

· 药剂与工艺 ·

数字化色谱指纹谱技术在双黄连制剂质量及药材鉴定中的应用

王新宏, 安睿, 邹云, 王智华, 洪筱坤, 李国文
(上海中医药大学 中药化学教研室, 上海 200032)

摘要:目的 建立双黄连制剂和药材的数字化色谱指纹谱以用于制剂质量分析和药材鉴定。方法 采用 RP-HPLC 梯度洗脱技术进行 HPLC 分离分析, 建立双黄连制剂和药材的数字化色谱指纹谱。色谱柱: Inertsil ODS 柱; 流动相: 乙腈-1% 乙酸水溶液作梯度洗脱; 流速: 1 mL/min; 检测波长: 280 nm。结果 在选定的色谱条件下, 建立了药材和制剂的数字化色谱指纹谱 HPLC-DFPS (HPLC-Digitized Finger Print Spectrum), 提供了稳定可控的制剂指纹谱图, 以及通过与空白样品比较探求了制剂中用以鉴定各药材的特征峰群。结论 利用数字化色谱指纹谱技术分析双黄连制剂的质量和鉴定中药材是切实可行的。

关键词: 数字化指纹谱; 双黄连制剂; 高效液相色谱法

中图分类号: R282.5; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2002)02-0115-04

Application of chromatograph-digitized fingerprint spectrum in identification of medicinal materials and qualitative control of SHUANGHUANGLIAN PREPARATION*

WANG Xin-hong, AN Rui, ZOU Yun, WANG Zhi-hua, HONG Xiao-kun, LI Guo-wen

(Department of Chinese Medicine Chemistry, Shanghai University of TCM, Shanghai 200032, China)

Abstract Object To establish HPLC-Digitized fingerprint spectrum (HPLC-DFPS) of SHUANGHUANGLIAN PREPARATION and relative medicinal herbs so that it will be applied in identification of medicinal materials and quality control of the PREPARATION. **Methods** A gradient separated method was applied. Column Inertsil ODS. Mobile phase acetonitrile-water (1% acetic acid). Detection wavelength: 280 nm. **Results** Using above optimum chromatography conditions, the HPLC-DFPS of relative medicinal materials and SHUANGHUANGLIAN PREPARATION was established. **Conclusion** Comparison of a group of characteristic peaks suggested that the HPLC-DFPS can be used for identification of relative medicinal materials and quality control of SHUANGHUANGLIAN PREPARATION.

Key words digitized fingerprint spectrum (DFPS); SHUANGHUANGLIAN PREPARATION; HPLC

* SHUANGHUANGLIAN PREPARATION is a Chinese herbal preparation with *Flos Lonicerae*, *Radix Scutellariae*, and *Fructus Forsythiae*. It has the function of antibiosis, antiviral, and antiinflammation etc.

金银花、黄芩、连翘组成的双黄连制剂具有良好的抗菌、抗病毒、抗炎解热的功能, 临床上广泛用于呼吸道感染、扁桃体炎、肺炎等。有关双黄连制剂的质量标准, 研究最多的是以 3 味中药的主要成分作为定性定量的指标^[1-3]。为了能在制剂中较全面、合理地反映其组成药材即对制剂中药材作出科学鉴定, 本研究收集了不同厂家生产的双黄连口服液制剂和同一厂家生产的不同批号的双黄连片剂, 采用梯度洗脱技术进行 HPLC 分析, 对制剂和药材的色

谱图建立数字化色谱指纹谱, 探求药材在制剂中呈现的特征峰群, 为双黄连制剂中药材的鉴定提供科学依据

1 试验材料

1.1 仪器: 高效液相色谱仪, 包括 Waters 510 型泵, Waters TM 996 PDA 检测器, Millennium 32 色谱工作站。SY3200 超声清洗机 (上海声源超声波仪器有限公司)

1.2 试剂: 乙腈、甲醇为 HPLC 级, 冰醋酸为分

收稿日期: 2001-05-24

作者简介: 王新宏 (1963-), 男, 浙江人, 博士, 上海中医药大学中药学院副教授, 主要从事中药质量标准研究。

Tel: (021) 54231710 Fax: (021) 54231547

析纯

1.3 样品:金银花、连翘、黄芩药材购于上海市药材公司,并经本校中药鉴定教研室吴赵云副教授鉴定。黄芩苷粗品、双黄连片剂(批号:990601,990702,990812,990305)、双黄连口服液(981002,981207,990301,990601,20000102)为上海五洋药业健康产品有限公司生产;双黄连口服液:哈尔滨制药四厂(991104),黑龙江完达山制药厂(990605),众生制药厂(990211),河南南阳制药厂(991012)。

