

康复新液 HPLC 指纹图谱建立及 6 种成分测定

吕 娜， 王钧麓， 陈丽华， 沈连刚， 李广志， 斯建勇*
(中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所，教育部中草药物质基础与资源利用重点实验室，北京 100193)

摘要：目的 建立康复新液（美洲大蠊提取物）HPLC 指纹图谱，并测定 6 种成分含量。**方法** 该药物的分析采用 TOSOH TSK-GEL ODS 色谱柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；流动相乙腈-水（含 0.07% 乙酸），梯度洗脱；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 280 nm。**结果** 10 批样品（I ~ X）指纹图谱中有 24 个共有峰，相似度 0.932 ~ 0.993（除样品 I）。尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、肌苷、原儿茶酸、环（甘氨酸-酪氨酸）分别在 3.460 ~ 173.0、3.960 ~ 198.0、3.596 ~ 179.8、1.338 ~ 66.9、3.672 ~ 183.6、3.552 ~ 177.6 μg/mL 范围内线性关系良好（ $r > 0.999\ 0$ ），平均加样回收率（RSD）分别为 99.8%（2.65%）、98.0%（2.55%）、99.7%（1.59%）、100.7%（2.80%）、102.0%（2.09%）、99.6%（1.88%）。**结论** 该方法准确、稳定、简单，可用于康复新液的质量控制。
关键词：康复新液；HPLC 指纹图谱；尿嘧啶；次黄嘌呤；黄嘌呤；肌苷；原儿茶酸；环（甘氨酸-酪氨酸）
中图分类号：R927.2 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-1528(2018)03-0613-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.03.021

Establishment of HPLC fingerprints of Kangfuxin Liquid and determintion of six constituents

LÜ Na, WANG Jun-chi, CHEN Li-hua, SHEN Lian-gang, LI Guang-zhi, SI Jian-yong*
(Ministry of Education Key Laboratory for Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine; Institute for Medicinal Plants Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish the HPLC fingerprints of Kangfuxin Liquid (extract of *Periplaneta americana* L.) and to determine the contents of six constituents. **METHODS** The analysis of this drug was performed on a TOSOH TSK-GEL ODS column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-water (containing 0.07% acetic acid) flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 280 nm. **RESULTS** There were twenty-four common peaks in the fingerprints of ten batches of samples (I - X) with the similarities of 0.932 - 0.993 (except for sample I). Uracil, hypoxanthine, xanthine, inosine, protocatechuic acid and Cyclo (Gly-Tyr) showed good linear relationships within the ranges of 3.460 - 173.0, 3.960 - 198.0, 3.596 - 179.8, 1.338 - 66.9, 3.672 - 183.6 and 3.552 - 177.6 μg/mL, whose average recoveries (RSDs) were 99.8% (2.65%), 98.0% (2.55%), 99.7% (1.59%), 100.7% (2.80%), 102.0% (2.09%) and 99.6% (1.88%), respectively. **CONCLUSION** This accurate, stable and simple method can be used for the quality control of Kangfuxin Liquid.
KEY WORDS: Kangfuxin Liquid; HPLC fingerprints; uracil; hypoxanthine; xanthine; inosine; protocatechuic acid; Cyclo (Gly-Tyr)

中药指纹图谱是通过一定色谱分析手段得到的共有峰图谱，其标示的成分信息可以表征物种的特 征性和不同个体的相似性，能够反映中药复杂成分内在的均一性和稳定性，对其产地差异和真伪鉴别

收稿日期：2017-05-23
基金项目：“十二五”国家科技重大创新药物专项（2011ZX09102-101-01，2012ZX09301-002-001）
作者简介：吕 娜（1989—），女，硕士生，从事天然药物化学研究。Tel: 18310943561, E-mail: 840546231@qq.com
* 通信作者：斯建勇（1963—），男，博士，研究员，从事天然药物化学研究。Tel: (010) 57833299, E-mail: jysi@implad.ac.cn

