

· 化学与分析 ·

银翘解毒软胶囊指纹图谱分析

梁慧慧^{1,2}, 萧伟^{2,3*}, 徐连明^{2,3}, 包乐伟³,
徐殿红³, 殷洪梅^{2,3}, 杨绪芳^{2,3}

(1. 南京中医药大学, 南京 210000; 2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏连云港 222001;
3. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏连云港 222001)

[摘要] 目的: 建立银翘解毒软胶囊的指纹图谱。方法: 采用 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸梯度洗脱, 检测波长 327 nm, 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹。测定 10 批银翘解毒软胶囊, 建立其指纹图谱。结果: 指纹图谱中标记了 14 个共有峰, 10 批银翘解毒软胶囊指纹图谱相似度均 > 0.97。结论: 该方法具有良好的精密性、重复性、稳定性, 可用于银翘解毒软胶囊质量的综合评价。

[关键词] 银翘解毒软胶囊; 指纹图谱; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)11-0054-04

[doi] 10.11653/syjf2013110054

Fingerprint Analysis of Yinqiao Jiedu Soft Capsules

LIANG Hui-hui^{1,2}, XIAO Wei^{2,3*}, XU Lian-ming^{2,3},
BAO Le-wei³, XU Dian-hong³, YIN Hong-mei^{2,3}, YANG Xu-fang^{2,3}

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210000, China;
2. State Key Laboratory of New-technology for Chinese Medicine Pharmaceutical Process,
Lianyungang 222001, China; 3. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd, Lianyungang 222001, China)

[Abstract] **Objective:** To establish HPLC fingerprint of Yinqiao Jiedu soft capsules. **Method:** HPLC was used with Kromasil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), mobile phase of acetonitrile-0.1% H₃PO₄ in a gradient elution, detection wavelength was 327 nm, flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and column temperature was 30 °C. Fingerprints of 10 batches of Yinqiao Jiedu soft capsules were established. **Result:** Under these selected spectrum condition, 14 common peaks were marked in fingerprints of 10 batches of Yinqiao Jiedu soft capsules, similarity of 10 batches soft capsules were more than 0.97. **Conclusion:** This method had good precision, repeatability and stability, which were satisfied to comprehensive evaluation for quality of Yinqiao Jiedu soft capsules.

[Key words] Yinqiao Jiedu soft capsules; fingerprint; HPLC

银翘解毒软胶囊收载于《中国药典》2010 年版一部, 由金银花、连翘、薄荷、荆芥、淡豆豉、牛蒡子(炒)、桔梗、淡竹叶、甘草等 9 味药组成, 具有辛凉解表、清热解毒的功效, 用于治疗风热感冒、发热头痛、咳嗽、口干、咽喉疼痛。目前国内对银翘解毒软胶囊质量标准的研究多集中于其中绿原酸的含量测定^[1]。为较为全面地反映银翘解毒软胶囊的内在质量, 本实验采用 HPLC 对银翘解毒软胶囊的指纹

[收稿日期] 20121129(020)

[基金项目] 国家科技部“973 计划”项目(2010CB735604)

[第一作者] 梁慧慧, 在读硕士, 从事中药新剂型的研究与开发, Tel: 15261397506, E-mail: lhh8119304 @ 126.com

[通讯作者] * 萧伟, 研究员级高级工程师, 从事中药新剂型的研究与开发, E-mail: wzhzh-nj @ tom.com

图谱进行研究,旨在建立银翘解毒软胶囊指纹图谱的方法,用于该制剂的质量控制。

1 材料

1100,1200 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),AB204-S 型电子天平(Mettler Toledo 公司),HH-4 型数显恒温水浴锅(上海浦东物理光学仪器厂),甲醇、乙腈为色谱纯,水为 Milli-Q 超纯水,其他试剂均为分析纯。

