

基于 UPLC 的注射用活血通络指纹图谱研究及多成分定量测定

林 夏^{1,2,3}, 崔培超⁴, 徐桂红^{2,3}, 李家春^{2,3}, 黄文哲^{2,3}, 王振中^{1,2,3}, 萧 伟^{1,2,3*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210000
2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001
3. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001
4. 江苏康缘生态农业发展有限公司, 江苏 连云港 222001

摘要:目的 建立注射用活血通络的指纹图谱, 并进行多成分定量分析, 提升注射用活血通络质量标准。方法 采用 Thermo C₁₈ 柱 (100 mm×3 mm, 1.7 μm), 以甲醇-0.05%甲酸水溶液梯度洗脱, 体积流量 0.4 mL/min, 柱温 20 °C, 检测波长为 260 nm。结果 得到分离度和重现性良好的指纹图谱, 确定 21 个共有峰, 其中 11 个共有峰来自于赤芍药材, 7 个共有峰来自于川芎药材, 3 个共有峰来自桃仁药材。同时利用相似度软件对 10 批注射用活血通络指纹图谱进行分析, 各批次样品相似度在 0.98 以上; 通过对照品比对, 指认了 5 个成分, 分别为苦杏仁苷、羟基芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸, 并对其定量分析。结论 UPLC 建立的注射用活血通络指纹图谱检测和 5 个指标成分定量分析方法, 快速、简便、准确, 能有效评价该制剂的质量。

关键词: 注射用活血通络; UPLC; 指纹图谱; 多成分定量测定; 苦杏仁苷; 羟基芍药苷; 芍药内酯苷; 芍药苷; 阿魏酸
中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)02-0262-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.02.014

Fingerprint and multi-components quantitative determination for Huoxuetongluo Injection by UPLC

LIN Xia^{1,2,3}, CUI Pei-chao⁴, XU Gui-hong^{2,3}, LI Jia-chun^{2,3}, HUANG Wen-zhe^{2,3}, WANG Zhen-zhong^{1,2,3}, XIAO Wei^{1,2,3}

1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210000, China
2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China
3. State Key Laboratory of Pharmaceutical Process New-tech for Chinese Medicine, Lianyungang 222001, China
4. Jiangsu Kanion Ecological Agriculture Development Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To establish a UPLC fingerprint of the compounds in Huoxuetongluo Injection, and to make a quantitative analysis. **Methods** The Thermo C₁₈ (100 mm × 3 mm, 1.7 μm) column was used with a mobile phase of methyl alcohol-0.05% formic acid gradient elution, the flow rate was 0.4 mL/min, the column temperature was 20 °C, and the detection wavelength was 260 nm. **Results** The fingerprint chromatography included 21 mutual peaks, of which 11 mutual peaks from *Paeoniae Radix Rubra*, 7 mutual peaks from *Chuanxiong Rhizoma*, and 3 mutual peaks from *Persicae semen*. The similarity among the batches was more than 0.98. Based on the retention time, and UV absorption spectra of reference compounds, five components, amygdalin, oxypaeoniflorin, albiflorin, paeoniflorin, and ferulic acid, were identified and quantified. **Conclusion** The method is rapid, simple, and accurate, and can be used for the quality control of Huoxuetongluo Injection.

Key words: Huoxuetongluo Injection; UPLC; fingerprint; multi-components quantitative determination; amygdalin; oxypaeoniflorin; albiflorin; paeoniflorin; ferulic acid

收稿日期: 2015-07-20

基金项目: 国家科技部重大新药创制“脑血栓形成急性期治疗药物——注射用活血通络的临床研究”(2011ZX091012-122)

作者简介: 林 夏 (1985—), 女, 本科, 工程师, 研究方向为中药质量标准研究。Tel: (0518)85521932 E-mail: linxia297125856@163.com

