

脑心清片 HPLC-DAD 指纹图谱的研究

尹仁杰, 王德勤, 罗 杰, 利 幼, 梁敬仪, 李楚源(广州白云山和记黄埔中药有限公司, 广东 广州 510515)

摘要: **目的** 建立脑心清片 HPLC-DAD 指纹图谱的分析方法, 以控制脑心清片的质量。**方法** 采用 HPLC-DAD 法, 色谱柱为 Agilent TC-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.2% 磷酸水溶液梯度洗脱, 柱温 25 ℃, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 256 nm, 记录时间 60 min。使用计算机辅助相似度评价软件进行数据处理, 对不同批次的脑心清片指纹图谱的相似度进行比较分析。**结果** 18 批脑心清片的指纹图谱存在一定的差异性, 从共有模式色谱图中共找到 16 个共有峰。**结论** 所建立的方法稳定、重现性好, 能显示脑心清片的内在质量, 为脑心清片的质量控制提供了科学依据。

关键词: 脑心清片; 指纹图谱; HPLC-DAD

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)01-0081-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.01.022

Study on HPLC-DAD Fingerprint of *Naoxinqing* Tablets

YIN Renjie, WANG Deqin, LUO Jie, LI You, LIANG Jingyi, LI Chuyuan* (Hutchison Whampoa Guangzhou Baiyunshan Chinese Medicine Co. Ltd, Guangzhou 510515, China)

Abstract: **Objective** To establish a HPLC-DAD fingerprint analysis method for *Naoxinqing* tablets. **Methods** HPLC-DAD method was performed on a Agilent TC-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.2% phosphoric acid as mobile phase by gradient elution. The flow rate was 1.0 mL/min, column temperature was 25 ℃, the detection wavelength was at 256 nm, and fingerprinting time lasted 60 min. The computer-assisted software for evaluating the fingerprint similarity was adopted to process the experimental data and to compare the similarity of HPLC fingerprints of *Naoxinqing* tablets of different batches. **Results** Certain differences existed in HPLC-DAD fingerprints of 18 batches of *Naoxinqing* tablets, and 16 common peaks were found in the HPLC fingerprints. **Conclusion** The established method is stable and reproducible, which can be used for the identification of the interior quality, and the results will provide the reference for the quality control of *Naoxinqing* tablets.

Keywords: *Naoxinqing* tablets; Fingerprints; HPLC-DAD

脑心清片是以天然植物柿 *Diospyros kaki* L 的叶为原料, 用水煮醇沉、乙酸乙酯萃取等方法提取精制而成的纯中药制剂, 主要适用于心脑血管缺血性疾病, 特别是对动脉硬化、脑卒中及其后遗症的疗效显著^[1-2]。脑心清片主要含有黄酮类、有机酸和三萜类化学成分^[3-7]。目前, 缺乏一个有效的方法对其质量进行全面控制, 指纹图谱技术具有整体性和模糊性的基本

属性, 能反应物质特征的完整全貌。本实验对 18 批不同批次的脑心清片进行了指纹图谱的研究, 为脑心清片的质量控制提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 2695 型高效液相色谱仪, 配自动进样器、四元泵、柱温箱、DAD 检测器(美国 Waters 公司); BP211D 型电子天平(德国赛多利斯公司); KQ-

