

[中药指纹图谱]

双黄连注射液 HPLC 指纹图谱研究

王艳伟¹, 宋立言², 代雪平¹, 宋汉敏¹

(1. 河南省食品药品检验所, 河南 郑州 450003; 2. 郑州大学临床药理研究所, 河南 郑州 450052)

摘要: 目的 建立双黄连注射液(金银花、黄芩、连翘)的 HPLC 指纹图谱,用于该制剂质量的控制。方法 运用 Waters Alliance 2695 高效液相色谱仪,采用 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm 5 μm),流动相为乙腈-0.5% 磷酸溶液,梯度洗脱,柱温 40 ℃,体积流量为 1.0 mL/min,检测波长为 350 nm。结果 在 14 批双黄连注射液基础上建立了有 14 个特征峰的双黄连注射液的 HPLC 指纹图谱。其中 10 个成分为新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、A 和 C,咖啡酸、连翘酯苷 A、黄芩苷和黄芩素。结论 该方法稳定、准确、重现性好,同时提供的信息较多,可用于双黄连注射液的全面质量控制。

关键词: 双黄连注射液; 指纹图谱; HPLC

中图分类号: R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2011)09-1461-04

RP-HPLC fingerprint of Shuanghuanglian Injection

WANG Yan-wei¹, SONG Li-yan², DAI Xue-ping¹, SONG Han-min¹

(1. Henan Provincial Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China; 2. Institute of Clinical Pharmacology of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

ABSTRACT: **AIM** To explore a fingerprint method for quality control of Shuanghuanglian Injection (*Lonicerae Japonicae Flos*, *Scutellariae Radix*, *Forsythiae Fructus*). **METHODS** The samples were determined by Waters Alliance 2695 HPLC with Phenomenex Luna C₁₈ column(4.6 mm×250 mm 5 μm) by gradient elution using acetonitrile-0.5% phosphoric acid as mobile phase at 40 ℃ column temperature, flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 350 nm. **RESULTS** The fourteen common peaks were established based on the fourteen batches of Shuanghuanglian Injection, which of ten components were identified as neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, isochlorogenic acid B, A, and C, caffeic acid, forsythiaside, scutellarin, and scutellarein. **CONCLUSION** The method is stable, accurate and creditable, meanwhile it provides useful information for the quality control of Shuanghuanglian Injection.

KEY WORDS: Shuanghuanglian Injection; fingerprint; HPLC

双黄连注射液是由金银花、黄芩、连翘制成的现代中药制剂,具有清热解毒、清宣风热的作用。临床上用于外感风热引起的发热、咳嗽、咽痛。适用于病毒及细菌感染的上呼吸道感染、肺炎、扁桃体炎、咽炎等^[1]。但随着使用范围日渐扩大,应用人群增加,加之临床应用不当及生产工艺不稳定多方面因素,引起的不良反应例数也相应增加,甚至有致人死亡的个案^[2-3]。为进一步规范双黄连注射液的生产,提高其质量,减少不良反应的发生,根据国家食品药品监督管理局《中药注射剂安全性再评价基本技术

要求》,本实验建立了双黄连注射液的 HPLC 指纹图谱,为双黄连注射液的全面质量控制提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Waters Alliance 2695 系统,含四元梯度泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱以及 Waters Empower 色谱工作站, Waters 二极管阵列检测器(PDA 996); Phenomenex Luna C₁₈(2) 100A(4.6 mm×250 mm 5 μm) 色谱柱。

