

复方五指柑胶囊UPLC指纹图谱研究

汪冰冰^{1*}, 陈敏怡^{1*}, 冯丽洁²

¹丽珠集团利民制药厂, 广东 韶关

²广东省高端液体药物制剂研发及产业化企业重点实验室, 广东 韶关

收稿日期: 2025年2月5日; 录用日期: 2025年2月18日; 发布日期: 2025年5月30日

摘要

目的: 采用超高效液相色谱法方法建立复方五指柑胶囊UPLC指纹图谱。方法: Luna Omega C18 (2.1 mm × 100 mm, 1.6 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-0.1%甲酸溶液, 流速0.3 mL·min⁻¹, 检测波长254 nm, 柱温25°C; 结果: 建立了复方五指柑胶囊UPLC指纹图谱, 通过相似度分析软件确定了10个色谱峰为复方五指柑胶囊的特征峰, 其相似度结果均在0.99以上; 结论: 分析方法稳定可靠, 为复方五指柑胶囊的质量控制提供依据。

关键词

复方五指柑胶囊, UPLC指纹图谱, 质量控制

UPLC Fingerprints Study of Compound Wuzhigan Capsules

Bingbing Wang^{1*}, Minyi Chen^{1*}, Lijie Feng²

¹Limin Pharmaceutical Factory Livzon Pharmaceutical Group Inc., Shaoguan Guangdong

²Guangdong Provincial Key Laboratory of R&D and Industrialization of High-End Liquid Pharmaceutical Preparations, Shaoguan Guangdong

Received: Feb. 5th, 2025; accepted: Feb. 18th, 2025; published: May 30th, 2025

Abstract

Objective: To establish UPLC fingerprint of compound Wuzhigan Capsules. Fluid Extract method by ultra-performance liquid chromatography. **Methods:** C18 (2.1 mm × 100 mm, 1.6 μm) column, mobile phase of acetonitrile-0.1% formic acid solution, flow rate of 0.3 mL·min⁻¹, and the detection wavelength of 254 nm, and column temperature of 25°C. **Results:** The UPLC fingerprint of compound

*共同一作。

Wuzhigan capsule was established. Ten chromatographic peaks were identified as characteristic peaks of compound Wuzhigan capsule by similarity analysis software, and the similarity results were all above 0.99. Conclusion: The method is stable and reliable, which provides a basis for the quality control of compound Wuzhigan capsules.

Keywords

Compound Wuzhigan Capsules, UPLC Fingerprint, Quantitative Control

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

复方五指柑胶囊(Compound wuzhigan capsules)主要成分为五指柑、功劳木、山芝麻、岗梅,为丽珠集团利民制药厂独家中药复方制剂,临床上可用于治疗急性胃肠炎[1]和风热感冒[2]。原质量标准为注册标准,仅有性状、鉴别(显微)、胶囊剂的常规检查等检查项目,而含量测定项仅对功劳木中的盐酸小檗碱进行测定。为了全面提高该产品的质量评估,本研究运用超高效液相色谱技术建立了复方五指柑胶囊的UPLC指纹图谱,为复方五指柑胶囊的质量控制提供了科学的方法依据。

中药指纹图谱技术是一种包含高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱法(GC)、质谱法(MS)等先进分析方法的现代分析技术,其构建的中药材化学指纹图谱不仅能够反映样品的整体化学成分,还能够展示各成分的含量和相对比例,为质量控制提供详细的化学指纹,实现对中药材的快速、精准检测[3]。高效液相色谱法(HPLC)现已被广泛应用于中药的指纹图谱检测分析,而近年来,超高效液相色谱(UPLC)在中药研究领域发展迅速[4]。UPLC与传统HPLC相比,表现出更高的分离度和灵敏度[5],常用于中药材、复方制剂及饮片的质量控制:李璐[6]等人利用UPLC技术建立鹅不食草配方颗粒指纹图谱;骆艺珠[7]等人运用UPLC色谱法建立玉女煎基准样品指纹图谱分析方法;曾雪蔚[8]等人采用超高效液相色谱法,建立六味安消胶囊的指纹图谱及10种有效成分的含量测定方法。本研究在借鉴中药相关文献中含量测定、成分分析、指纹图谱[9]-[12]等方法的基础上,运用超高效液相色谱技术构建了复方五指柑胶囊的UPLC指纹图谱,并对图谱中的共有峰进行了归属分析以及成分鉴定,旨在为建立一个系统、完善且简便快捷的质量评价方法提供数据支持。

