

艾迪注射液高效液相色谱指纹图谱研究*

徐晓卫¹, 陈心舒²

(1. 温州医学院附属第一医院药剂科, 325000; 2. 温州医学院药学院, 325035)

摘要 目的 建立艾迪注射液高效液相色谱指纹图谱质量控制方法。方法 色谱柱为 Agilent 1200 2-2-56 C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为水-乙腈 (梯度洗脱), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 203 nm, 柱温 40 ℃。结果 相同色谱条件下艾迪注射液各色谱峰分离较好, 标注了制剂中的 6 个共有指纹峰, 并得到以人参皂苷 Rg1 为内标的相对保留时间及峰面积比值, 10 批样品相似度>0.9, 达到指纹图谱技术要求。结论 该方法简单、可靠, 可用于艾迪注射液的质量控制。

关键词 艾迪注射液; 指纹图谱; 色谱法; 高效液相

中图分类号 R386; R927.1 文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2012)05-0666-03

为全面地考察艾迪注射液的质量, 保证临床用药安全有效, 笔者根据《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》, 采用高效液相色谱(HPLC)法对该制剂的指纹图谱进行研究, 建立艾迪注射液 HPLC 指纹图谱检测标准。通过探究色谱柱、检测波长、流动相等实验条件, 分离共有指纹峰, 建立指纹图谱共有模式, 对 10 批制剂指纹图谱进行相似度评价, 比较理论保留时间与实际保留时间的差别, 判断艾迪注射液质量的准确性, 以期对该制剂的质量提供有效的控制方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 1200 型高效液相色谱仪系列(包括四元泵、真空脱气泵、自动进样器、柱温箱、可变波长检测器、数据处理器, 美国 Agilent 公司), AL204 型电子天平(梅特勒-托利仪器有限公司, 上海), TGL-16B 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 试剂 人参皂苷 Rg1 对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110703-200726, 供含量测定用), 艾迪注射液(贵州益佰制药有限公司, 批号: 20091019, 20091125, 20100521, 20100718, 20101021, 1004252, 1001012s, 1002002, 20101102, 20101101), 乙腈为色谱纯, 乙醇、甲醇等均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 取人参皂苷 Rg1 对照品, 精密称定, 以甲醇溶液溶解, 并稀释制成 50 μg·mL⁻¹ 的人参皂苷 Rg1 对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 精密量取艾迪注射液 20 mL, 置分液漏斗, 加乙醚 10 mL 洗涤, 弃去乙醚, 水

层用水饱和和正丁醇萃取 5 次, 每次 10 mL, 合并正丁醇液, 水浴蒸干, 残渣加甲醇溶解并转移至 10 mL 量瓶, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min (离心半径 10 cm), 0.45 μm 针式过滤器过滤, 取上清液, 即得。

2.3 流动相的选择 色谱柱: Agilent 1200 2-2-56 C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相^[1]: 水(A)-乙腈(B), 二元梯度洗脱(A: 0~30 min, 83%→81%; 30~35 min, 81%; 35~55 min, 81%→65%; 55~70 min, 65%→0%; 70~75 min, 0→83%)。

2.4 其他色谱条件优化 比较检测波长为 203, 254, 284 nm (采用二级管阵列检测器), 柱温为 25, 40 ℃, 流速 1.0, 1.2 mL·min⁻¹ 条件下色谱峰的形状、大小和分离情况^[2]。结果检测波长 203 nm、柱温 40 ℃、流速 1.0 mL·min⁻¹ 时色谱条件下色谱峰数目适中, 各色谱峰之间分离度良好, 稳定性较好。

2.5 检测方法 取阴性对照品、对照品溶液、艾迪注射液供试品溶液, 按“2.3”“2.4”项方法筛选的色谱条件, 各进样 10 μL 分析。结果表明, 供试品溶液中保留时间为 45.160 min 的色谱峰(图 1)与对照品溶液人参皂苷 Rg1 的色谱峰一致, 且分离度良好、稳定^[3], 故选定此峰为艾迪注射液指纹图谱的参比峰(s)。

2.6 精密度实验 取同一供试品溶液, 连续进样 5 次, 检测其指纹图谱。各色谱峰的相对保留时间稳定, 各主要色谱峰的相对峰面积比值基本一致, 各峰保留时间比值的 RSD 为 0.29%~0.68%, 峰面积比值 RSD 为 0.68%~2.60%, 符合指纹图谱的技术要求^[4]。

2.7 稳定性实验 取同一供试品溶液, 分别于 0, 3, 6, 12, 24 h 检测指纹图谱。结果显示, 样品在 24 h 内各色谱峰保留时间比值 RSD 为 0.35%~1.40%, 峰面积比值 RSD 为 0.98%~2.90%, 符合指纹图谱技术要求。

2.8 重复性实验 取同一批艾迪注射液 5 份, 按照供

收稿日期 2011-06-12 修回日期 2011-08-27

基金项目 * 温州市 2011 年第二期科技计划项目 (Y20110200)

作者简介 徐晓卫 (1975-), 男, 浙江温州人, 主管药师, 主要从事医院药学工作。电话: 0577-88069551, E-mail: xxw@wzhospital.cn。

