

毛冬青注射液 HPLC 指纹图谱研究

赖 珊, 杨立伟, 欧国灯*, 李泳雪

(广东省药品检验所, 广东 广州 510180)

摘要 目的:应用 HPLC 法建立毛冬青注射液的指纹图谱。方法:采用 ODS-2 Hypersil C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) 色谱柱,以乙腈和 0.05% 磷酸为流动相,梯度洗脱,流速 1 mL/min,柱温 30℃,检测波长为 325 nm。结果:建立了毛冬青注射液的指纹图谱,并检测了 8 批毛冬青注射液样品;采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)”标定了 13 个共有峰,相似度较高,各色谱峰分离较好,达到中药注射剂指纹图谱研究的技术要求。结论:本方法准确可靠,为更好地控制毛冬青注射液的内在质量提供了科学依据。

关键词 毛冬青注射液;HPLC;指纹图谱

中图分类号:R927.2 文献标识码:A 文章编号:1001-4454(2009)07-1132-03

Study on Fingerprint of Maodongqing Injection by HPLC

LAI Shan, YANG Li-wei, OU Guo-deng, LI Yong-xue

(Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou 510180, China)

Abstract Objective: To establish the fingerprint of Maodongqing injection by HPLC. Methods: The column of ODS-2 Hypersil C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) was used. The mobile phase consisted of acetonitrile-0.05% phosphoric acid with gradient elution. The flow rate was 1 mL/min, the column temperature was 30℃, and the detection wavelength was 325 nm. Results: The fingerprint of Maodongqing injection was established, and 8 samples of different batches of Maodongqing injection were detected. Thirteen peaks in the chromatogram were marked by “Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprints of Traditional Chinese Medicine (Version 2004 A)”. There was a high similarity and each chromatographic peak was obtained with good separation and correlation according to the technical requirements of the fingerprints of Chinese traditional medicine. Conclusion: This method is accurate, reliable and provides a scientific basis for controlling the quality of Maodongqing injection.

Key words Maodongqing injection; HPLC; Fingerprint

毛冬青为冬青科冬青属植物毛冬青 (*Ilex pubescens* Hook. et Am) 的根,主产于广东、广西、安徽、福建等地,具有活血通脉、消肿止痛、清热解毒之功效。临床上常用于冠心病、心绞痛和脉管炎等的治疗^[1]。毛冬青注射液为毛冬青经加工制成的灭菌水溶液,为心血管疾病用药,有扩张血管及抗菌消炎的作用。由于缺乏合理、完善的质量控制指标及方法,现在市售的大多数毛冬青制剂均以毛冬青根中不含有的芦丁为指标性成分控制制剂中总黄酮的含量,显然这是不合理和不科学的^[2]。国家食品药品监督管理局已经明确规定所有的中药注射剂及其原料药材必须建立以色谱指纹图谱控制的质量标准,所以建立能系统、完整地反映毛冬青注射液内在质量的分析方法是当务之急。本研究即采用 HPLC 法建立该种注射剂的指纹图谱,旨在能更客观且有效地评价和控制毛冬青注射液的质量。

1 仪器与材料

1.1 仪器 Waters 2695 高效液相色谱仪(美国

Waters 公司), Waters 2996DAD 二极管阵列检测器(美国 Waters 公司), Millennium 32 色谱处理系统, Millipore 超纯水机(美国 Millipore 公司), 中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)。

1.2 材料 样品是由广东省博罗先锋药业集团有限公司提供的毛冬青注射液,产品批号:060803 ~ 060806、061001 ~ 061004,乙腈、磷酸为色谱纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 ODS-2 Hypersil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm);流动相:A(乙腈)-B(0.05% 磷酸),梯度洗脱:0 ~ 8 min(3% A ~ 3% A), 8 ~ 80 min(3% A ~ 20% A), 80 ~ 81 min(20% A ~ 3% A), 81 ~ 90 min(3% A ~ 3% A),所有组分均在 80 min 内洗脱出柱;流速:1 mL/min;检测波长:325 nm;柱温:30℃;进样量:10 μL。

2.2 供试品溶液的制备 因毛冬青注射液为注射剂,经过复杂的提取后杂质较少,预实验表明,毛冬

收稿日期:2009-01-19

基金项目:广东省中医药局建设中医药强省科研课题(1060035);广东省科技计划项目(2007B031407002)

作者简介:赖珊(1977-),女,主管药师,主要从事药品质量标准研究;Tel: 020-85819270, E-mail: laishan_77@163.com。

* 通讯作者:欧国灯, Tel: 020-81870106, E-mail: ouguodeng@qq.com。

青注射液经微孔滤膜过滤后直接进样,所得到的图谱中成分较多,杂质影响也较少,故不再进行提取处理。取毛冬青注射液,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取滤液,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 确定共有峰:按照上述色谱条件对8批样品分别进行试验,由得到的色谱图初步确定共有峰。

2.3.2 精密度试验:取同一供试品溶液(批号061004),连续进样6次,检测指纹图谱,结果表明,相似度为0.981~0.991,各色谱图相似度高,符合指纹图谱要求,精密度良好。

