

注射用五味子提取物指纹图谱研究

李莉^{1,2}, 李德坤^{1,2*}, 鞠爱春^{1,2*}

1. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300410

2. 天津市中药注射剂安全性评价企业重点实验室, 天津 300410

摘要: **目的** 采用高效液相色谱法建立注射用五味子提取物指纹图谱, 并对 2015—2016 年制备的 40 批注射用五味子提取物进行指纹图谱相似度分析。**方法** 试验考察了不同流动相组成和浓度、不同检测波长、不同洗脱方法、不同品牌 C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、不同流速、不同柱温等条件下供试品溶液的色谱行为, 利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统对试验所得色谱图进行相似度分析。**结果** 确定了高效液相色谱检测条件, 建立了 20 批注射用五味子提取物的对照指纹图谱 (相似度不低于 0.991), 确定了 12 个共有峰, 并对 5 个共有峰进行了指认, 其余 20 批供试品与对照图谱的相似度均值为 0.994。**结论** 本试验建立的注射用五味子提取物指纹图谱可以为其质量控制提供科学的依据, 为完善注射用益气复脉 (冻干) 质量标准提供数据支持。

关键词: 注射用益气复脉 (冻干); 注射用五味子提取物; 中药注射剂; 指纹图谱; 高效液相色谱法; 相似度; 质量控制; 质量标准

中图分类号: R283

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376 (2018) 03-0475-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.03.021

Study on fingerprints of *Fructus Schisandrae chinensis* extract for injection

LI Li^{1,2}, LI Dekun^{1,2}, JU Aichun^{1,2}

1. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300410, China

2. Key Laboratory of Safety Evaluation of Traditional Chinese Medicine Injections of Tianjin Enterprise, Tianjin 300410, China

Abstract: Objective To establish the fingerprint analysis method of *Fructus Schisandrae chinensis* extract for injection by HPLC; To analyze the similarity on the fingerprints of *Fructus Schisandrae chinensis* extract of 40 Ses prepared from 2015 to 2016. **Methods** The experiments were conducted to evaluate the influence of chromatographic behavior: Different mobile phase composition and concentration, different detection wavelength, different elution methods, different brands of C₁₈ columns (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), different flow rates and different column temperatures, etc. Similarity degree analysis of experimental chromatograms by similarity evaluation system of chromatographic fingerprint of traditional Chinese Medicine. **Results** The detection conditions of HPLC were determined, established the reference fingerprint with the 20 Ses of *Fructus Schisandrae chinensis* extract samples (the similarity is not less than 0.991), among which 12 peaks were common fingerprint peaks, and 5 main compounds were identified. The average similarity between the other 20 Ses of samples and the reference fingerprint was 0.994. **Conclusion** The fingerprint of *Fructus Schisandrae chinensis* extract can provide a scientific evaluation basis for the quality control of scientific evaluation for the quality control of it, and it also provide data support for improving the quality standard of Yiqi Fumai Lyophilized Injection.

Keywords: Yiqi Fumai Lyophilized Injection; *Fructus Schisandrae chinensis* extract for injection; traditional Chinese medicine injection; fingerprint; HPLC; similarity degree; quality control; quality standard

注射用益气复脉 (冻干) 由红参、麦冬和五味子 3 味中药组成, 具有益气复脉、养阴生津功效^[1]。用于冠心病劳累型心绞痛气阴两虚证。方中五味子是木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.)

收稿日期: 2018-01-12

基金项目: 天津市中药注射剂关键技术校企协同创新实验室建设 (项目编号: 17PTSJYC00090)

第一作者: 李莉 (1975—), 女, 高级工程师, 研究方向为药物制剂工艺研究和质量控制。Tel: (022)84498152 E-mail: lili4@tasly.com

*通信作者: 李德坤, 男, 工程师, 研究方向为中药注射剂工艺研究、质量标准研究、安全性及药物警戒研究。

Tel: (022) 26736712 E-mail: lidekun@tasly.com

鞠爱春 (1973—), 男, 高级工程师, 研究方向为中药注射剂工艺及质量控制。Tel: (022)86342096 E-mail: juach@tasly.com

