

龙加通络胶囊 UPLC 与 HPLC 指纹图谱的比较

郑雅楠¹, 廖茂梁¹, 孙卫^{1*}, 王现昌²

(1. 天津药物研究院, 天津 300193; 2. 天津世纪天龙药业有限公司, 天津 300000)

[摘要] 目的:建立龙加通络胶囊的 HPLC 和 UPLC 特征指纹图谱分析方法,比较 UPLC 与 HPLC 分析龙加通络胶囊指纹图谱的效果,为快速评价龙加通络胶囊的质量,完善其质量控制方法提供依据。方法:UPLC 色谱系统采用 Agilent Poroshell 120 Bonus-RP 色谱柱(3.0 mm × 50 mm, 2.7 μm),流动相乙腈-水溶液,梯度洗脱,检测波长 203 nm,柱温 25 ℃;HPLC 色谱系统采用 Agilent Zorbox ODS 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水溶液,梯度洗脱,检测波长 203 nm,柱温 35 ℃;并分别采用 UPLC 与 HPLC 对 10 批龙加通络胶囊进行指纹图谱分析。结果:分别建立了龙加通络胶囊的 UPLC 与 HPLC 指纹图谱共有模式。以薯蓣皂苷为参照峰,其中 UPLC 标识出 17 个共有峰,HPLC 标识出 13 个共有峰,10 批样品的相似度均 > 0.9。结论:2 种方法均可用于龙加通络胶囊质量控制,分离效果好、稳定性高、重复性好,UPLC 较 HPLC 更高效、快速、灵敏。

[关键词] 龙加通络胶囊; 指纹图谱; 超高效液相色谱; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)21-0066-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015210066

Comparison of UPLC and HPLC Fingerprints of Longjia Tongluo Capsules ZHENG Ya-nan¹, LIAO Mao-liang¹, SUN Wei^{1*}, WANG Xian-chang² (1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China; 2. Tianjin TianLong Pharmacy, Tianjin 300000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish and compare the UPLC and HPLC fingerprints of Longjia Tongluo capsules (LTC), and provide basis for quickly assessing the quality of Longjia Tongluo capsules and improving their quality control. **Method:** UPLC separation was performed on a Agilent Poroshell 120 Bonus-RP column (3.0 mm × 50 mm, 2.7 μm) at 25 ℃ through gradient elution with acetonitrile-water mixture and detection at a wavelength of 203 nm. HPLC separation was performed on a Agilent Zorbox ODS column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) at 35 ℃ through gradient elution with acetonitrile-water mixture and detection at a wavelength of 203 nm. HPLC and UPLC methods were used respectively to analyze the fingerprint of 10 batches of Longjia Tongluo capsules. **Result:** The common mode of UPLC and HPLC was established for Longjia Tongluo capsules. Taken Dioscin as the reference peak, 17 common peaks were identified in UPLC chromatography and 13 common peaks were identified in HPLC chromatography. The similarity of 10 batches of samples was over 0.9. **Conclusion:** Both the UPLC and HPLC methods could be used for the quality control of Longjia Tongluo capsule, with good separation effect, reproducibility and stability. Compared to HPLC, the UPLC method is more efficient, rapid, and sensitive.

[Key words] Longjia Tongluo capsule; fingerprint; UPLC; HPLC

龙加通络胶囊(国药准字 Z20133032)为天津世纪天龙药业有限公司于 2013 年上市的中药新品种,由穿山龙、刺五加等中药组成,具有活血化瘀、补中益气、舒筋活络之功效。临床用于治疗气虚血瘀证之中风,主要含有皂苷类成分和黄酮类成分^[1-4]。

龙加通络胶囊作为中药复方制剂,其提取工艺复杂、工艺参数多样,影响该药的质量因素众多,现工艺质量评价仅限于对全方中穿山龙指标性成分薯蓣皂苷元进行了定量研究^[5]。从传统中医药理论的观点看,单一从指标成分的含量控制难以全面控制产品

[收稿日期] 20140818(010)

[基金项目] 天津市科技计划项目(12ZCDZSY11600,14ZCZDSY00005);天津市应用基础与前沿技术研究计划(14JCQNJC13800)

[第一作者] 郑雅楠,副研究员,硕士,从事中药新药开发研究,Tel:022-23006323,E-mail:zhengyn@tjipr.com

[通讯作者] *孙卫,副研究员,从事中药新药开发研究,Tel:022-23006323,E-mail:sunw@tjipr.com

质量^[6]。本研究以市售不同批次生产的龙加通络胶囊为研究对象,应用 HPLC 指纹图谱方法提升了龙加通络胶囊的质控标准,但存在耗时长、洗脱条件复杂,色谱峰响应值低、溶媒峰干扰多等缺陷。采用 UPLC 技术^[7],而分离速度、灵敏度和分辨率均大幅提高,建立 UPLC 指纹图谱,减少了时间和溶剂消耗^[8],以期完善该制剂的质量评价体系,为进一步探讨引起其质量差异的原因奠定基础,以保证该药的质量和临床疗效稳定。

