

柴银方水煎液、中间体、颗粒 HPLC 指纹图谱建立及 5 种成分测定

陈佳莹, 张兴德*, 谢辉

(南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023)

摘要: 目的 建立柴银方(半枝莲、柴胡、蒲公英等)水煎液、中间体、颗粒 HPLC 指纹图谱,并测定绿原酸、马钱苷、连翘酯苷 A、连翘苷、柴胡皂苷 d 含量。方法 该药物 70% 甲醇提取液的分析采用 Heder a ODS-2 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相乙腈-0.1% 甲酸,梯度洗脱;体积流量 1.0 mL/min;柱温 35 ℃;检测波长 254 nm。结果 10 批水煎液、中间体、颗粒 HPLC 指纹图谱与各自对照图谱的相似度均大于 0.90,分别标定 24、22、22 个共有峰,通过对照品指认出 5 个,分别为绿原酸、马钱苷、连翘酯苷 A、连翘苷、柴胡皂苷 d,均在各自范围内线性关系良好($r>0.999 0$),平均加样回收率 97.31%~101.37%,RSD 1.35%~2.11%。三者之间相关性较好,各成分含量转移率在 73.94%~99.74% 范围内。结论 HPLC 指纹图谱结合多指标成分含量测定可用于柴银颗粒的质量控制。

关键词: 柴银方;水煎液;中间体;颗粒;HPLC 指纹图谱;化学成分

中图分类号: R927.2

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)12-3984-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.12.040

柴银方由半枝莲、柴胡、蒲公英、金银花、连翘、板蓝根、忍冬藤等药材组成,临床用于治疗病毒性高热^[1],疗效显著,为了方便患者携带服用,本实验拟将其研制为颗粒剂。方中柴胡^[2]具有透散泄热之功效,和解表里;连翘^[3]气芳烈而性清凉,能透肌解表,并且文献[4-6]报道,柴胡、连翘、板蓝根、蒲公英、忍冬藤、金银花等,都有一定的杀灭或者抑制病毒作用。

指纹图谱是一种综合、量化的鉴定手段,可全方位地对中药复方制剂所含化学成分的信息进行定性、定量分析^[7-13]。因此,本实验建立柴银方水煎液、中间体、颗粒 HPLC 指纹图谱,并对方中多种活性成分进行含量测定,以期初步研究三者之间化学成分的相似度及含量变化情况,对柴银颗粒制备全过程的质量控制具有重要意义。

1 材料

Waters 2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);MEI04E/02 电子分析天平(梅特勒托利多国际贸易有限公司)。马钱苷(批号 111640-2018084)、绿原酸(批号 110753-201817)、连翘酯苷 A(批号 111810-201606)、连翘苷(批号 110821-2018016)、柴胡皂苷 d(批号 110778-201711)对照品均购自中国药品食品检定研究院。半枝莲、柴胡、蒲公英、金银花、连翘、板蓝根、忍冬藤饮片均购自安徽省亳州中药饮片有限公司,经南京中医药大学陈建伟教授鉴定为正品,均符合 2015 年版《中国药典》规定。色谱纯乙腈、甲醇(美国 Tedia 公司);色谱纯甲酸(上海凌峰化学试剂有限公司);分析纯甲醇(南京化学试剂股份有限公司);水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Heder a ODS-2 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸(B),梯度洗脱(0~3 min, 5% A; 3~25 min, 5%~14% A; 25~40 min, 14%~20% A; 40~55 min, 20%~25% A; 55~65 min, 25%~35% A; 65~85 min, 35%~55% A);体积流量 1.0 mL/min;柱温 35 ℃;检测波长 254 nm;进样量 10 μL。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取各对照品适量,70% 甲醇溶解并定容至刻度,制成绿原酸、马钱苷、连翘酯苷 A、连翘苷、柴胡皂苷 d 质量浓度分别为 280.00、246.00、234.00、278.00、350.00 μg/mL 的溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液

