

## 基于化学特征图谱-生物热活性图谱关联检测的注射用双黄连冻干粉针质量控制方法的初步研究

张雅铭<sup>1,2</sup>, 鄢丹<sup>2\*</sup>, 张萍<sup>2</sup>, 任永申<sup>2</sup>, 张少峰<sup>2</sup>, 冯雪<sup>2</sup>, 肖小河<sup>2\*</sup>

(1. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850; 2. 中国人民解放军第302医院全军中药研究所, 北京 100039)

**摘要:** 为了建立包括生物热活性检测在内的中药注射剂质量控制方法, 本文以注射用双黄连冻干粉针为模式药, 建立 HPLC-ELSD 特征图谱, 进行相似度评价; 采用微量量热法, 建立生物热活性图谱, 并提取相关生物热动力学参数 (达峰时间  $T_m^2$ ,  $T_j$  和抑制率  $I\%$ ), 以相关系数法进行相似度评价。结果表明, HPLC-ELSD 特征图谱不易区分不同贮藏条件下样品之间的微小差异, 特别是对生物污染样品基本无法辨识; 生物热活性图谱可以区别高温处理样品及污染变质样品, 并可以全面反映模型生物的热生物学信息, 提供了专属性较强的二维信息, 可作为化学特征图谱的有益补充。本文从质量均一性出发, 通过 HPLC-ELSD 特征图谱和生物热活性图谱关联检测对注射用双黄连冻干粉针进行质量控制, 为实现对中药注射剂质量变化的早期快速筛查, 预警其不良反应提供了技术参考。

**关键词:** 注射用双黄连冻干粉针; HPLC-ELSD; 生物热活性图谱; 质量控制; 均一性

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 01-0093-05

## Quality control of Shuanghuanglian freeze-dried powder for injection based on its HPLC-ELSD fingerprints and biological profiles

ZHANG Ya-ming<sup>1,2</sup>, YAN Dan<sup>2\*</sup>, ZHANG Ping<sup>2</sup>, REN Yong-shen<sup>2</sup>, ZHANG Shao-feng<sup>2</sup>, FENG Xue<sup>2</sup>, XIAO Xiao-he<sup>2\*</sup>

(1. Institute of Pharmacology and Toxicology, The Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;

2. China Military Institute of Chinese Materia Medica, 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China)

**Abstract:** This paper is aimed to provide the methods of quality control and bioassay of traditional Chinese medicine injections including bioassay method. Shuanghuanglian freeze-dried powder for injection (SFPI) was chosen as study object. HPLC-ELSD fingerprints of SFPI had been established and the samples were differentiated by similarity calculation. Meanwhile, biological profiles of SFPI on *Escherichia coli* had been established by microcalorimetry. The similarity values were calculated using the correlation coefficient, based on quantitative thermo-kinetic parameters ( $T_m^2$ ,  $T_j$ ,  $I\%$ ). The results indicated that HPLC-ELSD fingerprints, which showed content changes of chemical components, could not monitor minimal variation of different samples, especially that of biological pollutants, while biological profiles could sensitively detect antibiotic activity alterations of the samples, which were kept under specific conditions. In conclusion, characterized by two-dimension, microcalorimetry could supply thermograms as biological profiles characterized to describe the bioactivity of drugs. This study could clearly demonstrate that the correlative detection was proposed as an efficient strategy for quality control of SFPI, based on HPLC-ELSD fingerprints and biological profiles, which could detect quality fluctuation of samples early and quickly and predict the potential adverse drug events (ADE)

收稿日期: 2009-07-25.

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目 (2009ZX09502-003, 2009ZX09502-022); 国家自然科学基金资助项目 (30701109).

\*通讯作者 Tel: 86-10-66933322, Fax: 86-10-63879915, E-mail: pharmacy302@126.com

Tel: 86-10-66933325, Fax: 86-10-63879915, E-mail: yd277@126.com

for ensuring clinical safety.

