

血栓心脉宁片的HPLC-ELSD指纹图谱研究

明磊*,林美好,张庆贺,刘海宇,卢丹,李平亚,刘金平[#](吉林大学再生医学科学研究所,长春 130021)

中图分类号 R283.64;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)07-0639-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.07.23

摘要 目的:建立血栓心脉宁片的高效液相色谱(HPLC)-蒸发光散射检测器(ELSD)指纹图谱。方法:色谱柱为Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),柱温为40℃,流动相为乙腈-1%冰醋酸(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,采用ELSD进行测定;应用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)进行评价。结果:10批血栓心脉宁片的HPLC-ELSD指纹图谱有17个共有峰,精密度、重复性、稳定性试验中各共有峰的相对峰面积与相对保留时间的RSD均<4%;10批样品的相似度在0.880~1.000之间。结论:本方法简便、准确、重复性好,可用于血栓心脉宁片的质量控制,可为血栓心脉宁片的深入研究提供基础。

关键词 血栓心脉宁片;指纹图谱;高效液相色谱-蒸发光散射检测器法

Fingerprint of Xueshuan Xinmaining Tablet by HPLC-ELSD

MING Lei, LIN Mei-yu, ZHANG Qing-he, LIU Hai-yu, LU Dan, LI Ping-ya, LIU Jin-ping (Institute of Frontier Medical Science, Jilin University, Changchun 130021, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish fingerprint of Xueshuan xinmaining tablet by using HPLC-ELSD. METHODS: The analysis was performed on Diamonsil C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with mobile phase consisted of acetonitrile-1% acetic acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. ELSD method was used; the data were analyzed by chromatographic fingerprint evaluation system (2004A version). RESULTS: 17 common peaks were found in HPLC-ELSD fingerprints of 10 batches of Xueshuan xinmaining tablet. In precision, reproducibility and stability test, RSDs of relative peak area and relative retention time of common peaks were less than 4%. The similarities of 10 batches of samples were between 0.880 and 1.000. CONCLUSION: The method is simple, accurate and reproducible, and it is suitable for the quality control of Xueshuan xinmaining tablet. It provides basis for the further study of Xueshuan xinmaining tablet.

KEY WORDS Xueshuan xinmaining tablet; Fingerprint; HPLC-ELSD

血栓心脉宁片是由川芎、槐花、丹参、水蛭、毛冬青、人工牛黄、人工麝香、人参茎叶总皂苷、冰片、蟾酥10味中药制成的片剂,具有益气活血、开窍止痛的功效,用于治疗气虚血瘀所致的中风、胸痹,症见头晕目眩、半身不遂、胸闷心痛、心悸气短;缺血性中风恢复期、冠心病、心绞痛见上述症候者^[1]。药理实验研究结果表明,血栓心脉宁片对大鼠实验性脑缺血^[2]、大鼠急性心肌梗死^[3]及心血管疾病^[4]均具有明显保护作用,对急性血瘀模型大鼠血液黏度、血小板聚集及血液流变学的异常变化有明显改善作用^[5]。已有文献以单体成分丹参酮II_A和丹酚酸B的含量作为质控指标评价该药的质量^[6-7],但对于该药指纹图谱的研究尚未见报道。笔者应用高效液相色谱-蒸发光

散射检测器(HPLC-ELSD)建立了血栓心脉宁片指纹图谱的测定方法。通过测定10批样品,应用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)对其进行评价,建立了血栓心脉宁片的指纹图谱,为全面评价该药质量提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

LC-10AT_{VP} HPLC仪、SEDEX FRANCE 75 ELSD、Chromato-Solution Light 色谱工作站(日本Shimadzu公司)。

1.2 药品与试剂

血栓心脉宁片(吉林华康药业股份有限公司,批号:110116、110118、110126、110127、110205、110301、110302、

- 量[J].中国中医药信息杂志,2011,18(1):55.
- [3] 王静,秦伟.HPLC法测定康妇膜中盐酸小檗碱的含量[J].中国药房,2011,22(35):3309.
- [4] 江汉美,叶代望,熊维利,等.反相高效液相色谱法测定葛根芩连片中盐酸小檗碱的含量[J].湖北中医药大学学报,2011,13(1):30.

