

表4 紫杉醇-HP- β -CD 形成包合物前后紫杉醇化学位移的变化

Table 4 $^1\text{H-NMR}$ Chemical shift of paclitaxel before and after inclusion complex with paclitaxel

质子	δ (游离紫杉醇)	α (包合物中紫杉醇)	$\Delta\delta$
Ar-ph	8.108	8.026	-0.082
Bo-ph	7.854	7.777	-0.077
Ap-ph	7.674	7.600	-0.074
Am-ph	7.580	7.574	-0.006
Bp-ph	7.533	7.474	-0.059
Co-ph	7.467	7.403	0.064
Bm-ph	7.451	7.364	-0.087
Cm-ph	7.422	7.364	-0.077
Cp-ph	7.292	7.345	-0.078
10-H	6.437	6.214	-0.085
13-H	6.129	6.161	0.032
3'-H	5.643	5.646	0.003
5-H	4.977	4.991	-0.006
2'-H	4.729	4.767	0.038
7-H	4.304	4.315	-0.011
20a-H	4.178	4.191	0.013
20b-H	4.161	4.187	0.026
3-H	3.828	3.825	0.003
2'-OH	3.807	3.820	-0.013
6a-H	2.454	2.460	-0.006
4-OAc	2.352	2.360	0.081
10-OAc	2.160	2.167	0.075
14a-H	2.234	2.255	-0.021
6b-H	1.969	2.001	0.032
18-Me	1.901	1.909	-0.018
19-Me	1.650	1.658	0.118
17-Me	1.144	1.149	0.005

包合物中质子的化学位移是主客分子相互作用的结果,由于紫杉醇的相对分子质量较大,其空间构象复杂,根据计算机程序模拟环糊精母核和紫杉醇萜环分子模型,紫杉醇萜环跨度大于环糊精母核的内腔直径,紫杉醇分子不能完全进入环糊精空穴中。结合 HP- β -CD 对紫杉醇增溶曲线两者相互作用形成的包合物无固定比例可以推断,主客分子之间没

有固定的包合比例,不能形成恒定结合常数的包合物,故其包合物形成的空间结构尚不能用现有信息对计算分子模型作出准确的推论。结合紫杉醇包合前后质子化学位移的改变,间接地推断紫杉醇被包合的部位为紫杉醇的3个芳香环,对照紫杉醇包合前后质子信号,3个芳香环质子的化学位移均明显,提示可能是芳香环随机进入主分子的亲水空穴中,且3个芳香环基团分别被不同的环糊精所包合^[6,7]。此外,由于紫杉醇立体空间较大,芳香环插入环糊精内腔后受环糊精外层亲水羟基的作用,结果导致主客分子的质子发生不同程度的位移,其中紫杉醇萜环上-CH₃和-OAc位移较为明显,从而提示主客分子之间相互作用在侧链形成包合可能性。

References:

- [1] Rao S, Orr G A, Chaudhary A G, *et al.* Characterization of taxol-binding site on the microtubule-2-(mazidobenzoyl) taxol photolabels a peptide (acid 217-213) of tubulin [J]. *Biol Chem*, 1995, 270(35): 20235-20238.
- [2] Bodor N, Drustur J, Wu W. Effect of cyclodextrins on the solubility and stability of a novel soft corticosteroid, loteprednol etabonate [J]. *Pharmazie*, 2000, 55(3): 206-209.
- [3] Zhang X N, Zhang Q. Research progress of taxanes and its clinical application [J]. *Foreign Med Sci; Sect Pharm* (国外医学:药学分册), 2002, 29(6): 321-324.
- [4] Uekama K, Hieda Y, Hirayama F, *et al.* Stabilizing and solubilizing effects of sulfolbutyl ether beta-cyclodextrin on prostaglandin E1 analogue [J]. *Pharm Res*, 2001, 18 (11): 1578-1585.
- [5] Zhang X N, Tang L H, Yan X Y, *et al.* Preparation of Paclitaxel for injection and its hypersusceptibility test [J]. *Chin Hosp Pharm J* (中国医院药学杂志), 2005, 25(1): 32-34.
- [6] He L, Wang G L, Zhang Q. An alternative paclitaxel microemulsion formulation: hypersensitivity evaluation and pharmacokinetic profile [J]. *Int J Pharm*, 2003, 250(1): 45-50.
- [7] Lee S, Seo D H, Kim H, *et al.* Investigation of inclusion complexation of paclitaxel by cyclonicoasakis-(1-2)-(β -D-glucopyranosyl), by cyclomaltoheptaoses (β -cyclodextrins) [J]. *Carbohydrate Res*, 2001, 334(2): 119-126.