有较好的指导作用^[1-2]。

康复新液是以美洲大蠊 *Periplaneta americana* L. 提取物为主要成分的单方制剂，用于各种外伤、溃疡、痿管、褥疮的治疗，效果独特，应用广泛。虽然该方组成单一，但因对美洲大蠊的基础研究不够彻底，发挥作用的药效成分并不明确，因此以测定总氨基酸含有量为主的现行标准^[3]并不能真实有效地反映其质量状态。同时文献调研发现，市面上 3 家康复新液生产厂家的提取工艺不尽相同^[4-6]，原药材的来源途径与饲养方式也有所差异，这些是否会影响到化学成分含有量及药效作用尚无相关实验报道。因此，建立 HPLC 指纹图谱可以把控制剂中多成分的相对含有量，能较全面地反映制剂整体质量，并且通过建立的对照指纹图谱模型可以给不同厂家提供参考，改进提取工艺和检测指标，缩小市面销售不同品牌、批次制剂的差异性。

近年来已有不少学者^[7-9]通过 HPLC 或 UPLC 法分析康复新液，为快速高效评价其质量提供了参考依据。本实验根据文献刊载的成熟分析条件^[7]，采用较为普遍的 HPLC 法建立 10 批不同厂家康复新液的 HPLC 指纹图谱，同时测定尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、肌苷、原儿茶酸、环（甘氨酸-酪氨酸）的含有量，以期对其质量标准的进一步完善提供依据。

1 仪器与试剂

Waters 600 高效液相色谱仪，配置 Waters2489 紫外检测器、Empower 3 色谱工作站；Waters 2535 半制备液相色谱仪，配置 Waters 2489 紫外检测器、威玛龙色谱工作站。乙腈为色谱纯（美国 Thermo Fisher 公司）；乙酸为色谱纯（天津光复精细化工研究所）；其余试剂均为分析纯；水为娃哈哈纯净水。康复新液共 10 批（I ~ X），除浓缩液（I）为四川好医生药业集团有限公司提供外，其余均就近购于市面药店或社区卫生服务中心，具体见表 1。尿嘧啶、次黄嘌呤、肌苷对照品购自中国食品药品检定研究院（批号 100469-201302、140661-200903、140669-201305）；原儿茶酸、黄嘌呤对照品购自北京索莱宝科技有限公司（批号 1110A022）；环-甘氨酸酪氨酸对照品购自北京硕康医药科技有限公司（201610001），含有量均在 98.5% 以上。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 TOSOH TSK-GEL ODS 色谱柱

表 1 样品信息

Tab. 1 Information of samples

编号	批号	厂家
I	140326	四川好医生药业集团有限公司
II	150818	内蒙古京新药业有限公司
III	160116	内蒙古京新药业有限公司
IV	160409	内蒙古京新药业有限公司
V	160756	四川好医生药业集团有限公司
VI	160808	湖南科伦制药有限公司
VII	170828	内蒙古京新药业有限公司
VIII	160853	四川好医生药业集团有限公司
IX	160907	内蒙古京新药业有限公司
X	161035	内蒙古京新药业有限公司

(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)；流动相乙腈（A）-水（含 0.07% 乙酸，B），梯度洗脱（0 ~ 10 min, 3% A；10 ~ 20 min, 3% → 30% A；20 ~ 21 min, 30% → 50% A；21 ~ 35 min, 50% → 100% A；35 ~ 40 min, 100% → 3% A）；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 280 nm；柱温 25 ℃；进样量 10 μL。

2.2 供试品溶液制备 精密量取 1 mL 样品 I（批号 140326），定容至 10 mL 量瓶中，摇匀，静置，0.22 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液待用；其余样品直接过滤，取续滤液待用。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取 1 份供试品溶液（批号 161035），连续进样 6 次后，对 23 个共有峰（峰面积大于总面积 10% 以上）的保留时间和峰面积进行计算，测定各共有峰保留时间和峰面积 RSD 介于 0.02% ~ 1.92% 及 0.86% ~ 2.59% 之间，均小于 3%，表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取 1 份供试品溶液（批号 160907），于 0、2、4、8、12、24 h 在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得各共有峰保留时间和峰面积 RSD 介于 0.11% ~ 2.22% 及 0.63% ~ 3.00% 之间，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 取同一供试品溶液（批号 160907）6 份，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得各共有峰保留时间和峰面积 RSD 介于 0.08% ~ 2.23% 及 0.67% ~ 2.84% 之间，表明该方法重复性良好。

