

山海丹牌野菊花注射液特征图谱分析

刘嘉澍¹, 张国跃¹, 罗定强¹, 宋莉¹, 惠选柱²

(1. 陕西省食品药品检验所, 陕西 西安 710065;

2. 陕西医药控股集团山海丹医药有限责任公司, 陕西 西安 710065)

摘要:目的 建立山海丹牌野菊花注射液中有效成分的含量测定及特征图谱研究方法, 对其质量进行控制。方法 采用高效液相色谱法(HPLC)梯度洗脱, 流动相: 乙腈-0.5% 磷酸溶液, 梯度洗脱, 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 326 nm, 以木犀草苷为参照峰计算其共有峰的相对保留时间。结果 标记 8 个吸收值较大的共有峰, 9 批供试品中 S 峰与标准对照品峰相对应, 其余特征峰的相对保留时间 RSD 均小于 0.6%。结论 该特征图谱方法可行, 可用于该厂家野菊花注射液的质量控制。

关键词:野菊花注射液; 高效液相色谱法; 特征图谱

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2016.10.016

Specific chromatograms of shanhaidan yejuhua injection by HPLC

LIU Jiashu, ZHANG Guoyue, LUO Dingqiang, et al

(*Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi 710065, China*)

Abstract; Objective To establish a method for the determination of the content and the study on the feature map of the active ingredients in Shanhaidan Yejuhua Injection, and to study its quality control. **Methods** HPLC Gradient elution was used with the mobile phase of acetonitrile-0.5% phosphate. The flow rate was set at $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ and the detection wavelength was 326nm. The relative retention time was calculated with galuteolin as the reference peak. **Results** A total of 8 larger absorption values were marked, and the S peak of the 9 batches was correspondent to the standard control. The relative retention time of the other characteristic peaks was less than 0.6%. **Conclusions** The method is feasible, and can be used for the quality control of shanhaidan yejuhua injection in the factory.

Key words: Yejuhua injection; HPLC; Specific chromatograms

目的条带是否存在。因此, 对 PCR 反应条件进行了再研究, 通过减小引物与模板的比率和提高退火温度, 减少了 PCR 反应中错配的发生; 使用简单实用的乙醇沉淀法对 PCR 产物进行了纯化, 杜绝了 PCR 产物中的 PCR 缓冲体系对酶切体系的干扰。改进的方法应用于多批川贝母的鉴别, 结果均良好。

随着中药材的分子鉴别法不断被药典收录, 分子鉴别法的特殊性也逐渐显示出来。和其他药典方法相比, 分子鉴别法由于灵敏度高, 细微试剂仪器的不同就有可能造成很大的结果差别。正因为这种现象的存在, 中国药典 2015 版四部才收录了通则 9 107 种中药材 DNA 条形码分子鉴定法指导原则。同时, 由于分子鉴别法灵敏度高, 不同的中药饮片形式(完整个体, 部分个体, 粉末)给如何取样进行基因组提取带来了不小的困难^[10]。而且在酶切完成后, 有时会出现没有酶切完全的现象, 也可能是由于样品混有伪品引起的。

出版社, 2015: 250-251.

- [2] 王爱华, 王丽丽. 中药川贝母的历史沿革及临床应用分析[J]. 世界临床医学, 2015, 9(11): 180-182.
- [3] 孙韬, 彭成. 川贝母止咳颗粒的平喘作用研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(7): 1575-1578.
- [4] 余芙蓉. 川贝母性状及混淆品与伪品鉴别[J]. 实用中医内科杂志, 2010, 24(5): 98-99.
- [5] 霍锋, 张泷, 张娅. DNA 分子标记技术在药用植物鉴别中应用[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(8): 4089-4091.
- [6] 蔡佩欣, 胡学善, 黄文秀, 等. DNA 芯片技术用于贝母的基因分型和种类鉴别[J]. 药学报, 2003, 38(3): 185-190.
- [7] 徐传林, 李会军, 李萍, 等. 川贝母药材分子鉴定方法研究[J]. 中国药科大学学报, 2010, 41(3): 226-230.
- [8] 周亭亭, 于文静, 李明成, 等. 川贝母 DNA 检测试剂盒的研制与评价[J]. 中国药理学杂志, 2014, 49(6): 501-504.
- [9] 谭莹, 张丽华, 李明成, 等. 中药川贝母 DNA 指纹鉴定研究[J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(1): 14-16.
- [10] 张文娟, 刘薇, 魏锋, 等. 聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性法用于检定川贝母掺伪情况的研究[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(10): 1830-1835.

(收稿日期: 2016-05-26, 修回日期: 2016-07-22)

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中国药典(一部)[S]. 北京: 中国医药科技

野菊花注射液,其组方为单味药野菊花。具有清热解毒的功效,用于治疗外感热病、目赤肿痛、咽喉疼痛;上呼吸道感染、急性扁桃体炎属热毒上攻等。因该品种所对病症较为常见且中药注射液存在高风险性,故在质量控制方面应更加严格。野菊花注射液原标准为国家药品监督管理局标准(试行)WS-11041(ZD-1041)-2002于2002年提出,其中仅用高效液相方法对绿原酸进行含量测定,专属性较差。李晓波等^[1]用气相色谱法对该制剂中的挥发性成分进行研究,建立指纹图谱且已有文献报告。但尚未见相应的高效液相色谱法(HPLC)的研究。鉴于液相方法同样具有较强的专属性且简单易操作,故本研究采用HPLC法对9批野菊花注射液的特征图谱进行研究,监测了野菊花中绿原酸、蒙花苷、木犀草苷、咖啡酸等成分,以木犀草苷为参照物,计算各共有峰的相对保留时间,以初步达到药品质量控制的目的。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 电子分析天平,型号:Sartorius公司BP211D,BS224S,AE240;高效液相色谱仪:型号:岛津LC-20AD高效液相色谱仪(PDA检测器)Empower色谱工作软件。