Baill.的干燥成熟果实,其味酸、甘,性温,具有收敛固涩、益气生津、补肾宁心的功效^[2]。五味子中含有多种化学成分,如木脂素、多糖、挥发油、有机酸、三萜、甾醇、香豆素、内酯、氨基酸、生物碱类、黄酮类、强心苷类等,木脂素是其主要化学成分^[3-4]。

试验选取 2015—2016 年制备的注射用五味子提取物 40 批进行指纹图谱相似度研究,为其质控和完善注射用益气复脉(冻干)质量标准提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),配置: G1312A 二元泵、G1322A 脱气泵、G1313A 进样器、G1314A UV 检测器、G1315B DAD 检测器和 G1316A 柱温箱; Milli-Q 型纯水仪(美国 Millipore 公司)、XS105DU 型电子分析天平(美国 Mettler Toledo 公司); KQ3200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Thermo Synchronis C₁₈ 柱(赛默飞公司,粒度 5 μm,体积 250 mm×4.6 mm, SN10041863, PN97105-254630, LOT11811); DIKMA Diamonsil C₁₈ 柱(迪马公司,粒度 5 μm,体积 250 mm×4.6 mm, SN6007104, CN99603); Phenomenex C₁₈ 柱(Phenomenex 公司,粒度 5 μm,体积 250 mm×4.6 mm, SN671030-2, BN:5520-134, PN00G-4435-E0)。

1.2 试剂

五味子醇甲对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110857-201513,质量分数 99.9%)、五味子醇乙对照品(上海士峰科技有限公司,批号 17071120,质量分数 98%)、五味子甲素对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110764-201513,质量分数 99.5%)、五味子乙素对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110765-201512,质量分数 99%)、五味子酯甲对照品(中国食品药品检定研究院,批号 111529-201505 质量分数 95.3%)。色谱级磷酸(天津市华东试剂厂,批号 150624015); 色谱级乙腈(OMNI CHEM 公司,批号 170100407M03)、甲醇(OMNI CHEM 公司,批号 2016-7-3); 注射用五味子提取物供试品 40 批。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱: Thermo Synchronis C₁₈ 柱(5 μm, 体积 250 mm×4.6 mm); 流动相: 乙腈-0.10%磷酸溶液

梯度洗脱(0~45 min, 乙腈 40%~70%; 45~50 min, 乙腈 70%~95%; 50~55 min, 乙腈 95%; 55~60 min, 乙腈 95%~40%); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30℃; 检测波长 254 nm; 进样量 10 μL。

2.2 混合对照品溶液的制备

精密称取 5 种对照品适量,置量瓶中,加适量色谱纯甲醇超声至分散均匀,冷却至室温后定容至刻度,混合均匀既得混合对照品溶液(五味子醇甲 133.28 μg/mL; 五味子醇乙 32.32 μg/mL; 五味子酯甲 23.92 μg/mL; 五味子甲素 24.32 μg/mL; 五味子乙素 22.96 μg/mL)。

2.3 单一对照品溶液的制备

分别精密称取 5 种对照品适量,加适量色谱纯甲醇超声至分散均匀,冷却至室温后定容至刻度,既得定位用 5 种单一对照品溶液(五味子醇甲对照品溶液 166.6 μg/mL; 五味子醇乙对照品溶液 80.8 μg/mL; 五味子酯甲对照品溶液 29.9 μg/mL; 五味子甲素对照品溶液 30.4 μg/mL; 五味子乙素对照品溶液 28.7 μg/mL)。

2.4 供试品溶液的制备

精密称取供试品约 150 mg,置 25 mL 量瓶中,加色谱纯甲醇适量超声至分散均匀,放冷至室温,用色谱纯甲醇定容至刻度。过 0.45 μm 滤膜,弃去初滤液约 0.5 mL,取续滤液备用。

2.5 空白溶液

以配制供试品溶液所用溶剂(色谱纯甲醇)为空白溶液。

2.6 色谱条件考察

2.6.1 流动相和洗脱方式考察 试验分别以甲醇-水、0.10%磷酸-乙腈和 0.05%磷酸-乙腈作为流动相,考察等度和梯度洗脱方式下供试品的色谱行为。通过对比可知: 甲醇-水(65:35)系统等度洗脱,色谱峰堆积包裹,峰形不佳; 采用甲醇-水梯度洗脱,基线漂移较为严重,洗脱时间较长。采用 0.05%磷酸-乙腈或 0.10%磷酸-乙腈梯度洗脱效果优于等度洗脱效果,0.10%和 0.05%磷酸洗脱效果无明显差异; 根据供试品溶液在梯度下 120 min 色谱图,确定洗脱时间可以设定为 60 min,序列进样中建议增加后运行时间 15 min,以利于色谱柱系统平衡和洗脱掉当前系统下可能存在的无紫外吸收成分。

