

【 方法学研究 】

葛根素注射剂杂质研究

胡芳晓¹, 杨传华^{2,3,4*}

1. 山东中医药大学, 山东 济南 250011

2. 山东中医药大学附属医院, 山东 济南 250011

3. 高血压国家中医临床研究基地, 山东 济南 250014

4. 国家中医药管理局高血压病血脉理论及应用重点研究室, 山东 济南 250011

摘要: **目的** 研究葛根素注射剂的杂质谱, 并对杂质进行结构鉴定。**方法** 建立高效液相梯度洗脱法, 分析 11 个厂家共 12 批次葛根素注射剂杂质谱, 利用半制备高效液相对注射剂中的杂质进行分离并结合核磁技术进行杂质结构确认。**结果** 不同生产厂家及批次的葛根素注射剂杂质种类及含量差别明显, 共分离并鉴定了注射剂中的 5 个杂质, 分别为 3'-羟基葛根素、3'-甲氧基葛根素、染料木素-8-葡萄糖苷、新葛根素 B、新葛根素 A, 均为葛根素异构体或其衍生物。**结论** 采用此方法检出的杂质峰数目较现行方法多, 且精密度高、重复性好。通过对葛根素注射剂杂质谱的研究, 可以有目的地控制部分杂质, 为质量控制研究提供参考。

关键词: 葛根素注射剂; 杂质谱; 高效液相; 结构鉴定; 3'-羟基葛根素; 3'-甲氧基葛根素; 染料木素-8-葡萄糖苷; 新葛根素 B; 新葛根素 A

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2018)07-1246-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.07.015

Study on impurities of Puerarin Injection

HU Fangxiao¹, YANG Chuanhua^{2,3,4}

1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011, China

2. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011, China

3. National TCM Clinical Research Base for Hypertension, Jinan 250014, China

4. Key research Office for Hypertension Blood Vessels Theory and Application, State Administration of Traditional Chinese Medicine of the People's Republic of China, Jinan 250011, China

Abstract: **Objective** To study the impurity profiling of Puerarin Injections and identify its chemical structures. **Methods** Twelve batches of Puerarin Injections from eleven manufactures were detected by establishing HPLC gradient analysis. High preparative performance liquid chromatography and NMR technique were used to isolate and identify the impurities. **Results** There were obvious differences in the numbers and content of impurities among the Puerarin Injections from different manufacturers. Five impurities were totally isolated from puerarin raw material and identified to be isomers or derivatives of puerarin, named 3'-hydroxypuerarin, 3'-methoxypuerarin, genistin-8-C-glucoside, neopuerarin B and neopuerarin A. **Conclusion** The method by which more peaks could be detected is accurate and reliable. Furthermore, the study on the impurity profiles of Puerarin Injections provides reference for the quality control of Puerarin Injection, according to this, several impurities can be controlled.

Keywords: Puerarin Injection; impurity profiling; HPLC; structure identification; 3'-hydroxypuerarin; 3'-methoxypuerarin; genistin-8-C-glucoside; neopuerarin B; neopuerarin A

收稿日期: 2017-11-20

第一作者: 胡芳晓 (1996—), 女, 本科在读。E-mail: 1121152827@qq.com Tel: (0531)88382150

*通信作者: 杨传华, 主任医师, 博士研究生导师, 主要从事高血压中医临床研究。E-mail: yangchuanhua1962@126.com Tel: (0531)88382156

葛根素是从中药葛根中提取的一种异黄酮类化合物,具有扩张血管、降低血压、保护心肌细胞等作用^[1]。葛根素注射剂临床可用于辅助治疗冠心病、心绞痛、心肌梗死、视网膜动静脉阻塞、突发性耳聋等疾病^[2]。目前葛根素注射剂剂型主要包括葛根素注射液、葛根素葡萄糖注射液、葛根素氯化钠注射液和注射用葛根素。注射用葛根素是在中药注射剂“葛根素注射液”基础上开发研制的冻干粉针,以固体状态存在,与原剂型相比,提高了药物的稳定性,有利于产品长期贮存^[3]。