1.4 对照品:咖啡酸、黄芩素、木犀草素购自 Sigma 公司;绿原酸、芦丁、黄芩苷、连翘苷购自中国药品生物制品检定所。

2 实验部分

2.1 色谱条件:色谱柱: Inertsil ODS-3 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 保护柱: Phenomenex ODS-C18柱 (3.0 mm×40 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈 (A)-1% 醋酸水溶液 (B) 作梯度洗脱, 0~10 min, 18% A-72% B; 10~20 min, 28% A-62% B; 20~35 min, 42% A-52% B; 35 min 以后, 63% A-33% B。流速: 1.0 mL/min, 柱温: 室温, 检测波长: 280 nm

2.2 对照品溶液配制: 分别精密称取对照品置量瓶中, 以甲醇为溶剂, 配制成单组分对照品溶液, 而后配制混合对照品溶液, 其中含绿原酸 0.1 mg/mL, 咖啡酸 0.1 mg/mL, 芦丁 0.05 mg/mL, 连翘苷 0.15 mg/mL, 黄芩苷 0.1 mg/mL, 黄芩素 0.2 mg/mL

2.3 供试液的制备: 取片剂 10 片, 刮去薄膜包衣, 研碎, 混匀, 精密称取 50 mg, 置离心管中, 加溶剂甲醇-水 (1:1) 4 mL, 超声 15 min, 离心后取上清液, 残渣重复操作一次, 合并两次上清液于 10 mL 容量瓶中, 定容至刻度。

取口服液 5 支, 将其混合均匀后, 精密移取 0.5 mL 加甲醇-水 (1:1) 定容至 10 mL

分别取金银花、连翘药材研磨成粉末, 过 40 目筛, 精密称取金银花 187.5 mg, 连翘 375 mg, 置离心管中, 同片剂操作。最后各定容至 10 mL 容量瓶中。

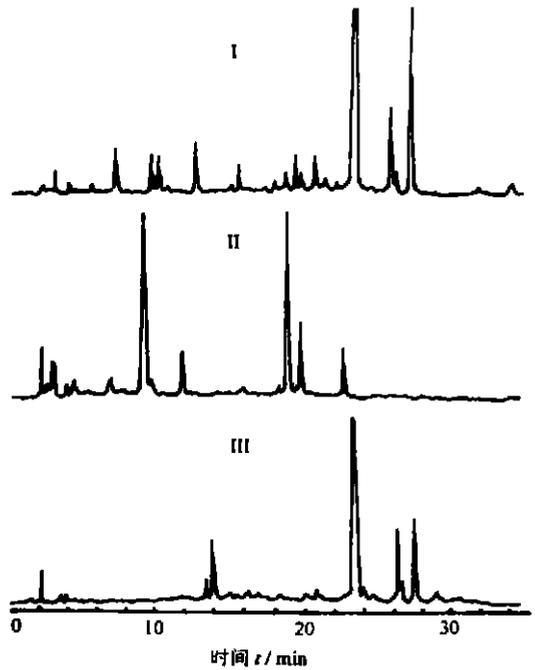
因制剂中采用黄芩苷粗品为原料, 所以称取黄芩苷粗品 5.7 mg 代替黄芩药材, 同上操作。

样品经微孔滤膜过滤, 按 2.1 项下色谱条件进样分析。此处仅以金银花药材、空白及样品的色谱图为代表, 见图 1

2.4 HPLC 相对保留值指纹谱的建立

2.4.1 HPLC-DFPS 原理及方法见文献 [4-5]。

2.4.2 相对保留值 T 的计算: 双黄连制剂在本实验



I 样品 II 金银花 III 空白

图 1 金银花药材、空白及样品 (片剂 990305) 的 HPLC 图谱。色谱条件下, 色谱峰较多且相当密集, 难以插入一个合适的参照物, 故选择一个出峰时间较居中、各制剂中均存在的组分作内参照峰, 如在鉴定金银花时以绿原酸峰为参照峰, 鉴定连翘时以连翘苷峰为参照峰, 鉴定黄芩时以黄芩苷作为参照峰 ($T=1$), 求出样品中所有峰的相对保留值 T

