

银黄滴丸 HPLC 指纹图谱研究

戴德雄, 刘根才, 朱 婷, 纪晓燕, 季玉林, 赵 准

浙江维康药业股份有限公司, 浙江 丽水 323000

摘要: 目的 利用 HPLC 法建立银黄滴丸的指纹图谱。方法 采用色谱柱 Kromasil 100-5C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 ℃, 流动相为乙腈-0.4%磷酸溶液, 进行梯度洗脱, 检测波长为 327 nm; 通过《中药色谱指纹图谱相似度评价软件》(2012) 对 10 批银黄滴丸的指纹图谱进行了相似度计算; 通过药材对照对共有峰进行归属; 通过对照品对照指认共有峰。结果 银黄滴丸 HPLC 指纹图谱有 7 个共有峰, 6 个共有峰 (峰 1、2、3、4、5、6) 来自于金银花药材, 1 个共有峰 (峰 7) 来自黄芩药材; 通过对照品比对, 指认了 7 个成分, 分别为新绿原酸 (峰 1)、绿原酸 (峰 2)、隐绿原酸 (峰 3)、3,4-*O*-二咖啡酰奎宁酸 (峰 4)、3,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸 (峰 5)、4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸 (峰 6)、黄芩苷 (峰 7); 10 批样品相似度均大于 0.9。结论 建立的指纹图谱具有良好的精密度、重复性和稳定性, 可以很好地控制药品质量。

关键词: 银黄滴丸; HPLC; 指纹图谱; 新绿原酸; 绿原酸; 隐绿原酸; 3,4-*O*-二咖啡酰奎宁酸; 3,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸; 4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸; 黄芩苷

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)24-4370-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.24.013

Study on HPLC fingerprint of Yinhuang Drop Pills

DAI De-xiong, LIU Gen-cai, ZHU Ting, JI Xiao-yan, JI Yu-lin, ZHAO Zhun

Zhejiang Wecome Pharmaceutical Company Limited, Lishui 323000, China

Abstract: Objective To establish the specific chromatogram of Yinhuang Drop Pills (YDP) by High performance liquid chromatography. **Methods** The chromatographic column Kromasil 100-5C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used, acetonitrile-0.4% phosphoric acid as mobile phase with gradient elution, and the detection wavelength was 372 nm. Through similarity evaluation software, the similarity of specific chromatogram of 10 batches YDP were calculated. **Results** The HPLC specific chromatogram of YDP showed 7 common peaks, of which 6 peaks (neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, 3,4-*O*-dicaffeoylquinic acid, 3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid, and 4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid) from *Lonicerae Flos*, 1 common peaks (baicalin) from *Scutellariae Radix*; By comparing with the reference substances, identified 7 components, respectively, the neochlorogenic acid (peak 1), chlorogenic acid (peak 2), cryptochlorogenic acid (peak 3), 3,4-*O*-dicaffeoylquinic acid (peak 4), 3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid (peak 5), 4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid (peak 6), baicalin (peak 7). By the methodology validation, verified that this method has good precision, repeatability and stability, 10 batches of sample similarity is greater than 0.9. **Conclusion** This method was available for the quality control of YDP.

Key words: Yinhuang Drop Pills; HPLC; fingerprint; neochlorogenic acid; chlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; 3,4-*O*-dicaffeoylquinic acid; 3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid; 4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid; baicalin

银黄滴丸 (Yinhuang Drop Pills, YDP) 是由金银花提取物和黄芩提取物组成的复方制剂, 具有清热、解毒、消炎的功效, 可用于急慢性扁桃体炎、急慢性咽喉炎、上呼吸道感染等症的治疗^[1-2]。银黄滴丸是由银黄片^[3]改剂型而来, 其质量标准主要利用薄层色谱 (TLC) 法对黄芩苷和绿原酸进行鉴别,

HPLC 法对两者进行定量测定。而黄芩和金银花含有皂苷类和黄酮类等多种化学成分, 仅测定黄芩苷和绿原酸 2 种成分不能客观全面地反映银黄滴丸的内在质量^[4-7]。