2.4 指纹图谱与色谱峰的指认和鉴定 将 10 批样品 HPLC 指纹图谱以 AIA 格式导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012.130723 版）”，样品 II 设为参照图谱，经过多点校正和数据匹配后，以平均值法生成对照指纹图谱 R。在扣除溶剂峰的基础上，共确定了 24 个共有峰，其保留时间 RSD 介

于0.02% ~0.59% 之间，峰面积总和大于总面积的79%，可判定这些峰为康复新液制剂的群体特征峰。

前期实验^[14]通过色谱柱层析、核磁共振、质谱等手段，对康复新液进行成分鉴定。本实验确定了其中5种成分，分别为尿嘧啶、次黄嘌呤、肌苷、原儿茶酸、环（甘氨酰-酪氨酸）、黄嘌呤，具体见图1。

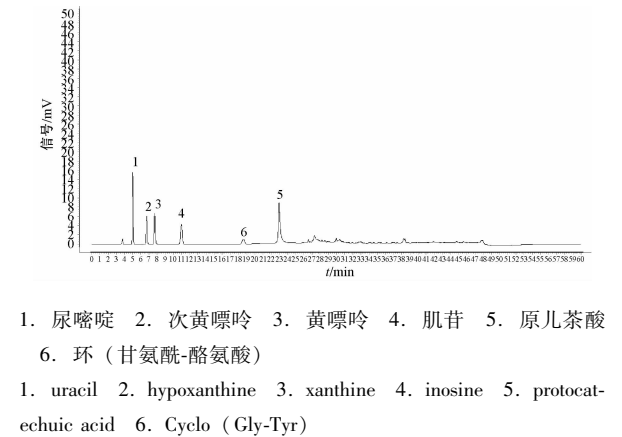


图1 各成分对照图谱
Fig.1 Reference chromatogram of various constituents

2.5 相似度计算 10批不同厂家样品的指纹图谱见图2，与对照指纹图谱R（图3）相比，样品Ⅱ~X的相似度范围在0.932~0.993之间；样品

I为浓缩液，其色谱峰峰面积及可识别峰数量都大于其余样品，故不予考虑，具体见表2。

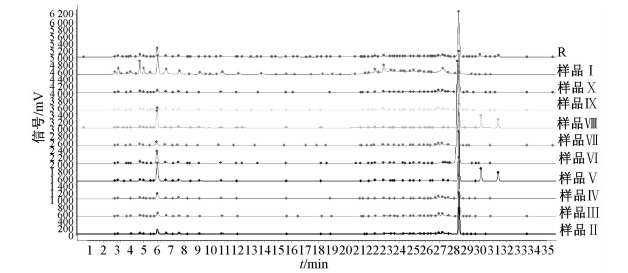
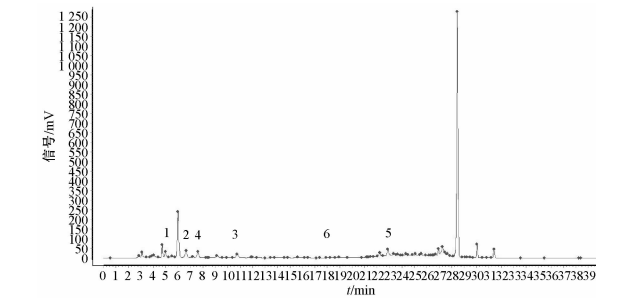


图2 10批样品指纹图谱
Fig.2 Fingerprints of ten batches of samples



1. 尿嘧啶 2. 次黄嘌呤 3. 黄嘌呤 4. 肌苷 5. 原儿茶酸
6. 环（甘氨酰-酪氨酸）
1. uracil 2. hypoxanthine 3. xanthine 4. inosine 5. protocatechuic acid 6. Cyclo (Gly-Tyr)

图3 10批样品对照指纹图谱
Fig.3 Reference fingerprint of ten batches of samples

表2 相似度评价结果										
Tab.2 Results of similarity evaluation										
编号	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
厂家	好医生	京新	京新	京新	好医生	天舒欣	京新	好医生	京新	京新
相似度	0.339	0.989	0.988	0.993	0.932	0.972	0.991	0.947	0.986	0.984

