

丹葵片 HPLC 指纹图谱研究

吴学芹¹, 董娟¹, 付爱珍¹, 吴红华¹, 王萌¹, 李宁², 张鹏¹ (1. 天津中医药大学, 天津市现代中药重点实验室, 天津市中药化学与分析重点实验室, 天津 300193; 2. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: **目的** 建立丹葵片 HPLC 指纹图谱, 为丹葵片质量控制及其作用机制的研究提供依据。**方法** 通过对检测波长, 色谱柱及流动相的选择, 确定丹葵片指纹图谱最佳检测条件, 采用 HPLC 法测定了 12 批次丹葵片样品, 运用中药指纹图谱相似度评价软件对结果进行分析。**结果** 本实验共标定 15 个共有峰, 12 批丹葵片 HPLC 指纹图谱共有峰特征明显, 但不同批次的指纹图谱略有差异。**结论** 该方法简单、快捷, 结果准确, 重现性好, 可用于丹葵片的质量控制。

关键词: 高效液相色谱法; 丹葵片; 指纹图谱; 相似度评价

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)03-0319-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.03.020

Studies of HPLC Fingerprint of *Danlou* Tablets

WU Xueqin¹, DONG Juan¹, FU Aizhen¹, WU Honghua¹, WANG Meng¹, LI Ning², ZHANG Peng¹ (1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin Key Laboratory of TCM Chemistry and Analysis, Tianjin 300193, China; 2. Shenyang Pharmaceutical University School of Chinese Medicine, Shenyang 110016 Liaoning, China)

Abstract: **Objective** To establish a HPLC fingerprint analysis method for *Danlou* tablets. **Methods** After optimization of detection wavelength, chromatographic column and mobile phase, 12 batches of *Danlou* tablets were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). The experimental data were analyzed by using the software of Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine. **Results** Fifteen common peaks were obtained for HPLC fingerprint of *Danlou* tablets. The common peaks in 12 batches had exclusive properties, but the fingerprints varied in different batches of samples. **Conclusion** The developed method is simple, fast, accurate, and with good repeatability, which can be used for quality control of *Danlou* tablets.

Keywords: High performance liquid chromatography; *Danlou* tablets; Fingerprints; Similarity evaluation

丹葵片以经方瓜蒌薤白白酒汤为基础, 主要由瓜蒌、薤白等 10 味中药组成, 具有宽胸通阳、化痰散结、活血化瘀等作用。临床研究^[1]表明丹葵片对治疗冠心病心绞痛疗效显著。丹葵片药味众多, 前期研究^[2]显示其化学成分十分复杂。在生产过程中, 仅对其中 1~2 个化学成分进行含量测定而建立质量控

制标准, 显然不能全面反映产品的质量情况。但进行多成分的质量控制, 不仅费时, 而且增加了企业生产成本。中药指纹图谱能较全面地反映复方中药制剂中所含成分的相对关系, 兼顾中药复方制剂成分的复杂性和相关性, 从而更好地评价、控制中药半成品和成品的质量, 保证中成药的功效^[3]。本文采

收稿日期: 2013-11-19

作者简介: 吴学芹, 女, 硕士研究生, 研究方向: 药物分析研究和天然药物化学研究。Email: wuxueqin1990@yeah.net。通讯作者: 张鹏, 副研究员, 研究方向: 中药物质基础。Email: zhp8270@sina.com。

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(81303183); 辽宁省高等学校优秀人才支持计划项目(LJQ2012088)。

用 HPLC 法构建丹参片的指纹图谱, 并对 12 批丹参片的色谱图进行了相似度评价, 为全面提升丹参片的质量标准提供了依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Agilent 1260 型高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司; XS205DU 型百万分之一微量电子天平, METTLER TOLEDO 公司; SCIENTZ SB 25-12DTN 超声波清洗机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; MILLIPORE 纯净水发生器, 天津市奥佳科技有限公司。

1.2 药品及试剂 甲醇、乙腈均为色谱纯, 天津市康科德科技有限公司; 甲酸, 色谱纯, 美国天地公司; Millipore 超纯水; 5-羟甲基糠醛、丹参素、丹酚酸 B、丹酚酸 A、丹参酮 II A, 天津中新药业股份有限公司, 纯度均大于 98.0%; 葛根素、大豆苷由本实验室自制, 经 NMR、MS、UV 等波谱鉴定, 采用 HPLC 面积归一化法测定纯度, 检验纯度大于 95.0 %。

1.3 供试样品 12 批丹参片供试品均由吉林康奈尔药业有限公司提供, 样品编号分别为: S1-20100101, S2-20100103, S3-20100104, S4-20100201, S5-20100301, S6-20100402, S7-20110702, S8-20110703, S9-20110901, S10-20111002, S11-20111102, S12-20111103。

