

[中药指纹图谱]

基于调脂抗氧化有效部位的降脂宁 HPLC 指纹图谱研究

罗文¹, 刘斌^{1,2*}, 王伟¹, 石任兵^{1,2}

(1. 北京中医药大学, 北京 100102; 2. 国家中医药管理局中药经典名方有效物质发现重点实验室, 北京 100102)

关键词: 降脂宁; 高效液相色谱; 指纹图谱; 有效部位

摘要: 目的: 建立基于调脂抗氧化有效部位的降脂宁颗粒(山楂、制首乌、决明子和荷叶) HPLC 指纹图谱。方法: HPLC 方法采用 Agilent Tc-C₁₈ 色谱柱, 流动相为 0.01% 甲酸水溶液-乙腈。梯度洗脱模式, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 280 nm, 参照物 2,3,5,4'-四羟基二苯乙炔-2-O-β-D-葡萄糖苷, 并对指纹峰进行归属。结果: 降脂宁调脂抗氧化有效部位指纹图谱有 29 个共有色谱峰, 其中峰 1~4, 8, 9 来自山楂; 峰 20~29 来自决明子; 峰 5, 6, 11~13, 15, 17~19 来自荷叶; 峰 7, 10, 14, 16 来自制首乌。同批次药材和不同批次药材制备的降脂宁调脂抗氧化有效部位指纹图谱相似度分别均在 0.99 和 0.90 以上。结论: 建立基于调脂抗氧化有效部位的降脂宁 HPLC 指纹图谱是可行的, 该方法准确、稳定、重复性好, 能够以调脂抗氧化活性为基础, 有效控制降脂宁质量。

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-1528(2011)02-0193-06

HPLC fingerprint of Jiangzhining granules concerning the lipid-regulation and anti-oxidation effective fraction

LUO Wen¹, LIU Bin^{1,2*}, WANG Wei¹, SHI Ren-bing^{1,2}

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China; 2. The Key Unit of Exploring Effective Substances of Classical and Famous Prescription of SATCM, Beijing 100102, China)

KEY WORDS: Jiangzhining granules; HPLC; fingerprint; effective fraction

ABSTRACT: **AIM:** To establish an HPLC fingerprint of Jiangzhining granules (*Crataegi Fructus*, *Polygoni multiflori Radix Praeparata*, *Cassiae Semen* and *Nelumbinis Folium*) concerning the lipid-regulation and anti-oxidation effective fraction. **METHODS:** HPLC method was used with Agilent Tc-C₁₈ column, 0.01% formic acid solution-acetonitrile as mobile phase in gradient elution mode, with 1.0 mL/min of flow rate and 280 nm of detection wavelength. 2,3,5,4'-tetrahydroxyl dibenzoethylene-2-O-β-D-glucoside was adopted as reference substance, and common peaks were traced to which herb came from Jiangzhining granules. **RESULTS:** The fingerprint of the lipid-regulation and anti-oxidation effective fraction of Jiangzhining granules had 29 common peaks, among them peaks 1-4, 8, and 9 came from *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br., peaks 20-29 came from *Cassia obtusifolia* L., peaks 5, 6, 11-13, 15 and 17-19 came from *Nelumbo nucifera* Gaertn., peaks 7, 10, 14 and 16 came from *Polygonum multiflorum* Thunb. The similarities of the fingerprints of 10 of Jiangzhining granules prepared with the same or different herbs were greater than 0.99 and 0.90, respectively. **CONCLUSION:** Establishing an HPLC fingerprint of Jiangzhining granules based on its lipid-regulation and anti-oxidation effective fraction has satisfactory accuracy, stability and reproducibility, and could be used to control the quality of Jiangzhining granules.

