

# 康复新液 UPLC 指纹图谱研究

吴红梅<sup>1</sup>, 徐峰<sup>2</sup>, 刘李梅<sup>1</sup>, 王祥培<sup>2\*</sup>, 杨明<sup>1,3</sup>

(1. 成都中医药大学中药材标准化教育部重点实验室, 成都 611137;

2. 贵阳中医学院, 贵阳 550002; 3. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

**[摘要]** **目的:** 建立康复新液的 UPLC 特征指纹图谱分析方法, 为快速评价其质量提供依据。**方法:** 采用 ZORBAX RRHD Eclipse plus C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm), 流动相甲醇-0.05% 乙酸溶液, 检测波长 256 nm。对不同厂家生产的 15 批康复新液进行研究, 通过中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版和聚类分析对指纹图谱进行分析。**结果:** 11 批湖南科伦药业与 3 批四川好医生攀西药业生产的康复新液标定了 10 个共有峰, 相似度 > 0.990; 与对照指纹图谱比较, 内蒙古京新药业生产的康复新液相似度 < 0.900, 标定 8 个共有峰, 指认了指纹图谱中 5 个共有峰。**结论:** 建立的方法快速有效, 可用于评价康复新液的质量。

**[关键词]** 康复新液; 指纹图谱; 聚类分析; 超高效液相色谱

**[中图分类号]** R283.6, R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)08-0059-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013080059

## Investigation of UPLC Fingerprint for Kangfuxin Liquid

WU Hong-mei<sup>1</sup>, XU Feng<sup>2</sup>, LIU Li-mei<sup>1</sup>, WANG Xiang-pei<sup>2\*</sup>, YANG Ming<sup>1,3</sup>

(1. Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicines, Ministry of Education, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 611137, China;

2. Guiyang College of TCM, Guiyang 550002, China;

3. Key Laboratory for Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish an UPLC characteristic chromatographic profile analysis method for Kangfuxin liquid, and provide basis for rapid evaluating quality of it. **Method:** Taking ZORBAX RRHD Eclipse plus C<sub>18</sub> column (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm), with methanol-0.05% acetic acid solution as mobile phase, detection wavelength 256 nm. Fifteen batches of Kangfuxin liquid from different manufacturers were investigated, fingerprint was analysed by 2004A edition of chromatographic fingerprint similarity evaluation system and cluster

**[收稿日期]** 20121115(008)

**[第一作者]** 吴红梅, 在读博士, 从事中药新剂型及新制剂研究, Tel: 18780089439, E-mail: 381176659@qq.com

**[通讯作者]** \* 王祥培, 教授, 博士, 从事中药及民族药的品种、品质与资源开发研究, E-mail: wxp0123@126.com

[3] 张小梅, 王云红, 杨荣平, 等. 青蒿素自乳化制剂的设计、优化及质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 59.

[4] 吴伟, 崔光华. 星点设计-效应面优化法及其在药学中的应用[J]. 国外医学——药学分册, 2000, 27(5): 292.

[5] 吴伟, 崔光华, 陆彬. 实验设计中多指标的优化星点设计和总评“归一值”的应用[J]. 中国药学杂志, 2000,

35(8): 530.

[6] Singh A, Worku Z A, Van-den-Mooter G. Oral formulation strategies to improve solubility of poorly water-soluble drugs[J]. Expert Opin Drug Deliv, 2011, 8(10): 1361.

[7] 陈伟. 细辛脑亚微乳及其鼻腔喷雾系统的研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2006.

**[责任编辑]** 仝燕

analysis software. **Result:** There were 10 common peaks in 11 batches of Kangfuxin liquid from Kelun pharmaceutical and 3 batches from Haoyisheng Panxi pharmaceutical, the peaks similarity was more than 0.990; However, only 8 common peaks in these productions from Inner Mongolia Jingxin pharmaceutical, the similarity was lower than 0.900 by comparing with the control fingerprint. Five common peaks were identified in the fingerprint. **Conclusion:** This established method was rapid and effective, it could be useful for quality evaluation of Kangfuxin liquid.

[ **Key words** ] Kangfuxin liquid; fingerprint; cluster analysis; UPLC

康复新液为美洲大蠊提取物制成的单方制剂,具有通利血脉、养阴生肌的功效。临床用于治疗瘀血阻滞、胃痛出血、胃及十二指肠溃疡等症,为卫生部药品标准《中药成方制剂》收载品种。目前,康复新液多通过测定总氨基酸含量来控制质量<sup>[1-2]</sup>,但难以达到控制质量的目的。同时,由于美洲大蠊的饲养基地较多,导致不同厂家生产的康复新液可能存在差异,因此,亟需建立一种快速有效的质量评价方法。目前,有报道研究美洲大蠊药材及其提取物的 HPLC 指纹图谱<sup>[3]</sup>,而有关康复新液的 UPLC 指纹图谱及不同厂家生产的该制剂稳定性研究均尚未见报道。UPLC 是近几年出现的一种新型液相色谱技术,与 HPLC 相比,能显著改善色谱峰的分离度和检测灵敏度<sup>[4-5]</sup>。本实验首次采用 UPLC 建立康复新液的指纹图谱分析方法,其色谱峰的保留时间均 < 23 min,极大地缩短了分析时间,为高效、快速地评价康复新液的质量提供参考。

