

注射用益气复脉(冻干)快速检测分析方法研究

闫 琰^{①②} 鄢 丹^② 陈龙虎^② 张 萍^② 任永申^② 冯 雪^② 肖小河^②

[摘要] 目的 探讨多孔层填料的新型色谱柱,建立注射用益气复脉(冻干)快速检测分析的方法。方法 采用 Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈ 柱(4.6 mm × 100 mm, 2.7 μm),乙腈-0.05% 磷酸梯度洗脱,流速为 0.5 ml/min,检测波长为 203 nm。结果 提取出注射用益气复脉(冻干)的高效液相色谱特征检测图谱,分析时间与 UHPLC 法分析时间相近,确定了 22 个共有峰,建立了该制剂的 HPLC 法的高效快速分离的分析方法。结论 与传统的高效液相色谱相比,该法具有分析速度快、灵敏度高、节约溶剂等优点;与 UHPLC 相比,该法具有经济、简便优势,可以有效地控制注射用益气复脉(冻干)的质量。

[关键词] 注射用益气复脉(冻干);快速特征分析

[中图分类号] R917

[文献标志码] A

[文章编号] 1008-9926(2012)01-069-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1008-9926.2012.01.20

Study on Rapid Chromatography Analysis of Yiqifumai Injection

YAN Yan^{①②}, YAN Dan^②, CHEN Long-hu^②, ZHANG Ping^②, REN Yong-shen^②, FENG Xue^②, XIAO Xiao-he^②

^①Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;

^②China Military Institute of Chinese Materia Hospital 302, Beijing 100039, China

[Abstract] **Objective** To establish a rapid chromatography analysis method for quality control of Yiqifumai Injection. **Methods** An Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈ (4.6 mm × 100 mm, 2.7 μm) column was used. Gradient elution was optimized and the final mobile phase consisted of phosphoric acid (0.05, V/V) and acetonitrile at a flow rate of 0.5 ml/min and at the wavelength of 203 nm. **Results** A rapid and effective method for separation of Yiqifumai Injection was established. **Conclusion** Compared to traditional HPLC, this method is rapid and sensitive. Additionally, this method provides higher resolution and saves reagents, applicable to quality control of Yiqifumai Injection.

[Key words] Yiqifumai injection; rapid analysis

注射用益气复脉(冻干) (Yiqifumai Injection, YQFM) 是在生脉注射液基础上开发研制而成,组方为红参提取物、麦冬提取物、五味子提取物,具有益气生津、敛阴止汗的功效。临床上用于治疗冠心病、劳累性心绞痛、气阴两虚等症。该药的指纹图谱研究已有报道。但红参成分复杂,皂苷类成分结构近似,极性相近,利用 HPLC 法对人参皂苷类成分分析的运行时间约 80 ~ 100 min^[1-3]。UHPLC 具有分析

速度快、分离度高等优势。近来,有报道将 UHPLC 用于成分复杂的中药材及中药制剂分析^[4,5]。但其前期投入成本高、仪器覆盖率较低,因此,本研究拟在 HPLC 上实现 UHPLC 的效果,建立快速高效的特征图谱分析方法,希望为中药质量控制技术提供一种新的参考方法。

1 仪器与试药

Agilent 1200 型高效液相色谱仪, DAD 检测器 (Agilent 公司), 甲醇、乙腈为色谱纯, 磷酸为分析纯。对照品人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg₁、20(s)-原人参二醇、20(s)-原人参三醇、五味子醇甲、五味子甲素、注射用益气复脉随行对照品 (均购自中国药品生物制品检定所)。YQFM (天津天士力之骄药业有限公司提, 批号: 20090202、20090203、20090401、20090402、20090501、20090601、20090701、20090702、20090703、20090801)。

基金项目: 国家新药创制重大专项, No. 2009ZX09502-003; 北京市自然科学基金项目, No. 7112128; 国家自然科学基金项目, No. 30873385

作者简介: 闫 琰, 博士研究生。研究方向: 中药注射剂质量控制与安全性评价。Tel: (010) 66933324; E-mail: glittens@126.com

作者单位: ① 100850 北京, 军事医学科学院; ② 100039 北京, 解放军 302 医院中药研究所

通讯作者: 肖小河, Tel: (010) 66933322; E-mail: pharmacy302@126.com; 鄢 丹, Tel: (010) 66933325; E-mail: yd277@126.com

2 方法与结果

2.1 溶液的制备 (1) 对照品溶液 分别精密称取对照品人参皂苷 Rb_1 、人参皂苷 Re 、人参皂苷 Rg_1 、20(s)-原人参二醇、20(s)-原人参三醇、五味子醇甲、五味子甲素, 适量, 用甲醇溶解, 分别制备成不同浓度的对照品溶液备用, 见表 1。

表 1 对照品溶液浓度

对照品名称	对照品浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	对照品名称	对照品浓度 ($\mu\text{g/ml}$)
人参皂苷 Rb_1	120	20(s)-原人参三醇	132
人参皂苷 Re	48	五味子醇甲	40
人参皂苷 Rg_1	62	五味子甲素	32.8
20(s)-原人参二醇	87		