*通信作者 萧 伟 (1959—), 研究员级高级工程师, 博士, 研究方向为中药制剂和创新中药的开发与研究。E-mail: wzhhz-nj@tom.com

注射用活血通络 (Huoxuetongluo Injection, HXTL) 为桃红四物汤简方, 由桃仁、赤芍、川芎 3 味中药组成, 具有活血化瘀、行气通络之功效, 用于中风中经络 (脑血栓形成) 之急性期证属痰瘀阻络者、半身不遂、口舌歪斜、舌强语謇、头晕目眩、舌泽暗淡等。桃仁、赤芍、川芎都含有丰富的化学成分, 并具有广泛的药理活性^[1-3]。注射用活血通络成分研究表明, 其主要含苷类、有机酸类及糖类成分。为了更好地控制产品质量, 保证临床疗效, 需提升质量标准, 建立能够更加全面评价该制剂质量的方法。目前 UPLC 法因其分离效率高、样品量少、节省溶剂、节省时间等特点越来越多的应用于中药注射剂质量研究^[4-5]。本实验以苷类、有机酸类成分为主要分析对象, 采用 UPLC 同时对注射用活血通络进行了指纹图谱^[6-7]研究和 5 个指标成分的定量测定^[8], 该方法可作为全面评价注射用活血通络质量的有效方法之一。

1 仪器和材料

Agilent 1290 超高压液相色谱仪, DAD 紫外检测器, 美国 Agilent 公司; MettlerAE240 电子分析天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; BSA224S-CW 型电子分析天平, 德国 Sartorius 公司; Centrifuge 5415D 高速离心机, 德国 eppendorf 公司; Milli-Q Academic 纯水机, 美国 Millipore 公司; KQ-250DB 型超声波清洗仪, 昆山市超声仪器有限公司。

注射用活血通络, 江苏康缘药业股份有限公司生产, 批号分别为 120501、120601、120701、120801、120901、130101、130401、130501、130601、130701; 苦杏仁苷对照品 (批号 110820-201305, 质量分数以 85.8% 计)、芍药苷对照品 (批号 110736-201337, 质量分数以 94.9% 计)、阿魏酸对照品 (批号 111787-201002, 质量分数以 100% 计), 均购自中国食品药品检定研究院; 芍药内酯苷对照品 (批号 MUST-14031214, 质量分数 $\geq 98.0\%$)、羟基芍药苷对照品 (批号 MUST-14061108, 质量分数 $\geq 98.0\%$), 均购自成都曼斯特生物科技有限公司; 甲醇, 色谱纯, 美国天地公司; 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Thermo C₁₈ 柱 (100 mm × 3 mm, 1.7 μm) 柱; 流动相为甲醇-0.05% 甲酸水溶液, 梯度洗脱, 线性洗脱程序为 0~6 min, 15%~28% 甲醇; 6~

12 min, 28%~44% 甲醇; 12~20 min, 44%~75% 甲醇; 20~25 min, 75% 甲醇; 体积流量 0.4 mL/min; 检测波长 260 nm; 柱温 20 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 2 μL ; 理论板数按芍药苷峰计算应不低于 100 000。

2.2 参照物的选择

选择保留时间适中、分离度较好的芍药苷作为参照物。

2.3 供试品溶液的制备

取本品内容物适量, 混匀, 取约 0.2 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶内, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 过 0.22 μm 滤膜, 即得。

2.4 精密度试验

取同一供试品 (批号 120501) 溶液连续进样 6 针, 以芍药苷为参照峰, 计算共有峰相对保留时间及主要共有峰相对峰面积, 结果 RSD 均小于 1.8%。又以第 1 次进样所得指纹图谱作为参照计算后 5 次进样所得指纹图谱的相似度, 结果相似度结果均不小于 0.99。

2.5 稳定性试验

取同一供试品 (批号 120501) 内容物适量, 取约 0.2 g, 精密称定, 按上述供试品溶液的制备方法制备供试品溶液, 精密吸取 2 μL , 分别于 0、3、6、9、12、18 h 注入液相色谱仪。以芍药苷为参照峰 (S), 计算共有峰相对保留时间及主要色谱峰相对峰面积, 结果 RSD 均小于 2%。又以第 1 次进样所得指纹图谱作为参照计算后 5 次进样所得指纹图谱的相似度, 结果相似度结果均不小于 0.99。