降脂宁由山楂、制首乌、决明子、荷叶四味中药 组成, 载于《中华人民共和国卫生部药品标准》(中

收稿日期: 2010-08-20

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAI08B03-04)

作者简介: 罗文(1984-), 女, 医学硕士, 研究方向: 中药分析

* 通讯作者: 刘斌, 男, 教授, 医学博士生导师。Tel: (010)84738629 E-mail: liubinyn67@163.com

药)第十三册^[1],具有降血脂、软化血管作用^[2],临床用于预防和治疗高脂血症。我们采用大孔树脂吸附技术,结合药理学研究,筛选确定了降脂宁调脂抗氧化有效部位^[3-6]。本实验建立了基于调脂抗氧化有效部位的降脂宁 HPLC 指纹图谱,并通过复方与组方各药材 HPLC 指纹图谱^[7-9]的相关性研究,对降脂宁 HPLC 指纹图谱色谱峰进行了归属。

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪,包括 1525 型二元高压梯度泵,2487 型二级管阵列检测器和 1500 型柱温箱(美国 Waters 公司);Sartorius BT 25S 型 1/100000 电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司);KQ-500DE 型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

1~9 批组方药材山楂、制首乌、决明子、荷叶购自全国各地,经北京中医药大学张贵君教授鉴定分别为蔷薇科植物山里红 *Crataegus pinnatifida* Bge. var. major N. E. Br. 的干燥成熟果实、蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根、豆科植物决明子 *Cassia obtusifolia* L. 的干燥成熟种子和睡莲科植物莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 的干燥叶;第 10 批组方药材山楂、制首乌、决明子、荷叶均为对照药材,购自中国药品生物制品检定所。2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷对照品(批号:08440-200402)购自中国药品生物制品检定所。

乙腈(Sigma-aldrich 公司,色谱纯);屈臣氏重蒸水;其他试剂为分析纯,购自北京北化精细化学品有限责任公司。

2 样品溶液制备

2.1 降脂宁调脂抗氧化有效部位制备 参照文献^[3]方法,制备降脂宁调脂抗氧化有效部位。

2.2 参照物溶液 精密称取 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷对照品 3.66 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,精密移取 1 mL,置 10 mL 量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,作为参照物溶液。

2.3 供试品溶液 取降脂宁调脂抗氧化有效部位约 25 mg,精密称定,置锥形瓶中,加 50% 乙醇 10 mL,称定重量,超声提取 30 min,放冷,再称定重量,用 50% 乙醇补足减失的重量,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

3 色谱条件

色谱柱:Agilent TC-C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 流动相:0.01% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)(0

~40 min 97:3~86:14;40~65 min 86:14~84:16;65~100 min 84:16~70:30;100~110 min 70:30~50:50;110~120 min 50:50~0:100)。流速:1.0 mL/min 检测波长:280 nm;柱温:30 °C。

4 方法学考察

4.1 精密度试验 精密吸取 2.3 项下供试品溶液 10 μL,连续进样 5 次,测定 HPLC 图谱。以 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷峰(峰 16)为参照峰,计算各共有峰相对保留时间 RSD 值 < 2%,相对峰面积 RSD 值 < 3%。表明方法精密度良好。

4.2 稳定性试验 精密吸取 2.3 项下供试品溶液,分别于制备后 3、6、9、12、15、18、24 h 进样,测定 HPLC 图谱。以 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷峰(峰 16)为参照峰,计算各共有峰相对保留时间 RSD 值 < 2%,相对峰面积 RSD 值 < 3%。表明供试品溶液在 24h 稳定。

4.3 重复性试验 取同批次药材 5 份,制备 5 批降脂宁调脂抗氧化有效部位。分别取 5 批有效部位各约 25 mg,精密称定,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,进样,测定 HPLC 图谱。以 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷峰(峰 16)为参照峰,计算各共有峰相对保留时间 RSD 值 < 2%,相对峰面积 RSD 值 < 3%。表明方法重复性良好。

5 指纹图谱建立

5.1 指纹图谱及技术参数 取同批次药材和不同批次药材,分别制备 10 批降脂宁调脂抗氧化有效部位。按 2.3 项下方法制备供试品溶液,进样,测定 HPLC 图谱。采用国家药典委员会中药指纹图谱相似度评价系统,进行时间窗设定、谱峰匹配,确定降脂宁指纹图谱 29 个共有色谱峰,见图 1、2。选择 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷峰(峰