1.4 数据处理软件 应用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版(国家药典委员会)将分析数据导入软件, 经选峰, 设定匹配模板, 谱峰多点校正、自动匹配, 建立标准模板, 对 12 批次丹参片色谱图进行谱峰差异性评价和整体相似性评价^[4]。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Hanbon Sci. & Tech. Hedera (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 检测波长: 280 nm; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 进样量: 10 μL; 柱温: 40 °C; 流动相: A-乙腈、B-0.1 % 甲酸水溶液; 梯度洗脱: 0~4 min, 4 %~10 % A; 4~23 min, 10 %~14 % A; 23~25 min, 14 %~20 % A; 25~28 min, 20 %~21 % A; 28~33 min, 21 %~22 % A; 33~43 min, 22 %~40 % A; 43~48 min, 40 %~90 % A; 48~53 min, 90 %~100 % A。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取丹参素、5-羟甲基糠醛、葛根素、大豆苷、丹酚酸 B、丹酚酸 A、丹

参酮 II A 标准品适量, 用甲醇分别配制成储备液, 置于棕色容量瓶中, 摇匀, 4 °C 保存。分别准确移取各对照品储备液适量, 用 50 % 甲醇稀释, 制得丹参素、5-羟甲基糠醛、葛根素、大豆苷、丹酚酸 B、丹酚酸 A、丹参酮 II A 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取不同批次丹参片各 3 片, 研磨, 精密称取粉末 0.25 g, 置于锥形瓶中, 精密量取 70 % 甲醇 25 mL 配制成 10 mg·mL⁻¹ 溶液, 超声提取 30 min, 放至室温, 用甲醇补足质量, 摇匀, 离心, 取上清液, 即得。

2.4 参照峰的选择 对 12 批丹参片色谱图进行分析, 选取稳定性好, 响应强, 特征明显, 分离度好的葛根素色谱峰作为参照峰。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 取丹参片批号为 20110901 的供试品溶液注入液相色谱仪, 连续 6 次进针, 以葛根素的保留时间和峰面积为参照, 对各主要共有色谱峰相对保留时间和相对峰面积进行统计。结果, 以葛根素的保留时间和峰面积为参照, 各主要共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积均基本一致, RSD < 2.71 %, 表明仪器精密度良好。

2.5.2 稳定性试验 取丹参片批号为 20110901 的供试品溶液在室温下保存, 分别于 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 14, 24, 48 h 测定, 以葛根素的保留时间和峰面积为参照, 对各主要共有色谱峰相对保留时间和相对峰面积进行统计。结果, 以葛根素的保留时间和峰面积为参照, 各主要共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致, RSD < 2.98 %, 表明供试品溶液在 48 h 内保持稳定。

2.5.3 重复性试验 取丹参片批号为 20110901 样品, 按照供试品制备方法平行处理 6 份, 分别注入液相色谱仪进行测定, 以葛根素的保留时间和峰面积为参照, 对各主要共有色谱峰相对保留时间和相对峰面积进行统计。结果, 以葛根素的保留时间和峰面积为参照, 各主要共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积均基本一致, RSD < 2.94 %, 表明供试品溶液重复性良好。

2.5.4 峰的归属 由 12 批丹参片供试品溶液 HPLC 色谱图可见, 15 个色谱峰为各批供试品所共有的。在共有指纹峰中, 指认其中 7 个色谱峰, 分别为: 5-羟甲基糠醛(2 号色谱峰)、丹参素(3 号色谱峰)、葛

根素(5 号色谱峰)、大豆苷(9 号色谱峰)、丹酚酸 B(11 号色谱峰)、丹酚酸 A(13 号色谱峰)、丹参酮 II A (15 号色谱峰), 其中 5 号色谱峰为参照峰 S。其余共有峰均按其相对葛根素的保留时间定性^[5]。

2.6 样品指纹图谱的测定 按照 2.3 项下方法制备 12 批丹菱片的供试品溶液, 依次进样检测, 测得 12 批丹菱片样品的 HPLC 色谱图, 丹菱片 HPLC 色谱图的标准图谱见图 1。