收稿日期: 2012-07-08

作者简介: 尹仁杰, 男, 博士后, 主要从事中药新药研究和质量标准研究。Email: yinrj@163.com。

基金项目: 国家十五重大科技专项(2009ZX09103-305); 2010 年粤港关键领域重点突破项目(2010A032100004)。

250DB 数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司, 500W, 40Hz)。

1.2 试药 原儿茶酸(批号: 809-200102)、糠酸(批号: 111630-200301)、异槲皮素(批号: 110733-200402)、金丝桃苷(批号: 101219-200305)、黄芪苷(批号: 120344-200401)、槲皮素(批号: 100081-200406)、山柰素(批号: 110861-200304)中国药品生物制品检定所, 均为含量测定用; 乙腈为色谱纯, 磷酸为分析纯, 水为二次重蒸馏水, 甲醇为分析纯。18 批脑心清片, 广州白云山和记黄埔中药有限公司, 批号分别为 F9A002、F9A003、F9A004、F9A005、D9A006、L8A001、J8A002、E7A002、K7A002、H5A002、K7A001、L7A001、I7A001、G7A001、J8A003、I5A002、L5A002、E5A001。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent TC-C₁₈ 分析柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.2%磷酸水溶液(B), 梯度洗脱程序: 0~10 min, 14%A→18%A; 10~25 min, 18%A; 25~45 min, 18%A→30%A; 45~60 min, 30%A→50%A; 平衡时间为 20 min; 体积流量 1.0 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL; 柱温 25℃; DAD 检测器采集范围 200~400 nm; 检测波长 256 nm, 采样时间 60 min。

2.2 供试品溶液的制备 取脑心清 10 片, 去包衣, 碾碎, 将 0.5 g 粉末置具塞锥形瓶中, 精密加入 75%甲醇 25 mL, 称重, 超声 30 min, 放冷, 称重, 用 75%甲醇补足减失重量。微孔滤膜(0.45 μm)过滤, 即得。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取原儿茶酸、糠酸、异槲皮素、金丝桃苷、黄芪苷、槲皮素、山柰素对照品适量, 加甲醇使溶解, 制成对照品混合溶液, 即得。

2.4 参照物的选择 脑心清片的主要有效成分为黄酮苷类成分, 黄芪苷是柿叶中的重要黄酮苷类成分, 由于其积分面积在指纹图谱中所占的比例达 10%以上, 色谱峰稳定, 重现性好, 加之黄芪苷的峰处在图谱中部, 其他色谱峰对其干扰较少, 有助于色谱峰的辨认, 因此, 选择黄芪苷作为参照物。

2.5 测定方法 进样 10 μL, 按照 2.1 项下的色谱条件进行测试, 记录色谱图。

2.6 方法学考察

2.6.1 精密度试验 取同一份供试品溶液, 按 2.1 项下条件重复进样 5 次, 记录色谱图, 以 13 号黄芪

苷峰的保留时间和峰面积为参照, 计算共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积, 计算 RSD。结果表明: 共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.05%~1.95%, 相对峰面积的 RSD 为 0.20%~2.90%, 采用国家药典委员会中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版计算其相似度, 结果相似度在 0.99 以上, 表明仪器精密度良好。

2.6.2 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 和 48 h 进样测定, 分别计算各共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD。相对保留时间 RSD 为 0.28%~0.71%, 相对峰面积的 RSD 为 0.39%~2.98%, 其相似度在 0.99 以上, 说明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.6.3 重复性试验 取同一样品平行制备 6 份供试品溶液, 进样测定, 计算共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD。相对保留时间 RSD 为 0.16%~2.34%, 相对峰面积 RSD 为 0.36%~2.90%, 其相似度在 0.99 以上, 说明该方法的重复性良好。

2.6.4 指纹图谱的建立和确认 按 2.2 项下操作, 制备 18 批脑心清片的供试品溶液, 精密吸取各供试品溶液和对照品溶液 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 在 2.1 项的色谱条件下进行测试, 记录 60 min 色谱图, 选择稳定性和重复性好, 吸收较强, 特征明显的色谱峰为共有峰, 最终标定 16 个特征峰构成脑心清片的指纹图谱, 其共有峰峰面积占总峰面积的 90%以上, 非共有峰面积百分比为 3.25%~8.77%, 符合国家药品监督管理局 2000 年版中药注射剂指纹图谱研究的技术要求^[8], 脑心清片的 HPLC 色谱图的指纹特征见图 1 和图 2。