1 材料

1260 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司,带有二元高压梯度泵、自动进样器、柱温箱和 DAD 全波长检测器, model C5860A 型超声波清洗仪(CBL Photoelectron Technology Co. Lid.), AB204-N 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo)。

10 个不同批次的龙加通络胶囊样品(S1 ~ S10)由天津世纪天龙药业有限公司提供(批号 1312202, 1309202, 1309201, 1310201, 1310202, 1310203, 1311201, 1311202, 1311203, 1312201)。

薯蓣皂苷(批号 111707-200501),原薯蓣皂苷(批号 111937-201201),伪原薯蓣皂苷(批号 111855-201302),异嗪皮啶(批号 110837-201206),紫丁香苷(批号 111574-200603),刺五加苷 E(批号 111713-200502)对照品均购自中国食品药品检定研究院。乙腈、甲醇均为色谱纯;水为屈臣氏蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

2.1.1 UPLC 色谱条件 Agilent Poroshell 120 Bonus-RP 色谱柱(3.0 mm × 50 mm, 2.7 μm),流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0 ~ 8 min, 5% ~ 80% A),流速 0.8 mL·min⁻¹,检测波长 203 nm,柱温 25 °C,进样量 10 μL。

2.1.2 HPLC 色谱条件 Agilent Zorbox ODS 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0 ~ 80 min, 5% ~ 80% A),流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 203 nm,柱温 35 °C,进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备 取薯蓣皂苷、原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷、紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶对照品适量,精密称定,加甲醇配制成含薯蓣皂苷、原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷、紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶质量浓度分别为 0.286 4, 0.555 0, 0.517 0, 0.083 2, 0.298 0, 0.298 0 g·L⁻¹ 的混合对照品溶液,备用。

2.3 供试品溶液的制备 称取上述 S1 ~ S10 号龙加通络胶囊样品粉末约 2 g,精密称定,置 100 mL 具塞三角瓶中,加甲醇 50 mL,称定质量,超声提取 15 min(功率 100 W,频率 40 Hz),放至室温,加甲醇补足减失的质量,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一份供试品溶液,分别按 2.1.1 及 2.1.2 项下色谱条件连续进样 6 次,在 UPLC 色谱条件下测得各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 分别在 0.1% ~ 0.8%, 1.0% ~ 2.2%,在 HPLC 色谱条件下测得各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 分别在 0.2% ~ 1.0%, 1.3% ~ 2.3%,符合指纹图谱技术要求^[9]。表明 UPLC 和 HPLC 仪器的精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取同一批样品 6 份,按 2.3 项下操作制备供试品溶液,分别按 2.1.1 及 2.1.2 项下色谱条件分别进样,在 UPLC 色谱条件下测得各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 分别在 0.2% ~ 0.8%, 1.0% ~ 2.5%,在 HPLC 色谱条件下测得各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 分别在 0.4% ~ 1.3%, 1.6% ~ 2.7%,符合指纹图谱技术要求^[9]。表明本方法的重复性良好,适用于龙加通络胶囊 UPLC 和 HPLC 指纹图谱的分析。

2.4.3 稳定性试验 取同一份供试品溶液,分别按 2.1.1 及 2.1.2 项下色谱条件下分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 进样测定,在 UPLC 色谱条件下测得各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 分别在 0.2% ~ 0.9%, 1.1% ~ 2.4%,在 HPLC 色谱条件下测得各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 分别在 0.5% ~ 1.8%, 1.8% ~ 2.9%,符合指纹图谱技术要求^[9]。表明供试品溶液在 24 h 稳定。

2.5 指纹图谱的建立与共有指纹峰的指认

2.5.1 指纹图谱的建立 取 10 批龙加通络胶囊样品,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,分别进样,记录不同批次龙加通络胶囊 UPLC 和 HPLC 指纹图谱。将指纹图谱导入国家药典委员会发布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件”(2004A 版),根据色谱图中各色谱峰的相对保留时间,进行谱峰匹配,并生成对照指纹图谱,结果见图 1 ~ 4。

2.5.2 共有指纹峰的确定 10 批龙加通络胶囊生成的 UPLC 对照指纹图谱,共有指纹峰 17 个,以 13 号峰(薯蓣皂苷)为参照峰(S),通过与对照品对照,

