

芪苈强心胶囊 UPLC 指纹图谱研究

姜新刚¹, 贾继明^{2*}, 李叶双², 乔莉³

(1. 河北以岭医药研究院有限公司, 石家庄 050035; 2. 北京以岭药业有限公司, 石家庄 050035;
3. 河北省中西医结合医药研究院, 石家庄 050035)

[摘要] 目的: 采用超高效液相色谱(UPLC)法建立芪苈强心胶囊的指纹图谱。方法: 采用 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 流动相乙腈-0.15% 磷酸水, 梯度洗脱, 流速 0.5 mL·min⁻¹, 柱温 40 °C, 检测波长 203 nm。结果: 建立了芪苈强心胶囊的 UPLC 指纹图谱, 共标定了 36 个共有峰, 指认了其中 8 个共有峰, 10 批芪苈强心胶囊指纹图谱的相似度均在 0.979 ~ 1.000。结论: 该法具有良好的精密度、稳定性和重复性, 为提高芪苈强心胶囊质量控制提供了新方法。

[关键词] 超高效液相色谱; 指纹图谱; 芪苈强心胶囊

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)08-0080-04

[doi] 10.11653/syjf2013080080

UPLC Fingerprints of Qili Qiangxin Capsule

JIANG Xin-gang¹, JIA Ji-ming^{2*}, LI Ye-shuang², QIAO Li³

(1. Hebei Yiling Pharmaceutical Research Institute Co. Ltd., Shijiazhuang 050035, China;
2. Beijing Yiling Pharmaceutical Co. Ltd., Shijiazhuang 050035, China;
3. Combination of Traditional Chinese Medicine with Western Medicine Academy
of Hebei, Shijiazhuang 050035, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a ultra performance liquid chromatography (UP-LC) method for fingerprints of Qili Qiangxin Capsule. **Method:** The Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) column was used. Acetonitrile and water containing 0.15% phosphoric acid were used as mobile phase of UPLC with gradient elution. The detection wavelength was set at 203 nm. Flow rate was set at 0.5 mL·min⁻¹ and column temperature was maintained at 40 °C. **Result:** UPLC fingerprint was established with 36 common peaks, 8 of 36 common peaks were identified, and the similar degrees of the UPLC fingerprints of Qili Qiangxin capsule from 10 batches were between 0.979 and 1.000. **Conclusion:** The method of fingerprints has acceptable precision, reproducibility and stability, which can be used as a new means for the quality control of Qili Qiangxin capsule.

[Key words] UPLC; fingerprints; Qili Qiangxin capsule.

芪苈强心胶囊是在络病理论指导下,由黄芪、人

参、附子、丹参、葶苈子、泽泻、玉竹、桂枝、红花、香加皮、陈皮共 11 味药组成,具有益气温阳、活血通络、利水消肿的功效,用于冠心病、高血压病所致轻、中度充血性心力衰竭等疾病,临床及药理研究表明芪苈强心胶囊能明显改善心功能、改善血流动力学、抑制心室重构、清除自由基、提高心肌细胞抗氧化能力,对慢性心力衰竭具有明显的疗效和良好的安全性^[1-3]。目前对于芪苈强心胶囊的研究主要集中在临床应用方面,其质量控制方面的研究较少^[4],中成药成份复杂,其作用往往是多种成份协同作用的

[收稿日期] 20120912(015)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2012CB518606);国家十二五“重大新药创制”科技重大专项(2011ZX09401-020);国家自然科学基金青年基金项目(81102768)

[第一作者] 姜新刚, 硕士, 工程师, 从事中药创新药物研究与开发, Tel: 13832182543, E-mail: jxglyh@126.com

[通讯作者] * 贾继明, Tel: 0311-85901304, E-mail: jjm_0451@163.com

结果,中药指纹图谱技术作为一种从整体上控制质量的手段,以被国内外广泛认可^[5-6]。UPLC 与 HPLC 相比具有高分离度、高速度、高灵敏度的特性^[7],近几年广泛应用于中药指纹图谱的研究^[8-10],本文首次采用超高效液相色谱法建立了芪苈强心胶囊的指纹图谱。

1 材料

ACQUITY UPLC H CLASS(美国 Waters 公司,包括四元高压梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、Empower3 色谱工作站),KQ5200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),分析天平(AG135 型,Mettler Toledo),LXJ-ⅡB 型低速大容量多管离心机(上海安亭科学仪器厂)。

磷酸(色谱级,批号 20120104,天津市科密欧化学试剂有限公司),甲醇(分析纯,批号 20120110,天津市科密欧化学试剂有限公司),乙腈(色谱级,Fisher),实验用水为超纯水。

