

丹珍头痛胶囊的HPLC指纹图谱研究

张宇霞^{1,2,3*}, 答占全¹, 王统霞¹, 李春梅¹, 纪兰菊^{1#}(1.青海益欣药业有限责任公司, 西宁 810003; 2.中国科学院西北高原生物研究所/中国科学院藏药研究重点实验室, 西宁 810001; 3.中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049)

中图分类号 R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)27-3864-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.27.43

摘要 目的:建立丹珍头痛胶囊的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱。方法:采用HPLC法。色谱柱为Dikma Diamonsil C₁₈, 流动相A为水, 流动相B为甲醇-乙腈, 梯度洗脱, 流速为1.0 ml/min, 检测波长为340 nm, 柱温为40 ℃, 进样量为20 μl, 记录时间为65 min。结果:精密性、稳定性、复复性试验的RSD≤0.23%; 标定10批丹珍头痛胶囊共有峰13个, 相似度均>0.90。结论:该方法简便、准确、重复性好, 可用于丹珍头痛胶囊的工艺稳定性评价和质量控制。

关键词 丹珍头痛胶囊; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 相似度

Study on the HPLC Fingerprint Chromatogram of Danzhen Headache Capsules

ZHANG Yu-xia^{1,2,3}, ZAN Zhan-quan¹, WANG Tong-xia¹, LI Chun-mei¹, JI Lan-ju¹(1.Qinghai Yixin Pharmaceuticals Co., Ltd, Xining 810003, China; 2.Northwest Institute of Plateau Biology/Key Laboratory of Zang Medicine Research, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China; 3.School of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the HPLC fingerprint chromatogram of Danzhen headache capsules. METHODS: HPLC method was adopted. The column was Dikma Diamonsil C₁₈ with the mobile phase of methanol-acetonitrile-water (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min; the temperature was 40 ℃, the detection wavelength was 340 nm, the sample size was 20 μl and the detection time was 65 min. RESULTS: RSDs of precision, stability and reproducibility tests were no more than 0.23%; 13 common peaks were identified in 10 batches of Danzhen headache capsules and the similarity of all samples were higher than 0.90. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, and can be used for the process stability evaluation and quality control of Danzhen headache capsules.

KEYWORDS Danzhen headache capsules; HPLC; Fingerprint chromatogram; Similarity

3分离效果较好,且分离时间适中,因此选用Inertsil OD-3进行色谱分离。

3.2 提取方法的选择

笔者比较了3种提取方法(索氏提取除杂再进行超声、先超声再进行萃取除杂、直接超声),结果发现3种方法均对被测成分无干扰且可较好地分离,考虑到操作的简便性,故选用直接超声法。此外,还考察了不同溶剂(甲醇、70%甲醇、50%甲醇、乙醇、70%乙醇、50%乙醇)对结果的影响。结果发现,采用70%乙醇与甲醇作为提取溶剂时,栀子苷含量基本一致,均能较好地提取分离栀子苷与甘草苷,考虑到乙醇的毒性小,故选用70%乙醇为提取溶剂。又考察了超声时间(30、45、60、90 min)对结果的影响。结果发现,超声45 min即可提取完全。

综上所述,本方法准确、灵敏、简便,可用于心神宁片中栀子苷和甘草苷的含量测定。

参考文献

[1] 郭五保,李彤晖,王卫峰.HPLC测定心神宁片中栀子苷

* 硕士研究生。研究方向:药材质量标准。E-mail: yuxia10086@126.com

通信作者:教授。研究方向:新药研发。E-mail: 1544887338@qq.com

的含量[J].华西药学杂志,2003,18(4):292.

[2] 尹美芝,张瑞华,崔雅慧,等.心神宁片中栀子苷含量影响因素的考察[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(6):52.

[3] 高雪松,王蕾.HPLC-EISD法测定心神宁片中酸枣仁皂苷A和B的含量[J].中国药师,2013,16(1):61.

[4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:80.

[5] 侯玉华,李智,李俊雅,等.RP-HPLC法测定复方丹栀逍遥丸中栀子苷的含量[J].中国药房,2010,21(47):4480.

[6] 张丽萍.用高效液相色谱法测定安坤颗粒中栀子苷和芍药苷的含量[J].药学实践杂志,2014,32(2):121.

