

注射用益气复脉（冻干）HPLC 指纹图谱研究

何珊珊¹, 岳洪水², 宋丽丽², 丁黎¹, 鞠爱春^{2*}, 叶正良^{2*}

1. 中国药科大学, 江苏 南京 210009

2. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津市中药注射剂关键技术企业重点实验室, 天津 300402

摘要: 目的 建立注射用益气复脉（冻干）的 HPLC 指纹图谱, 并建立评价其质量的指纹图谱分析方法。方法 采用 HPLC 法, 色谱柱为 Waters Symmetry[®] C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.01%磷酸水溶液梯度洗脱; 检测波长 203 nm; 柱温 32 ℃。结果 建立了注射用益气复脉（冻干）中人参皂苷类、五味子木质素类的指纹图谱, 并建立了 3 种指纹图谱分析评价方法。结论 建立的注射用益气复脉（冻干）指纹图谱的重复性、稳定性好, 采用夹角余弦法与相关系数法从两个不同的角度评价指纹图谱, 可以有效地反映益气复脉的质量, 两者差异不大, 而采用欧氏距离法却无法获得两张图谱的真实相似程度, 无法给出直观的综合质量评价结果。

关键词: 注射用益气复脉（冻干）; 指纹图谱; 相似度评价

中图分类号: R943.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2015)04-0390-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.04.009

Study on HPLC fingerprint of Yiqifumai Injection

HE Shan-shan¹, YUE Hong-shui², SONG Li-li², DING Li¹, JU Ai-chun², YE Zheng-liang²

1. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300402, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for determining the fingerprint of Yiqifumai Injection. **Methods** The HPLC analysis was performed on a Waters Symmetry C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) and the mobile phase consisted of acetonitrile-0.01% phosphoric acid. The detective wavelength was set at 203 nm and the column temperature maintained at 32 ℃. **Results** Two kinds of components in Yiqifumai for Injection were identified as ginsenosides and lignins by fingerprints. Three evaluation methods for fingerprints of Yiqifumai Injection were established. **Conclusion** The HPLC fingerprints of Yiqifumai Injection is stable and reproducible. The included angle cosine did not differ much from correlation coefficient, they can evaluate the quality of Yiqifumai Injection effectively while Euclidean distance can not give a direct visual evaluation on Yiqifumai Injection.

Key words: Yiqifumai Injection; fingerprint; similarity evaluation

注射用益气复脉（冻干）为天津天士力之骄药业有限公司独家生产的冻干剂型, 其处方来源于古方《生脉散》, 临床上用于冠心病劳累性心绞痛气阴两虚证, 冠心病所致慢性左心功能不全 II、III 级气阴两虚证等。组方药材为红参、麦冬、五味子, 成分较为复杂, 故采用中药色谱指纹图谱技术对其进行整体质量控制。中药指纹图谱技术可从整体上分析复杂化学物质的组成, 是被国内外广泛接受的中药质量评价模式^[1]。目前中药指纹图谱的评价多采用计算相似度的方法, 主要包括夹角余弦法^[2]、相

关系系数法^[3]、欧氏距离法、程度相似度及改良程度相似度法^[4-8]等方法。本文按照相关技术要求建立了其 HPLC 指纹图谱, 并采用不同相似度计算方法, 考察了注射用益气复脉（冻干）制剂指纹图谱的相似度, 旨在为其质量控制提供参考。

1 仪器和材料

Waters 2695 型高效液相色谱仪（美国 Waters 公司）, 配 Waters2489 型紫外检测器和 Empower 色谱工作站; AL204 型万分之一电子分析天平（瑞士 Mettler 公司）, Milli-Q 超纯水处理系统。乙腈、甲

收稿日期: 2014-12-10

作者简介: 何珊珊 (1989—), 女, 硕士生, 主要从事中药质量控制研究。Tel: (022)86342720 E-mail: heshanshan_33@126.com

*通信作者 叶正良 E-mail: yezl@tasly.com

鞠爱春 E-mail: juach@tasly.com

醇均为色谱纯 (Merck 公司), 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯, 五味子醇甲对照品 (批号 110857-200608, 供含量测定用) 购自中国食品药品检定研究院。40 批注射用益气复脉 (冻干) 由天津天士力之骄药业有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取一定量的五味子醇甲对照品, 用甲醇溶解, 制备成质量浓度为 50.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取装量差异项下的本品内容物约 1.3 g (相当于 2 瓶量), 精密称定, 加 30% 甲醇溶液 10 mL 使溶解, 过迪马公司 ProElutTM PLS SPE 柱, 体积流量约 1 mL/min, 流出液弃去, 再用含 0.5 mol/L 的氢氧化钠的 30% 甲醇溶液 2 mL 冲洗后, 继用 30% 甲醇溶液 5 mL 分次洗涤冲洗, 再用甲醇洗脱, 甲醇洗脱液收集于 5 mL 量瓶中至近刻度, 加甲醇至刻度, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2 色谱条件的选择与优化

