

双黄连口服液指标成分体内相关性研究

赵金凤¹, 李津明^{2*}, 王晓扬¹, 武文强¹, 贺国彬¹

1. 哈尔滨商业大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150076

2. 厦门医学高等专科学校, 福建 厦门 361008

摘要: 目的 建立双黄连口服液体内外 HPLC 指纹图谱。方法 色谱柱为 Welchrom C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.2%磷酸水溶液, 梯度洗脱, 分段变波长测定; 柱温 30 ℃; 进样量 10 μL。结果 利用中药色谱指纹图谱相似度软件 2004A 版, 对每种制备方法各 10 批次样品和不同制备方法进行整体相似度评价, 结果相似度平均值均大于 0.93。药典法制备的双黄连口服液 3 种指标成分体内相关性良好。结论 该方法精密度、稳定性和重复性良好, 所建立的对照指纹图谱具有较好的代表性, 该方法为建立中药口服制剂新的评价体系提供了思路。

关键词: 双黄连口服液; 指标成分; 指纹图谱; 血清化学; HPLC

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2013)23-3316-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.23.011

In vivo and *in vitro* correlation of quality control components in Shuanghuanglian Oral Liquid

ZHAO Jin-feng¹, LI Jin-ming², WANG Xiao-yang¹, WU Wen-qiang¹, HE Guo-bin¹

1. College of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

2. Xiamen Medical College, Xiamen 361008, China

Abstract: Objective To establish the *in vitro* and *in vivo* HPLC fingerprint of Shuanghuanglian Oral Liquid (SOL). **Methods** The chromatographic fingerprint was obtained with Welchrom C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); The mobile phase was methanol-0.2% phosphoric acid aqueous solution, with gradient elution and segmentation variable wavelength determination; The column temperature was maintained at 30 ℃; The injection volume was 10 μL. **Results** Among 10 batches of samples prepared by single and different preparation methods, the overall similarity evaluation was taken using the Chromatographic Fingerprint Similarity Software for Chinese Materia Medica (Version 2004A), and the average similarities were all above 0.93. The better *in vivo* and *in vitro* correlation of the index constituents in SOL prepared by the method of *Pharmacopoeia of People's Republic of China* was obtained. **Conclusion** The method had good precision, stability, and repeatability. The standard chromatographic fingerprint established has a better representativity, and the method provides the new ideas for establishing the new evaluation system of Chinese materia medica oral preparation.

Key words: Shuanghuanglian Oral Liquid; quality control components; fingerprints; serum chemistry; HPLC

双黄连口服液是由黄芩、金银花和连翘 3 味中药提取精制而成的合剂, 具有清热解毒、辛凉解表的功效, 对于由外感风热引起的头痛发热、咳嗽及咽痛等病症具有良好的疗效^[1-2]。《中国药典》2010 年版将该药品中的绿原酸、连翘苷和黄芩苷作为产品的指标成分^[3]。已有学者运用中药血清化学的方法对双黄连冻干粉针进行了体内外的研究^[4], 但由于是静脉注射的给药方式, 无体内吸收过程。双黄

连口服制剂指标成分的血清化学研究至今尚无文献报道^[5]。本实验将中药血清图谱^[6]作为体内研究的方法, 通过对不同工艺制备的双黄连口服液中指标成分体内外的相关性研究, 建立双黄连口服液 HPLC 血清指纹图谱^[7-8], 为双黄连口服液的质量评价和处方配伍的优化研究提供新的依据, 并以此为出发点, 为中药及其复方制剂质量评价提供血清化学研究依据。

收稿日期: 2013-07-15

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目 (LC2011C06)

作者简介: 赵金凤 (1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为新型药物传输系统。Tel: 13009715165 E-mail: clover_zjf@163.com

*通信作者 李津明, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药制剂现代剂型研究。Tel: 18054821390 E-mail: lijiming1962@163.com

1 仪器与材料

Dionex 高效液相色谱仪、Chromleon 6.8 工作站(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Welchrom C₁₈ 色谱柱(上海月旭科技有限公司); AS3120A 超声清洗器(天津奥特赛恩斯有限公司); BS124S 电子天平(北京赛多斯仪器公司); HH-4 恒温水浴锅(上海美强仪器有限公司); 18790 干热样品浓缩装置-氮吹仪(美国 Pierce 公司); TDL-5-A 型离心机、TGL-16B 型离心机(上海安亭科学仪器产); 真空采血管和一次性采血针(浙江康康医疗器械有限公司)。

