

热毒宁注射液栀子中间体生产过程中4种成分的测定

徐小倩^{1,2,3}, 马阳^{2,3}, 黄文哲^{2,3}, 毕宇安^{2,3}, 王振中^{2,3}, 萧伟^{2,3}, 丁岗^{1,2,3*}

(1. 南京中医药大学, 江苏南京 210000; 2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏连云港 222001; 3. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏连云港 222001)

摘要: 目的 建立HPLC法测定热毒宁注射液(青蒿、金银花、栀子)栀子中间体(提取浓缩液、萃取前浸膏、萃取浓缩液、干膏)生产过程中山栀苷、京尼平苷酸、京尼平龙胆双糖苷、栀子苷的含有量。**方法** 该药物50%甲醇提取液的分析采用Agilent ZORBAX SB-C₁₈色谱柱(4.6 mm×100 mm, 5 μm);以乙腈-0.1%磷酸为流动相,梯度洗脱;体积流量0.7 mL/min;检测波长237 nm;柱温为30 °C。**结果** 4种成分在各自范围内线性关系良好($R^2 > 0.9999$),药材中其平均加样回收率97.80%~102.15%, RSD 1.68%~3.29%;干膏中其平均加样回收率97.97%~101.99%, RSD 1.55%~3.35%。它们在同一工艺样品中的批次间一致性较好,并随着工艺流程的逐级精制趋于稳定。**结论** 该方法简便、准确、可靠,可用于栀子中间体生产过程中各环节样品的含有量测定及稳定性评价,并为热毒宁注射液的质量控制提供依据。

关键词: 热毒宁注射液; 栀子; 中间体; 山栀苷; 京尼平苷酸; 京尼平龙胆双糖苷; 栀子苷; HPLC

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2017)05-0993-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2017.05.023

Determination of four constituents in the productive process of *Gardeniae Fructus* intermediates in Reduning Injection

XU Xiao-qian^{1,2,3}, MA Yang^{2,3}, HUANG Wen-zhe^{2,3}, BI Yu-an^{2,3}, WANG Zhen-zhong^{2,3},
XIAO Wei^{2,3}, DING Gang^{1,2,3*}

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210000, China; 2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China;
3. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China)

KEY WORDS: Reduning Injection; *Gardeniae Fructus*; intermediates; shanzhiside; geniposidic acid; genipin-1-β-D-gentiobioside; gardenoside; HPLC

热毒宁注射液是由青蒿、金银花、栀子经一定工艺制备而成的中药注射剂,具有清热、疏风、解毒之功效,临幊上可用于上呼吸道感染所致的高热、微恶风寒等症^[1]。处方中栀子具有泻火除烦、清热利尿、凉血解毒的功效^[2],以栀子苷为代表的环烯醚萜苷类化合物是其主要成分,2015版《中国药典》也将栀子苷作为栀子的检测指标,其具有解热、抗炎、抗氧化、保肝利胆等作用^[3-5]。

中药注射液生产过程繁琐复杂,涉及药材提取、分离、纯化、浓缩、干燥等多个环节,但目前

有关热毒宁注射液的报道主要集中在制剂方面^[6-9],而对其生产过程质量控制的研究较少,而且大多以栀子苷为主要评价指标。因此,本实验旨在对热毒宁注射液生产过程中各栀子中间体环节进行跟踪研究,确定生产环节的质量控制点,丰富中间体质量控制的检测指标,评价批次间质量一致性,保证该制剂质量的稳定可控。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); 多功能粉碎机(300 g, 永康市兆申电

收稿日期: 2016-10-08

基金项目: 国家中药标准化项目(ZYBZH-C-JS-31)

作者简介: 徐小倩(1992—), 女, 硕士生, 从事药物分析与质量评价研究。Tel: 15895976090, E-mail: 15895976090@163.com

*通信作者: 丁岗(1968—), 男, 博士, 高级工程师, 从事中药新剂型的研究与开发。Tel: (025) 87181865, E-mail: dingg2000@126.com