(2) 供试品溶液 取 YQFM 随行对照品及 10 批 YQFM 样品各约 1.3 g, 精密称定, 置刻度离心管中, 加 0.5 mol/L 的氢氧化钠溶液 5 ml 使溶解, 再沿离心管壁精密加入环己烷 10 ml, 密塞, 上下均匀颠倒 4~5 次(避免乳化), 静置 1 min 后, 再重复上法操作 2 次, 3000 r/min 离心 5 min, 弃去环己烷提取液; 再按上述方法萃取 2 次, 水层精密加入 0.5 mol/L 的氢氧化钠溶液饱和的正丁醇 10 ml, 剧烈振摇提取, 3000 r/min 离心 5 min, 精密吸取正丁醇提取液 5 ml 蒸干, 残渣加甲醇适量使之溶解, 转移至 5 ml 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.2 色谱条件 色谱柱: Agilent Poroshell 120 SB- C_{18} 柱 (4.6 mm $\times$ 100 mm, 2.7 μm); 流动相: 0.05% 磷酸-乙腈, 梯度洗脱, 见表 2; 流速: 0.5 ml/min; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长: 203 nm; 进样量: 5 μl [6-8]。

表 2 梯度洗脱条件

时间 (min)	0.05% 磷酸	乙腈
0	80	20
4	70	30
6.5	65	35
15	60	40
30	55	45
45	20	80

2.3 精密度考察 取同一供试品溶液 (批号: 090601), 按 2.2 项下色谱条件连续进样 5 次, 以 6 号峰 (Rb_1) 为参比峰, 分别计算各共有峰的相对保留时间与相对峰面积的 RSD 值, 结果表明各共有峰相对保留时间的 RSD 小于 0.16%, 相对峰面积

的 RSD 小于 3.48%, 说明仪器精密度符合分析要求。

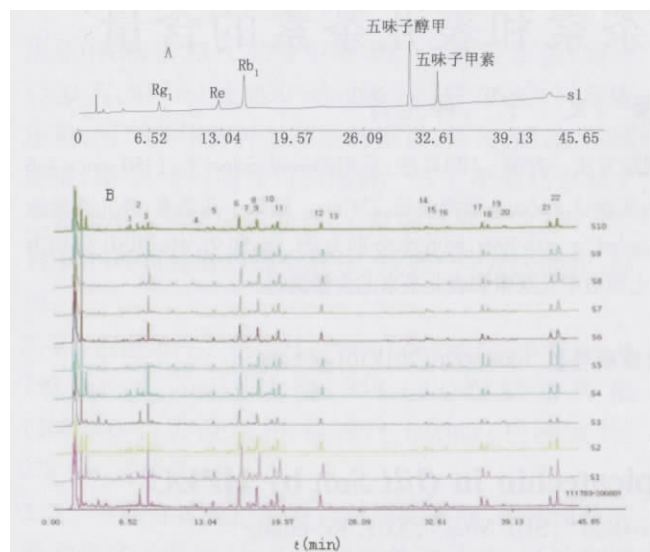
2.4 重复性试验 取同一批号样品 (批号: 090601), 按 2.1(2) 项下制备方法制备 5 份供试品溶液, 按照 2.2 项下色谱条件分别进样, 以 6 号峰 (Rb_1) 作为参比峰, 考察各共有峰的相对保留时间及相对峰面积, 经计算, 各共有峰相对保留时间的 RSD 小于 0.64%, 相对峰面积的 RSD 小于 3.67%, 结果表明该方法重复性较好, 符合指纹图谱分析要求。

2.5 稳定性考察 取同一批号样品 (批号: 090601), 分别于放置 0、4、8、12、24 h 后, 按 2.2 项下色谱条件进样, 以 6 号峰 (Rb_1) 作为参比峰, 考察各共有峰的相对保留时间及相对峰面积, 经计算, 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 4.77%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定, 符合分析要求。

2.6 样品 HPLC 特征图谱的建立

2.6.1 专属性试验 上述对照品及供试品溶液, 按照 2.2 项下条件进行测定, 色谱峰的理论塔板数均大于 20 000, 分离度在 1.5~15.6 之间。测定 YQFM 随行对照品及 10 批 YQFM 样品, 分别记为编号: S1-S10) 的特征图谱, 通过“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A”软件, 以 YQFM 随行对照品的特征图谱作为参照图谱, 对保留时间 2.5~45 min 的色谱峰进行多点校正后, 自动匹配。相似度在 0.932~0.990 范围, 平均值为 0.961, RSD 为 1.85%。以 6 号峰 Rb_1 为参比峰, 计算各个共有峰的相对保留时间及相对峰面积, 根据测定结果, 确定 22 个共有峰, 其相对保留时间的 RSD 均小于 0.35%, 相对峰面积的 RSD 小于 4.97%, 混合对照品及 YQFM 特征图谱见图 1, 相似度评价结果见表 3。