### 1 材料

1290 型超高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),AG135 型电子天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司),中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004 A 版,国家药典委员会)。

葫芦巴碱、尿嘧啶、次黄嘌呤、腺苷、肌苷对照品(均购自中国药品生物制品检定所,批号分别为 110883-200502,100469-200401,140661-200903,879-200001,40669-201104),乙腈、甲醇为色谱纯,水为纯净水,其他试剂为分析纯,康复新液来源及批号见表 1。

### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** ZORBAX RRHD Eclipse plus C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm × 100 mm,1.8 μm),流动相甲醇(A)-0.05% 乙酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 7 min,1% ~ 8% A;7 ~ 10 min,8% ~ 14% A;10 ~ 12 min,14% ~ 21% A;12 ~ 17 min,21% ~ 59% A;17 ~ 20 min,59% ~ 85% A;20 ~ 23 min,85% ~ 100% A),分析时间 23 min,流速 0.2 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 256 nm,柱

表 1 不同批次康复新液的相似度比较

No.	康复新液来源		相似度	
	生产厂家	批号	平均值	中位数
S1	湖南中南科伦药业	M120409	0.985	0.989
S2	湖南中南科伦药业	M120410	0.986	0.989
S3	湖南中南科伦药业	M120411	0.991	0.991
S4	湖南中南科伦药业	M1204072	0.991	0.995
S5	湖南中南科伦药业	M1204081	0.996	0.996
S6	湖南中南科伦药业	M1204082	0.981	0.987
S7	湖南中南科伦药业	M1204121	0.981	0.970
S8	湖南中南科伦药业	M1204122	0.996	0.997
S9	湖南中南科伦药业	M1204141	0.993	0.990
S10	湖南中南科伦药业	M1204142	0.994	0.992
S11	湖南中南科伦药业	M110126	0.966	0.972
S12	四川好医生攀西药业	120311	0.983	0.977
S13	四川好医生攀西药业	120403	0.994	0.991
S14	四川好医生攀西药业	120537	0.982	0.978
S15	内蒙古京新药业	120403	0.729	0.728

温 35 ℃,进样量 0.3 μL。

**2.2 对照品溶液的制备** 分别称取葫芦巴碱、尿嘧啶、次黄嘌呤、腺苷、肌苷对照品适量,精密称定,加水溶解,制成葫芦巴碱、尿嘧啶、次黄嘌呤、肌苷、腺苷质量浓度分别为 20,20,20,20,50 mg·L<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,作为参照物溶液。

**2.3 供试品溶液的制备** 取各康复新液,过 0.22 μm 微孔滤膜,取续滤液,即得。

**2.4 阴性对照溶液的制备** 取甘油、苯甲酸钠及山梨酸,按处方比例制成不含美洲大蠊药材的阴性样品,按 2.3 项下方法制得阴性对照溶液。

### 2.5 方法学考察

**2.5.1 精密度试验** 取同一份供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,测得各共有峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%,说明仪器精密度良好,符合指纹图谱要求。

**2.5.2 重复性试验** 取同一批样品 6 份,分别按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行检测,测得各共有色谱峰相对保留时间及相对峰面积的 RSD 均  $< 3.0\%$ ,表明该方法重复性良好。

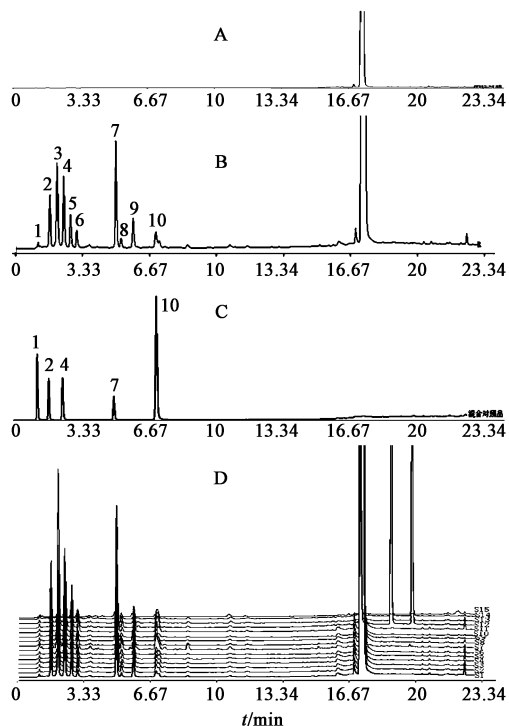
**2.5.3 稳定性试验** 取同一供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样,测得各共有色谱峰相对保留时间及相对峰面积的 RSD 均  $< 3.0\%$ ,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