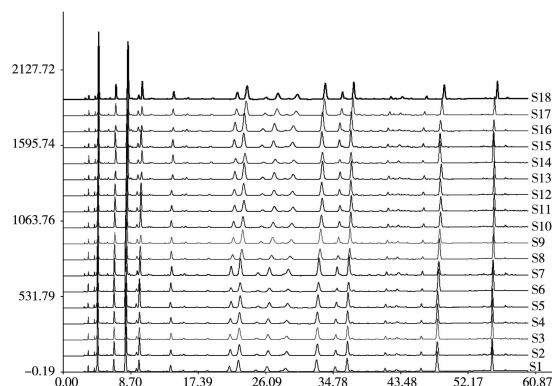
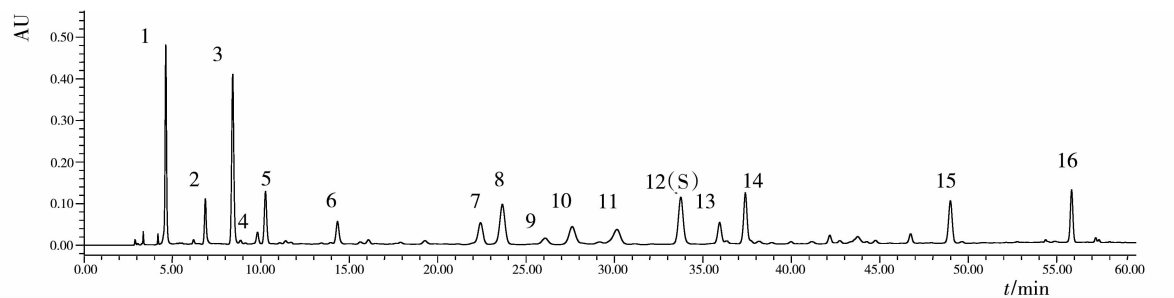


图 1 18 批脑心清片的 HPLC 指纹图谱

Figure 1 HPLC-DAD fingerprints of 18 batches of Naoxinqing tablet



2. 原儿茶酸; 3. 糠酸; 7. 异槲皮素; 8. 金丝桃苷; 12 (S) .黄芪苷; 15.槲皮素; 16-山柰素

图2 脑心清片的 HPLC–DAD 指纹图谱及相关峰的确

Figure 2 HPLC–DAD fingerprints of Naoxinqing tablets and its correlation peaks

采用国家药典委员会中药色谱指纹图谱相似度评价系统评价 18 批脑心清片的指纹图谱，以中位数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 0.90 以上，结果见表 1。

表 1 18 批脑心清片指纹图谱的相似度

Table 1 The similarity of HPLC–DAD fingerprints of 18 batches of Naoxinqing tablet

批号	相似系数	批号	相似系数
F9A002	0.962	H5A002	0.917
F9A003	0.958	K7A001	0.951
F9A004	0.963	L7A001	0.974
F9A005	0.912	I7A001	0.932
D9A006	0.932	G7A001	0.953
L8A001	0.942	J8A003	0.983
J8A002	0.936	I5A002	0.930
E7A002	0.968	L5A002	0.938
K7A002	0.962	E5A001	0.941

注：以对照图谱为模板，中位数法。

以 12 号峰(黄芪苷)为参照峰，各共有峰相对保留时间、相对峰面积见表 2 和表 3，分析结果显示，16 个共有峰相对保留时间的重现性较好，RSD 为 0.28 %~2.43 %；相对峰面积差异较大，RSD 为 3.55 %~37.91 %。

3 讨论

精密吸取供试品溶液 10 μL 进样，分别采用甲醇–水、甲醇–0.2 %甲酸(磷酸水)、乙腈–水、乙腈–0.2 %甲酸 (磷酸水)进行等度洗脱和线性梯度实验。结果表明，在乙腈–0.2 %磷酸水溶液的流动相中，各色谱峰的分布、峰形和分离度均优于甲醇–水(酸水)系统，因此，选择乙腈–0.2 %磷酸水溶液作为流动相；测试过程中，流动相 A 的终浓度控制在 50 %，是为了在不出现谱图基线漂移的前提下，尽量减少整个测试的时间，从而达到一个较佳的效果；样品 90

表 2 18 批脑心清片指纹图谱共有峰的相对峰面积

Table 2 The relative area of total peak in the HPLC–DAD fingerprints of 18 batches of Naoxinqing tablets

