·研究报告·

肾康注射液指纹图谱的研究

孙小萌[1],笔雪艳[2],曲范娜[2],张清波[3],杨会兵[4],张 雪[4],周 楠[1](1. 黑龙江中医药大学药学院,黑龙江 哈尔滨 150040;2. 黑龙江省食品药品检验检测所,黑龙江 哈尔滨 150088;3. 黑龙江省食品药品监督管理局,黑龙江 哈尔滨 150001;4. 西安世纪盛康药业有限公司,陕西 西安 710300)

[摘要] **目的** 建立肾康注射液的超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱,并对肾康注射液指纹图谱共有峰进行鉴定。**方法** 采用超高效液相色谱条件法,色谱柱 ACQUITY UPLC® CSH-C_{18}(2.1mm×100mm,1.7μm),甲醇(A)-0.1%甲酸溶液(B)二元梯度洗脱,流速 0.4 ml/min,检测波长 280 nm,进样量 2 μl,柱温 30 ℃,使用飞行时间质谱仪,负离子模式扫描。**结果** 建立了肾康注射液 UPLC 指纹图谱,采用 UPLC/ESI-Q-TOF MS 技术共鉴定了 26 个共有峰。采用《中药指纹图谱相似度评价系统(2012.130723 版)》评价了 20 批肾康注射液,指纹图谱相似度均大于 0.90。**结论** 本方法所建立的肾康注射液指纹图谱灵敏度高,稳定可靠,为肾康注射液的质量控制提供了科学依据。

[关键词] 肾康注射液;指纹图谱;液相色谱-质谱联用技术
[中图分类号] R983 [文献标志码] A [文章编号] 1006-0111(2019)06-0543-06
[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.06.014

Studies on fingerprint of Shenkang injection

SUN Xiaomeng[1], BI Xueyan[2], QU Fanna[2], ZHANG Qingbo[3], YANG Huibing[4], ZHANG Xue[4], ZHOU Nan[1] (1. Collage of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Haerbin 150040, China; 2. Heilongjiang Institute for Food and Drug Control, Haerbin 150088, China; Heilongjiang Food and Drug Administration, Haerbin 150001, China; 4. Xi'an Shi Ji Sheng Kang Pharmaceutical Industry Co., Ltd, Xi'an 710300, China)

[**Abstract**] **Objective** To establish an ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) fingerprint of Shenkang injection and identify the common peaks of Shenkang injection fingerprint. **Methods** The UPLC method was established by employing ACQUITY UPLC® CSH-C18 column(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) with methanol(A) -0.1% formic acid(B) aqueous solution as mobile phase in gradient elution. The detection wavelength was 280 nm. The flow rate was 0.4ml/min. The injection volume was 2 μl and the column temperature was 30 ℃. Time of flight mass spectrometer was used with negative ion mode scanning. **Results** The UPLC chromatographic fingerprint of Shenkang injection was established. 26 common peaks of shenkang injection were identified by UPLC/ESI-Q-TOF MS. The similarity of 20 batches of shenkang injection was over 0.90, which was evaluated by similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of TCM(Version 2012.130723). **Conclusion** This method is highly sensitive, stable and reliable, and can be used for the quality control of shenkang injection.

[**Key words**] Shenkang injection; fingerprint; UPLC/ESI-Q-TOF MS

肾康注射液由大黄、丹参、黄芪和红花四味药材组成,是由西安世纪盛康药业有限公司生产。具有益气活血,降逆泄浊,通腑利湿的功效[1-2]。临床上主要用于治疗慢性肾衰竭,肺部感染,慢性阻塞性肺疾病急性加重,心力衰竭,恶性肿瘤,糖尿病,高尿酸血症等[3-4]。原标准执行国家食品药品监督管理局标准(试行)YBZ08522004,采用高效液相色谱方法,对四味药材分别建立了指纹图谱;但该标准检测耗时长,不便于日常大批量肾康注射液的质量检测,同时亦消耗较多的有机试剂,不利于节能环保。之后企业在进一步的修订过程中,虽然将四味药材合成一张指纹图谱,但依然采用了高效液相色谱法,所获得的图谱中化学成分信息量较小。而且现有标准未考察不同品牌液相色谱仪及色谱柱等对指纹图谱采集的影响,为该标准的提升及大批量的药品检验工作开展带来不便。基于指纹图谱信息量最大化,多品牌液相仪器均可重现实验结果的考虑,此次研究采用了超高效液相色谱方法,结合质谱定性鉴定了90%以上的色谱峰结构与归属;并采用了3个不同