1.2 试剂与样品 绿原酸对照品(批号 110753-200413,中国药品生物制品检定所),咖啡酸对照品

收稿日期: 2010-09-09

作者简介: 王艳伟(1978—),男,主管药师,主要从事中药检验工作。E-mail: wblx101@163.com

(批号 110885-200102, 中国药品生物制品检定所), 黄芩苷对照品(批号 110715-200514, 中国药品生物制品检定所), 黄芩素对照品(批号 111595-200604, 中国药品生物制品检定所); 甲醇、乙腈为色谱纯(Merck 公司), 磷酸为分析纯(天津市风船化学试剂科技有限公司), 水为超纯水; 黄芩、金银花、连翘药材由河南福森药业有限公司提供, 并经河南省食品药品监督管理局雷留成副主任药师鉴定; 注射用黄芩提取物、注射用金银花连翘提取物由河南福森药业有限公司提供; 双黄连注射液由河南福森药业有限公司提供(批号: 0910001, 0910002, 0910003, 0910004, 0910005, 0910006, 0910009, 0910010, 0910011, 0910012, 0910016, 0910018, 0910019, 0910020)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 双黄连注射液: Phenomenex Luna C₁₈(2) 100A 色谱柱(250 mm × 4.6 mm 5 μm); 流动相为乙腈(A) - 0.5% 磷酸溶液(B) 进行梯度洗脱 0 ~ 5 min, 5% A ~ 5% A, 5 ~ 15 min, 5% A ~ 10% A, 15 ~ 20 min, 10% A ~ 14% A, 20 ~ 50 min, 14% A ~ 18% A, 50 ~ 70 min, 18% A ~ 25% A, 70 ~ 85 min, 25% A ~ 30% A, 85 ~ 110 min, 30% A ~ 50% A, 体积流量 1 mL/min; 检测波长 350 nm; 柱温 40 °C。理论板数按绿原酸峰计算应不低于 6 000。

黄芩药材、注射用黄芩提取物、金银花药材、注射用金银花连翘提取物色谱条件同上, 连翘药材检测波长为 280 nm, 其余条件同上。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸对照品适量, 置棕色量瓶中, 加 50% 甲醇制成每 1 mL 含 60 μg 的溶液, 即得(10 °C 以下保存)。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 黄芩 取本品粉末约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定质量, 加热回流 2 h, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3.2 注射用黄芩提取物 取本品约 50 mg, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加水 20 mL, 超声处理 10 min, 振摇并滴加 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液使完全溶解(pH 值不大于 7.0), 加水稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3.3 金银花 取本品粉末约 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, 加热回流 2 h, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3.4 连翘 取本品粉末约 1 g, 精密称定, 置具塞

锥形瓶中, 精密加入水 50 mL, 称定质量, 加热回流 4 h, 放冷, 再称定质量, 用水补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3.5 注射用金银花连翘提取物 精密吸取本品 2 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3.6 双黄连注射液 取本品, 摇匀, 滤过, 作为供试品溶液。

2.4 样品测定 精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 记录 110 min 色谱图。将色谱图导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统, 与对照指纹图谱相比较, 计算相似度。

3 方法学考察

3.1 精密度试验 取同一批次供试品溶液(批号: 0910001), 连续进样 6 次, 测定指纹图谱。结果表明, 各色谱峰相对保留时间的 RSD 均在 0.2% 以内, 相对峰面积的 RSD 均在 5% 以内, 有较高的相似度(均在 0.95 以上), 精密度良好。

3.2 稳定性试验 取同一批次供试品溶液(批号: 0910001), 分别在第 0、2、4、6、8、10 h 进样, 测定指纹图谱。结果表明, 各色谱峰相对保留时间的 RSD 均在 0.2% 以内, 相对峰面积的 RSD 均在 5% 以内, 有较高的相似度(均在 0.95 以上), 供试品溶液在 10 h 内基本稳定。

3.3 重复性试验 取同一批次样品(批号: 0910001), 平行制备 6 份供试品溶液, 测定指纹图谱。结果表明, 各色谱峰相对保留时间的 RSD 均在 0.2% 以内, 相对峰面积的 RSD 均在 5% 以内, 有较高的相似度(均在 0.95 以上), 重复性良好。

4 双黄连注射液指纹图谱的建立

测定本品 14 批样品的指纹图谱, 将其结果导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004, 1.0A 版), 以平均数法生成对照图谱, 评价各样品的相似度, 结果见图 1、表 1(屏蔽 12 号黄芩苷峰)。确定特征峰 14 个, 统计了各批总出峰数, 特征峰数与总出峰数的百分比及特征峰与总出峰面积的百分比。见表 2。