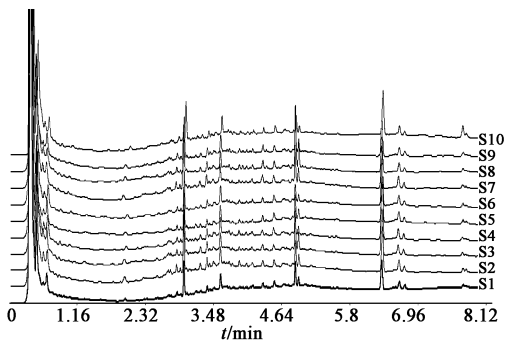
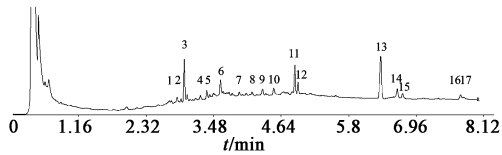


图1 10批龙加通络胶囊 UPLC 指纹图谱叠加
Fig.1 UPLC overlapped fingerprint of 10 samples of LTC



1. 紫丁香苷;3. 刺五加苷 E;4. 异嗪皮啶;9. 原薯蓣皂苷;10. 伪原薯蓣皂苷;13. 薯蓣皂苷

图2 10批龙加通络胶囊 UPLC 对照指纹谱
Fig.2 UPLC reference fingerprint of 10 samples of LTC

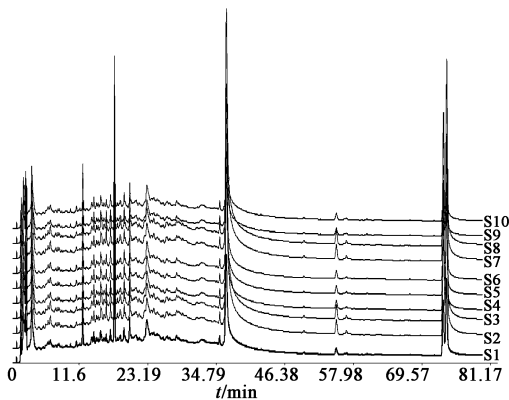
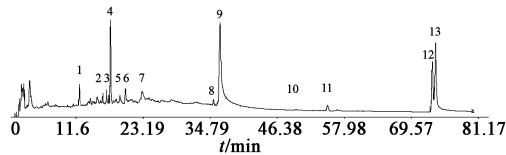


图3 10批龙加通络胶囊 HPLC 指纹图谱叠加
Fig.3 HPLC overlapped fingerprint of 10 samples of LTC



1. 紫丁香苷;4. 刺五加苷-E;6. 异嗪皮啶;8. 原薯蓣皂苷;10. 伪原薯蓣皂苷;11. 薯蓣皂苷

图4 10批龙加通络胶囊 HPLC 对照指纹谱
Fig.4 HPLC reference fingerprint of 10 samples of LTC

分别指认1号峰为紫丁香苷,3号峰为刺五加苷 E,4号峰为异嗪皮啶,9号峰为原薯蓣皂苷,10号峰为伪原薯蓣皂苷,13号峰为薯蓣皂苷;10批龙加通络胶囊生成的 HPLC 对照指纹图谱,共有指纹峰 13 个,

以 11 号峰(薯蓣皂苷)为参照峰(S),通过与对照品对照,分别指认 1 号峰为紫丁香苷,4 号峰为刺五加苷 E,6 号峰为异嗪皮啶,8 号峰为原薯蓣皂苷,10 号峰为伪原薯蓣皂苷,11 号峰为薯蓣皂苷。

2.5.3 相似度评价 应用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件”(2004A 版)对龙加通络胶囊药材指纹图谱进行相似度计算。结果表明,其中 10 批龙加通络胶囊样品与相应对照图谱的相似度均在 0.9 以上,表明该厂家不同批次样品质量稳定,见表 1。

表 1 10 批龙加通络胶囊相似度

Table 2 Similarity of 10 samples of LTC

No.	相似度	
	UPLC	HPLC
S1	0.982	0.980
S2	0.981	0.981
S3	0.984	0.985
S4	0.963	0.970
S5	0.984	0.985
S6	0.973	0.966
S7	0.984	0.989
S8	0.938	0.927
S9	0.991	0.983
S10	0.983	0.989

3 讨论

3.1 流动相的选择^[10-11] 考察了不同比例的甲醇-磷酸水溶液、乙腈-磷酸水溶液、甲醇-水溶液、乙腈-水溶液 4 个流动相系统,结果显示以乙腈-水溶液作为流动相系统时,各峰分离度及峰型良好。