* 硕士研究生。研究方向:天然药物化学成分。电话:0431-85619803。E-mail:minglei-418@163.com

[#] 通信作者:副教授,硕士研究生导师。研究方向:天然药物化学成分及其生物活性。电话:0431-85619803。E-mail:liujp@jlu.edu.cn

- [5] 梁海春,石书江,李一圣,等.HPLC法测定加味胃炎消片中野黄芩苷、盐酸小檗碱的含量[J].中药新药与临床药理,2011,22(1):96.
- [6] 张秀桥,周东斌,刘炎文,等.三黄泻心汤传统煎剂与中药配方颗粒汤剂中盐酸小檗碱含量测定比较[J].中国医院药学杂志,2002,22(7):408.
- [7] 陈思好,翟小燕.高效液相色谱法测定双柏膏中盐酸小檗碱含量[J].医学信息:下旬刊,2010,23(9):177.

(收稿日期:2012-02-09 修回日期:2012-07-23)

110303、110309、110311);乙腈为色谱纯,水为纯净水,其余试剂均为分析纯;芦丁、阿魏酸、丹酚酸B、人参皂苷R_{g1}、人参皂苷Re、胆酸、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基、丹参酮II_A对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为100080-200707、110773-200611、111562-200908、110703-200726、110754-200822、100078-200414、110803-200605、0718-9004、0766-200011)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相: 乙腈(A)-1%冰醋酸(B),梯度洗脱(洗脱程序见表1);柱温: 40℃;流速: 1.0 ml/min;漂移管温度: 50℃;载气: N₂;载气流速: 3.0 Bar。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedure

时间, min	A, %	B, %
0	18	82
20	18	82
60	20	80
90	30	70
105	37	63
140	60	40
175	100	0

2.2 对照品溶液的制备

精密称取对照品芦丁0.9 mg、阿魏酸1.8 mg、丹酚酸B 0.5 mg、人参皂苷R_{g1} 2.4 mg、人参皂苷Re 3.9 mg、胆酸1.9 mg、华蟾酥毒基1.9 mg、脂蟾毒配基2.3 mg、丹参酮II_A 1.8 mg,置于同一10 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,过0.45 μm微孔滤膜,即得。混合对照品的HPLC图见图1。

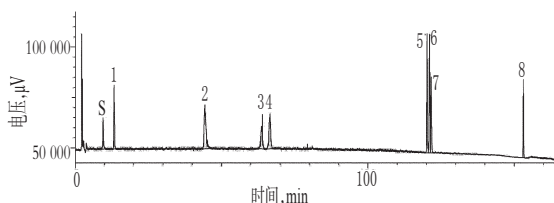


图1 混合对照品的HPLC图

S. 芦丁; 1. 阿魏酸; 2. 丹酚酸B; 3. 人参皂苷R_{g1}; 4. 人参皂苷Re; 5. 胆酸; 6. 华蟾酥毒基; 7. 脂蟾毒配基; 8. 丹参酮II_A

Fig 1 HPLC chromatograms of mixed control

S. rutin; 1. ferulic acid; 2. salvianolic acid B; 3. ginsenoside R_{g1}; 4. ginsenoside Re; 5. cholic acid; 6. cinobufagin; 7. resibufogenin; 8. tanshinone II_A

2.3 供试品溶液的制备

取血栓心脉宁片,研细,取约0.3 g,精密称定,加甲醇50 ml,超声处理(功率:250 W,频率:50 kHz)30 min,滤过,滤液蒸干,残渣用90%甲醇溶解并转移至5 ml量瓶中,加90%甲醇稀释至刻度,摇匀,过0.45 μm微孔滤膜,即得。血栓心脉宁片的HPLC图见图2。

2.4 精密度试验

精密吸取同一供试品(批号:110309)溶液10 μl,连续重复进样6次,按“2.1”项下色谱条件进行检测,采用中药色谱指

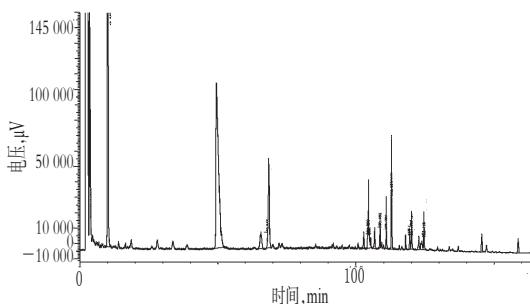


图2 血栓心脉宁片的HPLC图

Fig 2 HPLC chromatograms of Xueshuan xinmaining tablet 图谱相似度评价系统(2004A版)对6次测定结果进行计算,其相似度均为0.99以上。以芦丁峰为对照峰,考察6次测定的色谱中各共有峰的相对保留时间与相对峰面积对数值的一致性。结果,各共有峰相对保留时间的RSD为0.11%~0.26%,相对峰面积对数值的RSD为0.56%~1.34%,表明本方法精密度良好,符合指纹图谱技术要求。