2.3.3 重复性试验:取同一批次供试品溶液(批号061004),按“2.2”项下方法分别制备6份供试品,检测指纹图谱,结果表明,相似度为0.997~0.999,各主要色谱峰相对保留时间和其相对峰面积比值无明显变化,相似度高,符合指纹图谱的要求,重现性良好。

2.3.4 稳定性试验:取同一批次供试品溶液(批号061004),在室温下放置,分别于0、6、10、16、25 h进行指纹图谱测定,结果表明,相似度为0.968~0.996,各主要色谱峰相对保留时间和其相对峰面积比值无明显变化,相似度高,符合指纹图谱的要求,表明样品溶液在25 h内稳定。

2.4 样品测定 取8批样品,按“2.2”项下方法,制备成供试品溶液,注入液相色谱仪,记录90 min 色谱图即得。

2.5 指纹图谱分析与评价

2.5.1 共有峰标定:根据8批毛冬青注射液 HPLC 指纹图谱检测结果,利用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)”生成毛冬青注射液共有模式的对照 HPLC 指纹图谱,见图1,其中共有特征峰为13个。保留时间在26.2 min 和27.0 min 的两个峰其峰高和峰面积较为适中,与相邻峰分离较好,出峰位置适中,故选定为该指纹图谱参照峰。

