

丹参片的超高效液相色谱指纹图谱

秦学玲¹, 康绍建¹, 马娜¹, 蒋新平², 杨璐璐³

作者单位:¹云南省食品药品监督检验研究院中药检验所, 云南 昆明 650106;

²云南百康药业有限公司, 云南 昆明 650106;

³解放军联勤保障部队第九二〇医院中医科, 云南 昆明 650032

通信作者: 杨璐璐, 女, 副主任药师, 研究方向为中药制剂与药理研究, E-mail: yanglu09@163.com

基金项目: 全军中医药重大专项课题项目(2006071001)

摘要:目的 运用超高效液相色谱法对丹参片进行指纹图谱研究, 为全面评价丹参片的整体质量提供参考。方法 采用UPLC法, 色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC BEH C18(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm), 以0.2%磷酸溶液(A)-乙腈(B)为流动相, 梯度洗脱(0~10 min, 4% B→18% B; 10~15 min, 18% B→33% B; 15~19 min, 33% B→49% B; 19~37 min, 49% B→79% B); 柱温 19℃, 样品管理器温度 3.5℃; 流速为 0.25 mL/min; 以丹酚酸 B 为参照峰, 检测波长 280 nm。结果 建立了丹参片的 UPLC 指纹图谱共有模式, 确定了 13 个峰为共有峰, 所有样品的相似度均在 0.900 以上; 指认了其中的 11 个共有峰, 分别为: 丹参素钠、原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A、二氢丹参酮、隐丹参酮、丹参酮 I、熊果酸和丹参酮 II A。结论 所建立的方法能在 30 min 内检测丹参片中的多种成分, 操作简便、快速, 能全面控制丹参片的整体质量。

关键词: 色谱法, 高压液相; 丹参; 指纹图谱

Studies on the UPLC fingerprints of *Danshen* tablets

QIN Xueling¹, KANG Shaojian¹, MA Na¹, JIANG Xinping², YANG Lulu³

Author Affiliations: ¹Institute of Traditional Chinese Medicine, Yunnan Institute for Food and Drug Control, Kunming, Yunnan 650106, China; ²Kang pharmaceutical co. LTD. Yunnan, Kunming, Yunnan 650106, China;

³Department of Traditional Chinese Medicine, The 920th Hospital of the Joint Logistic Support Force of the Chinese People's Liberation Army, Kunming, Yunnan 650032, China

Abstract: Objective To establish a UPLC method for fingerprints analysis of *Danshen* tablets, and provide reference for comprehensive evaluation of *Danshen* tablets. **Methods** UPLC method was adopted. The determination was performed on Waters ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm) column with mobile phase consisted of 0.2% Phosphoric acid (A)-acetonitrile (B) by a gradient eluted program (0~10 min, 4% B→18% B; 10~15 min, 18% B→33% B; 15~19 min, 33% B→49% B; 19~37 min, 49% B→79% B) with a flow rate of 0.25 mL/min at 19℃. Sample manager temperature is 3.5℃. The detection wavelength was 280 nm with salvianolic acid B as the reference peak. **Results** The standard fingerprint was established, and the overall similarity of all samples exceeded 0.900. Moreover, 13 common peaks were found. Among them, 11 peaks were identified, including tanshinol, protocatechuic aldehyde, rosmarinci acid, lithospermic acid, salvianolic acid B, salvianolic acid A, dihydrotanshinone, cryptotanshinone, tanshinone I, ursolic acid, tanshinone II A. **Conclusion** This method is simple, rapid, and can be used to detect the multiple active ingredients in *Danshen* tablets within 30min. So it can be used to evaluate the quality uniformity of *Danshen* tablets.