2.5 重复性试验

取同一批样品(批号:110309)适量,共6份,精密称定,分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液,照“2.1”项下色谱条件进样检测,采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)对6次测定结果进行计算,其相似度均为0.99以上。以芦丁峰为对照峰,考察6份供试品色谱中各共有峰的相对保留时间与相对峰面积对数值的一致性。结果,各共有峰相对保留时间的RSD为0.13%~0.42%,相对峰面积对数值的RSD为0.50%~2.08%,表明本方法重复性良好,符合指纹图谱技术要求。

2.6 稳定性试验

取同一供试品(批号:110309)溶液适量,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,分别于0、4、8、12、16、24 h按“2.1”项下色谱条件进样检测,采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)对6次测定结果进行计算,其相似度均为0.99以上。以芦丁峰为对照峰,考察不同时间进样获得的供试品色谱中各共有峰的相对保留时间与相对峰面积对数值的一致性。结果,各共有峰相对保留时间的RSD为0.11%~0.57%,相对峰面积对数值的RSD为1.06%~1.97%,表明在24 h内供试品溶液的指纹图谱基本稳定,没有明显的变化,符合指纹图谱技术要求。

2.7 血栓心脉宁片标准指纹图谱的建立

比较10批供试品溶液的图谱给出的相关参数,其中有17个峰(包含S峰在内)是各批供试品共有的,因此确定这17个峰为其共有指纹峰。综合考虑出峰面积、出峰时间及分离度等因素,发现芦丁在制剂中的含量最高、色谱峰分离度较好且纯度较高,因此选择芦丁峰作为S峰。2号峰为丹酚酸B,3号峰为人参皂苷R_{g1},4号峰为人参皂苷Re,12号峰为胆酸,13号峰为华蟾酥毒基,14号峰为脂蟾毒配基,17号峰为丹参酮II_A,其余峰为未知物。10批血栓心脉宁片的HPLC指纹图谱见图3。

2.8 相似度计算

利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)软件对10批样品进行相似度分析。结果,相似度为0.88~1.00,表

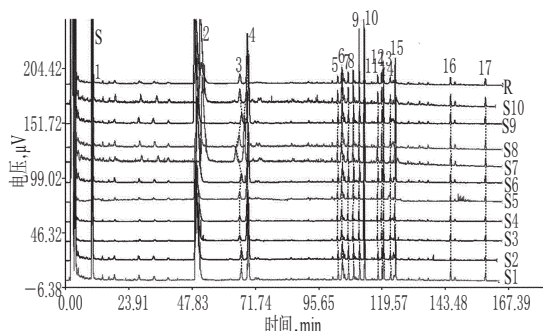


图3 10批血栓心脉宁片的HPLC指纹图谱

Fig 3 Fingerprint chromatograms of 10 batches of Xueshuan xinmaining tablet

明10批样品中的化学成分基本一致。血栓心脉宁片的标准指纹图谱相似度数据见表2。

表2 血栓心脉宁片的标准指纹图谱相似度

Tab 2 Similarity of standard fingerprint of Xueshuan xinmaining tablet

相似度	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
S1	1.000	1.000	0.997	0.992	0.993	0.997	0.887	1.000	1.000	0.882
S2	1.000	1.000	0.998	0.995	0.996	0.999	0.896	0.999	0.999	0.890
S3	0.997	0.998	1.000	0.999	0.999	1.000	0.909	0.996	0.995	0.904
S4	0.992	0.995	0.999	1.000	1.000	0.998	0.918	0.992	0.991	0.912
S5	0.993	0.996	0.999	1.000	1.000	0.999	0.918	0.993	0.991	0.913
S6	0.997	0.999	1.000	0.998	0.999	1.000	0.909	0.997	0.996	0.903
S7	0.887	0.896	0.909	0.918	0.918	0.909	1.000	0.885	0.883	1.000
S8	1.000	0.999	0.996	0.992	0.993	0.997	0.885	1.000	1.000	0.880
S9	1.000	0.999	0.995	0.991	0.991	0.996	0.883	1.000	1.000	0.877
S10	0.882	0.890	0.904	0.912	0.913	0.903	1.000	0.880	0.877	1.000
对照	0.992	0.994	0.997	0.997	0.997	0.997	0.938	0.991	0.990	0.934

