

灯盏花素注射液 HPLC 特征图谱研究

耿家玲¹, 王祥红², 田润涛², 明全忠¹

(1. 云南省食品药品检验所, 昆明 650011; 2. 珠海科曼中药研究有限公司, 珠海 519085)

摘要 目的: 采用 HPLC 法对灯盏花素注射液的特征图谱进行研究。方法: 采用 Zorbax SB C₁₈ (4.6 mm × 250 mm 5 μm) 色谱柱, 以 0.5% 甲酸溶液 - 甲醇 - 乙腈为流动相梯度洗脱, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 330 nm。结果: 初步建立了由 12 个共有峰组成的灯盏花素注射液特征图谱, 并对 89 批样品进行了相关系数比较, 分析了造成特征图谱差异的可能原因。结论: 生产工艺的不统一是导致特征图谱差异的主要原因。

关键词: 灯盏花素; 野黄芩苷; 注射液; 高效液相色谱; 特征图谱

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793 (2011) 08 - 1511 - 05

Study on HPLC specific chromatogram of Dengzhanhuasu injection

GENG Jia - ling¹, WANG Xiang - hong², TIAN Run - tao², MING Quan - zhong¹

(1. Yunnan Institute for Food and Drug Control, Kunming 650011, China;

2. Chranap Institute of Herbal Medicine Research, Zhuhai 519085, China)

Abstract Objective: To establish the HPLC specific chromatogram of Dengzhanhuasu injection. **Method:** A Zorbax SB C₁₈ (4.6 mm × 250 mm 5 μm) column was adopted by stepwise gradient elution with formic acid (0.5% *v/v*) - methanol - acetonitrile as the mobile phase. The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹, and detection wavelength was set at 330 nm. **Results:** The HPLC specific chromatogram of Dengzhanhuasu injection was constructed with 12 common specific chromatogram peaks. After calculating 89 different samples, the similarity of different samples was compared. **Conclusion:** The main causes for the different HPLC specific chromatogram were different manufacture technology.

Key words: breviscapinun; scutellarin; injection; HPLC; specific chromatogram

灯盏花素注射液是从菊科植物短葶飞蓬 *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand. - Mass. 中提取的黄酮类成分, 主要活性成分为灯盏花乙素, 即野黄芩苷。灯盏花素注射液具有活血化瘀、通络止痛的功效。临床上用于治疗各种缺血性疾病及伴有明显微循环障碍性疾病, 如中风后遗症、冠心病、心绞痛等。该品种使用广泛且用量较大, 国内有多家厂家生产。原标准收载于《卫生部药品标准》第 20 册^[1], 采用紫外分光光度法(吸收系数法)测定灯盏花乙素(野黄芩苷)的含量, 专属性较差。郑金凤等用 HPLC 法测定灯盏花素注射液中野黄芩苷含量及有关物质^[2], 对灯盏细辛药材中以野黄芩苷为主的多成分研究已有文献报道^[3~5]。但尚未见灯盏花素注射液特征图谱研究的有关文献报道。为了更好地控制其质量, 保证临床用药的安全和有效, 本文采用 HPLC

梯度洗脱, 测定了多个厂家的灯盏花素注射液, 初步建立了灯盏花素注射液特征图谱, 并分析了造成特征图谱差异的可能原因。

1 仪器、样品与试剂

HP1100 系列 HPLC 仪, 包括四元泵、在线脱气机、柱温箱、自动进样器、DAD 检测器、Agilent 化学工作站。野黄芩苷(批号: 842 - 200402), 由中国药品生物制品检定所提供; 89 批灯盏花素注射液由全国的 13 个厂家提供; 38 批灯盏花素注射液原料(黄酮类成分)由云南的 3 个厂家提供。甲醇、乙腈为色谱纯; 所用水均为过 0.45 μm 的纯净水; 其他化学试剂为分析纯。