2.2.2.1 水煎液 按日处方量称取各味饮片,按前期优化得到的最优工艺进行提取,即饮片加 12 倍量水煎煮 3 次,每次 2 h,水煎液过滤,合并滤液,减压浓缩(60 ℃)并定容至 500 mL,吸取 2 mL,置于 25 mL 量瓶中,70% 甲醇定容至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。

2.2.2.2 中间体 按日处方量称取各味饮片,制成水煎液后减压浓缩至相对密度为 1.05~1.08(60 ℃),冷却,置于真空干燥箱(0.09 MPa、70 ℃)中干燥成干浸膏,粉碎,得到中间体,精密称取 0.5 g,置于具塞锥形瓶中,精密加入 25 mL 70% 甲醇,称定质量,超声(250 W、40 kHz)处理 30 min,冷却至室温,70% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。

收稿日期: 2021-02-06

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(81001640)

作者简介: 陈佳莹(1996—),女,硕士,从事中药制剂及新型给药系统研究。Tel: 18801589282, E-mail: chenjiaying5868@163.com

* 通信作者: 张兴德(1976—),男,副教授,从事中药炮制、制剂及新型给药系统研究。E-mail: xingde 2293@126.com

2.2.2.3 颗粒 按日处方量称取各味，制成中间体后采用最优成型工艺进行湿法制粒，干燥，制得成品颗粒，精密称取1g，置于具塞锥形瓶中，按“2.2.2.2”项下方法制备，即得。

2.3 HPLC 指纹图谱建立

2.3.1 精密度试验 取同一批水煎液供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定6次，以连翘酯苷A（16号峰）为参照峰，测得各共有峰相对保留时间RSD均小于1.1%，相对峰面积RSD均小于3%，表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取同一批水煎液供试品溶液，于0、2、4、8、12、24、48 h在“2.1”项色谱条件下进样测定，以连翘酯苷A（16号峰）为参照峰，测得各共有峰相对保留时间RSD均小于1.8%，相对峰面积RSD均小于2.6%，表明溶液在48 h内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 取同一份水煎液，按“2.2.2.1”项下方法平行制备6份供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，以连翘酯苷A（16号峰）为参照峰，测得各共有峰相对保留时间RSD均小于1.3%，相对峰面积RSD均小于2.4%，表明该方法重复性良好。

2.3.4 图谱生成

2.3.4.1 参照峰选择 在供试品溶液色谱峰中，以连翘酯苷A（16号峰）峰面积最大，峰形较好，保留时间适中，分离度理想，故选择其作为参照峰。

2.3.4.2 水煎液 取对照品溶液、水煎液（S1~S10）供试品溶液适量，在“2.1”项色谱条件下进样测定，结果见图1~2。由此可知，水煎液指纹图谱中有24个共有峰，与对照品比对后指出9号峰为绿原酸，12号峰为马钱苷，16号峰为连翘酯苷A，22号峰为连翘苷，24号峰为柴胡皂苷d。

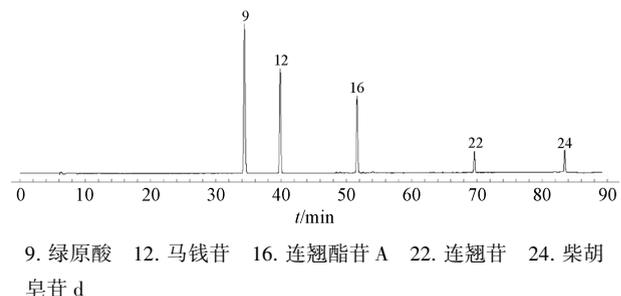


图1 对照品溶液 HPLC 色谱图

将相关指纹图谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件（2012版）”进行相似度分析，以对照图谱（SR）为参照，测得相似度分别为0.974、0.970、0.969、0.976、0.964、0.972、0.96、0.977、0.976、0.974，均在0.95以上，说明各批水煎液具有良好的相关性。