试品溶液制备方法,在上述色谱条件下,记录 HPLC 色谱图。结果表明,各峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 均 <3%,重复性良好。

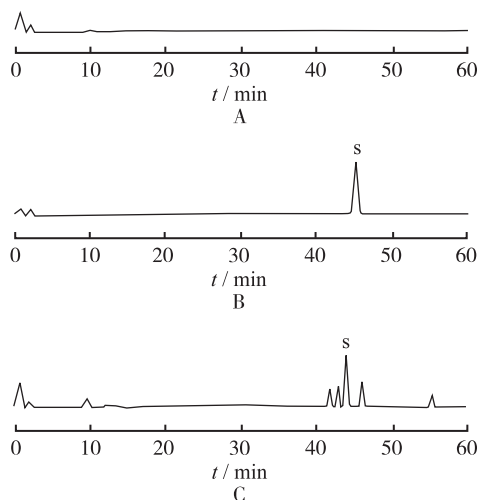


图 1 3 种溶液的 HPLC 色谱图

A. 阴性对照品;B. 对照品;C. 样品; s. 人参皂苷 Rg1

2.9 标准曲线的绘制 基于对照品色谱的稳定性、精密密度、重复性和保留时间变化^[5-6],以峰面积(A)与对照品浓度(C)作线性回归,制得人参皂苷 Rg1 的线性方程分别为 $A=88.961 2C+5.670 68$ ($r=0.999 4$),浓度范围为 $10.00 \sim 200.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.10 加样回收实验 精密量取已知含量 ($23.56 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 样品(批号:20101021) 20 mL,共 6 份,分别向上述样品溶液中加入人参皂苷 Rg1 标准品 2,4,6 mL,按“2.2”项方法处理,每个样品重复进样 3 次,每次 10 μL ,按上述色谱条件测定,计算加样回收率(表 1)。结果显示,人参皂苷 Rg1 平均回收率 99.66% ($\text{RSD}=1.04\%$)。表明该方法回收率良好,可以满足实验要求^[9]。

表 1 艾迪注射液样品中人参皂苷 Rg1 的回收率实验结果

原有量	加入量	测得量	回收率/ %
	mg		
0.471 2	0.100 0	0.568 5	97.30
0.471 2	0.100 0	0.573 6	102.40
0.471 2	0.200 0	0.669 2	99.00
0.471 2	0.200 0	0.672 8	100.80
0.471 2	0.300 0	0.769 8	99.53
0.471 2	0.300 0	0.767 9	98.90

2.11 艾迪注射液 HPLC 指纹图谱及技术参数

2.11.1 艾迪注射液 HPLC 指纹图谱及共有峰的标定

按照对照品和供试品溶液制备和检测方法,制备样品溶液,并对人参皂苷 Rg1 对照品和 10 批艾迪注射液样品的 HPLC 图谱进行检测。结果表明 10 批样品图谱相似,说明其成分基本相同。从其指纹图谱中可以发现,其中 6 个色谱峰是艾迪注射液共有峰,其他峰为非共有峰,非共有峰面积总和小于总峰面积 5%。

2.11.2 艾迪注射液 HPLC 指纹图谱相似度的测定

以人参皂苷 Rg1 色谱峰为参照峰,将其保留时间和峰面积设为 1,计算 10 批艾迪注射液指纹图谱 6 个共有峰的相对保留时间(表 2)与相对峰面积(表 3)比值^[7]。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A 版)》软件 J,以 10 批制剂平均数生成的共有模式指纹图谱为对照,各批制剂指纹图谱与其所得的共有模式图谱相似度为 0.9 以上,符合《中药注射剂指纹图谱实验技术指南(试行)》的要求(0.9~1.0)。结果表明,各批样品与标准有较好的相似性,表明生产工艺稳定。

表 2 艾迪注射液共有峰与 s 号峰相比的相对保留时间

批号	a	b	c	d	e	f
20091019	0.931	0.974	1.000	1.098	1.437	1.684
20091125	0.921	0.972	1.000	1.096	1.434	1.678
20100521	0.927	0.971	1.000	1.095	1.433	1.677
20100718	0.925	0.970	1.000	1.095	1.433	1.678
20101021	0.924	0.966	1.000	1.093	1.433	1.678
1004252	0.924	0.965	1.000	1.093	1.431	1.675
1001012s	0.921	0.961	1.000	1.089	1.431	1.675
1002002	0.923	0.965	1.000	1.090	1.432	1.677
20101102	0.926	0.972	1.000	1.096	1.434	1.678
20101101	0.919	0.966	1.000	1.090	1.432	1.677
RSD/%	0.35	0.43	0.04	0.28	0.12	0.15

2.11.3 艾迪注射液 HPLC 指纹图谱技术参数 共有峰的峰序(相对保留时间)为 a 0.924, b 0.968, c 1.000, d 1.093, e 1.433, f 1.677。