**Key words:** Shuanghuanglian freeze-dried powder for injection; HPLC-ELSD; biological profile; quality control; consistency

中药注射剂是我国独创的中药新剂型,在抢救危重症过程中发挥着其他剂型难以替代的独特作用,近年来不良反应报道较多,严重影响其临床的进一步应用。中药注射剂质量控制与安全性评价至关重要,产品质量问题是引起中药注射剂不良反应的重要原因之一。现有质量控制中的单一组分含量测定难以全面控制其质量。化学特征图谱通过对各色谱峰峰形、峰面积、保留时间及相似度的描述,反映了样品整体化学组分的含量波动,谱效(毒)关系尚未阐明。动物药理试验是药物生物活性有效的检测方法,但是试验周期长、干扰因素多,缺少快速灵敏的检测指标和方法。

本文以注射用双黄连冻干粉针为模式药,该药由中药金银花、黄芩、连翘精制而成,收载于 2005 版药典,是一种静脉给药的中药粉针剂,具有良好的抗菌、抗病毒、抗炎解热的功效,主要用于上呼吸道感染及急、慢性咽喉炎等疾病<sup>[1]</sup>,临床疗效确切。近年来不良反应/事件报道较多,以全身性损害、呼吸系统损害为主,严重影响其临床应用,所以对其进行质量控制和安全性评价非常重要。

本文在现有中药注射剂质控方法基础上,结合前期研究<sup>[2,3]</sup>,以注射用双黄连冻干粉针 HPLC-ELSD 特征图谱表征样品整体化学组分的含量波动;从质量均一性出发,以其抑菌活性为着眼点,采用微量量热法,以生物热活性图谱及热动力学参数定性定量地表征注射用双黄连冻干粉针抑菌活性的差异,为其质量的一致性和稳定性提供参考。

## 材料与方法

**仪器及材料** Agilent1100 高效液相色谱仪(DAD 检测器、四元梯度泵、在线脱气机), HP Chem station 色谱工作站, Alltech-2000 蒸发光散射检测器, AL 204 型电子天平(上海 Mettler-Toledo)。TAM III 12 通道毫瓦级热导式量热仪(Thermometric AB, 瑞典),实验时系统控温 37 °C, YXQLS-B 全自动立式电热蒸气灭菌器(上海降拓仪器设备有限公司)。

乙腈为色谱纯(美国 Fisher 公司),其他试剂为分析纯,水为双蒸水。大肠杆菌(*Escherichia coli* CMCC B44103)菌株,由中国药品生物制品检定所提供。LB 培养基: NaCl 5 g, 酵母膏 5 g, 蛋白胨 10 g, 溶解于

1 L 蒸馏水中,调至 pH 7.0~7.2 后分装, 121 °C 高压蒸气灭菌 30 min, 冷却后置 4 °C 冰箱中保存备用。注射用双黄连冻干粉针购于哈尔滨中药二厂,样品批号: S1 (0802101)、S2 (0805108)、S3 (0802109)、S4 (0802112)、S5 (0810109)、S6 (0903101)、S7 (0806109)、S8 (0802101)、S9 (0805108)、S10 (0903101)、S11 (0802109)、S12 (0802112)、S13 (0810109),其中样品 S1-S7、S8-S10 及 S11-S13 分别于避光室温(22 °C)、高温(60 °C)及室温敞口条件各放置 10 d。

**HPLC-ELSD 特征图谱的建立** 色谱柱: Kromasil C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 柱温: 30 °C; 流速: 1 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量: 5 μL。流动相为 0.5% 磷酸水溶液(A)-乙腈(B),洗脱程序: 0 min, 5% B; 15 min, 15% B; 20~35 min, 20% B; 45 min, 28% B; 55 min, 70% B; 70 min, 100% B。蒸发光散射检测器参数: 漂移管温度 115 °C; 载气(N<sub>2</sub>)流速 3.2 L·min<sup>-1</sup>; 不分流模式(impact off)。精密称取注射用双黄连冻干粉末适量,用甲醇-水(50:50)溶解,并转移至量瓶中,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液。

**生物热活性图谱的建立** 在恒温 37 °C 无菌条件下,采用微量量热仪的安瓿法测定。先将大肠杆菌接种到蛋白胨培养基中形成悬浮液(细胞数 1×10<sup>6</sup>·mL<sup>-1</sup>),分别与用灭菌水配制的不同浓度的注射用双黄连冻干粉针供试液混合,一并加入安瓿瓶中,加盖、密封,放入微量量热仪中跟踪记录大肠杆菌生长代谢的热谱图,当曲线重新返回基线时停止<sup>[4]</sup>。Origin 软件作图并提取生物热力学系数,结果用 SAS 软件进行统计。

