

# 清开灵注射液 HPLC/ELSD 指纹图谱 建立及质量相关性研究

曹 进 徐 燕 张永知 王义明 罗国安\*

(清华大学药物研究所,北京 100084)

**摘 要** 运用高效液相色谱/蒸发光散射检测器(HPLC/ELSD)建立了复方清开灵注射液的指纹图谱。对其中 7 种有效成分进行了定量测定,方法学考察结果良好;通过指纹图谱相似度评价软件,对 10 批清开灵注射液的 HPLC/ELSD 指纹图谱进行了相似度计算,结果表明:10 批样品相似度很好。该方法为中药质量控制提供了一种可以同时实现整体定性、指标成分定量且简便易行的方法模式。

**关键词** 高效液相色谱,蒸发光散射,清开灵,指纹图谱

## 1 引 言

清开灵注射液是从古方安宫牛黄丸拆方而来的一种中药注射剂,由该药剂是牛黄、珍珠母、板蓝根、水牛角、黄芩、栀子和金银花 7 味药材组成<sup>[1]</sup>,具有清热解毒,醒神开窍的作用<sup>[2]</sup>;整个注射液中,存在无机离子、有机小分子和生物大分子等各种化学成分。就一般质量控制而言,采用高效液相色谱法建立紫外色谱指纹图谱,对于大部分药材来源的物质均可产生一定响应而满足要求。鉴于清开灵中几种主要有效成分紫外特征吸收的差异,以及胆酸和熊果酸仅存在紫外末端(200 nm 附近)吸收<sup>[3]</sup>,本实验通过换用蒸发光散射检测器(ELSD),建立了清开灵注射液的高效液相色谱/蒸发光散射检测器(HPLC/ELSD)指纹图谱,对其中 7 种主要有效成分进行了定量,并对蒸发光散射检测器的影响因素作了一定探讨;利用由国家药典委员会主持研制开发的,用于色谱指纹图谱相似度评价的软件,对得到的 HPLC/ELSD 指纹图谱进行相似度计算。本文对 HPLC/ELSD 指纹图谱在中药注射液质量控制研究中的作用进行了探讨,为中药注射液质量控制提供了一种合理、可靠、简便的方法模式。

## 2 实验部分

### 2.1 试剂和仪器

甲醇(Fisher 公司,色谱纯)、甲酸(北京第二化工厂,分析纯),二次蒸馏水(自制);清开灵注射液(市售样品 10 批);栀子苷、黄芩苷、去氧胆酸、异去氧胆酸和胆酸对照品购于中国药品生物制品检定所,绿原酸、熊果酸对照品购于 Sigma 公司。

Dionex P580 型高效液相色谱仪(UVD170S 二极管阵列检测器,200~600 nm 全波长扫描)(美国六安公司),Alltech2000 型 ELSD 检测器,SZ-93 自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。

### 2.2 样品制备

精密吸取清开灵注射液 10 mL 于 50 mL 量瓶中,甲醇稀释至刻度,即得供试品。

精密称取各标准品,分别溶于甲醇,各配制 5 个浓度水平对照品溶液。

### 2.3 实验条件

液相色谱条件:(1)色谱柱:Phenomenex Luna 反相 C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm ×4.6 mm,5 μm i. d.);(2)流动相:A 相为 0.5% 甲酸水溶液,B 相为甲醇,流速:1.0 mL/min;柱温:30 °C;进样量:20 μL。线性梯度洗脱时间程序:开始 25 min 内 B 从 0% 上升到 75%,保持 10 min,第 40 min 时 100%B,保持 10 min。

