

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.21.005

柴胡安心胶囊平行四波长高效液相色谱指纹图谱研究*

于静¹, 焦丽亚¹, 张振杰¹, 王玲娇^{1△}, 杨继章¹, 孙国祥², 周春华¹

(1. 河北医科大学第一医院, 河北 石家庄 050031; 2. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 建立柴胡安心胶囊(CHANCs)的四波长高效液相色谱(HPLC)指纹图谱。方法 采用 HPLC 法, 分别于 254, 275, 290, 330 nm 波长下对样品进行检测, 建立 CHANCs 平行四波长高效液相色谱指纹图谱, 以均值法整合各样品的色谱信息, 结合系统指纹定量法区分 8 批样品的质量差异。结果 以葛根素为参照指纹峰, 分别标定了 63, 65, 53, 27 个共有峰。8 批 CHANCs 中 1 批(S₇)质量好, 2 批(S₁, S₃)质量很好, 5 批(S₂, S₄, S₅, S₆, S₈)质量极好。结论 平行多波长指纹图谱联合系统指纹定量法鉴定 CHANCs 的质量稳定、可靠。

关键词:柴胡安心胶囊; 系统指纹定量法; 平行多波长指纹图谱; 宏定性相似度; 宏定量相似度

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)21-0017-04

Study on the Parallel Four Wavelength HPLC Fingerprints of Chaihu Anxin Capsules

YU Jing¹, JIAO Liya¹, ZHANG Zhenjie¹, WANG Lingjiao¹, YANG Jizhang¹, SUN Guoxiang², ZHOU Chunhua¹

(1. The First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei, China 050031; 2. College of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang, Liaoning, China 110016)

Abstract: Objective To establish the parallel four wavelength HPLC fingerprints of Chaihu Anxin Capsules. **Methods** HPLC method was used to detect the samples at the wavelength of 254, 275, 290, 330 nm, and the parallel four wavelength HPLC fingerprints of Chaihu Anxin Capsules was established. The mean value method was used to integrate the chromatographic information of each sample, and the systematically quantified fingerprint method(SQFM) was used to distinguish the quality differences of 8 batches of samples. **Results** With puerarin as the reference fingerprint peak, 63, 65, 53 and 27 common fingerprint peaks were identified respectively. In 8 batches of Chaihu Anxin Capsules, the quality grade was 1 batch(S₇) with good quality, 2 batches(S₁, S₃) with better quality, 5 batches(S₂, S₄, S₅, S₆, S₈) with the best quality. **Conclusion** The quality of Chaihu Anxin Capsules identified by parallel multi-wavelength fingerprint combined with SFQM is stable and reliable.

Key words: Chaihu Anxin Capsules; systematically quantified fingerprint method; parallel multi-wavelength fingerprint; macro qualitative similarity; macro quantitative similarity

柴胡安心胶囊为河北医科大学第一医院的医院制剂(批准文号:冀药制字 Z20060013),由柴胡、葛根、白芍、桂枝、夏枯草等 14 味药材组方,具有疏肝理气、镇静安神、调和营卫之功效,主治焦虑抑郁和心脏神经官能症^[1]。有报道采用高效液相色谱(HPLC)法测定处方中单味药材代表成分和建立单味药材的指纹图谱^[2-4],柴胡安心胶囊(CHANCs)的质量标准目前只有显微鉴别和薄层鉴别^[5],尚未见关于其指纹图谱研究方面的报道。单波长指纹图谱鉴定的中药质量具有随机性和偶然性,多波长指纹图谱可充分反映复方制剂在不同特征波长下的多维信息,更加准确地区分具有多个化学成分的复方制剂的质量等级^[6-8]。本研究建立了 CHANCs 的平行四波长指纹图谱,采用系统指纹定量法鉴定其整体质量,为其质量标准的建立提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

1200 Series 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 科技有限公司);Sartorius BS 110S 型电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);KQ-400KDE 型高功率数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);微孔滤膜(0.45 μm,上海兴亚净化材料厂)。