2.6 重复性试验

取同一供试品 (批号 120501) 内容物适量, 取约 0.2 g, 精密称定, 按上述供试品溶液的制备方法制备供试品溶液, 平行制备 6 份, 测定, 计算。以芍药苷为参照峰, 计算共有峰相对保留时间及主要色谱峰相对峰面积, 结果 RSD 均小于 2%。又以第 1 次进样所得指纹图谱作为参照计算后 5 次进样所得指纹图谱的相似度, 结果相似度结果均不小于 0.99。

2.7 指纹图谱研究

2.7.1 指纹图谱的建立与技术参数 根据 10 批注射用活血通络检测所得图谱, 标定 21 个共有峰, 采用国家药典颁布的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2012 年版进行分析, 以中位数法建立对照指纹图谱, 见图 1。10 批所测供试品色谱图与对照指纹图谱相似度分别为 0.987、0.995、0.989、0.997、

0.991、0.991、0.989、0.980、0.987、0.988。

2.7.2 指纹图谱中共有峰的归属与指认 取赤芍药材、桃仁药材、川芎药材粉末(过三号筛)各约 0.5 g, 精密称定置具塞锥形瓶内, 加 50%甲醇 50 mL 超声 60 min, 取续滤液, 过 0.22 μm 滤膜, 即得。按“2.1”项下色谱条件进样分析, 通过保留时间和 DAD 扫描分析, 指纹图谱中标定的 21 个共有峰中 3、4、5、9、11、12、14、16、17、20、21 号峰来自赤芍药材, 1、2、10、13、15、18、19 号峰来自

川芎药材, 6、7、8 号峰来自桃仁药材。见图 2。通过与混合对照品图谱比对, 其中 8 号峰为苦杏仁苷, 9 号峰为羟基芍药苷, 12 号峰为芍药内酯苷, 14 号峰为芍药苷, 15 号峰为阿魏酸。

2.8 已指认共有成分的定量测定

2.8.1 色谱条件 同“2.1”项下色谱条件。色谱图见图 3。

2.8.2 混合对照品溶液的制备 取羟基芍药苷、苦杏仁苷、芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸对照品适量,

