神安颗粒中水溶性成分的HPLC指纹图谱研究

易延逵[1*]，李跃辉[2]，蔡光先[2]，杨永华[2]（1.南方医科大学中医药学院，广州 510515；2.湖南中医药大学超微工程技术中心，长沙 410006）

中图分类号 R283.627；R917 **文献标志码** A **文章编号** 1001-0408（2013）35-3317-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.35.17

摘 要 目的：制定神安颗粒中水溶性成分的指纹图谱，为神安颗粒“全指纹图谱系”的建立提供依据。方法：采用高效液相色谱法，以斯皮诺素为参照物，色谱柱为C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为乙腈-水（梯度洗脱），流速为1.0 ml/min，柱温为室温，检测波长为335 nm，进样量为10 μl，记录时间为55 min。以斯皮诺素峰（S峰）的保留时间和峰面积为1，计算各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积，并进行方法学考察；采用国家药典委员会推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2004A版）”，对10批样品进行相似度评价。结果：制定了神安颗粒中水溶性成分的区间指纹图谱，标注了6个共有指纹峰。各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致，RSD＜2%；10批样品的相似度均在0.80以上。结论：通过对神安颗粒中水溶性成分指纹图谱的制定，可为其“全指纹图谱系”的建立提供试验依据，为提高天然产物质量控制技术进行有意义的探索。
关键词 高效液相色谱法；全指纹图谱系；区间指纹图谱；斯皮诺素；神安颗粒

Study on HPLC Fingerprint of Water-soluble Constituent of Shen'an Granules

YI Yan-kui[1], LI Yue-hui[2], CAI Guang-xian[2], YANG Yong-hua[2] (1.School of TCM, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2.Ultra-micro Engineering Center, Hunan University of TCM, Changsha 410006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish fingerprint of water-soluble components of Shen'an granules, and to provide reference for the establishment of "complete fingerprint system" of Shen'an granules. METHODS: HPLC method was adopted using spinosin as reference. C_{18} (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column was used with acetonitrile-water as mobile phase (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was room temperature, and detection wavelength was set at 335 nm. The sample size was 10μl, and record time was 55 min. The retention time and peak area of spinosin chromatographic peak (S peak) regarded as 1, relative retention time and relative peak area ratios of other peak were calculated and reviewed by methodology; the similarity of 10 batches of samples was evaluated by using "TCM chromatograph fingerprint similarity appreciation system" recommended by Chinese Pharmacopoeia Committee. RESULTS: The interval fingerprint of water-soluble constituent of Shen'an granules had been formulated, and 6 common peaks were marked. The relative retention time and relative peak area of each common peak were in substantial agreement (RSD＜2%); 10 batches of samples showed the similarity was all more than 0.80. CONCLUSIONS: The formulation of the fingerprint of water-soluble constituent of Shen'an granules provide experiment basis for the construction of "complete fingerprint system", and carry out significant exploration to improve quality controlling technology of natural products.
KEY WORDS HPLC method; Complete fingerprint system; Interval fingerprint; Spinosin; Shen'an granules

天然产物（包括中药材、中药制剂、天然食品原料等）指纹图谱是指某种天然产物中所共有的、具有特异性的某类或数类成分的色谱或光谱的图谱，其特点在于：通过指纹图谱的特异性，能有效鉴别样品的真伪与产地；通过指纹图谱主要特征峰的含量或比例的制定，能有效控制样品的质量，确保样品质量的相对稳定。在有效成分不完全明确的前提下，特定天然

天麻素含量的测定。

同时，对方中黄芪、天麻、人参、川芎药味进行TLC定性鉴别，可得斑点分离好、阴性无干扰，表明所选方法专属性强。

综上，所建标准可用于黄芪天麻胶囊的质量控制。

参考文献

[1] 陈英红，姜瑞芝，邓伟珍，等. 参芪片质量标准研究[J].中成药，2008，30(3)：389.
[2] 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：附录34.
[3] 梁妍，郝小燕，朱洁，等.天参益智胶囊的质量标准研究[J]. 中成药，2008，30(5)：附11.
[4] 钟颖.天麻首乌胶囊的质量控制[J].中国医院药学杂志，2006，26(8)：965.
[5] 王福霞，康红英. 高效液相色谱法测定天麻胶囊中天麻素的含量[J].时珍国医国药，2007，18(6)：1 321.