ELSD 参数:漂移管温度 110 °C,雾化气体(N<sub>2</sub>)流速 2.0 L/min。

此条件下得到的 HPLC/ELSD 液相色谱图如图 1(A) 所示。

2003-04-09 收稿;2003-08-04 接受

本文系国家 973 重点基础研究项目(No. G1999054404)及科技部重大专项(No. 2002BA906A29-3)资助项目

### 3 结果与讨论

#### 3.1 蒸发光散射检测与紫外检测的比较

利用高效液相色谱/紫外检测器,采用相同的流动相体系和洗脱条件建立了清开灵注射液的 HPLC/UV 指纹图谱,并选取了出峰数目多且大小比例合适的 254 nm 作为标准检测波长,得到的 HPLC/UV 色谱图如图 1(B)。比较两种检测方式,可以发现 ELSD 不受成分是否有紫外吸收或紫外吸收值差异的影响,且受共存物质干扰少,基线平稳,从而实现同一色谱条件在指纹定性鉴别的基础上对多成分定量。而采用 UV 检测,对于紫外特征吸收有差异的各物质(如栀子苷、黄芩苷和绿原酸最大紫外吸收分别为 240、280 和 330 nm)往往不能在同一检测波长下同时得到很好的响应(如 254 nm 是清开灵注射液指纹图谱相似度比较的择优波长,但不能在此波长下进行有效成分定量)。对于无紫外吸收或仅存在紫外末端吸收的物质(如胆酸类物质和熊果酸),更不能采用 UV 检测。所以,在没有大大损失检测灵敏度、可以满足定性和定量要求的基础上,选用中等灵敏度的通用型检测器于复杂分析体系,是一种很好的替代方式。

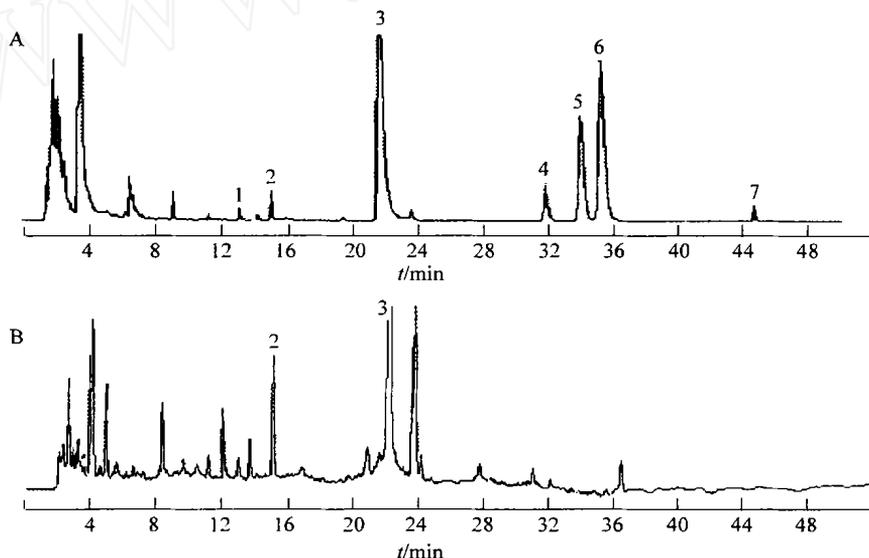


图 1 清开灵注射液 HPLC 色谱图

Fig. 1 High performance liquid chromatogram (HPLC) of Qing Kai Ling injection

A. HPLC/evaporative light scattering (ELSD) chromatogram; B. HPLC/ultraviolet (UV) chromatogram.

1. 绿原酸(chlorogenic acid); 2. 栀子苷(geniposide); 3. 黄芩苷(baicalin); 4. 去氧胆酸(deoxycholic acid); 5. 异去氧胆酸(hydeoxycholic acid); 6. 胆酸(cholic acid); 7. 熊果酸(ursolic acid)。

#### 3.2 ELSD 参数的选择

雾化气体流速和漂移管温度是影响蒸发光散射检测器响应的两个基本参数,实验过程中对这两个参数进行了选择,同时对比了分流和不分流两种模式。

雾化气流速对响应灵敏度有影响。实验考察了 1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0 L/min 5 个流速水平,发现在固定漂移管温度和分流模式前提下,噪声响应随雾化气流速变小而变大,这是由于雾化气流速越小,雾化器中形成的气溶胶液滴越大造成的;当雾化气流速增大到一定程度时,气溶胶液滴的变小会造成待测成分响应信号的较大程度降低。经过对比优化,最后确定采用 2.0 L/min 的雾化气体流速。

