

川参通注射液 HPLC 指纹图谱的研究

赵晶¹, 曹红², 邢俊波² (1. 第二军医大学药学院, 上海 200433; 2. 总后勤部卫生部药品仪器检验所, 北京 100071)

[摘要] 目的 建立川参通注射液的指纹图谱, 作为川参通注射液的质量评价指标。方法 采用高效液相色谱法, 流动相为乙腈-0.1% 甲酸水溶液, 梯度洗脱, 柱温 35℃, 流速 1.0 ml/min, 检测波长 281 nm。结果 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A 版) 对 11 批川参通注射液的指纹图进行处理, 确定了 11 个共有峰, 11 批样品的相似度均大于 0.970。结论 该方法简便、稳定、重复性好, 可作为川参通注射液的质量评价指标。

[关键词] 川参通注射液; 指纹图谱; 高效液相色谱法

[中图分类号] R927 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2013)02-0137-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.02.016

The fingerprint analysis on Chuanshentong injection by HPLC

ZHAO Jing¹, CAO Hong², XING Jun-bo² (1. Department of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Institute for Drug and Instrument Control Health Department, General Logistic Department of PLA, Beijing 100071, China)

[Abstract] **Objective** To establish the fingerprint analysis for quality evaluation index of Chuanshentong injection. **Methods** The fingerprints were established by HPLC. The mobile phase was acetonitrile-0.1% aqueous Formic acid solution in a gradient elution mode. The column temperature was maintained at 35 °C. The flow rate was 1.0 ml /min and detection wavelength was set at 281 nm. **Results** 11 common peaks were obtained in the fingerprint of 11 batches of Chuanshentong injection with the help of peaks match with Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM (Version 2004A). The similarity among 11 batches of Chuanshentong Injection was calculated more than 0.970. Principal components analyses was carried out to study the common HPLC fingerprint. **Conclusion** The method was simple, accurate and sensitive which could be used to evaluate the quality of Chuanshentong injection.

[Key words] Chuanshentong injection; fingerprint; HPLC

川参通注射液是用于前列腺局部注射治疗的纯中药制剂。由丹参、当归、川芎、麦冬四味中药组成。具有活血化瘀、清肺利水的功效, 主要用于治疗前列腺增生症所致的小便不畅, 排尿费力, 淋漓不尽等症^[1]。为了更全面有效的控制川参通注射液的质量, 提高中药注射剂的质量控制水平, 更好的确保临床用药的安全及疗效, 本研究参照中药注射剂指纹图谱的要求^[2,3], 对川参通注射液指纹图谱进行了研究, 建立了川参通注射液的指纹图谱, 并对 11 批注射液进行了相似度评价, 为其质量控制提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1200 系列高效液相色谱仪 (DAD 检测器, Agilent 化学工作站; 美国安捷伦公司), ME215S 电子天平 (德国赛多利斯公司生产);

KQ-300E 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 石英自动双重纯水蒸馏器 1810-B 型 (江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司); 中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件 (2004 A)。

1.2 药品与试剂 川参通注射液 (贵州瑞和制药有限公司); 原儿茶醛对照品 110810-200205 (中国药品生物制品检定所)。超纯水。乙腈、甲醇 (色谱纯, 美国 Fisher 公司), 甲酸 (分析纯, 天津市光复科技发展有限公司)。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 取原儿茶醛对照品适量, 精密称定, 加 50% 甲醇制成 1 ml 含 0.3 mg 原儿茶醛的对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 精密量取川参通注射液 5 ml, 置 10 ml 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀。用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.3 色谱条件^[4-7] 色谱柱: Kromasil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm 5 μm); 流动相为乙腈和 0.1% 甲酸水;

[作者简介] 赵晶 (1987-), 女, 硕士研究生。

[通讯作者] 曹红. Tel: (010) 66949080, E-mail: caohong6699@ sina.com.