Key words: Chromatography, high pressure liquid; *Salvia miltiorrhiza*; Fingerprint

丹参片是以唇形科植物丹参为原料而制成的片剂, 具有活血化瘀等功效^[1]。丹参片对军事训练中的急慢性损伤均具有较好的活血化瘀及缓解肿痛的作用。丹参片的主要成分为以丹酚酸 B 为代表的水溶性成分和以丹参酮IIA 为代表的脂溶性成分^[2-12]。笔者在前期研究的基础上, 参考相关文献^[2-16], 运用 UPLC 法对抽到的全部批次丹参片样品开展了指纹图谱的研究, 建立了丹参片的 UPLC 指纹图谱共有模式,

确定了 13 个峰为共有峰, 所有样品的相似度均在 0.90 以上; 指认了其中的 11 个共有峰。该方法能在 30 min 内检测丹参片中的多种成分, 操作简便、快速, 可为丹参片的整体质量控制提供参考。

本研究起止时间为 2015 年 2—12 月。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 UPLC 仪 Agilent Technologies 1290 Infinity 系统, (美国安捷伦公司); 天平: AW220

电子天平(日本岛津公司);对照品丹参素钠(批号 201403)、迷迭香酸(批号 201203)、丹酚酸 B(批号 201407)、丹参酮ⅡA(批号 201409)、原儿茶醛(批号 201307)、丹参酮Ⅰ(批号 201209)、隐丹参酮(批号 201312)、熊果酸(批号 201209)均购自中国食品药品检定研究院;紫草酸(批号 27342-47-5)、丹酚酸 A 对照品(批号 98361-23-6)、二氢丹参酮Ⅰ对照品(批号 68351-80)均购自西亚公司,标示含量均大于 99%;乙腈为色谱纯,水为高纯水(自制),其它试剂均为分析纯;丹参片为从 8 个生产厂家抽取的 74 批次样品。

1.2 色谱条件 采用 Waters ACQUITY UPLC BEH C18(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm)色谱柱,以 0.2% 磷酸溶液(A)-乙腈(B)为流动相,梯度洗脱(0~10 min, 4% B→18% B; 10~15 min, 18% B→33% B; 15~19 min, 33% B→49% B; 19~37 min, 49% B→79% B);柱温 19℃,样品管理器温度 3.5℃;流速为 0.25 mL/min;以丹酚酸 B 为参照峰,检测波长 280 nm。

1.3 对照品溶液的制备 取丹参素钠;二氢丹参酮;隐丹参酮;丹参酮Ⅰ;丹参酮ⅡA;熊果酸;原儿茶醛;迷迭香酸;紫草酸;丹酚酸 B;丹酚酸 A 对照品适量,精密称定,加甲醇制成浓度分别为 0.713 2、0.075 03、0.160 2、0.090 4、0.180 3、0.300 2、0.083 7、0.399 1、0.330 3、0.499 5、0.413 2 mg/mL 的对照品溶液,即得。

1.4 供试品溶液的制备 取供试品适量,除去包衣,研细,取约 0.2 g,精密称定,置 50 mL 容量瓶中,加入 75% 甲醇适量,超声处理 25 min(功率:300 W;频率:50 kHz),放冷用 75% 甲醇定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

1.5 阴性样品溶液的制备 取由宁夏启元国药有限公司提供的阴性样品,照“1.4”项下的方法制备,即得。

1.6 方法学考察

1.6.1 精密度试验 取批号为 141211 的丹参片参照“1.4”项下方法制备丹参片样品溶液,重复进样 6 次,参照“1.2”项下色谱条件进行测定,以 5 号峰(丹酚酸 B)为参照峰,计算 13 个主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积相对标准偏差(RSD)。结果表明,13 个色谱峰的相对保留时间 RSD 均小于 0.2%,相对峰面积 RSD 均小于 1.0%。说明该仪器具有较好的精密度。

1.6.2 重复性试验 取批号为 141211 的丹参片参照“1.4”项下方法制备 6 份丹参片样品溶液,参照“1.2”项下色谱条件进行测定,结果显示指纹图谱相似度的值均在 0.98 以上,13 个色谱峰相对保留时间 RSD 均小于 0.2%,相对峰面积 RSD 均小于 1.0%。说明所建立的方法具有较好的重复性。

1.6.3 稳定性试验 取批号为 141211 的丹参片参照“1.4”项下方法制备丹参片样品溶液,参照“1.2”项下色谱条件分别于 0、3、6、9、14、22 h 内进行测定,结果显示指纹图谱相似度值为 1,13 个色谱峰相对保留时间 RSD 均小于 0.2%,相对峰面积 RSD 均小于 1.0%。说明,丹参片样品溶液在室温放置 22 h 内比较稳定。