2.6.2 体积流量考察 通过对不同体积流量(0.8、0.9、1.0、1.1、1.2 mL/min)下混合对照品溶液中 5 种木脂素保留时间的分析,其保留时间差值最大为

0.1 min, 保留时间 RSD<0.2%, 峰面积 RSD<2%; 利用相似度评价软件对供试品溶液色谱图进行分析, 相对于参照 1.0 mL/min 色谱图, 其相似度 ≥ 0.999 ; 由此可见体积流量对 5 种木脂素保留时间和相似度的影响可以忽略, 考虑到色谱柱柱压要求和日常检测习惯, 确定流速 1.0 mL/min 作为流动相体积流量。

2.6.3 柱温考察 通过对不同柱温 (25℃、28℃、30℃、32℃、35℃) 下混合对照品溶液中 5 种木脂素保留时间的分析, 其保留时间差值最大为 1.1 min, 保留时间偏移相对较大; 利用相似度评价软件分别对混合对照品溶液和供试品溶液色谱图进行分析, 相对于参照 30℃ 其相似度均大于 0.999 和 0.993; 虽然色谱峰保留时间的偏移对相似度结果的影响不明显, 但为减小环境温度波动对检测结果的影响, 建议以 30℃ 作为检测柱温。

2.6.4 不同品牌色谱柱考察 试验对比了混合对照品溶液、供试品溶液和空白溶液在 Thermo Synchronis C₁₈ 柱、DIKMA Diamonsil C₁₈ 柱、Phenomenex C₁₈ 柱 3 款色谱柱上的色谱行为, 其出峰顺序一致, 分离度、峰形和响应良好, 空白溶液无干扰。但不同品牌色谱柱的保留时间略有差异, 这可能与不同品牌色谱柱的填料和填充情况有关, 因此在进行中药色谱指纹图谱相似度研究或日常分析时, 建议固定色谱柱品牌和规格, 增加混合对照品溶液色谱图作为参考。

2.7 方法学考察

2.7.1 干扰试验和木脂素指纹峰的确认 分别精密吸取空白溶液、供试品溶液 (批号 S16)、对照品溶液和混合对照品溶液 10 μ L 注入高效液相色谱仪, 按 2.1 项下色谱条件进行测定, 色谱图见图 1 和图 2。

2.7.2 精密度试验 取供试品溶液 (批号 S16), 连续进样 6 次, 检测指纹图谱峰, 结果各共有峰的相对保留时间 RSD<0.3%, 相对峰面积 RSD<0.4%, 相似度为 1.000, 说明该方法精密度良好。

2.7.3 重现性试验 分别精密称取 S16 供试品 6 份 (称样量: 145.13、157.35、140.47、145.38、141.43、150.87 mg), 按照 2.4 项下方法制得供试品溶液, 连续进样, 检测指纹图谱峰, 结果各共有峰的相对保留时间 RSD<0.1%, 相对峰面积 RSD<0.4%, 相似度为 ≥ 0.997 , 说明该方法重现性良好。

2.7.4 重复性试验 分别精密称取 S16 供试品 9 份 (称样量: 69.73、77.06、75.71、144.15、147.88、

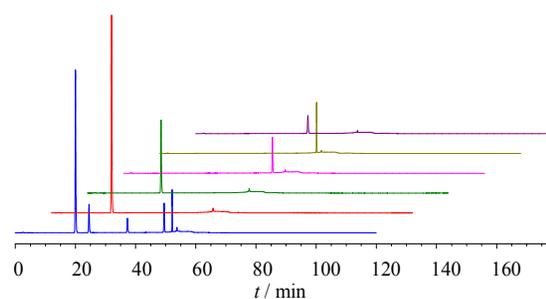
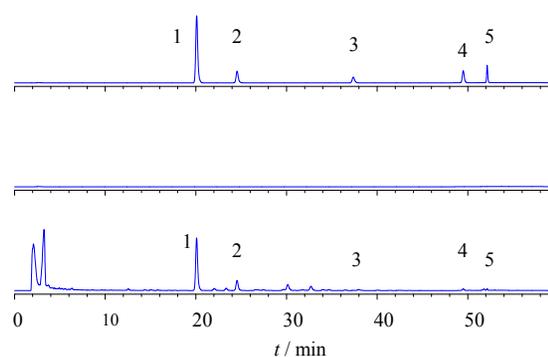