A相为0.1%甲酸水,B相为乙腈,采用梯度洗脱;梯度洗脱程序如下:0~70 min,5% B~40% B;70~80 min,40% B~75% B;80~90 min,75% B~75% B。进样量5 μ l;流速:1 ml/min;柱温:35 $^{\circ}$ C;检测波长:281 nm;运行时间90 min。进样前以流动相梯度初始条件平衡10 min。各个色谱峰分离度均大于1.5,理论塔板数均大于5 000。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取批号为20110318的川参通注射液按照供试品溶液制备项下方法制备供试液,按上述色谱条件连续进样6次,分别考察各共有峰的保留时间和峰面积,结果表明各共有峰保留时间的RSD<1.8%,峰面积的RSD<2.5%,表明仪器的精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取批号为20110318的川参通注射液按照供试品溶液制备项下方法制备供试液6份,分别进样检测并考察各共有峰的保留时间和峰面积,结果表明各共有峰保留时间的RSD<0.5%,峰面积的RSD<3%,表明重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一供试品溶液分别在0、4、8、16、24 h进样,记录指纹图谱。结果表明各共有峰保留时间的RSD<0.3%,峰面积的RSD<3%,表明供试样品在室温条件下24 h内稳定性良好。

2.5 指纹图谱的建立及分析

2.5.1 共有峰的确定和对照指纹图谱的生成 按2.2项供试品溶液的制备方法制备11批供试品溶液,依2.3项色谱条件,得到11批川参通注射的高效液相色谱图,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软件》(版本2004 A),共确定11个共有指纹峰。建立共有模式,对照指纹图谱见图1,11批样品色谱指纹图谱见图2。

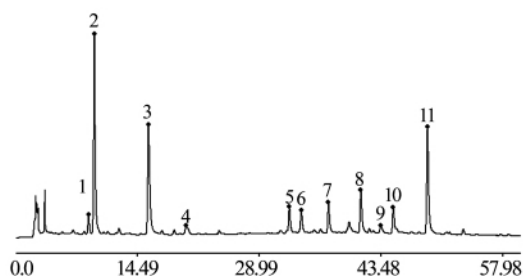


图1 川参通注射液的对照指纹图谱

2.5.2 参照峰的选择 色谱图中的3号峰,峰面积较大,出峰时间适中且稳定,经标准品对照认定为原儿茶醛的吸收峰,因此选择原儿茶醛作为参照

物,见图3。

2.5.3 指纹图谱评价 将11批川参通注射液的指纹图谱测定结果导入国家药典委员会的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004A版软件,进行相似度计算,结果均大于0.970,见表1。

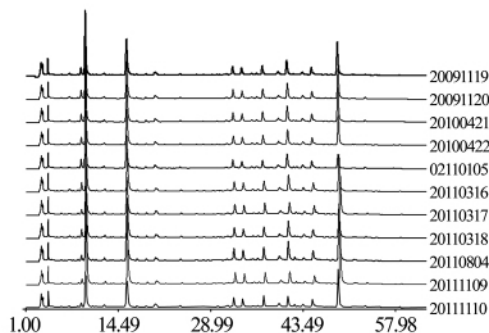


图2 11批川参通注射液的HPLC指纹图谱

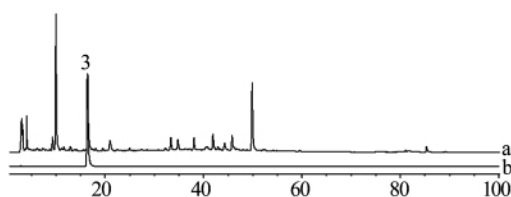


图3 川参通指纹图谱与对照品色谱图比较

a-指纹图谱; b-对照品色谱图; 3-原儿茶醛

表1 11批川参通注射液相似度计算结果

批号	相似度
20091119	0.997
20091120	0.996
20100421	0.990
20100422	0.999
20110105	0.998
20110316	0.999
20110317	0.970
20110318	0.998
20110804	1.000
20111109	0.998
20111110	1.000

2.5.4 主成分分析 主成分分析是将原来众多具有一定相关性的指标重新组合成一组相互无关的综合指标来代替原来指标的统计方法,也是数学上处理降维的一种方法。实验采用SPSS统计分析软件对此11个样本进行主成分分析,以挖掘数据隐含的信息。选取11个样品中共有指纹峰的峰面积为原始数据信息,先将11 \times 11原始数据矩阵经标准化处理,再对其进行运算,主成分个数提取原则为主成分对应的特征值大于1的前m个主成分。结果前2

个主成分的特征值大于1,且累计贡献率可以达到90.342%,包含了大部分信息,故提取前2个特征值。其中,第一主成分为 $\lambda = 6.917$,方差贡献率为62.877%,贡献率最大,包含的信息最多,影响也最大;第二主成分为 $\lambda = 3.021$,方差贡献率为27.465%。