痰热清氯化钠注射液指纹图谱的研究

宋汉敏¹, 刘乃强¹, 刘素梅², 聂桂华¹

(1. 河南省食品药品检验所, 河南 郑州 450003; 2. 河南省兽药监察所, 河南 郑州 450008)

摘要:目的 建立痰热清氯化钠注射液的指纹图谱。方法 采用 HPLC-ELSD 法检测痰热清注射液中非挥发性成分,以黄芩苷对照品为参照,标定共有峰,计算相对保留时间和相对峰面积比值,确定 10 批样品之间的相似度。结果 在全面方法学研究的基础上,对 10 批痰热清氯化钠注射液进行检测分析,HPLC 指纹图谱有 16 个共有峰,其相对保留时间及相对峰面积比值均符合要求。结论 建立的指纹图谱可作为痰热清氯化钠注射液质量评价的重要依据之一。

关键词: 痰热清氯化钠注射液; 黄芩苷; 高效液相色谱; 指纹图谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)09-1320-04

Chromatographic fingerprint of Tanreqing NaCl Injection

SONG Han-min¹, LIU Nai-qiang¹, LIU Su-mei², NIE Gui-hua¹

(1. Henan Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China; 2. Henan Institute for Animal Drug Control, Zhengzhou 450008, China)

Abstract; Objective To establish the fingerprint detecting standard for Tanreqing NaCl Injection.

Methods Using baicalin as reference substance to calibrate the common peaks by HPLC-ELSD. According to the technical requirements on fingerprint of traditional Chinese medicine injection, their relative retention times and peak area ratios were calculated and the similarity of ten batches of samples was determined. **Results** On the basis of systematic methodology, ten batches of injection samples were tested and analyzed so as to establish HPLC fingerprint for the injection. **Conclusion** The relative retention times and peak area ratios of 16 common peaks on HPLC fingerprint all conform to the requirement. So the established fingerprint can be used as the one of important foundations for quality control of Tanreqing NaCl Injection.

Key words: Tanreqing NaCl Injection; baicalin; HPLC; fingerprint

痰热清氯化钠注射液由黄芩、熊胆粉、山羊角、金银花、连翘以及辅料丙二醇、L-盐酸半胱氨酸、枸橼酸和氯化钠组成,具有清热、解毒、化痰的功效,用于风温肺热病属痰热阻肺症。为了加强中药注射剂的质量管理,确保中药注射剂的质量稳定、可控,国家食品药品监督管理局要求中药注射剂必须进行指纹图谱的研究。根据此要求,本实验对痰热清氯化钠注射液进行了指纹图谱的研究。

1 仪器与试剂

Waters 2690/5 液相色谱仪, Alltech ELSD 检测器。乙腈、三氟乙酸均为色谱纯,水为超纯水。黄芩苷对照品(批号:0715-9708)购于中国药品生物制品检定所。痰热清氯化钠注射液(规格为100 mL)由河南省新谊药业股份有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: Agilent Zorbax SB C₁₈ 分析柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.5% 三氟乙酸水溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱, 0~24 min, 流动相 A 的比例从 90% 递减到 58%, 24~30 min, 流动相 A 的比例从 58% 递减到 26%, 30~40 min, 流动相 A 的比例从 26% 递减到 10%; 体积流量: 0.5 mL/min; 记录 40 min 色谱图; 检测器参数: 载气流量为 2.5 mL/min, 漂移管温度为 95 °C, 撞击器关, 增益 4。