## 结果

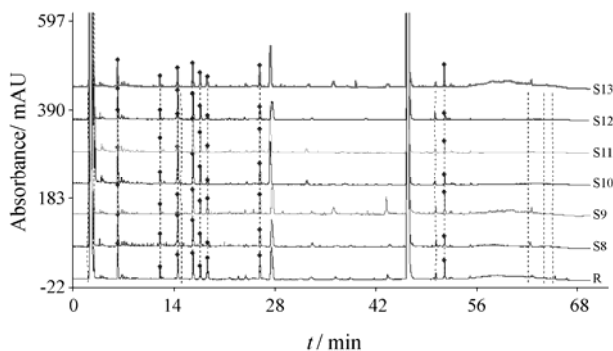
### 1 注射用双黄连冻干粉针化学特征图谱分析

**1.1 方法学考察** 取 S1 供试品溶液连续进样 6 次,计算各色谱峰的相对峰面积与保留时间。结果显示,相对峰面积与相对保留时间 RSD 均小于 3%,说明精密密度良好,符合特征图谱的检测要求。

取 S1 共 5 份,按供试品溶液制备方法制备供试液,分别进行 HPLC-ELSD 测定,计算各色谱峰的相对峰面积与相对保留时间。结果显示,相对峰面积与相对保留时间的 RSD 均小于 3%,说明重现性良好,符合特征图谱的检测要求。

将样品 S1 供试品溶液分别在 0、2、4、8、12 和 24 h 进样, 计算各共有峰的相对峰面积与相对保留时间, 结果显示, 共有峰的相对峰面积与相对保留时间的 RSD 均小于 3%, 说明样品在 24 h 内稳定。

**1.2 化学特征图谱相似度分析** 通过 HPLC-ELSD 特征图谱对样品 S1-S7 进行分析, 建立共有模式。以样品 S1-S7 (避光室温储存样品) 导入中药色谱特征图谱相似度评价系统研究版 (2004 A), 选取“时间窗”宽度为 0.50 min, 以均值的方法生成“对照图谱”, 如图 1 的“R”所示, 再将对照图谱“R”和 S8-S13 样品色谱图全谱导入中药色谱特征图谱相似度评价系统研究版 (2004 A), 确定 HPLC-ELSD 特征图谱的 17 个峰为共有特征色谱峰。



**Figure 1** HPLC-ELSD fingerprints of Shuanghuanglian freeze-dried powder for injections. R: Contrast; S8-13: Samples

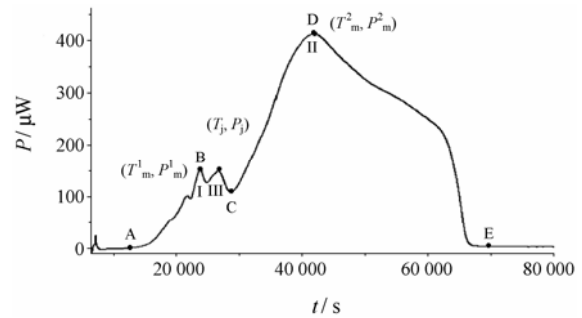
## 2 注射用双黄连冻干粉针生物热活性图谱分析

**2.1 大肠杆菌的生长热谱曲线** 图 2 是 37 °C 下, 安瓿法测定的大肠杆菌在未加药时生长代谢的热谱曲线。在密闭的安瓿瓶中营养物和氧的供给是有限的, 结合微生物生长代谢的一般规律, 大肠杆菌的生长代谢的热谱曲线分为 4 个期: 第一指数生长期 (A-B)、停滞期 (B-C)、第二指数生长期 (C-D)、衰亡期 (D-E)<sup>[5]</sup>。以达峰时间  $T_m$ 、发热功率  $P$ 、指数生长期生长速率常数  $k$  和总发热量  $Q_t$  等参数对其进行分析, 如图 2 所示峰 I、II 和 III 的达峰时间和发热功率分别为  $(T_m^1, P_m^1)$ 、 $(T_m^2, P_m^2)$  和  $(T_j, P_j)$ 。基于细菌细胞的多种热动力学模型中以指数模型最为常用<sup>[6]</sup>, 指数模型认为在细菌细胞的生长过程中的指数生长期:

$$P_m = P_0 \exp(kt) \text{ 或 } \ln P_m = \ln P_0 + kt \quad (1)$$

式中的  $P_m$  就是生物热活性图谱中指数生长期内  $t$  时刻的输出热功率, 将图谱的两个指数生长期  $P_m$ 、 $t$  值代入公式 (1) 中, 进行线性拟合可得大肠杆菌的第一和第二指数生长期生长速率常数  $k_1$  和  $k_2$  值; 对图谱积分可以求得曲线下面积即得总发热量  $Q_t$ ; 从图