*副教授，博士。研究方向：药物新剂型、新技术。电话：020-61648263。E-mail：dareyyk@sina.com

（收稿日期：2012-09-06 修回日期：2013-01-08）

产物的特征指纹图谱，对于有效控制天然产物的质量具有重要意义。目前，指纹图谱已成为国际公认的控制天然产物质量的最有效手段[1-3]。

神安颗粒由天麻、五味子、丹参、百合花、酸枣仁、首乌藤等组成，功能为补脑安神、宁心除烦。神安颗粒的主要成分有：(1)较高极性苷类成分：以天麻素为代表；(2)脂溶性成分：存在于丹参、五味子、百合花中的丹参醌类、五味子木脂素类、百合花色素类等；(3)水溶性成分：以斯皮诺素为代表的苷类成分及丹参素类成分。由此可见，神安颗粒所含成分较复杂，可采用建立“全指纹图谱系”来控制其质量。神安颗粒的“全指纹图谱系”应有以上各类成分的信息。本研究主要探讨神安颗粒中以斯皮诺素为代表的水溶性成分指纹图谱的制定[4]。

1 材料

1.1 仪器

1100型高效液相色谱(HPLC)仪、数据处理软件(美国Agilent公司)；SK1200H型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

神安颗粒(南方医科大学中医药学院制剂室自制，编号为1～10)；斯皮诺素对照品(中国食品药品检定研究院，批号：110736-200423，供含量测定用)；乙腈为色谱纯，水为重蒸水，其他试剂均为分析纯。

1.3 药材

酸枣仁等药材均购自长沙海川医药有限公司，经湖南中医药大学超微工程技术中心鉴定室温俊达教授鉴定为真品。

2 方法[5]与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱：C_{18}(250 mm×4.6 mm，5 μm)，用十八烷基硅烷键合胶为填充剂；流动相：乙腈-水，梯度洗脱(洗脱程序见表1)；柱温：室温；流速：1.0 ml/min；检测波长：335 nm。理论板数按斯皮诺素峰计算应不低于5 000[6]。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Process for gradient elution

时间，min	乙腈，%	水，%
0	50	50
30	68	32
45	76	24
50	68	32
55	50	50

2.2 供试品溶液的制备

取本品0.25 g，精密称定，置于具塞锥形瓶中，精密加入70%甲醇10 ml，称定质量，超声处理(功率：240 W，频率：45 kHz)1 h，放冷，再次称定质量，用甲醇补足减失的质量，摇匀，用微孔滤膜(0.45 μm)滤过，取续滤液，作为供试品溶液。

2.3 参照物的选择与对照品溶液的制备

神安颗粒中酸枣仁的指标成分为斯皮诺素，因而选用斯皮诺素为水溶性成分的参照物。

精密称取斯皮诺素对照品(80 ℃干燥1 h)适量，加流动相制成每1 ml中含斯皮诺素80 μg的溶液，即得对照品溶液。

2.4 测定法

分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各10 μl，注入液相色谱仪，按上述色谱条件测定，记录55 min的色谱图，即得。以斯皮诺素色谱峰(S峰)的保留时间和峰面积为1，计算其他各峰的相对保留时间和相对峰面积。