2.3.4.3 中间体、颗粒 取对照品溶液、中间体（Y1~Y10）供试品溶液、颗粒（Z1~Z10）供试品溶液适量，在“2.1”项色谱条件下进样测定，结果见图3~4。由此可知，中间体、颗粒指纹图谱中各有22个共有峰，与对照品比对

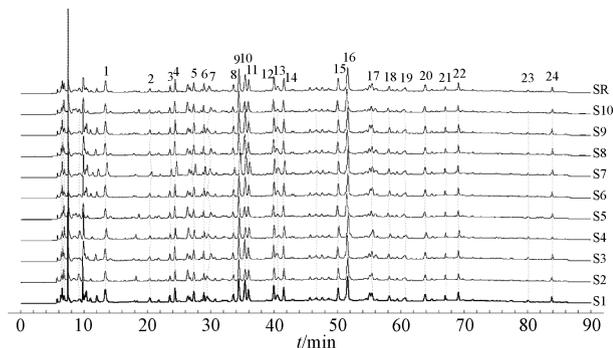


图2 10批水煎液 HPLC 指纹图谱

后也指出“2.4.3”项下5个峰。

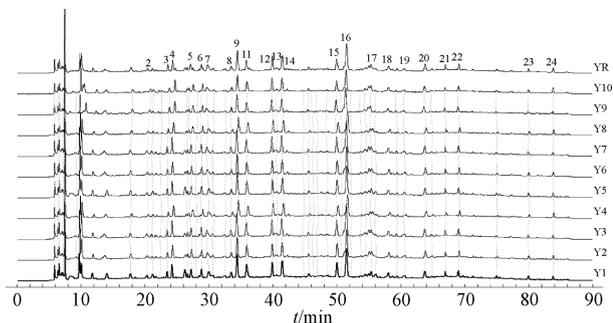


图3 10批中间体 HPLC 指纹图谱

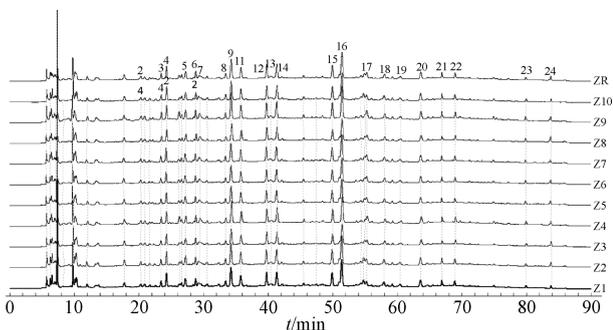


图4 10批颗粒 HPLC 指纹图谱

将相关指纹图谱数据分别导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件（2012版）”进行相似度分析，以对照图谱（YR、ZR）为参照，测得中间体相似度分别为0.945、0.948、0.940、0.978、0.972、0.968、0.949、0.972、0.978、0.948，颗粒相似度分别为0.974、0.973、0.974、0.966、0.971、0.958、0.979、0.982、0.975、0.962，均在0.94以上，表明各批样品一致性好，制剂工艺稳定可行。

2.3.4.4 水煎液-中间体-颗粒指纹图谱相似度分析 分别导入水煎液（S1、S2）、中间体（Y1、Y2）及颗粒（Z1、Z2）指纹图谱，评价三者相似度。结果见图5、表1。由此可知，3种形态指纹图谱共有峰基本一致，但水煎液中的1、10号峰没有在中间体、颗粒中形成共有峰，可能是由于金银花、连翘等饮片中挥发性成分减少，或受制备方式、温度等影响成分不稳定的因素而分解转化所致；三者相似度在0.861~0.985范围内，表明其相关性较好，该方法可

