

中图分类号: R917; R927.1 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)24-0098-05  
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.24.022



## 银翘解毒片高效液相色谱指纹图谱研究\*

吴琦<sup>1</sup>, 贾银芝<sup>1,2</sup>, 刘益庆<sup>1△</sup>, 陈红<sup>1</sup>

(1. 连云港市食品药品检验检测中心, 江苏 连云港 222006; 2. 江苏省食品药品监督检验研究院连云港实验室, 江苏 连云港 222006)

**摘要:**目的 建立银翘解毒片的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱。方法 采用 HPLC-二极管阵列检测器(PDA)-蒸发光散射检测器(ELSD)联用技术。以牛蒡苷峰为参照峰建立 15 批样品的 HPLC-PDA-ELSD 指纹图谱。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)进行相似度评价。结果 PDA 及 ELSD 下分别标定了 15 批样品指纹图谱中 35 个及 26 个共有峰, 指认了其中 9 个化学成分, 分别为绿原酸、甘草苷、连翘酯苷 A、木犀草苷、橙皮苷、连翘苷、牛蒡苷、甘草酸铵、桔梗皂苷 D。2 种检测器下分别有 14 批和 13 批样品的指纹图谱相似度大于 0.9。结论 所建立的方法可用于银翘解毒片的质量控制。

**关键词:** 银翘解毒片; 指纹图谱; 高效液相色谱法; 二极管阵列检测器; 蒸发光散射检测器; 桔梗皂苷 D; 质量控制

### HPLC Fingerprint of Yinqiao Jiedu Tablets

WU Qi<sup>1</sup>, JIA Yinzh<sup>1,2</sup>, LIU Yiqing<sup>1</sup>, CHEN Hong<sup>1</sup>

(1. Lianyungang Food and Drug Inspection Center, Lianyungang, Jiangsu, China 222006; 2. Lianyungang Laboratory of Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Lianyungang, Jiangsu, China 222006)

**Abstract: Objective** To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint of Yinqiao Jiedu Tablets. **Methods** The HPLC-photo diode array (PDA)-evaporative light scattering detector (ELSD) was adopted. The HPLC-PDA-ELSD fingerprint of 15 batches of samples was established with arctiin peak as the reference. The similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine (2012 version) was used for similarity evaluation. **Results** A total of 35 and 26 common peaks were marked in the fingerprint of 15 batches of samples by the PDA and ELSD respectively, and nine chemical components were identified, including chlorogenic acid, liquiritin, forsythoside A, luteoloside, hesperidin, phillyrin, arctiin, glycyrrhizic acid ammonium salt and platycodin D. There were 14 and 13 batches of samples with fingerprint similarity greater than 0.9 by the PDA and ELSD respectively. **Conclusion** The established method can be used for quality control of Yinqiao Jiedu Tablets.

**Key words:** Yinqiao Jiedu Tablets; fingerprint; HPLC; PDA; ELSD; platycodin D; quality control

银翘解毒片源自清代吴鞠通《温病条辨》中的银翘散<sup>[1]</sup>,由金银花、连翘、薄荷、荆芥、淡豆豉、牛蒡子、桔梗、淡竹叶、甘草 9 味中药材组方,有疏风解表、清热解毒功效,主要用于治疗风热感冒,症见发热头痛、咳嗽口干、咽喉疼痛。2020 年版《中国药典(一部)》以绿原酸和连翘苷为含量测定指标控制其质量<sup>[2]</sup>。目前对银翘解毒片质量控制的研究,主要是利用高效液相色谱(HPLC)法测定绿原酸<sup>[3-4]</sup>、连翘苷<sup>[5]</sup>、连翘酯苷 A<sup>[3,6-7]</sup>、牛蒡苷<sup>[3,5]</sup>、木犀草苷<sup>[3]</sup>、甘草酸<sup>[8]</sup>等的含量,也有研究采用毛细管电泳<sup>[9]</sup>(CE)法和 HPLC<sup>[10-11]</sup>串联紫外检测