葛根素注射剂临床应用中出现少量不良反应,如过敏反应、溶血性贫血^[4],限制了葛根素的应用。而引起葛根素不良反应的因素并不明确,可能与其所含杂质有关。本文对葛根素有关物质进行了分离及结构鉴定,并与不同厂家来源葛根素注射剂 HPLC 指纹图谱进行对照,确认了 5 种葛根素注射剂杂质结构,为葛根素生产过程中的质量控制提供了一定的依据。

1 仪器与试药

Agilent 1260 高效液相色谱系统(G1311C 四元泵、G1329B 自动进样器、G1316A 柱温箱、G1315D 二极管阵列检测器)、岛津 LC-6AD 半制备高效液相色谱仪(检测器为 SPD-M20A),Bruker 600M 型核磁共振波谱仪。

无水柠檬酸(分析纯,批号 20140710,天津科密欧化学试剂有限公司)、甲醇(色谱纯,MERDA)、乙腈(色谱纯,CINC 上海星可高纯试剂有限公司)、纯化水。

葛根素注射液 A(厂家 FM,批号 1611187),葛根素注射液 B(厂家 BY,批号 161002),葛根素注射液 C(厂家 DS,批号 1611241),葛根素注射液 D(厂家 SHL,批号 17010209),葛根素注射液 E(厂家 TT,批号 1610002),葛根素注射液 F(厂家 WT,批号 1703213),注射用葛根素 G(厂家 ZY,批号 160402),注射用葛根素 H(厂家 HB,批号 161202),注射用葛根素 I(厂家 SS,批号 201703101),注射用葛根素 J1(厂家 SHK,批号 16122021),注射用葛根素 J2(厂家 SHK,批号 17022018),注射用葛根素 K(厂家 RY,批号 16061419)。

2 方法与结果

2.1 HPLC 色谱分析条件

色谱柱为 Agilent zorbax SB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为 A (0.1%柠檬酸水溶液)-B

(0.08%柠檬酸甲醇溶液);进样量 10 μL;体积流量 1.0 mL/min;柱温 35℃;检测波长 250 nm。

本实验在《中国药典》色谱条件基础上,考察了不同组成体系及比例的流动相对样品峰形和分离度的影响,最终确定了表 1 的梯度洗脱条件,使得样品检测出的各峰分离度较好且基线较平稳。

表 1 HPLC 流动相梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program of mobile phase in HPLC analysis

t/min	A/%	B/%
0	75	25
15	75	25
35	60	40
40	60	40
41	75	25
50	75	25

2.2 供试品溶液配制

精密称(量)取葛根素注射剂(不同厂家、不同批次)适量,加适量甲醇溶解后,用溶剂[0.08%柠檬酸甲醇-0.1%柠檬酸(25:75)]稀释成每 1 mL 约含葛根素 0.5 mg 的溶液,作为供试品溶液。

2.3 对照品制备及溶液配制

利用岛津 LC-6AD 半制备高效液相色谱仪对葛根素原料(厂家 RY,批号 16061419)中的所有杂质进行分离(流动相为乙腈:水=15:85),富集纯化所有杂质峰并进行结构鉴定,得到 5 种结构确定的杂质,作为葛根素注射剂杂质分析的对照品。

精密称取各杂质对照品适量,加甲醇溶解,分别制成质量浓度为 0.1 mg/mL 的对照品储备液,将上述溶液保存于 4℃ 冰箱中备用。

2.4 检测限及定量限

精密吸取各杂质对照品储备液适量,用溶剂[0.08%柠檬酸甲醇-0.1%柠檬酸(25:75)]定量稀释成不同浓度的系列杂质对照品溶液,进行 HPLC 分析,以各杂质峰高约为噪音峰高的 3 倍时的浓度为最低检测限,以 10 倍信噪比浓度为定量限,见表 2。

2.5 线性关系考察

精密吸取各杂质对照品储备液,用溶剂[0.08%柠檬酸甲醇-0.1%柠檬酸(25:75)]分别稀释成不同浓度的系列标准溶液,并进行 HPLC 分析,以峰面积对各组分的质量浓度(μg/mL)作线性回归,计算相关系数(*r*),分别作出线性回归方程。结果表明,葛根素在 0.24~7.20 μg/mL 线性关系良好(*r*=