[作者简介] 孙小萌,硕士研究生,研究方向:中药质量标准,Email:1803938339@qq.com
[通讯作者] 笔雪艳,博士,主作药师,研究方向:中药药效物质基础及中药质量标准,Email:hljbixueyan@sina.com

品牌的超高效液相色谱仪对所建立的指纹图谱进行验证，得到了较为满意的结果。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters超高效液相色谱仪，配有四元梯度泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱、紫外检测器；ACQUITY UPLC® CSH C_{18} 色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.7μm）；Waters Acquity I class UPLC G2-XS Q Tof 四级杆-飞行时间质谱仪；XS205DU 电子天平。

1.2 试剂

甲醇（色谱纯、Dikma 公司）；甲酸（质谱级）；纯化水（实验室自制）。

1.3 对照品

毛蕊异黄酮葡萄糖苷（批号：111920-201304）、原儿茶醛（批号：110810-201007）均购自中国食品药品检定研究院。

1.4 样品

肾康注射液（批号：201211041、201306027、201307011、201312011、201402012、201403023、201404031、201405021、20141104、201505023、201501011、201502013、201503021、201504011、201510021、201507021、201508023、201509041、201510053、201511021），共20批，均由西安世纪盛康药业有限公司生产。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

以 ACQUITY UPLC® CSH C_{18} 色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.7μm），以甲醇（A）和0.1%甲酸（B）为流动相，梯度洗脱（0～3 min，1% A；3～15 min，1% A→4% A；15～55 min，4% A→40% A；55～65 min，40% A→60% A；65～66 min，60% A→90% A；66～69 min，90% A）；流速为0.4 ml/min，检测波长为280 nm，进样量2 μl，柱温30 ℃。

2.2 质谱条件

采用ESI离子源，负离子模式，毛细管电压设定为2.50 V，离子源温度120 ℃，脱溶剂气温度500 ℃，锥孔电压40 V；质谱方法：全信息串联质谱（MSE）；质量数50～1 200 Da；碰撞能量20～40 V。

2.3 对照品与供试品溶液的制备

对照品溶液的制备：精密称取原儿茶醛对照品和毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品适量，分别加甲醇制成浓度均为10 μg/ml的对照品溶液。

供试品溶液的制备：取肾康注射液适量，用0.22 μm的微孔滤膜过滤，即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验

取批号为201403023样品，按照“2.3”项下处理样品，按照“2.1”项下条件进样测定，连续进样5次，考察指纹图谱精密度。将精密度实验色谱图导入《中药指纹图谱相似度评价系统（2012.130723版）》，计算相似度，其平均值为0.965，RSD为0.06%，表明仪器精密度较高。

2.4.2 重复性试验

取同一批号的肾康注射液（批号：201403023），供试品溶液的制备按“2.3”项下处理，平行制备6份供试品溶液，按“2.1”项下条件进样测定，考察指纹图谱的变化情况。将重复性实验色谱图导入《中药指纹图谱相似度评价系统（2012.130723版）》，计算相似度，其平均值0.965，RSD为0.08%，表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验

按照“2.3”项下方法制备肾康注射液（批号：201403023）供试品溶液一份，于常温下保存，按“2.1”项下条件进样测定，分别在0、6、12、20、24 h测定供试品溶液，考察稳定性，将稳定性实验色谱图导入《中药指纹图谱相似度评价系统（2012.130723版）》，计算相似度，其平均值是0.965，RSD值为0.06%，说明肾康注射液供试品溶液在24 h内稳定。

3 结果

3.1 肾康注射液UPLC指纹图谱

取20批不同批次的肾康注射液样品，按照“2.3”项下处理对照品及供试品，按照“2.1”、“2.2”项下条件测定样品的指纹图谱，数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统研究（2012.130723版）》，以所确定的16个共有峰进行校正处理，生成肾康注射液指纹图谱与对照品对比图（图1）、肾康注射液对照指纹图谱（图2）、不同批次的叠加指纹图谱（图3）。

