

文章编号 1006-8147(2016)02-0164-04

论 著

红景天注射液 HPLC 指纹图谱研究

杨胜岩¹, 赵国华², 王仁久², 房宗宝², 吴海波², 刘倩¹, 唐铖^{1,3}, 段宏泉^{1,3}

(1.天津医科大学药学院,天津市临床药物关键技术重点实验室,天津 300070; 2.通化玉圣药业有限公司,通化 134000; 3.天津医科大学基础医学研究中心,天津 300070)

摘要 目的:建立红景天注射液的色谱指纹图谱,为红景天注射液的质量控制提供依据。方法:采用高效液相色谱法进行检测,以 Agilent XDB C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱为固定相,乙腈-水(0.07%磷酸)为流动相进行梯度洗脱,流速 0.8 mL·min⁻¹,检测波长 278 nm,柱温 30 ℃;以中国药典指纹图谱相似度评价系统(2004 版)对注射液进行指纹图谱数据分析。结果:所建立的色谱条件能够有效分离红景天注射液的主要成分,确定了 6 个共有峰,以化学对照品比对结合 HPLC-MS 鉴定了其中 5 个色谱峰,分别为没食子酸、对羟基苯甲酸、酪醇、红景天苷和对香豆酸。方法学考察结果表明,文中所建分析方法精密度 RSD≤1.90%、重现性 RSD≤0.32%、稳定性 RSD≤1.63%,均符合要求。对 9 个批次注射液进行的指纹图谱分析结果表明相似度均大于 0.96。结论:文中所建立的指纹图谱分析方法准确可靠,可以用于红景天注射液的质量控制。

关键词 红景天注射液;高效液相色谱指纹图谱;色谱峰鉴定;相似度评价

中图分类号 R9

文献标志码 A

Study on fingerprint of Hongjingtian injection by HPLC

YANG Sheng-yan¹, ZHAO Guo-hua², WANG Ren-jiu², FANG Zong-bao², WU Hai-bo², LIU Qian¹, TANG Cheng^{1,3}, DUAN Hong-quan^{1,3}

(1.Tianjin Key Laboratory on Technologies Enabling Development of Clinical Therapeutics and Diagnostics (Theranostics), School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2.Tonghua Yu Sheng Pharmaceutical Co., Ltd., Tonghua 134000, China; 3. Research Center of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To establish a HPLC fingerprint method and improve the quality control of Hongjingtian injection. **Methods:** Agilent XDB C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm) column was used as stationary phase. And water containing 0.07 % phosphoric acid-acetonitrile system was utilized as a mobile phase, at the flow rate of 0.8 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 278 nm, and the column temperature was set at 30 ℃. All the data was analyzed by fingerprint evaluation system(2004). **Results:** Components of Hongjingtian injection were analyzed. Six common peaks were obtained for standard fingerprint chromatography and five of them such as gallic acid, p-hydroxybenzoic acid, tyrosol, salidroside, p-hydroxycinnamic acid were identified by HPLC-MS and standard compounds. The similarities of nine batches sample were above 0.96. **Conclusion:** HPLC fingerprint method is accurate and reliable, and could be used for the quality control of Hongjingtian injection.

Key words Hongjingtian injection; HPLC fingerprint; chromatographic peak identification; similarity evaluation

红景天(*Rhodiola rosea* L.)的主要成分为红景天苷、酪醇和酚酸类化合物等,具有抗疲劳、抗衰老、增强学习记忆、抑制肿瘤、提高免疫等多种功能^[1-2];其所含多元酚类化合物和黄酮类化合物具有抗氧化作用^[3],对心脑血管系统具有保护作用^[4-5];能扩张血管,增加冠脉血流量,减少心肌耗氧量,改善心肌微循环,从而改善心肌的供血供氧^[6],并能够增强机体对缺氧的耐受力,快速缓解心血管疾病症状。近些年来,已有将该药制成注射液应用于临床的报道^[7]。中药注射液由于直接进入体内循环系统,其质量控制水平的提高对于保障质量,防止注射液不良反应的发生尤为重要。近年来,指纹图谱技术被逐步应用