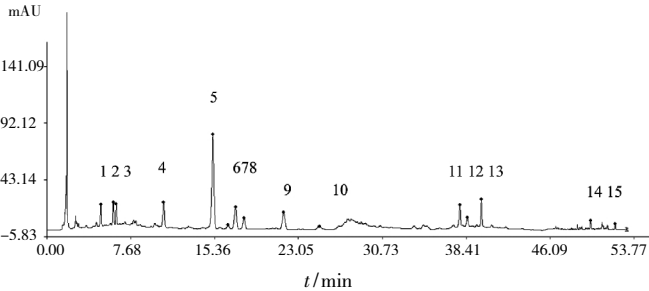


图 1 丹菱片 HPLC 色谱图的标准图谱
Figure 1 Standard HPLC graph of *Danlou* tablets

2.7 指纹图谱相似度分析

2.7.1 共有特征峰的标定 根据 12 批丹菱片供试品测定结果所给出的峰数、峰面积和相对保留时间等相关参数进行分析比较, 丹菱片高效液相色谱可分离出 20 多个色谱峰, 经与对照品对照, 并比较所有测定和记录的色谱图, 其中, 15 个色谱峰较为显

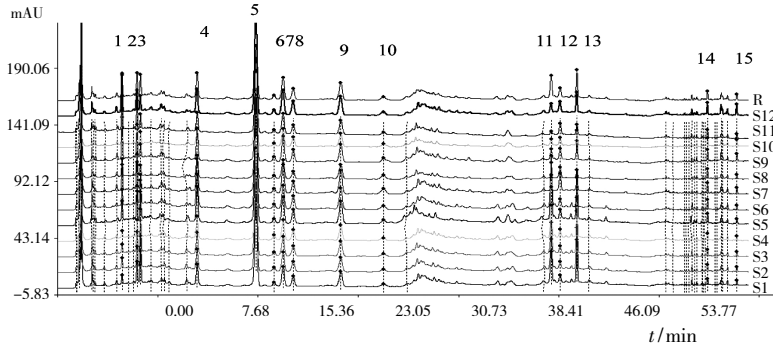


图 2 12 批丹菱片匹配后结果
Figure 2 Results of 12 batches of *Danlou* tablets after matched

著, 这 15 个色谱峰具有较强的特征性和代表性可作为指纹图谱的特征峰, 其中, 5 号峰来源于葛根素, 见图 2。

2.7.2 指纹图谱相似度分析 采用中药指纹图谱相似度评价软件(2004A 版)分析各批次样品指纹图谱的相似度, 以批号为 20100101 的色谱图作为参照图谱, 以中位数法生成 12 批丹菱片的对照图谱, 相似度评价结果均大于 0.96。以 5 号峰葛根素为参照峰, 15 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积见表 1~ 表 2。15 个共有色谱峰相对保留时间重现性较好, RSD 为 0.17 %~0.96 %; 相对峰面积差异较大, RSD 为 6.10 %~79.4 %, 可能与药材采收季节及采收地点有关。

3 讨论

对流动相进行优化, 针对丹菱片中大量的酚酸类成分选择 0.1 %甲酸水溶液进行洗脱, 指纹图谱分

表 1 12 批丹菱片 15 个共有峰的相对保留时间

Table 1 Relative retention time of fifteen common peaks in 12 batches of *Danlou* tablets

批号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
1 号峰	0.326	0.324	0.325	0.326	0.326	0.325	0.326	0.324	0.324	0.324	0.323	0.326
2 号峰	0.400	0.399	0.400	0.401	0.401	0.400	0.401	0.399	0.400	0.399	0.399	0.401
3 号峰	0.419	0.416	0.418	0.419	0.418	0.418	0.419	0.417	0.416	0.418	0.418	0.419
4 号峰	0.704	0.701	0.703	0.704	0.704	0.704	0.704	0.702	0.702	0.702	0.705	0.704
5 号峰	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
6 号峰	1.091	1.093	1.092	1.092	1.109	1.093	1.091	1.093	1.095	1.092	1.089	1.092
7 号峰	1.137	1.139	1.137	1.137	1.138	1.139	1.137	1.138	1.142	1.136	1.131	1.138
8 号峰	1.188	1.190	1.189	1.188	1.189	1.190	1.188	1.189	1.194	1.189	1.183	1.188
9 号峰	1.429	1.427	1.429	1.426	1.429	1.429	1.428	1.427	1.436	1.429	1.423	1.428
10 号峰	1.643	1.640	1.644	1.643	1.645	1.649	1.646	1.645	1.657	1.642	1.631	1.647
11 号峰	2.506	2.485	2.490	2.501	2.506	2.510	2.510	2.486	2.530	2.473	2.455	2.512
12 号峰	2.552	2.531	2.534	2.547	2.551	2.555	2.555	2.531	2.577	2.518	2.500	2.557
13 号峰	2.639	2.616	2.620	2.635	2.638	2.643	2.643	2.615	2.664	2.599	2.579	2.646
14 号峰	3.307	3.274	3.279	3.302	3.305	3.312	3.315	3.273	3.334	3.249	3.225	3.318
15 号峰	3.454	3.420	3.425	3.449	3.453	3.459	3.462	3.418	3.483	3.396	3.372	3.465