[7] 张科卫,崔晓兵,吴皓.双波长梯度洗脱法测定栀子柏皮汤制剂中栀子苷、甘草苷的含量[J].中成药,2008,30(11):1629.

[8] 胡震,杨广得,罗国安,等.栀子中栀子苷提取工艺及HPLC分析[J].中成药,2006,28(3):336.

(收稿日期:2015-04-02 修回日期:2015-07-29)

(编辑:刘柳)

丹珍头痛胶囊是青海益欣药业有限责任公司原研独家产品,由高原丹参、夏枯草、熟地黄、珍珠母、鸡血藤、川穹、当归、白芍、菊花、蒺藜、钩藤、细辛共十二味中、藏药材组成,具有平肝熄风、散瘀通络、解痉止痛的功效,可用于肝阳上亢、瘀血阻络所致的头痛、背痛颈酸、烦躁易怒等症,特别是针对脑供血不足、高血压脑外伤后遗症、偏头痛、神经衰弱、颈椎病等引起的多发性、慢性头痛具有疗效显著、标本兼治的综合效果,在临床上用于治疗偏头痛^[1]、血管神经性头痛^[2]。

患者用药的安全性与药品生产工艺的稳定性、质量标准的完善和提高密切相关。目前,丹珍头痛胶囊标准中可监控的药材仅有高原丹参[薄层色谱(TLC)鉴别丹参酮Ⅱ_A]和白芍[TLC鉴别芍药苷、含量测定芍药苷]两味药材。笔者曾对该药品中其他药材的主要成分进行了TLC鉴别及高效液相色谱(HPLC)法测定含量,以期完善其质量标准,但都受到了不同程度阴性干扰。化学指纹图谱可用于全面评价药材或者药品的质量,如红外指纹图谱^[3]、气相色谱-质谱(GC-MS)指纹图谱^[4]、HPLC指纹图谱^[5]、TLC指纹图谱^[6]等。由于该药品中含中药材种类较多,化学成分复杂,考虑到指纹图谱可以全面反映样品中的化学信息,同时近年来HPLC指纹图谱用于药品质量评价也较多^[7-10],在本研究中笔者对丹珍头痛胶囊进行了HPLC指纹图谱研究并对其进行相似度评价,以为完善丹珍头痛胶囊的质量控制方法提供参考。

1 材料

515型HPLC仪,包括溶剂管理系统、二极管阵列检测器、Empower色谱工作站(美国Waters公司);KQ-100B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);ESJ182-4型电子天平(沈阳龙腾电子有限公司);HH-4型数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司)。

丹珍头痛胶囊(批号:20131105、20131203、20131204、20140602、20140603、20140607、20140608、20140609、20140601、20140602,编号为S1~S10)由青海益欣药业有限责任公司提供;阿魏酸、芍药苷、绿原酸、木犀草苷、3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸、丹酚酸B、丹参酮Ⅱ_A、迷迭香酸对照品的质量浓度分别为0.012 0、0.029 4、0.030 9、0.040 9、0.030 5、0.136 0、0.016 0、0.312 0 mg/ml(批号分别为MUST-13090901、MUST-11090902、MUST-11090911、MUST-12090901、MUST-14090901、MUST-14090908、MUST-15090906、MUST-16090903)均购自成都曼思特生物科技有限公司;甲醇、乙腈为色谱纯,磷酸为分析纯,水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Dikma Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相A为水,流动相B为甲醇-乙腈(1:1, V/V),梯度洗脱(0~10 min, 15%→25%B;10~20 min, 25%→40%B;20~60 min, 40%→90%B;60~65 min, 15%B);流速:1.0 ml/min;检测波长:340 nm;柱温:40 ℃;进样量:20 μl;记录时间:65 min。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 取阿魏酸、芍药苷、绿原酸、木犀草苷、3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸、丹酚酸B、丹参酮Ⅱ_A、迷迭香酸对照品各适量,加入甲醇制成每1 ml含0.012 0 mg阿魏酸、0.029 4 mg芍药苷、0.030 9 mg绿原酸、0.040 9 mg木犀草苷、0.030 5 mg、3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸、0.136 0 mg丹酚酸B、0.016 0 mg丹参酮Ⅱ_A和0.312 0 mg迷迭香酸的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 将丹珍头痛胶囊粉末过七号筛,精密称取约1.5 g,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 ml,称定质量,回流提取2 h,放冷,用甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,经0.45 μm微孔滤膜滤过,得供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果,相似度均为0.90以上。以第11号峰为对照峰S,测定6次色谱中各共有峰的相对保留时间及相对峰面积比值的一致性。结果,RSD分别为0.09%(阿魏酸)、0.10%(芍药苷)、0.20%(绿原酸)、0.15%(木犀草苷)、0.12%(3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸)、0.09%(丹酚酸B)、0.12%(丹参酮Ⅱ_A)、0.20%(迷迭香酸),说明仪器精密度良好,符合指纹图谱技术要求。