器有限公司), KH2200B 超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司); XS205 电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司); ST16R 高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司); Milli-Q 纯水机(美国 Millipore 公司)。

1.2 试药 山栀子(批号 JL160330010)对照品购自上海江莱生物科技有限公司; 京尼平苷酸(批号 01M2)对照品购自上海源叶生物科技有限公司; 京尼平龙胆双糖苷(批号 20120203)、栀子苷(批号 20121020)对照品均购自上海永恒生物科技有限公司。乙腈为色谱纯; 其他试剂均为分析纯; 水为超纯水。

栀子采自江苏康缘药业股份有限公司药材生产基地, 共 5 批(批号分别为 Y1601070、Y1601071、Y1601072、Y1601073、Y1601074), 经连云港康济大药房连锁有限公司吴舟执业药师鉴定为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实。

栀子干膏生产过程中的中间体包括栀子提取浓缩液、栀子萃取前浸膏、栀子萃取浓缩液、栀子干膏, 各 10 批(批号分别为 Z160402、Z160403、Z160404、Z160405、Z160406、Z160407、Z160408、Z160409、Z160410、Z160411), 均由江苏康缘药业股份有限公司提供。

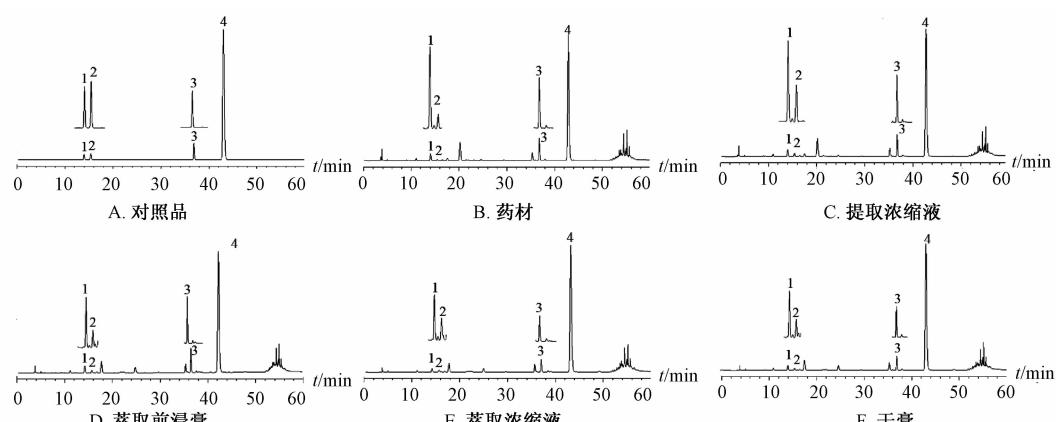
2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备 精密称取山栀子苷、京尼平苷酸、京尼平龙胆双糖苷、栀子苷对照品适量, 50% 甲醇制成每 1 mL 含 57.6、61.2、206.4、2 050.0 μg 上述成分的对照品溶液。

2.2 供试品溶液制备 基于热毒宁注射液生产工艺过程及公司内控标准, 精密称取栀子药材粉末约 0.25 g、栀子提取浓缩液约 0.15 g、栀子萃取前浸膏约 0.06 g、栀子萃取浓缩液约 0.10 g、栀子干膏约 0.06 g^[10], 置于 25 mL 量瓶中, 加入 50% 甲醇定容至刻度, 超声处理 30 min, 放冷, 50% 甲醇补足减失质量, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 即得。

2.3 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 100 mm, 5 μm); 流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸(B); 梯度洗脱(0~25 min, 5%~8% A; 25~30 min, 8%~11% A; 30~45 min, 11% A; 45~55 min, 11%~60% A; 55~60 min, 60%~5% A); 体积流量 0.7 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长 237 nm; 进样量 10 μL 。

2.4 系统适应性试验 在“2.3”项色谱条件下, 各成分色谱峰峰形均良好, 理论塔板数均大于 5 000, 与各相邻色谱峰分离度均大于 1.5。色谱图见图 1。