于中药注射液的质量控制,其优点在于可全面反映中药复杂的化学成分及其相对比例,在大多数中药有效成分尚未阐明的现状下,仍可有效地表征中药质量。与现行的单一有效成分或指标性成分鉴定相比,指纹图谱所含的信息量更大,更为科学、合理^[8]。本文采用高效液相色谱法建立红景天注射液指纹图谱分析条件,通过对多批次注射液分析确定共有峰,结合 HPLC-MS 和 HPLC 保留时间和对照品叠加试验方法对共有峰进行指认,进一步通过方法学考察建立色谱指纹图谱分析方法,为该产品的质量控制方法的改进提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 Agilent 1200 series 高效液相色谱仪,包括二元高压泵、柱温箱、自动进样器、紫外-

作者简介 杨胜岩(1991-),女,硕士在读,研究方向:中药现代质量控制与质量标准;通信作者:段宏泉, E-mail:duanhq@tjmu.edu.cn。

可见光检测器,Agilent Chemstation 工作站;中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 版(国家药典委员会);分析天平(十万分之一,上海恒平科学仪器有限公司)。

红景天苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110818-201206);酪醇对照品(中国药品生物制品检定所,批号:111676-200602);乙腈(色谱纯,百灵威公司);超纯水(Merck Millipore Q-Gard T1);其他试剂均为市售分析纯;红景天注射液(通化玉圣药业有限公司,批号:3001141104-1,3001141105-1,3001141201-1,3001141202-1,3001141204-1,3001141205-1,3001141206-1,3001141207-1,3001150105-1,3001150106-1,3001150107-1,3001150108-1,3001150109-1,3001150110-1,3001150201-1,3001150202-1,3001150203-1,3001150204-1,3001141103-1,3001141208-1,3001141209-1,3001141210-1,3001150101-1,3001150102-1,3001150103-1,1001150401-1,1001150402-1)。

1.2 方法

1.2.1 对照品及供试品溶液的配制 精密称取红景天苷对照品 5.12 mg,酪醇对照品 1.72 mg,分别置 10 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,分别制得浓度为 $0.512 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的红景天苷贮备液和 $0.172 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的酪醇贮备液。精密吸取红景天注射液 1.0 mL,用超纯水稀释至 10.0 mL,摇匀,所得溶液经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

1.2.2 色谱条件 本品含有的主要药效物质为红景天苷和酪醇等苯乙醇苷化合物,通过红景天苷、酪醇全波长扫描分析可知,上述化合物的最大吸收波长均在 278 nm。故本文选择 278 nm 作为检测波长。固定相:Agilent XDB C₁₈ 色谱柱($5 \mu\text{m}$, $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$);流动相:A-乙腈,B-0.07%磷酸水溶液,梯度洗脱,0~10 min,0~0A;10~30 min,0~3% A;30~38 min,3%~5%A;38~45 min,5%~7% A;45~50 min,7%~13%A;50~60 min,13%~22% A;检测波长:278 nm;进样量:20 μL ;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;流速:0.8 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

1.2.3 色谱指纹图谱的建立

1.2.3.1 共有峰的确定:按照“1.2.2”项下色谱条件,分析 18 批注射液的色谱指纹图谱。

1.2.3.2 各色谱峰的化学成分鉴定:参照文献[9]并适当调整,建立质谱分析条件如下:(1) 仪器一:Agilent 1200 series 高效液相色谱仪,Bruker HCT Iontrap 三维离子阱质谱仪,Bruker ESI Compass 1.3 for HCT/Esquire 工作站;质谱条件:ESI 源,负离子检测模

式,扫描范围为 m/z 100~1 000,毛细管电压为 145 V,锥孔电压为 30 V,脱溶剂气为氮气,350 $^{\circ}\text{C}$,8 L/min。

(2) 仪器二:Agilent 6520 QTOF 四极杆-飞行时间串联质谱仪,Agilent MassHunter Workstation Qualitative Analysis 工作站;质谱条件:ESI 源,负离子检测模式,扫描范围为 m/z 50~1 000,毛细管电压为 200 V,锥孔电压为 30 V,脱溶剂气为氮气,180 $^{\circ}\text{C}$,6 L/min。