2.2 供试品溶液的制备: 精密吸取本品 5 mL, 精密加水 5 mL, 摇匀, 加到已活化并水洗的 C₁₈ 小柱(500 mg, 3 mL, 加甲醇 5 mL, 待甲醇流完后, 加水 10 mL 洗, 备用), 用水 0.4 mL 洗脱, 弃去水洗脱液, 再用 4 mL 甲醇洗脱, 收集甲醇洗脱液, 用 0.45

μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.3 参照物的选择: 由于痰热清氯化钠注射液中黄芩苷和熊去氧胆酸为其主要有效成分, 两个成分色谱峰的积分面积在指纹图谱中所占的比例达 80% 以上, 并且色谱峰稳定, 重现性好, 加之黄芩苷峰处在图谱中部, 有助于色谱峰的辨认, 因此选择黄芩苷作为参照物。

2.4 参照物溶液的制备: 精密称取黄芩苷对照品适量, 加甲醇使溶解, 制成 0.3 mg/mL 的溶液, 即得。

2.5 测定方法: 进样 40 μL 时色谱峰信号丰富, 但主要有效成分黄芩苷和熊去氧胆酸为平头峰, 无法进行相对面积的计算, 而进样 5 μL 时没有平头峰, 但会失去许多小色谱峰信息, 所以采用进样 40 μL 和 5 μL 两个不同进样量, 分别进行相对保留时间和相对峰面积的计算, 并生成两个指纹图谱, 两者相互补充。分别精密量取供试品溶液 40 μL 和 5 μL 注入高效液相色谱仪, 分别记录色谱图, 计算各个峰的保留时间和积分面积, 见图 1。

2.6 黄芩苷、熊去氧胆酸和鹅去氧胆酸对照品峰的

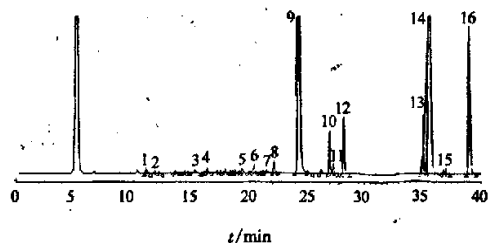


图1 痰热清氯化钠注射液 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatogram of Tanreqing NaCl Injection

确认:取黄芩苷、熊去氧胆酸和鹅去氧胆酸对照品溶液进样 10 μL ,记录色谱图,见图 2。由图可知,9号峰即峰 S 为黄芩苷,14号峰为熊去氧胆酸,16号峰为鹅去氧胆酸。

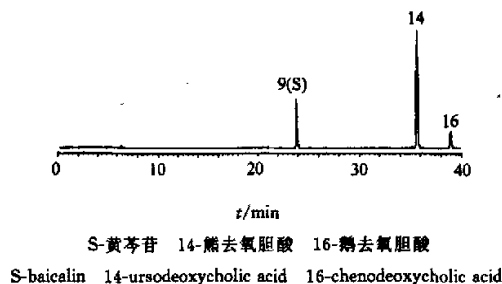


图2 黄芩苷、熊去氧胆酸和鹅去氧胆酸对照品 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC Chromatogram of baicalin, ursodeoxycholic acid, and chenodeoxycholic acid

2.7 方法学考察

2.7.1 稳定性试验:取批号 050303 本品制备供试品溶液,分别在 0、2.5、5.0、7.5、10.0、12.5、15.0 h 进样 40 μL 和 5 μL 分析,记录色谱图并积分,图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版处理,得到相似度系数,计算得其 RSD 均为 0。

2.7.2 精密度试验:取批号 050303 本品制备供试品溶液,连续进样 5 次,每次 40 μL 和 5 μL ,记录色谱图并积分,图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版处理,得到相似度系数,计算得其 RSD 均为 0。