器(UV)或二极管阵列检测器(PDA)法建立银翘解毒片的指纹图谱。中药指纹图谱能整体反映中药材或中药制剂所含化学成分的种类和数量,因此,研究指纹图谱对于制剂的质量控制十分必要。但 UV 具有一定局限性,如处方中桔梗的主要成分桔梗皂苷 D 不能被其检出,故需要一种通用型检测器作为补充。本研究中采用 HPLC 与 PDA 或蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)联合(HPLC-PDA 或 HPLC-ELSD)技术建立了银翘解毒片的指纹图谱,为制剂的质量控制提供了新的方法和策略。现报道如下。

\*基金项目:江苏省市场监管及技术能力建设专项资金项目[KJ21125046]。

第一作者:吴琦,男,硕士,主管药师,研究方向为药品检验,(电子信箱)583649395@qq.com。

△通信作者:刘益庆,男,硕士,副主任药师,研究方向为药品检验,(电子信箱)33359083@qq.com。

1987-1990.

[19] 龚 韬,杨 薇,王 夏,等.不同产地的当归中苯酞类成分的含量测定及聚类分析[J].中国医药导报,2022,19(19):20-24.

[20] 陈 成,邵 艳,俞明义,等.基于 HPLC 多指标成分定量控制联合化学计量学的得生胶囊综合质量评价[J].中国药师,2021,24(10):1918-1923.

[21] 李 力,潘倩雯,刘 宏.灰色关联度分析法在中药谱效学研究中的应用[J].中国药房,2018,29(11):1581-1584.

[22] 王玉霞,武晓玉,夏鹏飞,等.基于熵权 TOPSIS 模型对经不同方法干燥的苦水玫瑰品质的综合评价[J].中成药,2021,43(5):1241-1248.

(收稿日期:2023-02-14;修回日期:2023-07-28)

1 仪器与试药

1.1 仪器

E2695 型高效液相色谱仪、包括 2998 型 PDA 检测器、2424 型 ELSD 检测器(美国 Waters 公司);BP211D 型电子天平(德国 Sartorius 公司,精度为 0.01 mg);AE-100 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司,精度为 0.1 mg);IQ 7000 型纯水机(美国 Milli-Q 公司);F-100SD 型超声波清洗器(深圳福洋科技集团有限公司)。

1.2 试药

银翘解毒片(15 批,11 家企业生产,样品信息见表 1);绿原酸(批号为 110753-202018,含量 96.1%),甘草苷(批号为 111610-201908,含量 95.0%),连翘酯苷 A(批号为 111810-202108,含量 96.2%),木犀草苷(批号为 111720-202111,含量 96.6%),橙皮苷(批号为 110721-202019,含量 95.3%),连翘苷(批号为 110821-202117,含量 94.9%),牛蒡苷(批号为 110819-201812,含量 95.0%),桔梗皂苷 D(批号为 111851-201708,含量 97.9%),甘草酸铵(批号为 110731-202122,含量 94.4%)对照品,均购自中国食品药品检定研究院;乙腈、甲醇均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

表 1 15 批样品信息

Tab. 1 Information of 15 batches of samples

| 编号  | 批号        | 生产企业               |
|-----|-----------|--------------------|
| S1  | 1804111   | 云南腾药制药股份有限公司       |
| S2  | 20210469  | 云南腾药制药股份有限公司       |
| S3  | 20210868  | 云南腾药制药股份有限公司       |
| S4  | 20210205  | 云南腾药制药股份有限公司       |
| S5  | 190703    | 邛崃天银制药有限公司         |
| S6  | 18005     | 国药集团德众(佛山)药业有限公司   |
| S7  | 21122922  | 北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂 |
| S8  | 410270    | 昆明中药厂有限公司          |
| S9  | 200102    | 四川森科制药有限公司         |
| S10 | 201908251 | 江西九连山药业有限公司        |
| S11 | 1201003   | 一力制药股份有限公司         |
| S12 | 420062    | 昆明中药厂有限公司          |
| S13 | 2202020   | 湖北广仁药业有限公司         |
| S14 | 200201    | 云南云河药业股份有限公司       |
| S15 | 20210401  | 红云制药(梁河)有限公司       |