黄芩 *Scutellariae Radix*、金银花 *Lonicerae Flos*、连翘 *Forsythiae Fructus* 购于人民同泰药店, 由哈尔滨商业大学药学院中药鉴定学金哲雄教授鉴定, 依次为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根、忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾、木犀科连翘属植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实; 对照品黄芩苷(质量分数>95.2%, 批号为 1107152-200815)、绿原酸(质量分数>98.0%, 批号为 110753-200413)、连翘苷(质量分数>98.9%, 批号为 110821-200711)均购自中国食品药品检定研究院; 双黄连口服液(自制, 按照《中国药典》方法、单煎法、混煎法制成); 甲醇、乙腈(色谱醇, Dima Technology Inc 公司); 纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司), 其他试剂均为分析纯。

Wistar 大鼠, 雄性健康, 体质量 230~270 g, 吉林大学白求恩医学院动物实验中心, 许可证号: SYXK(吉)2007-0011。

2 方法与结果

2.1 双黄连口服液的制备

2.1.1 药典法 根据《中国药典》2010 年版方法制备, 即得。

2.1.2 单煎法 黄芩切片, 加水煎煮 3 次, 第 1 次 2 h, 第 2、3 次各 1 h, 合并煎液, 滤过, 滤液浓缩并在 80 ℃时加入 2 mol/L 盐酸溶液适量调节 pH 值至 1.0~2.0, 保温 1 h, 静置 12 h, 滤过, 沉淀加 6~8 倍量水, 用 40%氢氧化钠溶液调节 pH 值至 7.0, 再加等量乙醇, 搅拌使溶解, 滤过, 滤液用 2 mol/L 盐酸溶液调节至 pH 2.0, 60 ℃保温 30 min, 静置 12 h, 滤过, 沉淀用乙醇洗至 pH 值 7.0, 挥尽乙醇备用。金银花加水煎煮 2 次, 每次 1.5 h, 合并煎液, 滤过, 滤液浓缩至相对密度为 1.20~1.25 (70~

80 ℃测定)的清膏, 冷至 40 ℃时缓缓加入乙醇, 使含乙醇量达 75%, 充分搅拌, 静置 12 h, 滤取上清液, 残渣加入 75%乙醇适量, 搅匀, 静置 12 h, 滤过, 合并乙醇液, 回收乙醇至无醇味。连翘加水温浸 30 min 后, 煎煮 2 次, 每次 1.5 h, 合并煎液, 滤过, 滤液浓缩至相对密度为 1.20~1.25 (70~80 ℃测定)的清膏, 冷却至 40 ℃时缓缓加入乙醇, 使含乙醇量达 75%, 充分搅拌, 静置 12 h, 滤取上清液, 残渣加入 75%乙醇适量, 搅匀, 静置 12 h, 滤过, 合并乙醇液, 回收乙醇至无醇味。将 3 种提取物加在一起, 加水适量, 用 40%氢氧化钠溶液调节 pH 值至 7.0, 搅匀, 冷藏(4~8 ℃)72 h, 滤过, 即得。

2.1.3 混煎法 金银花、连翘加水温浸 30 min 后, 加入黄芩切片, 煎煮 3 次, 第 1 次 2 h, 第 2、3 次每次 1 h, 合并煎液, 滤过, 滤液浓缩至相对密度为 1.20~1.25 (70~80 ℃测定)的清膏, 冷却至 40 ℃时缓缓加入乙醇, 使含乙醇量达 75%, 充分搅拌, 静置 12 h, 滤取上清液, 残渣加入 75%乙醇适量, 搅匀, 静置 12 h, 滤过, 合并乙醇液, 回收乙醇至无醇味, 并加水适量, 以 40%氢氧化钠溶液调节 pH 值至 7.0, 搅匀, 冷藏(4~8 ℃)72 h, 滤过, 即得。