峰名	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	1.563	1.317	1.593	1.580	1.167	2.181	1.199	1.872	1.301	1.510	1.346	1.345	0.884	1.973	1.280	0.624	1.301	1.365
2	0.396	0.446	0.403	0.385	0.505	0.682	0.374	0.563	0.299	0.475	0.459	0.358	0.187	0.610	0.376	0.217	0.318	0.407
3	1.601	1.835	1.652	1.631	1.818	1.851	1.470	1.858	1.312	1.599	1.945	1.896	1.188	1.893	0.128	1.123	1.330	1.612
4	0.27	0.135	0.124	0.128	0.150	0.146	0.078	0.156	0.140	0.136	0.144	0.132	0.123	0.188	1.142	0.119	0.155	0.129
5	0.432	0.655	0.436	0.458	0.843	0.634	0.505	0.565	0.264	0.677	0.693	0.460	0.189	0.628	0.520	0.154	0.296	0.545
6	0.297	0.268	0.306	0.430	0.231	0.581	0.304	0.459	0.273	0.317	0.271	0.226	0.152	0.525	0.298	0.118	0.258	0.319
7	0.420	0.490	0.417	0.415	0.476	0.446	0.517	0.488	0.448	0.478	0.477	0.466	0.449	0.449	0.512	0.497	0.443	0.501
8	0.948	0.908	0.948	0.942	0.921	0.986	0.968	1.007	0.985	0.913	0.924	0.978	0.978	0.999	0.964	.029	0.979	0.994
9	0.165	0.165	0.160	0.143	0.133	0.122	0.190	0.152	0.184	0.170	0.170	0.169	0.166	0.145	0.190	0.188	0.181	0.181
10	0.506	0.498	0.493	0.493	0.528	0.440	0.547	0.562	0.612	0.575	0.567	0.572	0.543	0.547	0.499	0.575	0.615	0.582
11	0.398	0.570	0.402	0.409	0.504	0.394	0.653	0.472	0.447	0.548	0.536	0.492	0.457	0.576	0.538	0.506	0.448	0.548
12 黄芪苷	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
13	0.351	0.442	0.374	0.340	0.418	0.266	0.379	0.340	0.397	0.454	0.452	0.415	0.339	0.273	0.373	0.353	0.338	0.360
14	0.838	0.905	0.830	0.827	0.875	0.747	0.866	0.778	0.818	0.919	0.911	0.872	0.771	0.755	0.853	0.635	0.815	0.849
15	1.120	0.799	1.147	1.534	0.885	1.678	0.539	1.367	0.719	0.862	0.802	0.895	0.598	1.472	0.627	0.409	0.710	0.611
16	0.993	0.679	1.021	1.018	0.719	1.449	0.431	1.1681	0.593	0.757	0.682	0.790	0.492	1.237	0.515	0.688	0.590	0.620

表3 18批脑心清片指纹图谱共有峰的相对保留时间

Table 3 The relative retention time of total peak in the HPLC-DAD fingerprints of 18 batches of *Naoxinqing* tablet

峰号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	0.135	0.137	0.137	0.139	0.133	0.133	0.135	0.131	0.134	0.139	0.132	0.129	0.131	0.138	0.139	0.136	0.138	0.140
2	0.201	0.203	0.199	0.201	0.200	0.201	0.203	0.205	0.198	0.201	0.199	0.202	0.204	0.198	0.200	0.201	0.203	0.205
3	0.245	0.247	0.241	0.245	0.240	0.245	0.247	0.247	0.241	0.239	0.238	0.247	0.248	0.241	0.241	0.243	0.242	0.247
4	0.290	0.290	0.292	0.293	0.290	0.291	0.295	0.293	0.293	0.295	0.292	0.293	0.293	0.288	0.287	0.290	0.291	0.291
5	0.299	0.294	0.295	0.294	0.299	0.297	0.298	0.299	0.294	0.298	0.294	0.294	0.295	0.291	0.291	0.295	0.297	0.297
6	0.421	0.423	0.423	0.422	0.423	0.422	0.421	0.420	0.423	0.422	0.425	0.422	0.422	0.421	0.422	0.423	0.424	0.421
7	0.667	0.663	0.663	0.665	0.667	0.663	0.660	0.659	0.661	0.668	0.662	0.662	0.663	0.663	0.664	0.665	0.662	0.665
8	0.704	0.694	0.705	0.706	0.710	0.701	0.695	0.692	0.701	0.715	0.713	0.703	0.703	0.704	0.705	0.705	0.698	0.711
9	0.780	0.772	0.777	0.777	0.780	0.772	0.770	0.772	0.775	0.782	0.785	0.775	0.775	0.776	0.780	0.781	0.776	0.779
10	0.826	0.823	0.825	0.825	0.828	0.822	0.820	0.823	0.825	0.828	0.830	0.826	0.825	0.827	0.829	0.828	0.822	0.825
11	0.897	0.889	0.892	0.893	0.899	0.891	0.893	0.892	0.892	0.902	0.904	0.895	0.897	0.897	0.895	0.894	0.894	0.896
12 黄芪苷	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
13	1.064	1.058	1.062	1.062	1.070	1.057	1.059	1.053	1.055	1.071	1.075	1.055	1.057	1.051	1.051	1.057	1.053	1.060
14	1.105	1.097	1.110	1.113	1.126	1.106	1.103	1.089	1.112	1.119	1.128	1.113	1.109	1.096	1.085	1.115	1.103	1.118
15	1.439	1.422	1.447	1.452	1.452	1.432	1.412	1.418	1.442	1.446	1.453	1.436	1.427	1.420	1.412	1.455	1.432	1.442
16	1.638	1.611	1.642	1.657	1.653	1.624	1.619	1.649	1.650	1.668	1.660	1.637	1.616	1.615	1.602	1.662	1.627	1.623

