



苦木注射液高效液相色谱指纹图谱研究 及多成分定量分析

赖正权¹, 易宇阳¹, 廖慧君¹, 苏冀彦¹, 廖祝元², 林吉¹, 苏子仁^{1*}

(1. 广州中医药大学 新药开发研究中心, 广东 广州 510006;

2. 江西青峰药业有限公司, 江西 赣州 341000)

[摘要] 目的:建立苦木注射液的 HPLC 指纹图谱,并同时测定 3 种哌巴啉类生物碱的含量,全面评价其内在质量。方法:采用 Phenomenex Gemini C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),甲醇-30 mmol·L⁻¹乙酸铵(冰乙酸调 pH 4.5)溶液梯度洗脱,用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 A 版”处理分析,建立苦木注射液的 HPLC 指纹图谱共有模式。结果:在指纹图谱研究中,标定了 16 个共有峰,指认了 7 个化合物,分析的 11 批苦木注射液与共有模式之间相似性良好,相似度均在 0.9 以上;3 种哌巴啉类生物碱在含量分析测定条件下,各组分分离良好,相关系数均为 0.999 9,线性范围分别为 0.020 0~0.300 0,0.102 0~1.530 0,0.015 2~0.228 0 μg,加样回收率在 99.5%~102%。结论:本法灵敏度高、专属性强,HPLC 指纹图谱结合多成分含量测定为苦木注射液的质量控制提供科学依据。

[关键词] 苦木注射液;指纹图谱;反相高效液相色谱法;含量测定

苦木注射液收载于《中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂》第 20 册^[1],为苦木干燥枝或茎经加工制成。具有清热、解毒、消炎的功效,用于感冒、上呼吸道感染、急性扁桃体炎、肠炎、细菌性痢疾等。其中苦木 *Picrasma quassioides* 主要含有生物碱和苦味素类化合物^[2-4],其总生物碱经临床观察均证明其对呼吸系统、消化系统和泌尿系统的感染以及外伤感染和脓肿等有显著的疗效^[5]。部颁标准中的苦木注射液的质量评价方法仅有薄层色谱法及重量法,标准亟待提高。为确保该品种的质量稳定、可控,本实验建立了苦木注射液的 HPLC 指纹图谱和 3 种哌巴啉类生物碱的含量测定方法,重现性好、稳定性高,为评价苦木注射液的安全性与有效性提供科学依据。

1 材料

岛津高效液相色谱仪,配有 SPD-M20A PDA 检测器、CTO-20A 柱温箱、SIL-20AC 自动进样器、LC-20AT 泵、LC solution 色谱工作站;试验室专用超纯水机(重庆利迪现代水技术设备有限公司);CP225D 电子天平(0.01 mg,德国 Sartorius 公司)。

对照品 1-甲酸-7-羟基-β-哌巴啉、1-甲酸-β-哌巴啉、1-丙酸基-β-哌巴啉、3-甲基-铁屎米-5, 6-二酮、苦木碱 O、4-甲氧基-5-羟基铁屎米酮、4, 5-二甲氧基-铁屎米酮由广州中医药大学新药开发研究中心从苦木 *P. quassioides* 的茎中分离得到,并经理化性质和光谱数据分析鉴定,HPLC 归一法测定纯度在 98% 以上,可供对照用。苦木注射液(批号 20071217, 20080216, 20080616, 20080728, 20080821, 20080823, 20080919, 20081008, 20081127, 20081225, 20090105)由江西青峰药业有限公司提供。甲醇(Merck 公司)为色谱纯,水为重蒸水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 苦木注射液 HPLC 指纹图谱

2.1.1 对照品溶液的制备 取 1-甲酸-7-羟基-β-哌巴啉、1-甲酸-β-哌巴啉、1-丙酸基-β-哌巴啉、3-甲基-铁屎米-5, 6-二酮、苦木碱 O、4-甲氧基-5-羟基铁屎米酮、4, 5-二甲氧基-铁屎米酮对照品适量,精密称定,加甲醇分别制成每 1 mL 含 1-甲酸-7-羟基-β-哌巴啉 0.10 mg, 1-甲酸-β-哌巴啉 0.51 mg, 1-丙酸基-β-哌巴啉 0.076 mg, 3-甲基-铁屎米-5, 6-二酮 0.038 mg, 苦木碱 O 0.024 mg, 4-甲氧基-5-羟基铁屎米酮 0.04 mg, 4, 5-二甲氧基-铁屎米酮 0.01 mg 的对照品储备溶液。精密吸取上述 7 个成分的对照品

