

复方大青叶注射液 HPLC 指纹图谱研究

刘 瑞, 刘志刚, 李 磊, 任 冲, 袁 波, 李发美*

(沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016)

[摘要] 目的: 采用 HPLC 建立复方大青叶注射液的指纹图谱测定方法。方法: 采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱, 甲醇-水-磷酸为流动相进行梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm。结果: 建立了复方大青叶注射液的 HPLC 对照指纹图谱, 标示了注射液中的 20 个共有峰, 并初步确定注射液的相似度阈值为 0.85。结论: 该方法准确、重复性好, 为复方大青叶注射液的质量控制提供了依据。

[关键词] 复方大青叶注射液; 质量控制; 指纹图谱; 相似度

[中图分类号] R 284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-5302(2006)13-1059-04

色谱指纹图谱是在寻求综合评价中药质量的过程中鉴别中药真实性、评价质量一致性和稳定性实际可行的模式。复方大青叶注射液由大青叶、金银花、大黄、羌活和拳参 5 味药材经提取加工制成, 是中华人民共和国卫生部药品标准收载的品种^[1]。本研究建立了复方大青叶注射液 HPLC 指纹图谱检测标准, 实验方法的精密度、稳定性和重复性良好, 操作简便可行, 并采用国家药典委员会的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004 A 版)对 16 批大生产的注射液进行相似度评价, 同时对药材、中间体和注射液的相关性进行了研究。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪, DAD 检测器, Chemstation 色谱工作站; METTLER TOLEDO 电子天平; 甲醇(色谱纯), 磷酸(分析纯), 均购自山东禹王实业有限公司禹城化工厂; 尿苷(批号 887-200001), 腺苷(批号 879-200001), 没食子酸(批号 0831-9501), 绿原酸(批号 0753-200111), 均购自中国药品生物制品检定所; 复方大青叶注射液由国内几家生产企业提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件和系统适用性试验

Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm); 流动相 A 甲醇-B 0.2% 的磷酸水溶液(用 10% 的氢

氧化钠溶液调 pH 为 3.0), 梯度洗脱: 0 ~ 16 min, 3% ~ 20% A; 16 ~ 60 min, 20% ~ 75% A; 60 ~ 70 min, 流动相比比例保持不变; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 254 nm; 供试品溶液和对照品溶液各 20 μL。所有组分在 70 min 内洗脱出柱, 理论板数按尿苷峰计算不低于 2 万, 尿苷峰与相邻峰的分度大于 1.5。

2.2 供试品溶液的制备

精密吸取注射液 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用重蒸水稀释并定容至刻度。

2.3 参照物溶液的制备

取尿苷对照品适量, 精密称定, 重蒸水溶解, 并稀释成每 1 mL 中含 30 μg 的尿苷对照品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取供试品溶液, 在上述色谱条件下重复进样 5 次。结果表明, 各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%, 直观观察指纹图谱的全貌无明显变化, 测得的色谱指纹图谱相似度不小于 0.98, 符合指纹图谱技术要求。

2.4.2 重复性试验 分别精密量取同一批复方大青叶注射液 5 份, 每份 1.0 mL, 按“供试品溶液的制备”项下操作, 在上述色谱条件下进行 HPLC 分析。结果表明, 各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%, 直观观察指纹图谱的全貌无明显变化, 测得的色谱指纹图谱相似度不小于 0.98, 符合指纹图谱技术要求。

2.4.3 稳定性试验 取供试品溶液, 室温下放置, 分别在 0, 2, 4, 8, 16, 24 h 测定。结果表明, 各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于

[收稿日期] 2005-06-28

[基金项目] 国家科技攻关计划项目(2001BA701A56)子项目

[通讯作者] * 李发美, Tel: (024) 23986289, E-mail: fameili @

3.0%, 直观观察指纹图谱的全貌无明显变化, 测得的色谱指纹图谱相似度不小于 0.98, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5 样品测定

取统一工艺后, 各企业提供的 16 批复方大青叶注射液, 按“供试品溶液的制备”项下操作, 在上述色谱条件下进行指纹图谱分析。以尿苷峰为参比峰, 将其保留时间定为 1.0, 标示了复方大青叶注射液指纹图谱中 20 个共有指纹峰, 各峰相对保留时间见表 1。