经计算机模拟相似度计算软件计算，供试品指纹图谱应与对照品指纹图谱的相似度大于0.80。

2.5 神安颗粒中水溶性成分指纹图谱的建立

2.5.1 共有指纹峰的标定 采用相对保留时间标定共有指纹峰：以图谱中斯皮诺素为参照物，将各色谱峰保留时间与同一图谱中参照物的保留时间作比较，其比值为各色谱峰的相对保留时间。其中6个色谱峰为各样品所共有，故标定它们为共有指纹峰，见图1。10批神安颗粒指纹图谱中水溶性成分各共有峰的相对保留时间见表2。各共有指纹峰的相对保留时间分别为峰1(0.730 8～0.733 8)、峰2(0.866 9～0.870 3)、峰S(1.000 0)、峰4(1.122 0～1.125 9)、峰5(1.501 9～1.508 7)、峰6(1.757 3～1.768 9)。

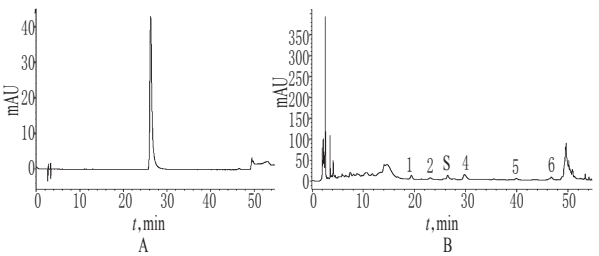

图1 高效液相色谱图

A. 斯皮诺素对照品；B.神安颗粒水溶性成分

Fig 1 HPLC chromatograms

A.spinosin control；B.water-soluble constituent of Shen'an granules

表2 10批神安颗粒中水溶性成分各共有峰的相对保留时间

Tab 2 Relative retention time of common peak of water-soluble constituent in 10 batches of Shen'an granules

样品号	各峰相对保留时间					
	1	2	S	4	5	6
1	0.733 0	0.869 7	1.000 0	1.124 7	1.503 9	1.760 4
2	0.732 3	0.870 3	1.000 0	1.124 0	1.505 8	1.764 3
3	0.732 0	0.870 0	1.000 0	1.122 0	1.501 9	1.757 3
4	0.733 8	0.868 9	1.000 0	1.125 9	1.508 7	1.768 9
5	0.733 4	0.869 5	1.000 0	1.124 4	1.505 5	1.764 1
6	0.730 8	0.868 8	1.000 0	1.122 6	1.504 4	1.763 2
7	0.731 2	0.866 9	1.000 0	1.122 8	1.502 1	1.761 2
8	0.732 6	0.868 1	1.000 0	1.123 1	1.504 6	1.758 2
9	0.731 4	0.869 2	1.000 0	1.122 2	1.505 9	1.762 2
10	0.733 2	0.867 3	1.000 0	1.123 8	1.506 4	1.767 2
$\bar{x}$	0.732 4	0.868 9	1.000 0	1.123 6	1.504 9	1.762 7

2.5.2 共有指纹峰的相对峰面积 以图谱中斯皮诺素为参照物，将各色谱峰峰面积与同一图谱中参照物的峰面积作比较，其比值为各色谱峰的相对峰面积，见表3。据《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求》规定，各共有指纹峰的面积比值必须相对固定：单峰峰面积占总峰面积≥20%，其差值＜20%；单峰峰面积占总峰面积≥10%而＜20%，其差值＜25%；单峰峰

面积占总峰面积＜10%，峰面积比值不作要求，仅需要标定相对保留时间。因神安颗粒中水溶性成分指纹图谱峰数少，故对单峰峰面积占总峰面积＜10%的共有峰也进行了计算。

表3　10批神安颗粒中水溶性成分各共有峰的相对峰面积

Tab 3　Relative peak area of common peak of water-soluble constituent in 10 batches of Shen'an granules