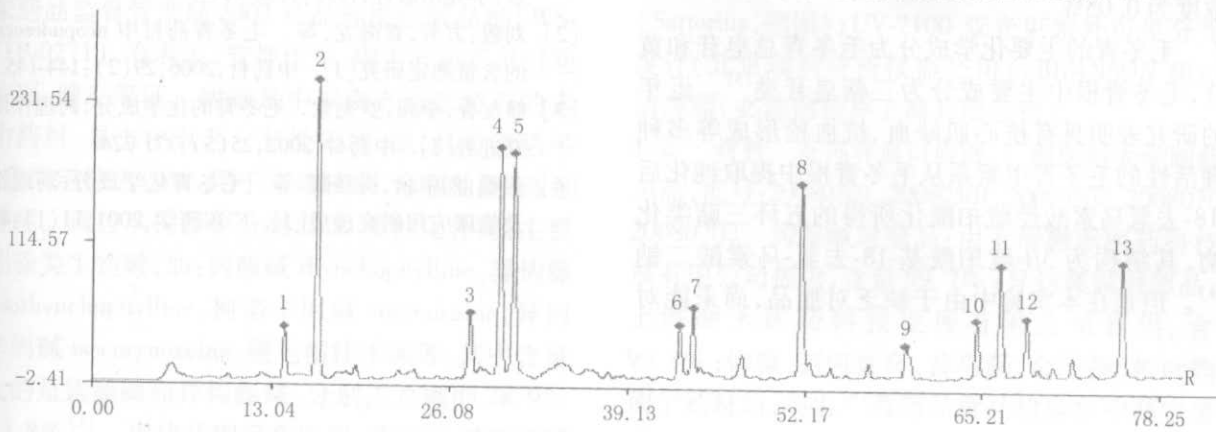


图1 8批毛冬青注射液样品的共有峰

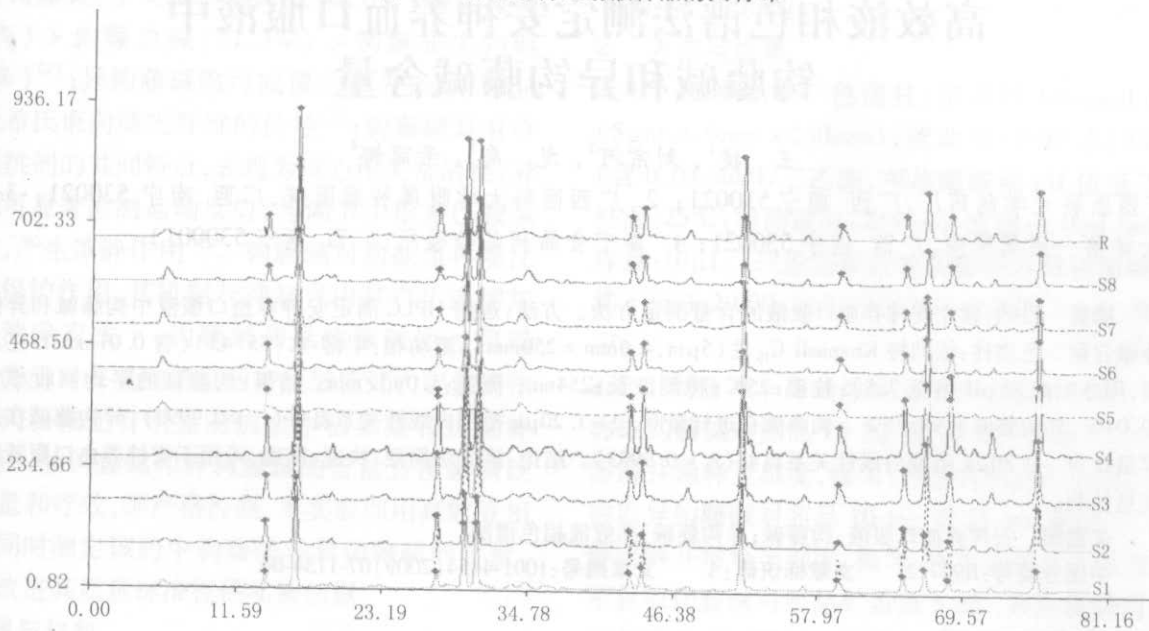


图2 8批毛冬青注射液的 HPLC 叠加图谱

表 1 8 批毛冬青注射液样品指纹图谱的相似度

批号	060803	060804	060805	060806	061001	061002	061003	061004
相似度	0.981	0.947	0.993	0.990	0.980	0.983	0.981	0.976

2.5.2 相似度评价:利用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)”软件,分别对 8 批毛冬青注射液指纹图谱进行匹配,并以 8 批样品生成的对照图谱(平均数法)作为对照模板,计算各图谱的相似度,范围分别在 0.947~0.983,见图 2 及表 1。

3 讨论

3.1 毛冬青注射液所含成分复杂,且极性范围跨度很大,等度洗脱很难分离,故采用梯度洗脱方式。经比较优化色谱条件,采用乙腈-磷酸溶液系统梯度洗脱法,所得峰形尖锐且各峰之间分离较好,得到较完整的 HPLC 指纹图谱。磷酸不同比例比较发现,增加酸的浓度并没有提高分离度和改善峰形,而且考虑到色谱柱所能承受的 pH 值,故控制加入磷酸的浓度为 0.05%。

3.2 毛冬青的主要化学成分为毛冬青总皂苷和黄酮苷,毛冬青根中主要成分为三萜皂苷类^[3]。近年来的研究表明具有抗心肌缺血、抗血栓形成等多种生理活性的毛冬青甲素系从毛冬青根中提取纯化后的 18-去氢乌索酸经琥珀酰化所得的五环三萜类化合物,其结构为 3β -琥珀酰基-18-去氢-乌索酸二钠盐^[4]。但是在本实验中由于缺乏对照品,尚未能对

毛冬青注射液的指纹图谱中各个峰与成分之间的关系进行归属,有待进一步研究。

3.3 毛冬青是我国南方常用中药,临床应用广泛,疗效确切。但从文献资料分析,毛冬青的整体研究尚不深入,特别是在化学成分、制剂工艺与质量控制、单体化学成分(或群)的药理作用等方面存在不足。本实验尝试建立毛冬青注射液指纹图谱的研究方法,并验证了该方法的稳定性、精密度和重现性,结果令人满意。可见,该方法可用于毛冬青注射液指纹图谱的研究工作,具有一定的现实意义。

参 考 文 献

- [1] 郑虎占,董泽宏,余靖. 中药现代研究与应用[M]. 北京:学苑出版社,1997:1036-1044.
- [2] 刘毅,方芳,袁海龙,等. 毛冬青药材中 neopudescensin 的含量测定研究[J]. 中药材,2006,29(2):144-145.
- [3] 熊友香,李昶,罗宪堂. 毛冬青的化学成分、药理作用研究进展[J]. 中药材,2002,25(5):371-374.
- [4] 蔡雄,刘中秋,祝晨藜,等. 毛冬青化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. 广东药学,2001,11(1):4-6.

高效液相色谱法测定安神养血口服液中 钩藤碱和异钩藤碱含量

王捷¹, 刘宗河², 龙禹³, 辛丽娜⁴

(1. 广西医科大学制药厂,广西 南宁 530021; 2. 广西医科大学附属肿瘤医院,广西 南宁 530021; 3. 广西医科大学第一附属医院,广西 南宁 530021; 4. 南宁食品药品检验所,广西 南宁 530001)

摘要 目的:建立安神养血口服液的含量测定方法。方法:运用 HPLC 测定安神养血口服液中钩藤碱和异钩藤碱含量。色谱柱:依利特 Kromasil C₁₈ 柱(5 μ m,4.6mm \times 250mm);流动相:甲醇-水(55:45)(含 0.01mol/L 三乙胺,用冰醋酸调 pH 值至 7.5);柱温:25 $^{\circ}$ C;检测波长:254nm;流速:1.0mL/min。结果:钩藤碱的平均回收率为 99.04%,异钩藤碱为 98.75%。钩藤碱在进样量 0.12~1.20 μ g 范围内线性关系良好($r_1=0.9999$),异钩藤碱在进样量 0.08~0.80 μ g 范围内线性关系良好($r_2=0.9993$)。结论:该方法简便、快速、准确,可用于安神养血口服液的质量控制。

关键词 安神养血口服液;钩藤碱;异钩藤碱;高效液相色谱法

中图分类号:R927.2 文献标识码:A 文章编号:1001-4454(2009)07-1134-04