漂移管温度在本实验中会较大程度的影响检测信号响应。实验考察了 90、100、110、115 和 120 5 个温度水平,图 2 所示是雾化气流速 2.0 L/min、不分流模式时,黄芩苷在 5 个温度下的检出限( $S/N=3$ )。可以看出:在低温度下,由于溶剂挥发不完全会造成较大的背景噪声,110 以下检出限( $S/N$ )随温度升高而降低,温度超过 110 后会由于待测成分部分挥发而使有效响应信号降低,进而造成检出限随温度升高而增加。最后确定采用 110 的漂移管温度。

对比分流和不分流两种模式,发现在分流情况下,仍然需要较高的漂移管温度,最后确定使用不分流模式。

### 3.3 标准曲线的制作

在 2.3 所述色谱条件下,各成分分别在 5 个浓度点,平行测定 3 次。据文献[4~6]报道,ELSD 响应峰面积值与样品质量呈对数关系,即  $\log A = b \log C + \log a$  ( $A$  为色谱峰面积值, $C$  为进样质量, $a$  和  $b$  为常数)。根据本实验结果,对于待定量的 7 种物质,在最优化实验条件下,峰面积值与样品质量呈线性关系,回归方程、线性范围、相关系数及检出限结果( $S/N=3$ )见表 1。结果表明各成分在各自浓度范围内线性关系良好。

表 1 各成分标准曲线和检出限

Table 1 Regression equation and detection limit for different compounds

组分 Compound	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient ( $r^2$ )	线性范围 Linear range ( $\mu\text{g}$ )	检出限 Detection limit ( $\mu\text{g}$ )
绿原酸 Chlorogenic acid	$A = 401 C + 49.3$	0.997	0.1 ~ 20	0.03
栀子苷 Geniposide	$A = 504 C + 30.5$	0.999	0.2 ~ 200	0.02
黄芩苷 Baicalin	$A = 653 C + 39.6$	0.999	0.7 ~ 100	0.05
去氧胆酸 Deoxycholic acid	$A = 525 C - 25.6$	0.997	0.5 ~ 100	0.03
异去氧胆酸 Hyodeoxycholic acid	$A = 379 C - 53.1$	0.998	1 ~ 500	0.05
胆酸 Cholic acid	$A = 408 C - 40.5$	0.999	1 ~ 500	0.05
熊果酸 Ursolic acid	$A = 353 C - 48.6$	0.996	0.2 ~ 20	0.05

### 3.4 方法学考察

依(2.2)方法平行配制 5 份供试品溶液,在(2.3)所述条件下测定各成分含量,以峰面积值为指标计算 RSD % ( $n=5$ ),考察方法的重复性。取供试品溶液,分别在 0、2、4、8、16 和 24 h 测定各成分含量,以峰面积值为指标计算 RSD % ( $n=6$ ),考察方法的样品稳定性。在已知各成分含量的供试品溶液中分别定量加入各成分标准品,考察方法的平均回收率 ( $n=5$ )。重复性、稳定性及回收率结果见表 2。

表 2 方法学考察结果

Table 2 Results of method evaluation

组分 Compound	重复性 Repeatability RSD (%) ( $n=5$ )	稳定性 Stability RSD (%) ( $n=6$ )	回收率 Recovery (%, $n=5$ )
绿原酸 Chlorogenic acid	1.6	1.7	102
栀子苷 Geniposide	1.4	1.6	102
黄芩苷 Baicalin	1.3	1.5	99
去氧胆酸 Deoxycholic acid	1.7	1.8	99
异去氧胆酸 Hyodeoxycholic acid	1.5	1.8	101
胆酸 Cholic acid	1.5	1.6	99
熊果酸 Ursolic acid	1.6	1.8	98

