

# 丹珍头痛胶囊的HPLC指纹图谱研究

张宇霞<sup>1,2,3\*</sup>, 答占全<sup>1</sup>, 王统霞<sup>1</sup>, 李春梅<sup>1</sup>, 纪兰菊<sup>1#</sup>(1.青海益欣药业有限责任公司, 西宁 810003; 2.中国科学院西北高原生物研究所/中国科学院藏药研究重点实验室, 西宁 810001; 3.中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049)

中图分类号 R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)27-3864-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.27.43

**摘要** 目的:建立丹珍头痛胶囊的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱。方法:采用HPLC法。色谱柱为Dikma Diamonsil C<sub>18</sub>, 流动相A为水, 流动相B为甲醇-乙腈, 梯度洗脱, 流速为1.0 ml/min, 检测波长为340 nm, 柱温为40 ℃, 进样量为20 μl, 记录时间为65 min。结果:精密性、稳定性、复复性试验的RSD≤0.23%; 标定10批丹珍头痛胶囊共有峰13个, 相似度均>0.90。结论:该方法简便、准确、重复性好, 可用于丹珍头痛胶囊的工艺稳定性评价和质量控制。

**关键词** 丹珍头痛胶囊; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 相似度

## Study on the HPLC Fingerprint Chromatogram of Danzhen Headache Capsules

ZHANG Yu-xia<sup>1,2,3</sup>, ZAN Zhan-quan<sup>1</sup>, WANG Tong-xia<sup>1</sup>, LI Chun-mei<sup>1</sup>, JI Lan-ju<sup>1</sup>(1.Qinghai Yixin Pharmaceuticals Co., Ltd, Xining 810003, China; 2.Northwest Institute of Plateau Biology/Key Laboratory of Zang Medicine Research, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China; 3.School of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the HPLC fingerprint chromatogram of Danzhen headache capsules. METHODS: HPLC method was adopted. The column was Dikma Diamonsil C<sub>18</sub> with the mobile phase of methanol-acetonitrile-water (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min; the temperature was 40 ℃, the detection wavelength was 340 nm, the sample size was 20 μl and the detection time was 65 min. RESULTS: RSDs of precision, stability and reproducibility tests were no more than 0.23%; 13 common peaks were identified in 10 batches of Danzhen headache capsules and the similarity of all samples were higher than 0.90. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, and can be used for the process stability evaluation and quality control of Danzhen headache capsules.

**KEYWORDS** Danzhen headache capsules; HPLC; Fingerprint chromatogram; Similarity

3分离效果较好,且分离时间适中,因此选用Inertsil OD-3进行色谱分离。

### 3.2 提取方法的选择

笔者比较了3种提取方法(索氏提取除杂再进行超声、先超声再进行萃取除杂、直接超声),结果发现3种方法均对被测成分无干扰且可较好地分离,考虑到操作的简便性,故选用直接超声法。此外,还考察了不同溶剂(甲醇、70%甲醇、50%甲醇、乙醇、70%乙醇、50%乙醇)对结果的影响。结果发现,采用70%乙醇与甲醇作为提取溶剂时,栀子苷含量基本一致,均能较好地提取分离栀子苷与甘草苷,考虑到乙醇的毒性小,故选用70%乙醇为提取溶剂。又考察了超声时间(30、45、60、90 min)对结果的影响。结果发现,超声45 min即可提取完全。

综上所述,本方法准确、灵敏、简便,可用于心神宁片中栀子苷和甘草苷的含量测定。

### 参考文献

[1] 郭五保,李彤晖,王卫峰.HPLC测定心神宁片中栀子苷

\* 硕士研究生。研究方向:药材质量标准。E-mail: yuxia10086@126.com

# 通信作者:教授。研究方向:新药研发。E-mail: 1544887338@qq.com

的含量[J].华西药学杂志,2003,18(4):292.

[2] 尹美芝,张瑞华,崔雅慧,等.心神宁片中栀子苷含量影响因素的考察[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(6):52.

[3] 高雪松,王蕾.HPLC-EISD法测定心神宁片中酸枣仁皂苷A和B的含量[J].中国药师,2013,16(1):61.

[4] 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,2010:80.

[5] 侯玉华,李智,李俊雅,等.RP-HPLC法测定复方丹栀逍遥丸中栀子苷的含量[J].中国药房,2010,21(47):4480.

[6] 张丽萍.用高效液相色谱法测定安坤颗粒中栀子苷和芍药苷的含量[J].药学实践杂志,2014,32(2):121.