1.2 试剂

没食子酸对照品(批号为 17062510),大豆苷对照品(批号为 17060913),肉桂酸对照品(批号为 20171102),葛根素对照品(批号为 17072302),绿原酸对照品(批号为 17081021),规格均为每瓶 20 mg,均购于上海士锋生物科技有限公司;芦丁对照品(批号为 20130809),槲皮素对照品(批号为 20121205),规格均为每瓶 20 mg,均购于美仑生物科技有限公司;柴胡安心胶

*基金项目:河北医科大学第一医院“星火”青年科研项目[XH201812]。

第一作者:于静,女,硕士研究生,副主任药师,研究方向为中药质量控制,(电子信箱)38565914@qq.com。

△通信作者:王玲娇,女,硕士研究生,主管药师,研究方向为中药质量控制,(电话)0311-85917354(电子信箱)327239256@qq.com。

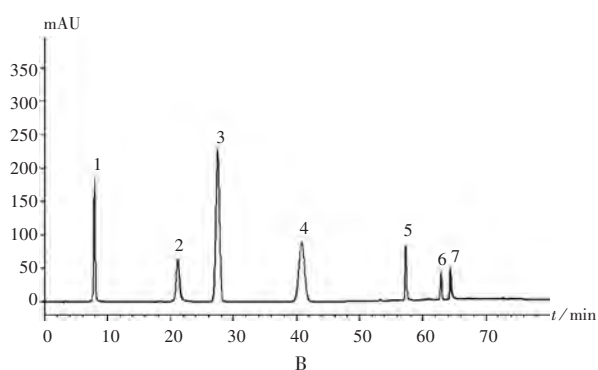
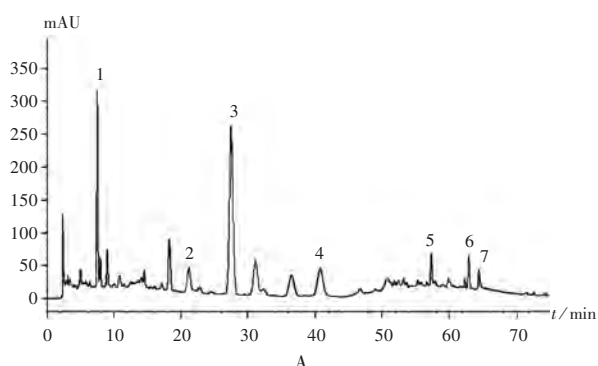
囊(规格为每粒0.5 g,批号分别为150601,150518,150419,150407,080115,080302,080403,20180725,编号分别为S₁~S₈,河北医科大学第一医院)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Diamondsil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:0.5%乙酸水(A)-甲醇(B),梯度洗脱,0~40 min时5%~25% B,40~60 min时25%~60% B,60~80 min时100% B;检测波长:254,275,290,330 nm;流速:1 mL/min;进样量:10 μL;柱温:30℃。

样品(批号为S₂)制备供试品溶液并取混合对照品溶液,按拟订色谱条件分别进样,记录275 nm波长下的色谱图,详见图1。葛根素峰与相邻峰分离较好,峰面积较大,理论板数不低于300 000,故选其作为参照峰。2 h空白溶液和供试品溶液色谱图表明,检测系统无其他峰干扰,组分在80 min内出峰完全。



1. 没食子酸 2. 绿原酸 3. 葛根素 4. 大豆苷
5. 芦丁 6. 肉桂酸 7. 槲皮素
A. 供试品溶液 B. 对照品溶液

图1 高效液相色谱图

2.2 溶液制备

称取葛根素对照品30 mg,精密称定,置10 mL容量瓶,用甲醇定容至刻度,摇匀,得对照品溶液。分别称取大豆苷、没食子酸、绿原酸、肉桂酸、芦丁、槲皮素对照品(17,7,21,12,21,18 mg),用甲醇定容于25 mL容量瓶中,作为对照品贮备液。