取 20 批不同批次的肾康注射液按上述“2.1”、“2.2”、“2.3”项下测定样品的指纹图谱，将所得的样品指纹图谱与上述所得的对照指纹图谱导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统研究(2012.130723 版)》各自进行全图匹配，16 点校正，计算各批样品指纹图谱与对照指纹图谱的相似度，结果 20 批注射液相似度均大于 0.90，20 批样品相似度的 RSD 为 1.79%。表明不同批次肾康注射液相似度较高，指纹图谱相似性良好说明工艺稳定。

3.2　肾康注射液特征峰指认

质谱采用负离子模式，方法是 MSE，对肾康注射液 UPLC 指纹图谱标示的主要色谱峰进行质谱确认，根据主要成分的色谱行为，结构信息，结合文献[5-8]及对照品，推测了肾康注射液 UPLC 指纹图谱的 26 个主要色谱峰。结果见图 4 和表 1。

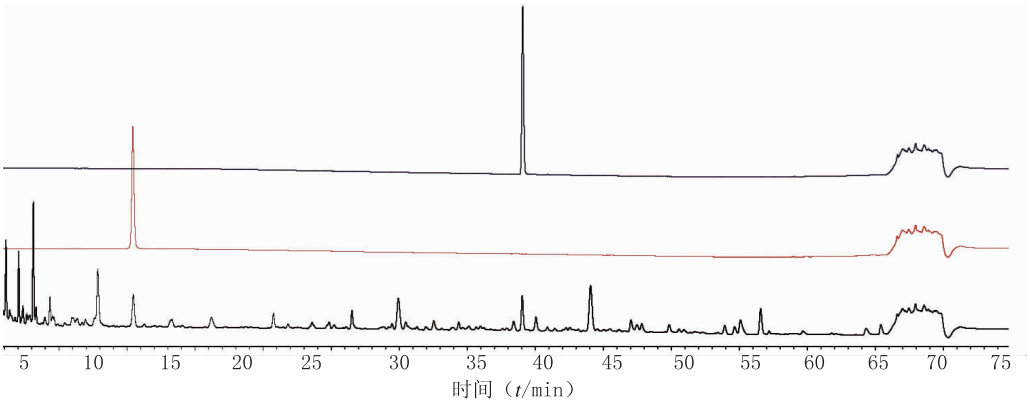

图 1　肾康注射液指纹图谱与对照品色谱图比较

A. 对照品色谱图；B. 对照品色谱图；C. 肾康注射液指纹图谱；1. 原儿茶醛；2. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷

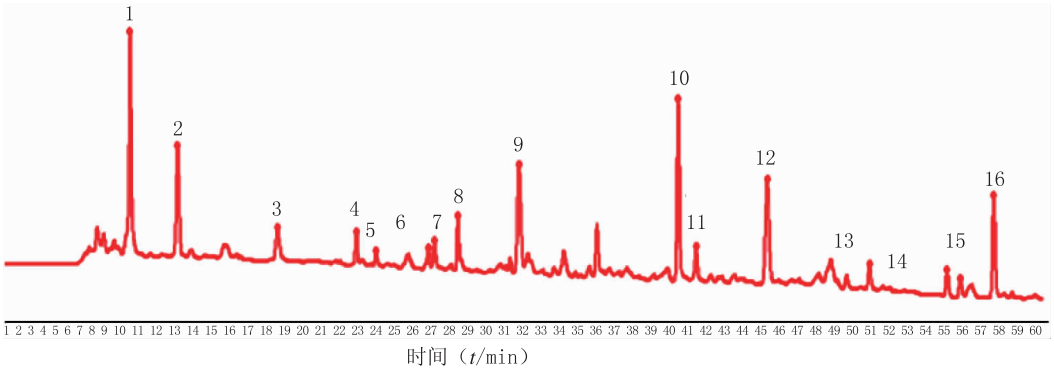

图 2　肾康注射液对照指纹图谱

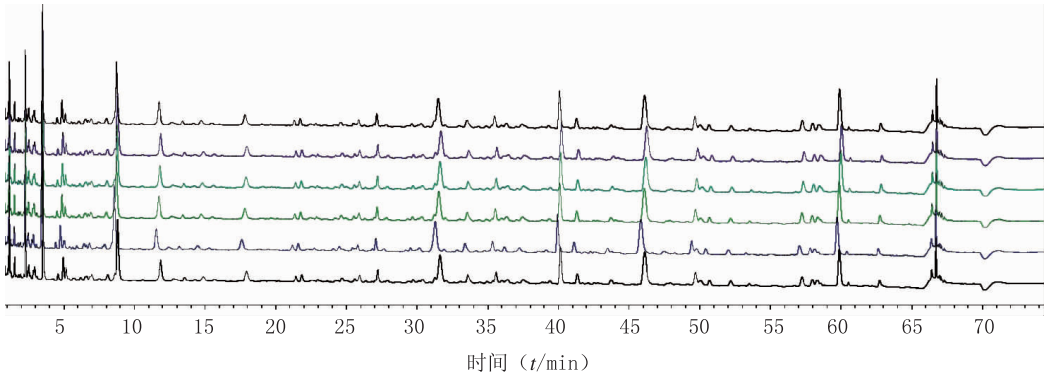

图 3　6 批肾康注射液 UPLC 指纹图谱叠加图

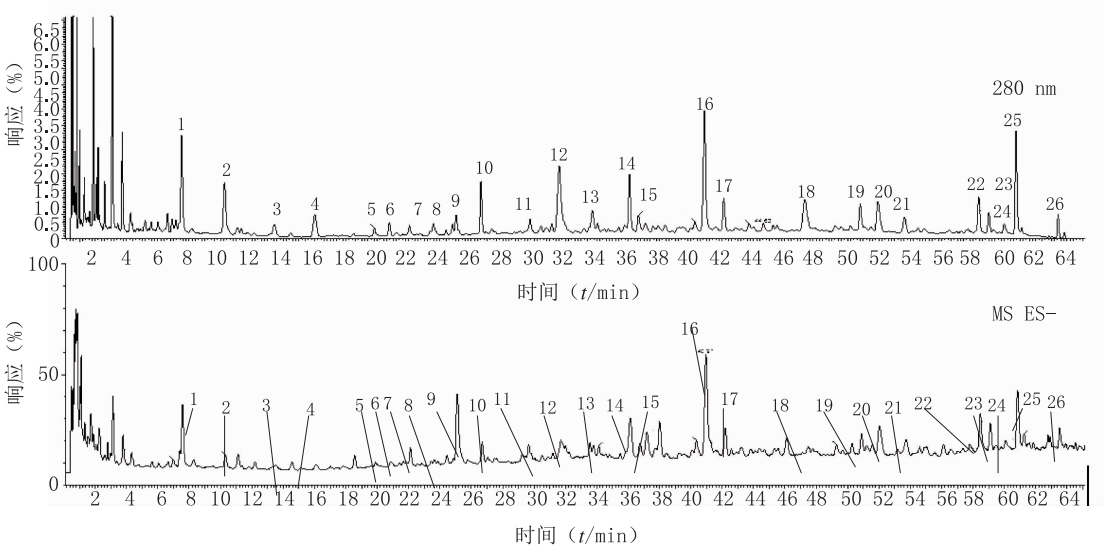

图 4 肾康注射液的质谱图

表 1 肾康注射液中成分的分析

序号	保留时间（min）	质核比[M－H]⁻（m/z）	分子式	化合物名称	归属到药材	归属到中间体 A/B
1	7.51	197.045 8	$C_9H_{10}O_5$	丹参素	丹参	中间体 A
2	10.25	137.024 6	$C_7H_6O_3$	原儿茶醛	丹参	中间体 A
3	13.44	493.118 9	$C_{26}H_{22}O_{10}$	丹酚酸 A	红花	—
4	16.01	593.151 2	$C_{27}H_{30}O_{15}$	红花黄色素 A	—	中间体 B
5	19.82	291.098 2	$C_{14}H_{16}N_2O_5$	黄芪碱 E	大黄	—