[7] 张科卫,崔晓兵,吴皓.双波长梯度洗脱法测定栀子柏皮汤制剂中栀子苷、甘草苷的含量[J].中成药,2008,30(11):1629.

[8] 胡震,杨广得,罗国安,等.栀子中栀子苷提取工艺及HPLC分析[J].中成药,2006,28(3):336.

(收稿日期:2015-04-02 修回日期:2015-07-29)

(编辑:刘柳)

丹珍头痛胶囊是青海益欣药业有限责任公司原研独家产品,由高原丹参、夏枯草、熟地黄、珍珠母、鸡血藤、川穹、当归、白芍、菊花、蒺藜、钩藤、细辛共十二味中、藏药材组成,具有平肝熄风、散瘀通络、解痉止痛的功效,可用于肝阳上亢、瘀血阻络所致的头痛、背痛颈酸、烦躁易怒等症,特别是针对脑供血不足、高血压脑外伤后遗症、偏头痛、神经衰弱、颈椎病等引起的多发性、慢性头痛具有疗效显著、标本兼治的综合效果,在临床上用于治疗偏头痛<sup>[1]</sup>、血管神经性头痛<sup>[2]</sup>。

患者用药的安全性与药品生产工艺的稳定性、质量标准的完善和提高密切相关。目前,丹珍头痛胶囊标准中可监控的药材仅有高原丹参[薄层色谱(TLC)鉴别丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>]和白芍[TLC鉴别芍药苷、含量测定芍药苷]两味药材。笔者曾对该药品中其他药材的主要成分进行了TLC鉴别及高效液相色谱(HPLC)法测定含量,以期完善其质量标准,但都受到了不同程度阴性干扰。化学指纹图谱可用于全面评价药材或者药品的质量,如红外指纹图谱<sup>[3]</sup>、气相色谱-质谱(GC-MS)指纹图谱<sup>[4]</sup>、HPLC指纹图谱<sup>[5]</sup>、TLC指纹图谱<sup>[6]</sup>等。由于该药品中含中药材种类较多,化学成分复杂,考虑到指纹图谱可以全面反映样品中的化学信息,同时近年来HPLC指纹图谱用于药品质量评价也较多<sup>[7-10]</sup>,在本研究中笔者对丹珍头痛胶囊进行了HPLC指纹图谱研究并对其进行相似度评价,以为完善丹珍头痛胶囊的质量控制方法提供参考。

## 1 材料

515型HPLC仪,包括溶剂管理系统、二极管阵列检测器、Empower色谱工作站(美国Waters公司);KQ-100B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);ESJ182-4型电子天平(沈阳龙腾电子有限公司);HH-4型数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司)。

丹珍头痛胶囊(批号:20131105、20131203、20131204、20140602、20140603、20140607、20140608、20140609、20140601、20140602,编号为S1~S10)由青海益欣药业有限责任公司提供;阿魏酸、芍药苷、绿原酸、木犀草苷、3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸、丹酚酸B、丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>、迷迭香酸对照品的质量浓度分别为0.012 0、0.029 4、0.030 9、0.040 9、0.030 5、0.136 0、0.016 0、0.312 0 mg/ml(批号分别为MUST-13090901、MUST-11090902、MUST-11090911、MUST-12090901、MUST-14090901、MUST-14090908、MUST-15090906、MUST-16090903)均购自成都曼思特生物科技有限公司;甲醇、乙腈为色谱纯,磷酸为分析纯,水为纯净水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Dikma Diamonsil C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相A为水,流动相B为甲醇-乙腈(1:1, V/V),梯度洗脱(0~10 min, 15%→25%B;10~20 min, 25%→40%B;20~60 min, 40%→90%B;60~65 min, 15%B);流速:1.0 ml/min;检测波长:340 nm;柱温:40℃;进样量:20 μl;记录时间:65 min。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 取阿魏酸、芍药苷、绿原酸、木犀草苷、3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸、丹酚酸B、丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>、迷迭香酸对照品各适量,加入甲醇制成每1 ml含0.012 0 mg阿魏酸、0.029 4 mg芍药苷、0.030 9 mg绿原酸、0.040 9 mg木犀草苷、0.030 5 mg、3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸、0.136 0 mg丹酚酸B、0.016 0 mg丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>和0.312 0 mg迷迭香酸的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 将丹珍头痛胶囊粉末过七号筛,精密称取约1.5 g,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 ml,称定质量,回流提取2 h,放冷,用甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,经0.45 μm微孔滤膜滤过,得供试品溶液。