图 1 混合对照品溶液和 5 种对照品溶液色谱图
Fig. 1 Chromatograms of mixed control solution and 5 kinds of control products solution



1-五味子醇甲; 2-五味子醇乙; 3-五味子酯甲; 4-五味子甲素; 5-五味子乙素
1- schizandrol A; 2- schizandrol B; 3- schisantherin C; 4- schizandrin A; 5- schizandrin B

图 2 混合对照品溶液 (A)、空白溶液 (B) 和供试品溶液 (C) 色谱图

Fig. 2 Chromatograms of mixed control solution (A), blank solution (B) and trial product solution (C)

144.06、231.78、236.73、233.67 mg), 按照 2.4 项下方法制得高中低浓度的供试品溶液, 连续进样, 依次检测指纹图谱峰, 结果各共有峰的相对保留时间 RSD<0.1%, 相对峰面积 RSD<0.4%, 相似度为 ≥ 0.999 , 说明该方法重复性良好。

2.7.5 稳定性试验 取供试品溶液 (批号 S16), 分别于 0、2、4、6、12、18、24、48 h 进样, 检测指纹图谱峰, 结果各共有峰的相对保留时间 RSD<0.1%, 相对峰面积 RSD<3%, 相似度 ≥ 0.999 , 说明该供试品溶液 48 h 的稳定性良好。

2.8 共有峰的测定及色谱峰的标定

通过对不同批次注射用五味子提取物指纹图谱的分析, 确定了 12 个共有指纹峰。通过比较供试品色谱图和混合对照品色谱图的保留时间和紫外色谱的检测结果, 对共有指纹峰进行鉴别, 确认了 5 个

主要木脂素的指纹峰, 其中, 供试品图谱中保留时间为 20.073 min 的色谱峰为五味子醇甲对照品色谱峰, 保留时间为 24.537 min 的色谱峰为五味子醇乙对照品色谱峰, 保留时间为 37.958 min 的色谱峰为五味子酯甲对照品色谱峰, 保留时间为 49.519 min 的色谱峰为五味子甲素对照品色谱峰, 保留时间为 52.150 min 的色谱峰为五味子乙素对照品色谱峰。色谱图见图 1 和图 2。

2.9 指纹图谱相似度评价

2.9.1 分析依据 利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012.130723 版) 软件对 20 批注射用五味子指纹图谱进行相似度分析, 以生成的对照图谱作为参照图谱; 并对其余 20 批供试品进行指纹图谱相似度分析^[5-6]。

2.9.2 对照图谱的生成 利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012.130723 版) 软件对 20 批注

射用五味子指纹图谱进行相似度分析, 以 S1 作为参照图谱, 对照图谱生成方法设定为平均数, 时间窗宽度设定为 0.1, 进行全谱匹配, 生成对照指纹图谱, 计算相似度, 相应数据见表 1。生成对照图谱的 20 批供试品色谱峰匹配图见图 3, 生成的对照图谱见图 4。20 批供试品间指纹图谱相似度不低于 0.981, 均值为 0.994; 20 批供试品指纹图谱与参照指纹图谱间相似度不低于 0.985, 均值为 0.994; 20 批供试品指纹图谱与对照指纹图谱间相似度不低于 0.991, 均值为 0.997。

2.9.3 其余 20 批供试品指纹图谱相似度评价 利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012.130723 版) 软件对其余 20 批注射用五味子提取物进行指纹图谱相似度分析, 以 2.9.2 生成的对照指纹图谱 (图 4) 作为参照图谱, 进行全谱匹配。供试品溶液配制情况和指纹图谱相似度评价结果见表 2。