中药指纹图谱是中药质量控制的一种有效方法, 是一种多指标的质量控制模式, 包含信息量大,

收稿日期: 2016-06-06

基金项目: 浙江省重大科技专项: 银黄滴丸的二次开发研究 (2014C03011)

作者简介: 戴德雄 (1968—), 男, 浙江缙云人, 高级工程师, 主要研究方向为药品研发、中成药质量控制及分析等。

它可以比较全面地反映所含化学成分的种类和数量,表征中药复杂成分与其内在质量的关系,从而能够全面、综合地反映和控制中药的质量,在中药制剂的质量评价和中药生产的质量控制中有着广泛的应用^[8-17]。为此,本实验采用 HPLC 法建立银黄滴丸的指纹图谱,并采用国家药典委员会推荐的《中药色谱指纹图谱相似度评价软件》(2012)进行相似度评价,为实现其全面质量控制奠定基础^[18-19]。

1 仪器与材料

Agilent 1200 高效液相色谱仪,包括 G1311A 泵、G1329A 进样器、G1314B 检测器、G1316A 柱温箱,美国安捷伦;BS124S 电子分析天平,德国赛多利斯股份公司;KQ-500DB 超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司。

乙腈为色谱纯,水为纯净水,其他试剂为分析纯。对照品新绿原酸(质量分数≥98.0%,批号 PRF7051143)、隐绿原酸(质量分数≥98.0%,批号 15020203)、3,4-*O*-二咖啡酰奎宁酸(3,4-*O*-DA,质量分数≥98.0%,批号 1542210),成都普瑞科技发展有限公司;对照品绿原酸(质量分数以 96.2%计,批号 110753-201415)、3,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸(3,5-*O*-DA,质量分数以 92.0%计,批号 111782-201405)、4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸(4,5-*O*-DA,质量分数以 94.1%计,批号 111894-201102)、黄芩苷(质量分数以 93.3%计,批号 110715-201318),中国食品药品检定研究院。银黄滴丸样品 10 批(批号 B150602、B150606、B150608、B150910、B151002、B151221、B160304、B160306、B160325、B160505,分别编号 S1~S10)由浙江维康药业股份有限公司提供。

金银花样品(批号为 20160401)于 2016 年 4 月 14 日购于安徽纪淞堂中药饮片有限公司,经浙江维康药业股份有限公司李建良副主任中药师鉴定为忍冬科忍冬属植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花;黄芩样品(批号为 160323)于 2016 年 04 月 20 日购于安徽纪淞堂中药饮片有限公司,经浙江维康药业股份有限公司李建良副主任中药师鉴定为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Kromasil 100-5C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),柱温 30 °C,流动相为乙腈-0.4%磷酸溶液,梯度洗脱:0~15 min, 5%~20%乙腈;15~

30 min, 20%~30%乙腈;30~40 min, 30%乙腈;检测波长 327 nm;理论塔板数按绿原酸峰计不低于 2 000。

2.2 供试品溶液的制备

取本品适量,研细,取约 0.6 g,精密称定,置 100 mL 棕色量瓶中,加 50%甲醇约 80 mL,超声处理(功率 500 W,频率 40 kHz) 30 min,放冷,加 50%甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 对照品溶液的制备

取绿原酸对照品适量,精密称定,置棕色量瓶中,加 50%甲醇制成含绿原酸 40 μg/mL 的对照品溶液,即得。

2.4 银黄滴丸指纹图谱的建立及相似度研究

2.4.1 参照峰的选择 绿原酸为银黄滴丸中主要药理活性成分之一,且参照《中国药典》2015 年版银黄片的指纹图谱测定方法^[20],确定绿原酸峰为 HPLC 指纹图谱的参照峰,色谱图见图 1-A。