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Zorbax Eclipse Plus C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~5 min 时 8%A, 5~25 min 时 8%A → 17%A, 25~34 min 时 17%A → 18%A, 34~57 min 时 18%A → 30%A, 57~65 min 时 30%A → 38%A, 65~72 min 时 38%A,

72~74 min 时 38%A → 100%A);流速:1.0 mL/min;柱温:30℃;进样量:10 μL;PDA 检测波长:230 nm;ELSD 条件:漂移管温度为 75℃,气体压力为 25 psi。

2.2 溶液制备

取绿原酸、甘草苷、连翘酯苷 A、木犀草苷、橙皮苷、连翘苷、牛蒡苷、桔梗皂苷 D、甘草酸铵的对照品各约 10 mg,精密称定,分别置 20 mL 容量瓶中,加甲醇 15 mL,超声(功率 600 W,频率 40 kHz,下同)处理 30 min,放冷至室温,用甲醇定容,摇匀,即得单一对照品溶液。

取样品 10 片,研细,取约 1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 25 mL,密塞,称定质量,超声处理 30 min,放冷至室温,再次称定质量,用 50% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

精密度试验:取样品(编号 S7)适量,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 6 次,以 32 号峰为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间及相对峰面积。结果 HPLC-ELSD 图谱各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.29%(n=6),相对峰面积的 RSD 均小于 2.21%(n=6);HPLC-PDA 图谱各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.38%(n=6),相对峰面积的 RSD 均小于 2.37%(n=6),表明方法精密度良好。

稳定性试验:取样品(编号 S7)适量,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,分别于室温下放置 0,2,4,8,12,24 h 时按 2.1 项下色谱条件进样测定,以 32 号峰为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果, HPLC-ELSD 图谱各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.31%(n=6),相对峰面积的 RSD 均小于 2.34%(n=6);HPLC-PDA 图谱各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.44%(n=6),相对峰面积的 RSD 均小于 2.59%(n=6),表明供试品溶液在室温放置 24 h 内基本稳定。

重复性试验:取样品(编号 S7)适量,按 2.2 项下方法平行制备供试品溶液 6 份,再按 2.1 项下色谱条件进样测定,以 32 号峰为参照峰,计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果, HPLC-ELSD 图谱各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.56%(n=6),相对峰面积的 RSD 均小于 2.52%(n=6);HPLC-PDA 图谱各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.64%(n=6),相对峰面积的 RSD 均小于 2.75%(n=6),表明方法重复性良好。

2.4 指纹图谱建立

HPLC-PDA 指纹图谱的建立:取 15 批样品适量,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,将各批样品色谱峰分别进行积分,导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版),以编号 S7 样