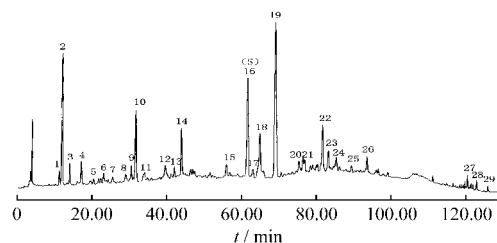


图 1 降脂宁调脂抗氧化有效部位 HPLC 指纹图谱色谱峰

S. 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷

Fig. 1 The chromatographic peaks in the fingerprint of the lipid-regulation and anti-oxidation effective fraction of Jiangzhining granules

S. 2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside

16) 作为参照峰,计算各共有指纹峰相对保留时间和相对峰面积 结果见表1~4。

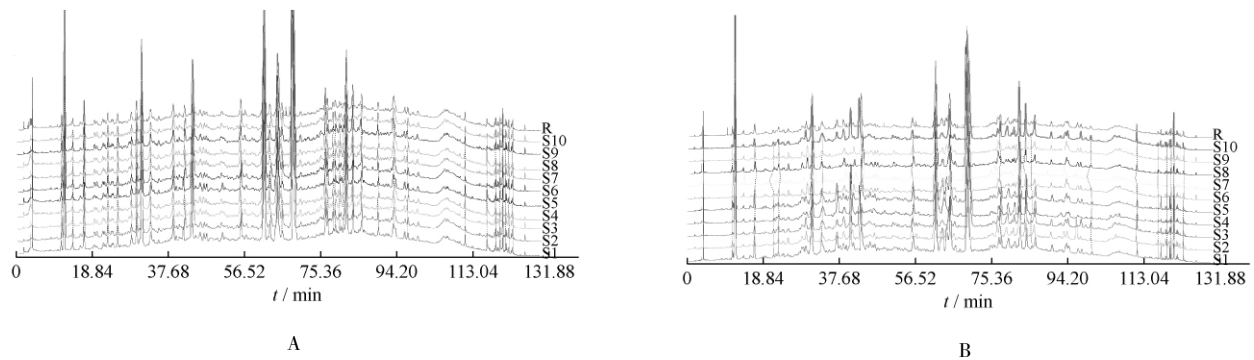


图2 降脂宁调脂抗氧化有效部位 HPLC 指纹图谱

R. 对照图谱 S1~10. 10批降脂宁调脂抗氧化有效部位

A. 同批次药材 B. 不同批次药材

Fig. 2 The fingerprint of the lipid-regulation and anti-oxidation effective fraction of Jiangzhining granules

R. The reference fingerprint S1~10. 10 batches of the lipid-regulation and anti-oxidation effective fraction of Jiangzhining granules

A. The same batches of herbs B. The different batches of herbs

表1

共有峰相对保留时间(同批次药材)

Tab. 1 The relative retention time of common peaks and their RSDs (the same batches of herbs)