1.7 指纹图谱的建立

1.7.1 共有峰的归属 取批号为 141211 的丹参片参照“1.4”项下方法制备丹参片样品溶液,取“1.3”项下制备对照品溶液;参照“1.2”项下色谱条件进行测定。指认了 11 个主要色谱峰,从左到右依次为:丹参素钠(1 号峰)、原儿茶醛(2 号峰)、迷迭香酸(3 号峰)、紫草酸(4 号峰)、丹酚酸 B(5 号峰)、丹酚酸 A(6 号峰)、二氢丹参酮Ⅰ(8 号峰)、丹参酮Ⅰ(9 号峰)、隐丹参酮(10 号峰)、熊果酸(11 号峰)、丹参酮ⅡA(13 号峰)。

1.7.2 指纹图谱共有模式的建立及数据处理 对所抽到的 8 个生产厂家 74 批次丹参片样品进行测定,生成丹参片的指纹图谱共有模式,详见图 1~9。并对 74 批丹参片样品 UPLC 指纹图谱进行了分析,以丹酚酸 B 为参照峰 S,确定了 13 个峰为共有峰,计算其相似度,详见表 1,2。

2 结果

(1)通过对不同企业指纹图谱的建立与分析可知(详见图 2 和表 1),供试品色谱图的相似度均在 0.9 以上。其中 E 企业样品相似度最好(相似度:0.998),说明其产品质量控制较好,而 C 企业样品相似度相对较差(相似度:0.901),说明其产品质量控制相对较差。

(2)通过对同一企业不同批次间指纹图谱的建立与分析可知(见图 3~9 和表 2),供试品色谱图的相似度均在 0.900 以上,均符合规定,合格率为 100%。其中 E 企业各批次间的样品相似度最好,其相似度范围为 0.998~1.000,说明其整个过程中批次间产品质量控制较好,而 C 企业各批次间的样品相似度相对较差,其相似度范围为 0.910~1.000,说明其整个过程中批次间产品质量控制较差,这与前期调研和提取工艺的研究结果基本一致。

(3)本研究建立的方法能在 30 min 内检测丹参片中的多种成分,操作简便、快速,具有较好的专属性和稳定性,可为丹参片的整体质量控制提供参考。

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法的选择 本实验在前期研究的基础上,参考相关文献^[2-16],最后确定供试品溶液制备方法为:取供试品适量,除去包衣,研细,取约 0.2 g,精密称定,置 50 mL 容量瓶中,加入