表 1 复方大青叶注射液指纹图谱共有峰的相对保留时间(t'_R)

峰号	t'_R	峰号	t'_R	峰号	t'_R
1	0.64	8	1.27	15	3.22
2	0.72	9	1.40	16	3.31
3	0.82	10	1.73	17	3.86
4	0.86	11	2.00	18	4.17
5	1.00	12	2.50	19	4.43
6	1.08	13	2.67	20	5.34
7	1.19	14	2.99		

2.6 指纹图谱相似度的测定

采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)评价 16 批复方大青叶注射液的指纹图谱, 设定时间窗宽度为 0.5 min, 以均值法生成对照指纹图谱, 建立共有模式, 见图 1, 苯甲醇不加入相似度计算, 测得样品与共有模式之间的相似度, 结果见表 2。

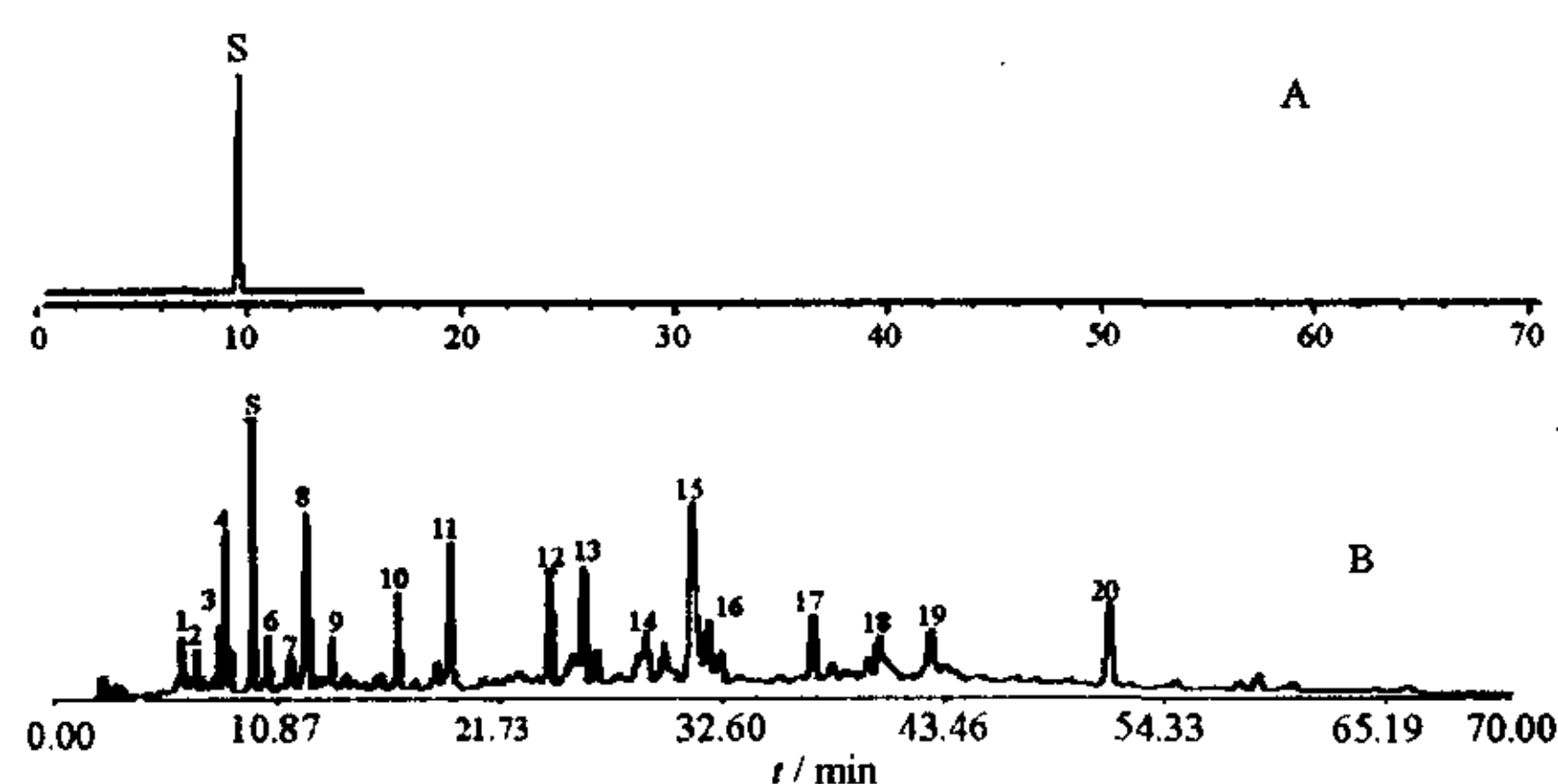


图 1 尿苷色谱图(A)和复方大青叶注射液 HPLC 指纹图谱(B)

S. 尿苷; 8. 没食子酸; 10. 腺苷;
12. 绿原酸; 15. 苯甲醇

2.7 相关性研究

2.7.1 药材和注射液的相关性 按复方大青叶注射液生产工艺^[2]和“供试品溶液的制备”项下操作, 自制大青叶、金银花、羌活、拳参和大黄药材的 HPLC 供试液, 按已建立的复方大青叶注射液 HPLC 指纹图谱色谱条件检测, 得到各药材 HPLC 指纹图谱, 与

表 2 16 批复方大青叶注射液样品指纹图谱相似度

No.	批号	相似度	No.	批号	相似度
1	041221	0.932	9	041223	0.914
2	041222	0.930	10	041229	0.944
3	041102	0.866	11	041201	0.977
4	041226	0.934	12	050101	0.917
5	041186	0.982	13	041221	0.981
6	041223	0.964	14	041226	0.963
7	041224	0.972	15	050101	0.909
8	050103	0.927	16	050104	0.899

