

中图分类号: R932; R284.1; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)19-0104-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.19.022



金莲花口服液高效液相色谱指纹图谱建立及指标成分含量测定

潘 燕

(浙江康恩贝制药股份有限公司·浙江省中药制药技术重点实验室, 浙江 金华 321109)

摘要:目的 建立金莲花口服液的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱和多成分定量方法。方法 以荜草苷峰为参照,建立18批金莲花口服液的HPLC指纹图谱,确定共有峰,采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)评价相似度。采用HPLC法,测定荜草素-2''-O-β-L-半乳糖苷、荜草苷、牡荆苷、槲皮素的含量。结果 18批样品有22个共有峰,相似度均不低于0.988;指认2号峰为荜草素-2''-O-β-L-半乳糖苷,4号峰为荜草苷,8号峰为牡荆苷,17号峰为槲皮素。18批样品中,荜草素-2''-O-β-L-半乳糖苷、荜草苷、牡荆苷、槲皮素的含量分别为(2.54±0.22)mg/mL、(3.12±0.37)mg/mL、(0.79±0.06)mg/mL、(0.28±0.04)mg/mL。结论 所建立的HPLC指纹图谱和多成分定量方法快速简便,可用于金莲花口服液的质量控制。

关键词:金莲花口服液;高效液相色谱法;指纹图谱;荜草素-2''-O-β-L-半乳糖苷;荜草苷;牡荆苷;槲皮素

Establishment of HPLC Fingerprint and Content Determination of Indicator Components of Jinlianhua Oral Liquid

PAN Yan

(Zhejiang CONBA Pharmaceutical Co., Ltd. · Zhejiang Provincial Key Laboratory of Pharmaceutical Technology in TCM, Jinhua, Zhejiang, China 321109)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint and multi-component quantitative method for Jinlianhua Oral Liquid. **Methods** HPLC fingerprints of 18 batches of Jinlianhua Oral Liquid was established with the orientin peak as a reference. The common peaks were identified and the similarity was evaluated by the Similarity Evaluation System of Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (Version 2012). HPLC was used to determine the contents of 2''-O-β-L-galactopyanosylorientin, orientin, vitexin, and quercetin. **Results** A total of 22 common peaks were identified from the fingerprints of 18 batches of samples, with a similarity of no less than 0.988. It was identified that peak 2 was 2''-O-β-L-galactopyanosylorientin, peak 4 was orientin, peak 8 was vitexin, peak 17 was quercetin. Among 18 batches of samples, the contents of 2''-O-β-L-galactopyanosylorientin, orientin, vitexin, and quercetin were (2.54±0.22) mg/mL, (3.12±0.37) mg/mL, (0.79±0.06) mg/mL, and (0.28±0.04) mg/mL, respectively. **Conclusion** The established HPLC fingerprint and multi-component quantitative method for Jinlianhua Oral Liquid were fast and simple, which can be used for the quality control of Jinlianhua Oral Liquid.

Key words: Jinlianhua Oral Liquid; HPLC; fingerprint; 2''-O-β-L-galactopyanosylorientin; orientin; vitexin; quercetin

金莲花口服液是由毛茛科植物金莲花 *Trollius chinensis* Bge. 的干燥花制成的单方制剂^[1],含有黄酮类和生物碱类成分,具有良好的清热、解毒、消肿、抗菌、抗病毒作用,可用于上呼吸道感染、扁桃体炎、咽炎、口疮、急性鼓膜炎、急性淋巴管炎等疾病的治疗^[2]。目前,除口服剂型外,片剂、胶囊剂、颗粒剂等其他剂型均收载于《中

国药典(一部)》,并以荜草苷(C₂₁H₂₀O₁₁)为指标成分控制含量^[1]。指纹图谱技术可对中药制剂中的各类成分进行分析,在有效成分难以明确的情况下,能较全面地反映中药制剂中所含化学成分组成及占比,在评价质量一致性及产品稳定性方面具有明显优势^[3-8]。为此,本研究建立了金莲花口服液的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,

第一作者:潘燕,女,大学本科,工程师,研究方向为药品质量控制,(电子信箱)panyan@conbapharm.com。

贵州医科大学学报,2017,42(10):1145-1148.
[8] 林启凤,张娜,叶廷秀,等. 天胡荽化学成分的研究[J]. 中成药,2020,42(1):120-123.
[9] 蒲首丞,郭远强,高文远. 天胡荽化学成分的研究[J]. 中草药,2010,41(9):1440-1442.
[10] 吴柳春,黄桂华,覃子龙. 天胡荽药材质量标准研究[J]. 中国药品标准,2008,9(4):256-259.
[11] 陈莉,罗颖,范俊. 天胡荽中槲皮素与山奈酚的含量测定[J]. 生物化工,2022(3):77-79.