2 溶液的制备

2.1 供试品溶液 取灯盏花素注射液, 加水稀释成每 1 mL 含 0.20 ~ 0.25 mg 的溶液, 摇匀, 滤过, 取续

滤液,即得灯盏花素注射液的供试品溶液;精密称取灯盏花素注射液原料 20 mg,置 100 mL 量瓶中,加甲醇适量,超声处理(功率 250 W,频率 33 kHz) 10 min,放冷,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得灯盏花素注射液原料的供试品溶液。

2.2 对照品溶液 精密称取常温减压干燥至恒重的野黄芩苷对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 0.2 mg 的溶液,即得。

2.3 阴性对照溶液 按处方比例称取除灯盏花素注射液原料以外的其他辅料,按制备工艺制成不含灯盏花素注射液原料的阴性对照,按“2.1”项下的方法制备阴性对照溶液。

3 色谱条件

灯盏花素注射液特征图谱采用灯盏细辛药材指纹图谱的色谱条件^[5]。色谱柱为 Zorbax SB C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为 0.5% 甲酸溶液(A) - 乙腈(B) - 甲醇(C), 梯度洗脱(0 min: 92% A, 3% B, 5% C; 15 min: 73.5% A, 11.5% B, 15% C; 45 min: 73.5% A, 11.5% B, 15% C; 55 min: 55% A, 45% B; 65 min: 15% A, 85% B); 流速 1 mL · min⁻¹; 检测波长 330 nm; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL。在上述色谱条件下,阴性对照对测定无干扰。

4 精密度试验

取灯盏花素注射液 9 号样本,按“2.1”项下的方法制备供试品溶液,按“3”项下色谱条件连续进样 6 次,以野黄芩苷的保留时间和峰面积为参照。色谱图中,各共有峰相对保留时间的 RSD 小于 0.11%, 相对峰面积的 RSD 小于 2.0%, 表明检测系

统的进样精密度合格。

5 稳定性试验

取灯盏花素注射液 9 号样本,按“2.1”项下的方法制备供试品溶液,按“3”项下色谱条件分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 不同时间点进行检测,以野黄芩苷的保留时间和峰面积为参照。色谱图中,各共有峰相对保留时间的 RSD 小于 0.39%, 相对峰面积的 RSD 小于 2.8%, 表明 12 h 内供试品溶液是稳定的。

6 重复性试验

取灯盏花素注射液 9 号样本,共 6 份,按“2.1”项下的方法制备供试品溶液,按“3”项下色谱条件测定,以野黄芩苷的保留时间和峰面积为参照。色谱图中,各共有峰相对保留时间的 RSD 小于 0.19%, 相对峰面积的 RSD 小于 3.1%, 表明方法重复性良好。

7 特征图谱的建立

7.1 灯盏花素注射液原料特征图谱的建立 为了更好地比较灯盏花素注射液与其原料的相关性,按“2.1”项下的方法制备灯盏花素注射液原料的供试品溶液,按“3”项下色谱条件,对 38 批灯盏花素注射液原料进行了测定,特征图谱稳定地出现 9 个共有峰,见图 1。以平均峰面积为共有模式特征峰面积值,结果见表 1。将共有模式与待测样本的野黄芩苷峰面积乘以 0.15 后(降低权重),再与其他特征峰值组成 1 对数据计算相关系数,38 批灯盏花素注射液原料中,除 4 批含量较低的样本外,加权相似度均在 0.94 以上。

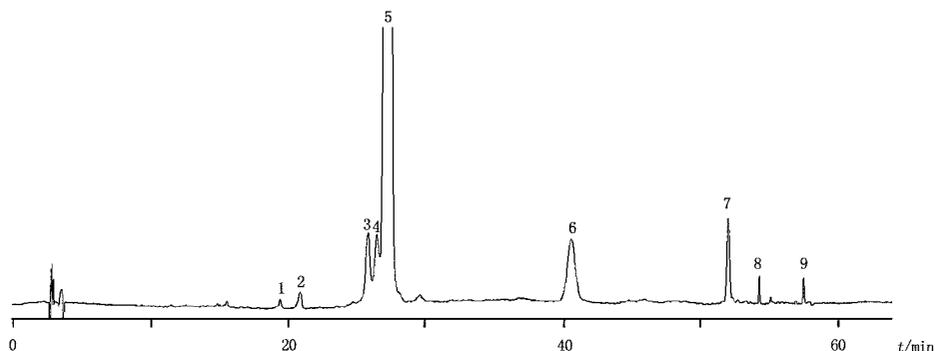


图 1 灯盏花素注射液原料典型特征图谱

Fig 1 HPLC⁵ specific chromatogram of Dengzhanhuasu material

5. 野黄芩苷(scutellarin)