峰号	样品编号										均值	RSD/%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10		
1	0.186	0.185	0.183	0.183	0.187	0.185	0.184	0.187	0.183	0.185	0.185	0.78
2	0.198	0.194	0.198	0.198	0.198	0.196	0.198	0.198	0.198	0.198	0.197	0.58
3	0.231	0.232	0.232	0.232	0.232	0.232	0.232	0.232	0.232	0.232	0.232	0.13
4	0.281	0.281	0.281	0.281	0.281	0.281	0.281	0.281	0.281	0.281	0.281	0.03
5	0.335	0.334	0.334	0.335	0.335	0.335	0.335	0.335	0.335	0.335	0.335	0.04
6	0.377	0.377	0.377	0.377	0.377	0.377	0.377	0.377	0.377	0.377	0.377	0.07
7	0.417	0.416	0.416	0.416	0.417	0.418	0.417	0.417	0.417	0.416	0.417	0.15
8	0.472	0.472	0.472	0.472	0.469	0.470	0.469	0.472	0.472	0.472	0.471	0.31
9	0.497	0.498	0.497	0.498	0.498	0.498	0.497	0.497	0.497	0.497	0.497	0.10
10	0.516	0.515	0.516	0.516	0.516	0.516	0.516	0.516	0.516	0.516	0.516	0.07
11	0.554	0.554	0.552	0.549	0.551	0.553	0.553	0.554	0.551	0.554	0.552	0.29
12	0.639	0.640	0.640	0.640	0.642	0.643	0.640	0.640	0.640	0.640	0.640	0.17
13	0.666	0.667	0.666	0.666	0.666	0.666	0.667	0.667	0.667	0.666	0.667	0.08
14	0.699	0.698	0.698	0.697	0.698	0.699	0.698	0.697	0.699	0.699	0.698	0.12
15	0.907	0.907	0.907	0.907	0.907	0.907	0.907	0.907	0.907	0.908	0.907	0.03
16(S)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-
17	1.024	1.023	1.022	1.024	1.024	1.023	1.023	1.023	1.023	1.023	1.023	0.05
18	1.054	1.053	1.053	1.049	1.053	1.053	1.051	1.052	1.053	1.055	1.053	0.17
19	1.125	1.126	1.124	1.124	1.126	1.126	1.126	1.124	1.124	1.125	1.125	0.08
20	1.246	1.245	1.246	1.247	1.246	1.247	1.246	1.245	1.247	1.247	1.246	0.06
21	1.254	1.253	1.252	1.255	1.253	1.253	1.254	1.254	1.252	1.252	1.253	0.10
22	1.328	1.329	1.330	1.331	1.332	1.334	1.329	1.330	1.332	1.333	1.331	0.13
23	1.355	1.353	1.350	1.353	1.351	1.350	1.348	1.350	1.351	1.354	1.351	0.16
24	1.392	1.393	1.395	1.395	1.393	1.397	1.395	1.394	1.396	1.393	1.394	0.11
25	1.458	1.460	1.453	1.458	1.458	1.460	1.458	1.457	1.457	1.456	1.457	0.14
26	1.526	1.527	1.525	1.523	1.523	1.529	1.530	1.528	1.530	1.527	1.527	0.17
27	1.968	1.969	1.967	1.966	1.964	1.963	1.971	1.966	1.964	1.964	1.966	0.14
28	2.008	2.007	2.004	2.002	2.003	2.006	2.007	2.004	2.002	2.004	2.005	0.11
29	2.058	2.051	2.053	2.052	2.050	2.051	2.053	2.055	2.051	2.057	2.053	0.13

表 2

共有峰相对峰面积(同批次药材)

Tab. 2 The relative retention areas of common peaks and their RSDs (the same batches of herbs)