2.2.1 不同色谱柱考察 Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ 柱、Agilent Eclipse Plus C₁₈ 柱、Diamonsil[®] C₁₈ 柱、Phenomenex[®] 5 μm C₁₈ 柱及 Waters Symmetry[®] C₁₈ 柱对色谱峰分离效果的影响。从柱效及木质素成分峰的分离情况 (峰的个数及分离度) 考察色谱柱的优劣, 结果 Waters Symmetry[®] C₁₈ 柱分离效果最好。

2.2.2 不同浓度磷酸水溶液的选择 首先考察了 0.01%、0.03%、0.05%、0.07%、0.1% 5 种不同浓度的磷酸溶液作为流动相, 对色谱分离效果的影响, 结果显示随着磷酸水溶液浓度的降低, 人参中的皂苷分离度明显提高, 故再尝试仅使用超纯水作为水相对皂苷峰分离的影响, 结果发现皂苷峰的分度有所降低, 故可知人参皂苷峰的分度受酸度变化影响较大^[6-7], 根据色谱峰分离效果, 最终选择了 0.01% 的磷酸水溶液作为水相。

2.2.3 柱温的选择 本实验考察了柱温为 25、27、30、32、35 $^{\circ}\text{C}$ 对注射用益气复脉 (冻干) 指纹图谱色谱峰分离效果的影响, 整体面貌相差不大, 但是综合考虑各个局部分离效果, 选择柱温为 32 $^{\circ}\text{C}$ 。

根据以上研究结果, 确定液相色谱条件为: 色谱柱为 Waters Symmetry[®] C₁₈ 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为 A (乙腈) -B (0.01% 磷

酸), 梯度洗脱 (表 1); 柱温 32 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长 203 nm; 进样量 20 μL 。

表 1 液相梯度洗脱条件
Table 1 HPLC gradient elution conditions

<i>t</i> / min	体积流量/(mL·min ⁻¹)	A/%	B/%
0~8	1	20→30	80→70
8~20	1	30→40	70→60
20~30	1→1.2	40	60
30~50	1.2	40→55	60→45
50~60	1.2→1	55→95	45→5
60~65	1	95	5
65~67	1	95→98	5→2
67~72	1	98	2
72~77	1	98→20	2→80
77~81	1	20	80

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取同一供试品溶液 (批号 20140504), 按上述色谱条件, 连续进样 6 次, 以相似度软件处理, 相互比较指纹图谱相似度, 各样品间相似度均大于 0.98, 表明色谱分析系统稳定, 仪器精密度较好。

2.3.2 稳定性试验 取同一供试品溶液 (批号 20140504), 分别在 0、4、8、12、16、20、24 h 7 个时间点进行检测, 用计算机相似度处理软件计算相似度, 结果相似度值均大于 0.98, 表明 24 h 内供试品溶液稳定。

2.3.3 重复性试验 取同一批号制剂 6 份 (批号 20140504), 制备供试品溶液, 按上述色谱条件方法进行检测, 6 份供试品溶液测得的色谱指纹图谱, 用计算机相似度处理软件计算相似度, 结果相似度值均大于 0.97, 表明重复性良好。

2.4 结果

2.4.1 样品指纹图谱采集 分别精密吸取对照品溶液 10 μL 、供试品溶液 20 μL , 注入高效液相色谱仪, 按上述色谱条件进行测定, 记录色谱图。测定 40 批注射用益气复脉 (冻干) 制剂的指纹图谱。

2.4.2 共有峰的确定 根据 30 批制剂进样结果, 对保留时间在 8~70 min 的色谱峰进行积分, 选择吸收强, 稳定性好, 特征明显的色谱峰作为共有峰。8 号峰 (即五味子醇甲峰) 因其在各批样品中含量较高, 峰形稳定, 与其他峰分离良好, 故以其作为内参比峰。以色谱峰对内参比峰的相对保留时间定性, 共标定 18 个共有峰, 见图 1。

2.4.3 对照指纹图谱的生成 将“2.4.1”所得 30 批图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012年版)”软件,以平均值生成对照图谱,进行多点校正后,全谱峰匹配,生成的注射用益气复脉(冻干)制剂对照指纹图谱见图 1。