表 1 相似度匹配结果
Table 1 Similarity matching results

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	对照 图谱
S1	1.000	0.988	0.990	0.996	0.995	0.995	0.997	0.992	0.999	0.996	0.994	0.999	0.999	0.999	0.995	0.991	0.996	0.985	0.988	0.988	0.997
S2	0.988	1.000	0.998	0.991	0.978	0.978	0.992	0.986	0.992	0.991	0.989	0.988	0.988	0.989	0.992	0.986	0.988	0.998	0.985	0.998	0.993
S3	0.990	0.998	1.000	0.988	0.978	0.978	0.996	0.981	0.994	0.989	0.987	0.990	0.991	0.991	0.989	0.981	0.986	0.993	0.978	0.993	0.991
S4	0.996	0.991	0.988	1.000	0.996	0.996	0.991	0.999	0.996	0.999	1.000	0.996	0.994	0.997	0.999	0.999	0.999	0.992	0.997	0.994	0.999
S5	0.995	0.978	0.978	0.996	1.000	1.000	0.988	0.997	0.993	0.997	0.996	0.996	0.994	0.997	0.996	0.996	0.998	0.980	0.994	0.983	0.996
S6	0.995	0.978	0.978	0.996	1.000	1.000	0.988	0.997	0.993	0.997	0.996	0.996	0.994	0.997	0.996	0.996	0.998	0.980	0.994	0.983	0.996
S7	0.997	0.992	0.996	0.991	0.988	0.988	1.000	0.986	0.999	0.992	0.989	0.997	0.998	0.997	0.991	0.985	0.992	0.986	0.981	0.988	0.995
S8	0.992	0.986	0.981	0.999	0.997	0.997	0.986	1.000	0.992	0.999	0.999	0.993	0.991	0.994	0.999	1.000	0.999	0.99	0.999	0.992	0.998
S9	0.999	0.992	0.994	0.996	0.993	0.993	0.999	0.992	1.000	0.996	0.994	0.999	0.999	0.999	0.996	0.991	0.996	0.989	0.988	0.991	0.998
S10	0.996	0.991	0.989	0.999	0.997	0.997	0.992	0.999	0.996	1.000	0.999	0.997	0.996	0.998	0.999	0.998	1.000	0.992	0.997	0.994	1.000
S11	0.994	0.989	0.987	1.000	0.996	0.996	0.989	0.999	0.994	0.999	1.000	0.995	0.993	0.996	0.999	0.999	0.999	0.992	0.998	0.994	0.999
S12	0.999	0.988	0.990	0.996	0.996	0.996	0.997	0.993	0.999	0.997	0.995	1.000	1.000	0.999	0.996	0.992	0.997	0.986	0.989	0.989	0.998
S13	0.999	0.988	0.991	0.994	0.994	0.994	0.998	0.991	0.999	0.996	0.993	1.000	1.000	0.999	0.994	0.99	0.995	0.984	0.986	0.987	0.997
S14	0.999	0.989	0.991	0.997	0.997	0.997	0.997	0.994	0.999	0.998	0.996	0.999	0.999	1.000	0.997	0.993	0.998	0.987	0.990	0.989	0.999
S15	0.995	0.992	0.989	0.999	0.996	0.996	0.991	0.999	0.996	0.999	0.999	0.996	0.994	0.997	1.000	0.999	0.999	0.994	0.998	0.996	0.999
S16	0.991	0.986	0.981	0.999	0.996	0.996	0.985	1.000	0.991	0.998	0.999	0.992	0.990	0.993	0.999	1.000	0.999	0.991	1.000	0.993	0.997
S17	0.996	0.988	0.986	0.999	0.998	0.998	0.992	0.999	0.996	1.000	0.999	0.997	0.995	0.998	0.999	0.999	1.000	0.990	0.997	0.992	0.999
S18	0.985	0.998	0.993	0.992	0.98	0.98	0.986	0.990	0.989	0.992	0.992	0.986	0.984	0.987	0.994	0.991	0.990	1.000	0.991	1.000	0.993
S19	0.988	0.985	0.978	0.997	0.994	0.994	0.981	0.999	0.988	0.997	0.998	0.989	0.986	0.99	0.998	1.000	0.997	0.991	1.000	0.992	0.995
S20	0.988	0.998	0.993	0.994	0.983	0.983	0.988	0.992	0.991	0.994	0.994	0.989	0.987	0.989	0.996	0.993	0.992	1.000	0.992	1.000	0.995
对照 图谱	0.997	0.993	0.991	0.999	0.996	0.996	0.995	0.998	0.998	1.000	0.999	0.998	0.997	0.999	0.999	0.997	0.999	0.993	0.995	0.995	1.000