2.12 含量测定 取 10 批艾迪注射液各 20 mL,按“2.2”项方法处理,按上述色谱条件测定,采用外标法计算含量。结果见表 4。不同批号艾迪注射液中人参皂苷 Rg1 平均含量 $23.52 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\text{RSD}=1.21\%$ 。

3 讨论

笔者在本实验中采用 HPLC 法,采用二元梯度洗脱,以水-乙腈为流动相,得到良好的分离度、峰形和较高的灵敏度。其精密密度、稳定性、重复性均良好,符合指纹图谱计算要求。方法简单、快速、准确,所得图谱能较全面地反映各批艾迪注射液成分的分布特征。该方法可以作为艾迪注射液质量控制的指纹图谱标准。

表 3 艾迪注射液共有峰与 s 号峰相比的相对峰面积

批号	a	b	c	d	e	f
20091019	0.340 48	0.370 60	0.996 45	0.775 30	0.287 23	0.595 26
20091125	0.340 69	0.371 50	0.998 49	0.778 92	0.288 05	0.595 93
20100521	0.340 81	0.370 89	0.999 22	0.777 11	0.287 64	0.596 02
20100718	0.340 73	0.370 80	0.999 35	0.777 14	0.287 64	0.596 34
20101021	0.341 09	0.371 29	1.001 27	0.778 93	0.288 15	0.597 40
1004252	0.341 34	0.371 50	1.000 00	0.776 95	0.289 72	0.597 79
1001012s	0.342 77	0.371 29	1.003 30	0.778 48	0.288 25	0.597 83
1002002	0.340 28	0.368 48	0.997 26	0.775 08	0.288 25	0.598 17
20101102	0.340 69	0.370 66	0.998 25	0.776 71	0.287 31	0.595 67
20101101	0.340 74	0.372 92	1.002 57	0.778 70	0.287 63	0.597 34
RSD/%	0.21	0.30	0.22	0.18	0.25	0.18

表 4 10 批样品中人参皂苷 Rg1 含量测定结果

批号	含量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	批号	含量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
20091019	23.48	1004252	23.16
20091125	22.99	1001012s	23.65
20100521	23.57	1002002	24.01
20100718	23.72	20101102	23.45
20101021	23.59	20101101	23.58

笔者建立了艾迪注射液 HPLC 指纹图谱, 选用人参皂苷 Rg1 为内参照峰, 确定 6 个共有指纹峰, 各共有峰的相对保留时间和峰面积均稳定。艾迪注射液 HPLC 指纹图谱相似度均在 0.90 ~ 1.00 之间, 表明不同批号样品间具有很高的相似度, 为艾迪注射液的质量控制提供了有效依据^[8], 与文献报道一致。

参考文献

[1] 孔维月, 林能明, 方罗. RP - HPLC 法测定艾迪注射液中人参皂苷 Rg1 的含量[J]. 中国药房, 2009, 27(20): 2131-2132.

[2] XU Y P, YAO T W. Study and application of fingerprints of ginkgobiloba leaves preparations[J]. Chin Pharm Sci, 2005, 14(1): 43-50.

[3] 赵丽, 钟巧妮, 雷玉霞, 等. 柴胡总苷高效液相色谱指纹图谱与主成分含量测定[J]. 医药导报, 2008, 27(3): 323-325.

[4] 唐宝莲, 辛绍棋, 蔡宝昌, 等. 太子参 HPLC 指纹图谱的初步研究[J]. 南京中医药大学学报, 2005, 5(21): 171-172.

[5] 高阳. 艾迪注射液色谱指纹图谱的研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2004.

[6] 夏泉, 李绍平, 黄赵刚, 等. 三七总皂苷注射液 HPLC 指纹图谱的比较分析[J]. 中成药, 2004, 26(5): 345-348.

[7] 浦锦宝, 梁卫青, 郑军献, 等. HPLC-ELSD 测定柴胡总皂苷中柴胡皂苷 a、d 的含量[J]. 中国中医药科技, 2010, 17(9): 430-431.

[8] ZHANG T T, ZHOU J S, WANG Q. HPLC analysis of flavonoids from the aerial parts of *Bupleurum Species* [J]. Chin J Natur Med, 2010, 8(2): 107-0113.

DOI 10.3870/yydb.2012.05.043

吡罗昔康肠溶片含量及其均匀度测定

林君, 王琼芬, 陈才军

(浙江省舟山市食品药品检验所, 定海 316000)

摘要 目的 建立测定吡罗昔康肠溶片含量及含量均匀度的高效液相色谱法。方法 色谱柱: Diamonsil C₁₈(2) 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈-0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液 (磷酸调 pH 至 3.0) (40:60), 检测波长: 243 nm, 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量: 20 μL 。结果 吡罗昔康在 20~200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好 ($r = 0.9999$), 平均回收率 99.59%, RSD 为 1.24% ($n = 9$)。结论 该方法专属性强, 重复性好, 结果准确可靠, 可用于吡罗昔康肠溶片含量及含量均匀度测定。

关键词 吡罗昔康; 色谱法; 高效液相; 含量测定; 含量均匀度

中图分类号 R971.1; R927.1

文献表示码 A

文章编号 1004-0781(2012)05-0668-03