3.2 测定波长的选择 由于皂苷类成分的最大吸收波长为 203 nm 末端吸收,在 2010 年版《中国药典》中,刺五加中紫丁香苷、刺五加苷 E、异嗪皮啶的检测波长为 220 nm(最大吸收波长有 223 nm 和 265 nm),本实验使用 Agilent-DAD 检测器进行紫外全波长扫描(200 ~ 400 nm),分别对 203,210,220,265 nm 等波长进行考察,结果显示在 203 nm 波长下皂苷类成分响应值最高,紫丁香苷、刺五加苷 E、异嗪皮啶色谱峰峰响应值影响不大,且色谱峰个数较多,综合比较基线噪音、共有峰响应值、色谱峰个数后,选择 203 nm 作为本实验的检测波长。

3.3 柱温的选择^[12-14] 本实验将柱温分别控制在 25,30,35 ℃ 进行实验,发现在 UPLC 条件下随温度的升高,各色谱峰的分度度变差,分析时间缩短。在

25 ℃条件下进行 UPLC 指纹图谱考察各峰分离度及峰型最好;在 HPLC 条件下随温度上高,个色谱峰的分离度与分析时间无明显变化。在满足测定情况下,为提高色谱柱使用寿命,分别选择 25 ℃(UPLC), 35 ℃(HPLC)。

3.4 龙加通络胶囊质量分析 本实验以龙加通络胶囊原有质量标准为基础,建立了龙加通络胶囊 UPLC 和 HPLC 指纹图谱。两种方法简便、可靠,专属性强,精密性、稳定性、重复性均良好。对 10 个批次龙加通络胶囊 UPLC 和 HPLC 指纹图谱进行了分析和比较,相似度评价均 >0.9,结果表明,该企业不同批次的样品指纹图谱相似度较高,质量较稳定。

3.5 龙加通络胶囊指纹图谱 UPLC 法与 HPLC 法比较 实验结果显示,UPLC 法可标示出 17 个共有峰,HPLC 法标示出 13 个共有峰,说明 UPLC 的色谱分离效果更好、灵敏度更高,特别是末端吸收的皂苷类成分,色谱峰响应值明显增加;UPLC 法色谱峰保留时间全部在 8 min 内,HPLC 法谱峰保留时间全部在 80 min 内,说明 UPLC 的分析效率更高,可显著缩短分析时间,减少流动相的消耗;与 HPLC 比较 UPLC 洗脱条件更简单,色谱峰的漂移时间较短,色谱峰易于匹配;从相似度评价中分析,UPLC 法与 HPLC 法结果基本一致,说明两种方法均可用于龙加通络胶囊的质量控制与评价,龙加通络胶囊主要含有皂苷类成分和黄酮类成分,特别是皂苷类成分为 203 nm 末端紫外吸收,HPLC 色谱响应值较低,与 HPLC 法相比 UPLC 法具有快速、灵敏、高分离度和节省溶剂等优点。

[参考文献]

[1] 王宝庆,李学彬,田志发,等. 穿山龙现代研究概况[J]. 中国林副特产,2010(5):96-97.

[2] 王桂香,赵英日,崔红华,等. 穿山龙总皂苷提取工艺研究[J]. 中国民族民间医药,2013,22(16):10-13.

[3] 黄桂香. 刺五加药理研究及临床应用概况[J]. 时珍国医国药,2002,13(8):496-497.

[4] 郭冷秋,张博,李廷利. 刺五加总苷的提取及纯化研究进展[J]. 中医药学报,2012,40(4):127-129.

[5] 徐雄良,张志荣,柯尊洪. RP-HPLC 法测定穿山龙中薯蓣皂苷元的含量[J]. 中国中药杂志,2013,28(9):885-887.

[6] 肖小河,金城,赵中振,等. 论中药质量控制与评价模式的创新与发展[J]. 中国中药杂志,2007,32(14):1378-1381.

[7] 赵容. UPLC 在药物分析中的应用[J]. 黑龙江医药,2014,27(2):283-285.

[8] Lucie Nováková, Ludmila Matysová, Petr Solich. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis[J]. Talanta,2006,68(3):908-918.

[9] 王玺,王文宇,张克荣,等. 中药 HPLC 指纹图谱相似性研究的探讨[J]. 沈阳药科大学学报,2003,20(5):360-362.

[10] 张金,张超. HPLC 测定祖师麻不同部位紫丁香苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(15):96-98.

[11] 薛珍珍,晏仁义,余盛贤,等. HPLC-DAD 测定厚朴中 6 种活性成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(22):45-49.

[12] 梁国华,苏树芬. 高效液相色谱/串联质谱法测定肿节风分散片中异嗪皮啶含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(22):148-150.

[13] 潘海峰,洪霞,李艳荣. HPLC-ELSD 测定穿山龙中薯蓣皂苷元[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(8):119-121.

[14] 员荣,孙丽丽,杨立伟,等. 咳特灵胶囊的 UPLC 指纹图谱及主成分的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(6):37-40.

[责任编辑 顾雪竹]