

# 正天丸的HPLC特征图谱研究

黄 澜\*, 黄惠琼, 李玲玲(厦门市药品检验所, 福建 厦门 361012)

中图分类号 R284.1;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)12-1713-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.12.46

**摘要** 目的:建立正天丸的高效液相色谱(HPLC)特征图谱。方法:采用HPLC法。色谱柱为Intersil ODS-C<sub>18</sub>,流动相为乙腈-0.05%磷酸溶液(梯度洗脱),检测波长为230 nm,流速为1.0 ml/min,柱温为30 ℃,进样量为10 μl。对10批样品的色谱图进行色谱峰匹配,建立正天丸HPLC特征图谱,并用中药指纹图谱相似度计算软件对共有峰进行归属分析。结果:建立的特征图谱具有较好的精密性、重复性和稳定性;确立了18个共有特征峰,对其中10个色谱峰进行了药材归属,6个色谱峰进行了化学指认,10批样品相似度均>0.95。结论:所建立的正天丸特征图谱能较完整地表达该制剂的整体特性,提高了该品种的质量控制水平。

**关键词** 正天丸;特征图谱;高效液相色谱法

## Study on the HPLC Specific Chromatogram of Zhengtian Pills

HUANG Lan, HUANG Hui-qiong, LI Ling-ling(Xiamen Institute for Drug Control, Fujian Xiamen 361012, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the HPLC specific chromatogram of Zhengtian pills. METHODS: HPLC was performed on Intersil ODS-C<sub>18</sub> column with mobile phase of acetonitrile-0.05% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min and the detection wavelength was 230 nm. The sample volume was 10 μl with the column temperature of 30 ℃. 10 batches of samples were selected to establish the specific chromatogram of Zhengtian pills through peaks-matching. The common peaks were analyzed by TCM fingerprint similarity calculation software. RESULTS: The established specific chromatogram had good precision, reproducibility and stability and determined the 18 common characteristic peaks. The source of 10 peaks was revealed and 6 of them were identified. The similarity of 10 batches of samples was all more than 0.95. CONCLUSIONS: The established specific chromatogram can completely reflect the general characters of Zhengtian pills and improve the level of quality control.

**KEYWORDS** Zhengtian pills; Specific chromatogram; HPLC

### 3.3 萃取方法的考察

采用萃取方法处理样品溶液,在萃取过程中溶剂(乙酸乙酯)用量、萃取次数以及萃取时间均可能影响萃取效果。在前期研究过程中,笔者在样品中加入定量的正己醇,用pH1.0的盐酸溶液溶解样品后配制成含正己醇高、中、低质量浓度的溶液,再用等体积的乙酸乙酯分3次萃取。结果发现,采用5 ml萃取1次,其回收率为96.9%,说明采用5 ml乙酸乙酯萃取1次即可满足要求。同时,笔者还对萃取时间(10、20、30 min)进行了考察,结果萃取20 min和30 min正己醇的测得含量相当,说明萃取20 min即可满足要求。故最终确定萃取方法为:取本品0.5 g,精密称定,加pH 1.0盐酸溶液5 ml溶解后,再加5 ml乙酸乙酯萃取20 min,取乙酸乙酯层进样测定。

### 3.4 方法的耐用性

在前期研究过程中,笔者对色谱条件中的进样口温度(178、180、182 ℃)、检测器温度(248、250、252 ℃)以及流速(7、8、9 ml/min)进行了微调,同时还更换了不同品牌的气相色谱仪(PE-Clarus 680气相色谱仪)及不同批号的色谱柱进行试验。结果,正己醇含量的RSD为1.81%,且空白溶剂对正己醇测定均无干扰,说明拟定的方法耐用性良好。

### 3.5 正己醇残留限度的拟定

2010年版《中国药典》二部和人用药品注册技术要求国际

协调会(ICH)相关指导原则并未规定药物中正己醇的残留限度,但2010年版《中国药典》二部和ICH相关指导原则将正丁醇、异丙醇、乙醇等醇类均归类为第三类溶剂,而第三类溶剂的限度为0.5%,故笔者建议将甲磺酸达比加群酯原料药中正己醇的残留量限度定为不得过0.5%。

综上所述,该方法专属性强,操作简便快速,结果准确,能有效地排除主成分降解产生的正己醇干扰,可用于甲磺酸达比加群酯原料药中正己醇的残留量测定。

### 参考文献

- [1] 朱津津,樊士勇,仲伯华.达比加群酯的合成工艺改进[J].中国药物化学杂志,2012,22(3):204.
- [2] Balaji N, Sivaraman VR, Neeraja P. GC quantification of residual hexylmethanesulfonate in dabigatran etexilate mesylate[J]. *IOSR Journal of Applied Chemistry*, 2012, 2(6):48.
- [3] 冯光玲,丁文娟,冯爱国,等.毛细管气相色谱法测定阿莫曲坦原料药中8种有机溶剂残留量[J].中国药房,2014,25(5):453.
- [4] 王希冉,刘鹏,王松会,等.pH对达比加群酯的溶解和油水分分配系数的影响[J].中国新药杂志,2013,22(24):2933.