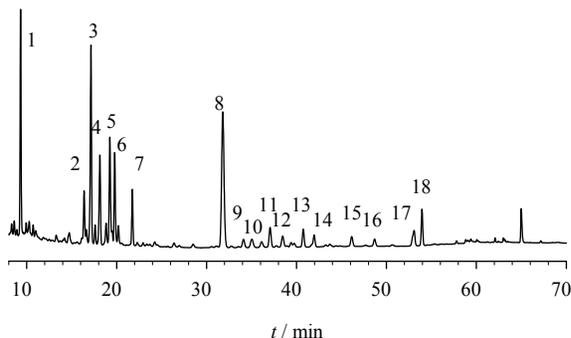


图 1 注射用益气复脉(冻干)对照指纹图谱

Fig. 1 HPLC reference fingerprint of Yiqifumai Injection

2.4.4 色谱指纹图谱的相似度评价 将剩余 10 批注射用益气复脉(冻干)制剂的色谱图与对照图谱比较,见图 2,并采用 2 种模式 3 种方法进行指纹图谱评价。

1) 全谱峰相似度 将 10 批供试品指纹图谱与对照指纹图谱相比较,经多点校正,计算相似度。结果见表 2。

2) 以共有峰计算相似度 采用夹角余弦、相关系数及欧式距离法,以 18 个共有峰计算相似度。将 10 批供试品指纹图谱与对照指纹图谱相比较,分别以夹角余弦、相关系数及欧式距离法计算 18 个共有峰的相似度,结果见表 3。

直观观察样品指纹图谱可看到,各批次样品图谱与对照图谱无大差异,相似度较好。另以全谱峰计算相似度和以共有峰采用夹角余弦及相关系数法计算指纹图谱相似度,相似度值均在 0.97 以上,说

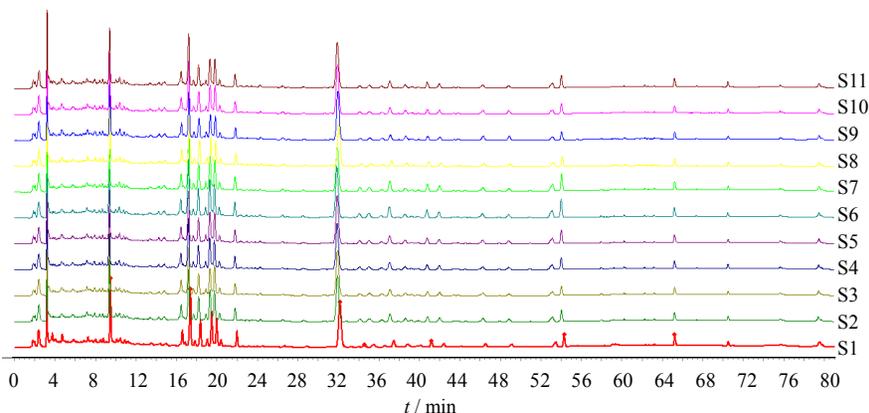


图 2 10 批制剂与对照色谱(S1)指纹图谱

Fig. 2 HPLC reference fingerprint (S1) and matched chromatograms for 10 batches of Yiqifumai Injection

表 2 10 批样品相似度(全谱)结果

Table 2 Similarity(full spectrum) of 10 batches of samples

对照	20120701	20120906	20121001	20121007	20121010	20121013	20121105	20121204	20121206	20121210	
对照	1	0.995	0.992	0.993	0.991	0.984	0.986	0.994	0.986	0.991	0.994
20120701	0.995	1	0.998	0.999	0.997	0.991	0.991	0.997	0.990	0.996	0.998
20120906	0.992	0.998	1	0.997	0.995	0.985	0.984	0.997	0.995	0.998	0.996
20121001	0.993	0.999	0.997	1	0.999	0.994	0.993	0.997	0.990	0.998	0.998
20121007	0.991	0.997	0.995	0.999	1	0.997	0.995	0.996	0.986	0.996	0.997
20121010	0.984	0.991	0.985	0.994	0.997	1	0.999	0.987	0.972	0.988	0.991
20121013	0.986	0.991	0.984	0.993	0.995	0.999	1	0.987	0.970	0.985	0.992
20121105	0.994	0.997	0.997	0.997	0.996	0.987	0.987	1	0.995	0.998	0.998
20121204	0.986	0.990	0.995	0.990	0.986	0.972	0.970	0.995	1	0.996	0.990
20121206	0.991	0.996	0.998	0.998	0.996	0.988	0.985	0.998	0.996	1	0.997
20121210	0.993	0.998	0.996	0.998	0.997	0.991	0.992	0.998	0.990	0.997	1