复方大青叶注射液指纹图谱相比较, 结果表明, 在注射液指纹图谱中, 除 15 号色谱峰为辅料苯甲醇外, 20 个指纹峰有 10 个来自大青叶(1, 2, 3, 4, 5, 10, 11, 16, 18, 19), 13 个来自金银花(4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19), 7 个来自羌活(4, 5, 9, 12, 13, 16, 19), 4 个来自拳参(8, 9, 12, 13), 7 个来自大黄(6, 7, 8, 13, 18, 19, 20), 所有指纹峰均从药材指纹图谱中找到归属。

2.7.2 中间体和注射液的相关性 按照注射液的生产工艺 2 次水沉后为中间体。复方大青叶注射液及其对应中间体的 HPLC 指纹图谱见图 2。由图 2 可见, 中间体的主要色谱峰均保留在注射液中, 但注射液色谱峰的峰面积相对较小。此外, 多增加了苯甲醇的色谱峰。按生产工艺自制的注射液与中间体的峰面积总积分值的比较见表 3。从表中可以看出, 中间体和注射液相关性良好, 但从中间体到注射液的过程中, 指纹图谱的总积分值下降大约 40% 左右, 推测可能由于活性炭的加入对成分的吸附所致。

3 讨论

3.1 色谱柱的考察

按照指纹图谱研究技术指南的要求, 作者考察了注射液在不同填料的色谱柱(C_8 , C_{18} 和氨基柱)上的分离情况, 结果在 C_{18} 柱上注射液中各成分能达到较好分离。同时对不同品牌色谱柱进行了考察, 分别用 Hypersil ODS-1 C_{18} 柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μ m, 大连依利特公司, 含碳量为 12%, 封尾), Dikma DiamonsilTM C_{18} 柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μ m, 迪马公司, 含碳量为 17%, 封尾), Kromasil ODS-1 柱 C_{18} (4.6 mm × 200 mm, 5 μ m, 天美公司, 含碳量 17.5%, 封尾)进行洗脱, 结果表明 Dikma DiamonsilTM C_{18} 柱洗脱出的色谱峰基线平稳, 峰数多且分离度好, 其他 2 种色谱柱上的分离尚可, 但色谱图略差, 最终选用 Dikma DiamonsilTM C_{18} 柱。