表1 灯盏花素注射液原料 HPLC 特征峰面积值(共有模式)

Tab 1 HPLC specific areas of Dengzhanhuasu material(common pattern)

峰号 (peak No.)	保留时间 (retention time) /min	峰面积 (peak area)
1	19.40	13.26
2	20.86	23.95
3	25.58	225.66
4	26.23	78.96
5(S)	27.08	4798.05
6	39.94	257.59
7	51.82	86.82
8	54.23	10.43
9	57.45	20.73

7.2 灯盏花素注射液特征图谱的建立 按“2.1”项下的方法制备供试品溶液,按“3”项下色谱条件,测定了13个厂家89批样品,并对89批样品进行了分析,样品因杂质的多少而分为2类,见图2-A、B)。第I类样品为6厂家35批样品;第II类样品为7厂家54批样品。第I类样品杂质含量少,接近灯盏花素注射液原料特征图谱,因此确定第I类样品中得到表达的12个色谱峰均列入注射剂特征峰,见图3;并选用平均峰面积作为灯盏花素注射液特征图谱共有模式特征峰面积值,结果见表2。将共有模式与待测样本的野黄芩苷峰面积乘以0.15(降低权重)后,再与其他特征峰值组成1对数据计算相关系数。第I类样品中,除1批外,其余的加权相似度均在0.91以上;第II类样品中,加权相似度最低者仅

为0.38(野黄芩苷含量为43.15%) 结果见图4。

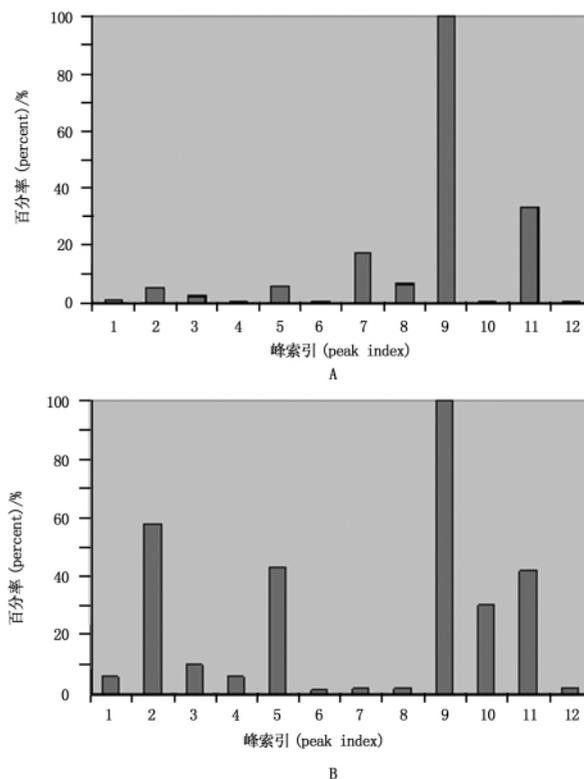


图2 2类样品(野黄芩苷降低权重)生成的标准特征图谱棒状图(共有模式)

Fig 2 Two kinds of rod graph (reduce scutellarin specific weight) cause by specific chromatogram(common pattern)

A. I类(6厂家35样本 标准特征图谱) [No. 1(35 samples of 6 factories ,the standard specific chromatogram)] B. II类(7厂家54样本,未采用) [No. 2(54 samples of 7 factories ,unadopt)]