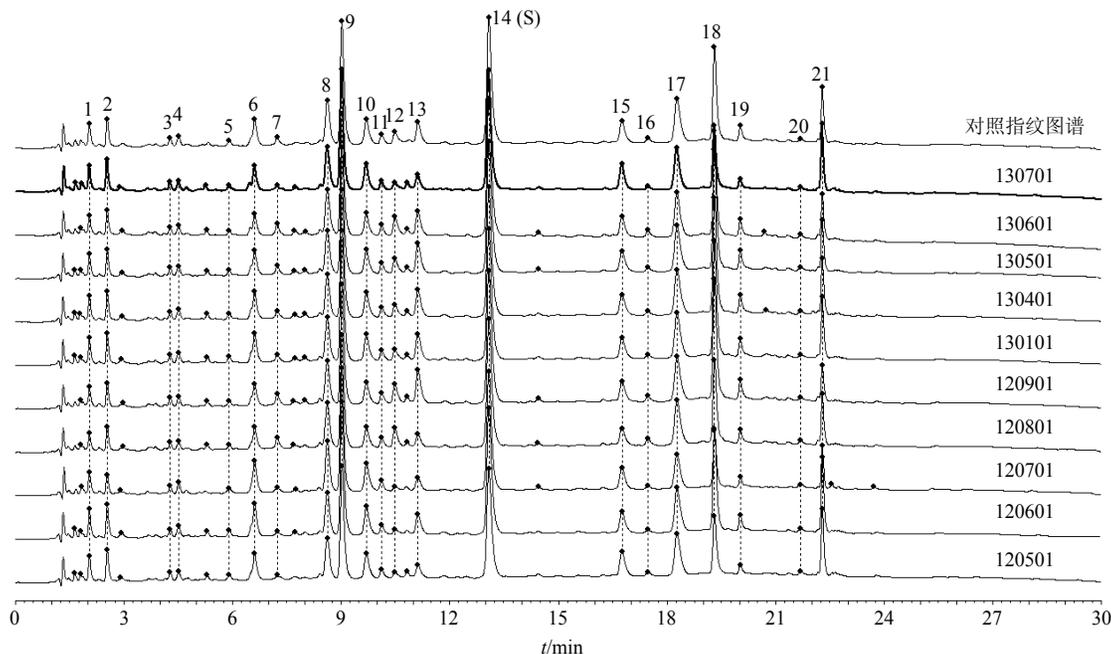


图 1 10 批注射用活血通络指纹图谱及其对照指纹图谱

Fig. 1 UPLC fingerprint and control fingerprint for 10 batches of Huoxuetongluo Injection

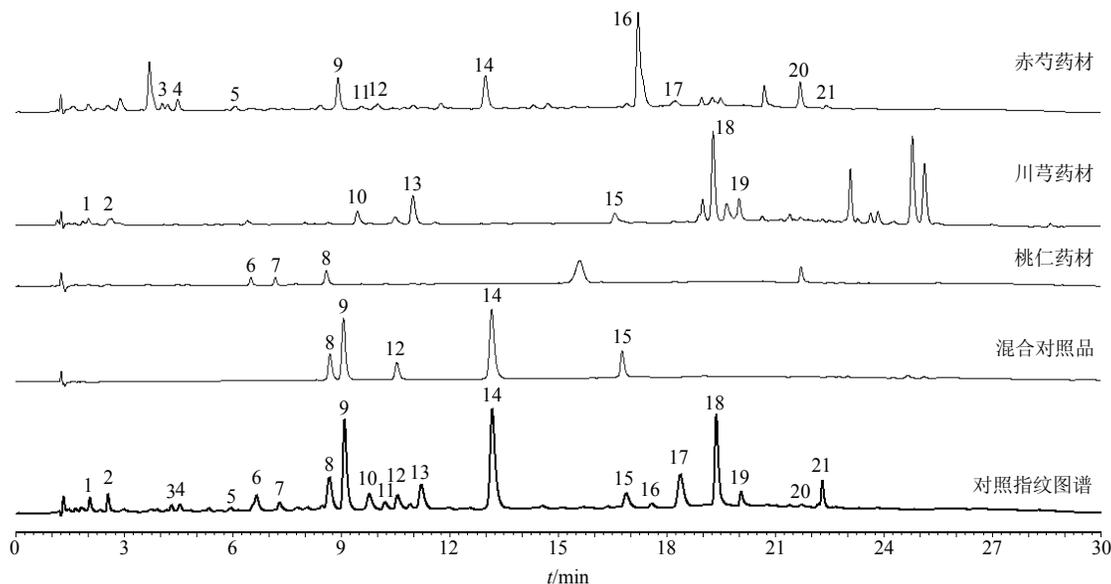
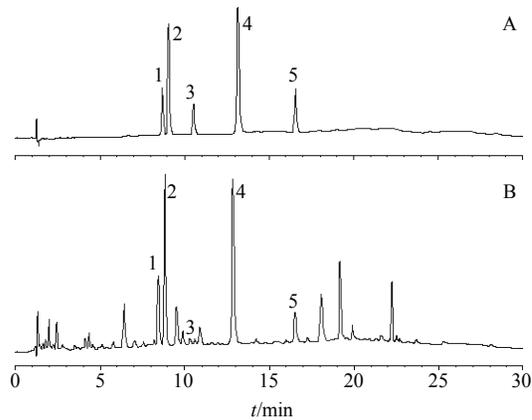


图 2 注射用活血通络指纹图谱中各共有峰归属色谱图

Fig. 2 Chromatogram of each common peak attribution in fingerprint of Huoxuetongluo Injection