样品号	各峰相对峰面积					
	1	2	S	4	5	6
1	0.853 8	0.352 6	1.000 0	1.976 4	0.434 0	0.932 0
2	0.856 2	0.358 1	1.000 0	2.052 1	0.444 1	0.943 5
3	0.859 8	0.356 9	1.000 0	2.105 2	0.454 5	0.935 4
4	0.860 5	0.359 9	1.000 0	2.026 2	0.455 2	0.950 6
5	0.857 6	0.357 4	1.000 0	2.121 2	0.452 0	0.944 2
6	0.868 2	0.357 4	1.000 0	2.092 1	0.443 8	0.933 6
7	0.857 3	0.361 4	1.000 0	2.045 2	0.452 0	0.934 8
8	0.864 9	0.359 4	1.000 0	2.011 6	0.453 1	0.942 3
9	0.855 6	0.365 3	1.000 0	2.098 2	0.443 0	0.924 8
10	0.858 1	0.353 1	1.000 0	1.992 4	0.454 2	0.941 5
$\bar{x}$	0.859 2	0.358 2	1.000 0	2.052 1	0.448 6	0.938 3

2.5.3　相似度计算　采用国家药典委员会推荐的"中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2004A版）"软件进行相似度计算，可得10批样品的相似度均在0.80以上。10批样品的HPLC指纹图谱见图2。

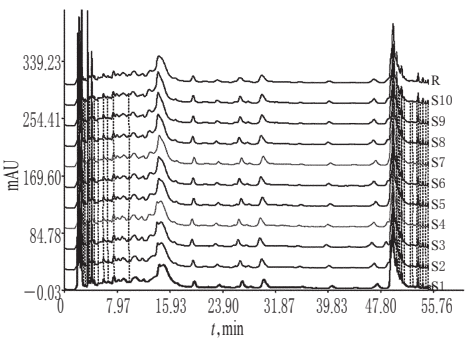

图2　10批样品的HPLC指纹图谱

Fig 2　HPLC chromatograms of 10 batches of samples

2.6　方法学考察

2.6.1　精密度试验　取同一份神安颗粒的供试品溶液适量，连续进样测定5次，比较各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明，各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致，RSD＜2%，符合指纹图谱的检测要求。

2.6.2　稳定性试验　取同一份神安颗粒的供试品溶液适量，分别于0、2、4、6、8 h进样测定，比较各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明，各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致，RSD＜2%，表明供试品溶液在8 h内稳定，符合指纹图谱的检测要求。

2.6.3　重复性试验　取同一批神安颗粒样品适量，共6份，分别按"2.2"项下方法制备供试品溶液，照上述色谱条件进样测定，比较各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明，各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致，RSD＜2%，表明本方法重复性良好，符合指纹图谱的检测要求。

2.7　指纹图谱中指纹峰与药味的相关性考察

为了确定神安颗粒"全指纹图谱系"中水溶性成分指纹图谱中指纹峰的来源，需要考察缺味神安颗粒和药材的指纹图谱，通过与相应缺味阴性样品和药材进行对比分析，考察指纹图谱中指纹峰与药味的相关性。这里主要对酸枣仁药材进行考察。

2.7.1　药材供试品溶液的制备　取酸枣仁药材粗粉1.0 g，精密称定，置于具塞锥形瓶中，精密加入70%甲醇10 ml，称定质量，超声处理（功率：240 W，频率：45 kHz）1 h，放冷，再次称定质量，用甲醇补足减失的质量，摇匀，用微孔滤膜（0.45 μm）滤过，取续滤液，即得。

2.7.2　缺酸枣仁的阴性对照溶液的制备　取缺酸枣仁药材的神安颗粒约1 g，精密称定，按"2.7.1"项下方法制备阴性对照溶液，即得。

2.7.3　色谱图的制定　分别精密吸取"2.3"项下对照品溶液与"2.2""2.7.1"项下供试品溶液各10 μl，注入液相色谱仪，按上述色谱条件测定，记录55 min的色谱图并进行比较，详见图3。