表2 葛根素注射剂主要杂质的检测限及定量限

Table 2 LOD and LOQ of the main impurities of Puerarin Injection

杂质编号	定量限		检测限
	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	相对浓度/%	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
1	0.100 00	0.02	0.033 00
2	0.130 00	0.03	0.042 90
3	0.066 50	0.01	0.021 95
4	0.080 00	0.02	0.026 40
5	0.100 00	0.02	0.033 00

0.999 9), 回归方程为 $y=35\ 363\ x-917.4$; 杂质 1 在 $0.25\sim 7.50\ \mu\text{g/mL}$ 线性关系良好 ($r=0.999\ 4$), 回归方程为 $y=27\ 767\ x+1\ 332.4$; 杂质 2 在 $0.33\sim 9.75\ \mu\text{g/mL}$ 线性关系良好 ($r=0.999\ 8$), 回归方程为 $y=32\ 974\ x+424.29$; 杂质 3 在 $0.33\sim 9.98\ \mu\text{g/mL}$ 线性关系良好 ($r=0.999\ 2$), 回归方程为 $y=46\ 080\ x+48.994$; 杂质 4 在 $0.25\sim 7.50\ \mu\text{g/mL}$ 线性关系良好 ($r=0.9983$), 回归方程为 $y=28\ 120\ x-790.72$; 杂质 5 在 $0.25\sim 7.58\ \mu\text{g/mL}$ 线性关系良好 ($r=0.9988$), 回归方程为 $y=26\ 018\ x+1\ 750.1$ 。

2.6 精密度实验

精密吸取同一批(批号 16061419)葛根素注射剂供试品溶液,加入适量各杂质对照品储备液混合,连续进样 6 次,分别考察杂质峰 1、2、3、4、5 的峰面积。计算各峰相对峰面积的 RSD 分别为 0.67%、0.93%、0.46%、0.56%、0.65%,结果表明该仪器具有较好的精密度。

2.7 重复性实验

取同一批样品,制备供试品溶液 6 份,加入各杂质对照品,分别考察各峰的峰面积。计算 1、2、3、4、5 相对峰面积的 RSD 分别为 0.26%、1.20%、0.39%、0.32%、0.36%,表明该实验方法具有较好的重复性。

2.8 稳定性实验

各取 5 种杂质对照品储备液适量混合,于室温下放置 0、2、4、6、8、10、12、24,分别进行 HPLC 分析,记录峰面积。杂质 1、2、3、4、5 在 24 h 内峰面积的 RSD 分别为 0.81%、1.08%、0.50%、0.30%、1.54%,表明各杂质在 24 h 内稳定。

2.9 加样回收率

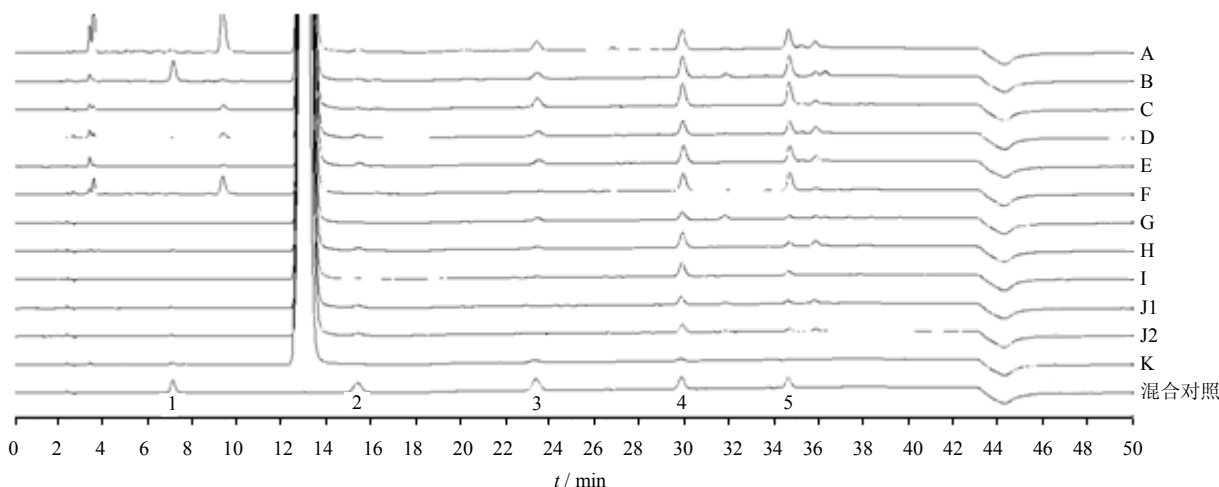
精密吸取各杂质含量已知的同一批注射用葛根素供试品溶液适量,分别加入各杂质对照品储备液,配成杂质含量相当于主成分葛根素浓度 1%的供试