6	20.77	611.160 5	$C_{27}H_{32}O_{16}$	羟基红花黄色素 A	大黄	中间体 B
7	22.05	289.071 5	$C_{15}H_{14}O_6$	(－)-表儿茶素	大黄	—
8	23.58	179.034 7	$C_9H_8O_4$	3,4-二羟基桂皮酸	红花	—
9	25.03	476.014 6	$C_{22}H_{22}O_{10}$	大黄素甲醚-没食子酰-葡萄糖苷	大黄;红花	—
10	26.62	461.109 3	$C_{22}H_{22}O_{11}$	山柰素-4′-甲醚-3-葡萄糖苷	大黄;黄芪	—
11	29.75	613.157 4	$C_{30}H_{30}O_{14}$	红花黄 C	大黄	—
12	31.61	609.145 1	$C_{27}H_{30}O_{16}$	芦丁（芸香苷）	大黄	—
13	33.72	461.147 0	$C_{23}H_{26}O_{10}$	9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O-β-D-葡萄糖苷	红花	—
14	36.09	445.115 2	$C_{22}H_{22}O_{10}$	毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷	大黄;丹参	中间体 A、B
15	36.66	477.101 5	$C_{22}H_{22}O_{12}$	异鼠李素-3-葡萄糖苷	大黄	中间体 B
16	40.87	641.207 0	$C_{29}H_{38}O_{16}$	7-羟基-3′,4′-二甲氧基-2′,5′-二葡萄糖异黄烷苷	大黄	中间体 A、B
17	42.10	313.070 5	$C_{17}H_{14}O_6$	8,3′-二羟基-7,4′-二甲氧基异黄酮	—	中间体 A
18	47.27	317.032 2	$C_{15}H_{10}O_8$	杨梅树皮素	—	—
19	50.81	417.082 3	$C_{20}H_{18}O_{10}$	丹酚酸 D	—	中间体 A
20	51.94	625.212 0	$C_{29}H_{38}O_{15}$	3′,4′-二甲氧基-7,2′-二葡萄糖异黄烷苷	—	中间体 A