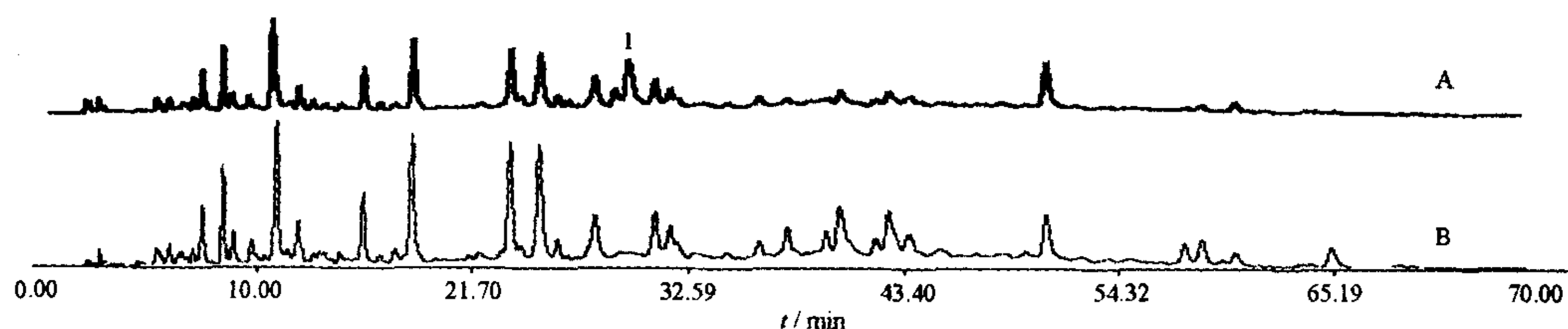


图 2 复方大青叶注射液和中间体的指纹图谱

A. 注射液; B. 中间体; 1. 苯甲醇

表 3 注射液和中间体指纹图谱的总积分值比较

批号	注射液	中间体	注射液:中间体
0409021	37 785	62 913	0.601
0409022	29 176	41 661	0.700
0409023	35 230	60 169	0.586
0409024	36 965	59 188	0.625
0409025	36 588	49 612	0.737
0409026	38 646	52 068	0.742
0409027	37 882	54 969	0.689
0409028	36 234	53 116	0.682
均值	36 063	54 212	0.665

3.2 流动相的考察

考察了多种流动相系统(甲醇-冰醋酸水溶液, 甲醇-醋酸铵缓冲液, 甲醇-磷酸水溶液, 甲醇-磷酸盐溶液, 乙腈-磷酸盐溶液等)和 pH 对分离的影响, 发现以甲醇-磷酸盐溶液为流动相比较好。在此色谱条件下, 图谱的各峰分离度良好, 基线平整, 特征性指纹峰表达明显, 且图谱的稳定性、重复性、精密度均好, 整个谱图运行时间为 70 min, 而且样品在色谱柱上没有残留, 对下一样品分析无干扰。150 min 色谱图见图 3(60 min 后流动相比比例保持不变)。

3.3 检测波长的考察

考察了 230, 254, 280, 300 nm 等波长下的检测情况, 结果在 280, 300 nm 下只能检测到少数色谱峰, 不能表现出注射液成分的整体特征; 254 nm 和 230 nm 下指纹图谱色谱峰数较多, 各指纹特征峰均有较大吸收, 能全面反映注射液成分的信息特征, 而且在 254 nm 下, 各色谱峰强度较均匀, 基线平整, 而在 230 nm 下测定时, 基线的稳定性较差, 各峰强度差异较大, 尤其溶剂前沿的峰强大, 同时运用二极管阵列检测器对检测波长进行选择, 确定 254 nm 为最佳检测波长。

3.4 参照物的选择

根据参照物的选择原则, 首选君药中的有效成分为参照物, 但是复方大青叶注射液水提醇沉的生产工艺使得君药大青叶的脂溶性有效成分靛蓝和靛

玉红在注射液中含量极低, 在指纹图谱中检测不到这 2 种成分(见图 3 B)。因此作者又选取主要来自注射液中君药大青叶的指标成分尿苷作为参照物。有关尿苷成分的鉴定已另撰文。在确定的色谱条件下, 尿苷色谱峰峰面积稳定, 与相邻色谱峰分离良好, 有助于辨认和评价色谱指纹图谱的特征。