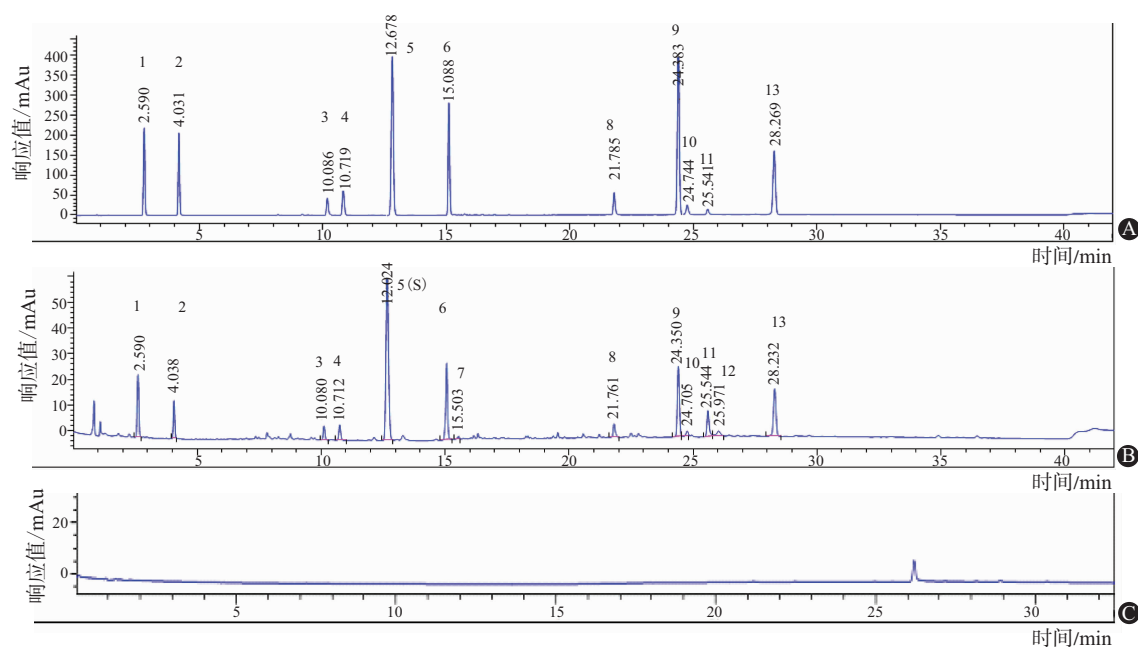


图1 丹参片 UPLC 图谱(共有模式):A 为混合对照品,B 为丹参片样品,C 为阴性样品

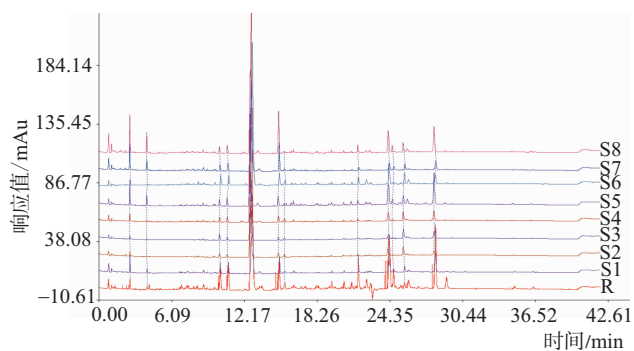


图2 8 个不同生产企业丹参片样品的 UPLC 指纹图谱

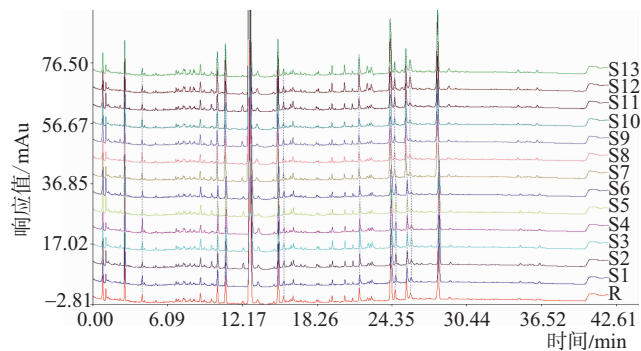


图3 企业 A 丹参片样品的 UPLC 指纹图谱

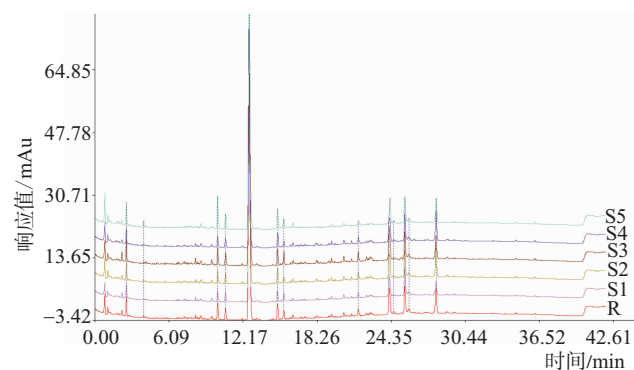


图4 企业 B 丹参片样品的 UPLC 指纹图谱

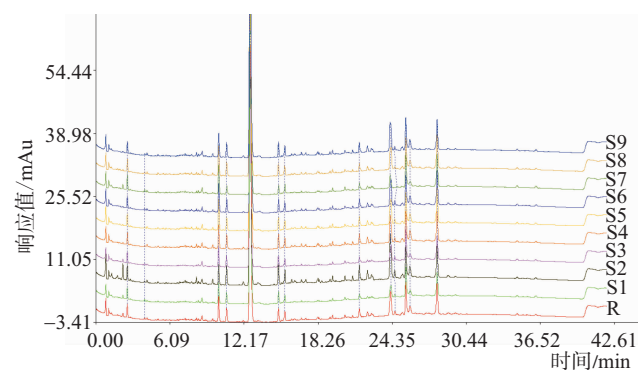


图5 企业 C 丹参片样品的 UPLC 指纹图谱

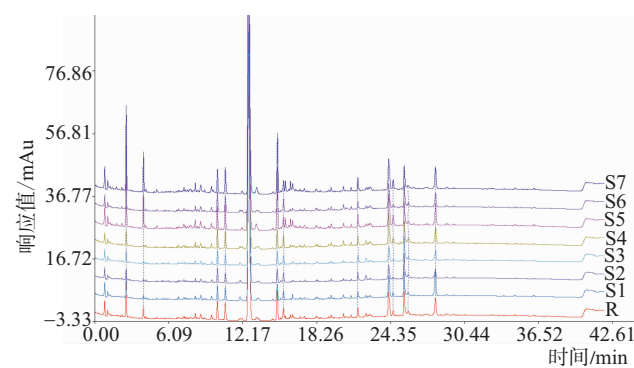


图6 企业 D 丹参片样品的 UPLC 指纹图谱

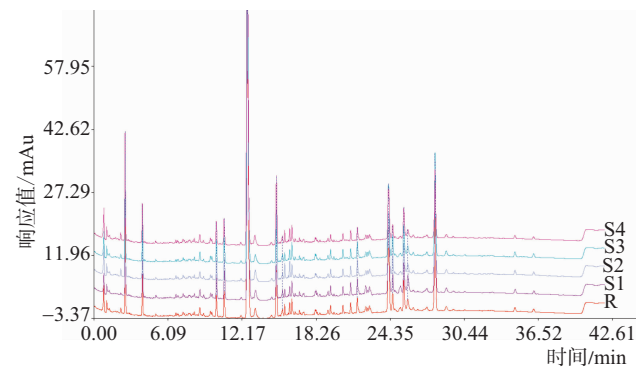


图7 企业 E 丹参片样品的 UPLC 指纹图谱