峰号	样品编号										均值	RSD/%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10		
1	0.115	0.111	0.111	0.110	0.114	0.114	0.116	0.113	0.111	0.115	0.113	2.04
2	1.273	1.265	1.246	1.224	1.227	1.254	1.251	1.265	1.246	1.224	1.247	1.41
3	0.184	0.173	0.170	0.176	0.171	0.182	0.175	0.185	0.170	0.167	0.175	3.65
4	0.204	0.215	0.212	0.200	0.203	0.200	0.199	0.197	0.195	0.209	0.203	3.28
5	0.029	0.026	0.027	0.028	0.031	0.033	0.030	0.036	0.033	0.030	0.030	10.11
6	0.064	0.060	0.058	0.069	0.066	0.071	0.062	0.057	0.066	0.069	0.064	7.52
7	0.068	0.066	0.063	0.060	0.066	0.074	0.072	0.065	0.065	0.060	0.066	7.34
8	0.022	0.022	0.022	0.022	0.022	0.022	0.023	0.022	0.022	0.022	0.022	1.43
9	0.094	0.095	0.092	0.089	0.093	0.087	0.092	0.090	0.088	0.097	0.092	3.26
10	0.528	0.517	0.504	0.528	0.466	0.410	0.402	0.506	0.385	0.426	0.467	12.10
11	0.059	0.057	0.066	0.063	0.059	0.066	0.065	0.059	0.056	0.058	0.061	6.18
12	0.109	0.108	0.111	0.117	0.113	0.112	0.114	0.111	0.113	0.112	0.112	2.24
13	0.100	0.095	0.093	0.093	0.096	0.098	0.094	0.096	0.093	0.098	0.095	2.77
14	0.336	0.357	0.382	0.390	0.325	0.312	0.357	0.363	0.317	0.328	0.347	7.80
15	0.103	0.096	0.094	0.095	0.099	0.091	0.093	0.097	0.097	0.095	0.096	3.48
16(S)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-
17	0.065	0.063	0.058	0.062	0.069	0.072	0.062	0.059	0.060	0.065	0.063	6.69
18	0.440	0.387	0.411	0.387	0.346	0.417	0.391	0.412	0.401	0.337	0.393	8.01
19	1.855	1.675	1.821	1.702	1.788	1.732	1.775	1.769	1.713	1.692	1.752	3.37
20	0.106	0.100	0.097	0.096	0.093	0.095	0.091	0.099	0.103	0.101	0.098	4.59
21	0.118	0.122	0.116	0.113	0.122	0.116	0.113	0.111	0.113	0.113	0.116	3.44
22	0.363	0.350	0.355	0.363	0.390	0.374	0.355	0.352	0.379	0.371	0.365	3.57
23	0.137	0.141	0.139	0.143	0.140	0.139	0.143	0.140	0.144	0.146	0.141	1.82
24	0.073	0.068	0.066	0.064	0.071	0.065	0.069	0.070	0.066	0.064	0.067	4.54
25	0.033	0.039	0.035	0.032	0.039	0.041	0.038	0.030	0.030	0.030	0.035	12.07
26	0.142	0.143	0.137	0.139	0.142	0.141	0.139	0.143	0.144	0.137	0.141	1.77
27	0.034	0.031	0.033	0.030	0.038	0.036	0.032	0.031	0.028	0.036	0.033	9.48
28	0.012	0.012	0.012	0.013	0.013	0.014	0.011	0.011	0.012	0.011	0.012	7.28
29	0.028	0.028	0.031	0.028	0.030	0.035	0.033	0.031	0.036	0.034	0.031	9.34

表 3

共有峰相对保留时间(不同批次药材)

Tab. 3 The relative retention time of common peaks and their RSDs (the different batches of herbs)

峰号	样品编号										均值	RSD/%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10		
1	0.186	0.185	0.183	0.184	0.189	0.186	0.182	0.184	0.184	0.183	0.185	0.95
2	0.198	0.195	0.197	0.198	0.197	0.195	0.202	0.199	0.197	0.197	0.197	0.98
3	0.231	0.232	0.232	0.230	0.232	0.232	0.232	0.232	0.232	0.232	0.232	0.24
4	0.281	0.284	0.281	0.281	0.281	0.281	0.281	0.281	0.281	0.281	0.281	0.35
5	0.335	0.334	0.334	0.335	0.336	0.335	0.335	0.335	0.335	0.335	0.335	0.14
6	0.377	0.377	0.380	0.377	0.377	0.377	0.377	0.377	0.377	0.377	0.377	0.25
7	0.417	0.416	0.416	0.416	0.417	0.419	0.417	0.417	0.417	0.416	0.417	0.19
8	0.472	0.472	0.472	0.472	0.469	0.470	0.469	0.472	0.472	0.472	0.471	0.30
9	0.497	0.498	0.497	0.498	0.498	0.493	0.497	0.495	0.497	0.497	0.497	0.33
10	0.516	0.515	0.504	0.516	0.516	0.516	0.516	0.516	0.516	0.516	0.515	0.70
11	0.554	0.554	0.549	0.549	0.548	0.553	0.553	0.554	0.551	0.554	0.552	0.44
12	0.640	0.640	0.640	0.640	0.642	0.643	0.640	0.640	0.640	0.640	0.641	0.16
13	0.666	0.662	0.666	0.658	0.666	0.666	0.667	0.667	0.667	0.666	0.665	0.45
14	0.699	0.698	0.698	0.697	0.698	0.699	0.683	0.697	0.699	0.699	0.697	0.68
15	0.907	0.907	0.907	0.907	0.912	0.907	0.907	0.907	0.907	0.908	0.907	0.18
16(S)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-
17	1.024	1.023	1.022	1.024	1.025	1.022	1.023	1.023	1.023	1.023	1.023	0.09
18	1.054	1.053	1.055	1.049	1.053	1.053	1.051	1.052	1.053	1.055	1.053	0.18