[稿件编号] 20110123004

[通信作者] * 苏子仁, Tel: (020) 39358517, Fax: (020) 39358390,

E-mail: suziren@gzhtcm.edu.cn



储备溶液各 1.0 mL,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 取适量苦木注射液,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

2.1.3 色谱条件 Phenomenex Gemini C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm); 流动相 30 mmol \cdot L⁻¹ 乙酸铵 (冰乙酸调 pH 4.5) 溶液 (A)-甲醇 (B) 梯度洗脱, 0~6 min, 5%~6% B; 6~9 min; 6%~20% B, 9~30 min, 20%~23% B; 30~40 min, 23%~30% B; 40~50 min, 30%~36% B; 50~75 min, 36%~65% B; 75~80 min, 65%~5% B; 80~85 min, 5% B。流速 1 mL \cdot min⁻¹; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 10 μL 。

2.1.4 检测波长的选择 通过苦木注射液全波长扫描图,各组分最大吸收波长主要集中在 254 nm 附近,故选择 254 nm 为检测波长。

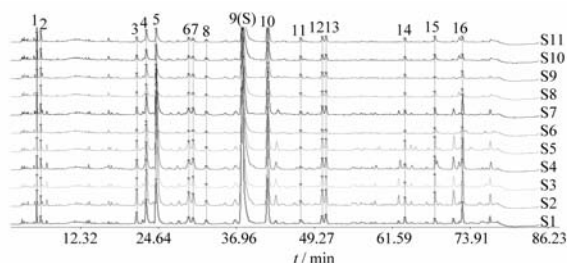
2.1.5 精密度试验 取同一份供试品溶液 (批号 20080821),连续进样 6 次,记录指纹图谱,以 1-甲酸- β -咔巴啉色谱峰为参照峰,各共有峰相对保留时间的 RSD 小于 0.14%,相对峰面积的 RSD 小于 2.2%,表明本方法精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取供试品溶液 (批号 20080821),分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 6 个时间点进行检测,记录指纹图谱,以 1-甲酸- β -咔巴啉色谱峰为参照峰,各共有峰相对保留时间的 RSD 小于 1.2%,相对峰面积的 RSD 小于 2.1%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.7 重复性试验 分别取苦木注射液 (批号 20080821) 共 6 份,按照供试品溶液的制备和检测方法进行检测,记录指纹图谱,以 1-甲酸- β -咔巴啉色谱峰为参照峰,各共有峰面积相对保留时间的 RSD 小于 0.26%,相对峰面积的 RSD 小于 2.0%,表明本方法重复性良好。

2.1.8 参照峰及特征峰的选择与确认 取 11 批苦木注射液,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,各取 10 μL ,按 2.1.3 项下条件进行测定,记录色谱图。把 11 批苦木注射液指纹图谱导入药典委员会推荐的中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版 (2004 年版) 软件,对保留时间 0~80 min 的色谱峰进行分析,选择稳定性和重复性好、吸收强、特征明显的色谱峰为共有峰,标定 16 个共有峰 (图 1),其共有峰面积占总峰面积的 90%,符合共有峰的要求。由样品指纹图谱可见 9 号峰居中且峰面积相对大,并且

色谱峰稳定,重现性好,因此选择该峰为制定指纹图谱的参照峰,经与混合对照品溶液对照测定,9 号峰为 1-甲酸- β -咔巴啉 (S),4 号峰为 1-甲酸-7-羟基- β -咔巴啉,10 号峰为 1-丙酸基- β -咔巴啉,12 号峰为 3-甲基-铁屎米-5, 6-二酮,13 号峰为苦木碱 O,15 号峰为 4-甲氧基-5-羟基铁屎米酮,16 号峰为 4, 5-二甲氧基-铁屎米酮,17 号峰为 4, 5-二甲氧基-铁屎米酮 (图 2)。



4. 1-甲酸-7-羟基- β -咔巴啉; 9(S). 1-甲酸- β -咔巴啉; 10. 1-丙酸基- β -咔巴啉; 12. 3-甲基-铁屎米-5, 6-二酮; 13. 苦木碱 O; 16. 4-甲氧基-5-羟基铁屎米酮; 17. 4, 5-二甲氧基-铁屎米酮。