2.7.3 重现性试验:取批号 050303 本品 6 份,制备供试品溶液,进样 40 μL 和 5 μL 分析,记录色谱图并积分,图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版处理,得到相似度系数,计算得其 RSD 分别为 0.04% 和 0。

2.8 样品测定:对 10 批痰热清氯化钠注射液制备供试品溶液,取 40 μL 和 5 μL 分别进样测定。从各个色谱图可以看出整个系统比较稳定,重现性好。40 μL 进样量图谱,目的考察小峰代表成分与成品标准图谱的相关性,但是黄芩苷峰和熊去氧胆酸峰超出信号记录范围,形成平头峰,因而失去部分整体信息,无法计算共有峰面积比,主要用来描述相关共有峰和其相对保留时间;以 5 μL 进样,图谱失去部分小峰信息,主要用来补充考察整体信息及主要大峰之间的面积比。将 10 批样品两个进样量的图谱分别导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统,按平均值法分别生成不同进样量标准图谱,相似度见表 1。可见平均值法生成的对照图谱具有较好的代表性,与

表 1 10 批样品相似度评价结果

Table 1 Similarity of ten batches of samples

批号	相似度系数	
	5 μL	40 μL
050201	0.998	0.999
050202	1.000	1.000
050203	1.000	1.000
050301	0.999	0.999
050302	0.997	1.000
050303	1.000	1.000
050304	0.999	1.000
050305	1.000	1.000
050306	1.000	1.000
050307	0.997	0.999
RSD/%	0.12	0.05

10 批痰热清氯化钠注射液图谱比较,相似度系数均达到 0.99 以上。

因此,该对照图谱作为标准图谱,见图 3。可以看出,采用两个进样量指纹图谱相互补充,较大进样量图谱反映共有峰信息,小进样量反映主要共有峰之间面积比(量比)信息,同时两个图谱均与对应标准图谱比较,相似度系数均不低于 0.99。除色谱图 8 min 前无机盐峰外,一般有 16 个共有峰,标号为 1~16 号峰,经确认,1、5 号峰为连翘的相关峰,2 号峰为山羊角的相关峰,3、4、6、7、8 号峰为金银花的相关峰,9、10、11、12 号峰为黄芩的相关峰,13、14、15、16 号峰为熊胆粉的相关峰。

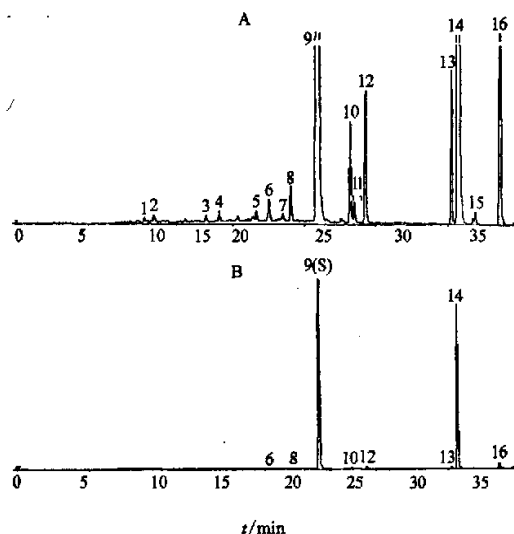


图3 40 μL (A) 和 5 μL (B) 的标准图谱

Fig. 3 Normal Chromatograms of 40 μL (A) and 5 μL (B)

10 批样品共有峰相对保留时间变动范围如下(共有峰相对保留时间变动范围的设定,系取 10 批样品共有峰相对保留时间的平均值 $\pm 10\%$):相对保

留时间:0.455~0.458(峰1)、0.485~0.488(峰2)、0.626~0.630(峰3)、0.670~0.674(峰4)、0.794~0.799(峰5)、0.834~0.841(峰6)、0.880~0.886(峰7)、0.907~0.913(峰8)、S(峰9)、1.106~1.113(峰10)、1.120~1.127(峰11)、1.156~1.163(峰12)、1.438~1.448(峰13)、1.463~1.472(峰14)、1.518~1.528(峰15)、1.599~1.609(峰16)。