续表3

峰号	样品编号										均值	RSD/%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10		
19	1.125	1.126	1.124	1.124	1.093	1.126	1.109	1.124	1.124	1.125	1.120	0.94
20	1.246	1.245	1.246	1.239	1.246	1.230	1.246	1.245	1.247	1.247	1.244	0.43
21	1.254	1.253	1.252	1.255	1.256	1.253	1.252	1.254	1.252	1.252	1.253	0.12
22	1.328	1.329	1.330	1.341	1.332	1.329	1.329	1.330	1.332	1.333	1.331	0.27
23	1.355	1.353	1.350	1.353	1.351	1.350	1.332	1.350	1.346	1.354	1.349	0.50
24	1.393	1.393	1.395	1.395	1.398	1.397	1.394	1.394	1.396	1.393	1.395	0.12
25	1.458	1.460	1.436	1.458	1.458	1.460	1.458	1.457	1.457	1.456	1.456	0.48
26	1.526	1.527	1.525	1.531	1.523	1.513	1.530	1.528	1.530	1.527	1.526	0.34
27	1.968	1.969	1.967	1.966	1.980	1.963	1.971	1.966	1.964	1.964	1.968	0.26
28	2.008	2.007	2.004	2.002	2.003	2.006	2.015	2.004	2.002	2.004	2.005	0.19
29	2.058	2.051	2.053	2.052	2.033	2.051	2.053	2.055	2.051	2.057	2.051	0.33

表4 共有峰相对峰面积(不同批次药材)

Tab.4 The relative retention areas of common peaks and their RSDs (the different batches of herbs)