芪苈强心胶囊由石家庄以岭药业股份有限公司提供,共 10 批(批号 S1:10010 2, S2:111201, S3:110803, S4:101002, S5:110303, S6:100106, S7:111103, S8:110301 S 9:110901, S10:111203);丹参素钠(批号 110855-200809)、丹酚酸 B(批号 111562-200605)、人参皂苷 Rb₁(批号 110704-201122)、人参皂苷 Rd(批号 111818-201001)、人参皂苷 Rb₂(批号 111715-200802)、橙皮苷(批号 110721-201204)、芒柄花素(批号 111703-201204)均购于中国药品生物制品鉴定所,人参皂苷 Rc(批号 11021-14-0)购于上海源叶生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),柱温 40 ℃,流速 0.5 mL·min⁻¹,检测波长 203 nm,进样 1 μL,流动相 B 为乙腈, D 为 0.15% 磷酸,梯度洗脱(0 ~ 1 min, 1% ~ 1% B; 1 ~ 2.5 min, 1% ~ 5% B; 2.5 ~ 10 min, 5% ~ 10% B; 10 ~ 13 min, 10% ~ 12% B; 13 ~ 29 min, 12% ~ 21% B; 29 ~ 42 min, 21% ~ 40% B; 42 ~ 55 min, 40% ~ 80% B; 55 ~ 56 min, 80% ~ 80% B)。

2.2 对照品溶液制备 分别称取各标准品适量,用 80% 甲醇配制成含丹参素钠 0.12 g·L⁻¹、丹酚酸 B 0.09 g·L⁻¹、橙皮苷 0.09 g·L⁻¹、芒柄花素 0.23 g·L⁻¹、人参皂苷 Rb₁ 0.17 g·L⁻¹、人参皂苷 Rc 0.1 g·L⁻¹、人参皂苷 Rd 0.15 g·L⁻¹、人参皂苷 Rb₂ 0.16

g·L⁻¹的溶液,其中人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rc、人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Rd 为混标溶液,其余对照品溶液均为单独配制。

2.3 供试品溶液制备 取芪苈强心胶囊 1.0 g,精密称定,加入 80% 甲醇 25 mL,称重,超声 30 min,放置室温,称重,用 80% 甲醇补足质量,混匀后离心 4 500 r·min⁻¹, 15 min,移取上清液 13 mL 蒸干,用 10 mL 去离子水混悬,上样,大孔吸附树脂 XAD7HP 25 mL,先用 200 mL 去离子水洗脱,再用 200 mL 95% 乙醇洗脱,收集 95% 乙醇洗脱液蒸干,干膏用 80% 甲醇溶解定容至 25 mL,0.22 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,备用。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 按 2.3 要求取 110803 批样品制备供试品溶液,在上述色谱条件下重复进样 5 次,直观观察各指纹图谱的全貌无明显变化,重叠良好,共有峰相对保留时间的 RSD < 2.8%,相对峰面积的 RSD < 3.0%,表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 按 2.3 要求取 110803 批样品制备供试品溶液,在上述色谱条件下,分别在 0, 4, 12, 20, 24, 30, 36, 48 h 进样分析,直观观察各指纹图谱的全貌无明显变化,重叠良好,共有峰相对保留时间的 RSD < 2.7%,相对峰面积的 RSD < 2.9%,表明样品在 48 h 内稳定。

2.4.3 重复性试验 取 110803 批样品 5 份,按 2.3 要求分别制备供试品溶液,在上述色谱条件下进样分析,直观观察各指纹图谱的全貌无明显变化,重叠良好,共有峰相对保留时间的 RSD < 1.6%,相对峰面积的 RSD < 2.7%,表明方法重复性良好。

2.5 指纹图谱的建立及相似度分析

2.5.1 指纹图谱的建立 取 10 批芪苈强心胶囊样品,按 2.3 要求制备供试品溶液,在上述色谱条件下进样分析,得到 10 批芪苈强心胶囊的指纹图谱(图 1),并采用国家药典委员会开发的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”软件对 10 批样品

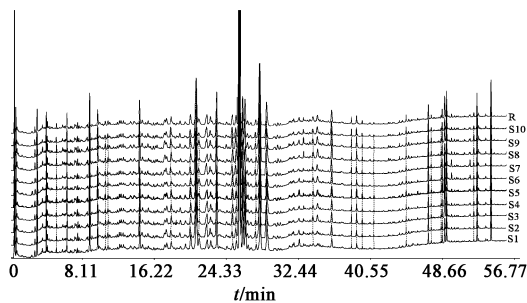


图 1 10 批芪苈强心胶囊 UPLC 指纹图谱

的指纹图谱进行分析,以 S5 为参照指纹图谱(图 2),采用平均数相关系数法对各指纹图谱色谱峰进行了多点校正和自动匹配,其中共有色谱峰 36 个,用标准品指认了其中 8 个共有峰,分别为丹参素(1 号峰)、橙皮苷(12 号峰)、丹酚酸 B(17 号峰)、芒柄花素(23 号峰),人参皂苷 Rb₁(25 号峰)、人参皂苷 Rc(26 号峰)、人参皂苷 Rb₂(27 号峰)、人参皂苷 Rd(28 号峰),以出峰稳定,峰面积较大的 17 号色谱峰-丹酚酸 B 为参照峰。