## 2.6 指纹图谱的构建和解析

**2.6.1 共有峰的标记** 对 15 批康复新液进行指纹图谱分析,以肌苷(7 号峰)作为内参比峰,以峰的共有率  $> 80\%$  为依据,标定了 10 个共有峰,分别为 1 号峰(1.127 min), 2 号峰(1.712 min), 3 号峰(2.064 min), 4 号峰(2.399 min), 5 号峰(2.731 min), 6 号峰(3.044 min), 7 号峰(4.982 min), 8 号峰(5.248 min), 9 号峰(5.853 min) 和 10 号峰(6.986 min)。通过与对照品图谱比对,指认 1 号峰为葫芦巴碱, 2 号峰为尿嘧啶, 4 号峰为次黄嘌呤, 7 号峰为肌苷, 10 号峰为腺苷。见图 1。

**2.6.2 强峰标定** 将 15 批制剂的色谱图与对照图谱进行比较,发现 S8 与之相似度最高,于是将 S8 作为标准制剂。通过峰面积的比较,选取峰面积较大且稳定的图谱共有峰,得到 7 个强峰,分别为共有峰 2 号(9.794%), 3 号(17.920%), 4 号(14.104%), 5 号(6.102%), 6 号(3.766%), 7 号(23.072%), 10 号(3.978%), 其峰面积之和占扣除防腐剂等附加剂之后总峰面积的 75% 以上。这 7 个强峰均为共有峰,可反映康复新液内在特征,因此,可用来评价康复新液的质量。

**2.6.3 共有指纹峰的相对保留时间及相对峰面积** 在供试品色谱图中,以肌苷色谱峰(7 号峰)为参照



A. 阴性对照; B. 供试品; C. 对照品; D. 15 批样品

图 1 康复新液 UPLC 指纹图谱

峰,其保留时间和色谱峰面积为 1,将其他特征峰的保留时间与峰面积与肌苷相比,得到各峰的相对保留时间和相对峰面积(表 2~3)。结果表明 15 批康复新液中 10 个共有指纹峰显示了很好的“共有”特点。

**2.6.4 相似度计算** 将 15 批康复新液样品 UPLC 图谱以 AIA 格式依次导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004A 版软件,扣除阴性对照样品峰后选峰,设定匹配模板,将峰自动匹配,计算各色谱图的整体相似度(表 1)。除 S15 相似度  $< 0.90$  外,其他均  $> 0.90$ 。

**2.6.5 聚类分析** 采用 SPSS 数据统计软件,将 15 批样品的共有峰面积数据,选用组间联接进行聚类,用欧式距离平方计算样品相似性程度,见图 2。

表 2 15 批康复新液相对保留时间

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15
1	0.225	0.225	0.226	0.226	0.224	0.226	0.225	0.224	0.225	0.226	0.227	0.224	0.226	0.226	0.234
2	0.343	0.343	0.342	0.343	0.343	0.343	0.343	0.343	0.343	0.343	0.344	0.344	0.346	0.346	0.352
3	0.412	0.412	0.413	0.413	0.413	0.413	0.413	0.415	0.415	0.412	0.411	0.417	0.416	0.415	0.423
4	0.481	0.480	0.481	0.480	0.481	0.480	0.480	0.482	0.483	0.480	0.479	0.485	0.483	0.482	0.486
5	0.548	0.546	0.548	0.547	0.547	0.547	0.547	0.549	0.549	0.547	0.547	0.551	0.550	0.549	0.551
6	0.612	0.610	0.611	0.610	0.611	0.610	0.610	0.612	0.613	0.610	0.609	0.614	0.611	0.610	0.612
7	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
8	1.054	1.052	1.052	1.052	1.051	1.052	1.052	1.051	1.051	1.052	1.053	1.051	1.052	1.052	-
9	1.175	1.172	1.173	1.173	1.171	1.173	1.173	1.171	1.171	1.174	1.175	1.172	1.177	1.177	-
10	1.402	1.398	1.402	1.401	1.394	1.401	1.400	1.395	1.396	1.402	1.408	1.395	1.412	1.412	1.417