2.3.2 稳定性试验 取同一样品(编号:S8)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别于放置2、4、6、8、10 h时按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果,相似度均为0.90以上。以第11号峰为对照峰S,测定6次色谱中各共有峰的相对保留时间及相对峰面积比值的一致性。结果,RSD分别为0.15%(阿魏酸)、0.16%(芍药苷)、0.20%(绿原酸)、0.15%(木犀草苷)、0.21%(3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸)、0.19%(丹酚酸B)、0.11%(丹参酮Ⅱ_A)、0.22%(迷迭香酸),说明供试品溶液在10 h内基本稳定。

2.3.3 重复性试验 取同一样品(编号:S8)适量,共6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果,相似度均为0.90以上。以第11号峰为对照峰S,测定6次色谱中各共有峰的相对保留时间及相对峰面积比值的一致性。结果,RSD分别为0.15%(阿魏酸)、0.17%(芍药苷)、0.20%(绿原酸)、0.14%(木犀草苷)、0.20%(3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸)、0.19%(丹酚酸B)、0.12%(丹参酮Ⅱ_A)、0.23%(迷迭香酸),说明本方法重复性良好,符合指纹图谱技术要求。

2.4 样品指纹图谱的建立及相似度评价

取10批样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,将所得的HPLC图谱导入国家药典委员会《中药指纹图谱相似度评价系统(2004A)》软件,选择批号20131203的药品为参照图谱,以平均数法生成对照指纹图谱,时间窗宽度为0.10 min,对比色谱图,确定共有峰为13个,详见图1。以色谱峰稳定、重复性较好的第11号峰为对照峰S,各共有峰相对保留时间比值的RSD为0~0.27%,说明10批样品中13个共有峰都能稳定出现。而相对峰面积比

值的RSD最高却达到60%以上,说明各批样品中13个共有峰的含量相差较大,故需提高对该药品的质量控制。对10批丹珍头痛胶囊进行相似度评价,相似度均大于0.90,详见表1。