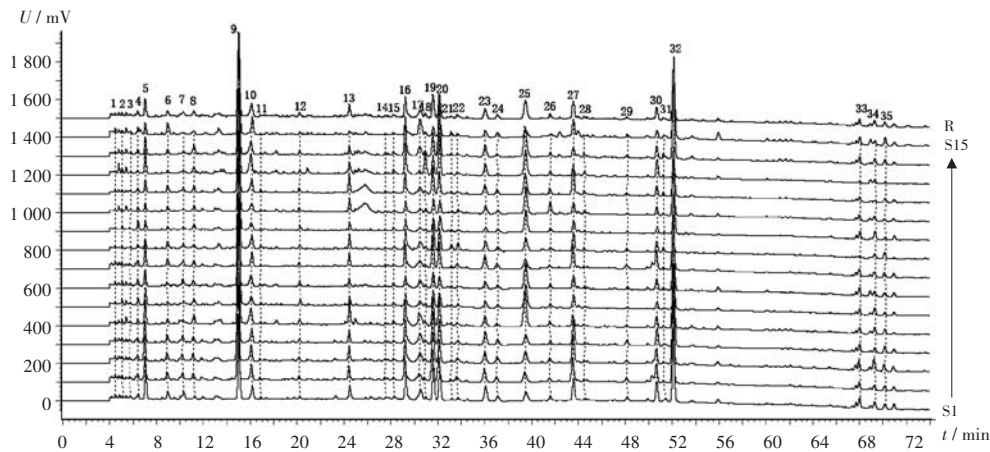


图1 15批银翘解毒片的高效液相色谱-二极管阵列检测器叠加指纹图谱

Fig.1 HPLC - PDA superimposed fingerprint of 15 batches of Yinqiao Jiedu Tablets

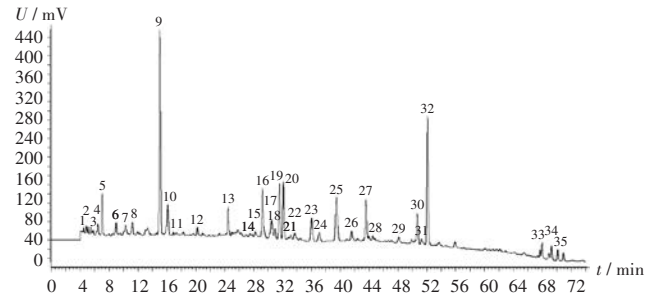


图2 银翘解毒片的高效液相色谱-二极管阵列检测器  
对照指纹图谱

Fig.2 HPLC - PDA reference fingerprint of Yinqiao Jiedu Tablets  
品的色谱图作为参照图谱,剪切溶剂峰,选择中位数法,时间窗设为0.2 min,采用多点校正法建立叠加指纹图谱(见图1),生成对照指纹图谱(见图2),根据匹配结果共标定35个共有峰。各共有峰保留时间的 $RSD$ 为0.03%~0.68%,峰面积的 $RSD$ 为19.62%~87.12%,表明共有峰的出峰时间较稳定,但不同批次样品成分含量波动较大。15批样品与对照图谱的相似度结果见表2。仅1批样品(S13)的相似度小于0.9,表明不同厂家不同批次银翘解毒片的相似性较好。

表2 15批银翘解毒片样品的相似度

Tab.2 Similarity of 15 batches of Yinqiao Jiedu Tablets

| 样品编号 | HPLC - PDA法 | HPLC - ELSD法 | 样品编号 | HPLC - PDA法 | HPLC - ELSD法 |
|------|-------------|--------------|------|-------------|--------------|
| S1   | 0.953       | 0.927        | S9   | 0.913       | 0.859        |
| S2   | 0.971       | 0.958        | S10  | 0.976       | 0.959        |
| S3   | 0.979       | 0.970        | S11  | 0.965       | 0.964        |
| S4   | 0.969       | 0.961        | S12  | 0.984       | 0.975        |
| S5   | 0.986       | 0.985        | S13  | 0.888       | 0.818        |
| S6   | 0.974       | 0.949        | S14  | 0.972       | 0.948        |
| S7   | 0.978       | 0.971        | S15  | 0.937       | 0.932        |
| S8   | 0.971       | 0.964        |      |             |              |

HPLC - ELSD 指纹图谱的建立:按上述方法建立 HPLC - ELSD 叠加指纹图谱(见图3),生成对照指纹图谱(见图4)。共标定26个共有峰,其中除36号峰外均可与 HPLC - PDA 指纹图谱中的共有峰对应。15批样品中,各共有峰保留时间的 $RSD$ 为0.04%~0.37%,峰面积的 $RSD$ 为38.30%~88.81%,表明共有峰的出峰时间较稳定,但不同批次样品的成分含量波动较大。15批样品与对照图谱的相似度结果见表2。仅2批(S9及S13)