3 讨论

3.1 提取溶剂的考察

分别采用水、甲醇、75%甲醇3种溶剂对血栓心脉宁片超声提取,结果以甲醇提取液效果最为理想,故选择甲醇作为提取溶剂。

3.2 流动相的确定

试验过程中对比了乙腈-水、乙腈-1%冰醋酸溶液作为流动相的结果,发现以乙腈-1%冰醋酸溶液进行线性梯度洗脱能得到较好的分离效果。

3.3 检测器的确定

试验考察了HPLC-二极管阵列检测器(DAD)和HPLC-ELSD的分离效果。结果发现,当使用DAD检测时,在任一特定波长下检出的化合物数量远远少于ELSD所检测出的数量;使用ELSD可以在多溶剂梯度的情况下获得最多有效峰,分辨率较高。

3.4 小结

本试验在中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)的辅助下,建立了血栓心脉宁片的HPLC-ELSD指纹图谱。由于指纹图谱是由ELSD检测的,它的进样浓度的对数值与峰面积的对数值呈正比,故在计算相对峰面积时要计算其对数值^[9]。本方法重复性、稳定性与精密密度均较好,各共有峰相对保留时间和相对峰面积的对数值均符合指纹图谱技术要求。

参考文献

- [1] 明磊,王鹏,李海军,等.血栓心脉宁片中无机元素成分分析[J].中国当代医药,2010,17(16):60.
- [2] 刘建伟,曲绍春,于晓风,等.血栓心脉宁片对大鼠实验性脑缺血的保护作用[J].中西医结合心脑血管病杂志,2011,9(3):333.
- [3] 赵星宇,睢大员,于晓风,等.血栓心脉宁片对大鼠急性心肌梗死的保护作用及其机制[J].中西医结合心脑血管病杂志,2008,6(2):177.
- [4] 刘郁,刘春杰,刘连新,等.洋参川芎复方制剂抗心血管疾病的实验研究[J].中国药房,2008,19(3):175.
- [5] 王宏,曲绍春,于晓风,等.血栓心脉宁片对急性血瘀模型大鼠血小板功能及血液流变学的影响[J].中国老年学杂志,2010,30(22):3335.
- [6] 刘传贵,王福文,李振伟.HPLC测定血栓心脉宁片中丹参酮II_A和丹酚酸B的含量[J].中国现代中药,2007,9(8):12.
- [7] 刘传贵,董长萍,王福文.HPLC测定血栓心脉宁片中丹酚酸B的含量[J].中药研究与信息,2005,7(12):19.
- [8] 罗曼,鲍家科,熊慧林,等.白果仁萜类内酯成分的指纹图谱研究[J].中成药,2011,33(9):1465.

(收稿日期:2012-03-08 修回日期:2012-04-16)

国家食品药品监督管理局、财政部联合发布《食品药品违法行为举报奖励办法》

本刊讯 为鼓励公众积极举报食品药品违法行为,及时发现、控制和消除食品药品安全隐患,严厉打击食品药品违法犯罪行为,确保食品药品安全,近日,国家食品药品监督管理局与财政部联合出台了《食品药品违法行为举报奖励办法》(以下简称《办法》)。《办法》适用于各级食品药品监管部门,对自然人、法人和其他组织以来信、走访、网络、电话等方式,举报属于其监管职责范围内的药品、医疗器械、保健食品、化妆品在研制、生产、流通和使用环节中的违法行为,经查证属实并依法作出处理后,根据举报人的申请,予以相应物质及精神奖励的行为。

餐饮服务环节食品安全的投诉举报奖励,按照各省(区、市)制定的食品安全有奖举报管理规定执行。

《办法》明确了举报奖励应当同时符合的条件,包括:有明确的举报对象、具体的举报事实及证据;举报内容事先未被食品药品监管部门掌握;举报内容经查证属实并已依法作出处理。

《办法》规定,有下列情形之一的,不属于举报奖励范围:食品药品监管部门工作人员及其直系亲属或其授意他人的举报;假冒伪劣产品的被假冒方及其委托代理人或利害关系人的举报;属于申诉案件的举报;其他不符合法律、法规规定的奖励情形。

举报奖励的实施原则上限于实名举报,对匿名举报并查处的案件,在结案后能够确定举报人真实身份,且举报人愿意领取奖励的,应当给予奖励。