(收稿日期:2014-10-28 修回日期:2015-03-06)

(编辑:周 箫)

\* 主管中药师,硕士。研究方向:中药质量控制与成分分析。电话:0592-5619842。E-mail: huanglan7902@163.com

正天丸首创于1985年,具有疏风活血、养血平肝、通络止痛之功效,为国家基本药物<sup>[1-2]</sup>。目前,该品种的质量研究仅涉及某几味药材的薄层色谱鉴别<sup>[3]</sup>和含量测定<sup>[4-7]</sup>,难以综合评价该复方制剂的内在质量水平。中药指纹(特征)图谱技术作为目前综合评价中药材或中成药的有效手段,很大程度上反映了药品的研制、工艺、贮存过程中化学成分的变化情况<sup>[8-9]</sup>。基于中药指纹(特征)图谱的技术特点以及正天丸质量研究的需求,本研究建立了正天丸的高效液相色谱(HPLC)特征图谱;同时,应用中药指纹图谱相似度计算软件对10批样品的相似度进行评价。通过对测定结果的系统分析,本研究将为建立正天丸全面、整体的质量评价方法提供科学、有效的技术依据。

## 1 材料

1200系列SL型HPLC仪,包括二元泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱、紫外检测器、化学工作站(美国Agilent公司);XS-105电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);中药指纹图谱相似度评价系统2009版(国家药典委员会)。

芍药苷(批号:110736-201035)、升麻素苷(批号:111522-201008)、阿魏酸(批号:110773-200611)、5-O-甲基维斯阿米醇苷(批号:111523-201007)、欧前胡素(批号:110826-200511)、异欧前胡素(批号:110827-200407)、白芍对照药材(批号:120905-201109)、川芎对照药材(批号:120918-201110)、当归对照药材(批号:120927-201014)、防风对照药材(批号:120947-201108)、白芷对照药材(批号:120945-200406)均由中国食品药品检定研究院提供;正天丸由广州华润三九医药股份有限公司提供,批号:1202018H、1201023H、1201010H、1201012H、1201031H、1202013H、1201017H、1202025H、1201037H、1201002H;甲醇为分析纯,乙腈为色谱纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Intersil ODS-C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.05%磷酸溶液(B), 梯度洗脱(洗脱程序见表1); 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 30 °C; 检测波长: 230 nm; 进样量: 10 μl。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedure

| 时间, min | 流动相A, % | 流动相B, % |
|---------|---------|---------|
| 0~10    | 5→10    | 95→90   |
| 10~30   | 10→20   | 90→80   |
| 30~40   | 20      | 80      |
| 40~60   | 20→40   | 80→60   |
| 60~90   | 40→60   | 60→40   |
| 90~110  | 60→100  | 40→0    |

### 2.2 供试品溶液的制备

取正天丸样品研细, 取约3 g细粉, 置具塞锥形瓶中。精密加入稀乙醇15 ml, 称定质量, 超声处理(功率: 250 W, 频率: 40 kHz) 60 min, 取出, 冷却, 用稀乙醇补足减失的质量, 滤过, 即得。

### 2.3 对照品及对照药材溶液的制备

取上述各对照品适量, 加甲醇制成每1 ml含50 μg的对照品溶液, 过滤, 即得。取上述对照药材各约0.5 g, 按“2.2”项下的方法制成对照药材溶液, 过滤, 即得。

## 2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一批正天丸样品溶液(批号: 1202018H), 连续进样6次, 考察仪器的精密程度。结果, 各共有峰的相对保留时间、相对峰面积的RSD均<3%, 相似度计算结果均>0.90, 表明仪器精密程度良好, 符合特征图谱的测定要求。

2.4.2 重复性试验 取同一批正天丸样品(批号: 1202018H), 共6份, 照“2.2”项下方法制备成供试品溶液, 按“2.1”项色谱条件测定。结果, 样品间各共有峰相对保留时间、相对峰面积的RSD均<3%, 相似度计算结果均>0.90, 表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取“2.4.2”项下的1份供试品溶液, 分别放置0、4、8、16、24 h后测定。结果, 样品色谱中各共有峰的相对保留时间、相对峰面积的RSD均<3%, 相似度计算结果均>0.90, 表明样品在24 h内稳定, 能满足特征图谱的测定要求。