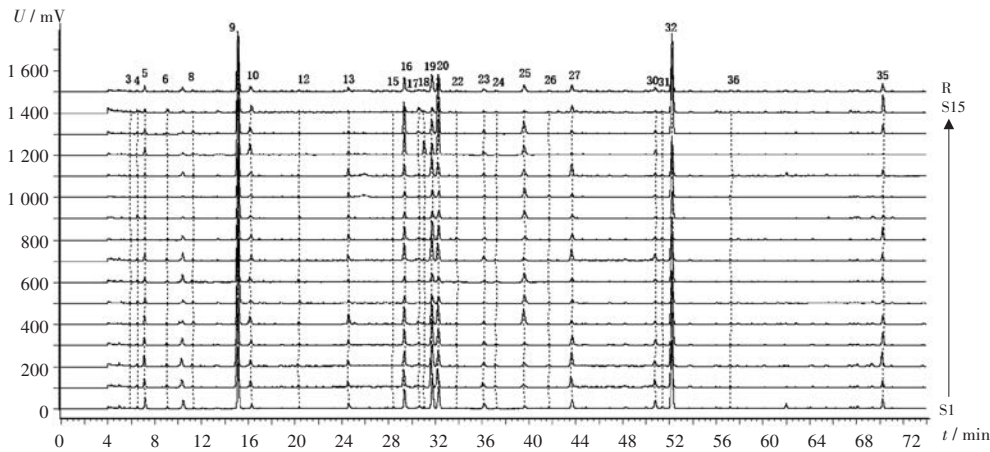


图3 15批银翘解毒片的高效液相色谱-蒸发光散射检测器叠加指纹图谱

Fig.3 HPLC - ELSD superimposed fingerprint of 15 batches of Yinqiao Jiedu Tablets

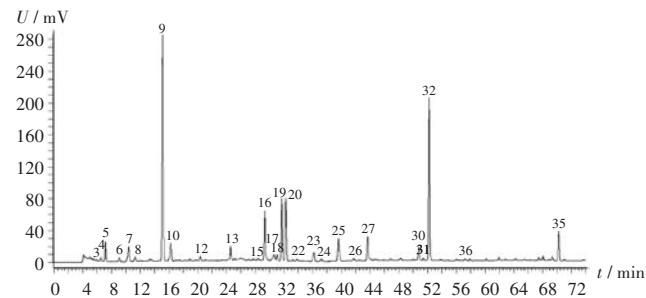


图4 银翘解毒片的高效液相色谱 - 蒸发光散射检测器  
对照指纹图谱

Fig. 4 HPLC - ELSD reference fingerprint of Yinqiao Jiedu Tablets  
样品的相似度小于 0.9, 表明不同厂家不同批次银翘解毒片的相似性较好。