2. 材料

2.1. 试药

单味药材提取物与复方五指柑胶囊均为自制。复方五指柑胶囊共21批,批号分别为XS-220702~XS-220719、XS-240627、XS-240701、XS-240702。对照品与试剂信息见表1。

Table 1. Reagents used in the experiment and their manufacturers

表 1. 实验使用试剂及其厂家

试剂	厂家	纯度	批号
功劳木对照提取物	中国食品药品检定研究院	含非洲防己碱(C ₂₀ H ₂₁ NO ₄) 2.5%, 药根碱(C ₂₀ H ₂₀ NO ₄) 11.7%, 巴马汀(C ₂₁ H ₂₁ NO ₄) 12.5%, 小檗碱(C ₂₀ H ₁₇ NO ₄) 6.7%	610011-201501

续表

盐酸药根碱	中国食品药品检定研究院	90.3%	110733-202110
盐酸小檗碱	中国食品药品检定研究院	85.9%	110713-202316
盐酸巴马汀	中国食品药品检定研究院	85.7%	110732-201913
异荭草苷	南京景竹生物科技有限公司	99.67%	JZ22021709
甲醇	Honeywell 公司	色谱纯	W3SG1H
乙腈	Honeywell 公司	色谱纯	Y4RA1H
甲酸	默克公司	分析级	K43228664210

2.2. 仪器

超高效液相色谱仪(ACQUITY UPLC H-Class PLUS, Waters); 电子天平(XS105DU, METTLER TOLEDO); 超纯水机(Milli-Q Reference A⁺, Merck KGaA); 超声波清洗器(CQ-6, 上海沪超超声波仪器有限公司)。

3. 方法与结果

3.1. 色谱条件

色谱柱: Luna Omega C18 (2.1 mm × 100 mm, 1.6 μm); 流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸溶液(B), 进行梯度洗脱(0~1.4 min, 10% → 19% A; 1.4~5 min, 12% → 19% A; 5~8.3 min, 19% → 23% A; 8.3~9.7 min, 23% → 26% A; 9.7~12.5 min, 26% → 51% A); 流速为 0.3 mL·min⁻¹; 检测波长为 254 nm; 柱温为 25℃; 进样量: 0.8 μL。

3.2. 溶液制备

3.2.1. 对照品溶液制备

以甲醇为溶剂, 分别配制 0.1 mg·mL⁻¹ 异荭草苷对照溶液、0.05 mg·mL⁻¹ 的盐酸药根碱对照溶液、0.05 mg·mL⁻¹ 的盐酸小檗碱对照溶液、0.4 mg·mL⁻¹ 的功劳木对照提取物溶液、0.05 mg·mL⁻¹ 的盐酸巴马汀对照溶液。

对照品溶液的配制见下图 1。

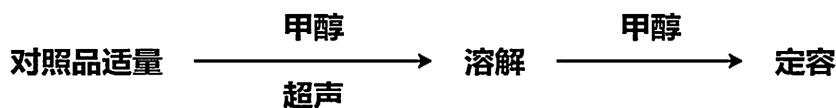


Figure 1. Flow chart of preparations of reference solution
图 1. 对照品溶液的配制流程图

3.2.2. 单味药材提取物溶液制备

称取单味药材提取物适量, 置于 50 mL 量瓶中, 加入甲醇适量, 超声 10 min, 待冷却至室温, 加甲醇稀释定容至刻度, 摇匀, 滤过, 即得。

3.2.3. 供试品溶液制备

称取复方五指柑胶囊内容物适量, 置于 25 mL 量瓶中, 加入甲醇适量, 超声 10 min, 待冷却至室温, 加甲醇稀释定容至刻度, 摇匀, 滤过, 即得。

3.3. 方法学考察

3.3.1. 标准图谱模拟

取 15 批样品(批号为: XS-220705~XS-220719), 依照“3.2.3”部分所述方法制备供试品溶液, 并在“3.1”规定的色谱条件下进行测定。随后, 将获得的图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”中, 进行标准图谱的模拟。