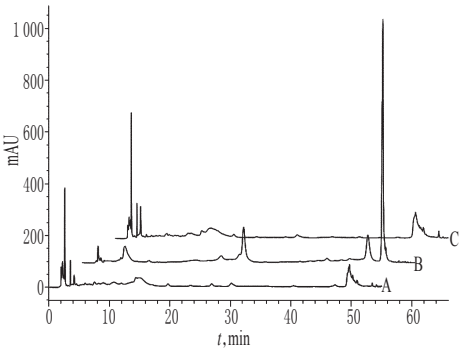

图3　指纹图谱对比图

A.神安颗粒水溶性成分；B.酸枣仁；C.缺酸枣仁阴性对照

Fig 3　Contrast analysis of fingerprint

A.water-soluble constituent of Shenan granules; B. Semen Ziziphi Spinosae; C. negative control without Semen Ziziphi Spinosae

由图3可知，神安颗粒水溶性成分指纹图谱中2、S、6号峰来源于酸枣仁。

3　讨论

3.1　"全指纹图谱系"的研究概况

笔者在2006年[7]对中药指纹图谱进行了一个全面的概括，进而在2007年[8]提出了"全指纹图谱系"这一新的概念，之后对更年颗粒进行了"全指纹图谱系"的初步探讨[4]。

3.2　神安颗粒"全指纹图谱系"的研究

在对神安颗粒指纹图谱的研究中，因神安颗粒成分复杂，一张指纹图谱难以反映大部分成分的信息，为此对其进行了"全指纹图谱系"研究，制定了以天麻素为代表的苷类成分、以五味子醇甲为代表的脂溶性成分和以斯皮诺素为代表的水溶性成分的指纹图谱。本研究主要探讨了以斯皮诺素为代表的水溶性成分的指纹图谱，并与酸枣仁药材和缺酸枣仁阴性样品进行了相关性分析，确定了部分指纹峰的来源。

3.3　区间指纹图谱的构思与研究

3.3.1　指纹图谱研究面临的问题　近年来，众多学者对天然

产物指纹图谱进行了探索性研究[9-12]，但真正将指纹图谱作为产品质量标准的只有中药注射剂。2000年，国家药品监督管理局在《关于加强中药注册管理有关事宜的通知》（国药管注〔2000〕157号）中要求“中药注射剂应固定药材产地，建立药材和制剂的指纹图谱标准”[13]。而其他天然产物的指纹图谱研究多只停留在研究阶段，并未将指纹图谱收入产品质量标准中。

造成天然产物指纹图谱研究“瓶颈”的原因很多，常见的主要是天然产物的成分复杂、影响因素多等；此外，笔者在研究中发现还存在一个重要现象，就是因为天然产物成分的复杂性，指纹图谱的分析结果中往往有大量的杂质峰群存在，而现有的分析手段很难使这些杂质峰群达到很好的分离。

3.3.2　区间指纹图谱的构思与研究　针对指纹图谱分析结果中杂质峰群的存在，笔者在研究中提出了进行“区间指纹图谱”的制定。所谓“区间指纹图谱”，即是建立某一区间的指纹图谱，整个指纹图谱可分为几个区间，也即是分为几个时间段，在一定区间内可能杂质峰群比较集中，这样就不用对这一区间的杂质峰群进行指纹峰的定位，而对一定区间内色谱峰分离均较好的组峰尤其是参比峰所在区间进行指纹峰的定位，从而制定出这一区间的指纹图谱。