21	53.63	447.092 8	$C_{21}H_{20}O_{11}$	木犀草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	—	中间体 A
22	58.37	491.097 6	$C_{26}H_{20}O_{10}$	丹酚酸 C	—	中间体 A
23	59.01	717.145 3	$C_{36}H_{30}O_{16}$	紫草酸 B	—	中间体 A
24	59.99	285.039 7	$C_{15}H_{10}O_6$	山柰黄素(山柰酚)	—	中间体 A
25	60.74	197.060 3	$C_{13}H_{10}O_2$	(E)-3-十三烯-5,7,9,11-四炔-1,2-双醇	—	中间体 A
26	63.43	267.065 6	$C_{16}H_{12}O_4$	芒柄黄花素	—	中间体 A

4　讨论

4.1　药材与肾康注射液指纹图谱中特征峰的归属研究

供试品溶液的色谱图与对照指纹图谱(见图 2)基本一致,主要的色谱峰应在 65 min 以内出完,且分离良好。供试品肾康注射液指纹图谱共有 16 个特征峰,依次对应表 1 中序号 1～16 的成分。其中 2 号峰和 10 号峰由对照品定位,分别依次是原儿茶醛、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(见图 1)。由图 5～8 可知,大黄药材与供试品指纹图谱中特征峰共有的是 5、6、7、9、10、11、12、14、15、16 号峰,共计归属 10 个峰(见图 5)。黄芪药材与供试品指纹图谱中特征峰共有的是 10 号峰,共计归属 1 个峰(见图 6)。红花药材与供试品指纹图谱中特征峰共有的是 3、8、9、13 号峰,共计归属 4 个峰(见图 7)。丹参药材与供试品指纹图谱中特征峰共有的是 1、2、14 号峰,共计归属 3 个峰(见图 8)。10 号峰毛蕊异黄酮葡萄糖苷是大黄、黄芪药材所共有的;9 号峰是大黄、红花药材所共有的;14 号峰为丹参与大黄药材所共有;4 号峰是四味药材制成注射液后新生成的色谱峰。

4.2　中间体与肾康注射液成品的主成分归属

中间体 A 是由丹参黄芪生成,采用“2.1”、“2.2”项下条件分析,结果见图 9 和表 1,结合质谱鉴定出中间体 A 中 13 个成分,与肾康注射液已鉴定的 26 个成分进行归属(见图 4 和表 1),发现中间体 A 中的全部成分均能归属在样品肾康注射液中。