液,分别进行 HPLC 分析,计算平均回收率。结果表明杂质 1、2、3、4、5 的回收率分别为 106.6%、103.4%、101.7%、117.1%、106.4%。

2.10 HPLC 图谱采集及杂质结构鉴定

按上述方法配制了样品及对照品,对 11 个厂家葛根素注射剂杂质谱进行了检测及比对(图 1),对其中 5 个杂质峰化合物结构进行鉴定(Bruker 600M 型核磁共振波谱仪),分别为 3'-羟基葛根素(1)、3'-甲氧基葛根素(2)、染料木素-8-葡萄糖苷(3)、新葛根素 B(4)、新葛根素 A(5),5 种杂质的结构见图 2,相应的核磁数据见表 3。其他峰由于含量较少,暂未鉴定结构。

不同生产厂家及批次的葛根素注射剂杂质种类及含量差别明显,共分离并鉴定了注射剂中的 5 个杂质,均为葛根素异构体或其衍生物。其中杂质 1、2、3 分别为 3'-羟基葛根素、3'-甲氧基葛根素、染料木素-8-葡萄糖苷,均为葛根素的衍生物,来源于葛根素原料。11 个厂家共 12 批次葛根素注射剂中杂质 1、2、3 的含量各不相同,杂质 1 仅存在于 A 和 B 这 2 个厂家的葛根素注射剂中,厂家 B 中杂质 1 含量尤为显著,达到 0.28%;杂质 2 在 A、B、D、E、H 及 J 等 6 个厂家共 7 批次的葛根素注射剂中含量差异不大(0.04%~0.07%),在 C、F、G、I、K 厂家共 5 批次的葛根素注射剂中未检测到杂质 2;杂质 3 仅在厂家 F 及 J 中未检测到,其他厂家中杂质 3 的含量差异略大(0.04%~0.22%)。可通过对葛根素原料药的质量控制降低杂质 1、2、3 的含量。另外,杂质 4 和 5 为 12 批次葛根素注射剂的共有杂质,是葛根素的同分异构体,且容易相互转化。葛根素注射液中 4 及 5 的杂质总和均高于注射用葛根素中 4 及 5 的杂质总和,这可能与不同剂型葛根素注射剂的生产工艺中的温度控制不同有关。见表 4。



1- 3'-羟基葛根素; 2- 3'-甲氧基葛根素; 3- 染料木素-8-葡萄糖苷; 4-新葛根素 B; 5- 新葛根素 A
1- 3'-hydroxypuerarin; 2- 3'-methoxypuerarin; 3- genistin-8-C-glucoside; 4- neopuerarin B; 5- neopuerarin A