2.2 双黄连口服液体外指纹图谱

2.2.1 色谱条件 Welchrom C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.2%磷酸水溶液, 洗脱程序: 0~15 min, 15%甲醇; 15~45 min, 15%~45%甲醇; 45~60 min, 45%~15%甲醇; 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长: 0~21 min 为 324 nm, 21~42 min 为 240 nm, 42~60 min 为 280 nm; 柱温 30 ℃; 进样量 10 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备 黄芩苷对照品溶液的配制: 精密称取黄芩苷对照品 10.47 mg, 放入 25 mL 量瓶中, 加入 50%甲醇溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。绿原酸对照品溶液的配制: 精密称取绿原酸对照品 4.82 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 加纯净水使其溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。连翘苷对照品溶液的配制: 精密称取连翘苷对照品 15.48 mg 置 25 mL 量瓶, 加 50%甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得; 混合对照品溶液的制备: 精密量取黄芩苷对照品溶液 6 mL、绿原酸对照品溶液 0.5 mL、连翘苷对照品溶液 0.25 mL, 置同一 10 mL 棕色量瓶中, 加 50%甲醇稀释定容至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密吸取“2.1”项下制备的双黄连口服液各 1 mL, 置于 50 mL 棕色量瓶中, 加入 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.4 参照峰的选择 在 3 种方法制备的双黄连口服液中, 均选择保留时间 46 min 的色谱峰为参照峰, 因其峰面积大, 峰形较好且稳定, 通过与对照品溶液的 HPLC 对比, 确认其为黄芩苷, 因此 3 种方法制备的双黄连口服液均选择黄芩苷作为参照峰, 以参照峰峰面积的积分为 1, 色谱图见图 1。

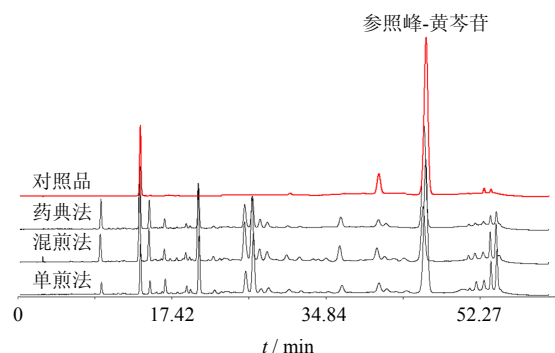


图 1 不同方法制备的双黄连口服液参照峰的选择

Fig. 1 Reference peak selection of SOL prepared by different methods

2.2.5 精密度试验 按照“2.2.3”项下方法制备单煎法双黄连口服液的供试品溶液, 连续进样 5 次, 分别测定相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值, 结果口服液中峰相对保留时间的 RSD 值及相对峰面积的 RSD 值均小于 3%。

2.2.6 稳定性试验 按照“2.2.3”项下制备单煎法双黄连口服液的供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12 h 进样, 每次进样 10 μ L, 分别测定相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值, 结果口服液中峰相对保留时间的 RSD 值及相对峰面积的 RSD 值均小于 3%, 说明样品在 12 h 内稳定。

2.2.7 重复性试验 按照“2.2.3”项下方法制备 5 个平行的单煎法双黄连口服液的供试品溶液, 用 0.45 μ m 微孔滤膜处理后进样, 每次进样 10 μ L, 分别测定相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值, 结果口服液中峰相对保留时间的 RSD 值及相对峰面积的 RSD 值均小于 3%, 说明样品在该方法中重复性较好。

2.2.8 指纹图谱的建立 按照“2.2.3”项下方法将 3 种方法所制备的双黄连口服液, 每种方法各 10 批次, 制备成供试品溶液, 用 0.45 μ m 微孔滤膜处理后进样, 每次进样 10 μ L, 经 HPLC 测定后, 利用

中药色谱指纹图谱相似度软件 2004A 版进行匹配分析后, 选用中位数法作为对照指纹图谱的生成方法, 从而建立不同方法所制备的双黄连口服液的指纹图谱, 并在此基础上, 对于 3 种方法的指纹图谱进行叠加, 从而直观的判断 3 种方法制备的口服液中成分的区别, 结果见图 2。