称取同一批样品(批号为S₂)内容物0.5 g,精密称定,加入约50 mL 50%乙醇回流1.5 h,过滤,残渣中加入50 mL 50%乙醇继续回流1.5 h,重复2次,合并3次滤液,减压浓缩至约15 mL,加50%乙醇定容至25 mL,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.3 指纹图谱检测波长确定

处方中的柴胡药效成分柴胡皂苷类吸收波长约在230 nm,白芍的芍药苷最大吸收波长约为254 nm,葛根活性成分葛根素的最大吸收波长为280 nm,夏枯草有效成分迷迭香酸的最大吸收波长约为320 nm^[9-12]。为使该复方制剂中的主要化学成分均能显现最大紫外吸光度,尽可能地反映组方中代表成分的综合特点,本研究中利用DAD检测器扫描190~400 nm波长信号,依据具有药效作用的药材化学成分的紫外吸收光谱特征,最终选取了4个特征波长(254,275,290,330 nm)。

2.4 方法学考察

精密度试验:精密吸取供试品溶液[取样品(批号为S₂)依法制备]10 μL,连续进样6次,分别记录4个检测波长下的色谱图。结果以葛根素峰的保留时间和峰面积为参照,四波长各指纹峰相对保留时间的RSD均小于1.00%,相对峰面积的RSD均小于3.03% (n=6),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:精密吸取供试品溶液[取样品(批号为S₂)依法制备]分别于0,4,8,12,24 h时进样测定,记录4个检测波长下的色谱图。结果以葛根素峰的保留时间和峰面积为参照,四波长各指纹峰相对保留时间的RSD均小于1.00%,相对峰面积的RSD均小于3.00% (n=6),表明供试品溶液在24 h内基本稳定。

重复性试验:取样品(批号为S₂),平行制备供试品溶液6份,精密吸取10 μL进样测定,分别记录4个检测波长下的色谱图。结果以葛根素峰的保留时间和峰面积为参照,四波长各指纹峰相对保留时间的RSD均小于1.00%,相对峰面积的RSD均小于2.94% (n=6),表明方法重复性良好。

2.5 CHANCs四波长指纹图谱分析

平行四波长指纹图谱的建立:将8个批次样品的供试品溶液分别进样测定,记录色谱图。以葛根素峰为参照物峰,按峰出现率100.00%计,确定各检测波长下的共有指纹峰,分别是63个(254 nm)、65个(275 nm)、53个(290 nm)、27个(330 nm)。将8批样品指纹图谱信号导入“中药色谱指纹图谱超信息特征数字化评价系统4.0”软件,按平均值法生成对照指纹图谱(RFP),对照指纹图谱和各个批次样品HPLC指纹图谱见图2。