### 3.5 不同批号清开灵注射液的测定

采用上述方法,对市售 10 批清开灵注射液样品进行了各成分的含量测定,结果见表 3。表中数据表明,对于黄芩苷、去氧胆酸、异去氧胆酸、胆酸 4 种成分含量相对标准偏差都是比较小的,而绿原酸、栀子苷和熊果酸 3 种成分则相对标准偏差很大。这是因为在清开灵制备工艺中,黄芩和胆酸是通过直接加入含量 90% 以上的黄芩苷、牛(猪)胆酸实现的;而绿原酸、栀子苷、熊果酸来源于金银花、栀子的药材提取液,其含量受药材来源、提取工艺及提取条件等诸多因素的影响。

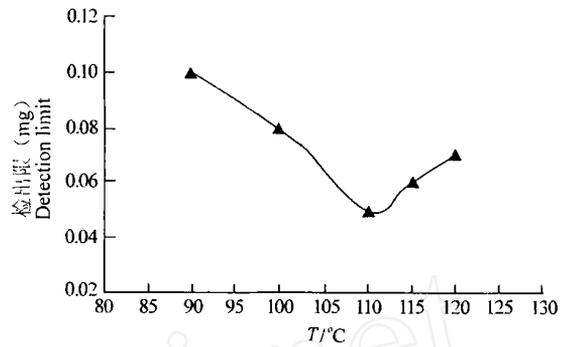


图 2 漂移管温度对 ELSD 检出限的影响(对黄芩苷)

Fig. 2 Relationship between tube temperature and detection limit (for baicalin)

表 3 10 批清开灵注射液中各成分的含量(mg/L)

Table 3 Content of different compounds for 10 QingKaiLing injections(mg/L)

组分 Compound	批号 1 No. 1	批号 2 No. 2	批号 3 No. 3	批号 4 No. 4	批号 5 No. 5	批号 6 No. 6	批号 7 No. 7	批号 8 No. 8	批号 9 No. 9	批号 10 No. 10	RSD (%, n = 10)
绿原酸 Chlorogenic acid	0.49	0.60	1.20	1.28	1.25	0.54	0.94	0.85	1.23	0.63	35.7
栀子苷 Geniposide	45	46	68	60	68	55	50	58	77	82	20.8
黄芩苷 Baicalin	5160	5110	5370	5130	5640	5510	5440	5120	5520	5270	3.7
去氧胆酸 Deoxycholic acid	300	280	310	315	290	295	275	305	310	285	4.6
异去氧胆酸 Hydeoxycholic acid	3230	3220	3280	3260	3210	3225	3300	3215	3240	3245	0.9
胆酸 Cholic acid	3340	3380	3360	3310	3400	3330	3325	3350	3370	3290	1.0
熊果酸 Ursolic acid	0.45	0.69	1.00	0.93	0.56	0.54	0.63	0.75	0.82	1.10	28.6

### 3.6 不同批号清开灵注射液的相似度计算

对 HPLC/ELSD 图谱按照保留时间进行谱峰匹配后,运用中药指纹图谱相似度软件,以批号 1 为参考标准计算 10 批清开灵注射液指纹图谱的相似度,结果见表 4。一般情况下,相似度大于 90 即认为相似度良好,表 4 中数据可以看出此 10 批清开灵注射液的 HPLC/ELSD 指纹图谱相似度很好。

表 4 10 批清开灵注射液的相似度

Table 4 Correlation of 10 QingKaiLing injections

待测批号/标准批号 Test sample No./standard sample No.	2/1	3/1	4/1	5/1	6/1	7/1	8/1	9/1	10/1
相似度系数 Similarity (P)	99.9	99.6	99.9	98.5	99.3	99.0	99.9	99.4	99.6

### 3.7 质量评价

以上含量测定和相似度比较结果说明:在清开灵注射液的指纹图谱整体具备相似性的情况下,必须对其中的有效指标成分进行定量。这样,才能全面地反映出复方的整体质量;单一指标评价则很难反映中药复方的内在质量。