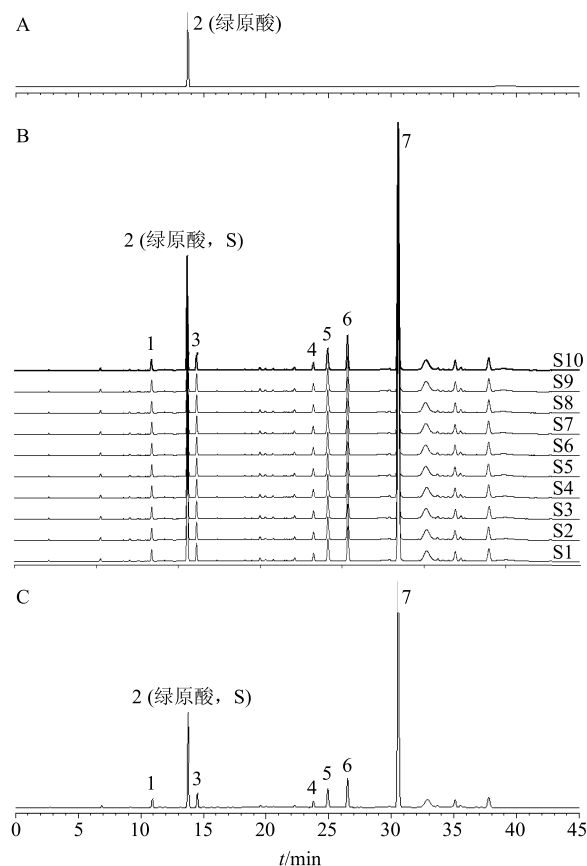


图 1 绿原酸对照品 HPLC 谱图 (A)、10 批银黄滴丸指纹图谱 (B) 和银黄滴丸对照指纹图谱 (C)

Fig. 1 HPLC of chlorogenic acid reference substance (A), HPLC fingerprint of 10 batches of YDP (B), and HPLC specific chromatogram of YDP (C)

2.4.2 重复性试验 取同一批样品 (B150602), 按“2.2”项下方法同时制备 6 份供试品溶液, 分别进样测定。结果表明, 各共有峰的相对保留时间 RSD 在 0.05%~0.10%, 相对峰面积 RSD 在 0.47%~0.90%, 符合指纹图谱的要求, 表明重复性良好。

2.4.3 精密度试验 取同一供试品 (B150602) 溶液, 连续进样 6 次, 参照《中国药典》2015 年版银黄片的指纹图谱测定方法^[20], 以绿原酸作为参照峰, 考察各共有峰的相对保留时间及相对峰面积的一致性。结果表明, 各共有峰的相对保留时间 RSD 在 0.05%~0.09%, 相对峰面积 RSD 在 0.14%~0.74%, 符合指纹图谱的要求, 表明精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 取同一份 (B150602) 供试品

溶液, 分别在 0、4、8、12、15、24 h 进样测定。结果表明, 各共有峰的相对保留时间和相对峰面积无明显变化, 各共有峰的相对保留时间 RSD 在 0.02%~0.13%, 相对峰面积 RSD 在 0.11%~0.57%, 表明供试品溶液至少在 24 h 内稳定。

2.4.5 指纹图谱的建立 10 批样品指纹图谱的色谱峰均在 40 min 内全部出完。对所得指纹图谱进行分析, 选择稳定性好, 吸收强, 特征明显的色谱峰为参照峰 (2 号峰, S), 参照《中国药典》2015 年版银黄片的指纹图谱测定方法^[20], 确定供试品色谱的共有峰为 7 个, 计算各共有峰与 S 峰的相对保留时间和相对峰面积, 色谱图见图 1-B。各共有峰相对保留时间与相对峰面积见表 1、2。

表 1 指纹图谱共有峰相对保留时间

Table 1 Fingerprint common peak relative retention time

峰号	相对保留时间										RSD/%
	B150602	B150606	B150608	B150910	B151002	B151221	B160304	B160306	B160325	B160505	
1	0.794	0.794	0.794	0.794	0.794	0.794	0.794	0.794	0.794	0.793	0.04
2 (S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
3	1.054	1.054	1.054	1.053	1.054	1.054	1.053	1.054	1.054	1.054	0.04
4	1.731	1.729	1.730	1.727	1.727	1.727	1.726	1.728	1.728	1.729	0.09
5	1.814	1.813	1.813	1.811	1.810	1.810	1.809	1.812	1.812	1.812	0.09
6	1.929	1.928	1.928	1.926	1.925	1.925	1.924	1.926	1.926	1.927	0.08
7	2.221	2.220	2.220	2.218	2.217	2.218	2.216	2.219	2.219	2.220	0.07