图1 不同厂家及批次葛根素注射剂杂质谱与杂质对照品图谱

Fig. 1 The chromatograms of Puerarin Injections and impurities

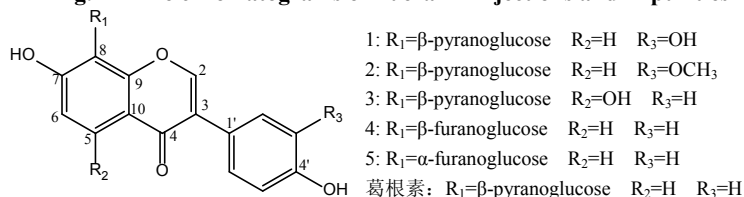


图2 葛根素及5种杂质的结构

Fig. 2 Structures of puerarin and five impurities

表3 葛根素注射剂杂质的¹H (600 MHz) 和¹³C (150 MHz) NMR 测定数据及解析

Table 3 ¹H (600 MHz) and ¹³C (150 MHz) NMR Spectroscopic Data of impurities 1- 5 in DMSO-d₆ (δ in ppm, J in Hz)

no.	1 ^[5]		2 ^[6]		3 ^[7]		4 ^[8]		5 ^[8]	
	δ _H , mult.	δ _C , type	δ _H , mult.	δ _C , type	δ _H , mult.	δ _C , type	δ _H , mult.	δ _C , type	δ _H , mult.	δ _C , type
2	8.27 s	152.9 CH	8.39 s	152.9 CH	8.40 s	153.9 CH	8.34 s	152.6 CH	8.31 s	152.6 CH
3		123.0 C		125.5 C		122.0 C		123.3 C		123.3 C
4		174.9 C		174.9 C		180.5 C		174.8 C		174.9 C
5	7.91 d (8.7)	126.2 CH	7.94 d (8.8)	126.1 CH		161.1 C	7.95 d (8.9)	126.4 CH	7.90 d (8.9)	125.6 CH
6	6.97 d (7.9)	115.2 CH	6.99 d (8.8)	115.9 CH	6.31 s	98.9 CH	6.91 d (8.9)	116.4 CH	6.87 d (8.8)	115.6 CH
7		161.7 C		161.9 C		163.3 C		160.5 C		161.7 C
8		112.6 C		112.5 C		104.3 C		111.7 C		109.5 C
9		156.3 C		156.2 C		156.3 C		154.9 C		154.6 C
10		116.7 C		116.7 C		104.6 C		116.4 C		116.6 C
1'		123.1 C		123.2 C		121.2 C		122.4 C		122.5 C
2'	7.03 d (1.7)	113.1 CH	7.17 S	115.3 CH	7.39 d (8.6)	130.2 CH	7.40 d (8.6)	130.1 CH	7.38 d (8.6)	130.1 CH
3'		147.2 C		144.8 C	6.82 d (8.6)	115.1 CH	6.82 d (8.5)	115.0 CH	6.82 d (8.6)	115.0 CH
4'		146.4 C		145.3 C		157.4 C		157.2 C		157.2 C
5'	6.75 d (8.1)	115.2 CH	6.81 d (8.2)	116.7 CH	6.82 d (8.6)	115.1 CH	6.82 d (8.5)	115.0 CH	6.82 d (8.6)	115.0 CH
6'	6.80 d (8.1, 1.8)	121.6 CH	7.04 d (8.1)	119.8 CH	7.39 d (8.6)	130.2 CH	7.40 d (8.6)	130.1 CH	7.38 d (8.6)	130.1 CH
-OMe			3.80 s	55.7 CH ₃						
	8-Glcp		8-Glcp		8-Glcp		8-Glcf		8-Glcf	
1''	4.81 d (9.8)	73.5 CH	4.82 d (9.8)	73.5 CH	4.67 d (9.8)	73.3 CH	5.27 d (3.3)	80.1 CH	5.72 d (3.1)	79.7 CH
2''	4.03 t (9.1)	70.8 CH	4.04 t (9.1)	70.8 CH	3.97 t (9.1)	70.7 CH	4.15 m	81.8 CH	4.15 d (3.0)	77.8 CH
3''	3.27 (m)	78.9 CH	3.28 m	78.8 CH	3.24 m	78.8 CH	3.80 m	80.6 CH	3.80 m	75.1 CH
4''	3.17 (m)	70.6 CH	3.21 m	70.5 CH	3.20 m	70.6 CH	4.12 m	76.9 CH	4.12 d (2.7, 8.7)	80.7 CH
5''	3.23 (m)	81.9 CH	3.25 m	81.8 CH	3.21 m	81.7 CH	3.82 m	68.8 CH	3.82 m	68.5 CH
6''	3.44(m), 3.70d (11.4)	61.4 CH ₂	3.45 dd(5.5, 11.2), 3.71 t (15.5)	61.4 CH ₂	3.44 m, 3.70 d (11.4)	61.5 CH	3.43 m, 3.59 m	63.7 CH ₂	3.43 d (10.8), 3.59 d (10.3)	63.9 CH ₂

