

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.19.019

香菊片质量控制研究

李 春, 贾文江, 李 宏, 刘 峥

(陕西省商洛市药品检验所, 陕西 商洛 726000)

摘要:目的 建立香菊片的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,以及同时测定其中9种主要功效成分(没食子酸、绿原酸、咖啡酸、升麻素苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、迷迭香酸、蒙花苷、甘草酸铵)含量的方法。方法 色谱柱为 Kromasil100-5-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.5%磷酸水溶液(梯度洗脱),流速为0.8 mL/min,检测波长为230 nm,柱温为40℃,进样量为5 μL。结果 香菊片的HPLC指纹图谱共标定18个共有峰,指认了其中9个指标成分,各批次样品与指纹图谱共有模式的相似度均大于0.950。没食子酸、绿原酸、咖啡酸、升麻素苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、迷迭香酸、蒙花苷、甘草酸铵的质量浓度分别在各自线性范围内与峰面积线性关系良好($R^2 \geq 0.9983$, $n=6$);检测限介于0.011~0.053 ng,定量限介于0.037~0.192 ng;精密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于2%($n=6$);平均加样回收率介于100.24%~100.70%,RSD介于0.20%~0.53%($n=6$)。结论 该方法操作简便,结果准确,重复性和稳定性均较好,可用于香菊片的质量控制。

关键词:香菊片;指纹图谱法;高效液相色谱法;多成分定量分析;质量控制

中图分类号:R932;R286.0

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)19-0073-05

Quality Control of Xiangju Tablets

Li Chun, Jia Wenjiang, Li Hong, Liu Zheng

(Shangluo Pharmaceutical Inspection Institute, Shangluo, Shaanxi, China 726000)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography(HPLC) fingerprint of Xiangju Tablets, and to determine the content of nine main active ingredients(gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, prim-O-glucosylcimifugin, calycosin-7-O-glucoside, 5-O-methylvisammioside, rosmarinic acid, buddleioside, ammonium glycyrrhetate) in Xiangju Tablets. **Methods** The chromatographic column was Kromasil100-5-C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.5% phosphoric acid solution with gradient elution, the flow rate was 0.8 mL/min, the detection wavelength was 230 nm, the column temperature was 40℃, and the injection volume was 5 μL. **Results** There were 18 common peaks in the HPLC fingerprint of Xiangju Tablets, and nine index components were identified. The similarity among each batch of samples and the common pattern of fingerprint was greater than 0.950. The gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, prim-O-glucosylcimifugin, calycosin-7-O-glucoside, 5-O-methylvisammioside, rosmarinic acid, buddleioside, ammonium glycyrrhetate showed a good linear relationship with the peak area in their respective mass concentration range($R^2 \geq 0.9983$, $n=6$). The limit of detection(LOD) was in the range of 0.011-0.053 ng and the limit of quantitation(LOQ) was in the range of 0.037-0.192 ng. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 2%($n=6$). The average recoveries of gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, prim-O-glucosylcimifugin, calycosin-7-O-glucoside, 5-O-methylvisammioside, rosmarinic acid, buddleioside, ammonium glycyrrhetate were in the range of 100.24%-100.70% with RSDs of 0.20%-0.53%($n=6$). **Conclusion** The method is simple, accurate, reproducible and stable, which can be used for the quality control of Xiangju Tablets.

Key words: Xiangju Tablets; fingerprints; HPLC; multi-component quantitative analysis; quality control

香菊片由化香树果序(除去种子)、夏枯草、野菊花、黄芪、辛夷、防风、白芷、甘草、川芎9味中药提取制成,功能辛散祛风、清热通窍,用于治疗急、慢性鼻窦炎和慢性鼻炎。目前香菊片已收录的标准只有黄芪中主要成分黄芪甲苷的含量测定,但不能全面、准确地评价产品质量^[1]。中药指纹图谱运用现代分析技术以图形的形式表达中药化学信息,具有整体性和模糊性的特点,全面呈现了中药各成分间的相互作用,高效、准确、全面^[2]。本研究中采用高效液相色谱(HPLC)法测定香菊片中没食子酸、绿原酸、咖啡酸、升麻素苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、迷迭香酸、蒙花苷、甘草酸铵9种主要功效成分的含量,并建立了香菊片指纹图谱