图 1 11 批苦木注射液样品的 HPLC 指纹图谱

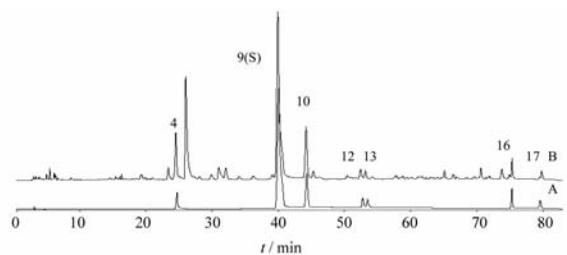


图 2 混合对照品 (A)、苦木注射液样品 (B) 的 HPLC 图

2.1.9 对照指纹图谱的建立和相似度计算 采用国家药典委员会推荐的中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版 (2004 年版),将 11 批苦木注射液数据导入该软件,对选定的 16 个特征峰进行多点校正,自动匹配,生成苦木注射液对照指纹图谱 (图 3)。经各批苦木注射液与对照指纹图谱比较,计算各批苦木注射液的相似度,结果 11 批样品相似度均大于 0.970,平均为 0.984, RSD 0.87%。

2.2 苦木注射液中 3 种咔巴啉类生物碱的含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 取 1-甲酸-7-羟基- β -咔巴啉、1-甲酸- β -咔巴啉、1-丙酸基- β -咔巴啉对照品适量,精密称定,加甲醇分别制成每 1 mL 含 1-甲酸-7-

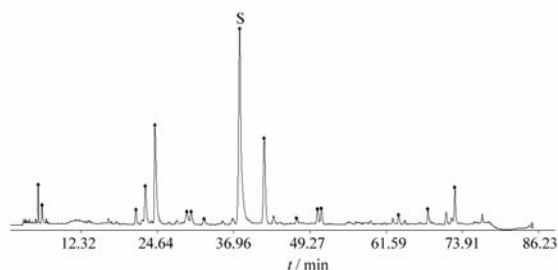
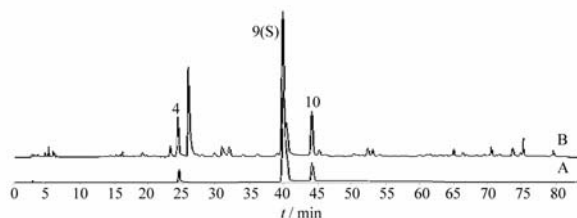


图3 苦木注射液的对照指纹图谱



4. 1-甲酸-7-羟基-β-咔巴啉; 9(S). 1-甲酸-β-咔巴啉;
10. 1-丙酸基-β-咔巴啉。

图4 对照品(A)、苦木注射液样品(B)的HPLC图

羟基-β-咔巴啉 0.10 mg, 1-甲酸-β-咔巴啉 0.51 mg, 1-丙酸基-β-咔巴啉 0.076 mg 的对照品储备溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备和色谱条件 供试品溶液的制备同 2.1.2 项下的方法制备, 色谱条件同 2.1.3 项下的色谱条件。

2.2.3 检测波长的选择 通过苦木注射液全波长扫描, 分别选择 1-甲酸-7-羟基-β-咔巴啉、1-甲酸-β-咔巴啉、1-丙酸基-β-咔巴啉的最大吸收波长 271, 260, 245 nm 为检测波长。

2.2.4 系统适用性试验 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液各 10 μL, 按 2.2.2 项进样测定, 结果 1-甲酸-7-羟基-β-咔巴啉、1-甲酸-β-咔巴啉、1-丙酸基-β-咔巴啉均能达到基线分离, 分离度在 1.5 以上, 样品中其他成分对测定无干扰(图 4)。

2.2.5 检测限和定量限 在选定的色谱条件下, 当信噪比为 3 时, 测得 1-甲酸-7-羟基-β-咔巴啉、1-甲酸-β-咔巴啉、1-丙酸基-β-咔巴啉的检测限分别为 2.1, 3.5, 1.8 ng; 当信噪比为 10 时, 测得 3 个成分的定量限分别为 7.2, 12.0, 6.1 ng。

2.2.6 线性关系考察 精密吸取 1-甲酸-7-羟基-β-咔巴啉、1-甲酸-β-咔巴啉、1-丙酸基-β-咔巴啉对照品储备溶液各 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得 6 个浓度系列的混合对照品溶液。在上述色谱条件下, 分别进样 10 μL 进行测定。以峰面积 Y 为纵坐标, 进样量 X (μg) 为横坐标, 绘制标准曲线(表 1)。