5 双黄连注射液对照指纹图谱中色谱峰的确认

取大黄酚、大黄素甲醚、咖啡酸、绿原酸、连翘苷、黄芩苷、芦丁、金丝桃苷、槲皮苷、木犀草苷、木犀草素、槲皮素、黄芩素、汉黄芩素、汉黄芩苷、隐绿原酸、新绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C、连翘酯苷 A 等对照品, 分别配制成适当质量浓度的对照品, 按照指纹图谱测定方法, 测定对照品色谱

表 1 14 批双黄连注射液指纹图谱相似度结果

Tab. 1	The results of the 14 batches of Shuanghuanglian Injection Similarity analysis														
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	对照指纹图谱
S1	1.000	0.966	0.967	0.942	0.943	0.985	0.985	0.939	0.936	0.961	0.961	0.908	0.889	0.999	0.964
S2	0.966	1.000	0.999	0.995	0.995	0.991	0.990	0.979	0.978	0.984	0.984	0.959	0.946	0.964	0.992
S3	0.967	0.999	1.000	0.994	0.995	0.991	0.991	0.980	0.979	0.984	0.984	0.959	0.947	0.965	0.993
S4	0.942	0.995	0.994	1.000	1.000	0.978	0.978	0.987	0.985	0.985	0.985	0.971	0.963	0.940	0.992
S5	0.943	0.995	0.995	1.000	1.000	0.978	0.978	0.988	0.986	0.986	0.985	0.973	0.964	0.941	0.993
S6	0.985	0.991	0.991	0.978	0.978	1.000	1.000	0.967	0.963	0.981	0.978	0.938	0.920	0.986	0.985
S7	0.985	0.990	0.991	0.978	0.978	1.000	1.000	0.966	0.963	0.981	0.978	0.937	0.920	0.986	0.985
S8	0.939	0.979	0.980	0.987	0.988	0.967	0.966	1.000	0.999	0.996	0.997	0.988	0.980	0.936	0.995
S9	0.936	0.978	0.979	0.985	0.986	0.963	0.963	0.999	1.000	0.994	0.996	0.988	0.980	0.934	0.993
S10	0.961	0.984	0.984	0.985	0.986	0.981	0.981	0.996	0.994	1.000	0.999	0.981	0.971	0.960	0.998
S11	0.961	0.984	0.984	0.985	0.985	0.978	0.978	0.997	0.996	0.999	1.000	0.983	0.973	0.959	0.998
S12	0.908	0.959	0.959	0.971	0.973	0.938	0.937	0.988	0.988	0.981	0.983	1.000	0.998	0.905	0.981
S13	0.889	0.946	0.947	0.963	0.964	0.920	0.920	0.980	0.980	0.971	0.973	0.998	1.000	0.885	0.971
S14	0.999	0.964	0.965	0.940	0.941	0.986	0.986	0.936	0.934	0.960	0.959	0.905	0.885	1.000	0.963
对照指纹图谱	0.964	0.992	0.993	0.992	0.993	0.985	0.985	0.995	0.993	0.998	0.998	0.981	0.971	0.963	1.000

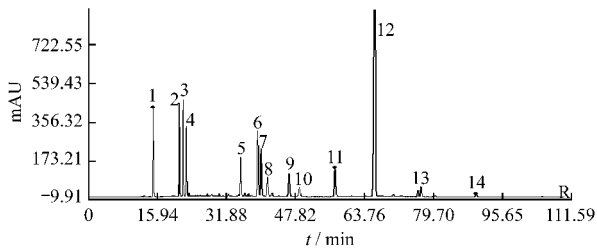


图 1 双黄连注射液对照指纹图谱

Fig. 1 The HPLC fingerprint of Shuanghuanglian Injection

表 2 14 批双黄连注射液的总出峰数及其特征峰所占比例

Tab. 2 The total numbers of the peaks of Shuanghuanglian Injection and its proportion of the characteristic peaks

编号	总出峰数/个	特征峰数/总出峰数	特征峰面积/%
S1	36	38.89	95.52
S2	35	40.00	95.92
S3	35	40.00	95.87
S4	34	41.18	96.22
S5	34	41.18	96.19
S6	34	41.18	96.04
S7	35	40.00	95.94
S8	35	40.00	95.85
S9	36	38.89	95.40
S10	36	38.89	95.70
S11	37	37.84	94.50
S12	35	40.00	95.62
S13	35	40.00	95.46
S14	35	40.00	95.81