3.3.2. 共有峰归属及成分分析试验

按“3.2.1”“3.2.2”方法制备对照品溶液单味药材提取物溶液各 1 份, 在“3.1”色谱条件下, 每份样品进样 1 次, 记录色谱图。

3.3.3. 精密度试验

按“3.2.3”方法制备供试品溶液 1 份, 在“3.1”色谱条件下, 连续进样 6 次, 记录色谱图。

3.3.4. 重复性试验

取 6 份同一批次样品, 按“3.2.3”方法制备供试品溶液, 在“3.1”色谱条件下, 每份样品进样 1 次, 记录色谱图。

3.3.5. 稳定性试验

按“3.2.3”方法制备供试品溶液 1 份, 在“3.1”色谱条件下, 并分别于 0 h, 2 h, 3 h, 4 h, 7 h, 12 h, 24 h, 48 h 测定, 记录色谱图。

3.3.6. 耐用性试验

取 1 份样品, 按“3.2.3”制备供试品溶液, 在“3.1”色谱条件下, 分别采用不同流速($0.25 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 和 $0.35 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$)进行测定, 将图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”计算相似度。

3.3.7. 样品检测

取 5 批样品(批号为: XS-220701、XS-220702、XS-220703、XS-220704、XS-240627), 按“3.2.3”方法制备供试品溶液, 在“3.1”色谱条件下进行测定, 记录色谱图。

3.4. 结果

3.4.1. 标准图谱的模拟

将“3.3.1”试验中获得的色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”, 以 S1(批号: XS-220705)的批次样品图谱作为参考图谱, 剪切 2 min~17 min 色谱图, 识别出 10 个共有峰, 并设定时间窗口宽度为 0.1。采用平均数法, 经过多点校正和自动匹配后, 生成对照图谱(图 2), 15 批样品叠加图谱(图 3)。将 15 批样品图谱与对照图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”进行相似度计算, 以盐酸巴马汀作为参照峰 S, 计算得出的相似度均超过 0.99, 详细结果参见表 2。

3.4.2. 共有峰归属及成分分析

复方五指柑胶囊由五指柑、功劳木、岗梅、山芝麻等 4 味药材组成。将复方五指柑胶囊样品与单味药材色谱图进行比对(图 4), 分析共有峰来源, 见图 4。通过对比可得, 来源于五指柑药材的峰有 1、2、4; 来源功劳木药材的特征峰有 3、6、7、9、10; 来源于山芝麻药材的特征峰有 5、8。同时通过与对照品色谱图比对(图 5), 可知峰 4 为异荭草苷, 峰 7 为盐酸药根碱, 峰 9 为盐酸巴马汀, 峰 10 为盐酸小檗碱。

3.4.3. 精密度试验结果分析

“3.3.3”精密度试验谱图与标准图谱相似度均在 0.99 以上, 主要共有峰保留时间在 0.09%~1.39%

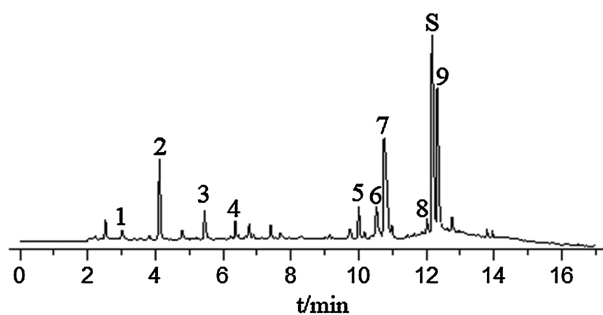


Figure 2. Comparative chromatogram
图 2. 对照图谱

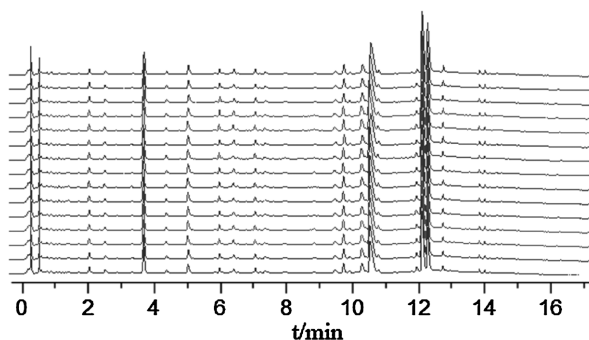


Figure 3. UPLC chromatograms of 15 batches of samples
图 3. 15 批样品 UPLC 图谱

Table 2. Similarity of 15 batches of samples
表 2. 15 批样品相似度

批号	相似度	批号	相似度	批号	相似度
XS-220705	0.999	XS-220710	1.000	XS-220715	0.996
XS-220706	1.000	XS-220711	1.000	XS-220716	0.998
XS-220707	1.000	XS-220712	1.000	XS-220717	0.999
XS-220708	1.000	XS-220713	1.000	XS-220718	1.000
XS-220709	1.000	XS-220714	0.999	XS-220719	1.000