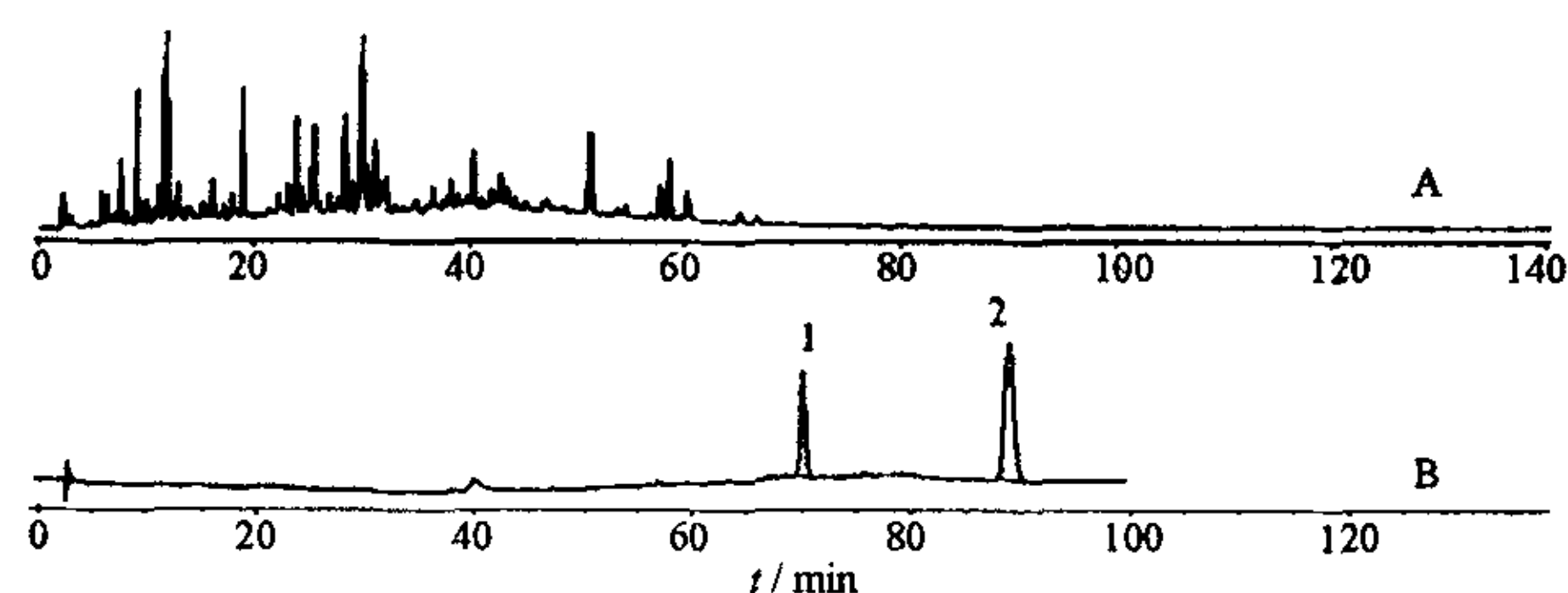


图 3 复方大青叶注射液 HPLC 图

A. 150 min 的色谱图; B. 大青叶中脂溶性成分

1. 靛蓝; 2. 靛玉红

3.5 共有峰的识别和匹配

实验中发现注射液的色谱指纹图谱中, 指纹峰相对保留时间的偏差都在 3% 以内, 但由于指纹图谱中色谱峰较密集, 因此辅以各色谱峰的紫外光谱图对色谱峰进行识别, 通过比较在线紫外光谱和加入对照品溶液的方法, 确认了 5 个已知成分峰, 它们分别是尿苷、没食子酸、腺苷、绿原酸和苯甲醇。