注: 1、2 号峰放大 10 倍, 3 号峰放大 2 倍

1. 山栀子苷 2. 京尼平苷酸 3. 京尼平龙胆双糖苷 4. 栀子苷
1. shanzhiside 2. geniposidic acid 3. genipin-1- β -D-gentiobioside 4. gardenoside

图 1 4 种成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of four constituents

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液, 50% 甲醇稀释成 6 个不同质量浓度, 取 10 μL 注入

色谱仪, 在“2.3”项色谱条件下测定。以峰面积为纵坐标(Y), 质量浓度为横坐标(X)进行回归, 同时在仪器信噪比 $S/N = 3$ 时测定最低检测

限, S/N=10 时测定最低定量限。结果见表 1, 可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表 1 4 种成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of four constituents

成分	回归方程	R ²	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	最低检测限/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	最低定量限/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
山梔苷	$Y = 19.105X + 1.0595$	1.0000	0.6~57.6	0.059	0.118
京尼平苷酸	$Y = 22.221X - 0.2946$	1.0000	0.6~61.2	0.063	0.125
京尼平龙胆双糖苷	$Y = 14.450X - 5.9641$	0.9999	2.1~206.4	0.211	0.423
梔子苷	$Y = 20.267X - 84.9530$	1.0000	21.0~2050.0	0.003	0.010

2.5.2 精密度试验 取对照品溶液适量, 在“2.3”项色谱条件下进样 6 次, 测得山梔苷、京尼平苷酸、京尼平龙胆双糖苷、梔子苷峰面积 RSD 分别为 0.54%、0.33%、0.35%、0.04%, 表明仪器精密度良好。

2.5.3 重复性试验 取同一批梔子药材 (批号 Y1601075) 和梔子干膏 (批号 Z160405) 各 6 份, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 测得前者山梔苷、京尼平苷酸、京尼平龙胆双糖苷和梔子苷峰面积 RSD 分别为 1.47%、2.69%、2.17%、0.37%, 后者分别为 1.25%、2.35%、1.05%、0.98%, 表明该方法重复性良好。

2.5.4 稳定性试验 取对照品溶液 (梔子苷 820.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、同一批梔子药材 (批号 Y1601075)、梔子干膏 (批号 Z160405) 适量, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定, 测得前者山梔苷、京尼平苷酸、京尼平龙胆双糖苷、梔子苷峰面积 RSD 分别为 0.61%、1.39%、0.67%、2.89%, 后者分别

为 1.72%、2.29%、0.38%、0.26%, 表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5.5 加样回收率试验 精密称取含有量已知的梔子药材粉末约 0.12 g、梔子干膏约 0.03 g, 平行 6 份, 按 1:1 比例精密加入各定量对照品, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 注入色谱仪进行测定, 计算加样回收率。结果, 梔子药材中山梔苷、京尼平苷酸、京尼平龙胆双糖苷、梔子苷的平均加样回收率为 97.80%~102.15%, RSD 分别为 2.90%、3.29%、1.68%、1.84%; 梔子干膏中其平均加样回收率为 97.97%~101.99%, RSD 分别为 1.81%、3.35%、1.55%、1.61%。

2.6 样品含有量测定

2.6.1 药材 将 5 批药材 (批号 Y1601070、Y1601071、Y1601072、Y1601073、Y1601074) 混合勾兑后进行检测, 实验结果符合本公司对梔子药材的内控指标, 批号定为 Y1601075。再取以上各批样品适量, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.3”项色谱条件下测定, 结果见表 2。

表 2 4 种成分含有量测定结果 (药材, mg/g)

Tab. 2 Results of content determination of four constituents (medicinal materials, mg/g)

成分	Y1601070	Y1601071	Y1601072	Y1601073	Y1601074	Y1601075	平均值
山梔苷	2.69	2.65	2.66	2.92	2.45	2.67	2.67
京尼平苷酸	0.45	0.46	0.44	0.46	0.48	0.47	0.46
京尼平龙胆双糖苷	9.21	8.66	9.10	9.01	8.68	9.10	8.96
梔子苷	65.82	62.80	64.03	70.70	58.22	64.64	64.37