## 2.5 特征图谱的建立及分析

2.5.1 HPLC特征参照图谱的建立及特征峰的确定 按“2.1”项下的色谱条件, 分别记录了10批正天丸样品的HPLC图谱, 并用中药指纹图谱相似度评价软件<sup>[10]</sup>对各色谱图进行叠加(图1), 确立了正天丸的特征参照图谱(图2)。为便于分析, 按所分离化合物的极性强弱将图谱分为A、B、C 3个区域: 0~42 min为中高极性区(A区), 包括9个主要色谱峰; 42~70 min为中等极性区(B区), 该区无明显特征色谱峰; 70~110 min为低极性区(C区), 包括9个主要色谱峰。

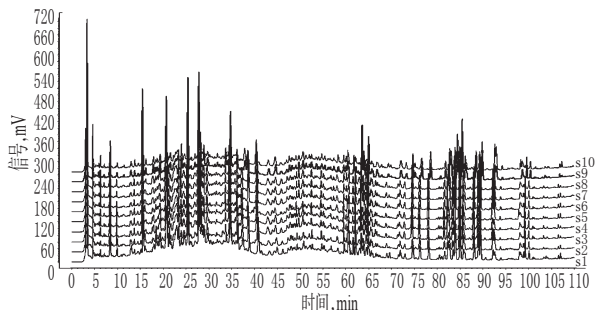


图1 10批正天丸样品叠加色谱图

Fig 1 Overlay chromatograms of 10 batches of Zhengtian pills sample

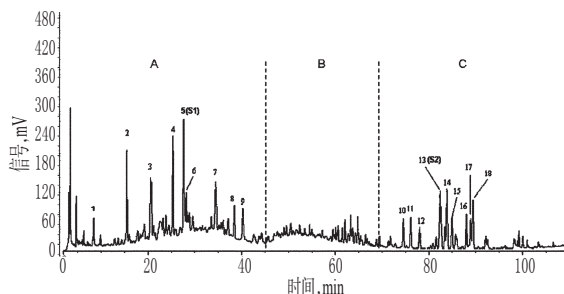


图2 正天丸的HPLC特征图谱

Fig 2 HPLC specific chromatograms of Zhengtian pills

由图2可见, 正天丸的特征图谱共包括18个共有特征峰。由于单次谱图记录时间较长, 仅设立1个参照峰存在较大误差, 因此根据色谱峰分布情况, A区5号峰(芍药苷)设为参照峰1(S1), C区13号峰(欧前胡素)设为参照峰2(S2)。

各共有峰的相对保留时间(峰号)平均值如下: A区为

0.301(1)、0.558(2)、0.743(3)、0.914(4)、1.000(S1)、1.016(6)、1.253(7)、1.383(8)、1.448(9);C区为0.905(10)、0.924(11)、0.947(12)、1.000(S2)、1.017(14)、1.029(15)、1.067(16)、1.079(17)、1.085(18)。

各共有峰的相对峰面积(峰号)平均值如下:A区为0.245(1)、0.672(2)、0.709(3)、0.873(4)、1.000(S1)、0.490(6)、0.581(7)、0.408(8)、0.254(9);C区为0.599(10)、0.608(11)、0.456(12)、1.000(S2)、1.138(14)、0.630(15)、0.595(16)、0.515(17)、0.630(18)。

**2.5.2 特征峰的药材归属及化学指认** 采用相同色谱条件测定各对照药材与复方制剂的特征图谱,比较各个色谱峰的保留时间及紫外吸收扫描图谱。结果,归属了其中10个特征峰的处方药材来源:3、4、5号峰来自于白芍,6、8号峰来自于防风,7、14、15号峰来自于当归、川芎,13、16号峰来自于白芷。经与对照品色谱图比较分析,确认了其中6个特征峰的化学成分,按保留时间先后次序分别为芍药苷、升麻素苷、阿魏酸、5-O-甲基维斯阿米醇苷、欧前胡素、异欧前胡素,详见图3。

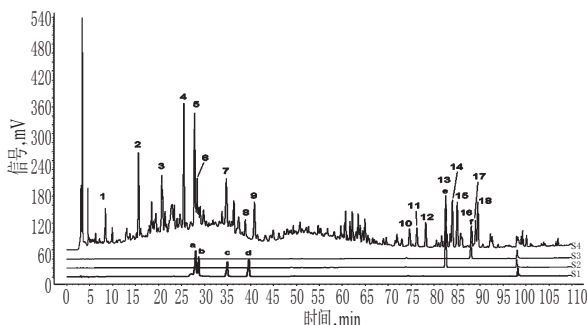


图3 正天丸特征图谱与6个对照品的HPLC图谱

a.芍药苷;b.升麻素苷;c.阿魏酸;d.5-O-甲基维斯阿米醇苷;e.欧前胡素;f.异欧前胡素

**Fig 3 Specific chromatograms of Zhengtian pills and HPLC chromatography of 6 reference substances**

a.paeoniflorin; b.prim-O-glucosylcimifugin; c. ferulic acid; d. 5-O-methylvisammioside; e. imperatorin; f. isoimperatorin