图 1 并与对照指纹图谱中的相关峰进行光谱图比对,最后确认对照指纹图谱中 1 号峰为新绿原酸,2 号峰为绿原酸,3 号峰为隐绿原酸,4 号峰为咖啡酸,7 号峰为连翘酯苷 A,9 号峰为异绿原酸 B,10 号峰为

异绿原酸 A,11 号峰为异绿原酸 C,12 号峰为黄芩苷,14 号峰为黄芩素^[4]。

6 双黄连注射液对照指纹图谱中特征峰的归属

取黄芩、黄芩提取物、金银花、连翘、金银花连翘提取物制成适当浓度的供试品溶液,按照指纹图谱测定方法,测定各自色谱图,并与对照指纹图谱中的相关峰进行光谱图比对,最后确认对照指纹图谱中 1 号峰为新绿原酸,2 号峰为绿原酸,3 号峰为隐绿原酸,9 号峰为异绿原酸 B,10 号峰为异绿原酸 A,11 号峰为异绿原酸 C,上述峰均来自金银花;4 号峰为咖啡酸,来自金银花和连翘;7 号峰为连翘酯苷 A,与 5、6 号峰均来自连翘;12 号峰为黄芩苷,14 号峰为黄芩素,与 8 号、13 号峰均来自黄芩^[5](图 2 ~ 图 6)。

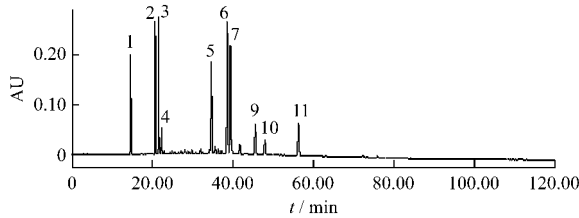


图 2 注射用金银花连翘提取物指纹图谱

Fig. 2 The HPLC fingerprint of extract of *Lonicera japonicae Flos* and *Forsythiae Fructus*

7 讨论

7.1 洗脱系统的选择 试验过程中共选择了甲醇-0.5%冰醋酸溶液^[6]、乙腈-0.5%冰醋酸溶液^[7]、乙腈-0.5%磷酸溶液等 3 种流动相系统,结果表明乙腈-0.5%磷酸溶液分离效果最好。