3.6 不同企业注射液样品的指纹图谱分析

研究初期对不同企业提供的注射液进行分析, 发现不同企业的产品指纹图谱之间差异较大, 难于统一。作者对可能引起不同企业产品差异的生产工艺和投料药材两种主要因素分别进行了分析, 发现不同企业的产品质量差异的部分原因是工艺不完全统一, 而更主要的原因是药材来源的不同。因此作者对方中的 5 味药材分别固定了产地和品种, 并统一了生产工艺。

3.7 统一工艺后大生产样品的相似度结果分析

由表 2 相似度评价结果可见 16 批不同企业提供的按统一工艺大生产的注射液 HPLC 指纹图谱相

似度除一批为 0.87 外,其余均在 0.90 以上,因此建议在对复方大青叶注射液质量进行评价时, HPLC 指纹图谱相似度应达到 9.0 以上,并且随着生产企业生产水平的不断改进和提高,复方大青叶注射液

的相似度阈值也将不断提高。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 卫生部药品标准. 中药成方制剂(第 20 册). 1998:201.

Fingerprint analysis of composite Folii Isatidis injection by HPLC

LIU Rui, LIU Zhi-gang, LI Lei, REN Chong, YUAN Bo, LI Fa-mei
(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To develop the chromatographic fingerprints of composite Folii Isatidis injection by HPLC. **Method:** The separation was performed on a Diamonsil C₁₈ column with a mobile phase consisting of methanol-water-phosphoric acid as gradient eluent at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The UV detection was set at 254 nm. **Result:** A standard HPLC fingerprint procedure was developed for composite Folii Isatidis injection, with 20 common peaks and a similarity threshold of 9.0 established. **Conclusion:** This method was accurate, repeatable and useful for the quality control of composite Folii Isatidis injection.

[Key words] Composite Folii Isatidis injection; quality control; HPLC fingerprint; similarity

[责任编辑 鲍 雷]

HPLC 测定双丹颗粒中丹酚酸 B 和芍药苷的含量

葛志伟, 贺 庆, 水文波, 程翼宇*
(浙江大学 药学院, 浙江 杭州 310027)

[摘要] **目的:**建立双丹颗粒中丹酚酸 B 和芍药苷的含量测定方法。**方法:**采用高效液相色谱法, Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱, 流动相 A0.05% 的磷酸水溶液, B 含 0.05% 磷酸的 4% 乙腈甲醇溶液, 梯度洗脱, 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 25 ℃, 检测波长 230 nm。**结果:**丹酚酸 B 在 0.710 ~ 22.7 μg ($r = 0.9999$), 芍药苷在 0.103 ~ 3.30 μg ($r = 0.9999$) 有良好的线性关系, 测定了 3 个批次双丹颗粒中丹酚酸 B 和芍药苷的含量, 其中丹酚酸 B 的含量范围为 6.46 ~ 11.6 mg·g⁻¹, 芍药苷的含量范围为 1.44 ~ 1.78 mg·g⁻¹。**结论:**该方法准确度好、重复性好、稳定可靠, 可以作为双丹颗粒质量控制的方法。

[关键词] 高效液相色谱法; 双丹颗粒; 丹酚酸 B; 芍药苷

[中图分类号] R 284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-5302(2006)13-1062-03

双丹颗粒由丹参和丹皮 2 味药组成, 具有改善心肌微循环, 增加冠状动脉的血流量, 降低心肌的耗氧量, 维持缺氧心肌的氧代谢供求平衡, 保护心脏的

功能, 还可抗血栓形成和抗动脉粥样硬化。国家药品标准选用 TLC-UV 法[S₃-243(X-233)-2000(Z)]测定原儿茶醛的含量, 该法处理繁琐, 误差较大; 亦有报道用 HPLC 测定丹参素和原儿茶醛的含量来进行质量控制^[1], 但这 2 种成分均来自于丹参, 不能代表全方药效物质基础。为了更好地控制该制剂的质量, 有必要建立一种更合理的含量分析方法。本研究以丹酚酸 B 和芍药苷作为质量控制指标, 使用高

[收稿日期] 2005-06-20

[基金项目] 国家自然科学基金项目(90209005)

[通讯作者] * 程翼宇, Tel: (0571) 87951138, E-mail: chengyy@

zju.edu.cn