表2 初始因子载荷矩阵

峰号	主成分	
	1	2
1	-0.793	0.577
2	0.898	0.326
3	0.810	0.569
4	0.585	-0.488
5	0.982	0.087
6	0.966	0.184
7	0.964	0.197
8	0.048	0.968
9	-0.811	0.438
10	-0.290	0.894
11	0.955	0.110

表2为初始因子载荷矩阵,每一个载荷量表示主成分与对应变量的相关系数。将主成分载荷矩阵中的数据除以主成分相对应的特征值开平方根便得到2个主成分中每个指标所对应的系数,经计算可得主成分的模型为:

$$F_1 = -0.302X_1 + 0.341X_2 + 0.308X_3 + 0.222X_4 + 0.373X_5 + 0.367X_6 + 0.367X_7 + 0.018X_8 - 0.308X_9 - 0.110X_{10} + 0.363X_{11}$$

$$F_2 = 0.332X_1 + 0.188X_2 + 0.327X_3 - 0.281X_4 + 0.050X_5 + 0.106X_6 + 0.113X_7 + 0.557X_8 + 0.252X_9 + 0.514X_{10} + 0.063X_{11}$$

F_1 、 F_2 分别表示2个主成分, X_1 、 X_2 、 X_3 …… X_{11} 分别表示各个色谱峰峰面积经标准化后的数据。由 F_1 和 F_2 的方程中可以看出5、6、7号色谱峰在主成分1中有明显的正相负荷,表明它们增加,第一主成分增大;1、9号色谱峰在主成分1中有明显的逆负荷,表明它们增加,第一主成分减少;其他对第一主成分影响相对较小。8、10号色谱峰在主成分2中有明显的正相负荷,表明它们增加,第二主成分增大;4号色谱峰在主成分2中有明显的逆负荷,表明它增加,第二主成分减少;其他对第二主成分影响相对较小。2个主成分中 F_1 是特征值最大的,即是“包含信息最多”的指标,因此5、6、7号色谱峰在的川参通注射液的质量

量控制中起着相对比较重要的作用。

3 讨论

3.1 柱温的选择 由于不同的柱温会对各成分峰分离度产生影响,因此本研究中考察了柱温(25、30、35、40℃),得出在柱温为35℃时,效果最佳,故选择35℃作为分离柱温。

3.2 检测波长的选择 由于中药复方中成分比较复杂,因此选择一个能够整体反映样品特征的检测波长至关重要。本研究利用DAD检测器对样品进行了全波长扫描,得出:检测波长在280~300nm内信息量最丰富,后又分别考察波长在281、288、297nm的HPLC色谱图,发现在281nm时色谱峰分离度最好,故选择281nm作为检测波长。

3.3 流动相的选择 由于注射液中主要的成分为水溶性酚酸类物质,因此考虑在流动相中加入酸可使峰形更好,减少拖尾现象的产生。研究中分别考察A相为甲酸水、乙酸水和磷酸水的HPLC色谱图,发现以0.1%甲酸水作为A相时各个峰的分度增加,峰形较好,响应值也较高,故选0.1%甲酸水作为流动相A相。

3.4 本研究中确立的方法操作简单,有着良好的精密度稳定性和重现性,所建立的川参通注射液的指纹图谱中确定的11个共有峰保留时间稳定,11批样品的相似度均在0.970~1.000之间,以指纹图谱整体评价川参通注射液的质量,较单一成分的定量分析更全面,信息量更丰富。为川参通注射液的质量控制提供更可靠的保障。

【参考文献】

- [1] 王鹏,陆涛,彭云飞等.川参通定位注射治疗慢性前列腺炎[J].实用医药杂志,2004,21(12):1113.
- [2] 国家药品管理监督局.中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)的通知[J].中成药,2000,22(10):671.
- [3] 许怀勇.中药指纹图谱在药品质量控制中的应用[J].医药导报,2009,29(2):218.
- [4] 中国药典2010版.一部[S].2010:38,71,124,144.
- [5] 唐旭利,刘静,李国强等.丹参药材水溶性成分HPLC化学指纹图谱研究[J].中成药,2008,30(3):313.
- [6] 罗娟敏,肖雪,梁琼麟等.丹红注射液指纹图谱研究[J].中成药,2011,33(8):1277.
- [7] 吴燕燕,尚明英,蔡少青.当归的化学成分指纹图谱[J].药学学报,2008,43(7):728.

[收稿日期]2012-07-03

[修回日期]2012-10-09