## 4 结束语

采用 HPLC/ELSD 法所建立的复方清开灵注射液指纹图谱可以在一个色谱、检测条件下,同时实现整体定性、多指标成分定量的功能,用于质量控制。可以为中药的质量控制和评价提供新的方法模式。

### References

- Zheng Huzhan(郑虎占), Dong Zehong(董泽宏), She Jing(余靖). *Modern Study of Traditional Chinese Medicine*(中药现代研究与应用), Vol. 4(第四卷). Beijing(北京): Xue Yuan Press(学苑出版社), 1998: 3166 ~ 3187
- Jin Yulong(金玉龙), Zhao Zhixin(赵志新). *Acta Chinese Medicine and Pharmacology*, 1995, 10(4): 54 ~ 56
- Chen Dechang(陈德昌). *Handbook of Standard Sample for Traditional Chinese Medicine*(中药化学对照品工作手册). Beijing(北京): China Medical Technology Press(中国医药科技出版社), 2002: 124, 168
- Li Wenkui, Fitzloff John F. *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2001, 25: 257 ~ 265
- Li Wenkui, Fitzloff John F. *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2002, 30: 67 ~ 75
- Kong Liang, Li Xin, Zou Hanfa. *J. Chromatogr. A*, 2001, 936: 111 ~ 118

## Fingerprint Chromatogram by High Performance Liquid Chromatography with Evaporative Light Scattering Detection of Qing Kai Ling Injection and Its Relationship with Quality Control

Cao Jin, Xu Yan, Zhang Yongzhi, Wang Yiming, Luo Guoan\*

(Institute of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100084)

**Abstract** By high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection (HPLC/ELSD), we established the fingerprint chromatogram of Qing Kai Ling injection. The method was applied to quantify 7 major bioactive components in it simultaneously with satisfactory results. Using special software, we got the HPLC/ELSD fingerprint chromatogram similarity of 10 injection and found the perfect correlation among them. The method connecting HPLC with ELSD could be used as a credible and convenient quality control method for the Chinese Medicinal Medicine.

**Keywords** High performance liquid chromatography, evaporative light scattering detection, Qing Kai Ling, chromatogram fingerprint

(Received 9 April 2003; accepted 4 August 2003)

### 维护科技道德、加强自律的联合公告

为加强化学科技期刊的精神文明建设,提高各编辑部工作人员的职业道德水平,保障期刊的健康发展,我们在“中国化学会 2003 年期刊工作交流研讨会”期间,经过认真讨论,决定发表如下公告:

1. 提倡追求真理、实事求是、团结协作、诚实劳动;坚持学术民主,鼓励百家争鸣,尊重他人劳动成果;严肃政治纪律,坚决反对伪科学。

2. 严格执行审稿制度,杜绝稿件发表中的不正之风。

3. 维护投稿人的权益,各编辑部须在收稿后的 3 个月内向投稿人通报稿件处理情况,逾期未通报,投稿人有权自行处理所投稿件。

4. 拒绝刊登署名有争议、引用他人著述未注明出处、在上述规定期限内一稿两投或多投的稿件。

5. 对弄虚作假、抄袭剽窃和一稿两投或多投者,一经查实,相关编辑部视其情节轻重分别予以书面警告、通知其所在单位、在刊物上公开曝光并做出若干年内拒绝接收有此稿第一作者和通讯联系人署名的稿件等处理。

6. 强调编者、作者的诚信,鼓励对上述所列违反道德规范的行为进行据实举报。保护举报人的合理要求。不受理匿名举报。对于严重违反科技工作者职业道德、情节恶劣、影响极坏的事件,将及时报请有关部门进行严肃处理。并在签署本联合公告的期刊范围内建立情况通报制度。

本联合公告于各期刊签署并在刊物上刊出后生效,公告将由中国化学会期刊工作委员会监督执行。

中国化学会化学类期刊编辑部