共有模式,对其共有峰进行指认和归属确定。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 Infinity II型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);Sartorius SQP型电子天平(赛多利斯科学仪器<北京>有限公司,精度为0.1 mg);KQ-250DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为250 W,频率为40 kHz);RS30UVE型实验室超纯水机(上海和泰仪器有限公司)。

1.2 试剂

没食子酸对照品(批号为110831-201605,含量以90.8%计),咖啡酸对照品(批号为110885-201703,含

量以 99.7% 计), 绿原酸对照品(批号为 110753-201817, 含量以 96.8% 计), 升麻素苷对照品(批号为 111523-201712, 含量以 97.4% 计), 毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品(批号为 111920-201606, 含量以 97.6% 计), 5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品(批号为 111523-201811, 含量以 97.4% 计), 迷迭香酸对照品(批号为 111871-201706, 含量以 90.5% 计), 蒙花苷对照品(批号为 111528-201710, 含量以 96.6% 计), 甘草酸铵对照品(批号为 111731-201720, 含量以 97.7% 计), 辛夷对照药材(批号为 121079-201205), 防风对照药材(批号为 120947-201810), 夏枯草对照药材(批号为 120993-201306), 黄芪对照药材(批号为 121462-201705), 均购于中国食品药品检定研究院; 化香树果序对照药材(广元市黎生中药材专业合作社, 批号为 Z190801), 香菊片(批号分别为 181003, 191110, 191201, 191203, 191204, 191208, 191209, 规格为每片 0.32 g), 均购自陕西香菊药业集团有限公司; 乙腈(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 甲醇、磷酸(分析纯, 成都市科隆化学有限公司); 超纯水(实验室自制)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[3-7]

色谱柱: Kromasil00-5-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.5% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(程序见表 1); 流速: 0.8 mL/min; 检测波长: 230 nm; 柱温: 40 °C; 进样量: 5 μL。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution program of the mobile phase

时间	流动相 A	时间	流动相 A
0 ~ 10 min	8% → 12%	75 ~ 80 min	32% → 40%
10 ~ 30 min	12% → 18.3%	80 ~ 90 min	40% → 50%
30 ~ 40 min	18.3%	90 ~ 100 min	50% → 60%
40 ~ 55 min	18.3% → 24.5%	100 ~ 105 min	60% → 65%
55 ~ 65 min	24.5% → 27.5%	105 ~ 115 min	65% → 8%
65 ~ 75 min	27.5% → 32%		

2.2 溶液制备

取没食子酸、绿原酸、咖啡酸、升麻素苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、迷迭香酸、蒙花苷、甘草酸铵对照品各适量, 精密称定, 加甲醇溶解并定容, 制成质量浓度分别为 23.1540, 16.2624, 11.9640, 11.882 8, 16.396 8, 11.103 6, 19.005 0, 27.434 0, 23.448 0 μg/mL 的混合对照品溶液。取 7 批样品, 各 20 片, 除去包衣, 研细, 取粉末 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定质量, 超声处理(功率为 250 W, 频率为 40 kHz)45 min, 取出, 放冷, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 即得供试品溶液。取对照药材化香树果序、辛夷、防风、夏枯草、黄芪, 按制备工艺煎煮

2 次, 合并煎液, 浓缩至干, 加 60% 乙醇 30 mL, 过滤, 低温蒸干, 用甲醇 5 mL 溶解, 滤过, 取续滤液作为对照药材溶液。取除化香树果序(除去种子)、辛夷、防风、夏枯草、黄芪及其他药材, 按香菊片处方工艺制备阴性样品, 按供试品溶液制备方法制备阴性对照药材溶液。

2.3 指纹图谱建立及分析

2.3.1 方法学考察

精密度试验: 取同一批(批号为 191208)样品, 依法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定 6 次, 记录色谱图。结果以迷迭香酸色谱峰为参照峰, 各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.73% (n=6), 相对峰面积的 RSD 均小于 1.51% (n=6), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 取同一批(批号为 191208)样品, 依法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 时进样测定, 记录色谱图。结果以迷迭香酸色谱峰为参照峰, 各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.51% (n=6), 相对峰面积的 RSD 均小于 1.44% (n=6), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

重复性试验: 取同一批(批号为 191208)样品, 依法制备供试品溶液, 共 6 份, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果以迷迭香酸色谱峰为参照峰, 各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.82% (n=6), 相对峰面积的 RSD 均小于 1.52% (n=6), 表明方法重复性好。