7.2 检测波长的选择 试验过程中,波长为 254

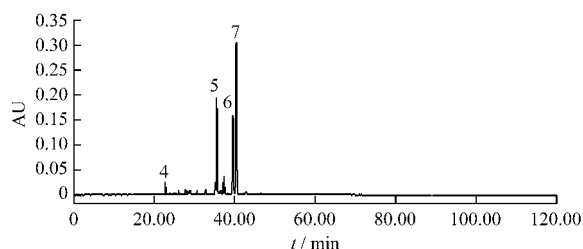


图3 连翘指纹图谱

Fig. 3 The HPLC fingerprint of *Forsythiae Fructus*

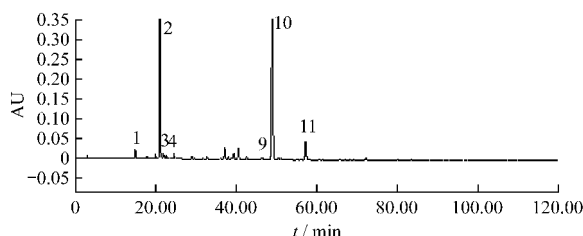


图4 金银花指纹图谱

Fig. 4 The HPLC fingerprint of *Lonicerae japonicae Flos*

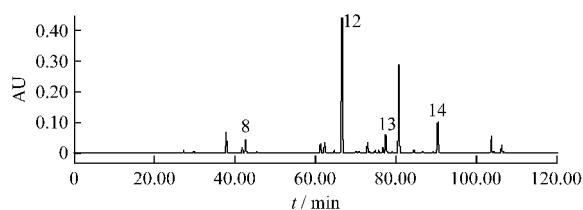


图5 黄芩指纹图谱

Fig. 5 The HPLC fingerprint of *Scutellariae Radix*

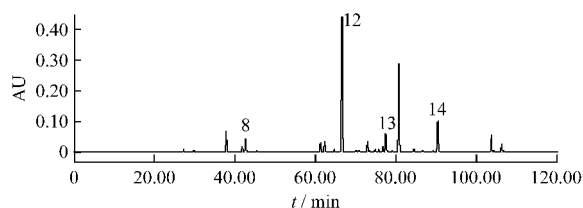


图6 注射用黄芩提取物指纹图谱

Fig. 6 The HPLC fingerprint of *Scutellariae Radix* extract

1. 新绿原酸 2. 绿原酸 3. 隐绿原酸 4. 咖啡酸

7. 连翘酯苷 A 9. 异绿原酸 B 10. 异绿原酸 A

11. 异绿原酸 C 12. 黄芩苷 14. 黄芩素

1. neochlorogenic acid 2. chlorogenic acid 3. cryptochlorogenic acid

4. caffeic acid 7. forsythiaside 9. isochlorogenic acid B

10. isochlorogenic acid A 11. isochlorogenic acid C

12. scutellarin 14. scutellarein

nm 和 280 nm 下,黄芩苷峰过大,其他峰相对峰面积不稳定,不易分开,波长 350 nm 下各峰比例良好,峰与峰间距良好,易于分辨,故选择 350 nm 为测定波长。

7.3 柱温的选择 为了保持色谱分析的一致性,

设定柱温来控制不同实验环境下的色谱分析,试验中考察了 25℃、30℃、35℃、40℃ 柱温下的分离情况,结果表明,柱温 40℃ 时分离效果较好。

7.4 实验中发现双黄连注射液指纹图谱与注射用金银花连翘提取物指纹图谱存在一定差异,原因可能是双黄连注射液制备工艺中用 40% 氢氧化钠溶液调 pH 值,在加热灭菌及放置过程中使绿原酸同系物及连翘酯苷同系物发生了水解反应所致,具体反应机理尚需进一步研究。

7.5 实验中确定了 14 个特征色谱峰,较为全面的反映了双黄连注射液药理作用的物质基础,为加强双黄连注射液质量控制提供了依据。但双黄连注射液有效成分复杂^[8-12],尚需进一步研究其药理、毒理的物质基础和作用机理,确定双黄连注射液临床疗效和不良反应产生的根源,为临床合理用药提供科学依据。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准: 中药成方制剂第十一册[S]. 1996: 38.
- [2] 刘文涛. 双黄连注射液的不良反应[J]. 医药导报, 2003, 22(增): 142-143.
- [3] 张志强. 双黄连注射液不良反应概述[J]. 实用中医药杂志, 2003, 19(6): 334-335.
- [4] 郭洁, 宋殿荣, 王跃飞, 等. 双黄连冻干粉 HPLC 指纹图谱特征色谱峰的归属研究[J]. 天津中医药, 2009, 26(6): 497-499.
- [5] 张洁, 马百平, 赵阳, 等. 双黄连粉针剂指纹图谱中特征色谱峰的组成药味归属及定性[J]. 中成药, 2005, 27(12): 1365-1369.
- [6] 李方, 姜文红, 刘丽娟, 等. 注射用双黄连(冻干)指纹图谱的建立及其在质量控制中的应用[J]. 中成药, 2007, 29(8): 1196-1198.
- [7] 王新宏, 安睿, 邹云, 等. 数字化色谱指纹谱技术在双黄连制剂质量及药材鉴定中的应用[J]. 中草药, 2002, 33(2): 115-118.
- [8] 钮旭升, 闫海霞, 高慧媛, 等. 双黄连粉针中抗病毒部位活性与化学成分研究[J]. 中国现代中药, 2006, 8(1): 16.
- [9] 刘悦, 宋少江, 徐绪, 等. 连翘化学成分研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2003, 20(2): 101.
- [10] 高玉敏, 王名洲, 王建平, 等. 金银花化学成分的研究[J]. 中草药, 1995, 26(11): 568.
- [11] 杨得坡, 张小莉. 中药黄芩挥发性化学成分的研究[J]. 中药新药与临床药理, 1999, 10(4): 234.
- [12] 吕本强. 注射用双黄连粉针剂物质基础研究[D]. 广州: 第一军医大学, 2007.