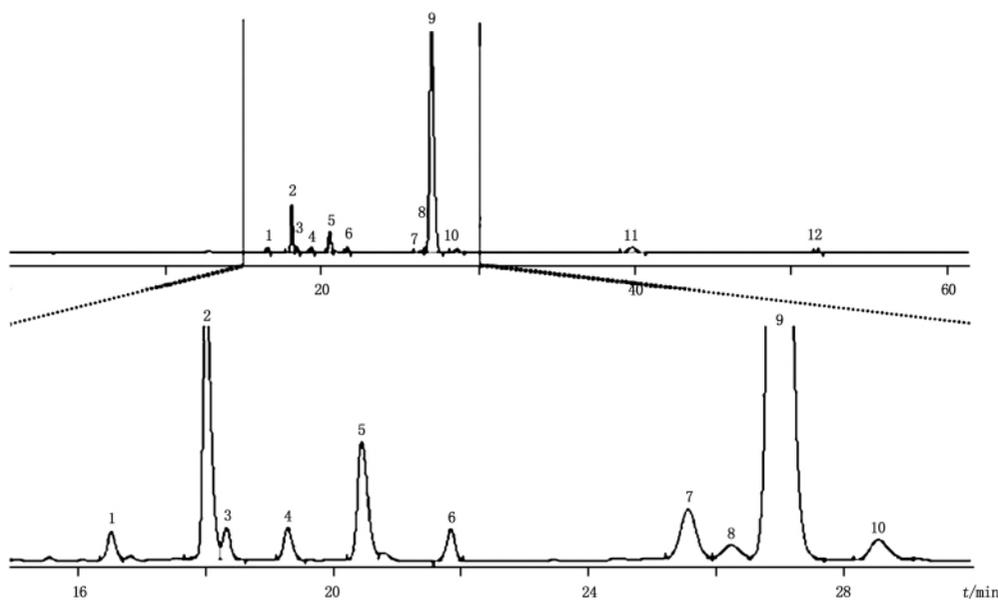


图3 灯盏花素注射液典型特征图谱

Fig 3 HPLC specific chromatograms of Dengzhanhuasu injection

9. 野黄芩苷(scutellarin)

表 2 灯盏花素注射液 HPLC 特征峰面积值 (共有模式)

Tab 2 HPLC specific peak areas of Dengzhanhuasu injection (common pattern)

峰号 (peak No.)	保留时间 (retention time) /min	峰面积 (peak area)
1	16.38	15.05
2	18.12	64.62
3	18.36	28.81
4	19.29	10.40
5	20.79	72.35
6	21.45	14.54
7	25.57	201.52
8	26.23	78.35
9(S)	26.97	7991.56
10	29.29	11.51
11	40.01	406.54

8 特征图谱差异原因分析

相同色谱条件下,灯盏花素注射液与其原料典型特征图谱差异较大,见图 1、图 3。不同企业生产的灯盏花素注射液特征图谱差异则更显著,见图 5。

8.1 灯盏花素注射液与其原料典型特征图谱差异原因分析 灯盏花素是从灯盏细辛中提取的以野黄芩苷为主的黄酮类成分。据文献报道^[6],野黄芩苷元上的 3 个羟基不稳定,易发生甲基化反应。因此,推断野黄芩苷可能在注射剂的辅料如乙二胺四乙酸钠或碳酸氢钠及流动相中甲酸的催化作用下,甲醇与野黄芩苷发生反应生成甲基化产物,而灯盏花素注射液原料中没有这些辅料,不发生甲基化反应。这可能是导致灯盏花素注射液与其原料典型特征图谱有差异的原因。