2.5 共有峰的定性分析

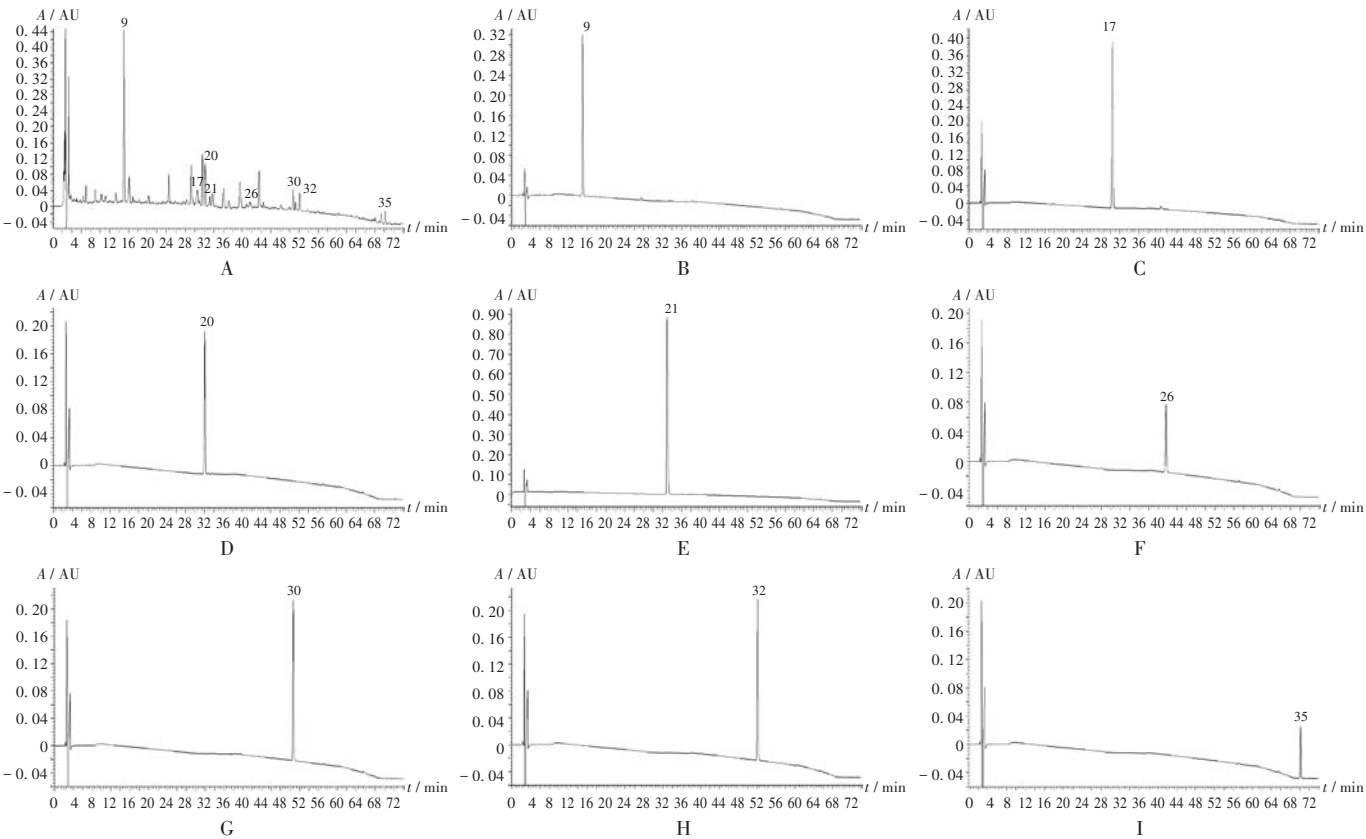
取 2.2 项下一对照品溶液及供试品溶液各适量, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 比对指认色谱峰。HPLC - PDA 色谱图中鉴定出 9 号峰为绿原酸, 17 号峰为甘草苷, 20 号峰为连翘酯苷 A, 21 号峰为木犀草苷, 26 号峰

为橙皮苷, 30 号峰为连翘苷, 32 号峰为牛蒡苷, 35 号峰为甘草酸铵, 详见图 5。HPLC - ELSD 色谱图中鉴定出 36 号峰为桔梗皂苷 D, 详见图 6。

3 讨论

3.1 试验条件选择

预试验中分别考察了乙腈 - 水、甲醇 - 水、甲醇 - 0.1% 甲酸水 3 种流动相, 结果显示, 以乙腈 - 水为流动相进行梯度洗脱时, 各成分分离效果较好。分别考察了温度 (30, 35, 40 °C) 和流速 (0.8, 1.0, 1.2 mL / min) 对色谱峰分离效果的影响, 结果显示, 柱温为 30 °C、流速为 1.0 mL / min 时能使基线平稳, 且分离度和峰形达到较好效果。同时采用 PDA 进行紫外全波长扫描, 兼顾各成分的检测信号强度和检测灵敏度, 在 230 nm 波长处色谱图基线噪音较低, 峰数目多, 分离度较好, 且基线稳定, 故选择 230 nm 为检测波长。对 ELSD 漂移管温度 (70, 75, 80 °C) 和气体压力 (20, 25, 30 psi) 进行考察, 最终确定漂移管温度 75 °C、气体压力 25 psi 为最优