2.6.2 中间体 将混合后的梔子药材 (批号 Y1601075) 进行投料, 得到 10 批中间体 (批号分别为 Z160402、Z160403、Z160404、Z160405、Z160406、Z160407、Z160408、Z160409、Z160410、Z160411), 其体积、密度等指标均符合公司规定, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.3”项色谱条件下测定, 结果见表 3。

2.7 质量分析与评价

2.7.1 批间一致性 采用 Excel 分析, 并引入 P 值来表示批次间质量的波动情况^[11], P 值越接近 100%, 批次间一致性越好, 在 75%~125% 范围

内为一致性良好, 计算公式为 $P = C_i/\bar{C}_i \times 100\%$, 其中 C_i 表示待测成分的浓度, \bar{C}_i 表示待测成分在不同批次样品中的平均浓度, 结果见图 2。图 2A 和 2B 显示, 京尼平苷酸的四分位区间 (即第 75 和第 25 百分位数之差) 在限定范围内, 而有极值超出范围, 表明其在梔子提取浓缩液和梔子萃取前浸膏中存在一定程度的批间波动, 而其他 3 种成分的 P 值均在 75%~125% 范围内, 表明批次间差异也较小; 图 2C 和 2D 显示, 各成分的 P 值均在 75%~125% 范围内, 表明批次间差异较小。此外, 在生产过程中各成分批次间波动均逐步趋于

稳定, 表明热毒宁注射液生产工艺较稳定。

表3 4种成分含有量测定结果(中间体, mg/g)

Tab. 3 Results of content determination of four constituents (intermediates, mg/g)

样品	成分	Z160402	Z160403	Z160404	Z160405	Z160406	Z160407	Z160408	Z160409	Z160410	Z160411
提取浓缩液	山梔苷	5.15	5.20	4.80	4.61	4.90	4.58	4.78	5.06	4.59	5.02
	京尼平苷酸	1.23	1.31	0.84	1.01	0.87	1.91	1.05	1.01	1.13	1.01
	京尼平龙胆双糖苷	16.27	16.84	15.19	15.07	15.61	15.84	17.45	17.70	16.77	15.16
	梔子苷	124.10	139.84	126.18	122.89	128.00	116.78	126.64	131.48	126.41	134.40
萃取前浸膏	山梔苷	5.69	5.82	6.34	5.75	6.08	6.10	5.85	5.72	5.05	5.63
	京尼平苷酸	1.57	1.76	1.11	1.51	1.53	1.96	1.68	2.20	1.20	1.12
	京尼平龙胆双糖苷	18.32	18.47	19.05	18.40	18.61	20.09	19.33	18.88	17.50	15.98
	梔子苷	138.25	147.38	151.61	143.02	145.06	147.21	135.65	136.09	128.10	139.10
萃取浓缩液	山梔苷	8.45	9.07	8.54	8.53	9.12	8.69	8.16	6.71	7.23	7.14
	京尼平苷酸	2.71	3.44	2.46	2.70	2.66	2.91	3.10	2.66	3.14	3.14
	京尼平龙胆双糖苷	26.36	29.24	27.40	29.51	30.65	31.15	29.76	23.85	27.71	27.82
	梔子苷	327.91	327.69	330.71	330.58	353.47	332.55	303.95	327.27	336.98	338.64
干膏	山梔苷	11.05	10.82	10.49	9.98	10.15	9.69	9.47	7.57	8.05	7.91
	京尼平苷酸	3.87	4.09	3.09	3.21	3.00	3.23	3.65	3.00	3.47	3.42
	京尼平龙胆双糖苷	36.83	35.09	33.75	35.15	34.95	35.68	34.64	27.26	30.44	30.55
	梔子苷	380.00	400.74	417.42	407.15	413.74	396.51	371.00	384.12	398.73	400.97