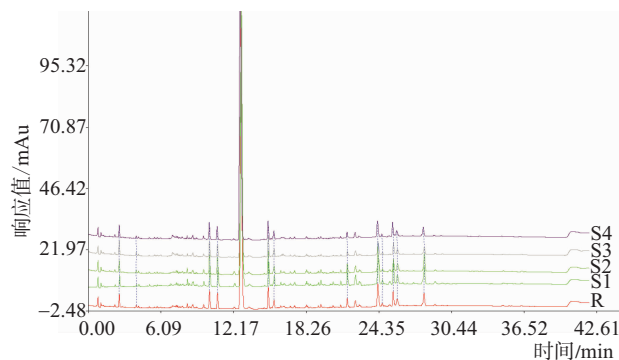


图8 企业F不同批次间丹参片样品的UPLC指纹图谱

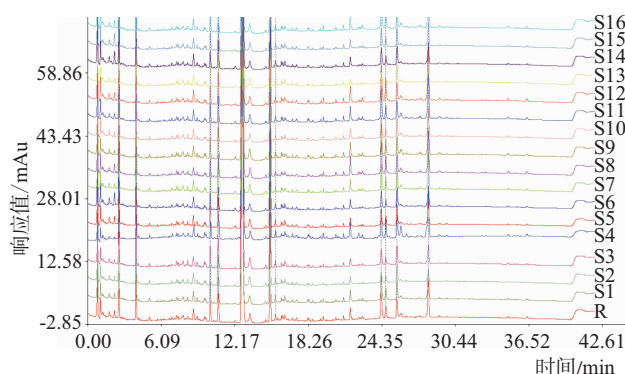


图9 企业G丹参片样品的UPLC指纹图谱

表1 各企业间丹参片指纹图谱分析结果

企业名称	相似度
数据文件对照图谱. Sep	1.000
A企业-280. cdf	0.915
B企业-280. cdf	0.980
C企业-280. cdf	0.901
D企业-280. cdf	0.911
E企业-280. cdf	0.998
F企业-280. cdf	0.923
G企业-280. cdf	0.916
H企业-280. cdf	0.991

表2 各企业不同批次间丹参片指纹图谱相似度范围分析结果

企业名称	相似度范围	批次	合格率/%
A	0.997~1.000	13	100
B	0.992~1.000	5	100
C	0.910~1.000	9	100
D	0.996~0.999	7	100
E	0.998~1.000	4	100
F	0.995~1.000	4	100
G	0.996~1.000	31	100