2.3.2 指纹图谱建立及相似度评价

取 6 批样品(编号为 S1-S6), 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。详见图 1。将 6 份指纹图谱依次导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012A 版)软件, 采用中位数法, 设定时间窗口为 0.1, 经多点校正, 生成指纹图谱共有模式, 共得到 18 个共有峰。详见图 2。以 6 批样品生成的指纹图谱共有模式为对照图谱, 计算各谱图与共有模式的相似度。结果 6 批指纹图谱的相似度分别为 0.965, 0.973, 0.976, 0.964, 0.969, 0.977。

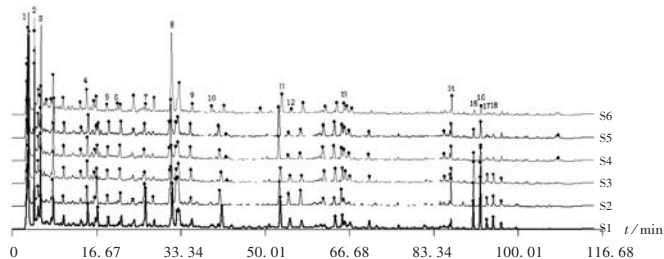


图 1 样品高效液相色谱叠加指纹图谱

Fig. 1 HPLC superimposed fingerprints of the sample

2.3.3 共有峰指认与归属

取 2.2 项下混合对照品溶液和对照药材溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 并与指纹图谱共有模式中

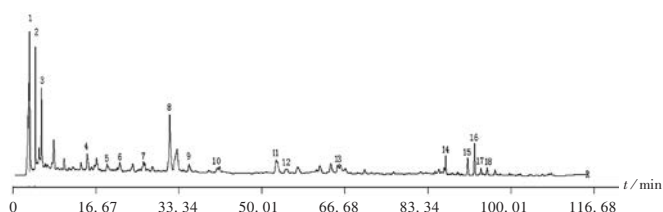


图2 高效液相色谱指纹图谱共有模式

Fig. 2 The common pattern of HPLC fingerprints

各主要共有峰进行对比。以保留时间为评价指标,指出指纹图谱共有模式中3,4,5,7,8,10,11,13,14号特征峰分别为没食子酸、绿原酸、咖啡酸、升麻素苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、迷迭香酸、蒙花苷、甘草酸铵;与同样条件下测得的对照药材的指纹图谱进行比较,确认1,2,3号峰来源于化香树果序,5,11号峰来源于夏枯草,7,9,10号峰来源于防风,8号峰来源于黄芪,4,6,12,15,16,17,18号峰来源于辛夷。详见图3。

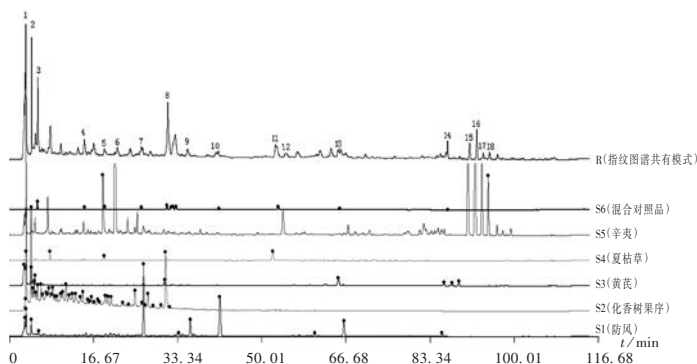


图3 指纹图谱叠加图

Fig. 3 Superimposed fingerprints

2.4 含量测定

2.4.1 方法学考察

专属性试验:取2.2项下3种溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图(见图4)。结果供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相同保留时间处有相应