系统定量法综合评价CHANCs平行四波长指纹图

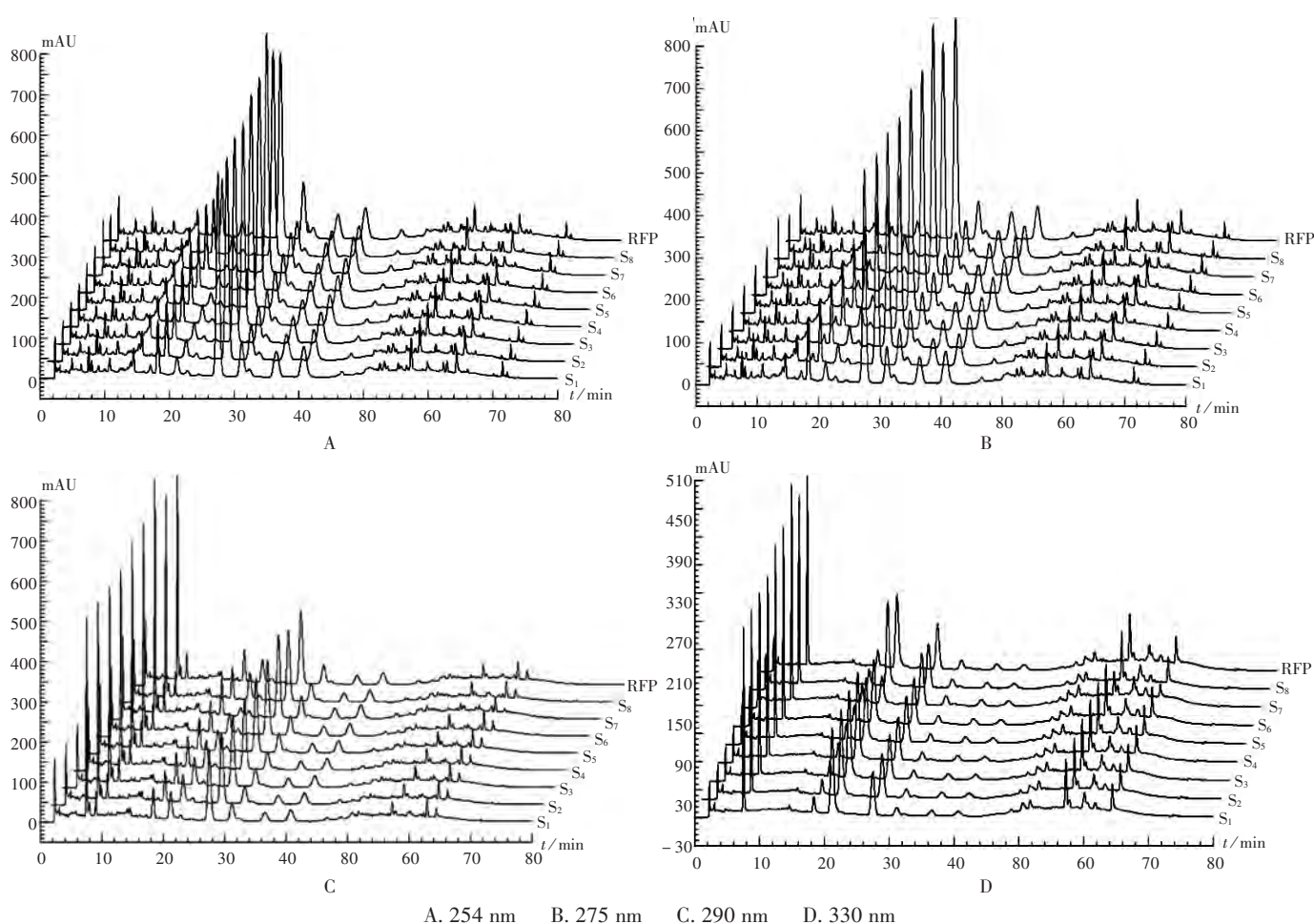


图2 四波长下8批柴胡安心胶囊的高效液相色谱指纹图谱和其对对照指纹图谱

谱质量:以生成的各个波长的对照指纹图谱为标准,依次计算8批样品的宏定性相似度(S_m)、宏定量相似度(P_m)、指纹均化性变异系数(α),详见表1。用均值法整合平行四波长 HPLC 指纹图谱,计算 S_m , P_m , α ,用6级系统指纹定量法评价的质量结果见表2。结果显示,8个批次样品的 S_m 值均大于0.95,但 α 值均小于0.15,在一定程度上表明不同批次样品的平行指纹图谱在化学成分数量和分布比例上有一定差异; P_m 值除 S_1, S_3, S_7 外,其余批次样品均大于95%,表明不同批次样品的宏

表1 系统指纹定量法评价柴胡安心胶囊质量结果

项目	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5	S_6	S_7	S_8
S_m	0.994	0.995	0.982	0.994	0.992	0.992	0.966	0.995
P_m	96.1	99.1	94.6	98.5	100.0	100.0	107.8	99.4
α	0.093	0.048	0.065	0.032	0.049	0.049	0.105	0.032
质量等级	Ⅱ	I	Ⅱ	I	I	I	Ⅲ	I
质量评价	很好	极好	很好	极好	极好	极好	好	极好