9. 绿原酸 17. 甘草苷 20. 连翘酯苷 A 21. 木犀草苷 26. 橙皮苷 30. 连翘苷 32. 牛蒡苷 35. 甘草酸铵  
A. 供试品溶液 B. 绿原酸对照品溶液 C. 甘草苷对照品溶液 D. 连翘酯苷 A 对照品溶液 E. 木犀草苷对照品溶液  
F. 橙皮苷对照品溶液 G. 连翘苷对照品溶液 H. 牛蒡苷对照品溶液 I. 甘草酸铵对照品溶液

图5 高效液相色谱 - 二极管阵列检测器色谱图

9. Chlorogenic acid 17. Liquiritin 20. Forsythoside A 21. Luteoloside 26. Hesperidin 30. Phillyrin 32. Arctiin 35. Glycyrrhizic acid ammonium salt  
A. Test solution B. Chlorogenic acid reference solution C. Liquiritin reference solution D. Forsythoside A reference solution E. Luteoloside reference solution  
F. Hesperidin reference solution G. Phillyrin reference solution H. Arctiin reference solution I. Glycyrrhizic acid ammonium salt reference solution

Fig. 5 HPLC - PAD chromatograms

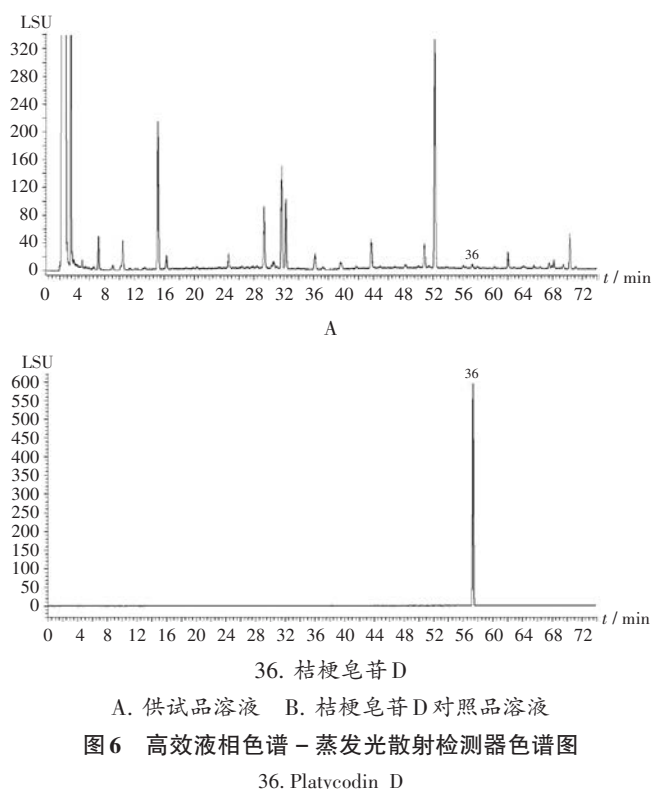


图6 高效液相色谱-蒸发光散射检测器色谱图

36. Platycodin D

A. Test solution B. Reference solution of platycodon D

Fig. 6 HPLC - ELSD chromatograms

ELSD参数。

### 3.2 检测器选择

PDA适用于有紫外吸收的化学成分,对于无紫外吸收的成分检测具有一定局限性。ELSD是通用型检测器,不依赖被测成分的光学特性,可检测无紫外吸收或紫外吸收较弱的成分。银翘解毒片处方中桔梗的指标成分桔梗皂苷D紫外吸收较弱,HPLC-ELSD法较HPLC-UV法更适于桔梗皂苷D的含量测定<sup>[12]</sup>。2005年版《中国药典(一部)》把2000年版及以前版本中列出的金银花分列为金银花和山银花,在药典收载变化后,部分厂家申请将处方中的金银花变更为山银花,但处方中含金银花的制剂仍存在用山银花投料现象<sup>[13-16]</sup>。山银花含有金银花所没有的特征成分灰毡毛忍冬皂苷乙,该成分紫外吸收较弱,药典规定山银花中灰毡毛忍冬皂苷乙的测定采用HPLC-ELSD法,故将PDA和ELSD合用,建立更全面的指纹图谱的同时也对金银花投料的规范性进行有效控制。