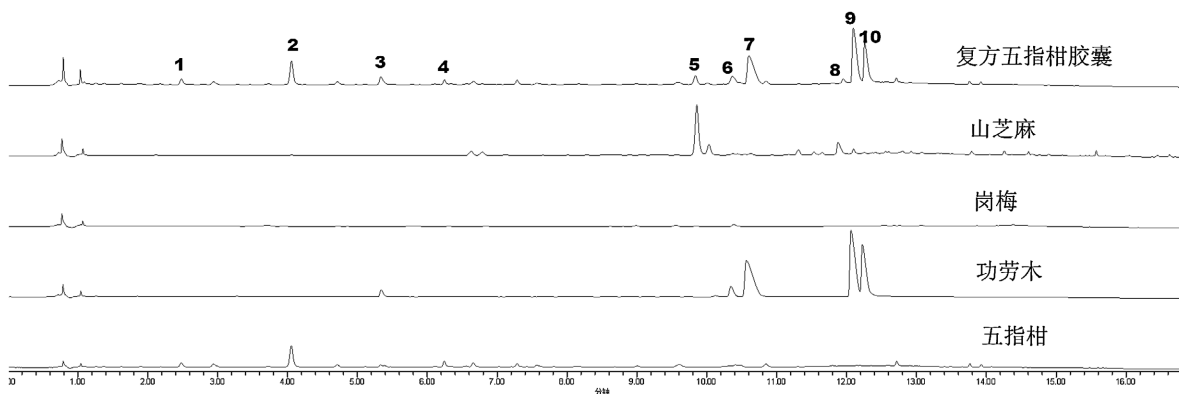


Figure 4. UPLC chromatograms of samples and single herbs
图 4. 样品、单味药材 UPLC 色谱图

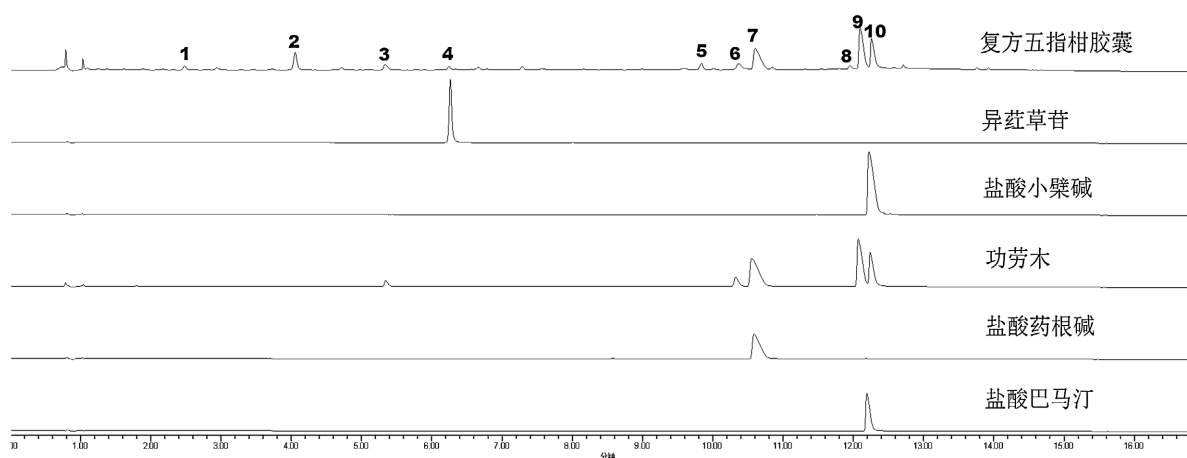


Figure 5. UPLC chromatograms of samples and comparisons

图 5. 样品、对照品 UPLC 色谱图

之间, RSD < 10%, 方法精密度良好。

3.4.4. 重复性试验结果分析

“3.3.4”重复性试验谱图与标准图谱相似度均在 0.99 以上, 主要共有峰保留时间在 0.44%~1.47%之间, RSD < 10%, 方法重复性良好。

3.4.5. 稳定性试验结果分析

“3.3.5”稳定性试验谱图与标准图谱相似度均在 0.99 以上, 主要共有峰保留时间在 0.38%~6.60%之间, RSD < 10%, 供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