**2.6 样品相似度的评价**

采用国家药典委员会中药指纹图谱相似度评价软件2009版对10批正天丸样品的特征图谱进行相似度评价。将样品色谱图导入软件,进行峰匹配,建立共有模式,测定样品与共有模式之间的相似度。结果,10批样品相似度分别为0.993、0.995、0.998、0.992、0.985、0.986、0.990、0.976、0.994、0.988。

**3 讨论**

正天丸为15味药组成的大复方制剂,化学环境复杂,处方药味中所含各化学成分性质差异巨大。为在同一张色谱图中尽可能全面地反映组方中药的信息,本研究比较了不同流动相比例的乙腈-水、乙腈-0.05%磷酸水溶液、乙腈-0.1%乙酸水溶液、甲醇-0.05%磷酸水溶液等,结果发现使用乙腈-0.05%磷酸水溶液作为流动相,在上述梯度条件下,基线较为平稳,各待测成分能得到较好分离且分析时间适中。采用二极管阵列检测器在紫外190~400 nm范围内扫描,结果显示在230 nm波长下能检出的色谱峰信息最多,基线平稳且各色谱峰响应

适中。此外,在供试品的制备方法上,比较了不同比例的甲醇-水、乙醇-水等提取溶剂,对不同提取方式、提取时间进行考察,最终确定以稀乙醇为提取溶剂、超声60 min即可满足测定要求。

由于正天丸处方组成复杂,所含化学成分极性差异较大,因此按极性大小将特征谱图分区将有利于进行科学、全面的分析。由图2可见,18个特征峰主要分布于高、低极性区,中等极性区由于色谱峰过于复杂且响应值不高,未能设立明显的特征峰,进一步的分析工作有待今后的深入研究。同时,本研究在复方制剂与药材相关性方面也开展了一部分的工作,确认了18个特征色谱峰中10个色谱峰的药材归属并指认了其中6个色谱峰的化学成分,虽然目前仍不能全面反映该品种中各组方药味及化学成分的信息,但为今后的研究工作奠定了坚实基础。

综上所述,本研究建立的正天丸特征图谱专属性强、重现性好,以其为参照对10批样品进行相似度分析,相似度均在0.95以上。由于该品种为华润三九医药股份有限公司独家产品,样品间高度的一致性也说明该产品稳定性良好,生产工艺稳定、内控严格、质量可靠。同时,特征图谱作为综合、有效评价大复方制剂质量的有效手段,也为产品的真伪鉴别和质量评价、监控生产企业的违规生产行为、提高企业的市场竞争力提供了有力的技术支撑。

**参考文献**

[1] 曹克刚,高颖,黄粤.正天丸治疗头痛研究述评[J].北京中医药大学学报,2009,16(1):13.  
 [2] 李涛,范吉平,曹克刚.正天丸组方配伍及功效特点解析[J].中医药导报,2013,19(6):65.  
 [3] 郑琴,潘革.正天丸中钩藤的薄层色谱鉴别方法改进[J].中国药师,2003,6(4):248.  
 [4] 尤立华,赵希贤.氧化铝对正天丸中芍药苷含量测定结果影响的探析[J].首都医药,2012,19(8):53.  
 [5] 汪建君,李玲玲,陈惠玲,等.HPLC法测定正天丸和正天胶囊中羟基红花黄色素A的含量[J].中国药品标准,2013,14(3):197.  
 [6] 黄澜,陈惠玲,李玲玲.HPLC法同时测定正天丸中芍药苷、阿魏酸、升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷的含量[J].中国中药杂志,2013,38(13):2114.  
 [7] 汪建君,陈惠玲.HPLC-PDA法检测正天丸和正天胶囊中6种非法添加色素[J].药物评价研究,2013,36(1):51.  
 [8] 李强,李超.中药指纹图谱研究综述[J].齐鲁药事,2010,29(3):158.  
 [9] 刘文,蒋世云.中药指纹图谱研究与应用进展[J].中国药房,2011,22(19):1819.  
 [10] 关洪月,李林,刘晓,等.中药指纹图谱相似度计算方法探析[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(18):282.

(收稿日期:2014-04-11 修回日期:2014-09-01)

(编辑:余庆华)