别为 0.01 s、0 $\mu\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$ 、3 000 $\mu\text{V} \cdot \text{s}$ 、0 μV 积分,得峰面积在 3 000 $\mu\text{V} \cdot \text{s}$ 的空白峰 15 个。将空白 15 个峰当作色谱峰处理,总峰数减去 15 个色谱峰,按正态峰计算可得噪音峰的平均峰宽;响应率;最小峰面积,以信噪比等于 3 倍^[4] 确定积分阈值,得峰宽、响应率、最小面积、最小峰高分别为 26.36 s、8.7 $\mu\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$ 、2 655 $\mu\text{V} \cdot \text{s}$ 、305 μV 。

2.6 方法学考察

2.6.1 稳定性试验 取同一四物微丸样品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 检测,记录特征色谱,结果表明各共有特征色谱峰其相对保留时间的 RSD 在 1% 以内,相对峰面积的 RSD 也在 3% 以内,符合指纹图谱的要求。

2.6.2 精密度实验 取四物微丸样品,连续进样 5 次,检测特征色谱。结果表明:各共有色谱峰的相对保留时间的 RSD 在 1% 以内,相对峰面积的 RSD 在 3% 以内,符合指纹图谱的要求。

2.6.3 重现性实验 按四物微丸样品的制备方法制备供试品,平行操作 5 份,检测特征色谱。结果表明:各共有色谱峰的相对保留时间的 RSD 在 1% 以内,相对峰面积的 RSD 在 3% 以内,符合指纹图谱的要求。

2.7 四物微丸指纹图谱的测定及技术参数

2.7.1 主要色谱峰的鉴定及参照峰的选取 按“2.4”项中的色谱条件,分别测定空白甲醇溶剂、梓醇、芍药苷、川芎嗪、阿魏酸及混合对照品溶液,可知混合对照品溶液中各色谱峰所对应的对照品,见图 2,并与样品特征色谱中相应色谱峰进行比较,见图 3,发现样品特征色谱中 4, 7, 14, 15 号峰的保留时间及紫外光谱分别和梓醇、川芎嗪、芍药苷、阿魏酸相吻合。故样品特征色谱中 4, 7, 14, 15 号特征峰分别鉴定为梓醇、川芎嗪、芍药苷、阿魏酸。由于该方中当归为臣药,阿魏酸为当归中的主要活性成分,川芎中亦含有阿魏酸,且所得特征色谱中阿魏酸(15 号峰)峰面积较大、出峰时间适宜且稳定,故选择阿魏酸色谱峰作为参照峰。

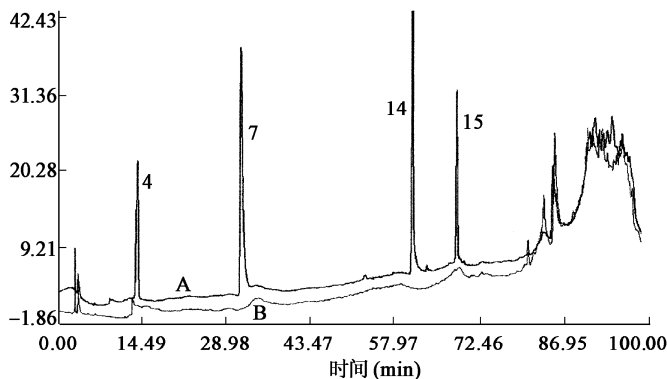


图 2 对照品溶液及甲醇高效液相色谱图

A. 对照品溶液液相色谱图 B. 甲醇空白液相色谱图

4. 梓醇 7. 川芎嗪 14. 芍药苷 15. 阿魏酸

2.7.2 指纹图谱的测定 取 10 批四物微丸样品, 按 2.4 项下色谱条件进行 HPLC 分析, 实现了峰与峰之间良好分离, 使用中药色谱指纹图谱相似度评价系统自动进行峰匹配, 确定 17 个共有峰(图 3), 以阿魏酸色谱峰的保留时间和峰面积积分为 1, 各共有峰的相对保留时间及相对峰面积的 RSD 均在 3% 以内; 以 17 个共有峰峰面积的均值做模板, 利用“相关系数”法^[5]和“夹角余弦”法^[6]计算指纹图谱的相似度, 计算的相似度结果均大于 0.99。

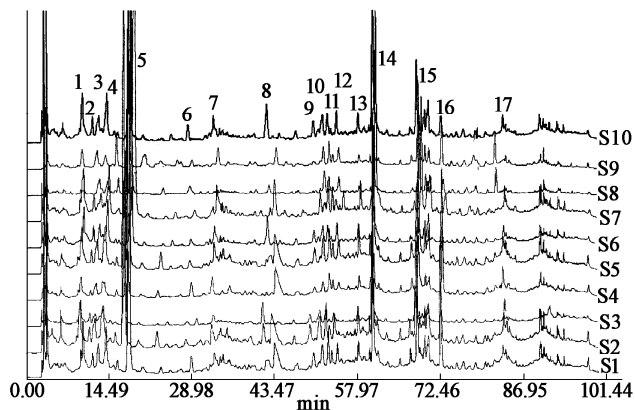


图 3 10 批四物微丸 HPLC 指纹图谱

3 结论与讨论

目前, 大量中药及其制剂在其有效成分尚未被阐明的情况下, 只采用单一或少数几个成分做指标进行质量评价, 只考虑众多复杂成分中的个别“活性成分”, 而忽略了中药制剂诸多成分间的协同作用, 因此较难全面反映中药制剂的质量情况。本实验根据研究结果, 建立了四物微丸 HPLC 指纹图谱及技术参数, 确定了 17 个共有峰的峰号(相对保留时间): 1(0.143 8), 2(0.168 4), 3(0.186 6), 4(0.219 8), 5(0.268 9), 6(0.418 1), 7(0.480 2), 8(0.616 8), 9(0.734 6), 10(0.767 5), 11(0.775 6), 12(0.796 5), 13(0.843 9), 14(0.887 9), 15(1.00 0), 16(1.065 6), 17(1.212 1)。各共有峰的相对保留时间及相对峰面积的 RSD 均在 3% 以内; 利用“相关系数”法和“夹角余弦”法计算指纹图谱的相似度, 结果均在 0.99 以上, 上述结果表明所建立的指纹图谱的技术指标稳定, 重现性好, 为较好地评价四物微丸的内在质量提供了一条新的途径。

[参考文献]

- [1] 段富津. 方剂学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1995. 122-123.
- [2] 盛或欣, 果德安. 四物汤共煎液与单煎混合液主要成分的含量比较[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(1): 1.
- [3] 朱海涛, 邓雪华, 陈吉炎, 等. Excel 软件用于药学研究中的正交设计数据处理[J]. 中成药, 2006, 25(3): 241.
- [4] 李发美. 医药高效液相色谱技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999. 11.
- [5] 苗爱东, 孙殿甲. Excel 2002 在中药指纹图谱相似度计算中的应用[J]. 药学进展, 2003, 27(1): 51.
- [6] 王龙星, 肖红斌, 梁鑫淼, 等. 一种评价中药指纹图谱相似性的新方法: 向量夹角法[J]. 药学学报, 2002, 37(9): 713.