## 2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果,相似度均为0.90以上。以第11号峰为对照峰S,测定6次色谱中各共有峰的相对保留时间及相对峰面积比值的一致性。结果,RSD分别为0.09%(阿魏酸)、0.10%(芍药苷)、0.20%(绿原酸)、0.15%(木犀草苷)、0.12%(3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸)、0.09%(丹酚酸B)、0.12%(丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>)、0.20%(迷迭香酸),说明仪器精密度良好,符合指纹图谱技术要求。

2.3.2 稳定性试验 取同一样品(编号:S8)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别于放置2、4、6、8、10 h时按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果,相似度均为0.90以上。以第11号峰为对照峰S,测定6次色谱中各共有峰的相对保留时间及相对峰面积比值的一致性。结果,RSD分别为0.15%(阿魏酸)、0.16%(芍药苷)、0.20%(绿原酸)、0.15%(木犀草苷)、0.21%(3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸)、0.19%(丹酚酸B)、0.11%(丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>)、0.22%(迷迭香酸),说明供试品溶液在10 h内基本稳定。

2.3.3 重复性试验 取同一样品(编号:S8)适量,共6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果,相似度均为0.90以上。以第11号峰为对照峰S,测定6次色谱中各共有峰的相对保留时间及相对峰面积比值的一致性。结果,RSD分别为0.15%(阿魏酸)、0.17%(芍药苷)、0.20%(绿原酸)、0.14%(木犀草苷)、0.20%(3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸)、0.19%(丹酚酸B)、0.12%(丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>)、0.23%(迷迭香酸),说明本方法重复性良好,符合指纹图谱技术要求。

## 2.4 样品指纹图谱的建立及相似度评价

取10批样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,将所得的HPLC图谱导入国家药典委员会《中药指纹图谱相似度评价系统(2004A)》软件,选择批号20131203的药品为参照图谱,以平均数法生成对照指纹图谱,时间窗宽度为0.10 min,对比色谱图,确定共有峰为13个,详见图1。以色谱峰稳定、重复性较好的第11号峰为对照峰S,各共有峰相对保留时间比值的RSD为0~0.27%,说明10批样品中13个共有峰都能稳定出现。而相对峰面积比

值的RSD最高却达到60%以上,说明各批样品中13个共有峰的含量相差较大,故需提高对该药品的质量控制。对10批丹珍头痛胶囊进行相似度评价,相似度均大于0.90,详见表1。

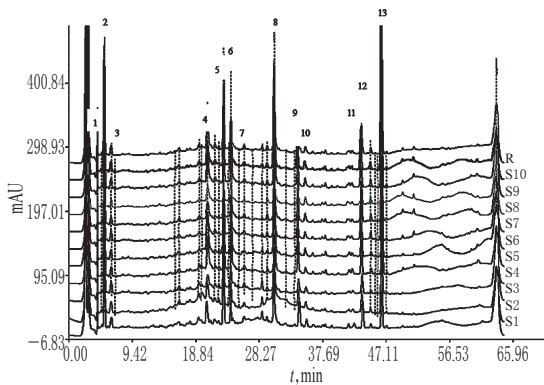


图1 10批丹珍头痛胶囊高效液相色谱指纹图谱

Fig 1 HPLC fingerprint chromatogram of 10 batches of Danzhen headache capsules

表1 10批丹珍头痛胶囊的相似度计算结果

Tab 1 Results of similarity of 10 batches of Danzhen headache capsules

| 编号  | S1    | S2    | S3    | S4    | S5    | S6    | S7    | S8    | S9    | S10   | 相似度   |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| S1  |       | 0.945 | 0.974 | 0.921 | 0.921 | 0.845 | 0.914 | 0.767 | 0.916 | 0.879 | 0.940 |
| S2  | 0.945 |       | 0.942 | 0.965 | 0.941 | 0.915 | 0.954 | 0.859 | 0.965 | 0.948 | 0.975 |
| S3  | 0.974 | 0.942 |       | 0.941 | 0.932 | 0.867 | 0.928 | 0.802 | 0.927 | 0.893 | 0.953 |
| S4  | 0.921 | 0.965 | 0.941 |       | 0.932 | 0.971 | 0.982 | 0.936 | 0.986 | 0.983 | 0.994 |
| S5  | 0.921 | 0.941 | 0.932 | 0.932 |       | 0.859 | 0.913 | 0.797 | 0.923 | 0.898 | 0.944 |
| S6  | 0.845 | 0.915 | 0.867 | 0.971 | 0.859 |       | 0.976 | 0.986 | 0.974 | 0.989 | 0.968 |
| S7  | 0.914 | 0.954 | 0.928 | 0.982 | 0.913 | 0.976 |       | 0.940 | 0.998 | 0.992 | 0.992 |
| S8  | 0.767 | 0.859 | 0.802 | 0.936 | 0.797 | 0.986 | 0.940 |       | 0.936 | 0.965 | 0.927 |
| S9  | 0.916 | 0.965 | 0.927 | 0.986 | 0.923 | 0.974 | 0.998 | 0.936 |       | 0.994 | 0.994 |
| S10 | 0.879 | 0.948 | 0.893 | 0.983 | 0.898 | 0.989 | 0.992 | 0.965 | 0.994 |       | 0.985 |
| 相似度 | 0.940 | 0.975 | 0.953 | 0.994 | 0.944 | 0.968 | 0.992 | 0.927 | 0.994 | 0.985 |       |