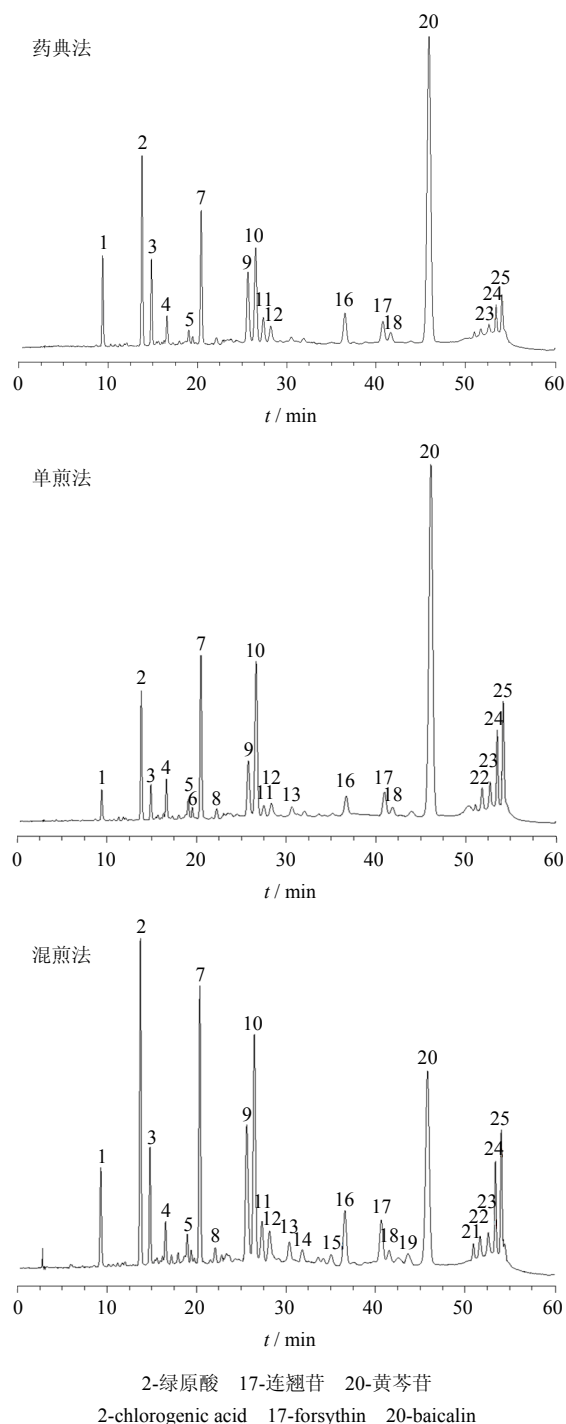


图 2 不同方法制备的双黄连口服液 HPLC 指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprints of SOL prepared with different methods

由图2可知,不同方法所制备的双黄连口服液在成分上有所差别,对峰面积占总峰面积1.5%以上的色谱峰进行标号标记,药典法中标记出17个峰,单煎法中标记出21个峰,混煎法中标记出24个峰,通过图1可知三者具有较多的共同峰,但3种方法所制备的双黄连口服液的指纹图谱在峰面积上有所不同。

2.2.9 相似度分析 利用中药色谱指纹图谱相似度软件2004A版,对每种制备方法各10批次样品和不同制备方法进行整体相似度评价,先设定色谱峰自动匹配,按照中位数法生成对照指纹图谱,结果各方法的10批次样品与对照指纹图谱相比,相似度平均值均大于0.93,证明所建立的对照指纹图谱具有较好的代表性,可用于双黄连口服液的指纹图谱比较测定。对不同制备方法之间的相似度进行计算,结果药典法与单煎法两者的相似度为0.98,说明其相似度较好,而混煎法与药典法和单煎法的相似度分别为0.89、0.86,说明其具有一定的差异。

2.3 双黄连口服液体内血清指纹图谱

2.3.1 色谱条件 Welchrom C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-0.2%磷酸水溶液,洗脱程序:0~30 min, 15%~45%甲醇;45~60 min, 45%~15%甲醇;检测波长:0~21 min为324 nm, 21~42 min为240 nm, 42~60 min为280 nm。Welchrom C₁₈ (10 mm×4.6 mm, 5 μm) 保护柱;体积流量1.0 mL/min;柱温30 ℃;进样量10 μL。

2.3.2 对照品溶液的制备 同“2.2.2”项下。

2.3.3 供试品溶液的制备 同“2.2.3”项下。

2.3.4 含药血清制备 取Wistar雄性大鼠,禁食12 h后,称定质量,根据大鼠的体质量,按照12 μL/g的剂量ig给药,分别于给药后30 min采血。Ip 10%水合氯醛(2 μL/g)。对大鼠进行麻醉,麻醉后,自肝门静脉取血,血液置于3 000 r/min的离心机中,离心10 min后取出,取上层清液,加入丙酮除蛋白,涡旋使血清与丙酮充分混合,10 min后再将血清样品放入12 000 r/min的离心机中离心10 min后取出,收集上层清液,用氮吹仪吹干后,残渣加1 mL 50%甲醇,使溶解后,用0.45 μm微孔滤膜处理后进样,每次进样10 μL,记录色谱图。