1.2.4 色谱指纹图谱方法学考察

1.2.4.1 精密度试验:取同一批次红景天注射液 1 支,按“1.2.1 项”下制备方法制备供试液;按“1.2.2 项”下色谱条件,连续进样 6 次。

1.2.4.2 重现性试验:取同一批次红景天注射液 6 支,分别按“1.2.1 项”下制备方法制备供试液 6 份;按“1.2.2 项”下色谱条件,分别进样分析。

1.2.4.3 稳定性试验:取同一批次红景天注射液 1 支,按“1.2.1 项”下制备方法制备供试液;按“1.2.2 项”下色谱条件,分别于 0、2、6、10、12、24 h 进样分析。

1.2.5 对照图谱的生成和相似度评价 对 18 批红景天注射液按“1.2.2 项”下色谱条件进行测定。将红景天注射液色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版》研究,计算各样品指纹图谱与对照图谱的相似度。

1.2.6 市售样品指纹图谱的相似度评价 取市售该企业的 9 批注射液,按上文中建立的指纹图谱测定方法检测,将所得指纹图谱和上述红景天注射液对照指纹图谱通过《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004B 版》对各图谱进行全谱匹配,计算各样品指纹图谱与对照图谱的相似度。

2 结果

2.1 色谱指纹图谱的建立

2.1.1 共有峰的确定 通过比较 18 批供试品色谱指纹图谱的共有色谱峰,选择稳定性好、吸收强、特征明显的色谱峰为共有峰,共标定 6 个峰,见图 1。

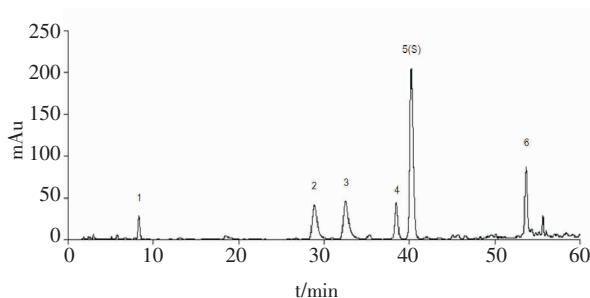


图1 红景天注射液的色谱指纹图谱

Fig 1 The chromatographic fingerprint of Hongjingtian injection

2.1.2 各色谱峰的化学成分鉴定 通过分子离子峰与红景天化学成分比较分析,分子离子峰提取 TIC 峰与 UV 色谱峰保留时间比对,鉴定了 5 个化学成分,见表 1。

表 1 5 个共有色谱峰的化学成分鉴定

Tab 1 Identifying chemical constituents of 5 common chromatographic peaks

序号	Rt/min	M+X	分子式	名称
1	8.8	[M+H] ⁺ =170.9 [M-H] ⁻ =168.8	C ₇ H ₆ O ₅	没食子酸
2	30.8	[M+H] ⁺ =139.0 [M-H] ⁻ =136.9	C ₇ H ₆ O ₃	对羟基苯甲酸
3	34.3	[M+H] ⁺ =139.0 [M-H] ⁻ =136.9	C ₈ H ₁₀ O ₂	酪醇
5	41.6	[M+H] ⁺ =301.0 [M-H] ⁻ =299.0 [M+HCOO] ⁻ =345.1 [2M-H] ⁻ =599.1	C ₁₄ H ₂₀ O ₇	红景天苷
6	54.7	[M-H] ⁻ =163.0 calcd. 163.0395	C ₉ H ₇ O ₃	对香豆酸

进一步采用化学对照品的保留时间及与注射液叠加试验分析对比,最终确定本文鉴定的 5 个共有色谱峰的化学成分无误。

2.2 色谱指纹图谱方法学考察

2.2.1 精密度试验结果 对共有峰进行比较,选定第 5 个共有峰红景天苷为参照物峰(S 峰),结果显示各共有峰相对保留时间 $RSD \leq 0.16\%$,各共有峰相对峰面积 $RSD \leq 1.90\%$,表明精密度良好。

2.2.2 重现性试验结果 各共有峰相对保留时间 $RSD \leq 0.17\%$,各共有峰相对峰面积的 $RSD \leq 0.32\%$,表明所建方法重现性较好。