表1 标准曲线方程及线性关系

化合物	回归方程	r	线性范围/μg	检测限/ng	定量限/ng
1-甲酸-7-羟基-β-咔巴啉	$Y = 2.408 \times 10^6 X + 4.204 \times 10^3$	0.999 9	0.020 0 ~ 0.300 0	2.1	7.2
1-甲酸-β-咔巴啉	$Y = 4.829 \times 10^6 X - 5.514 \times 10^5$	0.999 9	0.102 0 ~ 1.530 0	3.5	12.0
1-丙酸基-β-咔巴啉	$Y = 8.602 \times 10^6 X - 8.230 \times 10^3$	0.999 9	0.015 2 ~ 0.228 0	1.8	6.1

2.2.7 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 记录色谱图, 计算峰面积。1-甲酸-7-羟基-β-咔巴啉、1-甲酸-β-咔巴啉、1-丙酸基-β-咔巴啉的 RSD 均为 0.20%, 表明精密度良好。

2.2.8 稳定性试验 取供试品溶液(样品批号 20080821) 1 份, 于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 分别进样测定, 记录峰面积。1-甲酸-7-羟基-β-咔巴啉、1-甲酸-β-咔巴啉、1-丙酸基-β-咔巴啉的 RSD 分别为 0.60%, 1.1%, 0.30%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.9 重复性试验 取同一批号样品(样品批号 20080821) 6 份, 分别按 2.2.2 项下方法制成供试品溶液, 进样测定。1-甲酸-7-羟基-β-咔巴啉、1-甲酸-β-咔

巴啉、1-丙酸基-β-咔巴啉的平均质量分数分别为 25.34, 64.55, 9.46 mg · L⁻¹; RSD 分别为 0.50%, 0.70%, 0.40%。表明本方法的重复性良好。

2.2.10 加样回收率试验 量取已测含量的苦木注射液(样品批号 20080821) 2.5 mL 共 6 份, 分别置 5 mL 量瓶中, 准确加入与样品中含量等量的对照品溶液, 加甲醇定容至刻度。按 2.2.2 项下方法平行制备溶液, 依法测定, 记录色谱图, 计算回收率。1-甲酸-7-羟基-β-咔巴啉、1-甲酸-β-咔巴啉、1-丙酸基-β-咔巴啉的平均回收率分别为 99.5%, 102%, 99.6%; RSD 分别为 0.50%, 0.70%, 1.1%。结果表明本方法符合分析化学要求。



2.2.11 样品测定 取不同批号苦木注射液,分别按**2.2.2**项下方法制成供试品溶液,精密吸取各供试品溶液按上述色谱条件进样测定峰面积,计算含量(表3)。

表3 不同批号的苦木注射液中3个成分的质量浓度

批号	质量浓度		
	mg · L ⁻¹		
	1-甲酸-7-羟基-β-咔巴啉	1-甲酸-β-咔巴啉	1-丙酸基-β-咔巴啉
20071217	20.03	67.63	7.30
20080216	28.76	95.6	11.32
20080616	19.12	64.63	11.04
20080728	24.43	66.73	9.29
20080821	25.34	64.55	9.46
20080823	6.59	27.32	4.45
20080919	19.68	49.49	9.08
20081008	11.95	35.07	6.53
20081127	11.96	35.90	4.85
20081225	10.03	37.69	5.94
20090105	11.77	36.00	4.87

3 讨论

由于生物碱类成分是苦木注射液的主要有效部位,主要考察了流动相A:甲醇-乙酸铵溶液系统,梯度洗脱;B:甲醇-磷酸盐缓冲溶液系统,梯度洗脱;C:甲醇-十二烷基苯磺酸钠水溶液系统,梯度洗脱;D:甲醇-氨水系统,梯度洗脱。结果发现以A系统分离度、峰形及理论塔板数较好,故选择其为流动相。为了尽可能的反映苦木注射液的“全部成分”,作者对A系统条件进行优化。考察了流动相不同pH的影响,不同乙酸铵浓度的影响,最终选择了pH 4.5,乙酸铵浓度