min 图谱显示, 在 60 min 后无特征峰出现, 因此, 最终确定采样时间为 60 min。

脑心清片主要含有有机酸和黄酮类成分, 这些成分易溶于甲醇、乙醇以及含水的醇类溶剂。本研究对提取溶剂、提取方法、提取时间进行了考查。通过比较 50 % 甲醇、75 % 甲醇、75 % 乙醇和甲醇为溶剂, 超声和回流的不同提取方式以及分别超声 15, 30, 45 min 的提取效率, 发现用 75 % 甲醇超声提取 30 min 效果最佳, 因此, 确定以 75 % 甲醇为溶剂, 超声 30 min 为最佳提取条件。

先用 DAD 在 200~400 nm 进行全波长扫描, 观察各吸收峰的强度变化, 再选取不同波长下的色谱图进行考察, 重点考察 240, 250, 256, 270, 300, 360 nm 处的色谱图, 计算峰总面积, 峰总高度以及峰总数, 结果显示各成分在 256 nm 处具有较好的紫外吸收, 色谱信息最为丰富, 能获得最佳的分析效果。因此, 本实验选择 256 nm 作为实验用检测波长。

方法学研究及样品测定结果表明, 本研究建立的脑心清片指纹图谱检测方法合理可行, 18 批脑心清片指纹图谱特征峰的相对保留时间具有较好的重现性, 但是相对峰面积差异较大, 且相似度介于

0.917~0.983 之间, 说明不同批次的脑心清片之间存在一定的差异性, 这可能与柿叶药材以及生产过程的差异有关。本研究通过建立 HPLC-DAD 指纹图谱分析方法, 对不同批次脑心清片的化学成分进行综合宏观分析, 有利于全面控制脑心清片的质量。

参考文献:

- [1] 蔡越冬, 杨少锋. 脑心清片治疗脑动脉硬化症和冠心病心绞痛 60 例临床总结[J]. 中药新药与临床药理, 2001, 12(6): 414-416.
- [2] 李楚源, 贝伟剑, 刘昌孝, 等. 脑心清片防治脑动脉硬化研究进展[J]. 药物评价研究, 2010, 33(4): 296-301.
- [3] 贝伟剑. 柿叶活性成分及脑心清片对脑缺血神经保护作用研究[D]. 广州: 中山大学博士论文, 2003.
- [4] 贝伟剑, 罗杰, 吴爱奎, 等. HPLC 法测定柿叶浸膏中鞣质和山柰酚的含量[J]. 中草药, 2005, 36(7): 1014-1015.
- [5] 贝伟剑, 王德勤, 梁敬仪, 等. 脑心清片浸膏中金丝桃苷 HPLC 含量测定[J]. 广西中医学院学报, 2009, 12(2): 62-67.
- [6] 陈光, 贾澎云, 徐绥, 等. 柿叶化学成分的研究(II) [J]. 中草药, 2005, 36(1): 26-28.
- [7] 罗杰, 贝伟剑, 徐腾, 等. 脑心清片质量标准的研究[J]. 中国新药杂志, 2004, 13(7): 625-627.

(编辑: 宋威)