表4 不同厂家葛根素注射剂杂质归一化含量

Table 4 The norm content of impurities and puerarin in Puerarin Injections from different manufacturers

厂家	剂型	批号	杂质 1/%	杂质 2/%	杂质 3/%	杂质 4/%	杂质 5/%	葛根素/%	总杂质/%
A	注射液	1611187	0.04	0.06	0.19	0.33	0.27	97.81	2.19
B	注射液	161002	0.28	0.04	0.14	0.39	0.36	98.57	1.43
C	注射液	1611241	—	—	0.22	0.42	0.36	98.79	1.21
D	注射液	17010209	—	0.06	0.11	0.24	0.19	99.17	0.83
E	注射液	1610002	—	0.07	0.10	0.34	0.27	99.04	0.96
F	注射液	1703213	—	—	—	0.34	0.31	98.91	1.09
G	粉针	160402	—	—	0.07	0.16	0.05	99.64	0.36
H	粉针	161202	—	0.06	0.04	0.29	0.08	99.43	0.57
I	粉针	201703101	—	-	0.04	0.24	0.06	99.66	0.34
J	粉针	16122021	—	0.05	—	0.15	0.06	99.65	0.35
		17022018	—	0.05	—	0.16	0.07	99.63	0.37
K	粉针	16061419	0.03	—	0.08	0.05	—	99.82	0.18

“—”表示未检出

“—” means not detected

3 讨论

本文分析了11个厂家共12批次(图2、表4)葛根素注射剂杂质谱,其中6个厂家共6批次(A~F)为葛根素注射液,另外5个厂家共6批次(G~K)为注射用葛根素。

由此看来,葛根素注射液可能由于辅料及生产工艺等原因导致其所含杂质种类更多、含量更大,而注射用葛根素粉针杂质谱相似,且葛根素纯度均较高。目前,对于葛根素注射剂杂质结构方面的研究较少。本文通过对葛根素注射剂杂质谱及杂质结构的研究,为葛根素注射剂生产过程中的质量控制提供了一定的参考,也为进一步研究葛根素注射剂杂质对葛根素药效的影响奠定了基础。

参考文献

- [1] 白智峰, 成 倍, 李大强. 葛根素对心房纤颤患者血小板活化和内皮功能的影响 [J]. 河南诊断与治疗杂志, 2003, 17 (2): 96-97.
- [2] 陈 蕊, 陈民辉, 蔡 梅, 等. HPLC 校正因子法同时测定葛根素及其各种注射剂中的5种有关物质 [J]. 中国中药杂志, 2011, 13(36): 1744.
- [3] 李江英, 张亚军. 注射用葛根素的质量标准研究 [J]. 中成药, 2003, 8(25): 622.
- [4] 李其国. 葛根素注射剂不良反应分析和处理对策 [J]. 临床合理用药, 2011, 4(3A): 7-8.
- [5] 王付荣, 葛喜珍, 杨秀伟. 通脉方化学成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(20): 61-69.
- [6] Kim J M, Lee Y M, Lee G Y, et al. Constituents of the roots of *Pueraria lobata* inhibit formation of advanced glycation end products (AGEs) [J]. Arch Pharm Res, 2006, 29(10): 821-825.
- [7] Rauter A P, Martins A, Borges C, et al. Liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionisation mass spectrometry/nuclear magnetic resonance analyses of the anti-hyperglycemic flavonoid extract of *Genista tenera* Structure elucidation of a flavonoid-C-glycoside [J]. J Chromatogr A, 2005 (1089): 59-64.
- [8] Zhang H J, Yang X P, Wang K W. Two new C-glucofuranosyl isoflavones in puerarin injection [J]. Chin Chem Lett, 2009, 20: 720-723.