3 含有量测定

- 3.1 色谱条件 同“2.1”项。
- 3.2 对照品溶液制备 精密称取尿嘧啶0.008 65 g、次黄嘌呤0.004 95 g、黄嘌呤0.006 69 g、肌苷0.008 99 g、原儿茶酸0.045 9 g、环（甘氨酰-酪氨酸）0.004 44 g，加水（含50%乙腈）溶解（难溶时70℃加热或超声）后，定容至量瓶中配制贮备液（865、990、669、899、918、888 μg/mL），分别精密吸取2 mL定容至10 mL量瓶中，制得对照品溶液（173、198、133.8、179.8、183.6、177.6 μg/mL）。
- 3.3 供试品溶液制备 同“2.2”项。
- 3.4 方法学考察
- 3.4.1 线性关系考察 精密吸取对照品溶液

- 0.10、0.20、0.40、0.80、1.60、3.20 mL，加水（含50%乙腈）稀释至5.0 mL，共得到7个（包括母液）不同质量浓度，在“2.1”项色谱条件下进样10 μL测定。以峰面积（Y）对质量浓度（X）进行回归，再按照信噪比10和3分别得到定量限和检测限，结果见表3，可知各成分在各自范围内线性关系良好。
- 3.4.2 精密度试验 精密吸取“3.2”项下对照品溶液适量，0.22 μm微孔滤膜过滤，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得各成分峰面积RSD均小于2.7%，表明仪器精密度良好。
- 3.4.3 重复性试验 精密吸取“3.2”项下对照品溶液6份，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得各成分峰面积RSD均小于1.8%，表明该方法

表 3 各成分线性关系

Tab. 3 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	定量限/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	检测限/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
尿嘧啶	$Y=7\,014.9X+4\,029.1$	0.999 9	3.460 ~ 173.0	0.037	0.011
次黄嘌呤	$Y=3\,212.8X+3\,018.6$	0.999 9	3.960 ~ 198.0	0.040	0.012
肌苷	$Y=12\,108X-771.6$	0.999 4	3.596 ~ 179.8	0.036	0.011
黄嘌呤	$Y=3\,836.9X+3\,526.4$	0.999 7	1.338 ~ 66.9	0.013	0.004
原儿茶酸	$Y=11\,343X-41\,194$	0.999 5	3.672 ~ 183.6	0.037	0.011
环(甘氨酸-酪氨酸)	$Y=1\,474.7X-926.26$	0.999 8	3.552 ~ 177.6	0.036	0.011

重复性良好。

3.4.4 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 X (批号 161035), 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 于 0、2、4、8、12、24 h 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 测得各成分峰面积 RSD 均小于 3%, 表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

3.4.5 加样回收率试验 精密量取含有量已知的供试品 V (批号 160756) 1 mL, 精密加入每 1 mL 分别含有 6 种对照品 6.92、7.92、7.192、2.676、7.344、7.104 $\mu\text{g/mL}$ 及其 2、8 倍质量浓度的溶液

1 mL, 按“3.3”项下方法制备供试品溶液, 平行 3 次, 计算回收率。结果, 尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、肌苷、原儿茶酸、环(甘氨酸-酪氨酸)平均加样回收率分别为 99.8%、98.0%、99.7%、100.7%、102.0%、99.6%, RSD 分别为 2.65%、2.55%、1.59%、2.80%、2.09%、1.88%。

3.4.6 含有量测定 量取各供试品溶液适量, 按“3.3”项下方法制备供试品溶液, 各精密吸取 10 μL , 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 外标法计算含有量, 结果见表 4。

表 4 各成分含有量测定结果 ($\mu\text{g/mL}$)

Tab. 4 Results of content determination of various constituents ($\mu\text{g/mL}$)

编号	尿嘧啶	次黄嘌呤	肌苷	黄嘌呤	原儿茶酸	环(甘氨酸-酪氨酸)	总含有量
I *	166.63	603.87 **	85.66	259.76 **	139.63	167.39	1 422.95
II	10.20	59.17	14.60	52.83	14.09	10.28	161.18
III	12.85	72.31	20.73	58.12	15.10	0 ***	179.12
IV	11.45	63.66	14.92	68.13 **	15.21	0 ***	173.37
V	11.85	49.49	5.93	65.47	16.02	11.30	160.06
VI	7.59	76.10	20.66	54.66	16.84	0 ***	175.85
VII	12.09	71.87	19.20	46.58	17.90	65.20	232.84
VIII	13.88	57.59	5.99	68.03 **	18.39	11.07	174.96
IX	12.35	98.15	8.94	49.99	28.40	0 ***	197.83
X	12.72	71.36	20.82	58.79	15.51	0 ***	179.20