1-苦杏仁苷 2-羟基芍药苷 3-芍药内酯苷 4-芍药苷 5-阿魏酸
1-oxypaeoniflorin 2-amygdalin 3-albiflorin 4-paeoniflorin
5-ferulic acid

图3 混合对照品(A)和注射用活血通络样品(B)的HPLC图

Fig. 3 HPLC of mixed reference substances (A) and Huoxuetongluo Injection sample (B)

精密称定,加水制成含苦杏仁苷 1 082.4 μg/mL、羟基芍药苷 60.3 μg/mL、芍药内酯苷 121.4 μg/mL、芍药苷 1 502.2 μg/mL、阿魏酸 22.4 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.8.3 供试品溶液的制备 同“2.3”项供试品溶液的制备方法。

2.8.4 线性关系的考察 取混合对照品溶液,依次精密量取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL 置 1 mL 量瓶内,加水稀释至刻度,摇匀,分别精密吸取 2 μL,注入液相色谱仪,测定,以进样浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,得回归方程分别为苦杏仁苷 $Y=0.168\ 1\ X-1.04$, $r=0.999\ 8$; 羟基芍药苷 $Y=10.434\ X+1.413\ 3$, $r=0.999\ 8$; 芍药内酯苷 $Y=0.676\ 2\ X-0.346\ 7$, $r=0.999\ 9$; 芍药苷 $Y=0.437\ 8\ X+0.786\ 7$, $r=0.999\ 9$; 阿魏酸 $Y=5.174\ 7\ X-0.386\ 7$, $r=0.999\ 8$ 。结果苦杏仁苷、羟基芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸分别在 108.24~649.44、6.03~36.18、12.14~72.84、150.22~901.32、2.24~13.44 μg/mL 呈良好的线性关系。

2.8.5 精密度试验 取同一供试品(批号 120501)溶液连续进样 6 次,以峰面积计算各指标成分 RSD,分别为苦杏仁苷 0.31%、羟基芍药苷 1.21%、芍药内酯苷 0.26%、芍药苷 1.34%、阿魏酸 1.0%。

2.8.6 稳定性试验 取同一供试品(批号 120501)内容物适量,取约 0.2 g,精密称定,按“2.3”项方

法制备供试品溶液,精密吸取 2 μL,分别于 0、3、6、9、12、18 h 注入液相色谱仪。以峰面积计算各指标成分 RSD,分别为苦杏仁苷 1.03%、羟基芍药苷 0.38%、芍药内酯苷 1.61%、芍药苷 0.55%和阿魏酸 0.64%,结果表明供试品溶液中各成分在 18 h 内稳定性良好。

2.8.7 重复性试验 取同一供试品(批号 120501)内容物适量,取约 0.2 g,精密称定,按“2.3”项方法制备供试品溶液,平行制备 6 份,测定,计算。苦杏仁苷、羟基芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷和阿魏酸的平均质量分数分别为 107.0、5.9、10.0、147.0、2.1 mg/g, RSD 分别为 0.93%、2.84%、0.72%、1.04%、1.96%,结果表明本方法重复性良好。

2.8.8 回收率试验 取同一供试品(批号 120501)内容物适量,取约 0.1 g,精密称定 6 份,分别置 50 mL 量瓶中,精密量取“2.8.2”项混合对照品溶液 10 mL 置于以上 6 份样品中,加水溶解稀释定容至刻度,摇匀,过 0.22 μm 滤膜,注入超高效液相色谱仪,测定,计算回收率。结果苦杏仁苷、羟基芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷和阿魏酸的平均回收率分别为 102.3%、102.0%、98.7%、98.0%、99.6%, RSD 分别为 0.59%、1.81%、2.76%、1.57%、2.97%。

2.8.9 样品定量测定结果 取 10 批注射用活血通络,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件进样分析,分别计算 5 种成分的量,结果见表 1。

3 讨论

比较了甲醇-水、乙腈-水和甲醇-0.05%甲酸系

表 1 样品测定结果 (n=2)