30 mmol · L⁻¹。

本研究以梯度洗脱模式在85 min内获得苦木注射液指纹图谱,各色谱峰大部分都得到了基线分离。标定了16个共有峰,其共有峰面积占总峰面积90%以上,很好的表达了苦木注射液的指纹特征,并且确认了其中的7个共有峰:1-甲酸-7-羟基-β-咔巴啉、1-甲酸-β-咔巴啉、1-丙酸基-β-咔巴啉、3-甲基-铁尿米-5,6-二酮、苦木碱O、4-甲氧基-5-羟基铁尿米酮、1个4,5-二甲氧基-铁尿米酮。

同一厂家的11批产品测定结果表明,3种咔巴啉类生物碱的含量波动相对较大,提示加强质量指标的建立,有利苦木注射液的质量稳定。产品的质量与原料和生产工艺密切相关,提示要提高产品质量,不但要控制原料的含量,而且要优化生产工艺。

本实验采用HPLC所建立的苦木注射液指纹图谱可以在一个色谱条件下,同时实现整体定性、多指标成分定量的作用,为苦木注射液的质量控制及稳定性评价提供了新的方法模式。

[参考文献]

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会: 中华人民共和国卫生部药典标准[S]. 1998, 20: 184
- [2] Kazuo K, Taichi O. β-carboline alkaloids from *Picrasma quassioides* (D. Dom) Benn [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29(9): 3060.
- [3] W H, Gao H, Li C Y, et al. β-Carboline alkaloids from the stems of *Picrasma quassioides* [J]. *Magn Reson Chem*, 2010, 48(10): 490.
- [4] 陈猛, 范华英, 戴胜军, 等. 苦木生物碱的化学研究 [J]. *中草药*, 2007, 38(6): 807.
- [5] 谷华, 王梅, 王志阳. 苦木的现代药理与临床应用 [J]. *中医研究*, 2001, 14(5): 55.



Fingerprint research and multi-component quantitative analysis of Kumu injection by HPLC

LAI Zhengquan¹, YI Yuyang¹, LIAO Huijun¹, SU Jiyan¹, LIAO Zhuyuan², LIN Ji¹, SU Ziren^{1*}

(1. New Drug R&D Department¹ Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Jiangxi Qingfeng Pharmaceutical Co., Ltd., Ganzhou 341000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the HPLC chromatographic fingerprint of Kumu injection and to simultaneously determine the contents of three β -carboline alkaloids, comprehensively evaluating the immanent quality of Kumu injection. **Method:** The chromatographic analysis was performed on a Phenomenex Gemini C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m) column with the gradient elution solvent system composed of methanol and 30 mmol · L⁻¹ aqueous ammonium acetate (adjusted with glacial acetic acid to pH 4.5). Similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine (2004 A) was used in data analysis. **Result:** Sixteen co-possessing peaks were selected as the fingerprints of Kumu injection, and 7 peaks were identified by chemical reference substances. There were good similarities between the standard fingerprint chromatogram and each fingerprint chromatogram from the eleven samples for their similarity coefficients were not less than 0.9. Three kinds of β -carboline alkaloids were separated well. The correlation coefficients were 0.9999. The linear ranges of three components were 0.020 0-0.300 0, 0.102 0-1.530 0, 0.015 2-0.228 0 μ g, respectively, and the average recoveries ranged were from 99.5% to 102%. **Conclusion:** The method of fingerprint combined with quantitative analysis is sensitive, selective, and provide scientific basis for quality control of Kumu Injection.

[Key words] Kumu injection; fingerprint; RP-HPLC; assay

doi:10.4268/cjcm20111311

[责任编辑 马超一]

书 讯

科学出版社于2011年3月出版了由中国药品生物制品检定所林瑞超教授主编的《中国药材标准名录》。作者在国家食品药品监督管理局的大力支持和全国各省、自治区、直辖市药检所的积极配合下,从2004年开始,收集整理历版药典、部颁标准、地方标准等大量资料,历时6年,进行了细致归纳整理,编写了这本权威、实用的中药材标准检索专业工具书。该书共收录了4700余种药材,涉及530个科,内容涵盖药材名、科名、拉丁科名、类别(动物、植物或矿物)原动植物中文名、原动植物拉丁学名、药用部位及出处等。编写简明,内容实用,是企业、医院中医药科技工作者必备的、权威的药材标准检索专业工具书。当当网、卓越网、新华书店及医学专业店有售。定价298元。电话:010-64034601,64019031;地址:北京市东黄城根北街16号科学出版社(100717);联系人:温晓萍;请在汇款附言注明所购图书的书名、册数、联系电话、是否要发票等。