表3 10批样品相似度结果
Table 3 Similarity of 10 batches of samples

方法	20120701	20120906	20121001	20121007	20121010	20121013	20121105	20121204	20121206	20121210
夹角余弦	0.998	0.995	0.996	0.994	0.987	0.989	0.998	0.990	0.994	0.998
相关系数	0.996	0.992	0.993	0.988	0.975	0.980	0.996	0.984	0.990	0.996
欧氏距离	383 211	640 758	542 447	584 339	899 544	775 612	599 963	747 354	570 164	417 016

明该制剂的质量较稳定,另一方面,亦表明该制剂生产工艺十分稳定。而采用欧氏距离法计算相似度值,取值范围不在 $[0, 1]$ 区间内,故无法直接给出样品质量的评价,但其与另外两种计算方法检验样品指纹图谱时,趋势基本一致,3种不同方法之间相互认证。采用不同相似度算法均以共有峰计算相似度时,需手动计算,而该样品成分复杂,峰的数目较多,计算量大,而采用全谱峰计算相似度,可利用现有的成熟相似度系统软件,简便快捷,较适用于实际生产中产品的质量的控制。

3 讨论

3.1 以全谱峰计算相似度

以全谱峰计算相似度色谱指纹图谱往往比较复杂,色谱峰的保留时间会发生漂移,从而影响指纹图谱的相似度。多点校正对指纹图谱相似度有重大意义。在使用相似度软件计算样品相似度过程中,未进行多点校正即选择全谱峰匹配,结果各批样品与对照谱图的相似度均低于0.620;选择以7号峰为marker峰,进行全谱峰匹配,结果显示相似度值均在0.938以上,但9、10、11、13、14、16、17、18号共有峰均未匹配上;选择8号峰为marker峰,进行全谱峰匹配,结果显示相似度值在0.968以上,但9、13、14、17号共有峰未匹配上;选择8号及17号峰为marker峰,进行全谱峰匹配,结果显示相似度值在0.984以上,所有共有峰均匹配上,能很好地对齐。由此可知选取不同的marker峰及marker峰个数对计算结果有影响,且选多个marker峰比选单个相似度计算结果理想。

3.2 以共有峰计算相似度

采用夹角余弦法和相关系数法,以18个共有峰计算相似度时,两种方法计算的相似度值相差不大。夹角余弦法是将两张指纹图谱当作两个空间向量,以向量间的夹角余弦值表示指纹图谱的相似度^[2],相关系数法在数学上是用来表示所有的点是否都在同一条直线上,即是否完全相关,以此来表示中药指纹图谱的相似性^[9]。两种方法从不同的角度评价

产品质量,均能在一定程度上反应产品的质量。

3.3 以欧氏距离计算相似度

根据欧式距离数据并不能判断样品的质量,该法无法直接给出直观的综合质量评价结果。采用欧氏距离法计算获得的相似度值远大于1,说明欧氏距离虽然可以用来表示两个向量之间的真实距离,但是作为相似度评价方法却无法获得两张图谱的真实相似程度,非真正意义上的相似度分析方法,故欧氏距离法不宜作为生产中产品标准的控制方法。

参考文献

- [1] 乔晓莉,肖学风,周大铮,等. UPLC-MS/MS法同时测定注射用益气复脉(冻干)中13种成分[J]. 中草药, 2014, 45(23): 3402-3407.
- [2] 王龙星,肖红斌,梁鑫淼,等. 一种评价中药色谱指纹谱相似性的新方法: 向量夹角法[J]. 药学学报, 2002, (9): 713-717.
- [3] 田润涛,谢培山. 色谱指纹图谱相似度评价方法的规范化研究(一)[J]. 中药新药与临床药理, 2006, (1): 40-42, 54.
- [4] 刘永锁,曹敏,王义明,等. 相似系统理论定量评价中药材色谱指纹图谱的相似度[J]. 分析化学, 2006, (3): 333-337.
- [5] 刘永锁,孟庆华,蒋淑敏,等. 相似系统理论用于中药色谱指纹图谱的相似度评价[J]. 色谱, 2005, (2): 158-163.
- [6] 王玺,王文宇,张克荣,等. 中药HPLC指纹图谱相似性研究的探讨[J]. 沈阳药科大学学报, 2003, (5): 360-362, 366.
- [7] 张萍,张南平,肖新月,等. 人参皂苷类成分的化学分析[J]. 药物分析杂志, 2004, (3): 229-237.
- [8] Chuang W C, Sheu S J. Determination of ginsenosides in ginseng crude extracts by high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromat A*, 1994, 685(2): 243-251.
- [9] 关洪月,李林,刘晓,等. 中药指纹图谱相似度计算方法探析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, (18): 282-287.