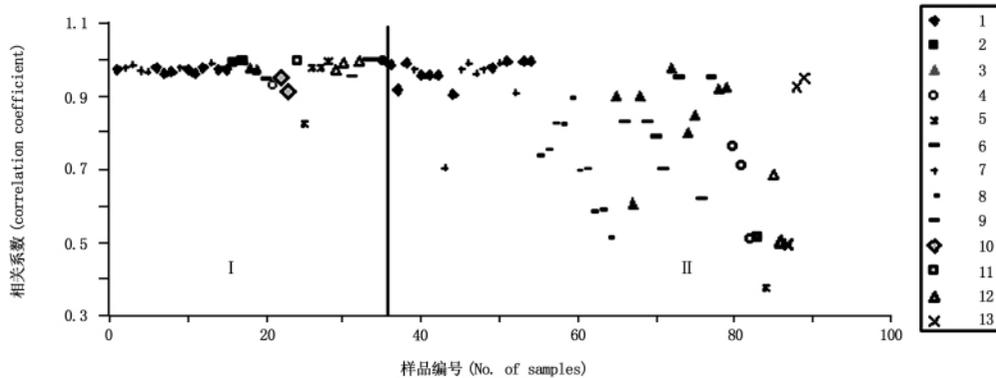


图 4 13 个厂家 89 批样品相关系数计算结果

Fig 4 Correlation coefficient calculation results of 89 batch samples of 13 manufacturers

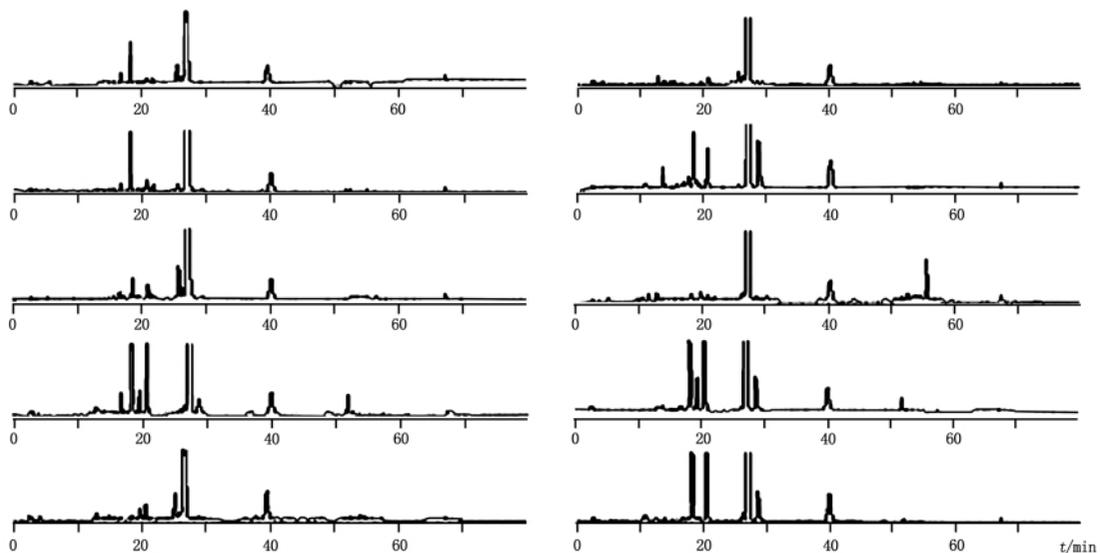


图 5 10 批灯盏花素注射液特征图谱 (不同企业生产)

Fig 5 HPLC chromatograms of 13 batch Dengzhanhuasu injection (produce by different factories)

8.2 灯盏花素注射液中野黄芩苷的含量分析 89 批样本,按上述色谱条件测定了野黄芩苷的含量(标示量%),含量在 90% 以上的有 7 批,85% ~ 90% 的有 9 批,80% ~ 85% 的有 10 批,75% ~ 8% 的有 20 批,70% ~ 75% 的有 13 批,70% 以下的有 30 批。平均含量为 73.4%,最低者为 43.15%。灯盏花素注射液中野黄芩苷含量参差不齐的原因是:原标准采用紫外分光光度法(吸收系数法)测定灯盏花乙素(野黄芩苷)的含量,并规定灯盏花乙素(野黄芩苷)的含量不低于 90%,但由于灯盏花甲素等与野黄芩苷有相近的结构,故该法实际测定的是总黄酮的含量。各企业生产工艺不相同,灯盏花甲素等也不尽相同,按原标准检验合格的灯盏花素注射液,用本文 HPLC 梯度洗脱测定野黄芩苷含量,势必有一定的差异。灯盏花素注射液相似度低的主要原因是全图谱中野黄芩苷峰的差异明显。