谱上可以直接读取第一指数生长期的最大发热功率  $P_m^1$  及达峰时间  $T_m^1$  和第二指数生长期的最大发热功率  $P_m^2$  及达峰时间  $T_m^2$ 。这些生物热动力学参数的改变均可反映样品的抑菌活性。经计算, 未经药物干预时大肠杆菌生长代谢的第二指数生长期生长速率常数  $k_2 = (0.475 \pm 0.004) \text{ h}^{-1}$ , RSD 为 0.954% ( $n = 5$ ), 说明实验结果具有良好的重现性。



**Figure 2**  $P$ - $t$  growth curve of *E. coli*

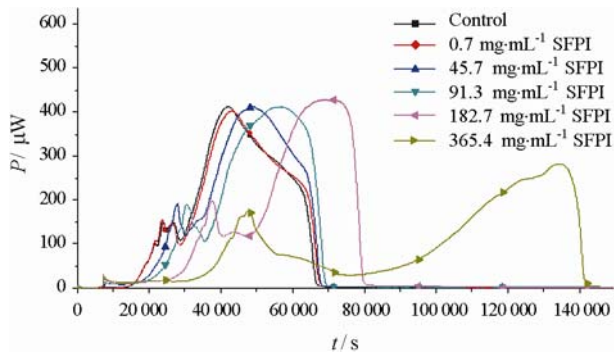
**2.2 量-效关系考察** 图 3 为注射用双黄连冻干粉针不同浓度作用下的大肠杆菌生长热活性图谱, 由图谱及生物热力学参数分析, 随供试液浓度增加, 大肠杆菌生长曲线整体呈“后延”趋势, 且其生长状况与第二指数生长期的达峰时间  $T_m^2$  相关性最显著, 可作为评价供试液抑菌活性强弱的客观指标, 因此本文选择  $T_m^2$  计算抑菌率 ( $I\%$ ) 为注射用双黄连冻干粉针作用于大肠杆菌生长代谢量效关系的评价指标, 按公式 (2) 进行计算, 并且抑菌率 ( $I\%$ ) 与剂量的量效关系重现性、稳定性均较好 ( $r = 0.9967$ )。

$$I\% = (T_m^2 - T_0^2) / T_0^2 \times 100\% \quad (2)$$

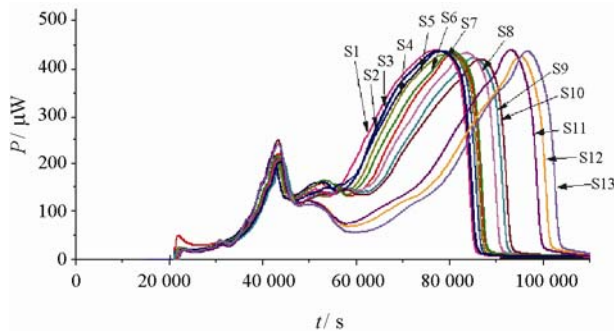
式中  $T_0^2$  为未经药物干预时大肠杆菌生长代谢的第二指数生长期的达峰时间,  $T_m^2$  为药物干预时大肠杆菌生长代谢的第二指数生长期的达峰时间。

**2.3 生物热活性图谱相似度分析** 图 4 为注射用双黄连冻干粉针样品 S1-S13 的生物热活性图谱, 其生物热力学参数及抑制率见表 1。样品 S1-S13 生物热力学参数  $T_m^1$ 、 $P_m^1$ 、 $T_m^2$ 、 $P_m^2$ 、 $T_j$ 、 $k_1$ 、 $k_2$ 、 $Q_t$  中, 达峰时间  $T_m^2$ 、 $T_j$  和抑制率  $I\%$  更能表征药物作用于细菌随时间生长变化特征, 故选  $T_m^2$ 、 $T_j$  和抑制率  $I\%$  作为注射用双黄连冻干粉针样品生物热活性图谱谱峰测量参数, 采用相关系数法对样品 S1-S13 生物热活性图谱进行相似度分析, 由图 4 及表 2 结果可知, S1-S7 (避光室温储存样品) 的相似度较高; S8-S10 (高温 60 °C 储存样品) 的相似度在“量”上与 S1-S7 有差异, 相似模式没有明显差异; S11-S13 (污染变质样