Table 1 Determination of five maker components (n=2)

| 批号 | 质量分数/(mg·g ⁻¹) | | | | |
|--------|----------------------------|-------|-------|-------|-----|
| | 羟基芍药苷 | 苦杏仁苷 | 芍药内酯苷 | 芍药苷 | 阿魏酸 |
| 120501 | 5.9 | 107.0 | 10.0 | 147.0 | 2.1 |
| 120601 | 6.1 | 100.4 | 8.9 | 151.0 | 2.0 |
| 120701 | 6.6 | 101.5 | 13.8 | 149.5 | 1.9 |
| 120801 | 6.8 | 112.3 | 12.4 | 158.3 | 2.2 |
| 120901 | 5.4 | 118.3 | 13.7 | 142.5 | 1.9 |
| 130101 | 5.2 | 110.5 | 12.9 | 155.6 | 2.0 |
| 130401 | 6.9 | 104.3 | 11.1 | 149.6 | 2.2 |
| 130501 | 5.3 | 116.7 | 10.2 | 152.2 | 1.9 |
| 130601 | 5.1 | 112.5 | 9.9 | 154.3 | 2.3 |
| 130701 | 6.0 | 113.6 | 8.6 | 149.8 | 2.1 |

统对指纹图谱的影响,结果甲醇-0.05%甲酸流动相系统所得指纹图谱峰形较好,基线较平稳。比较了在常规液相上使用 Gemini C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)及在 UPLC 上使用 Thermo C₁₈ 柱(100 mm×3 mm, 1.7 μm)和 Agilent C₁₈ 柱(50 mm×3.0 mm, 1.8 μm)对指纹图谱的影响,结果在 UPLC 上使用 Thermo C₁₈ 柱(100 mm×3 mm, 1.7 μm)分析指纹图谱时其分离效率高、分离度较好,故选择用该类型色谱柱分析注射用活血通络的指纹图谱。比较了柱温在 15、20、25 °C 时所得图谱,结果柱温为 20 °C 时所得指纹图谱中 5 个指标成分分离度在 1.6 以上;比较了体积流量为 0.35、0.4、0.45 mL/min 所得图谱,结果对色谱峰分离无显著影响。通过 DAD 检测器在 190~400 nm 全扫描,结果 260 nm 下色谱峰较多,因此选择 260 nm 作为指纹图谱检测和苦杏仁苷、羟基芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷和阿魏酸定量测定的检测波长,并且对 5 个指标成分进行了峰纯度验证,结果表明在本实验所确定的检测条件下样品中所测定的 5 个成分不含其他干扰成分。

本研究建立的注射用活血通络 UPLC 指纹图谱及多成分测定方法,对 21 个共有峰进行了归属,并对其中 5 个成分进行了定量分析,能够较全面控制

注射用活血通络的质量,但是其他 16 个共有峰的定性分析还需要进一步研究。

参考文献

- [1] 王仁芳, 范令刚, 高文远, 等. 桃仁化学成分与药理活性研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2010, 25(6): 427-429.
- [2] 陆小华, 马 骁, 王 建, 等. 赤芍的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(4): 595-602.
- [3] 金玉青, 洪远林, 李建蕊, 等. 川芎的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中药与临床, 2013, 4(3): 44-48.
- [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): 48-50.
- [5] 吴 莎, 王 雪, 吴亚男, 等. UPLC 用于热毒宁注射液中 11 种成分测定及其指纹图谱研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(24): 4804-4810.
- [6] 乔怀耀, 罗 荣, 吴 娟, 等. 舒肝解郁胶囊的 UPLC-MS 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2014, 45(2): 208-213.
- [7] 唐 云, 刘汉清, 唐海涛, 等. 蒲参胶囊的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(4): 133-137.
- [8] 余捷婧, 吴金雄, 梁亚凤, 等. HPLC 同时测定赤芍和白芍中没食子酸等 6 种成分的量 [J]. 中草药, 2015, 46(11): 1673-1677.