[12] 张兰,张德志. 天胡荽的研究进展[J]. 现代食品与药品杂志,2007(1):15-17.
[13] 董关涛,宋良科,李小锋,等. 天胡荽及其近缘植物的槲皮素含量测定[J]. 安徽农业科学,2010,38(10):5101-5103.
[14] 王祥培,许士娜,吴红梅,等. 天胡荽药材中槲皮素的薄层鉴别与含量测定[J]. 时珍国医国药,2020,21(1):44-45.
[15] 李江,林军,黄忠仕,等. 天胡荽与破铜钱中总黄酮的含量测定[J]. 广西医科大学学报,2004,21(4):491-492.

(收稿日期:2022-11-26;修回日期:2023-04-27)

并同时测定荳草素-2''-O-β-L-半乳糖苷、荳草苷、牡荆苷、槲皮素的含量,为金莲花制剂的质量控制及相关产品的研发、生产提供依据。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);XSE205DU型电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司,精度为十万分之一);Milli-Q型超纯水仪(美国Millipore公司);WSZ-100A型回旋振荡器(上海一恒科学仪器有限公司)。

1.2 试药

荳草素-2''-O-β-L-半乳糖苷对照品(振强生物技术有限公司,批号为20191003,纯度为99.85%);荳草苷对照品(批号为111777-202003,纯度为98.0%),牡荆苷对照品(批号为111687-201704,纯度为94.9%),槲皮素对照品(批号为100081-201610,纯度为99.1%),均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈均为色谱纯,购自美国Merck公司;磷酸(EP,西班牙Scharlau公司);水为纯化水;金莲花口服液(浙江康恩贝制药股份有限公司,批号分别为JL2081-1, JL2081-2, JL2081-3, JL2082-1, JL2082-2, JL2082-3, JL2083-1, JL2083-2, JL2083-3, JL2181-1, JL2181-2, 21JL81-3, JL2182-1, JL2182-2, JL2181-3, JL2183-1, JL2183-2, JL2183-3, 编号为S1-S18,规格为每支10 mL)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Kinetex-XB-C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.35%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~12 min时12%A, 12~25 min时12%A → 15%A, 25~28 min时15%A → 19%A, 28~40 min时19%A → 23%A, 40~46 min时23%A → 25%A, 46~55 min时25%A, 55~60 min时25%A → 33%A, 60~65 min时33%A, 65~70 min时33%A → 90%A);流速:1.0 mL/min;柱温:30 ℃;检测波长:340 nm;进样量:5 μL。

2.2 溶液制备

精密量取样品5 mL,置100 mL容量瓶中,加甲醇80 mL,回旋振荡30 min,加甲醇定容,摇匀,滤过,弃去初滤液,精密量取续滤液10 mL,置25 mL容量瓶中,加50%甲醇定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

取荳草素-2''-O-β-L-半乳糖苷、荳草苷、牡荆苷、槲皮素对照品各适量,精密称定,加50%甲醇溶解,制成每1 mL含荳草素-2''-O-β-L-半乳糖苷50 μg、荳草苷60 μg、牡荆苷18 μg、槲皮素5 μg的混合对照品溶液。

按处方比例称取蔗糖50.00 g、羟苯乙酯0.10 g、苯甲酸钠0.90 g,精密称定,置500 mL容量瓶中,用纯化水溶解并定容,按供试品溶液制备方法制备缺金莲花的阴性对照品溶液。

2.3 HPLC 指纹图谱建立

2.3.1 方法学考察

重复性试验:取样品(编号为S5)6份,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,以荳草苷(4号峰)为参照峰,计算各共有峰相对保留时间的RSD在0~0.29%之间(n=6),相对峰面积的RSD在0~2.76%之间(n=6),表明方法重复性良好。