2.3.5 空白血清制备 Wistar雄性大鼠,禁食12 h后,称定质量,根据大鼠的体质量,按照12 μL/g的剂量ig蒸馏水,之后按照“2.3.4”项下步骤进行处理。

2.3.6 双黄连口服液血清指纹图谱的建立 将用0.45 μm微孔滤膜处理过的对照品溶液、体外供试品溶液、空白血清、含药血清分别进样,每次进样10 μL,比较不同样品的色谱图,结果见图3。

通过与对照品溶液和体外供试品与含药血清的比较分析,以保留时间作为标准,对含药血清中的色谱峰进行认定,由图4得出,药典法含药血清图谱中在绿原酸、连翘苷和黄芩苷出峰时间处有色谱峰出现;单煎法含药血清图谱中只有绿原酸和连翘

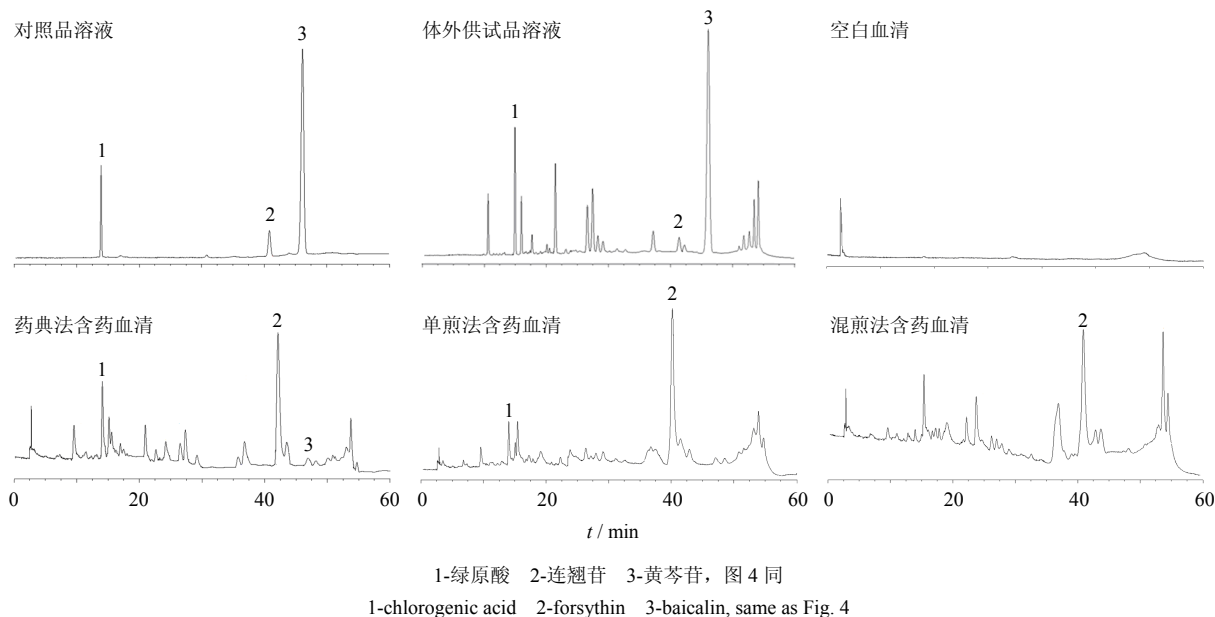


图3 不同样品的HPLC图

Fig. 3 HPLC fingerprints of different samples

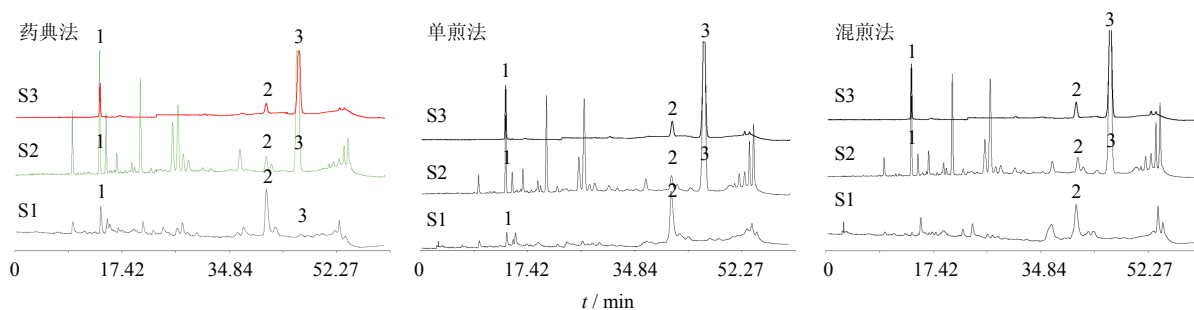


图4 含药血清 (S1)、体外供试品溶液 (S2) 和混合对照品溶液 (S3) 3 种样品叠加的 HPLC 图

Fig. 4 Overlap HPLC fingerprints of serum containing drug (S1), *in vitro* test solution (S2), and mixed reference substance solution (S3)