峰号	样品编号										均值	RSD/%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10		
1	0.115	0.111	0.111	0.110	0.122	0.114	0.116	0.113	0.111	0.115	0.114	3.30
2	1.273	1.265	1.326	1.224	1.173	1.146	1.251	1.265	1.246	1.224	1.239	4.13
3	0.184	0.168	0.170	0.186	0.171	0.182	0.167	0.185	0.170	0.167	0.175	4.70
4	0.204	0.215	0.198	0.194	0.203	0.213	0.199	0.197	0.195	0.209	0.203	3.70
5	0.029	0.026	0.033	0.028	0.039	0.033	0.035	0.036	0.033	0.030	0.032	12.82
6	0.064	0.060	0.069	0.069	0.060	0.071	0.062	0.057	0.066	0.069	0.065	7.47
7	0.068	0.066	0.063	0.078	0.066	0.058	0.072	0.065	0.065	0.060	0.066	8.92
8	0.022	0.022	0.023	0.022	0.024	0.022	0.022	0.022	0.022	0.022	0.022	3.39
9	0.094	0.095	0.084	0.089	0.088	0.087	0.092	0.107	0.088	0.097	0.092	6.95
10	0.528	0.517	0.423	0.528	0.332	0.410	0.402	0.506	0.385	0.426	0.446	15.52
11	0.059	0.057	0.058	0.063	0.059	0.055	0.065	0.059	0.056	0.058	0.059	5.35
12	0.109	0.108	0.125	0.117	0.121	0.112	0.108	0.111	0.113	0.112	0.114	4.96
13	0.100	0.095	0.085	0.093	0.096	0.098	0.107	0.096	0.093	0.098	0.096	6.11
14	0.336	0.357	0.435	0.390	0.325	0.473	0.357	0.363	0.317	0.328	0.368	13.82
15	0.103	0.096	0.107	0.095	0.099	0.086	0.093	0.097	0.086	0.095	0.096	6.92
16(S)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-
17	0.065	0.063	0.069	0.062	0.069	0.063	0.062	0.067	0.060	0.065	0.065	4.56
18	0.440	0.387	0.303	0.387	0.346	0.337	0.391	0.412	0.401	0.337	0.374	11.14
19	1.855	1.675	1.740	1.702	1.788	1.678	1.775	1.769	1.713	1.692	1.739	3.33
20	0.106	0.100	0.089	0.096	0.085	0.095	0.088	0.099	0.103	0.101	0.096	7.12
21	0.118	0.122	0.116	0.121	0.122	0.116	0.124	0.111	0.113	0.113	0.118	3.80
22	0.363	0.350	0.436	0.363	0.390	0.320	0.355	0.326	0.379	0.371	0.365	9.01
23	0.137	0.141	0.150	0.143	0.140	0.145	0.143	0.135	0.144	0.146	0.142	3.03
24	0.073	0.068	0.058	0.064	0.060	0.065	0.069	0.056	0.066	0.064	0.064	7.88
25	0.033	0.039	0.029	0.032	0.039	0.032	0.038	0.030	0.030	0.030	0.033	11.73
26	0.142	0.143	0.137	0.150	0.142	0.141	0.142	0.143	0.144	0.137	0.142	2.48
27	0.034	0.031	0.046	0.030	0.033	0.036	0.051	0.031	0.028	0.036	0.036	20.32
28	0.012	0.012	0.012	0.015	0.013	0.014	0.014	0.011	0.012	0.011	0.013	9.46
29	0.028	0.028	0.042	0.028	0.033	0.035	0.033	0.039	0.036	0.034	0.034	14.29

5.2 指纹图谱相似度计算 应用国家药典委员会中药指纹图谱相似度评价系统计算软件,计算各样品指纹图谱与共有模式对照图谱 R 之间的相似度。结果同批次药材制备有效部位相似度在 0.994 ~ 0.998,不同批次药材制备有效部位相似度在 0.913 ~ 0.975 之间。

6 指纹图谱与组方药材的相关性分析

采用 2.1 项和 2.3 项下方法,分别制备组方药材制首乌、山楂、荷叶、决明子供试液,及分别缺制首乌、山楂、荷叶、决明子的阴性样品溶液。按 3 项下色谱条件进样分析,获得各组方药材及阴性样品 HPLC 色谱图。以色谱峰相对保留时间相对偏差为

指标,对降脂宁指纹图谱共有峰与组方药材的相关性进行分析。结果峰1~4、8和9归属于山楂,峰5、6、11~13、15和17~19归属于荷叶,峰7、10、14和16归属于制首乌,峰20~29归属于决明子。

7 讨论

7.1 色谱条件选择 色谱柱分别试用了 Agilent TC-C₁₈柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)、Waters Symmetry Shield RP₁₈柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm)、SunFire C₁₈柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm)、Nova-Pak C₁₈柱(3.9 mm×150 mm, 5 μm)和 Kromasil C₁₈柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm),以 Agilent TC-C₁₈柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)分离度好,色谱峰对称性好,基线平稳。分别选取 238、254、280、320 nm 作为检测波长,以色谱峰数目及其积分面积为指标,确定检测波长为 280 nm。分别用水-乙腈、水-甲醇、0.1% 甲酸水溶液-乙腈、0.01% 甲酸水溶液-乙腈混合溶剂为流动相,以不同洗脱梯度进行试验,确定了流动相及其洗脱梯度。