定量相似度无显著差异。最终评价的质量等级为 S_7 为Ⅲ级, S_1 和 S_3 为Ⅱ级,其余批次均为Ⅰ级。通常规定质

表2 柴胡安心胶囊平行指纹图谱与各波长指纹图谱结果

批次	254 nm				275 nm				290 nm				330 nm				平行谱			
	S_m	P_m	α	质量等级	S_m	P_m	α	质量等级	S_m	P_m	α	质量等级	S_m	P_m	α	质量等级	S_m	P_m	α	质量等级
S_1	0.996	88.7	0.129	Ⅲ	0.989	89.0	0.113	Ⅲ	0.994	104.0	0.076	Ⅱ	0.995	102.7	0.053	Ⅱ	0.994	96.1	0.093	Ⅱ
S_2	0.999	99.6	0.037	I	0.988	102.0	0.039	I	0.996	89.3	0.098	Ⅲ	0.995	105.5	0.019	Ⅱ	0.995	99.1	0.048	I
S_3	1.000	97.8	0.017	I	0.938	85.8	0.114	Ⅲ	0.996	89.0	0.104	Ⅲ	0.995	105.7	0.024	Ⅱ	0.982	94.6	0.065	Ⅱ
S_4	0.999	93.7	0.046	Ⅱ	0.989	95.9	0.044	I	0.995	99.2	0.002	I	0.994	105.0	0.035	Ⅱ	0.994	98.5	0.032	I
S_5	1.000	102.1	0.014	I	0.974	108.9	0.087	Ⅱ	0.997	93.6	0.086	Ⅱ	0.997	95.5	0.009	I	0.992	100.0	0.049	I
S_6	1.000	102.1	0.014	I	0.974	108.9	0.087	Ⅱ	0.997	93.6	0.086	Ⅱ	0.997	95.5	0.009	I	0.992	100.0	0.049	I
S_7	0.998	116.5	0.026	Ⅳ	0.986	101.5	0.162	Ⅳ	0.980	132.9	0.187	Ⅵ	0.899	80.3	0.046	Ⅳ	0.966	107.8	0.105	Ⅲ
S_8	0.999	99.0	0.046	I	0.989	99.6	0.041	I	0.993	95.3	0.008	I	0.997	103.7	0.034	I	0.995	99.4	0.032	I

量等级为V级及以上时说明样品质量合格,因此本研究中测定的8批CHANCs样品均为合格品。

四波长下CHANCs的质量评价结果比较:将不同批次的样品各个波长下分别建立对照指纹图谱,采用系统指纹定量法评价其质量。结果见表3。可见,各样品 S_m 和 α 相对偏差差异较小,表明指纹信号相似度、均化性与对照指纹图谱差异较小。单波长的质量级别的划分主要由 P_m 决定。不同评价方法的 P_m 值比较结果见图3。4个特征波长和平行谱的质量等级比较结果见图4,可见,同一样品在不同波长下评价结果提示了个别批次样品的质量差异很大,均值法整合的平行谱的质量等级和254 nm和330 nm波长下的质量等级结果相近,却又有所不同,平行谱综合了单个波长评价CHANCs质量的不足,使评价结果更接近真实结果。