用于工艺制备过程及颗粒质量评价。

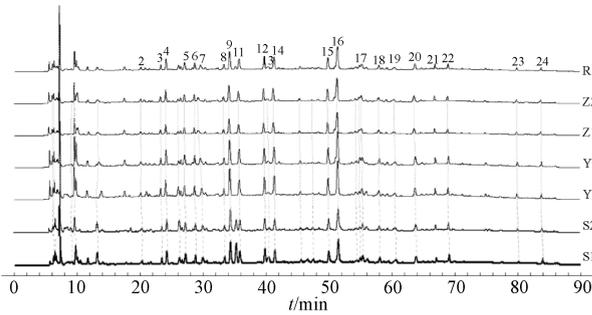


图5 水煎液-中间体-颗粒 HPLC 指纹图谱

表1 水煎液-中间体-颗粒 HPLC 指纹图谱相似度

样品	S1	S2	Y1	Y2	Z1	Z2	R
S1	1.000	0.962	0.866	0.87	0.861	0.879	0.921
S2	0.962	1.000	0.865	0.873	0.863	0.862	0.917
Y1	0.866	0.865	1.000	0.943	0.985	0.972	0.981
Y2	0.870	0.873	0.943	1.000	0.962	0.967	0.978
Z1	0.861	0.863	0.985	0.962	1.000	0.967	0.984
Z2	0.879	0.862	0.972	0.967	0.967	1.000	0.985
R	0.921	0.917	0.981	0.978	0.984	0.985	1.000

2.4 水煎液-中间体-颗粒含量测定

2.4.1 线性关系考察 精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液1、3、5、10、20、30 μL，在“2.1”项色谱条件下进样测定。以峰面积为纵坐标 (Y)，进样量为横坐标 (X) 进行回归，结果见表2，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表2 各成分线性关系

成分	回归方程	r	线性范围/μg
绿原酸	$Y=659\ 728X+775\ 469$	0.999 4	0.280~8.400
马钱苷	$Y=471\ 327X+586\ 848$	0.999 8	0.246~7.380
连翘酯苷 A	$Y=456\ 783X+823\ 181$	0.999 6	0.234~7.020
连翘苷	$Y=64\ 815X+92\ 579$	0.999 5	0.278~8.340
柴胡皂苷 d	$Y=590\ 935X-206\ 755$	0.999 3	0.350~10.500

2.4.2 精密度试验 精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液10 μL，在“2.1”项色谱条件下进样测定6次，测得绿原酸、马钱苷、连翘酯苷 A、连翘苷、柴胡皂苷 d 峰面积 RSD 分别为 1.32%、1.98%、2.6%、1.20%、0.97%，表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一份水煎液供试品溶液，于0、2、4、8、12、24、48 h 在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得绿原酸、马钱苷、连翘酯苷 A、连翘苷、柴胡皂苷 d 峰面积 RSD 分别为 1.69%、0.92%、0.73%、1.36%、1.84%，表明溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.4.4 重复性试验 取同一批水煎液，按“2.2.2.1”项下方法平行制备6份水煎液供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得绿原酸、马钱苷、连翘酯苷 A、连翘苷、柴胡皂苷 d 峰面积 RSD 分别为 1.05%、1.41%、0.66%、1.78%、1.20%，表明该方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验 取同一批各成分含量已知的中间

体粉末6份，每份约0.5 g，精密称定，置于具塞锥形瓶中，精密加入各对照品（与中间体中各成分含量相当）适量，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，绿原酸、马钱苷、连翘酯苷 A、连翘苷、柴胡皂苷 d 平均加样回收率分别为 99.45%、97.31%、99.68%、101.37%、97.77%，RSD 分别为 2.05%、1.73%、1.94%、1.35%、2.11%。

2.4.6 结果分析 由表3可知，除了绿原酸、柴胡皂苷 d 外，其他成分转移率均大于90%，含量基本稳定。

表3 各含量测定结果 (mg/g)