3.4.6. 耐用性试验结果分析

“3.3.6”耐用性试验谱图与标准图谱相似度均在 0.99 以上, 耐用性良好。

3.4.7. 样品相似度

将“3.3.7”所得图谱与对照图谱(见图 1)导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”计算相似度(结果见表 3), 5 批样品相似度均在 0.99 以上。

Table 3. Similarity of 5 batches of samples

表 3. 5 批样品相似度

批号	相似度	批号	相似度
XS-220701	0.998	XS-220704	0.999
XS-220702	0.999	XS-240627	0.997
XS-220703	0.998		

4. 讨论

4.1. 检测波长选择

本研究采用 PDA 检测器在 200~400 nm 波长范围内进行扫描, 通过比较研究 210 nm、254 nm、347 nm 波长下的色谱峰个数、分离度、峰型, 结果显示在 254 nm 波长下的色谱图各色谱峰分离效果及形状较好, 共有峰个数更多, 基线平稳, 因此选择其作为检测波长。

4.2. 流动相的选择

在复方五指柑胶囊中, 盐酸小檗碱的含量测定采用了乙腈作为有机分离溶剂。本研究进一步验证了乙腈同样适用于五指柑、岗梅、山芝麻和功劳木药材中主要成分的 UPLC 分离。至于水相溶剂, 本研究对比了 0.1% 和 0.5% 甲酸溶液作为流动相的效果, 发现 0.1% 甲酸溶液的分​​离效果更佳, 因此优选 0.1% 甲酸溶液作为水相。通过优化流动相比例的研究, 最终确定了“3.1”项下的梯度洗脱条件。

4.3. 色谱柱选择

本研究通过对 ZORBAX Eclipse Plus (C18 2.1 * 100 mm, 1.8-Micron)、Luna Omega C18 (2.1 mm * 100 mm, 1.6 μm) 色谱柱进行比较研究, 结果见图 6。采用 Luna Omega C18 (2.1 mm * 100 mm, 1.6 μm) 色谱柱, 在保留时间 8~12 min 处, 各样品峰分离度明显较高, 优选用于复方五指柑胶囊的指纹图谱分析。