8.3 灯盏花素注射液溶液中野黄芩苷的稳定性 试验过程中发现:不同厂家的供试品溶液,稳定程度不一样。如灯盏花素注射液 55 号样本,按“2.1”项下的方法制备供试品溶液,按“3”项下色谱条件分别于 0 2 4 6 24 h 不同时间点进行检测,经比较发现除保留时间 18.17 min 和 27.29 min(野黄芩苷)的峰面积有显著变化外,其他色谱峰面积变化都不明显,注射液放置 24 h 后保留时间为 27.29 min 的峰面积下降了 26%,而保留时间为 18.17 min 的峰面积上升了 3 倍多。而有些厂家的样品 24 h 内均较稳定,说明不同厂家的制剂处方也是不一样的,从而导致不同生产厂家供试品溶液的稳定性也不一致。

9 讨论

9.1 特征图谱对灯盏花素注射液的质控作用 灯盏花素注射液特征图谱质控作用一是检查野黄芩苷以外的“有关物质”成分及“有关物质”之间的相对比例,二是纯度检查。本文色谱条件采用梯度洗脱,对杂质峰的洗脱能力加强,且主成分峰与各峰得到了较好的分离,即可用于定性鉴别,又可用于定量分析。

9.2 溶剂种类的选择 实验中还曾用甲醇作溶剂稀释灯盏花素注射液样品,但与同浓度的水稀释液相比,野黄芩苷的峰面积显著降低,并在 56 min 分钟处出现一杂质峰,因此,选用水为稀释样品用溶

剂。

9.3 相似度计算 由于灯盏花素注射液中野黄芩苷峰在特征图谱中占绝对优势,相似度计算中也贡献最大,掩盖了杂质的差异。因此采用了加权相似度的算法,相似度以相关系数表示。在考察了大量样本的基础上,认为将共有模式与待测样本的野黄芩苷峰面积乘以 0.15(降低权重)后,再与其他特征峰值组成 1 对数据计算相关系数,可以较好反映杂质峰差异而不影响其整体性。但现行国家药典委员会推荐的特征图谱软件不支持此算法,本品色谱峰不多,用计算器或用 Excel 计算相关系数,操作也较简单。

9.4 小结 不同企业生产的灯盏花素注射液在外观、含量、稳定程度及特征图谱上均有较大的差异,这些差异可能是由企业生产工艺不同及质量标准的不可控性造成的。因此,灯盏花素注射液生产工艺的统一及建立注射液规范化的质量标准势在必行。

参考文献

- 1 Drug Specifications Promulgated by Ministry of Public Health, PR China(卫生部药品标准). Chinese Traditional Patent Medicines(中药成方制剂). Vol 20(第二十册). 1998. 102
- 2 ZHENG Jin-feng(郑金凤), LI Wen-li(李文莉), FENG Fang(冯芳). HPLC determination of scutellarin and its related substances in breviscapine injection(HPLC 法测定灯盏花素注射液中野黄芩苷含量及有关物质). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2011, 31(1): 34
- 3 WANG Yue-fei(王越飞), PAN Gui-xiang(潘桂湘), GAO Xiu-mei(高秀梅) et al. HPLC simultaneous quantification of four bioactive components in Herba Erigerontis from different habitats(HPLC 法同时测定不同产地灯盏细辛中 4 种有效成分的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2009, 29(3): 416
- 4 DONG Yuan(董媛), CHEN Bin(陈彬), LI Hai-shan(李海山) et al. Study on HPLC fingerprint of Herba Erigerontis(灯盏细辛药材 HPLC 指纹特征研究). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2010, 30(7): 1228
- 5 XIE Pei-shan(谢培山). Fingerprint of Chinese Herbal Medicine(中药色谱指纹图谱). Beijing(北京): People's Medical Publishing House(人民卫生出版社) 2005. 219
- 6 LIU Li-yan(刘丽艳), DU Xiao-juan(杜晓娟), CHEN Zhi-yu(陈治宇) et al. Methylation of scutellarin(野黄芩苷的甲基化). *J Chengde Med Coll*(承德医学院学报), 1999, 16(3): 217

(本文于 2010 年 8 月 7 日收到)