2.7.2 评价方法建立 基于表3数据, 初步确定这4种成分含有量在各中间体中的波动范围, 具体见表4。课题组前期将梔子苷作为质量控制指标, 而本实验发现, 各中间体中其RSD均小于5%, 符合公司规定, 同时山梔苷和京尼平龙胆双糖苷在各中间体中的RSD也较小。因此, 初步将山梔苷RSD控制在15%以内, 京尼平龙胆双糖苷控制在10%以内, 而京尼平苷酸达到27.04%, 并且含有量偏低, 故结合生产实际, 不将其作为质控指标。

表4 4种成分含有量范围

Tab. 4 Content ranges of four constituents

中间体	成分	平均值/ (mg·g ⁻¹)	范围/%	RSD/%
提取浓缩液	山梔苷	4.87	94~107	4.81
	京尼平苷酸	1.14	74~168	27.04
	京尼平龙胆双糖苷	16.19	93~109	5.97
	梔子苷	127.67	91~110	5.00
萃取前浸膏	山梔苷	5.80	87~109	5.96
	京尼平苷酸	1.56	71~140	22.72
	京尼平龙胆双糖苷	18.46	87~109	6.00
	梔子苷	141.15	91~107	4.97
萃取浓缩液	山梔苷	8.16	82~112	10.32
	京尼平苷酸	2.89	85~119	10.51
	京尼平龙胆双糖苷	28.34	84~110	7.72
	梔子苷	330.97	92~107	3.72
干膏	山梔苷	9.52	80~114	13.17
	京尼平苷酸	3.40	88~120	10.99
	京尼平龙胆双糖苷	33.43	82~107	9.00
	梔子苷	397.04	93~105	3.72

4 讨论

4.1 提取方法选择 本实验考察了提取溶剂

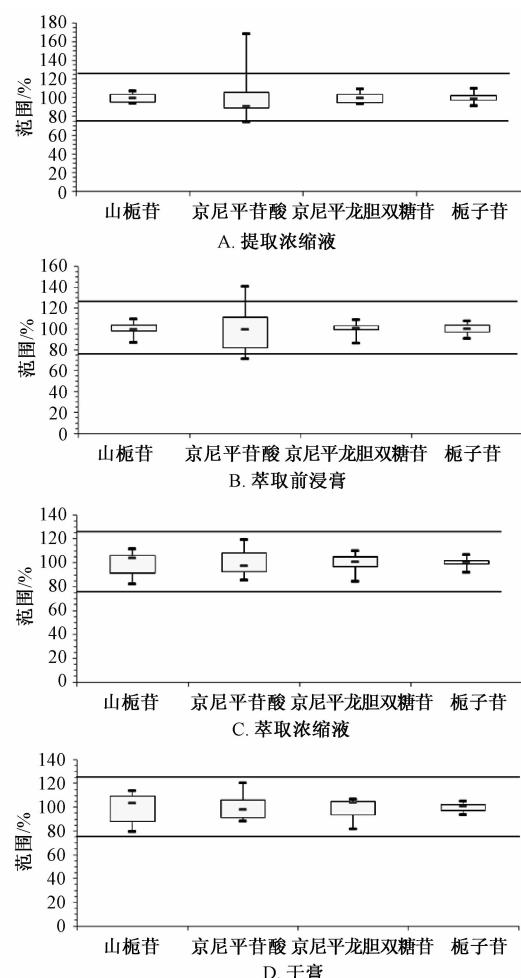


图2 4种成分含有量测定箱图

Fig. 2 Box charts of content determination of four constituents

(20% 甲醇、50% 甲醇、纯甲醇) 和提取方法(加热回流、超声提取),发现以50% 甲醇为溶剂时最佳,超声提取与加热回流效果基本一致,但前者更简单易行。在此基础上,再选择提取时间15、30、45 min 进行研究,发现30 min 和45 min 时各成分含有量差异不大,而15 min 时山梔苷和京尼平苷酸含有量明显降低。最终确定,最佳提取方法为50% 甲醇超声提取30 min。