样品	绿原酸	马钱苷	连翘酯苷 A	连翘苷	柴胡皂苷 d
S3	1.411 6	1.165 5	2.994 8	1.000 6	1.246 8
S4	1.797 3	1.419 7	3.014 2	0.930 0	1.246 9
Y3	1.252 7	1.183 8	2.669 1	0.816 9	0.864 9
Y4	1.332 7	1.376 6	2.949 7	0.994 0	0.978 9
Z3	1.293 1	1.102 8	2.561 6	0.858 2	0.859 2
Z4	1.135 5	1.341 0	2.964 4	0.947 9	0.803 1
水煎液→中间体平均	80.57	99.04	93.51	93.80	73.94
转移率/%					
中间体→颗粒平均	93.94	95.45	98.35	99.74	90.16
转移率/%					

3 讨论

本实验建立了柴银方水煎液、中间体、成品的 HPLC 指纹图谱，结果水煎液确定了24个共有峰，中间体、颗粒均确定了22个共有峰，其中能指认出5个峰。对比单煎饮片指纹图谱发现，有新成分产生，可能是方中各味饮片在合煎过程中相互作用所致，并且可能使中药复方配伍合煎呈现出比单煎更强的药效^[14-15]。

含量测定结果显示，绿原酸、柴胡皂苷 d 在水煎液-中间体-颗粒传递过程中与其他成分相比损失较多，可能是两者在浓缩、干燥期间长时间受热，性质不稳定所致^[16-17]，表明对颗粒的质量评价与控制不仅要着重于提高水煎液标准，更要关注从提取到制粒的整个生产流程。

本实验首先考察了不同提取溶剂、提取方法、流动相、色谱柱，发现70%甲醇提取后超声处理30 min 时效果最好。然后，进行紫外可见的200~400 nm 全波长扫描，发现在254 nm 处的色谱峰信息较多，分离度较好，最终确定为“2.1”项下水平条件。再考察了不同色谱柱、柱温(25、30、35℃)对色谱峰分离度的影响，最终确定为汉邦 Heder ODS-2 C₁₈ 色谱柱、柱温35℃。

4 结论

本实验首次建立了柴银颗粒从水煎液至中间体、颗粒的全方位的 HPLC 指纹图谱，表明颗粒质量能通过指纹图谱结合定量分析来建立标准，从而实现从提取到制粒等整个过程的控制，可为缩小成品间差异，生产出安全、药效稳定的柴银颗粒提供依据。

参考文献:

[1] Chughtai A A, Wang Q, Dung T C, et al. The presence of

- fever in adults with influenza and other viral respiratory infections[J]. *Epidemiol Infect*, 2017, 145(1): 148-155.
- [2] 辛国, 赵彤彤, 黄晓巍. 柴胡化学成分及药理作用研究进展[J]. 吉林中医药, 2018, 38(10): 1196-1198.
- [3] 夏伟, 董诚明, 杨朝帆, 等. 连翘化学成分及其药理学研究进展[J]. 中国现代中药, 2016, 18(12): 1670-1674.
- [4] 邢世华, 李晓波. 清热解毒类中药抗病毒活性及作用机制研究进展[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(4): 464-468.
- [5] 陈冉, 王婷婷, 李开铃, 等. 免疫调节抗病毒中药的特性与应用[J]. 中草药, 2020, 51(6): 1412-1426.
- [6] 章德林, 汤丹丰, 郑琴, 等. 具有抗感染作用的中药分类研究[J]. 中草药, 2015, 46(24): 3771-3778.
- [7] 赵娟, 谢世静, 赵兴华, 等. 中药指纹图谱质控方法研究进展[J]. 云南中医中药杂志, 2020, 41(1): 82-86.
- [8] 赵晨曦. 中药复方制剂指纹图谱质量评价研究进展[J]. 临床医药文献电子杂志, 2019, 6(A2): 194.
- [9] 聂燕, 汪滢, 赵璐, 等. 中药及其复方指纹图谱的研究新进展[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(12): 3110-3112.
- [10] 余一鸣, 胡永慧, 韩立云, 等. 中药质量控制的研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(12): 2557-2563.
- [11] 张萍, 杨燕, 鄢丹, 等. 多指标成分含量测定与指纹图谱分析在中药制备工艺与质量控制中的应用[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(1): 120-123.
- [12] 孙岚萍, 顾志荣, 马转霞, 等. 黄芩饮片-标准汤剂-配方颗粒 HPLC 指纹图谱相关性研究[J]. 中草药, 2020, 51(10): 2781-2789.
- [13] 黄博, 姚力, 林燕翔, 等. 基于指纹图谱及多指标成分定量分析的肿节风配方颗粒质量标准研究[J]. 中草药, 2019, 50(13): 3058-3064.
- [14] 吴笛, 刘法锦, 廖彩霞. 中药配伍对化学成分的影响[J]. 中成药, 2003, 25(2): 152-154.
- [15] 李玥. 中药药对配伍后药效物质基础变化研究进展[J]. 海峡药学, 2017, 29(8): 72-74.
- [16] 陈钢, 侯世祥, 胡平, 等. 金银花提取物中绿原酸的稳定性研究[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(3): 34-37.
- [17] 邬科芳, 倪力军, 张立国. 不同提取工艺对柴胡中柴胡皂苷 a 含量的影响[J]. 中成药, 2006, 28(8): 1230-1231.