$$T = t_R / t_{R_s}$$

t_R 各组分的出峰时间, t_{R_s} 内参照峰的出峰时间

色谱相对保留值是一组仅与化合物性质、色谱分离条件相关的半定量参数, 当色谱分离条件固定时, 仅与化合物的性质有关, 可以消除人和仪器设备对化合物保留时间的影响。

2.4.3 T 值窗口的设定: 由于保留时间受各种实验因素的影响, 每一次实验数据不可能完全一致, 故对每个峰位的 T 值设定窗口为 2%, 即通过大量的实验数据计算每个峰位的 T 值, 取可信限在 ± 2% 的范围内。

2.4.4 指纹谱的建立: 按样品各色谱峰 T 值的大小次序排序, 在每个 T 项下标出该组分的相对面积值 (RA) 即组成了样品的 HPLC-DFPS。以样品色谱峰的总面积为分母, 各色谱峰面积为分子, 计算得到各色谱峰的相对面积值, 亦称为相应化合物的相对丰度, 计算公式为:

$$RA = A_x \times 100 / \sum A$$

RA 相对面积值, A_x 某个峰的面积, $\sum A$ 总峰面积

在一些可以作比较的不同的样品中,对具有相同 T 值的峰的特征峰,可以获知所对应的化合物在各个样品中的相对含量,达到半定量分析的目的。表 1 为以绿原酸为内参照峰的金银花药材

及样品色谱指纹谱的特征峰,表 2 为以连翘苷为内参照峰的连翘药材及样品色谱指纹谱的特征峰,表 3 为以黄芩苷为内参照峰的黄芩粗品及样品色谱指纹谱的特征峰。

表 1 金银花药材及样品的特征峰

| T 值 | 样品峰相对面积 (RA) | | | | | | | | | | | | | | | Δ |
|-------|--------------|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | |
| 0.488 | 0.98 | | 0.23 | 0.32 | 0.31 | 0.48 | 0.60 | 0.04 | 0.33 | 0.29 | | 0.18 | 0.29 | 0.16 | 0.30 | 13 |
| 0.558 | 0.69 | | 0.34 | 0.35 | | 0.24 | 0.71 | 0.31 | 0.34 | 0.26 | | 0.26 | 0.26 | 0.22 | 11 | |
| 0.767 | 1.93 | | 1.40 | 0.15 | 0.33 | 0.37 | 3.01 | 1.43 | 2.13 | 1.74 | 1.13 | 2.63 | 1.71 | 1.07 | 2.98 | 14 |
| 1.000 | 53.43 | | 1.34 | 1.25 | 1.22 | 1.16 | 0.83 | 1.67 | 2.10 | 1.57 | 1.24 | 2.43 | 2.47 | 0.78 | 3.74 | 14 |
| 1.047 | 2.38 | | 1.12 | 0.63 | 0.15 | 0.23 | 2.12 | 1.50 | 2.15 | 1.46 | 1.50 | 1.89 | 1.49 | 0.64 | 2.94 | 14 |
| 1.977 | 0.56 | | | 0.16 | | | 0.35 | 0.63 | 1.60 | 0.78 | 0.72 | 1.78 | 1.60 | | 1.83 | 10 |
| 2.047 | 22.59 | | 1.23 | 0.27 | 0.18 | 0.21 | 0.58 | 0.47 | 1.00 | 0.54 | 0.31 | 0.64 | 0.78 | 0.80 | 0.80 | 14 |
| 2.140 | 7.94 | | 0.53 | 0.51 | 0.41 | 0.40 | 2.29 | 0.78 | 1.96 | 1.46 | 0.71 | 2.13 | 1.76 | | 2.85 | 13 |
| 2.740 | 2.43 | | 0.71 | 1.05 | 1.07 | 1.07 | 0.60 | 0.89 | 1.13 | 0.35 | 0.60 | 0.83 | 0.88 | 0.65 | 1.05 | 14 |

1 金银花药材; 2 金银花空白; 3~ 6 为上海五洋制药厂生产的片剂,批号分别是 990305 990601 990702 990812; 7~ 11 为上海五洋制药厂生产的口服液,批号分别是 981002 981207 990301 990601 2000102; 12~ 15 分别是众生制药厂 (990211)、哈尔滨制药四厂 (991104)、黑龙江完达山制药厂 (990605)、河南阳制药厂 (991012)生产的口服液。Δ 为具有某 T 值的样品数。