7.2 供试品溶液制备方法考察 取降脂宁调脂抗氧化有效部位 4 份,每份约 25 mg,精密称定,置锥形瓶中,分别加入水、甲醇、50% 甲醇和 50% 乙醇各 10 mL,称重,超声提取 30 min,放冷,称重,用相应溶剂补足减失的重量,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。精密吸取供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,得到不同溶剂提取的可检出成分谱。经过分析可知 50% 乙醇提取获得的成分数量较多且含量高,故选择 50% 乙醇作为溶剂。另取降脂宁调脂抗氧化有效部位 3 份,每份约 25 mg,精密称定,置锥形瓶中,分别用 50% 乙醇 10 mL 以超声 30 min、回流 30 min、浸泡 24 h 方式进行提取,放冷,称重,用 50% 乙醇补足减失的重量,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。精密吸取供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,得到不同提取方式的可检出成分谱。经过分析可知超声提取获得的成分数量较多且含量高,故选择超声提取方式。

7.3 指纹图谱评价 分别比较由同批次药材和不同批次药材制备的 10 批降脂宁调脂抗氧化有效部位指纹图谱,发现其指纹图谱中主要峰群的整体图貌基本一致,虽然不同产地样品中各成分含量的相对比值有一定差别,但 10 批样品指纹图谱相似度分别均在 0.99 和 0.90 以上。表明降脂宁调脂抗氧化有效部位制备工艺稳定、重现性良好,建立基于调脂

抗氧化有效部位的降脂宁 HPLC 指纹图谱是可行的,不仅能够从整体上全面而有效地控制降脂宁的质量^[10],而且能够实现中药复方指纹图谱与其功效的有效链接,实现指纹图谱化学物质属性与生物活性表征的有机结合,使指纹图谱的质量控制方法更有针对性。

7.4 复方指纹图谱与组方药材的相关性分析 以降脂宁为研究对象,在建立复方 HPLC 指纹图谱基础上,通过对各组分药材及其阴性样品 HPLC 图谱的检测,以色谱峰相对保留时间相对偏差为考察指标,对降脂宁指纹图谱中的 29 个共有色谱峰进行归属。其中峰 1~4、8、9 来自山楂;峰 20~29 来自决明子;峰 5、6、11~13、15、17~19 来自荷叶;峰 7、10、14、16 来自制首乌。该指纹图谱相关性分析方法可较为准确地判别降脂宁指纹图谱中主要色谱峰的归属,有助于快速确定降脂宁的化学成分组成;同时,若结合降脂宁药理学指标分析,又可借此建立降脂宁与组方药材药效间的联系,分析各药材在降脂宁整体药效中的作用,对降脂宁的组方原理和配伍理论研究也具有积极意义。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准. 中药成方制剂(第十三册) [S]. 1997:116.
- [2] 关建红, 薛征, 任晋斌. 降脂宁调脂及抗动脉粥样硬化的研究 [J]. 中药药理与临床, 2001, 17(4):29.
- [3] 杨英, 刘斌, 毕力夫, 等. 降脂宁有效部位及其药效组分对脐静脉内皮细胞损伤的保护作用 [J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32(3):160-163.
- [4] 杨英, 刘斌, 毕力夫, 等. 降脂宁调血脂及抗脂质过氧化作用的实验研究 [J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(5):647-649.
- [5] 杨英, 刘斌, 王伟, 等. 降脂宁有效部位及其药效组分对胆固醇代谢的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32(9):603-607.
- [6] 徐冬艳, 刘斌, 王伟. 基于抗氧化效应的降脂宁质量评价方法研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10):44-47.
- [7] 罗文, 刘斌, 王伟, 等. 何首乌药材 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2008, 31(8):557-560.
- [8] 罗文, 刘斌, 王伟, 等. 山楂药材 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(1):39-42.
- [9] 罗文, 刘斌, 王伟, 等. 决明子药材 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32(2):115-117.
- [10] 罗文, 刘斌, 王伟, 等. 基于降脂宁调脂抗氧化有效部位 HPLC 指纹图谱的多指标成分定量方法研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(6):413-416.