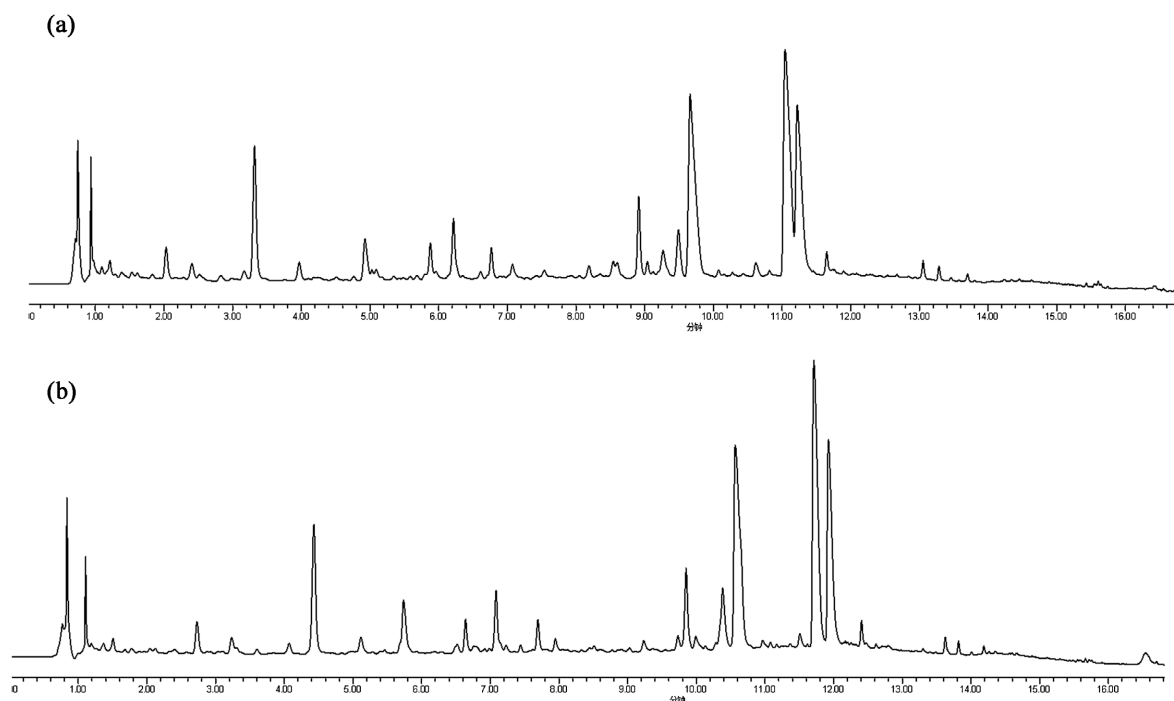


Figure 6. Results graph of column evaluation. ((a) ZORBAX Eclipse Plus (C18 2.1 * 100 mm, 1.8-Micron), (b) Luna Omega C18 (2.1 mm * 100 mm, 1.6 μm))

图 6. 色谱柱考察结果图。((a)为 ZORBAX Eclipse Plus(C18 2.1 * 100 mm, 1.8-Micron)色谱柱(b)为 Luna Omega C18 (2.1 mm * 100 mm, 1.6 μm)色谱柱)

4.4. HPLC 与 UPLC 指纹图谱对比研究

本研究对比考察了复方五指柑胶囊的 HPLC 指纹图谱与 UPLC 指纹图谱, 通过 UPLC 技术建立的指纹图谱具有更高的分辨率、更快的分析时间和更好的灵敏度。分析时间从 HPLC 指纹图谱 42 min 缩短至 17 min, 且峰型及分离度更优, 详见图 7、图 8。

5. 结论

本研究初步构建了复方五指柑胶囊的 UPLC 指纹图谱, 并确定了 10 个共有峰, 这些峰覆盖了处方中的功劳木、五指柑和山芝麻三味中药成分。同时, 本研究还指认了异荭草苷、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、