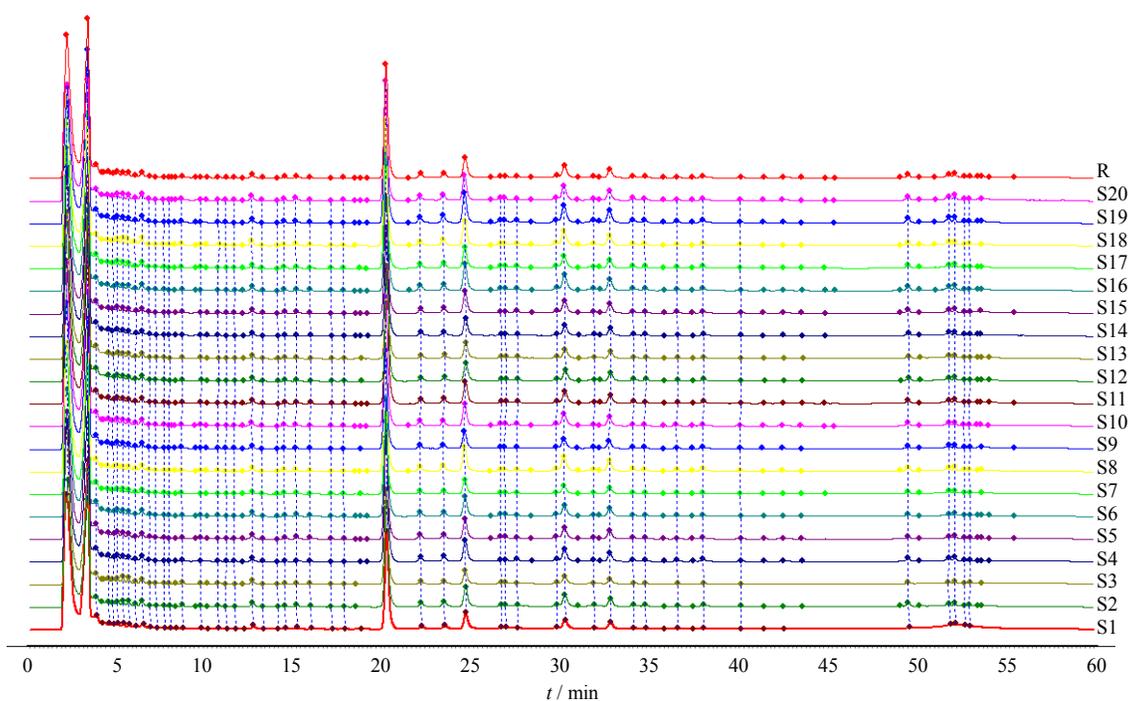


图3 生成对照图谱的20批供试品色谱峰匹配图

Fig. 3 Chromatogram peak matching diagram of 20 batch of test products which generated a control map