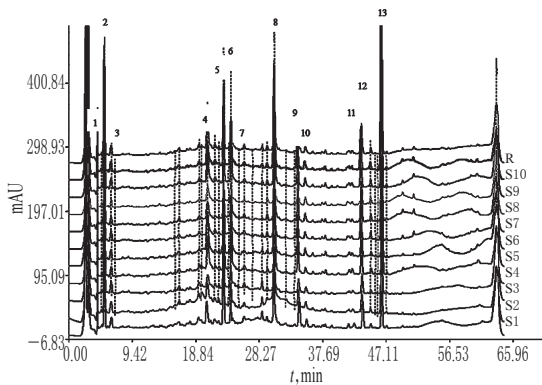


图1 10批丹珍头痛胶囊高效液相色谱指纹图谱

Fig 1 HPLC fingerprint chromatogram of 10 batches of Danzhen headache capsules

表1 10批丹珍头痛胶囊的相似度计算结果

Tab 1 Results of similarity of 10 batches of Danzhen headache capsules

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	相似度
S1		0.945	0.974	0.921	0.921	0.845	0.914	0.767	0.916	0.879	0.940
S2	0.945		0.942	0.965	0.941	0.915	0.954	0.859	0.965	0.948	0.975
S3	0.974	0.942		0.941	0.932	0.867	0.928	0.802	0.927	0.893	0.953
S4	0.921	0.965	0.941		0.932	0.971	0.982	0.936	0.986	0.983	0.994
S5	0.921	0.941	0.932	0.932		0.859	0.913	0.797	0.923	0.898	0.944
S6	0.845	0.915	0.867	0.971	0.859		0.976	0.986	0.974	0.989	0.968
S7	0.914	0.954	0.928	0.982	0.913	0.976		0.940	0.998	0.992	0.992
S8	0.767	0.859	0.802	0.936	0.797	0.986	0.940		0.936	0.965	0.927
S9	0.916	0.965	0.927	0.986	0.923	0.974	0.998	0.936		0.994	0.994
S10	0.879	0.948	0.893	0.983	0.898	0.989	0.992	0.965	0.994		0.985
相似度	0.940	0.975	0.953	0.994	0.944	0.968	0.992	0.927	0.994	0.985	

3 讨论

3.1 提取方法的选择

分别对提取溶剂(甲醇、乙酸乙酯、甲醇-乙酸乙酯、无水乙醇)、提取时间(0.5、1、1.5、2、2.5 h)、提取方法(回流、超声)、料液比(1:16、1:20、1:50、1:100)、样品粒度(过四号筛、过七号筛)进行考察,发现以甲醇回流、提取时间2 h、提取料液比1:16、样品粒度为过七号筛时,峰的数量、分离度及峰形均较好。

3.2 色谱条件的优化

在样品指纹图谱条件摸索过程中,分别以甲醇(乙腈)-水、甲醇(乙腈)-0.01%磷酸缓冲液、甲醇-乙腈-水、甲醇-乙腈-0.01%磷酸缓冲液为流动相,且试用不同的梯度,最后确定选择流动相A为水、流动相B为甲醇-乙腈(1:1, V/V)、梯度洗

脱时,各峰分离度较好。

3.3 检测波长的选择

采用二极管阵列检测器对样品进行200~400 nm全波长扫描,发现340 nm波长处检测到的峰数目较多,且分离度较好,故确定340 nm为检测波长。

3.4 指纹图谱数据分析

10批丹珍头痛胶囊中13个共有峰的相对保留时间和相对峰面积计算结果显示,各共有峰出峰时间基本稳定,但共有峰对应的化合物含量差异较大,可能与药材的产地、采收期、采收年限、贮藏及生产工艺控制等因素有关。故需重视药材来源,选用优质药材,严格控制生产工艺,保证药品的质量。

综上所述,该方法简便、准确、重复性好,可用于丹珍头痛胶囊的工艺稳定性评价和质量控制。

参考文献

- [1] 郭桂珍.丹珍头痛胶囊治疗偏头痛的临床疗效分析[J].中国社区医师:医学专业,2010,12(24):118.
- [2] 韩强.丹珍头痛胶囊治疗血管神经性头痛的临床观察[J].中国实用医药,2010,5(7):143.
- [3] 陈斌,李军会,臧鹏,等.六味地黄丸指纹图谱的近红外光谱分析方法的建立[J].光谱学与光谱分析,2010,30(8):2124.
- [4] 单臻,赵陆华,屠颖,等.肾宝片中挥发油GC指纹图谱的研究[J].中国天然药物,2005,3(3):158.
- [5] 向增旭,高山林.HPLC指纹图谱在金银花药材真伪鉴别中的应用研究[J].中国中药杂志,2008,33(9):996.
- [6] 魏凤环,张佳佳,张璐.夏天无TLC指纹图谱的研究[J].中药材,2006,29(6):547.
- [7] 张辰辰,杨继章,吴丹,等.香桂化浊胶囊的HPLC-PDA指纹图谱研究[J].医药导报,2014,33(1):86.
- [8] 曾超,陆东,段伟昌,等.肉桂配方颗粒的HPLC指纹图谱研究[J].中国药房,2014,25(7):635.
- [9] 朱文荣,李松.炒牛蒡子配方颗粒的HPLC指纹图谱研究[J].现代药物与临床,2014,29(2):158.
- [10] 刘悦,龚苏晓,张铁军,等.头痛滴丸不同提取工艺指纹图谱比较研究[J].中成药,2014,36(1):85.

(收稿日期:2014-10-25 修回日期:2015-01-09)

(编辑:余庆华)

《中国药房》杂志——《国际药学文摘》(IPA)收录期刊,欢迎投稿、订阅