表 2 连翘药材及样品的特征峰

| T 值 | 样品峰相对面积 (RA) | | | | | | | | | | | | | | | Δ |
|-------|--------------|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | |
| 0.638 | 5.66 | | | 0.55 | 0.45 | 0.44 | 0.39 | 1.30 | 1.17 | 0.76 | 0.84 | 0.45 | 1.34 | 0.10 | 1.01 | 13 |
| 0.659 | 36.61 | | 0.21 | 1.57 | 1.49 | 1.40 | 1.41 | 3.24 | 3.08 | 1.99 | 2.08 | 1.26 | 3.21 | | 2.46 | 13 |
| 0.680 | 5.95 | | 0.66 | 0.24 | 0.14 | 0.24 | 0.26 | 0.25 | 0.18 | 0.36 | 0.21 | 0.23 | 0.13 | | 0.29 | 13 |
| 0.822 | 2.88 | | 0.54 | 0.61 | 0.65 | 0.67 | 0.58 | 0.52 | 0.25 | 0.39 | 0.62 | 0.31 | 0.22 | 0.48 | 0.67 | 14 |
| 1.000 | 4.68 | | 0.22 | 0.23 | 0.21 | 0.20 | 0.78 | 0.46 | 0.85 | 0.32 | 0.28 | 0.33 | 0.50 | 1.91 | 0.44 | 14 |

1 连翘药材; 2 连翘空白; 余同表 1

表 3 黄芩粗品药材及样品的特征峰

| T 值 | 样品峰相对面积 (RA) | | | | | | | | | | | | | | | Δ |
|-------|--------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | |
| 1.000 | 86.01 | | 77.29 | 81.71 | 82.30 | 82.50 | 66.93 | 77.88 | 70.74 | 75.03 | 72.26 | 71.88 | 72.18 | 81.42 | 70.87 | 14 |
| 1.257 | 8.84 | | 6.57 | 4.52 | 4.87 | 4.85 | 1.82 | 1.65 | 5.20 | 3.27 | 6.36 | 5.38 | 3.91 | 5.75 | 0.37 | 14 |
| 1.331 | 1.44 | | 0.39 | 1.12 | 0.36 | 0.33 | | 0.33 | | | 0.49 | | 0.58 | | | 8 |

1 黄芩粗品; 2 黄芩空白; 余同表 1

3 结果

3.1 双黄连制剂中金银花药材的鉴定: 一般在制剂中鉴定某药味的存在与否是通过直观比较制剂、待鉴药材和空白样品色谱图,观察相对应色谱峰有无来鉴定,但该方法粗糙,误差较大,无量化指标,不能正确、客观、量化地分析。本研究通过分析制剂、待鉴药材和空白样品的数字化色谱指纹谱,清楚地发现金银花指纹谱中有 9 个色谱峰为多数样品共有,其中 T 值为 0.488 (仅在 11 号样品中未检出), 0.588 (5, 11, 12 号样品中未检出), 0.767, 1.000, 1.047, 1.977 (3, 5, 6, 14 号样品中未检出), 2.047, 2.140 (14 号样品中未检出), 2.740 因此可以认为这些色谱峰是金银花在制剂中的特征峰群,换句话说,这些色谱峰是由金银花产生,这为制剂中金银花的鉴定

奠定了基础

3.2 双黄连制剂中连翘的鉴定: 采用连翘苷作为参照峰建立了指纹谱,通过连翘药材、连翘空白制剂和样品指纹谱比较,可以清楚地看出连翘指纹谱中的 6 个色谱峰为多数样品共有,其中 T 值为 0.638 (3 号样品中未检出), 0.659 (14 号样品中未检出), 0.680 (14 号样品中未检出), 0.779 (14 号样品中未检出), 0.822, 1.000 这些特征峰群在双黄连片剂、口服液中出现率很高。

3.3 双黄连制剂中黄芩的鉴定: 由于制剂工艺中采用黄芩粗品作为原料药,所以在制剂中检出物是以黄芩粗品为比较对象。采用黄芩苷作为参照峰建立指纹谱,通过黄芩粗品、黄芩空白制剂和样品指纹谱比较,其特征峰群 T 值为 1.000, 1.257,

1. 331

3. 4 制剂工艺重现性的比较: 本实验所研究的片剂均系上海五洋制药厂生产, 经比较不同批号片剂指纹谱, 发现各批号片剂总色谱峰为 28 个, 3 个以上批号都出现的峰为 23 个, 其重叠率大于 82%, 有些小峰可能未能检出, 降低了其重叠率, 但已说明不同批次样品的重现性是很好的。

文中研究的口服液系不同厂家生产, 在工艺操作中总会有偏差, 9 个样品中, 以 7 个以上样品都出现的峰为共有峰计, 则它们之间的重叠率也大于 57. 5%。

4 讨论

4. 1 本研究采用了 HPLC-PDA 技术对双黄连制剂进行梯度洗脱, 一次进样即能得到众多的色谱峰, 分离分析效率高, 且其相对保留值相当稳定, 所建立的数字化色谱指纹谱更具稳定性和可控性。