表 3 15 批康复新液相对峰面积

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15
1	0.051	0.045	0.044	0.070	0.054	0.048	0.037	0.049	0.065	0.065	0.042	0.039	0.035	0.055	0.509
2	0.556	0.378	0.383	0.468	0.494	0.534	0.640	0.425	0.631	0.629	0.328	0.357	0.519	0.552	2.267
3	0.663	0.693	0.849	0.694	0.911	0.569	1.322	0.777	1.034	1.024	0.529	1.111	0.812	0.986	1.297
4	0.883	0.521	0.550	0.735	0.720	0.801	0.749	0.611	0.944	0.952	0.499	0.642	0.780	1.018	5.750
5	0.318	0.218	0.232	0.357	0.335	0.317	0.317	0.264	0.443	0.443	0.159	0.291	0.327	0.592	1.740
6	0.144	0.164	0.167	0.179	0.165	0.163	0.138	0.163	0.163	0.162	0.173	0.204	0.172	0.184	0.624
7	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
8	0.101	0.105	0.107	0.092	0.100	0.101	0.103	0.105	0.104	0.103	0.069	0.100	0.101	0.124	-
9	0.348	0.317	0.290	0.316	0.314	0.294	0.325	0.292	0.334	0.336	0.353	0.265	0.234	0.260	-
10	0.165	0.160	0.163	0.216	0.197	0.168	0.322	0.172	0.305	0.234	0.217	0.288	0.271	0.350	0.692

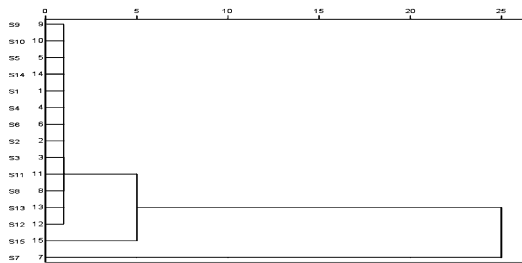


图 2 15 批康复新液的系统聚类分析

由图 2 可知,15 批样品大体上聚为 3 类,其中 S1 ~ S6 及 S8 ~ S14 为一类,S7 为一类,剩下的 S15 为一类。结合色谱图观察,S7 的 10 号峰是 15 批制剂中最高,峰面积是其他色谱峰的 2 ~ 12 倍,同时其他峰峰面积均较大,因此聚为一类;S15 中各峰面积均较小,且相似度为所有样品中最低,说明聚类分析与指纹图谱相似度结果相近。

### 3 讨论

曾考虑采用强碱性阴离子交换树脂及酸性阳离子交换树脂处理样品<sup>[3,6]</sup>,结果发现不过离子交换树脂,也可达到很好的分离效果,因此为减少样品的前处理所带来的误差,在供试品溶液制备中选择不过离子交换树脂,而选择直接过滤。

比较了乙腈-水和甲醇-水系统下的色谱图,发现甲醇-水系统梯度洗脱的柱压较低,同时流动相的改变对基线影响较小;比较了甲醇-水和甲醇-0.05% 乙酸溶液系统,发现甲醇-0.05% 乙酸溶液系统梯度洗脱的柱压较低,信息量大,基线平稳,所以选择甲醇-0.05% 乙酸溶液系统为流动相。曾对样品进行 ELSD 检测,但由于色谱峰信息太少,未能满足指纹图谱的要求。采用二极管阵列 200 ~ 400 nm 扫描,综合考虑康复新液中各主要成分的吸收光谱,

使各被测组分均有较大吸收,选用 256 nm 为指纹图谱检测波长。

通过对 15 批康复新液 UPLC 指纹图谱的研究发现,不同厂家生产的制剂在附加剂的使用方面差异较大,扣除附加剂影响后绝大多数制剂相似度均 > 0.9,表明各厂家生产的制剂具有较好的相似性;将各批制剂共有峰峰面积进行聚类分析发现,除个别制剂外绝大多数均归为一类,说明康复新液质量较稳定。本实验建立的 UPLC 指纹图谱可快速评价康复新液质量,为改善该制剂的质量控制提供实验依据。同时,宜结合相应药效学研究,将会更科学、合理地对其进行质量评价和控制。

### [参考文献]

- [1] 中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂. 第 19 册[S]. 北京:人民卫生出版社,1998:176.
- [2] 吴红梅,李晨晨,刘楠,等. 闪式与回流提取动物药美洲大蠊总氨基酸的工艺比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(21):52.
- [3] 王利春,孔繁贵,廖军,等. 一种美洲大蠊药材及其提取物的指纹图谱质量测定方法,中国:2008101167730 [P]. 2008-12-10.
- [4] 刘卉,姚卫峰,张丽,等. 基于超高效液相色谱指纹图谱轮廓的香丹注射液相似度快速评价[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(12):48.
- [5] 马培,许利嘉,刘延泽,等. 虎杖药材 UPLC 特征图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,9(6):46.
- [6] 焦春香,张成桂,刘光明,等. 心脉隆注射液 HPLC 指纹图谱建立方法的研究[J]. 中成药,2011,33(10):1648.

[责任编辑 全燕]