中间体 B 由红花,大黄组成,采用“2.1”、“2.2”项下条件分析,结果见图 10 和表 1,推测了其中 9 个成分。与肾康注射液已鉴定的 26 个成分进行归属(见图 4 和表 1),共有成分有 5 个,分别是对应表 1 中序号为 4、6、14、15、16 号。

中间体 A 和中间体 B 共有的成分有 2 个,分别对应表 1 中序号为 14、16 号成分。二者与成品成分进行归属,合计归属了 16 个色谱峰,分别对应表 1 中序号是 1、2、4、6、14、15、16、17、19、20、21、22、23 号。

中间体 B 在制成成品的过程中丢失了 4 个成分,分别是没食子酸、山柰酚-3-O-芸香糖苷、奥刀拉亭-7-O-β-D-葡萄糖苷、槲皮素-3-O-α-L-鼠李糖苷。肾康注射液中的成分经中间体 A、B 归属后,未归属的成分有 10 个,分别对应表 1 中序号是 3、5、7、8、9、10、11、12、13、18 号。

4.3　不同色谱柱的考察

确定指纹图谱的色谱条件后,为考察不同色谱柱对指纹图谱重现性的影响,对 3 种不同品牌的色谱柱进行考察。3 种色谱柱的信息见表 2。根据色谱峰的峰形、分离度效果进行选择。实验结果表明,不同色谱柱分离效果相差较大,色谱峰峰形和分离效果较好的是 ACQUITY UPLC® CSH C_{18} 色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.7 μm)。提示建立本指纹图谱需要固定色谱柱型号,因此,建议选用该型号色谱柱。

表 2 三种色谱柱的信息

色谱柱类型	大小(mm)	粒径(μm)
CSH C_{18}	2.1×100	1.7
HSS T3	2.1×100	1.7
BEH C_{18}	2.1×100	1.7

4.4　不同品牌 UPLC 色谱仪的考察

应用同一种型号色谱柱 ACQUITY UPLC CSH C_{18}(2.1 mm×100 mm,1.7 μm),在相同的色谱条件下,随机选取一批肾康注射液(批号:201507021),分别在沃特世(Waters)、赛默飞世尔(Thermofisher)和安捷伦(Agilent)三个品牌的超高效液相色谱仪上进行检测,同一批次样品在不同仪器上所得图谱相似度分别为:Waters:0.901;Thermofisher:0.903;Agilent:0.900,表明重现性良好,不同品牌仪器得到的色谱图相似度结果差别不大。

4.5　对照品的选择

大黄、丹参、红花和黄芪都是常用的中药材,所含成分的含量测定与药理实验均有较多的报导。根据上述优化后的色谱条件,对四味药材中常用于测定含量并具有药理活性的对照品进行检测(见表 3),结果表明,原儿茶醛对照品与毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品可以做为色谱峰定位的参考(见图 1)。由于实验条件有限,后期会收集更多的对照品进行研究。

表 3　对照品的选择

名称	来源	批号
原儿茶醛	中检院	110810-201007
没食子酸	中检院	0831-9501
木犀草苷	中检院	111520-200504
迷迭香酸	中检院	111871-201404
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	中检院	111920-201304
羟基红花黄色素 A	中检院	111637-201308
芦荟大黄素	中检院	110795-201308
大黄素	中检院	110756-200110
大黄酚	中检院	0796-200208
大黄酸	中检院	110757-200206
大黄素甲醚	中检院	110758-201114

(下转第 576 页)

是否为直属干休所;与年龄无关。

3.5 离退休干部用药存在超疗程、超剂量现象

离退休老干部年均用药37个,年用药品种数在100个以上的老干部有12名。人年均消耗规定日剂量数(DDDs)在90(正常成年人90天用药量)以上的药品有60个,说明该药实际连续使用超过90天。DDDs越大,说明该药的使用频率越高,反映患者对该药的选择倾向性越大。其中,盐酸贝那普利片、格列齐特缓释片的人年均规定日剂量数高达592和525,存在超疗程、超用量的问题,这也是与离退休干部门诊人年均药品消耗金额密切相关的因素之一。