4. 2 本实验采用梯度洗脱技术和 PDA 检测器, 对

双黄连制剂提取物进行分离分析, 通过一次进样, 即能使 210~ 400 nm 波长范围内有吸收的所有组分都能被检测出来。通过 PDA 技术获得多组分的三维图谱 (分析时间 t 波长 λ 吸收值 A) 信息, 可找出每个峰的最大吸收波长, 使每个色谱峰都有较大的检测灵敏度。实验借助三维图, 截割得到不同吸收波长的 $A-t$ 图, 通过比较各波长下的色谱图, 最后选择检测波长 280 nm, 在此波长下, 出峰数多, 可提供的信息多, 灵敏度高, 基线平直稳定。

参考文献:

- [1] 华菊根, 胡立君, 李国枕. 注射用双黄连质量标准的研究 [J]. 中成药, 1996, 18(11): 13-15.
- [2] 郭淑敏, 胡丽君, 张丽敏, 等. 高效液相色谱法测定注射用双黄连中连翘苷的含量 [J]. 中国中医药科技, 1997, 4(2): 93-95.
- [3] 徐凯建, 陆义诚, 孙孝祥, 等. HPLC 法测定双黄连注射液中原酸、黄芩苷的含量 [J]. 中草药, 1991, 22(2): 53-55.
- [4] 洪筱坤, 王智华, 郭济贤, 等. 柴胡属 19 种植物挥发油的气相色谱-相对保留值的指纹分析 [J]. 药学学报, 1998, 23(11): 839-941.
- [5] 王新宏, 范广平, 安睿, 等. 地榆属几种植物的 HPLC-FPS 比较研究 [J]. 中国药理学杂志, 1997, 32(增刊): 30-33.

加味脑乐静合剂稳定性的跟踪分析

赵绪元, 李煥德*, 向大雄, 王秀良, 唐晓恋**, 陈卫林**

(中南大学湘雅二医院 药剂科, 湖南 长沙 410011)

摘要: 目的 对加味脑乐静合剂的稳定性进行研究, 探讨 pH 值的变化与微量沉淀形成的关系, 确保本品安全有效使用。方法 样品室温下存放, 对其 pH 沉淀形成及化学成分进行为期 2 年的跟踪检测。化学成分的定性用 TLC 和 HPLC 法, 葛根素含量测定采用 HPLC 法, 外标法定量 (mg/mL)。结果 获得了沉淀和液体部分各自的 TLC 和 HPLC 特征图谱。在薄层上可以清楚地检出甘草和葛根的斑点, 在 HPLC 谱中可以清楚地检出葛根素的特征峰; 随着贮存时间的延长, 沉淀的量稍有增加, 而 pH 值略有下降。结论 该液体制剂在贮存期间基本稳定, 所获实验数据可为本品的进一步研究提供参考。

关键词: 稳定性; 加味脑乐静合剂; HPLC; TLC

中图分类号: R286. 01; R286. 02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2002)02-0118-03

Studies on stability of JIAWEI NAOLEJING ORAL LIQUOR*

ZHAO Xu-yuan, LI Huan-de, XIANG Da-xiong, WANG Xiu-liang, TANG Xiao-luan, CHEN Wei-lin
(Department of Pharmacy, Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha Hunan 410011, China)

Abstract Object To study the stability of JIAWEI NAOLEJING ORAL LIQUOR and to find the relationship between pH and sedimentation in the ORAL LIQUOR, so as to ensure its safety and efficacy. **Methods** The chemical constituents of the ORAL LIQUOR which have been stored for 24 months at room temperature were qualitatively determined by TLC and HPLC, the puerarin was quantitatively determined by HPLC with external standard and expressed in mg/mL. **Results** Characteristic TLC and HPLC spectrum of the sediment and the liquid was obtained. Spots of *Radix glycyrrhizae* and *Radix Puerariae* were clearly distinguished on the plate. HPLC peaks of puerarin were clearly exhibited. The content of sediment in the ORAL LIQUOR increased slowly accompanying time prolonging, but the pH value

收稿日期: 2001-07-10

基金项目: 卫生部科技计划, 湖南省科委重点项目 (98ssy1002)

* 通讯联系人, 教授, 国家新药评委, Tel 0731-5550252 ** 湖南中医学院 96 级实习生