中间精密度试验:取样品(编号为S5)6份,依法制备供试品溶液,不同人员于不同时间利用不同仪器按2.1项下色谱条件进样测定,以荳草苷(4号峰)为参照峰,并与重复性试验项下供试品溶液共12份计算各共有峰相对保留时间的RSD在0~1.10%之间(n=12),相对峰面积的RSD在0~2.92%之间(n=12),表明方法中间精密度良好。

稳定性试验:取样品(编号为S5),按2.2项下方法制备供试品溶液,分别于室温下放置0, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 h时按2.1项下色谱条件进样测定,以荳草苷(4号峰)为参照峰,计算各共有峰相对保留时间的RSD在0~1.81%之间(n=11),相对峰面积的RSD在0~2.84%之间(n=11),表明供试品溶液在室温下放置96 h内稳定性良好。

2.3.2 对照图谱生成及共有峰标定

取样品(编号为S1-S18),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。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)进行分析,以S1为参照图谱,选择中位数法,设定时间窗宽度为0.1 min,生成对照图谱,确定22个共有峰。详见图1。通过与混合对照品溶液色谱图进行对比,指认了4种指标性成分,分别为2号峰(荳草素-2''-O-β-L-半乳糖苷)、4号峰(荳草苷)、8号峰(牡荆苷)、17号峰(槲皮素)。其中,荳草苷分离度较好,保留时间适中,峰面积最大,峰形对称,故选择其为参照峰(S)。

2.3.3 相似度评价

采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)计算18批样品(编号为S1-S18)的相似度,结果相似度均不低于0.988,表明不同批次样品相似度高。详见表1。

2.4 指标性成分含量测定

2.4.1 方法学考察

专属性试验:取2.2项下供试品溶液、混合对照品溶液、阴性对照品溶液各5 μL,按2.1项下色谱条件进样测定。结果各成分色谱峰与相邻色谱峰分离度均大

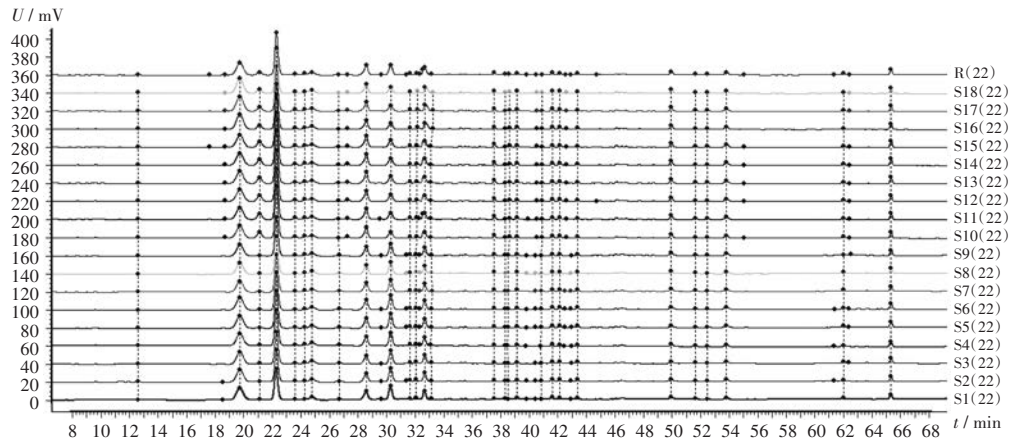


图1 18批金莲花口服液高效液相色谱叠加指纹图谱

Fig. 1 HPLC overlay fingerprints of 18 batches of Jinlianhua Oral Liquid

表1 18批金莲花口服液指纹图谱相似度评价结果

Tab. 1 Similarity results of fingerprints of 18 batches of Jinlianhua Oral Liquid

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.988	S7	0.997	S13	0.994
S2	0.988	S8	0.997	S14	0.994
S3	0.989	S9	0.997	S15	0.994
S4	0.994	S10	0.993	S16	0.995
S5	0.994	S11	0.990	S17	0.995
S6	0.994	S12	0.993	S18	0.995