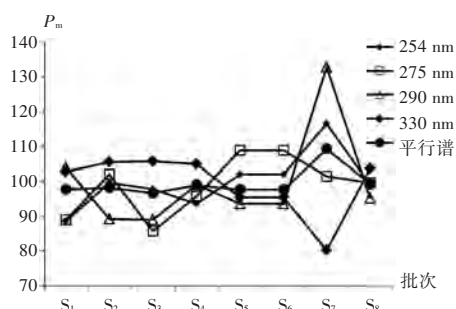


图3 不同评价方法的 P_m 值比较

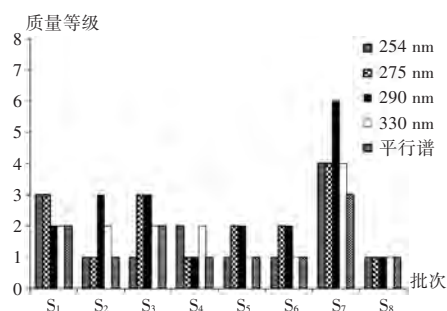


图4 不同评价方法得到的样品质量等级比较

3 讨论

3.1 色谱条件选择

柴胡安心胶囊主要药材的成分如没食子酸、大豆苷、肉桂酸等极性差异较大,故首选梯度洗脱。试验过程中,发现色谱图中4个主成分大峰难以分开,多次更换流动相比率和色谱柱均达不到基线分离,最后通过逐一单位药材按供试品溶液方法处理进样比对已知葛根中相关成分极性相差较小导致。故参考《中国药典》的方法,选择5%~25%甲醇在40 min内缓慢升高梯度,使其相关峰得到分离。选择流动相时,发现没食子酸和大豆苷的色谱图拖尾严重,选择了不同体积分数的醋酸溶液,发现随着醋酸比例的升高,上述成分的峰形逐渐对称,进而达到测定要求。

3.2 平行指纹图谱技术的均值法评价

利用任意的单个波长均不能完整地表达制剂中不同种类化学成分的全部指纹信息,因此选择单味药材中具有药效作用的主要成分下的特征波长,对不同波长下色谱图进一步整合,得到复方制剂的多维信息,才能最终鉴别其真实质量。本试验中分别采用独立权重法、均值法和投影参数法、信息熵权重法^[13-14]整合各批次样品在4个特征波长下的定性、定量指纹图谱信息,以系统指纹定量法评价质量,发现8个批次的样品质量等级基本一致。结合均值法简单便捷的特点,最终选择其作为整合指纹整体信息的方法。

参考文献:

- [1] 高延秋. 柴胡安心胶囊对心血管神经症的疗效和安全性观察[D]. 石家庄:河北医科大学,2007.
- [2] 刘冲,刘荫贞,乐智勇. 桂枝饮片标准汤剂质量标准研究[J]. 中草药,2017,48(8):1577-1583.
- [3] 王欢,毕福钧,林彤,等. 延胡索 HPLC 指纹图谱研究及9种生物碱含量测定[J]. 中药材,2017,40(3):624-629.
- [4] 宗志勇,郑金凤,路广义,等. 白芍药材主根与根茎的 HPLC 指纹图谱比较研究[J]. 中国药房,2017,28(27):3865-3867.
- [5] 王淑红,杨继章,张振杰. 柴胡安心胶囊的薄层色谱鉴别[J]. 中国药业,2010,19(3):29.
- [6] 李勇军,蒋礼,何燕玲,等. 金莲花胶囊高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中国药业,2018,27(2):23-25.
- [7] 药雅俊,孔祥鹏,裴妙荣. 大黄硝石滴丸 HPLC 多波长指纹图谱及多成分含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(6):30-33.
- [8] 马迪迪,巩丹丹,孙国祥,等. 三波长融合指纹图谱结合6组分定量和主成分分析评价银翘解毒片的质量[J]. 色谱,2017,35(7):741-747.
- [9] 刘玉梅,周安,俞年军,等. HPLC-DAD 双波长法同时测定柴胡中5种皂苷的含量[J]. 中国中药杂志,2018,43(2):363-368.
- [10] 方晓艳,张蕾,冯素香,等. HPLC 法比较河南8个产地葛根中5种成分[J]. 中成药,2016,38(9):2073-2075.
- [11] 余捷婧,吴金雄,梁亚凤,等. HPLC 同时测定赤芍和白芍中没食子酸等6种成分的量[J]. 中草药,2015,46(11):1673-1677.
- [12] 皮胜玲,张凯强,胡玉珍,等. 野生与栽培夏枯草5种活性成分的 HPLC 测定[J]. 中草药,2017,48(8):1666-1670.
- [13] 孙国祥,吴波,毕开顺. 平行五波长高效液相色谱指纹图谱全息整合法定量鉴定杞菊地黄丸的整体质量[J]. 色谱,2010,28(9):877-884.
- [14] 杨方良,张晶,孙国祥,等. 银翘解毒丸八波长高效液相色谱定量指纹图谱研究[J]. 时珍国医国药,2013,24(7):1647-1649.

(收稿日期:2019-05-08)