### 3 讨论

#### 3.1 提取方法的选择

分别对提取溶剂(甲醇、乙酸乙酯、甲醇-乙酸乙酯、无水乙醇)、提取时间(0.5、1、1.5、2、2.5 h)、提取方法(回流、超声)、料液比(1:16、1:20、1:50、1:100)、样品粒度(过四号筛、过七号筛)进行考察,发现以甲醇回流、提取时间2 h、提取料液比1:16、样品粒度为过七号筛时,峰的数量、分离度及峰形均较好。

#### 3.2 色谱条件的优化

在样品指纹图谱条件摸索过程中,分别以甲醇(乙腈)-水、甲醇(乙腈)-0.01%磷酸缓冲液、甲醇-乙腈-水、甲醇-乙腈-0.01%磷酸缓冲液为流动相,且试用不同的梯度,最后确定

选择流动相A为水、流动相B为甲醇-乙腈(1:1, V/V)、梯度洗脱时,各峰分离度较好。

#### 3.3 检测波长的选择

采用二极管阵列检测器对样品进行200~400 nm全波长扫描,发现340 nm波长处检测到的峰数目较多,且分离度较好,故确定340 nm为检测波长。

#### 3.4 指纹图谱数据分析

10批丹珍头痛胶囊中13个共有峰的相对保留时间和相对峰面积计算结果显示,各共有峰出峰时间基本稳定,但共有峰对应的化合物含量差异较大,可能与药材的产地、采收期、采收年限、贮藏及生产工艺控制等因素有关。故需重视药材来源,选用优质药材,严格控制生产工艺,保证药品的质量。

综上所述,该方法简便、准确、重复性好,可用于丹珍头痛胶囊的工艺稳定性评价和质量控制。

### 参考文献

- [1] 郭桂珍. 丹珍头痛胶囊治疗偏头痛的临床疗效分析[J]. 中国社区医师:医学专业, 2010, 12(24):118.
- [2] 韩强. 丹珍头痛胶囊治疗血管神经性头痛的临床观察[J]. 中国实用医药, 2010, 5(7):143.
- [3] 陈斌, 李军会, 臧鹏, 等. 六味地黄丸指纹图谱的近红外光谱分析方法的建立[J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(8): 2 124.
- [4] 单臻, 赵陆华, 屠颖, 等. 肾宝片中挥发油GC指纹图谱的研究[J]. 中国天然药物, 2005, 3(3):158.
- [5] 向增旭, 高山林. HPLC指纹图谱在金银花药材真伪鉴别中的应用研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(9):996.
- [6] 魏凤环, 张佳佳, 张璐. 夏天无TLC指纹图谱的研究[J]. 中药材, 2006, 29(6):547.
- [7] 张辰辰, 杨继章, 吴丹, 等. 香桂化浊胶囊的HPLC-PDA指纹图谱研究[J]. 医药导报, 2014, 33(1):86.
- [8] 曾超, 陆东, 段伟昌, 等. 肉桂配方颗粒的HPLC指纹图谱研究[J]. 中国药房, 2014, 25(7):635.
- [9] 朱文荣, 李松. 炒牛蒡子配方颗粒的HPLC指纹图谱研究[J]. 现代药物与临床, 2014, 29(2):158.
- [10] 刘悦, 龚苏晓, 张铁军, 等. 头痛滴丸不同提取工艺指纹图谱比较研究[J]. 中成药, 2014, 36(1):85.

(收稿日期:2014-10-25 修回日期:2015-01-09)

(编辑:余庆华)

《中国药房》杂志——《国际药学文摘》(IPA)收录期刊, 欢迎投稿、订阅