银翘解毒软胶囊由江苏康缘药业股份有限公司提供(批号分别为 Z120701, Z120301, Z120801, Z120401, Z120501, Z120901, Z120902, Z120201, Z120702, Z120302),绿原酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110753-200413),咖啡酸、甘草苷、连翘酯苷 A 对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为 110885-200102, 111610-201005, 111810-201103),新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A, 异绿原酸 B 及异绿原酸 C 对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号分别为 MUST-11112202, MUST-11112203, MUST-11061601, MUST-11083102, MUST-11081803)。10 批金银花、连翘、薄荷、荆芥、淡竹叶、淡豆豉、牛蒡子(炒)、桔梗、甘草购自单位及产地见表 1,经江苏康缘药业股份有限公司鉴定,金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾,连翘为木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实,薄荷为唇形科植物薄荷 *Mentha haplocalyx* Briq. 的干燥地上部分,荆芥为唇形科植物荆芥 *Schizonepeta tenuifolia* Briq. 的干燥地上部分,淡豆豉为豆科植物大豆 *Glycine max* (L.) Merr. 的成熟种子的发酵加工品,牛蒡子为菊科植物牛蒡 *Arctium lappa* L. 的干燥成熟果实,桔梗为桔梗

科植物桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. 的干燥根,淡竹叶为禾本科淡竹叶 *Lophatherum gracile* Brongn. 的干燥茎叶,甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fish. 的干燥根和根茎。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),检测波长 327 nm,柱温 30 °C,流速 1.0 mL·min⁻¹,流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 20 min, 5% ~ 15% A; 20 ~ 45 min, 15% ~ 20% A; 45 ~ 80 min, 20% ~ 25% A)。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取甘草苷、连翘酯苷 A、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 对照品适量,加甲醇配成质量浓度分别为 117.2, 129.6, 54.1, 82.3, 51.2, 89.0, 51.3, 59.5, 57.4 mg·L⁻¹ 的混合溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备 取本品内容物约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50 mL 甲醇,超声 30 min(30 °C, 100 W, 40 kHz),放冷,补足减失的质量,滤过,取续滤液,经 0.45 μm 滤膜滤过,即得。

2.4 方法学考察^[2-3]

2.4.1 精密度试验 精密称定银翘解毒软胶囊(批号 Z120701)1 g,按 2.3 项下制备供试品溶液,按 2.1 项下条件连续进样 6 次,记录色谱图,以绿原酸为参照峰,结果各共有峰相对保留时间 RSD 均 < 0.21%,相对峰面积 RSD 均 < 2.52%,表明仪器精密度良好,符合指纹图谱要求。

2.4.2 重复性试验 精密称定银翘解毒软胶囊(批号 Z120701)1 g,按 2.3 项下分别制备供试品 6 份,按 2.1 项下条件进样分析,以绿原酸为参照峰,结果共有峰相对保留时间 RSD 均 < 0.36%,相对峰面积 RSD 均 < 3%,表明该方法重复性良好,符合指纹图谱要求。

2.4.3 稳定性试验 精密称定银翘解毒软胶囊(批号 Z120701)1 g,按 2.3 项下制备供试品溶液,分别于 0, 1.5, 3, 4.5, 6, 7.5, 9, 10.5, 12 h, 24 h 测定,以绿原酸为参照峰,结果各峰相对保留时间 RSD 均 < 0.37%,相对峰面积 RSD 均 < 3.5%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5 指纹图谱的建立^[4-5]

2.5.1 共有指纹峰的标定 取 10 批银翘解毒软胶囊内容物,分别制备供试品溶液,各精密吸取 10 μL,注入高效液相色谱仪,记录 0 ~ 80 min 色谱图。采用相对保留时间标定共有指纹峰,以图谱中绿原

表 1 银翘解毒软胶囊药材饮片来源

No.	药材	供货单位	批号/批	产地
1	金银花	河南省宛西制药股份有限公司	10	山东
2	连翘	河南省宛西制药股份有限公司	10	山西
3	薄荷	亳州千草药业饮片厂	10	安徽
4	荆芥	河南省宛西制药股份有限公司	10	江苏
5	淡豆豉	亳州千草药业饮片厂	10	东北
6	牛蒡子	亳州千草药业饮片厂	10	甘肃
7	桔梗	河南省宛西制药股份有限公司	10	安徽
8	淡竹叶	亳州千草药业饮片厂	10	四川
9	甘草	亳州千草药业饮片厂	1	内蒙古
10	甘草	河南省宛西制药股份有限公司	9	内蒙古

酸色谱峰为参照峰(S),将各色谱峰保留时间与同一图谱中参照峰的保留时间比较,其比值为各色谱峰的相对保留时间,计算 10 批药材指纹图谱中各色谱峰的相对保留时间和相对保留面积。其中 14 个色谱峰为各样品所共有,故标定他们为共有指纹峰。