4.2 流动相选择 本实验考察了甲醇-0.1% 磷酸、乙腈-0.1% 磷酸流动相,发现甲醇-0.1% 磷酸无法使京尼平龙胆双糖苷实现基线分离,而乙腈-0.1% 磷酸可使各成分均达到基线分离,而且色谱峰峰形良好,故最终选择其进行梯度洗脱。

4.3 结果分析 文献[12-14] 报道,总环烯醚萜苷可以干预脑出血后炎症反应,具有抗炎作用,与梔子药效具有一定关联性,也为热毒宁注射液药理作用提供依据。梔子中间体生产过程中的成分含有量与生产工艺密切相关,京尼平苷酸含有量在梔子提取浓缩液和萃取前浸膏中存在批次间波动,而其他成分批次间一致性均较好。纵观整个工艺流程,山梔苷、京尼平苷酸、京尼平龙胆双糖苷、梔子苷批次间波动均逐步趋于稳定,表明该制剂梔子中间体生产工艺稳定性良好。

5 结论

本实验首先建立HPLC法测定4种环烯醚萜苷类成分(山梔苷、京尼平苷酸、京尼平龙胆双糖苷、梔子苷)的含有量,发现该方法分离度良好,简便准确,重复性理想。再初步确定了各成分含有量范围,新增山梔苷和京尼平龙胆双糖苷作为梔子中间体的质量评价指标,完善了生产过程质量控制指标,可为热毒宁注射液质量评价提供参考依据。

参考文献:

[1] 黄小民,柳于介,何煜舟,等.热毒宁注射液治疗急性上呼

- 吸道感染的临床研究[J].中国临床药理学与治疗学,2006,11(4):470-473.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:2015年版一部[S].北京:中国医药科技出版社,2015:248.
- [3] 杨全军,范明松,孙兆林,等.梔子化学成分、药理作用及体内过程研究进展[J].中国现代中药,2010,12(9):7-11.
- [4] 郭建华,田成旺,刘晓,等.中药环烯醚萜类化合物研究进展[J].药物评价研究,2011,34(4):293-297.
- [5] 孟兆青,唐朝辉,闫云霞,等.梔子苷降尿酸作用研究[J].世界科学技术,2014,16(7):1565-1568.
- [6] 毕宇安,王振中,宋爱华.热毒宁注射液高效液相色谱指纹图谱研究及多成分定量分析[J].世界科学技术:中医药现代化,2010,12(2):298-303.
- [7] 张亚飞,王雪,毕宇安,等.一测多评法测定热毒宁注射液中9种成分[J].中草药,2013,44(22):3162-3169.
- [8] 萧伟,凌娅,毕宇安,等.热毒宁注射液的GC/MS指纹图谱[J].中国天然药物,2007,5(2):127-129.
- [9] 毕宇安,王雪,张伟,等.热毒宁注射液中糖类成分的HPLC-ELSD法测定[J].时珍国医国药,2015,26(5):1070-1072.
- [10] Li Y J, Wang S Y, Bi S, et al. Quality control throughout the production process of Chinese herbal preparations using HPLC-DAD multiple chromatographic fingerprinting combined with HPLC/Q-TOF MS: a case study on Re Du Ning Injections[J]. *Anal Methods*, 2015, 7(22): 9458-9465.
- [11] Liu X S, Wu Z Z, Yang K, et al. Quantitative analysis combined with chromatographic fingerprint for comprehensive evaluation of Danhong injection using HPLC-DAD[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 76: 70-74.
- [12] 杨奎,石娅萍,向靓,等.梔子总环烯醚萜苷对脑出血大鼠血肿周围NF- κ B表达的影响[J].中药药理与临床,2007,23(6):26-27.
- [13] 杨奎,石娅萍,向靓,等.梔子总环烯醚萜苷对脑出血大鼠血红素氧化酶-1表达的影响[J].中药新药与临床药理,2008,19(1):9-11.
- [14] 杨奎,闵志强,石娅萍,等.梔子总环烯醚萜苷对脑出血大鼠炎症反应与神经元凋亡的影响[J].中药新药与临床药理,2009,20(1):8-10.