共有峰相对面积:按《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》规定,单峰面积占总峰面积5%以下的不做规定。色谱图中仅有14号共有峰单峰面积占总峰面积超过5%,按规定14号峰相对S峰面积比不得超过(20%±0.69%)。非共有峰占总峰面积不到0.3%,符合《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》规定。

3 讨论

根据指纹图谱相似度评价分析结果,方法的稳定性、精密度和重复性的相关系数均在0.999以上,10批样品相似度均在0.99以上,具有很好的相关性,可以作为痰热清氯化钠注射液质量控制标准。

黄芩苷为方中的主要有效成分,在使用紫外检测器扫描时,其最大吸收在280 nm处^[1],但熊胆粉中主要有效成分熊去氧胆酸没有吸收,未表现出相关性。使用蒸发光散射检测器可以克服此不足^[2,3],

显示更多的信息,根据信息最大化原则,选择ELSD进行分析测定。

由于痰热清氯化钠注射液有效成分质量浓度较低,直接进样时所显示的色谱峰信息量很少,不能达到指纹图谱的要求,且注射液中有辅料氯化钠,较多的氯化钠对ELSD污染严重^[2,3],需要进行前处理,以去除或基本除去无机盐,使成分质量浓度达到信息量的要求。经过考察,采用本实验供试品溶液的制备项下的方法进行样品处理,既基本除去了氯化钠,又使供试品得到富集。

根据痰热清氯化钠注射液生产工艺,成品中加有辅料L-盐酸半胱氨酸、枸橼酸,蒸发光散射检测器对两者也能产生信号响应,氯化钠虽然经处理基本除去,但还有残留,也产生信号响应。为考察指纹图谱中三者对色谱峰的干扰情况,对L-盐酸半胱氨酸、枸橼酸和氯化钠进行了考察,结果发现其色谱峰保留时间均在5~6 min,对色谱峰无干扰。

References

- [1] CH P (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.
- [2] Zhao Y X, Li M L. The application of the ELSD in the analysis of composition of Chinese medicine [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28(10): 913-916.
- [3] Deng H G, Cao Y Z. The current detector of quality of HPLC-ELSD [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1994, 14(3): 61-63.

近红外光谱法预测红参醇提过程中总皂苷的变化研究

王 静¹, 莫必琪², 李 斌¹, 瞿海波^{1*}, 程翼宇¹

(1. 浙江大学 中药科学与工程学系, 浙江 杭州 310027; 2. 正大青春宝药业有限公司, 浙江 杭州 310023)

摘 要:目的 应用近红外(NIR)光谱技术快速分析红参乙醇回流提取过程。方法 采用比色法测定提取液样品的总皂苷质量浓度作为对照值,同时采集提取液样品的NIR光谱。运用正交信号校正算法消除光谱中的干扰信息,采用偏最小二乘回归法建立NIR光谱校正模型。结果 NIR光谱校正模型能够准确地预测红参提取过程总皂苷质量浓度。结论 NIR光谱技术可用于红参醇提过程快速分析。

关键词:红参;近红外光谱;正交信号校正

中图分类号:R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)09-1323-04

Determination of ginsenoside in ethanol extracting process of red ginseng using near-infrared spectroscopy

WANG Jing¹, MO Bi-qi², LI Bin¹, QU Hai-bin¹, CHENG Yi-yu¹

(1. Department of Chinese Medicine Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China; 2. Chiatai Qinchunbao Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310023, China)

Abstract: Objective Near-infrared (NIR) spectroscopy was used as a fast analytical technique in the

收稿日期:2006-12-05

基金项目:浙江省科技厅重大科技计划(021103549)

*通讯作者 瞿海波 E-mail: quhb@zju.edu.cn