2.5.2 非共有峰峰面积 计算非共有峰占总峰面积的比值。结果表明其比值 <5%,符合指纹图谱的要求。

2.5.3 指纹图谱相似度评价 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价》软件 2004 年 A 版进行相似度计算。设置批号 Z120701 的样品图谱为参照图谱,对照图谱生成方法采用中位数法,时间窗宽度 0.10,多点校正后自动匹配,生成对照指纹图谱见图 1,生成的指纹图谱见图 2。结果 10 批胶囊 [S1 (Z120701), S2 (Z120301), S3 (Z120801), S4 (Z120401), S5 (Z120501), S6 (Z120901), S7 (Z120902), S8 (Z120201), S9 (Z120702), S10 (Z120302)] 的相似度分别为 0.991, 0.984, 0.993, 0.975, 0.995, 0.991, 0.974, 0.994, 0.992, 0.981, 1。表明建立的指纹图谱的技术稳定、重复性好。

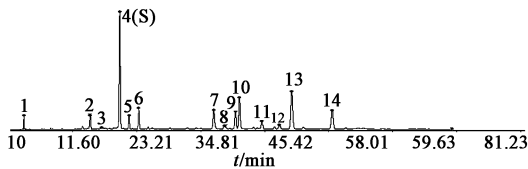


图 1 银翘解毒软胶囊 HPLC 对照指纹谱

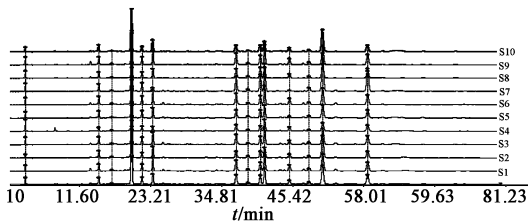
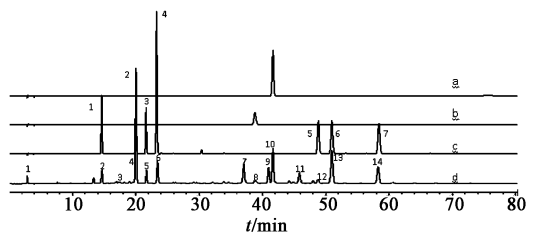


图 2 10 批银翘解毒软胶囊指纹图谱

2.6 色谱峰指认 分别精密量取对照品和供试品溶液各 10 μL,注入高效液相色谱仪,记录 80 min 的色谱图并进行对比,见图 3。通过图谱对比,确定图谱中 2 号峰为新绿原酸,4 号峰为绿原酸,5 号峰为隐绿原酸,6 号峰为咖啡酸,8 号峰为甘草苷,10 号峰为连翘酯苷 A,12 号峰为异绿原酸 B,13 号峰为异绿原酸 A,14 号峰为异绿原酸 C。

3 讨论

分别对提取溶剂(甲醇、乙醇,80% 甲醇及 50% 甲醇)、提取方式(超声、加热回流)及提取时间进行了考察,最终选用甲醇超声提取 30 min,该方法简



a. 连翘酯苷 A; b. 甘草苷; c 中 1,2,3,4,5,6,7 分别为新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C; d. 供试品

图 3 银翘解毒软胶囊 HPLC

便,得到的色谱峰信息丰富。

考察了乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸、乙腈-0.05% 三氟乙酸梯度洗脱系统,结果选择乙腈-0.1% 磷酸溶液进行梯度洗脱时,得到的色谱峰形较好,且较稳定。记录该色谱条件下 110 min 色谱图,结果发现 80 min 后无色谱峰出现,故色谱记录时间 80 min。

采用 DAD 二级管阵列检测器进行全波长扫描,比较了 200 ~ 400 nm 所得的 HPLC 图谱,结果在 250,280,327 nm 处检测时,会呈现较多的色谱峰,但为排除辅料类成分干扰,同时使各色谱峰分离度较好、出峰数目适中、峰形较好,确定检测波长 327 nm。

考察了 Phenomenex Gemini C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Waters Symmetry @ C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 3 种不同型号的色谱柱,结果见图 4。结果选择了 Kromasil C₁₈ 色谱柱,其出峰较其他 2 种色谱柱早,且各色谱峰分离度较佳,峰形较好。同一份供试品按 2.1 项下色谱条件分别在 Agilent 1100,1200 系列高效液相色谱仪上进样,结果出峰数目一致,与银翘解毒软胶囊对照指纹图谱匹配后相似度分别为 0.994, 0.993, 表明色谱条件在 Agilent 仪器上系统适应性良好。