表2 线性关系考察及检测限、定量限确定结果

Tab. 2 Results of the linear relation test, LOD and LOQ

成分	回归方程	r	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	检测限 ($\mu\text{g/mL}$)	定量限 ($\mu\text{g/mL}$)
荜草素-2''-O- β -L-半乳糖苷	$Y=9.5642X+0.5488$	0.9998	10.13~101.27	0.1028	0.2056
荜草苷	$Y=12.664X+1.1856$	0.9998	12.46~124.62	0.0623	0.1246
牡荆苷	$Y=13.076X+2.0872$	0.9999	3.60~36.00	0.0360	0.0720
槲皮素	$Y=10.645X+0.1716$	0.9995	1.00~10.04	0.1004	0.2008

于1.5,且阴性对照无干扰。详见图2。

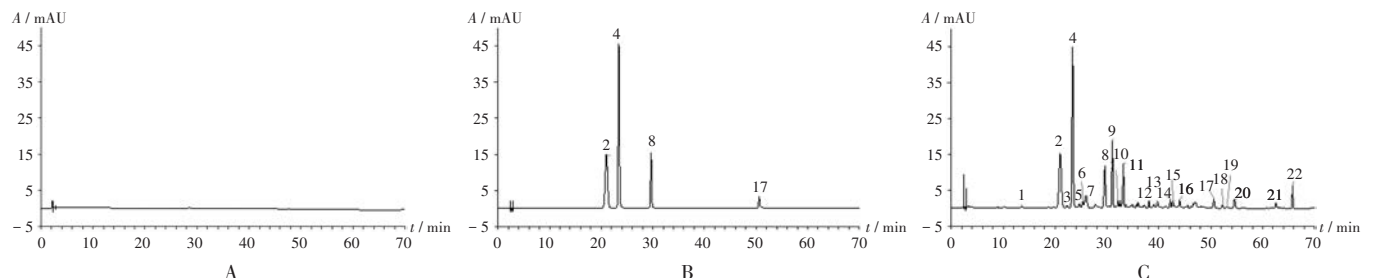
线性关系考察:取荜草素-2''-O- β -L-半乳糖苷、荜草苷、牡荆苷、槲皮素对照品各适量,精密称定,分别用50%甲醇溶解并逐级稀释成系列质量浓度的溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,以对照品溶液质量浓度($X, \mu\text{g/mL}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表2。

检测限和定量限确定:取线性关系考察项下溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,分别以信噪比(S/N)为3:1和10:1时的质量浓度作为检测限和定量限^[9]。结果见表2。

重复性试验:以2.3.1项下重复性试验图谱数据计算样品含量,荜草素-2''-O- β -L-半乳糖苷、荜草苷、牡荆苷、槲皮素平均含量分别为2.68, 2.96, 0.86, 0.24 mg/mL , RSD 分别为0.44%, 0.28%, 0.60%, 1.70% ($n=6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:以2.3.1项下稳定性试验图谱数据计算,荜草素-2''-O- β -L-半乳糖苷、荜草苷、牡荆苷、槲皮素峰面积的 RSD 分别为0.55%, 0.42%, 0.62%, 0.41% ($n=11$),表明供试品溶液在室温下放置96 h内稳定性良好。

中间精密度试验:以2.3.1项下中间精密度试验图



2. 荜草素-2''-O- β -L-半乳糖苷 4. 荜草苷 8. 牡荆苷 17. 槲皮素

A. 阴性对照品溶液 B. 混合对照品溶液 C. 供试品溶液

图2 专属性试验高效液相色谱图

2. 2''-O- β -L-Galactopyanosylorientin 4. Orientin 8. Vitexin 17. Quercetin

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

Fig. 2 HPLC chromatograms of the specificity test

谱数据计算样品含量,并与“2.4.1 重复性试验”项下供试品溶液含量共12份计算荜草素-2''-O-β-L-半乳糖苷、荜草苷、牡荆苷、槲皮素峰面积的RSD分别为0.89%,0.98%,1.04%,2.24%(n=12),表明中间精密度良好。

加样回收试验:取样品(编号为S5)2.50 mL,平行6份,分别精密加入荜草素-2''-O-β-L-半乳糖苷、荜草苷、牡荆苷、槲皮素对照品各适量,依法制备供试品溶液。结果加样回收率均在85%~110%之间,表明方法准确度良好。详见表3。

表3 4个指标性成分加样回收试验结果(n=6)