表 2 12 批丹蒌片 15 个共有峰的相对峰面积

Table 2 Relative peak area of fifteen common peaks in 12 batches of *Danlou* tablets

批号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
1 号峰	0.052	0.058	0.045	0.033	0.085	0.072	0.114	0.114	0.191	0.208	0.184	0.171
2 号峰	0.116	0.119	0.108	0.091	0.103	0.084	0.132	0.152	0.143	0.128	0.160	0.097
3 号峰	0.170	0.169	0.168	0.146	0.106	0.105	0.069	0.071	0.060	0.078	0.079	0.065
4 号峰	0.197	0.182	0.194	0.211	0.248	0.256	0.259	0.242	0.237	0.175	0.165	0.174
5 号峰	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
6 号峰	0.043	0.048	0.040	0.052	0.042	0.043	0.044	0.043	0.049	0.043	0.039	0.046
7 号峰	0.230	0.232	0.231	0.238	0.232	0.232	0.290	0.288	0.268	0.254	0.248	0.247
8 号峰	0.127	0.126	0.124	0.120	0.125	0.130	0.122	0.113	0.126	0.136	0.112	0.138
9 号峰	0.209	0.209	0.209	0.211	0.237	0.245	0.273	0.261	0.218	0.219	0.205	0.219
10 号峰	0.051	0.051	0.052	0.053	0.067	0.068	0.088	0.089	0.079	0.065	0.037	0.061
11 号峰	0.257	0.253	0.243	0.249	0.311	0.343	0.023	0.026	0.073	0.048	0.023	0.058
12 号峰	0.072	0.066	0.064	0.072	0.059	0.063	0.129	0.117	0.086	0.079	0.099	0.075
13 号峰	0.253	0.248	0.253	0.235	0.174	0.181	0.074	0.065	0.112	0.110	0.072	0.102
14 号峰	0.028	0.025	0.026	0.025	0.027	0.031	0.038	0.047	0.037	0.035	0.034	0.042
15 号峰	0.024	0.024	0.022	0.020	0.017	0.019	0.025	0.025	0.030	0.034	0.022	0.043

离效果优于纯水；对柱温进行考察(35 ℃和 40 ℃)，结果表明，柱温为 40 ℃时丹酚酸 A 的分离效果明显提高；在 Agilent 1260 高效液相色谱仪上利用 DAD 检测器对丹蒌片甲醇提取液进行全波长扫描，结果表明在 280 nm 处丹蒌片指纹图谱的色谱峰多，分离度好，因此，本实验采用 280 nm 波长^[6]。

以甲醇-水为提取溶剂，分别采用超声提取和加热回流提取法进行试验，结果表明，相同提取时间超声提取可将有效成分充分提取，综合考虑，超声提取法简单、快速，故采用超声方法提取样品；考察超声提取时间，比较超声提取 20、30、40 min 样品，结果表明，当超声时间超过 30 min 时主要色谱峰的峰数和峰面积已没有明显变化，因此，选择超声提取 30 min。

考察用纯水以及 30 %、50 %、70 % 纯甲醇作为溶剂，超声提取样品 30 min，结果表明，采用 70 % 甲醇溶液提取主要色谱峰峰数最多，峰面积最大；采用 70 % 甲醇溶液分别稀释固液比为 1 : 50，1 : 100，1 : 200 样品超声 30 min，结果表明，固液比 1 : 100 时主成分的峰面积最高。

建立丹蒌片 HPLC 指纹图谱，共有特征峰明显，整体分离度较好，能充分反映出丹蒌片整体化学成分的特征，可用于丹蒌片质量评价和质量标准的提升研究。

参考文献：

- [1] 郭方圆. 丹蒌片对兔颈动脉粥样硬化斑块的影响[D]. 上海：第二军医大学，2012.
- [2] Dong J, Zhu Y, Gao XM, et al. Qualitative and quantitative analysis of the major constituents in Chinese medicinal preparation *Dan-Lou* tablet by ultra high performance liquid chromatography/diode-array detector/quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2013, 80: 50-62.
- [3] 罗格莲, 郑孝勇. 指纹图谱技术在中药鉴定中的应用[J]. *药学研究*, 2013, 32(2): 112-114.
- [4] 王侃, 孙文君, 单鸣秋, 等. 茜草饮片 HPLC 指纹图谱研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(10): 113-115.
- [5] 于静, 邓雁如, 宋丽丽, 等. 金芪降糖片 HPLC 指纹图谱的研究[J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(2): 278-279.
- [6] 韩晓娜, 韩蓉, 谭文伟, 等. 枇杷花 HPLC 指纹图谱研究[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2012, 14(6): 210-212.

(编辑：宋威)