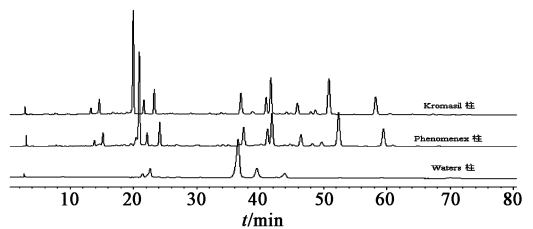


图 4 银翘解毒软胶囊于 3 种不同型号色谱柱的 HPLC

考察了 30,35,40 °C 柱温条件下各色谱峰的分离情况。结果表明不同柱温下色谱峰略有区别,当温度升高时,部分峰发生峰位相对位移与合并,使分离度降低,因此选择柱温 30 °C。

河北产不同等级金银花药材脂溶性成分的 GC-MS 分析

张芳, 张永清*, 马燕, 王斌
(山东中医药大学药学院, 济南 250355)

[摘要] 目的: 比较河北产不同等级金银花脂溶性成分组成。方法: 采用超临界萃取法提取金银花脂溶性成分, 并用气相色谱-质谱联用(GC-MS)技术分析脂溶性成分组成。结果: 河北产金银花脂溶性成分种类丰富, 一等品分离出 57 个成分, 二等品分离出 48 个成分, 三等品分离出 47 个成分。所含成分种类包括烃类、醇类、酯类、不饱和脂肪酸类、烯类、酮类、醛类等成分; 其中, 3 批样品共有组分 12 种, 均以正二十九烷相对百分含量最高, 含量分别为 31.345%, 30.642%, 37.647%。结论: 河北产不同等级金银花脂溶性成分存在一定差异。

[关键词] 金银花; 脂溶性成分; GC-MS; 不同等级

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0057-04

[doi] 10.11653/syfy2013110057

GC-MS Analysis of Liposoluble Content of Different Levels Lonicerae Japonica Flos in Hebei

ZHANG Fang, ZHANG Yong-qing*, MA Yan, WANG Bin

(College of Pharmacology of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[收稿日期] 20121101(014)

[基金项目] 国家“十二五”科技支撑项目(2011BAI06B01)

[第一作者] 张芳, 讲师, 博士, 从事中药质量控制及资源研究, E-mail: zfang_819@163.com

[通讯作者] * 张永清, 教授, 博士生导师, 从事中药资源及其质量控制研究, E-mail: zyxq622003@126.com

按《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求》^[6]采用 HPLC 对银翘解毒软胶囊中非挥发性成分指纹图谱及技术参数进行研究, 取得了较满意的结果, 标定了 14 个共有峰。同时方法学考察其精密度、稳定性、重复性均良好, 表明所建立的 HPLC 指纹图谱方法可行。运用指纹图谱相似度软件对银翘解毒软胶囊 HPLC 指纹图谱进行了相似度计算, 结果 10 批不同批次软胶囊的指纹图谱具有较好相似度, 表明各批次样品的成分无明显差异, 为客观评价软胶囊质量提供一定依据。

3 讨论

中药复方是多味药、多组分、多因素构成的复杂体系, 其化学成分的复杂性和多样性是其疗效的物质基础。目前对银翘解毒软胶囊的质量标准的研究多集中在绿原酸的含量测定上, 为了更全面地控制银翘解毒软胶囊的质量, 本研究选择了以绿原酸等几个共有峰为代表, 建立了银翘解毒软胶囊的指纹图谱, 经初步验证能够用来控制本品的质量, 确保产

品批次间的稳定性、均一性, 从而为银翘解毒软胶囊制备工艺稳定性提供重要依据。

[参考文献]

- [1] 陈坚. HPLC 法测定银翘解毒软胶囊中绿原酸含量[J]. 首都医药, 1999, 6(4): 23.
- [2] 谢培山. 中药色谱指纹图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 10.
- [3] 颜月园, 萧伟, 吴云, 等. 散结镇痛胶囊中黄酮类成分的指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 58.
- [4] 屠鹏飞. 中药指纹图谱指定的方法学探讨[C]. 广州: 现代化中药产业关键技术系列研讨会—国际色谱指纹评价中药质量研讨会, 2001.
- [5] 蔡宝昌. 中药制剂分析[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007: 10.
- [6] 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)[J]. 中成药, 2000, 22(10): 671.

[责任编辑 仝燕]