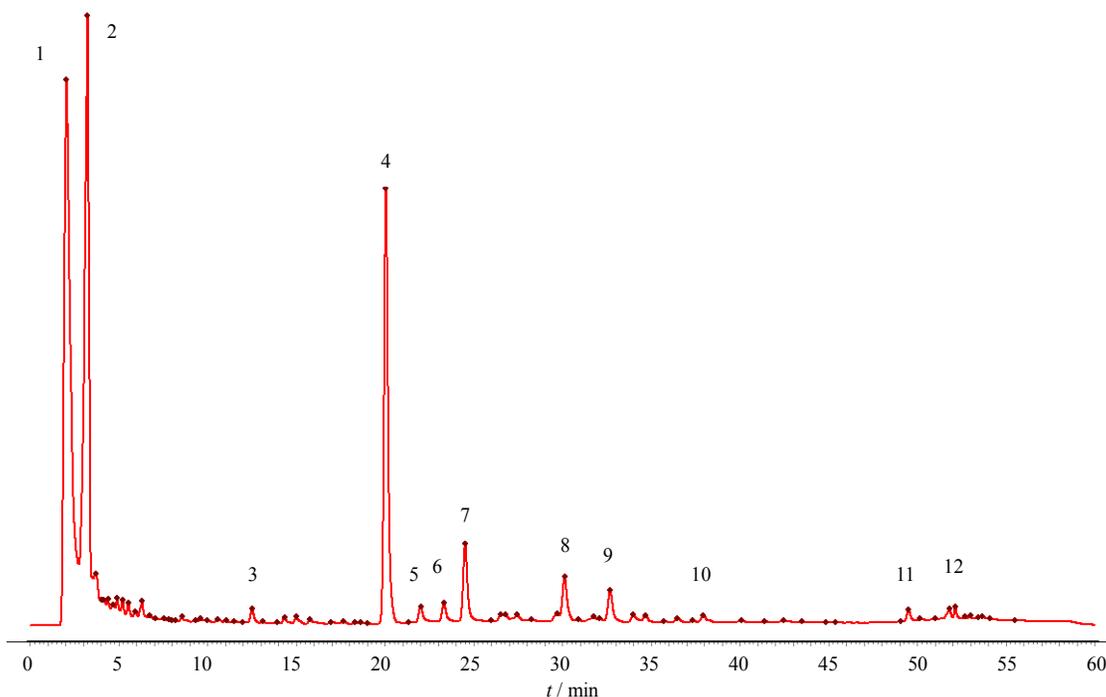


图4 20批供试品生成的对照图谱

Fig. 4 Control map of the 20 batch of test products

3 讨论

本研究相似度计算结果显示, 20批注射用五味子提取物的相似度较高, 相似度评价结果均值为

0.994, 除 S21 (相似度为 0.958)、S33 (相似度为 0.986) 和 S40 (相似度为 0.986) 外, 其余各批相似度均不低于 0.99, 说明注射用五味子提取物的质

表2 20批注射用五味子提取物指纹图谱相似度评价结果

Table 2 Similarity evaluation of the fingerprint of *Fructus Schisandrae* extract for 20 batches of injection

批号	称样量/mg	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	相似度	批号	称样量/mg	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	相似度
S21.cdf	146.93	5.877 2	0.958	S31.cdf	158.12	6.324 8	0.997
S22.cdf	160.87	6.434 8	0.994	S32.cdf	147.53	5.901 2	0.997
S23.cdf	150.09	6.003 6	0.991	S33.cdf	151.39	6.055 6	0.986
S24.cdf	151.96	6.078 4	0.992	S34.cdf	147.08	5.883 2	0.998
S25.cdf	156.46	6.258 4	0.997	S35.cdf	149.50	5.980 0	1.000
S26.cdf	148.60	5.944 0	0.999	S36.cdf	147.00	5.880 0	0.996
S27.cdf	157.56	6.302 4	0.999	S37.cdf	146.07	5.842 8	1.000
S28.cdf	156.76	6.270 4	0.997	S38.cdf	145.37	5.814 8	0.999
S29.cdf	151.77	6.070 8	1.000	S39.cdf	156.50	6.260 0	0.996
S30.cdf	143.61	5.744 4	0.999	S40.cdf	156.33	6.253 2	0.986

量比较稳定,批间差异较小,进而推测其工艺过程比较稳定。由此可知,本试验研究所得的 HPLC 特征指纹图谱能够反映注射用五味子提取物的固有特性,结合相似度分析和生产过程数据分析,可以作为注射用五味子提取物质量控制的方法,为完善注射用益气复脉(冻干)质量标准提供科学依据。

参考文献

- [1] 褚延斌,苏小琴,李德坤,等.基于一测多评法对注射用益气复脉(冻干)中9种成分的质量控制研究[J].中草药,2017,48(17):3537-3544.
- [2] 中国药典[S].2015.
- [3] 王佳丽,杨洪涛.五味子主要化学成分的药理研究[J].河南中医,2014,34(2):357-359.
- [4] 史琳,王志成,冯叙桥.五味子化学成分及药理作用的研究进展[J].药物评价研究,2011,34(3):208-212.
- [5] 中国药典[S].四部.2015.
- [6] 王连芝,付克,顾媛媛,等.不同产地五味子药材色谱图谱研究[J].中国中医药信息杂志,2016,23(11):103-106.