3.3.3　区间指纹图谱的制定程序　很明显，“区间指纹图谱”的制定过程比一般指纹图谱的制定要复杂得多，一般指纹图谱的制定只是其中一个部分。具体如下：①天然产物分析分离条件的确定：制定指纹图谱的原则是要尽量使天然产物中主要成分峰基本分离，从而建立天然产物指纹峰的控制标准。首先要选择多种分析处理方法对样品进行分析，采用多种仪器分析方法进行分析比较，尽量使主要成分峰分离，而这里所针对的是存在杂质峰群的情况，因而分析处理的目的一方面是使主要成分峰达到分离，同时使杂质峰群一要尽量少，二要尽量集中于某一区间。②“区间指纹图谱”区间的确定：对于优化分析分离条件后所获得的指纹图谱，一般会在某些区间存在较多的杂质峰群，而主要成分峰主要集中于某一区间，那么这一区间就是要选择的区间，杂质峰群所在的其他区间将不再考虑。③“区间指纹图谱”的制定：确定了“区间指纹图谱”区间后，接下来就是对这一区间的指纹峰进行标注，从而制定出指纹图谱，制定的过程同样参照国家药品监督管理局《关于印发〈中药注射剂指纹图谱研究的技术要求（暂行）〉的通知》[5]及有关指纹图谱的一般建立程序进行。

正是基于目前指纹图谱研究中出现的问题，笔者提出了“区间指纹图谱”这一概念，很好地解决了指纹图谱研究中出现的杂质峰群问题，从而为天然产物指纹图谱的建立打开了新的思路和方法，也为指纹图谱建立的可行性提供了更多的试验依据。

3.3.4　神安颗粒“区间指纹图谱”的研究　在对神安颗粒指纹图谱的研究中，因神安颗粒成分复杂，笔者进行了以斯皮诺素为代表的水溶性成分指纹图谱的建立。在试验过程中优化了流动相等色谱条件，并进行了供试品溶液制备方法的选择优化。结果发现，在0～18 min和48～55 min区间内有大量的杂质峰群，而在18～48 min区间内主要指纹峰分离较好，因而选择这一区间制定神安颗粒水溶性成分的指纹图谱。

参考文献

[1] Natalie Lazarow YCH. Use of fingerprinting and marker compounds for identification and standardization of botanical drugs: strategies for applying pharmaceutical HPLC analysis to herbal products[J]. *Drug Inform J*, 1998, 32(2): 497.

[2] Houghton PJ. Establishing identification criteria for botanicals[J]. *Drug Inform J*, 1998, 32(2): 461.

[3] 任德权.中药指纹图谱质控技术的意义与作用[J].中药新药与临床药理，2001，12(3)：135.

[4] 易延逵，陈志良.更年颗粒“全指纹图谱系”的研究[J].中成药，2008，30(12)：1 794.

[5] 国家药品监督管理局.关于印发《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求（暂行）》的通知[J].中成药，2000，22(10)：671.

[6] 解军波，刘艳，张彦青，等.HPLC法测定酸枣仁黄酮片中斯皮诺素[J].中草药，2010，41(10)：1 653.

[7] 易延逵，陈志良，邓虹珠.中药指纹图谱的研究评析[J].中成药，2006，28(8)：1 192.

[8] 易延逵，陈志良，杨永华.中药“全指纹图谱系”的研究分析[J].中草药，2007，38 (7)：1 105.

[9] 李文博，韩建平，高钧，等.养血清脑颗粒的高效液相色谱指纹图谱研究[J].分析化学，2011，39(3)：387.

[10] 徐玲玲，徐熠，年华.痛风颗粒HPLC指纹图谱研究[J].中国药房，2011，22(31)：2 938.

[11] 孙国祥，王玲娇.基于双波长HPLC指纹谱的一级系统指纹定量法鉴定木香顺气丸质量[J].化学学报，2010，68(18)：1 903.

[12] 赵晓莉，张新庄，狄留庆，等.小儿金宁口服液的HPLC指纹图谱研究[J].中国药房，2010，21(43)：4 086.

[13] 国家药品监督管理局.关于加强中药注册管理有关事宜的通知[S].国药管注[2000]157号.2000-04-14.

（收稿日期：2012-09-09　修回日期：2012-10-26）

《中国药房》杂志——RCCSE中国核心学术期刊，欢迎投稿、订阅