2.2.3 稳定性试验结果 各共有峰相对保留时间 $RSD \leq 0.83\%$,各共有峰相对峰面积 $RSD \leq 1.63\%$ 。表明所建方法稳定性良好。

2.3 对照图谱的生成和相似度评价 对 18 批红景天注射液进行测定并将红景天注射液色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版》,研究结果见图 2,相似度计算结果显示 18 批样品相似度均在 0.9 以上,平均为 0.982, RSD 为 0.85%。生成红景天注射液对照指纹图谱见图 3。

2.4 市售样品指纹图谱的相似度评价 各样品指纹图谱与对照图谱的相似度结果见表 2,9 批注射液相似度均高于 0.970,表明不同批次红景天注射液相似度较高,指纹图谱相似性良好说明工艺较稳定。

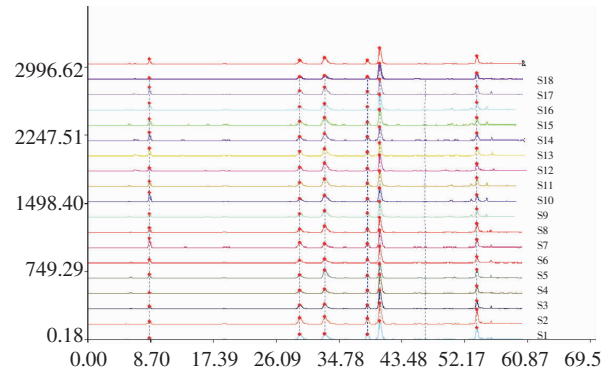


图 2 1~18 批红景天注射液指纹图谱(R 为对照指纹图谱)

Fig 2 The fingerprints of the 1~18 batches of Hongjingtian injection(R is the control fingerprint)

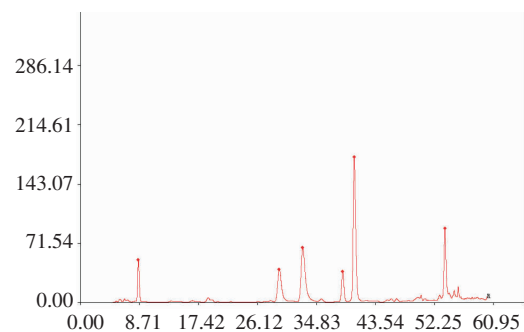


图 3 红景天注射液对照指纹图谱

Fig 3 Control fingerprint of the Hongjingtian injection

表 2 9 批红景天注射液样品相似度评价结果

Tab 2 Results for the similarity evaluation of the 9 batches of Hongjingtian injection

编号	批号	相似度	平均	RSD
S1	3001141103-1	0.986		
S2	3001141208-1	0.990		
S3	3001141209-1	0.977		
S4	3001141210-1	0.967		
S5	3001150101-1	0.977	0.981	0.99
S6	3001150102-1	0.978		
S7	3001150103-1	0.971		
S8	1001150401-1	0.994		
S9	1001150402-1	0.993		

3 讨论

在检测波长选择方面:由于中药产品中存在的物质成分差别较大,指纹图谱样品在色谱响应行为上也有较大差别。因此检测波长的选择就显得尤为重要^[10]。检测波长选择的主要原则是整体全面,尽可能减少数据间差别,达到最优化的显示^[11]。本品主要化学成分为红景天苷和酪醇,两者最大吸收均为 278 nm,结合 DAD 检测谱图中红景天各色谱峰随

波长的峰高分布情况,研究表明该化合物在 278 nm 波长处色谱峰数目最多且峰面积最大,可满足有效指纹信息最大化原则,故最终确定以 278 nm 检测波长用于注射液的综合质量控制。

在色谱柱选择方面:本文分别采用 Agilent XDB C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent XDB C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent Zorbax SB C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 和 Agilent Zorbax Extend C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 4 种色谱柱,对同一批号的样品进行分析比较。结果显示红景天苷和酪醇在使用 Agilent XDB C₁₈ 分离时,可将各组分较好地分离,峰形良好并且分析时间较短,故最终选用 Agilent XDB C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 进行指纹图谱检测。