注:限度规定相似度不得低于0.850

75%甲醇适量,超声处理25 min(功率:300 W;频率:50 kHz),放冷,用75%甲醇定容,摇匀,滤过,取续滤液,用0.2 μm 微孔滤膜滤过,即得。

3.2 色谱条件的选择 本实验在前期研究的基础上,参考相关文献^[2-16],最后确定色谱条件为:采用Waters ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm $\times$ 100 mm,1.7 μm)色谱柱,以0.2%磷酸溶液(A)-乙腈

(B)为流动相,梯度洗脱(0~10 min,4% B $\rightarrow$ 18% B;10~15 min,18% B $\rightarrow$ 33% B;15~19 min,33% B $\rightarrow$ 49% B;19~37 min,49% B $\rightarrow$ 79% B);柱温19 $^{\circ}\text{C}$,样品管理器温度3.5 $^{\circ}\text{C}$;流速为0.25 mL/min;以丹酚酸B为参照峰,检测波长280 nm。

3.3 参照峰的选择 酚酸性成分是丹参片中一类主要活性成分,其中丹酚酸B为丹参片中酚酸性成分的代表,其在丹参片中的含量最高,并且是2015版中国药典规定的含量测定项目,因此我们选择丹酚酸B作为参照峰。

3.4 不足 因H企业只抽到1批次样品,所以未作批次间指纹图谱的研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:678.
- [2] 许虎,刘训红,傅兴圣,等. 高效毛细管电泳法同时测定丹参片中5种酚酸类成分[J]. 中国药理学杂志,2012,47(20):1661-1664.
- [3] 张青云,崔田. 丹参片脂溶性成分HPLC指纹图谱研究[J]. 淮海医药,2011,29(1):66-67.
- [4] 李耿,孟繁蕴,杨洪军,等. UPLC法同时测定丹参中11种成分的含量[J]. 中国药房,2014,25(19):1766-1768.
- [5] 张璐,程月发,张爱兵,等. 不同厂家的丹参片和丹参胶囊中四种活性成分的高效液相色谱法比较分析[J]. 时珍国医国药,2012,23(11):2790-2791.
- [6] 何昱,成金乐,徐吉银,等. HPLC-DAD同时测定丹参中原儿茶醛、丹酚酸B、隐丹参酮、丹参酮II A四种成分的含量[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2011,13(4):688-692.
- [7] 周晓希,孔羽,魏宇昆,等. RP-HPLC-DAD同时测定丹参及丹参片中6种水溶性成分的含量[J]. 中药材,2014,37(2):337-339.
- [8] 迟栋,贾荷丽. HPLC研究裕丹参水煎液指纹图谱[J]. 光明中医,2013,28(3):481-482.
- [9] 宋建平,许虎,刘训红,等. 丹参HPCE—DAD指纹图谱的研究[J]. 中药材,2012,35(9):1414-1417.
- [10] 李倩,刘伟,罗祖良,等. 一测多评法测定丹参中丹参酮II A、隐丹参酮、丹参酮I、二氢丹参酮I的含量[J]. 中国中药杂志,2012,37(6):824-828.
- [11] 郑江萍,叶政德,杨光义. 丹参配方颗粒HPLC指纹图谱研究[J]. 海峡药学,2016,28(9):45-49.
- [12] 时荣同,张清文,姚惠,等. HPLC法测定注射用丹参多酚酸盐中丹参乙酸镁的含量[J]. 安徽医药,2016,20(3):466-468.
- [13] 高杨,王彬,秦昆明,等. 正交法优选丹参提取工艺研究[J]. 安徽医药,2015,19(12):2276-2279.
- [14] 张雪,褚文静,黄喜茹,等. 反相高效液相色谱二极管阵列检测法同时测定丹参饮片中5种水溶性成分[J]. 理化检验-化学分册,2010,46(11):1323-1325.
- [15] 孙棣,刘文英,梁彩. HPLC法同时测定丹参片中4种有效成分的含量[J]. 中国医科大学学报,2007,38(1):51-54.
- [16] 周维,胡昌江,戴德荣,等. 丹参饮片、标准水煎剂、配方颗粒HPLC特征图谱相关性研究[J]. 中国现代中药,2016,18(9):1100-1102,1113.

(收稿日期:2018-03-20,修回日期:2018-06-04)