表 2 指纹图谱共有峰相对峰面积

Table 2 Fingerprint common peak relative peak area

峰号	相对峰面积										RSD/%
	B150602	B150606	B150608	B150910	B151002	B151221	B160304	B160306	B160325	B160505	
1	0.102	0.102	0.103	0.102	0.103	0.102	0.102	0.102	0.102	0.102	0.19
2 (S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
3	0.152	0.151	0.152	0.152	0.151	0.152	0.151	0.150	0.151	0.151	0.33
4	0.085	0.084	0.084	0.084	0.086	0.084	0.085	0.084	0.086	0.085	0.90
5	0.280	0.278	0.278	0.276	0.284	0.280	0.280	0.277	0.282	0.281	0.84
6	0.399	0.399	0.397	0.396	0.401	0.396	0.398	0.397	0.401	0.400	0.52
7	3.257	3.205	3.252	3.225	3.254	3.375	3.204	3.372	3.385	3.401	2.43

2.4.6 相似度计算 相似度是评价中药指纹图谱的一个重要参数, 运用《中药色谱指纹图谱相似度评价软件》(2012), 对 10 批次银黄滴丸的 HPLC 指纹图谱进行分析, 建立银黄滴丸 HPLC 指纹图谱的对照图谱, 见图 1-C。各样品 (批号 B150602、B150606、B150608、B150910、B151002、B151221、B160304、B160306、B160325、B160505) 指纹图谱与该对照图谱比较, 得到相似度均为 1.0。

2.5 指纹图谱中共有峰的药材归属与指认

2.5.1 对照品溶液的制备 取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、3,4-*O*-DA、3,5-*O*-DA、4,5-*O*-DA、黄芩苷对照品适量, 加 50%乙醇分别制成含新绿原酸 23.30 μg/mL、绿原酸 49.18 μg/mL、隐绿原酸 50.61 μg/mL、3,4-*O*-DA 50.18 μg/mL、3,5-*O*-DA 48.65 μg/mL、4,5-*O*-DA 48.29 μg/mL、黄芩苷 50.85 μg/mL 的对照品溶液。

2.5.2 单味药材溶液的制备 取金银花药材 532.4 mg、黄芩药材 292.5 mg，置 100 mL 棕色量瓶中，加 50%甲醇约 80 mL，超声处理（功率 500 W，频率 40 kHz）30 min，放冷，加 50%甲醇至刻度，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.5.3 共有峰的药材归属与指认 取“2.5.1”及“2.5.2”项下制备的溶液，按“2.1”项下色谱条件进样分析，通过保留时间分析，指纹图谱中标定的 7 个共有峰中 1、2、3、4、5、6 号峰来自金银花药材，7 号峰来自黄芩药材。通过与 7 种对照品谱图比对，其中 1 号峰为新绿原酸，2 号峰为绿原酸，3 号峰为隐绿原酸，4 号峰为 3,4-*O*-DA，5 号峰为 3,5-*O*-DA，6 号峰为 4,5-*O*-DA，7 号峰为黄芩苷。色谱图见图 2。

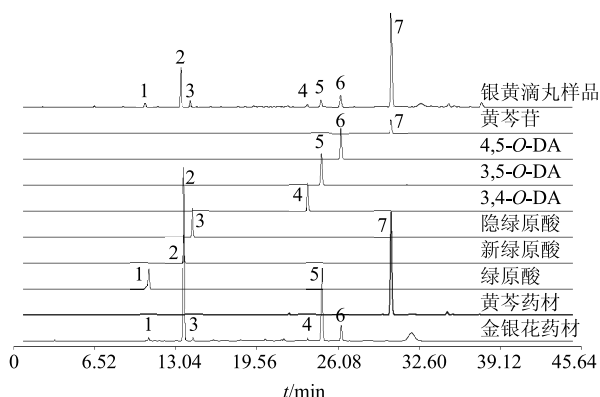


图 2 银黄滴丸 HPLC 指纹图谱中各共有峰归属

Fig. 2 Each common peak attribution in fingerprint of YDP

3 讨论

分别考察了 50%甲醇、50%乙醇提取溶剂及 20、30、40 min 超声提取时间对结果的影响，结果表明以 50%甲醇为提取溶剂，超声 30 min 即可^[21]。