### 3.3 指纹图谱分析

本研究建立了银翘解毒片的HPLC-PDA和HPLC-ELSD指纹图谱,在PDA和ELSD下分别标定了35个和26个共有峰,通过对照品比对法指认了9个共有峰。指纹图谱相似度结果表明,11个厂家的15批银翘解毒片样品的相似性较好,但成分的含量存在显著差异,说明生产所用药材质量参差不齐,或者生产工艺转

移率不一致。

### 3.4 方法评价

本研究中所建立的HPLC-PDA-ELSD指纹图谱,相较单一检测法能更全面地反映制剂的指纹图谱特征,该研究为银翘解毒片的质量控制提供了一定参考。

### 参考文献

- [1] CHEN L, WANG Z, FU D, et al. Application of Chemomic Release Kinetics to Evaluation of the Release Characteristics of Yinqiaojiedu Tablets[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2008, 6(6): 450 - 455.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 1628 - 1629.
- [3] 吴有根, 陈燕军, 魏惠珍, 等. RP-HPLC同时测定银翘解毒片中4种成分的含量[J]. 江西中医药, 2019, 50(1): 68 - 70.
- [4] 刘玲. HPLC法测定银翘解毒片中绿原酸的含量[J]. 中国药师, 2009, 12(7): 980 - 981.
- [5] 张宇洁, 徐玥, 孙文燕. HPLC法同时测定银翘解毒片中连翘苷和牛蒡苷的含量[J]. 应用化工, 2013, 42(10): 1927 - 1929.
- [6] 张宏伟, 龚韬, 严文利, 等. 高效液相色谱法测定不同厂家银翘解毒片中连翘酯苷A的含量[J]. 中国医药导报, 2013, 10(6): 102 - 104.
- [7] 赵昱玮, 于森, 南敏伦, 等. 高效液相色谱法测定银翘解毒片中连翘酯苷A的含量[J]. 中国医药科学, 2011, 1(22): 114 - 115.
- [8] 武琳, 杨光, 杜菁, 等. HPLC测定十全大补丸、补中益气丸、银翘解毒片中甘草酸含量[J]. 中国中医药信息杂志, 2016, 23(12): 99 - 102.
- [9] MA DD, YANG LP, YAN B, et al. Capillary electrophoresis fingerprints combined with chemometric methods to evaluate the quality consistency and predict the antioxidant activity of Yinqiaojiedu tablet[J]. Journal of Separation Science, 2017, 40(8): 1796 - 1804.
- [10] 冯华, 罗秀琼, 石尚友. 银翘解毒片高效液相色谱指纹图谱识别研究[J]. 甘肃中医药大学学报, 2016, 33(6): 43 - 46.
- [11] 马迪迪, 巩丹丹, 孙国祥, 等. 三波长融合指纹图谱结合6组分定量和主成分分析评价银翘解毒片的质量[J]. 色谱, 2017, 35(7): 741 - 747.
- [12] 尤钺, 田冬娜, 郭建鹏. 不同检测器HPLC测定桔梗皂苷D的研究[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(7): 100 - 104.
- [13] 陆静娴, 陈勇, 黄琴伟, 等. 银翘解毒颗粒中金银花的投料规范性研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(13): 1669 - 1672.
- [14] 覃丽娜, 白桂昌, 张慧, 等. 银翘解毒颗粒中金银花掺伪检查[J]. 中国药事, 2021, 35(12): 1375 - 1382.
- [15] 郑文燕, 李哲, 冯启宏, 等. HPLC和UPLC-MS/MS法考察清热解毒口服液中金银花投料规范性[J]. 中国药师, 2022, 25(1): 189 - 193.
- [16] 王立伟, 徐达, 安丽娜, 等. 金银花及其制剂中掺伪山银花的快速鉴别研究[J]. 中国药业, 2019, 28(1): 39 - 44.

(收稿日期: 2023-02-14; 修回日期: 2023-08-24)