2.5.2 指纹图谱相似度分析 采用国家药典委员会开发的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”软件对 10 批芪苈强心胶囊的指纹图谱进行分析,以 S5 为参照指纹图谱(图 2),采用平均数

相关系数法对各指纹图谱色谱峰进行了多点校正和自动匹配,生成芪苈强心胶囊共有模式的对照指纹图谱(R),然后进行了相似度计算,10 批芪苈强心胶囊与对照指纹图谱的相似度见表 1。

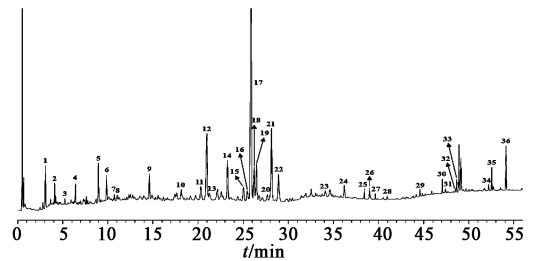


图 2 芪苈强心胶囊 UPLC 参照指纹图谱 S5

表 1 10 批芪苈强心胶囊指纹图谱相似度

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1.000	0.998	0.995	0.996	0.995	0.990	0.995	0.979	0.985	0.987	0.996
S2	0.998	1.000	0.997	0.999	0.996	0.992	0.998	0.983	0.986	0.991	0.997
S3	0.995	0.997	1.000	0.999	1.000	0.997	0.999	0.991	0.994	0.997	1.000
S4	0.996	0.999	0.999	1.000	0.998	0.995	0.999	0.989	0.991	0.995	0.999
S5	0.995	0.996	1.000	0.998	1.000	0.998	0.997	0.992	0.995	0.997	0.999
S6	0.990	0.992	0.997	0.995	0.998	1.000	0.997	0.995	0.997	0.996	0.998
S7	0.995	0.998	0.999	0.999	0.997	0.997	1.000	0.990	0.992	0.996	0.999
S8	0.979	0.983	0.991	0.989	0.992	0.995	0.990	1.000	0.999	0.996	0.993
S9	0.985	0.986	0.994	0.991	0.995	0.997	0.992	0.999	1.000	0.997	0.995
S10	0.987	0.991	0.997	0.995	0.997	0.996	0.996	0.996	0.997	1.000	0.997
R	0.996	0.997	1.000	0.999	0.999	0.998	0.999	0.993	0.995	0.997	1.000

3 讨论

考察了乙腈-水、甲醇-水、乙腈-0.15% 磷酸、甲醇-0.15% 磷酸、乙腈-0.1% 甲酸、甲醇-0.1% 甲酸、乙腈-0.2% 磷酸 7 个流动相系统,结果表明乙腈-0.15% 磷酸流动相系统的色谱图中出峰较多,各峰分离度较好,基线平稳,且条件温和有利于指纹图谱的分析,因此最终采用乙腈-0.15% 磷酸流动相系统。

分别考察了提取溶剂 60% 甲醇、80% 甲醇、纯甲醇,结果表明采用 80% 甲醇提取的样品色谱图中出峰较多,峰面积较大,故提取溶剂确定为 80% 甲醇;考察了超声、回流两种提取方式,结果表明二者提取效率相当,但超声提取操作简便,故选择超声提取;考察了 1.0 g 芪苈强心胶囊分别用 25, 50, 75 mL 80% 甲醇提取,结果表明 50 mL 与 75 mL 提取的色谱图基本一致,所以确定提取溶剂用量为 1.0 g 芪苈强心胶囊用 50 mL 80% 甲醇超声;考察了超声 10, 30, 50 min,结果表明超声 30, 50 min 提取效率

相当,因此确定超声时间为 30 min;考察了 AB-8, XAD7HP 大孔吸附树脂对芪苈强心胶囊的富集效果,结果表明,采用 XAD7HP 大孔吸附树脂吸附,水洗脱除杂,95% 乙醇洗脱部位分析,能有效去除大量有色物质干扰,同时能最大限度的保留芪苈强心胶囊中化学成份。