2.6.2 共有峰的确定 依据测定的 10 批 YQFM 供试品溶液, 比较特征色谱图, 依据各吸收峰与对照品的紫外吸收光谱及相对保留时间可知, YQFM 的特征图谱中, 3 号峰为 Rg_1 , 5 号峰为 Re , 6 号峰为 Rb_1 , 14 号峰为五味子醇甲, 16 号峰为五味子甲素, 20(s)-原人参二醇、20(s)-原人参三醇在此洗脱条件下未有保留, 具体原因需要进一步查找。由于人参皂苷类成分结构类似, 保留时间相近, 而且有紫外末端吸收, 仅通过与对照品紫外吸收色谱图和相对保留时间做比较, 不能准确定性, 有待于进一步质谱分析确认 [9]。



A: 对照品; B: 10 批样品

图 1 YQFM HPLC 特征图

表 3 YQFM 样品与对照品特征图谱比较的相似度结果

批号	相似度	批号	相似度
20090202(S1)	0.932	20090601(S6)	0.959
20090203(S2)	0.943	20090701(S7)	0.955
20090401(S3)	0.964	20090702(S8)	0.949
20090402(S4)	0.97	20090703(S9)	0.985
20090501(S5)	0.99	20090801(S10)	0.964

3 讨论

本试验分别选用了 3.5、2.7、1.8 μm 填料粒径的色谱柱进行试验筛选,在相同流速下,此 3 种色谱柱完成 YQFM 样品分析的时间分别为 80、45、30 min,柱压分别 69、108、420 Bar,比较色谱峰的分析度、峰形、柱效,填料粒径 2.7 μm 的表面多孔层填料色谱柱,实现了人参皂苷类成分快速的分离,峰形尖锐,灵敏度高,色谱峰的理论塔板数均大于 20 000,分离度在 1.5~15.6,其分离效果与 1.8 μm 柱相近,与传统 HPLC 色谱柱相比,2.7 μm 粒径色谱柱分析时间仅为 3.5 μm 粒径色谱柱的一半,同时该方法具有良好的准确度、精密度和稳定性。

本试验绘制了 10 批 YQFM 样品的 HPLC 特征图谱,通过中药色谱指纹图谱相似度评价系统,确定了 22 个共有峰,相似度大于 0.90 可认为产品质量一致,本实验中各批次样品的相似度均大于 0.930,实现了 R_{g1} 与 R_e 的完全分离。

YQFM 目前尚未被《中国药典》收载,执行的是国家药品标准,本实验样品处理方法依据国家药品标准 YB107062006-2009Z,该方法提取出的样品成分大部分为人参皂苷类成分,对麦冬、五味子中的大部分成分在该条件下未有分离或者检测出来,对于色谱峰的定性有待于一步质谱试验的验证。

本试验建立了注射用 YQFM 样品快速检测方法,该方法同时具备 HPLC、UHPLC 双重优点,分析速度快、灵敏度高、分离度高和节约溶剂,经济、简便,在 HPLC 上得到 UHPLC 分离速度和效果,提高复杂产物的分离度。尤其适用于成分复杂、结构类似的中药材及中药制剂的成分分析和质量控制。

【参考文献】

- [1] 周丹丹,王蕴华,李凡,等.注射用益气复脉(冻干)的 HPLC 指纹图谱研究[J].药物分析杂志,2009,29(11):1900-1904
- [2] 夏晶,王钢力,季申,等.生脉注射液 HPLC 指纹图谱的研究[J].中成药,2006,28(8):1093-1095
- [3] 冯雪松,王大成,刘雅茹.高效液相色谱法测定生脉饮中 6 种活性成分的含量[J].化学与生物工程,2008,25(2):76-78
- [4] 杨立伟,郑传奇,蒋忠军,等.超高效液相色谱法测定西洋参中人参皂苷 R_{g1} 、 R_e 、 R_{b1} 的含量[J].中药材,2008,31(1):55-57
- [5] 刘梅,夏鑫华,俞桂新,等.丹参药材超高效液相色谱指纹图谱研究[J].广州中医药大学学报,2009,26(6):559-564
- [6] 夏静,王钢力,季申,等.HPLC 测定生脉注射液中 4 种成分的含量[J].中成药,2006,28(1):27-31
- [7] 刘奕明,杨柳,曾星,等.参麦注射液中人参皂苷 R_{g1} 和 R_e 药代动力学研究[J].药学报,2005,40(4):365-368
- [8] 杨柳,刘奕明,曾星,等.HPLC/MS/MS 法测定参麦注射液及人血浆中的人参皂苷 R_{g1} [J].药物分析杂志,2005,25(8):905-908
- [9] 夏晶,王柯,王钢力,等.LC-MS/MS 法确认生脉注射液指纹图谱的特征峰[J].中成药,2007,29(3):313-317

(收稿日期:2011-03-28;修回日期:2011-05-16)

(本文编辑 梁爱君)