实验曾选择了 3 种不同厂家的色谱柱(Kromasil 100-5C₁₈, 250 mm×4.6 mm, 5 μm; Agilent extend-C₁₈, 250 mm×4.6 mm, 5 μm; 依利特 Hypersil BDS C₁₈, 250 mm×4.6 mm, 5 μm)，考察了方法的耐用性。各组分在 3 种不同厂家的色谱柱中出峰顺序一致，理论板数、分离度均能较好地满足系统适用性要求，表明所采用的色谱条件耐用性良好，综合对称因子等各因素本实验选择 Kromasil 100-5C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱。

10 批样品相似度结果均为 1.0，本实验所建立的银黄滴丸指纹图谱检测方法灵敏、简便、快速，可有效地控制药品质量。

参考文献

- [1] 郑敏霞, 诸葛周, 戴德雄, 等. HPLC 法测定银黄滴丸中绿原酸和黄芩苷 [J]. 中草药, 2011, 42(6): 1138-1140.
- [2] 彭芸, 戴德雄, 朱莹. 银黄滴丸、银黄颗粒和银黄胶囊体外溶出度比较研究 [J]. 中草药, 2012, 43(6): 1122-1124.
- [3] 卫生部药品标准中药成方制剂第六册 [S]. 1989.
- [4] 宋亚玲, 倪付勇, 赵玮武, 等. 金银花化学成分研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(24): 3656-3664.
- [5] 夏远, 李弟灶, 裴振昭, 等. 金银花化学成分的研究进展 [J]. 中国现代中药, 2012, 14(4): 26-32.
- [6] 刘志辉, 李俊生, 郑啸, 等. 透皮促渗剂对黄芩总黄酮凝胶膏剂成分体外经皮渗透的影响 [J]. 中草药, 2015, 46(18): 2703-2711.
- [7] 王雅芳, 李婷, 唐正海, 等. 中药黄芩的化学成分及药理研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(1): 206-211.
- [8] Chen F F, Qi H Y, Shi Y P. Fingerprint analysis of *Codonopsis Radix* by HPLC coupled with chemometrics analysis [J]. *Chin Herb Med*, 2013, 5(4): 307-312.
- [9] 胡恩明. 黑骨藤指纹图谱及谱效关系探索性研究 [D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2016.
- [10] 王飒, 盛萍, 姚蓝, 等. 维药多伞阿魏体外抗胃癌活性部位 GC-MS 指纹图谱的研究 [J]. 中草药, 2015, 46(19): 2874-2879.
- [11] Xie R F, Zhao Q H, Li Z C, et al. Comparison on HPLC fingerprints between *Fraxini Cortex* and its eye drop [J]. *Chin Herb Med*, 2013, 5(4): 301-306.
- [12] 古文杰. 两色金鸡菊头状花序聚块部位主要成分及指纹图谱研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- [13] 朱文荣, 李松. 炒牛蒡子配方颗粒的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(2): 158-161.
- [14] 秦红霖, 李永申. 特征图谱技术在中药质量分析中的应用 [J]. 中国实用医药, 2014, 9(7): 253-255.
- [15] 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.
- [16] 王雪. 五味子咀嚼片质量控制及其 HPLC-DAD 指纹图谱研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2015.
- [17] 黄文芳, 石召华, 陈立军. 指纹图谱技术评价不同干燥方式对地龙氨基酸组分提取物的影响 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(3): 297-301.
- [18] 中药注射剂色谱指纹图谱实验研究操作规程指南 (试行) [S]. 2001.
- [19] 侯小平, 何新新, 苏薇薇. 中药指纹图谱的控制技术 [J]. 中药材, 2001, 24(5): 370-371.
- [20] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [21] 黄雄, 黄嫒, 王峻, 等. 银黄颗粒的 HPLC 特征图谱分析 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(8): 1320-1323.