品) 的相似度在 0.800~0.900 之间, 相似模式与 S1-S7 存在差异。S11-S13 (污染变质样品) 的第一指数生长期  $P_m^1$  较正常样品和高温处理样品  $P_m^1$  高, 且  $T_m^2$ 、 $T_j$  及抑制率  $I\%$  与正常样品和高温处理样品比较有明显差异。



**Figure 3**  $P$ - $t$  growth curves of *E. coli* with different concentrations of Shuanghuanglian freeze-dried powder for injection (SFPI)



**Figure 4** Biological profiles of Shuanghuanglian freeze-dried powder for injections. S1-13: Samples

### 3 综合分析

注射用双黄连冻干粉针的 HPLC-ELSD 特征图谱表明, 与正常样品的对照图谱 “R” 比较, 高温处理样品 (S8-S10) 及染菌样品 (S11-S13) 的 10、15 号峰平均峰面积下降约两倍, 16、17 号峰的平均峰面积增加约两倍。相似度分析结果 (0.97、0.98、0.97、0.99、0.97、0.98、0.98、0.92、0.98、0.87、0.87、0.93、0.98) 表明 HPLC-ELSD 特征图谱不能较好的分辨出特殊条件处理的样品, 尤其是不能分辨污染变质样品。

注射用双黄连冻干粉针的生物热活性图谱分析结果表明: 与正常样品相比, 高温处理样品 (S8-S10) 及染菌样品 (S11-S13) 抑菌活性增强,  $T_m^2$ 、 $T_j$  及抑

**Table 2** Similarity values of HPLC-ELSD fingerprints and biological profiles

Sample No.	Chromatographic fingerprints	Biological profiles
S1	0.97	0.99
S2	0.98	0.99
S3	0.97	0.99
S4	0.99	0.99
S5	0.97	0.99
S6	0.98	0.98
S7	0.98	0.98
S8	0.92	0.95
S9	0.98	0.94
S10	0.87	0.93
S11	0.87	0.87
S12	0.93	0.85
S13	0.98	0.84

**Table 1** Biothermodynamic parameters of *E. coli* and inhibition rates

Sample	$T_m^1/s$	$P_m^1/\mu W$	$T_m^2/s$	$P_m^2/\mu W$	$T_j/s$	$k_1/h^{-1}$	$k_2/h^{-1}$	$Q_t/J$	$I\%$
S1	43 466	206	77 194	433	53 864	0.446	0.216	12.56	0.46
S2	43 719	201	77 222	432	52 651	0.493	0.194	12.43	0.46
S3	43 863	205	78 783	431	54 882	0.468	0.189	12.73	0.49
S4	42 106	213	77 774	432	54 006	0.526	0.179	12.39	0.47
S5	42 834	205	79 101	424	51 088	0.504	0.203	12.52	0.50
S6	43 060	213	80 437	430	52 444	0.544	0.198	12.57	0.52
S7	43 067	218	80 667	425	54 221	0.508	0.178	12.08	0.53
S8	43 466	212	83 512	428	58 363	0.497	0.195	12.83	0.58
S9	44 156	202	84 950	417	57 922	0.490	0.204	12.62	0.61
S10	43 379	210	86 449	414	58 629	0.475	0.184	12.74	0.64
S11	43 198	246	93 018	434	43 247	0.738	0.199	12.66	0.76
S12	43 247	241	95 058	421	43 198	0.810	0.188	12.41	0.80
S13	43 261	237	96 550	432	43 261	0.731	0.211	12.53	0.83

$n = 3$ .  $T_m^1$ : Maximum appearance time of phase I;  $T_m^2$ : Maximum appearance time of phases II;  $T_j$ : Appearance time of peak III;  $P_m$ : Maximum heat rating of exponential growth phase;  $k$ : Growth rate constant of exponential growth phase;  $Q_t$ : Total caloric power;  $I\%$ : Inhibition rate