3.6 离退休干部安全合理用药的对策建议

离退休干部不同程度存在多药并用、超量用药,长此以往后果将难以评估。为此建议:一是由军队基层医疗机构或体系医院根据离退休干部的病情和治疗需要,对长期服用治疗用药的必要性、合理性进行评价,依据评价结果,对服用药品的品类、剂量进行调整和干预;二是从多种渠道加强对离退休干部安全用药与合理用药的宣教,使其转变用药"多用多好、一用就好"的错误思想;三是引导医护人员根据患者与治疗情况合理用药,加大医疗机构药事管理与治疗学委员会关于超剂量、超范围使用药品的监督管理作用;四是建立基层医疗机构与体系医院之间、军队医院之间药品使用的"可视"渠道和相互监督、共同管理的长效机制,避免重复开药、一药多开的问题。

【参考文献】

[1] 郭雨禾,拓永东,田日新. 新形势下军队干休所卫生所的地位作用及工作思考[J]. 中华保健医学杂志,2011,13(4):337-339.

[2] 史润泽,宋巍,张裕刚. 西北地区部队离退休干部近5年健康体检结果分析[J]. 西北国防医学杂志,2014,35(1):60-62.

[3] 苑学愚,杨文. 北京地区某部离退休干部老年疾病患病率调查[J]. 海军医学杂志,2009,30(4):336-338.

[4] 徐若华,于宝成,仲伟红,等. 军队老年人良性前列腺增生症的患病率及其与代谢综合征的关系[J]. 中国老年学杂志,2013,33(16):3976-3977

[5] 郭雨禾,拓永东,王贵臣. 关于干休所卫生事业费使用管理的几点思考[J]. 中华保健医学杂志,2011,13(4):336-337.

[收稿日期] 2019-09-11 [修回日期] 2019-11-05
[本文编辑] 陈盛新

(上接第547页)

4.6 小结

中药指纹图谱具有整体性和模糊性的基本属性,能够较全面的反应中药材中所含化学成分的种类和数量,能更加客观的从整体上评价中药的内在质量。相较单一成分或指标性成分评价中药的质量更加科学全面。本文主要对不同批次肾康注射液成品展开研究,经相似度计算,表明各批次间相似度相差不大,质量稳定。下一步将收集更多的样品,并进行中间体的研究,控制生产工艺对质量的影响,为肾康注射液质量控制提供更多的理论支持。

利用UPLC法建立的肾康注射液指纹图谱方法,经方法学验证具有良好的精密度,重复性和稳定性。文中利用UPLC-MS技术,建立肾康注射液四味药材的指纹图谱,其灵敏度高,稳定性好,重复性高,给出的信息更加全面。指纹图谱鉴定归属26个色谱峰,进一步阐明肾康注射液的化学物质基础,为肾康注射液的质量控制提供了新依据。

【参考文献】

[1] 支旭然,刘洪涛,吴茵,等. UPLC-MS/MS法同时测定肾康注射液中7个有效成分[J]. 药物分析杂志,2017,37(1):37-42.

[2] 叶烨,丁邦晗,王洁,等. 肾康注射液临床应用真实世界研究[J]. 新中医,2014,46(10):79-81.

[3] 邓金华,张奉莲,王定勇,等. 肾康注射液治疗慢性肾衰竭的Meta分析[J]. 现代药物与临床,2015,30(5):595-599.

[4] 王爱媛,房辉,王余,等. 肾康注射液辅助治疗早期糖尿病肾病的疗效及对氧化应激的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(8):308-310.

[5] 徐守竹,谢艳华,张晓卫,等. RP-HPLC法同时测定肾康注射液中5种蒽醌类成分[J]. 中成药,2013,35(1):90-93.

[6] 支旭然,董占军,吴茵,等. HPLC同时测定肾康注射液中的4种成分[J]. 华西药学杂志,2017,32(3):297-299.

[7] 刘芳,郭丝影,柴士伟,等. 肾康注射液中化学成分的UPLC-Q-TOF-MS分析[J]. 现代药物与临床,2017,32(6):975-977.

[8] 张立新,周晓英,张良,等. 肾康注射液中大黄药材指纹图谱研究[J]. 中国药业,2001,10(10):36-37.

[收稿日期] 2018-11-14 [修回日期] 2019-11-05
[本文编辑] 陈盛新