Tab.3 Results of the recovery test of four indicator components (n=6)

成分	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	\bar{X} (%)	RSD(%)
荜草素-2''-O-β-L-半乳糖苷	670.0	651.5	1325.5	100.61	101.10	0.92
	670.0	651.5	1320.2	99.80		
	670.0	651.5	1338.4	102.59		
	670.0	651.5	1330.1	101.32		
	670.0	651.5	1328.2	101.03		
	670.0	651.5	1329.7	101.26		
荜草苷	740.0	767.4	1514.1	100.87	101.60	0.60
	740.0	767.4	1519.1	101.52		
	740.0	767.4	1528.4	102.74		
	740.0	767.4	1520.2	101.67		
	740.0	767.4	1519.3	101.55		
	740.0	767.4	1519.4	101.56		
牡荆苷	215.0	230.0	441.7	98.57	98.84	0.29
	215.0	230.0	442.5	98.91		
	215.0	230.0	443.1	99.17		
	215.0	230.0	443.0	99.13		
	215.0	230.0	441.6	98.52		
	215.0	230.0	442.1	98.74		
槲皮素	60.0	62.90	120.9	96.82	98.44	1.89
	60.0	62.90	123.9	101.59		
	60.0	62.90	122.5	99.36		
	60.0	62.90	122.0	98.57		
	60.0	62.90	121.4	97.62		
	60.0	62.90	120.8	96.66		

2.4.2 样品含量测定

取样品(编号为S1-S18),依法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,并计算含量。结果显示,同一批药材得到的制剂(编号为S1-S3,编号为S4-S6,编号为S7-S9,编号为S10-S12,编号为S16-S18)各指标性成分的含量较接近,批间略有差异。详见表4。

3 讨论

3.1 色谱柱选择

对不同色谱柱Kromasil-100-5-C₁₈柱(250 mm ×

表4 18批样品中4个指标性成分的含量测定结果 (mg/mL, n=2)

Tab.4 Results of the content determination of four indicator components in 18 batches of samples (mg/mL, n=2)

编号	荜草素-2''-O-β-L-半乳糖苷	荜草苷	牡荆苷	槲皮素
S1	2.55	2.51	0.73	0.23
S2	2.59	2.55	0.75	0.23
S3	2.59	2.55	0.74	0.23
S4	2.50	2.85	0.80	0.25
S5	2.64	3.00	0.84	0.26
S6	2.65	3.01	0.84	0.26
S7	2.35	3.00	0.79	0.25
S8	2.37	3.04	0.79	0.24
S9	2.42	3.09	0.81	0.25
S10	2.32	3.48	0.82	0.32
S11	2.31	3.49	0.82	0.32
S12	2.32	3.48	0.82	0.31
S13	2.41	3.62	0.87	0.32
S14	2.42	3.63	0.87	0.33
S15	2.41	3.62	0.86	0.33
S16	2.96	3.09	0.70	0.30
S17	2.95	3.08	0.70	0.29
S18	2.94	3.08	0.70	0.28
$\bar{X} \pm s$	2.54 ± 0.22	3.12 ± 0.37	0.79 ± 0.06	0.28 ± 0.04

4.6 mm, 5 μm), Thermo-Hypersil-GOLD-C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), Inertsil ODS-3 C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), Kinetex-XB-C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)进行考察,结果Kinetex-XB-C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)峰形较其他色谱柱好,故最终选择此色谱柱用于分离。

3.2 流动相选择

考察不同流动相体系[乙腈-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.1%磷酸溶液(含1%四氢呋喃)、乙腈-1%冰醋酸溶液、乙腈-0.4%磷酸溶液、乙腈-0.35%磷酸溶液]的洗脱效果,发现乙腈-0.35%磷酸溶液分离度高,色谱峰较多,故最终选择此流动相体系进行梯度洗脱。

3.3 指标成分选择

现代药理学研究表明,金莲花及其制剂具有抗菌、抗病毒等作用^[10],其主要有效成分为黄酮类化合物,包括荜草素-2''-O-β-L-半乳糖苷、荜草苷、牡荆苷、槲皮素等^[11-15],故最终选择上述4个指标性成分进行含量测定。

3.4 方法评价

本研究中建立的方法稳定、准确性与重复性均良好,可用于金莲花口服液的质量控制。