制率  $I\%$  较正常样品大。相似度分析结果 (0.99、0.99、0.99、0.99、0.99、0.98、0.98、0.95、0.94、0.93、0.87、0.85、0.84) 可以区分正常样品、高温处理样品与污染变质样品。

综上所述, 在中药注射剂的质量控制和安全性评价过程中, 注射用双黄连冻干粉针 HPLC-ELSD 特征图谱显示样品在高温和染菌情况下化学组分含量的变化, 而生物热活性谱则可以表征其抑菌活性的变化, 并且两种方法具有较好的互补性。

## 讨论

本研究从注射用双黄连冻干粉针质量均一性角度切入, 首先制备不同贮藏条件下的特殊样品, 通过考察高温处理样品及污染变质样品的质量差异, 旨在模拟考察储存和运输过程中样品成分及活性的变化, 为中药注射剂质量波动的早期快速筛查提供技术参考。本研究对样品统一进行盲法编号 (即实验过程中对各个样品的储存情况未知), 所以可保证研究结果的客观性。

本文建立了注射用双黄连冻干粉针的 HPLC-ELSD 特征图谱, 有效地检测了化学成分的含量变化, 从化学信息上表征其质量的变化。蒸发光散射检测器作为一种通用型的检测器, 产生的响应只与分析成分的质量相关, 而不依赖其光学性质, 梯度洗脱时流动相不产生背景干扰, 通过稳定的特征图谱实现对中药注射剂质量的控制, 能够检测到样品在储存和运输过程中所产生的无紫外吸收的化学成分<sup>[7]</sup>, 在中药注射剂质量控制方面具有明显的优势。微量量热法是基于生化反应中普遍存在的热交换而建立的, 能实时、在线、动态、量化地反应微生物生长代谢过程中的动态整体信息, 从而有效的弥补了常规方法信息单一的不足<sup>[8]</sup>。注射用双黄连冻干粉针生物热活性图谱是在限定性条件下、大肠杆菌在药物 (双黄连冻干粉针) 干预后, 微量量热仪实时记录不同时间点的发热功率得到的热谱曲线, 随双黄连冻干粉针浓度的不同出现的特征性变化。

本文从序贯应用化学特征图谱检查及生物特征图谱检查, 定性定量中药注射液合格样品/特殊样品的质量信息, 以期建立合格样品质量标准信息数据库, 采用模式识别技术, 比对特殊样品质量信息, 筛选标准质量变化的敏感信息, 设定其阈值范围, 建立判别函数; 从而在对样品质量检验过程中采用模式识别、参数放行技术, 以实现中药注射剂质量波动的早期预警的目的。

## References

- [1] Wu RQ. Application of Shuanghuanglian injection powder in medical therapy [J]. J Emerg Syndromes Tradit Chin Med (中国中西医结合), 2007, 17: 857-858.
- [2] Wang JB. Demonstration Study on the Bioassay and Quality control of Radix et Rhizoma Rhei (大黄的生物测定和质量控制研究) [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2008.
- [3] Li Y. Study on the Bioassay and Quality Control of Radix Isatidis (板蓝根的生物测定和质量控制研究) [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2008.
- [4] Liu, Y, Wang GL, Zhao RM, et al. Microcalorimetric study on the growth of *Escherichia coli* HB101 effected by recombinant plasmid [J]. Acta Chim Sin (化学学报), 2005, 63, 327-331.
- [5] Lin XY, Liu Y, Liu P, et al. Microcalorimetric investigation on the growth model and the protein yield of *Bacillus thuringiensis* [J]. Biochem Biophys Methods, 2004, 59: 267-274.
- [6] Liu Y, Xie WH, Xie CL, et al. Thermo kinetic study of the limited growth of bacteria [J]. Acta Phys Chim Sin (物理化学学报), 1996, 12: 156-158.
- [7] Yan SK, Xin WF, Wang YM, et al. Application of HPLC-ELSD fingerprint and constellation graphical clustering method applied to evaluate the quality of Qingkailing injection [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2005, 40: 842-845.
- [8] Yan D, Xiao XH, Jin C, et al. Microcalorimetric investigation of the effect of berberine alkaloids from *Coptis chinensis* Franch on *Staphylococcus aureus* growth [J]. Sci Sin B (中国科学 B 辑), 2008, 51: 640-645.