色谱峰出现,理论板数按迷迭香酸峰(11号峰)计均大于3000。

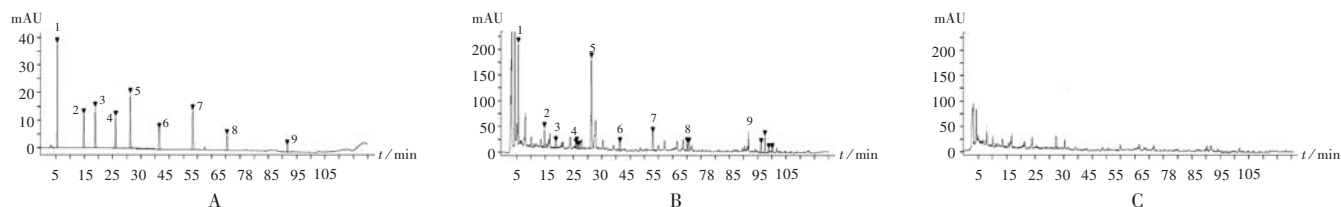
线性关系考察及检测限(LOD)和定量限(LOQ)确定:精密吸取没食子酸、绿原酸、咖啡酸、升麻素苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、迷迭香酸、蒙花苷、甘草酸铵质量浓度分别为154.3600, 65.0500, 11.9640, 11.8828, 81.9840, 11.1036, 19.0050, 27.4340, 234.4800 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液1,2,5,10,15,20 mL,分别置20 mL容量瓶中,加甲醇稀释并定容,摇匀,按2.1项下色谱条件测定,记录色谱图。以各组分对照品质量浓度($X, \mu\text{g/mL}$)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。取2.2项下混合对照品溶液,用甲醇逐步稀释,按各组分色谱峰信噪比(S/N)分别为3:1和10:1时测定LOD和LOQ。结果见表2。

精密试验:取2.2项下混合对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果见表2,表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一批(批号为191208)样品,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件分别于0,2,4,8,12,24 h时进样测定,记录峰面积。结果见表2,表明供试品溶液在24 h内稳定。

重复性试验:取同一批(批号为191208)样品,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,平行6份,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果见表2,表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为191208)1 g,精密称定,共6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,分别精密加入没食子酸、绿原酸、咖啡酸、升麻素苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、迷迭香酸、蒙花苷、甘草酸铵对照品适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算各成分平均加样回收率。结果见表2。



1. 没食子酸 2. 绿原酸 3. 咖啡酸 4. 升麻素苷 5. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 6. 5-O-甲基维斯阿米醇苷 7. 迷迭香酸
8. 蒙花苷 9. 甘草酸铵

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照药材溶液

图4 高效液相色谱图

1. gallic acid 2. chlorogenic acid 3. caffeic acid 4. prim-O-glucosylcimifugin 5. calycosin-7-O-glucoside 6. 5-O-methylvisammioside
7. rosmarinic acid 8. buddleoside 9. ammonium glycyrrhetate

A. Mixed reference solution B. Test solution C. Negative reference medicinal materials solution

Fig. 4 HPLC chromatograms

表2 香菊片中9种成分含量测定方法学考察结果($n=6$)

Tab. 2 Results of the methodological investigations of the content determination of the content determination of nine components in Xiangju Tablets($n=6$)

成分	线性回归方程	R^2	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	LOD (ng)	LOQ (ng)	RSD(%)		重复性试验		加样回收试验	
						精密性试验	稳定性试验	含量(mg/g)	RSD(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
A	$Y=56.704X-8.007$	0.999 5	7.718 0~154.360 0	0.016	0.045	0.56	0.61	1.372 1	0.52	100.25	0.25
B	$Y=35.287X-7.115$	0.999 1	3.252 0~65.050 0	0.020	0.062	0.51	0.49	1.008 7	0.60	100.70	0.43
C	$Y=69.820X-5.927$	0.999 4	0.598 2~11.960 0	0.011	0.037	0.85	0.72	0.221 5	0.90	100.55	0.33
D	$Y=55.906X+1.529$	0.999 8	0.594 1~11.880 0	0.017	0.053	0.77	0.70	1.077 7	0.83	100.24	0.49
E	$Y=71.392X+6.640$	0.999 8	4.099 0~81.980 0	0.013	0.042	0.62	0.59	1.076 6	0.66	100.54	0.34
F	$Y=53.496X+2.487$	0.998 4	0.555 2~11.100 0	0.019	0.058	0.40	0.43	0.815 1	0.52	100.68	0.34
G	$Y=61.706X-5.899$	0.999 6	0.950 2~19.000 0	0.014	0.044	0.64	0.81	0.918 0	0.68	100.67	0.53
H	$Y=19.029X-4.854$	0.998 3	1.372 0~27.430 0	0.028	0.074	0.17	0.64	1.270 3	0.70	100.40	0.20
I	$Y=4.092X-8.156$	0.999 8	11.720 0~234.480 0	0.053	0.192	0.49	0.58	2.138 4	0.56	100.34	0.26

注:A为没食子酸,B为绿原酸,C为咖啡酸,D为升麻素苷,E为毛蕊异黄酮葡萄糖苷,F为5-O-甲基维斯阿米醇苷,G为迷迭香酸,H为蒙花苷,I为甘草酸铵。表3同。

Note:A is gallic acid,B is chlorogenic acid,C is caffeic acid,D is prim-O-glucosylcimifugin,E is calycosin-7-O-glucoside,F is 5-O-methylvisammioside,G is rosmarinic acid,H is buddleoside,I is ammonium glycyrrhetate, as well as Tab. 3.