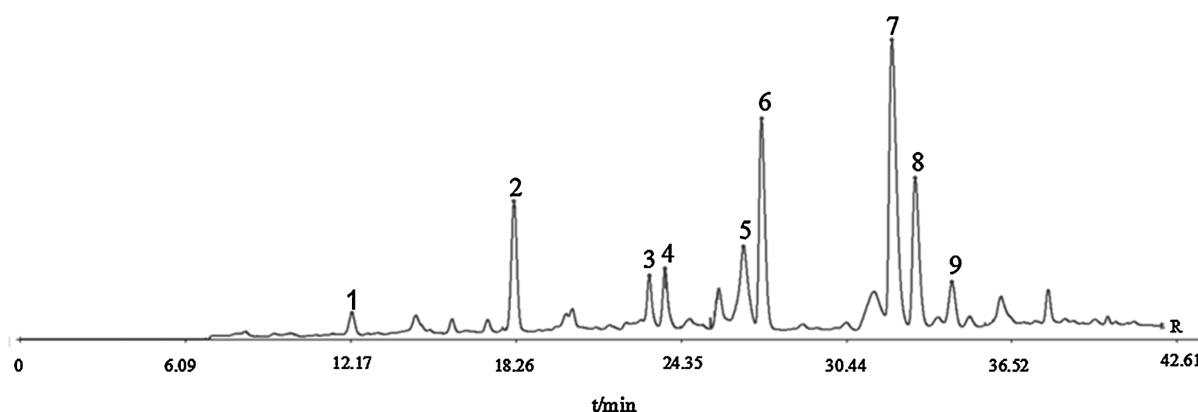


Figure 7. HPLC fingerprints of Compound Wuzhigan Capsules

图 7. 复方五指柑胶囊 HPLC 指纹图谱

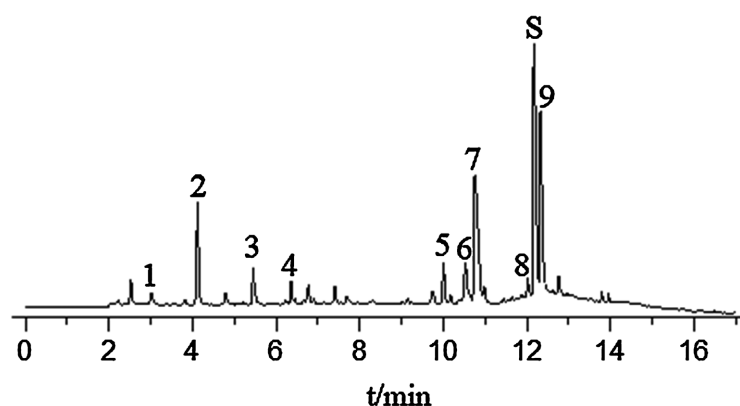


Figure 8. UPLC fingerprints of Compound Wuzhigan Capsules

图 8. 复方五指柑胶囊 UPLC 指纹图谱

盐酸小檗碱在指纹图谱中的共有峰。所建立的 UPLC 指纹图谱仅需 17 min 即可完成对复方五指柑胶囊中 3 味药材的 4 种成分的监测。

6. 展望

药品必须具备三个基本属性：安全性、有效性和质量可控性，其中质量可控性是确保有效性的基础。与传统的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱相比，超高效液相色谱(UPLC)展现了更为卓越的性能。对于制药企业来说，高效且迅速的质量评估方法是至关重要的。通过将传统的 HPLC 指纹图谱升级为 UPLC 指纹图谱，分析样品所需的时间显著减少。展望未来，随着数据的不断积累，我们有望将指纹图谱的定性鉴别进一步优化为定量分析方法，实现更为高效地检测和快速评价。这将有助于进一步缩短样品检测周期，加速药品上市流程，为公众健康提供更高效、及时的保障。

此外，UPLC 指纹图谱的建立不仅提升了分析的精度，还增强了数据的可靠性。通过优化色谱条件与数据处理方法，我们能够更全面地揭示药品中的化学成分特征，为药品的质量控制提供更加科学依据。未来，随着技术的不断进步，UPLC 指纹图谱的应用范围将进一步拓展，不仅局限于复方五指柑胶囊，还将广泛适用于其他多种中药及复方制剂的质量控制，为中药现代化和国际化进程贡献力量。同时，我们也期待通过跨学科合作，将人工智能、大数据分析等先进技术融入指纹图谱研究中，进一步提升药品质量评估的智能化水平，为保障公众用药安全做出更大贡献。

参考文献

- [1] 孙虹, 胡海棠, 曹晖, 等. 复方五指柑胶囊治疗急性胃肠炎的多中心临床研究[J]. 现代药物与临床, 2014, 29(11): 1257-1261.
- [2] 陈晓媚, 曹晖, 孙虹, 等. 复方五指柑胶囊治疗风热感冒多中心随机双盲平行对照临床试验[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(3): 531-535.
- [3] 王明明, 刘春辉, 朱莉, 等. 中药指纹图谱技术在中药材质量控制中的应用研究[J]. 质量与市场, 2024(9): 30-32.
- [4] 张慧, 陈燕, 汪佳楠, 等. 指纹图谱技术在中药配方颗粒质量评价及过程控制中的应用[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(19): 3822-3827.
- [5] 胡扬. 超高效液相色谱技术在中药研究中的应用及发展[C]//中国商品学会. 中国商品学会第五届全国中药商品学术大会论文集. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2017: 596-600.
- [6] 李璐, 江斌, 梁素仪, 等. 鹅不食草配方颗粒指纹图谱及一测多评法研究[J]. 中国民族民间医药, 2024, 33(18): 27-34.
- [7] 骆艺珠, 曹旖岚, 赵文军, 等. 经方玉女煎指纹图谱及功效关联物质预测分析[J]. 中成药, 2024, 46(9): 3164-3170.
- [8] 曾雪蔚, 卫柳辛, 张振山, 等. 六味安消胶囊的指纹图谱及含量测定[J]. 沈阳药科大学学报, 2024, 41(8): 1074-1086.
- [9] 仝立国, 牛艳艳, 吉海杰, 等. 扶正固本颗粒 HPLC 指纹图谱建立[J]. 中成药, 2022, 44(1): 211-214.
- [10] 陈丹, 戚建中, 李柯, 等. HPLC 法同时测定五指柑中 9 种成分[J]. 中成药, 2021, 43(10): 2733-2736.
- [11] 苏丹, 高玉桥, 梅全喜. 山芝麻药材中 6 个三萜类成分及总三萜的含量测定[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(5): 1038-1040.
- [12] 孙虹, 胡淑毅, 张剑波. HPLC 法测定复方五指柑胶囊中盐酸小檗碱的含量[J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(9): 39-40.