考察了 203, 254, 280, 330 nm 的色谱图,结果表明 203 nm 的色谱图中色谱峰较多,故确定检测波长为 203 nm;考察不同色谱柱温度:40, 50 ℃,不同分析流速:0.3, 0.4, 0.5 mL·min⁻¹,结果表明色谱柱温度为 40 ℃,流速为 0.5 mL·min⁻¹ 时色谱图中出峰较多,各峰分离度及峰形较好,分析时间适中。

建立了芪苈强心胶囊的 UPLC 指纹图谱,10 批指纹图谱相似度均在 0.979~1.000,表明样品整体质量有较好的稳定性,为提高芪苈强心胶囊的质量控制提供 1 种新方法。由于本实验只采用了二极管阵列检测器,一些无紫外吸收的成分无法检测,

不同纯化方法对金银花提取物中咖啡酰奎宁酸类成分含量的影响

邱新建^{1,2,3}, 赵海鹏^{1,2,3}, 刘向东^{1,2,3}, 苏瑞强^{1,2,3*}, 李守信^{1,2,3}, 赵志全^{1,2,3}

(1. 鲁南制药集团股份有限公司, 山东 临沂 276006; 2. 中药制药共性技术国家重点实验室, 山东 临沂 276006; 3. 中药制药新技术山东省企业重点实验室, 山东 临沂 276006)

[摘要] 目的: 考察不同纯化方法对金银花提取物中咖啡酰奎宁酸类成分的影响。方法: 应用醇沉法、石硫法、石硫醇法、大孔树脂吸附法及萃取法等对金银花进行提取纯化, 并采用高效液相色谱法测定其中 6 种咖啡酰奎宁酸类成分的含量。结果: 萃取法所得金银花提取物中咖啡酰奎宁酸类成分的含量最高, 总咖啡酰奎宁酸含量达 83.91%。结论: 萃取法是制备金银花提取物的理想方法。

[关键词] 金银花; 咖啡酰奎宁酸; 绿原酸; 萃取法; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)08-0083-04

[doi] 10.11653/syfy2013080083

Effects of Different Purification Methods on Content of Caffeoyl Quinic Acids from Flos Lonicerae Extractive

QIU Xin-jian^{1,2,3}, ZHAO Hai-peng^{1,2,3}, LIU Xiang-dong^{1,2,3},
SU Rui-qiang^{1,2,3*}, LI Shou-xin^{1,2,3}, ZHAO Zhi-quan^{1,2,3}

(1. Lunan Pharmaceutical Group Co. Ltd., Linyi 276006, China; 2. State Key Laboratory of Generic Manufacture Technology of Chinese Traditional Medicine, Linyi 276006, China; 3. Shangdong Province Key Laboratory of Pharmaceutical New Technology of Chinese Traditional Medicine, Linyi 276006, China)

[收稿日期] 20120904(013)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2012CB724001)

[第一作者] 邱新建, 硕士, 工程师, 从事中药新药研究与开发, Tel: 0539-8336639, E-mail: qixunjian126@126.com

[通讯作者] * 苏瑞强, 硕士, 研究员, 从事新药研究与开发, Tel: 0539-8336639, E-mail: ruiqianguo@hotmail.com

在今后的实验中应联合蒸发光散射检测器或质谱进行更加全面的分析。

[参考文献]

[1] 吴以岭, 谷春花, 徐贵成, 等. 芪苈强心胶囊治疗慢性心力衰竭随机双盲、多中心临床研究[J]. 疑难病杂志, 2007, 6(5):263.

[2] 魏聪, 贾振华, 吴以岭, 等. 芪苈强心胶囊对兔实验性慢性心力衰竭心室重构的保护作用[J]. 疑难病杂志, 2007, 6(3):144.

[3] 唐思文, 徐登峰, 王玲玲, 等. 芪苈强心胶囊多目标优化组合物对实验性心衰大鼠心功能的保护作用[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(5):532.

[4] 李向军, 徐红辉, 张永峰, 等. 芪苈强心胶囊质量标准研究[J]. 中国药业, 2011, 20(24):44.

[5] 聂磊, 罗国安, 曹进, 等. 中药二维信息指纹图谱模式识别[J]. 药学学报, 2004, 39(2):1362.

[6] 刘智, 王爱民, 许祖超, 等. 全天麻胶囊特征指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15):86.

[7] 周新, 陈会明, 白桦, 等. HPLC 与 UPLC 色谱条件转换方法研究[J]. 分析试验室, 2008, 27(4):56.

[8] 张琦, 王振中, 萧伟, 等. 白芍药材 UPLC 特征指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6):712.

[9] 马培, 许利嘉, 刘延泽, 等. 虎杖药材 UPLC 特征指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2):72.

[10] 张琦, 王振中, 萧伟, 等. 茯苓 UPLC 特征指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(7):966.

[责任编辑 顾雪竹]