苷的色谱峰出现；混煎法含药血清图谱中有连翘苷色谱峰出现。

3 结论

3.1 双黄连体外指纹图谱

从双黄连口服液不同制法的 HPLC 指纹图谱叠加图可以看出，单煎法、混煎法、药典法的 HPLC 图并没有太明显的变化，但色谱峰面积特别是混煎法中黄芩苷与另外 2 种方法中黄芩苷相差很多，说明混煎法这种制造工艺对黄芩苷的量有一定的抑制作用；而不同制备方法之间的相似度说明，药典法与单煎法两者指纹图谱相似度较好，而混煎法的图谱则与另外两者的差异度较大。

3.2 双黄连体内血清指纹图谱

利用血清指纹图谱，对给药后大鼠含药血清进行分析研究，通过含药血清、对照品、空白血清和药液的指纹图谱的比较分析，从而对不同方法所制备的双黄连口服液中质控成分是否入血进行判断，结果显示，药典法制备的口服液 3 种指标成分在血清指纹图谱均找到了所属峰，但黄芩苷峰面积较小，说明其入血量不高，可能是由于其在胃中会与胃酸发生苷的酸水解反应，从而导致一部分黄芩苷水解成黄芩素；单煎法中，在 48 min 左右出现疑似黄芩苷的色谱峰，但与对照品和体外指纹图谱中黄芩苷的色谱峰相差 1 min 以上，由于没有进行质谱分析，因此不敢确定。

综上所述，3 种不同制备的双黄连口服液的质控成分体外均能检出，但混煎法制得的双黄连口服液黄芩苷不达标；体内 3 种指标成分除药典法制得的双黄连口服液均检出外，单煎法与混煎法只能检出 1 或 2 种指标成分。结果表明：药典法制备的双黄连口服液，3 种指标成分体内外相关性良好。在本研究范围内，此结果从一定程度上说明了药典法

制备双黄连口服液工艺的优越性。

4 讨论

《中国药典》2010 年版中将双黄连口服液中的指标成分黄芩苷、连翘苷、绿原酸，分别采取了 3 种不同 HPLC 色谱条件进行考察，其供试品溶液的制备方法也比较繁琐。本实验采用 HPLC 变波长梯度洗脱方法，可同时测定双黄连口服液中 3 种指标成分的量。

将药典法所测得的 3 种方法制备的双黄连口服液中指标成分的量与此种变波长梯度洗脱方法所得的量进行配对样品 *t* 检验，结果显示 2 种方法所得结果无显著性差异，为简化指标成分的测定，故本实验选用变波长梯度洗脱方法。

参考文献

- [1] 杜英峰, 张兰桐, 靳怡然, 等. 多波长 RP-HPLC 法测定双黄连口服液中黄芩苷、绿原酸和连翘苷 [J]. 中成药, 2009, 31(9): 1368-1371.
- [2] 周雪梦, 陆春妮, 元文宝, 等. 清开灵和双黄连口服液体内抗禽流感病毒作用 [J]. 中草药, 2011, 42(7): 1351-1356.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [4] 郭洁, 宋殿荣, 宋红运, 等. 双黄连冻干粉针大鼠血清药物成分的初步研究 [J]. 天津中医药, 2010, 27(2): 160-162.
- [5] 李萍, 刘惠如, 黄涛. 中药血清学对中药现代化的意义 [J]. 传统医药, 2007, 16(2): 58.
- [6] 王喜军. 中药血清学学科的形成及发展 [J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2010, 12(4): 632-633.
- [7] 宋金春, 曾俊芬, 胡传芹, 等. 生化汤的血清药物化学研究 [J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(13): 977-979.
- [8] 牟玲丽, 陈丽, 李峰, 等. 基于衰老大鼠模型的银杏叶提取物血清指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2012, 43(4): 690-693.