注: * 表示稀释 10 倍后的含有量; ** 表示测量结果超出检测限, 但还处于趋势范围内; *** 表示峰面积值过低, 忽略不计

4 讨论

本实验采用乙腈-水 (含 0.07% 乙酸) 作为流动相进行梯度洗脱, 较甲醇-水 (含 0.07% 乙酸)、乙腈-水 (含 0.07% 甲酸) 溶剂峰信号低、影响小、出峰时间早、分离度较好。另外, 对照品的最大吸收波长一般位于 270 ~ 275 nm, 但 280 nm 处出峰数量较多, 溶剂峰影响小, 故本实验选择其作为检测波长。

在 280 nm 波长处, 康复新液 II ~ X HPLC 指纹图谱的整体外观基本一致, 特征指纹峰的保留时间也相当, 与对照图谱的相似度都大于 0.930, 表明不同提取方式对该方成分组成影响不大; 康复新液 I 为浓缩液, 各成分含有量较其他样品高, 峰值较大, 并且许多非特征峰也较为明显, 因此与其他

样品的相似度较低。

通过文献调研和前期研究表明^[10-13], 康复新液含有多种核苷、氨基酸及小分子肽类成分, 在紫外条件下可以检测到的主要有 4 种核苷 (尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、肌苷)、1 种有机酸 (原儿茶酸)、1 种环二肽 [环 (甘氨酸-酪氨酸)]^[14]。因此, 本实验选择以上几种成分进行含有量测定, 发现除环 (甘氨酸-酪氨酸) 外其他成分含有量在各批样品中均无明显差异, 尤其是同一厂家不同批次之间更加相似。

另外, 有文献表明美洲大蠊富含小分子肽类成分^[10], 为促进创面愈合的主要物质^[15]。因此, 建议今后对康复新液有效成分含有量的测定应以该类化合物为主。

参考文献：

[1] 铁 民. 中药指纹图谱在中药质量监控中的应用[J]. 医药卫生 (全文版), 2016(8): 161.

[2] 罗国安, 王义明. 中药指纹图谱的分类和发展[J]. 中国新药杂志, 2002, 11(1): 46-51.

[3] WS3-B-3674-2000 (Z), 国家药品监督管理局国家药品标准[S].

[4] 何道峰, 郝振平. 治疗消化道溃疡用的美洲大蠊提取物的提取方法: 中国, CN102885857B[P]. 2014-05-28.

[5] 耿福能. 美洲大蠊提取物的新用途: 中国, CN102552330A[P]. 2012-07-11.

[6] 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, CN101320027B[P]. 2011-06-29.

[7] 黄 博, 敬 勇, 张秀娟, 等. HPLC 法测定美洲大蠊药材中尿嘧啶、次黄嘌呤及肌苷的含量[J]. 中药材, 2014, 37(9): 1537-1540.

[8] 张 利, 李 惠. HPLC 法同时测定康复新液中尿嘧啶、次黄嘌呤及肌苷含量[J]. 中国药师, 2012, 15(9): 1265-1267.

[9] 吴红梅, 徐 峰, 刘李梅, 等. 康复新液 UPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(8): 59-62.

[10] 李 旸, 王 芳, 张普照, 等. 美洲大蠊化学成分研究[J]. 中药材, 2015, 38(10): 2038-2041.

[11] 蒋文贤, 罗世林, 王 英, 等. 美洲大蠊的化学成分[J]. 暨南大学学报 (自然科学与医学版), 2015, 36(4): 294-301.

[12] Luo S L, Huang X J, Wang Y, *et al.* Isocoumarins from American cockroach (*Periplaneta americana*) and their cytotoxic activities[J]. *Fitoterapia*, 2014, 95: 115-120.

[13] 尹卫平, 姜亚玲, 李鹏飞, 等. 昆虫美洲大蠊天然产物的研究及其化学分类学意义[J]. 河南科技大学学报 (自然科学版), 2012, 33(5): 101-104.

[14] 吕 娜, 沈连刚, 李广志, 等. 康复新液化学成分研究[J]. 中国现代中药, 2017, 19(4): 488-490.

[15] 吴红梅. 上市品种“康复新液”的药学再评价[D]. 成都: 成都中医药大学, 2013.