UPLC-MS 法鉴别银翘解毒类制剂中山银花投料情况

阎睿, 贺灵芝, 熊有明, 郭娅, 王文婷, 姜登军, 何世新*
(重庆市万州食品药品检验所, 三峡库区道地药材开发利用重庆市重点实验室, 重庆 404100)

摘要: 目的 建立 UPLC-MS 法鉴别银翘解毒类制剂中山银花投料情况。方法 该药物 50% 甲醇提取液的分析采用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.9 μm); 流动相甲醇-0.1% 甲酸, 梯度洗脱; 体积流量 0.2 mL/min; 柱温 40 ℃; 电喷雾离子源; 正离子检测; 多反应监测模式。结果 灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙在 1~200 ng/mL 范围内线性关系良好 ($r \geq 0.999 0$), 平均加样回收率分别为 95.30%~100.27%、95.36%~100.24%, RSD 分别为 1.86%~4.72%、1.71%~4.04%。结论 该方法真实可靠, 重复性好, 可用于银翘解毒类制剂中山银花投料的鉴别。

关键词: 银翘解毒类制剂; 山银花; 灰毡毛忍冬皂苷乙; 川续断皂苷乙; UPLC-MS

中图分类号: R927.2

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)12-3987-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.12.041

银翘解毒类制剂是治疗风热感冒、发热头痛、咽喉疼痛的常用中成药, 具有辛凉解表、清热解毒等功效, 主要由金银花、连翘、薄荷等 9 种药材组成^[1-3]。2005 年前, 《中国药典》将忍冬、红腺忍冬、华南忍冬、毛花柱忍冬共同归属于金银花, 但 2005 年后药典中的金银花仅指忍冬, 其余均为山银花^[4-5], 故市面上仍有一些厂商以山银花替代金银花生产银翘解毒类制剂。陆静娴^[6]对 189 批银翘

解毒颗粒进行鉴别后发现, 山银花替代率为 49.7%, 表明这是一种普遍现象, 故实现银翘解毒类制剂中山银花的鉴别对提高其质量有重要意义。

对金银花、山银花鉴别的关键在于发现两者之间的特征性物质。薛强^[7]通过 HPLC-Q Exactive Orbitrap-MS 发现, 灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙可能为金银花、山银花特征性成分; 王浩斌等人建立了灰毡毛忍冬皂苷乙、川续

收稿日期: 2022-08-16

基金项目: 2021 年度重庆市药品科研项目 (渝药监 [2021] 30)

作者简介: 阎睿 (1986—), 男, 主管药师, 从事药品质量分析和研究工作。Tel: (023) 58152873, E-mail: 14252361@qq.com

* 通信作者: 何世新 (1967—), 男, 主任药师, 从事药品质量分析和标准研究工作。Tel: (023) 58760233, E-mail: 563627478@qq.com