表3 香菊片中9种成分含量测定结果(mg/g, $n=3$)

Tab. 3 Determination results of nine components in Xiangju Tablets(mg/g, $n=3$)

批号	A	B	C	D	E	F	G	H	I
181003	1.372 1	1.008 7	0.221 5	1.077 7	1.076 6	0.815 1	0.918 0	1.270 3	2.138 4
191201	0.865 7	0.879 7	0.312 5	0.314 8	0.840 2	0.330 9	0.720 6	1.202 7	3.229 6
190203	0.980 8	0.713 0	0.267 6	0.524 0	1.197 0	0.572 8	0.852 6	1.730 4	6.547 8
191204	0.864 2	0.870 4	0.413 6	0.357 1	0.796 1	0.343 7	0.908 0	1.219 1	2.981 1
191208	2.613 0	0.908 1	0.155 8	0.173 2	2.734 3	0.332 4	0.703 5	1.214 4	4.347 6
191209	1.755 6	0.865 3	0.159 1	0.173 7	2.133 5	0.281 8	0.614 2	0.965 6	4.558 7
191110	0.843 3	0.764 9	0.245 9	0.235 0	0.763 6	0.341 4	0.438 7	1.514 2	3.367 2

2.4.2 样品含量测定

取7批香菊片样品各适量,依法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定3次,记录色谱图,按外标法分别计算各成分的含量。结果见表3。

3 讨论

考察了不同提取方法(超声提取和加热回流提取),不同提取时间(30,45,60 min),不同流速(0.6,0.8,1.0 mL/min),不同柱温(25,30,35,40 $^{\circ}\text{C}$),不同进样量(5,10,20 μL),不同流动相体系(甲醇、乙腈、不同比例磷酸水溶液),不同检测波长(190~400 nm)对含量测定结果的影响。综合色谱峰基线平稳,保留时间适中,峰形及峰分离情况,最终选择2.1项下色谱条件。

本研究中测定了6批香菊片的指纹图谱,并采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012A版)建立了指纹图谱的共有模式,相似度比较结果显示,不同批次香菊片的差异较小,表明其质量较稳定。采用中位数法,经多点校正,自动匹配生成了18个共有峰,指认其中的9个指标成分,分别为没食子酸、绿原酸、咖啡酸、升麻素苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、5-O-甲基维斯阿米

醇苷、迷迭香酸、蒙花苷、甘草酸铵。现代药理学研究表明,上述9种成分主要具有抗炎、抗过敏的药理学作用,与香菊片的药效相关,能较好地反映产品质量^[8-11]。

综上所述,建立的方法操作简便,结果准确,重复性和稳定性均较好,可用于香菊片的质量控制,可为其选料、生产、储存、检验等过程的质量控制提供参考。

参考文献

- [1] WS₃-15(Z-06)-2001(Z)-1,国家食品药品监督管理局国家药品标准:散剂标准香菊片[S].
- [2] 杨方良,张晶,孙国祥,等. 中药组方指纹图谱研究方法和思路[J]. 色谱,2016,34(7):715-725.
- [3] 魏红立,刘俊霞,吕勤芝. HPLC法测定香菊片中没食子酸的含量[J]. 河北医药,2015,37(22):3499-3501.
- [4] 王巧清. 基于指纹图谱分析和多成分同时定量的玉屏风丸质量评价[J]. 中国药业,2020,29(5):111-116.
- [5] 肖何芳. 抗炎退热片高效液相色谱指纹图谱的建立及其7种成分含量测定[J]. 中国药业,2020,29(21):62-66.
- [6] 夏伯候,严冬,曹艺,等. 不同剂型夏桑菊颗粒HPLC指纹图谱及其共有模式识别分析[J]. 中国中药杂志,2016,41(3):416-420.