在特征峰的指认方面,本文进一步做了 HPLC 叠加分析试验。众所周知,HPLC-MS 联用技术虽然能够快速鉴定色谱指纹图中色谱峰所对应的化学成分结构,但是无法准确区别分子量相同而化学结构不同的化学成分,特别是中药化学成分组成复杂,同分异构体也很多,很难利用分子离子峰的裂解规律进行鉴定。现有文献报道常采用混合化学对照品分析,通过保留时间指认色谱峰所对应化学成分,但由于仪器分析精密度的局限性,如无法区分保留时间相差 0.1~0.2 min 的不同化学成分,而叠加试验则可以避免这类问题。本研究采用化学对照品与注射液叠加试验作为色谱峰鉴定的补充。上述两种方法相结合,鉴定的指纹图谱中色谱峰所对应化学成分准确、依据充分。

本文建立的 HPLC 测定红景天注射液指纹图

谱的方法,能较为全面地反映红景天注射液的化学组成及其相对比例,有助于对药品质量进行整体描述和评价。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典 (一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 154-154
- [2] 罗文哲, 王建杰, 阮阳, 等. 红景天多糖对老年小鼠免疫功能的影响[J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(11):1360
- [3] Huang S C, Lee F T, Kuo T Y, et al. Attenuation of long-term rhodiola rosea supplementation on exhaustive swimming-evoked oxidative stress in the rat [J]. Chinese J Physiol, 2009, 52(5):316
- [4] Qian E W, Ge T, Kong S K. Salidroside promotes erythropoiesis and protects erythroblasts against oxidative stress by up-regulating glutathione peroxidase and thioredoxin [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 133:308
- [5] Mao G X, Wang Y, Qiu Q. Salidroside protects human fibroblast cells from premature senescence induced by H₂O₂ partly through modulating oxidative status [J]. Mech Ageing Dev, 2010, 131:723
- [6] Wang J, Li J Z, Lu A X, et al. Anticancer effect of salidroside on A549 lung cancer cells through inhibition of oxidative stress and phospho-p38 expression [J]. Oncol Lett, 2014, 7(4): 1159
- [7] Zhao X J, Lu Y, Tao Y, et al. Salidroside liposome formulation enhances the activity of dendritic cells and immune responses[J]. Int Immunopharmacol, 2013, 17(4):1134
- [8] 刘静, 周晓梅, 祝与鸣, 等. 中药质量控制方法研究进展[J]. 中国药房, 2010, 21(3):281
- [9] 霍佳丽, 王建华, 吴志军, 等. 新疆大花红景天化学成分的 HPLC-MS 研究[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24:1405
- [10] 杨婷媛, 李三鸣, 李红菊, 等. 红景天注射液中红景天苷和酪醇的定性定量分析[J]. 中成药, 2007, 29(12):1789
- [11] 姚令文, 聂黎行, 张颖, 等. 大株红景天注射液指纹图谱研究[J]. 中国药事, 2011, 25(9):916

(2015-09-15 收稿)

(上接第 163 页)

- Medical Association -Physician Consortium for Performance Improvement[J]. Circulation, 2012, 125(19): 2382
- [8] Crapo R O, Casaburi R, Coates A L, et al. ATS statement: Guidelines for the six-minute walk test[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2002, 166(1): 111
 - [9] Takamochi K, Oh S, Matsuoka J, et al. Risk factors for morbidity after pulmonary resection for lung cancer in younger and elderly patients[J]. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2011, 12(5): 739
 - [10] Siafakas N D. Surgery and the respiratory muscles[J]. Thorax, 1999,

54(5): 458

- [11] Funk G C, Lang I, Schenk P, et al. Left ventricular diastolic dysfunction in patients with COPD in the presence and absence of elevated pulmonary arterial pressure[J]. Chest, 2008, 133(6): 1354
- [12] Fiack C A, Farber H W. Pulmonary hypertension associated with left ventricular diastolic dysfunction[J]. J Heart Lung Transplant, 2010, 29(2): 230

(2015-09-19 收稿)