1.2 试剂 乙腈为色谱纯,其他为分析纯,水为去离子水。

1.3 样品 绿原酸(批号:110753-201314)、蒙花苷(批号:111528-200606)、木犀草素(批号:111520-200504)、木犀草苷(批号:111720-200905)、咖啡酸(批号:110885-200102)对照品均由中国食品药品检定研究院提供;野菊花注射液样品由陕西医药控股集团山海丹医药有限责任公司(批号:15020028,15020027,15020026,14090012,14090011,14090010,15030034,15030035,15030033)提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适应性 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(Agilent C₁₈, 250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:A相为乙腈,B相为0.5%冰醋酸溶液,梯度洗脱,流动相变化比例见表1,检测波长:326 nm,流速:1.0 mL × min⁻¹,柱温:35 °C,进样体积:10 μL。理论板数:理论板数以绿原酸峰计算应不低于5 000^[2-3]。

表1 流动相比例

时间/min	A相/%	B相/%
0	10	90
30	15	85
50	20	80
75	25	75
76	90	10
80	90	10
81	10	90
90	10	90

2.2 供试品溶液的制备 直接取样品适量,用微孔滤膜滤过,作为供试品溶液。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸13.58 mg,蒙花苷16.04 mg,木犀草苷9.82 mg,咖啡酸对照品8.24 mg,分别置于100 mL容量瓶中,加50%甲醇稀释至刻度,再精密量取25 mL置50 mL容量瓶中,加50%甲醇稀释至刻度,制成浓度分别为67.91.0、16.04、9.82、8.24 mg · L⁻¹的混合对照品溶液。

2.4 方法学验证

2.4.1 精密度实验 精密吸取同一供试品溶液(批号:14090010),重复进样6次,记录色谱图。结果表明,各色谱图中8个共有峰保留时间RSD均 < 0.25%、峰面积RSD均 < 2.56%,故该方法精密度良好,符合特征图谱的要求,见表2,3。

表2 精密度保留时间结果/min

项目	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5	峰6	峰7	峰8
精密度1	10.955	11.627	14.304	39.701	44.213	45.653	59.072	71.445
精密度2	10.987	11.659	14.325	39.755	44.256	45.685	59.125	71.509
精密度3	10.997	11.669	14.336	39.765	44.267	45.685	59.104	71.520
精密度4	11.008	11.669	14.336	39.787	44.288	45.707	59.147	71.552
精密度5	11.019	11.691	14.347	39.797	44.331	45.749	59.168	71.573
精密度6	11.029	11.701	14.357	39.808	44.331	45.739	59.200	71.605
精密度7	11.029	11.712	14.368	39.808	44.320	45.739	59.189	71.584
RSD/%	0.243	0.247	0.147	0.096	0.100	0.078	0.078	0.076

表3 精密度峰面积结果/ $\mu\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$

项目	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5	峰6	峰7	峰8
精密度1	1 742 062	1 649 016	202 961	540 696	992 169	525 955	115 617	1 482 504
精密度2	1 756 099	1 651 712	199 869	535 203	981 523	504 608	109 589	1 485 357
精密度3	1 745 986	1 646 800	196 673	535 532	984 229	492 013	110 154	1 478 281
精密度4	1 735 249	1 608 422	202 158	518 990	986 065	518 836	110 205	1 466 170
精密度5	1 737 802	1 616 841	202 141	534 071	991 059	515 603	115 418	1 490 986
精密度6	1 751 283	1 650 298	202 938	525 127	980 090	506 380	112 175	1 470 749
精密度7	1 734 063	1 612 409	198 246	509 736	983 331	517 965	116 044	1 484 745
RSD/%	0.478	1.220	1.242	2.083	0.467	2.221	2.553	0.590

表4 稳定性保留时间结果/min

项目	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5	峰6	峰7	峰8
稳定性0 h	10.923	11.584	14.283	39.701	44.181	45.632	59.051	71.403
稳定性3 h	10.965	11.627	14.304	39.701	44.192	45.643	59.072	71.424
稳定性6 h	10.987	11.659	14.325	39.755	44.256	45.685	59.125	71.509
稳定性9 h	11.008	11.669	14.336	39.787	44.288	45.707	59.147	71.552
稳定性12 h	11.029	11.701	14.357	39.808	44.331	45.739	59.200	71.605
稳定性18 h	10.997	11.669	14.357	39.765	44.288	45.696	59.115	71.467
稳定性24 h	10.997	11.669	14.315	39.787	44.331	45.717	59.168	71.531
RSD/%	0.312	0.325	0.166	0.106	0.137	0.085	0.088	0.101

表5 稳定性峰面积结果/ $\mu\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$

项目	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5	峰6	峰7	峰8
稳定性0 h	1 728 080	1 616 522	199 329	525 467	918 757	509 783	107 287	1 481 988
稳定性3 h	1 734 603	1 618 886	202 247	533 172	965 700	523 671	114 079	1 469 593
稳定性6 h	1 756 099	1 651 712	199 869	535 102	981 523	504 608	109 589	1 485 357
稳定性9 h	1 735 249	1 608 422	202 158	518 990	986 065	518 836	110 205	1 466 170
稳定性12 h	1 751 283	1 650 298	202 938	525 127	980 090	506 380	112 175	1 470 749
稳定性18 h	1 727 141	1 616 022	197 826	534 120	972 028	494 067	116 559	1 486 440
稳定性24 h	1 723 249	1 606 331	201 642	538 275	978 615	510 955	112 460	1 481 701
RSD/%	0.722	1.168	0.933	1.305	2.386	1.898	2.739	0.564

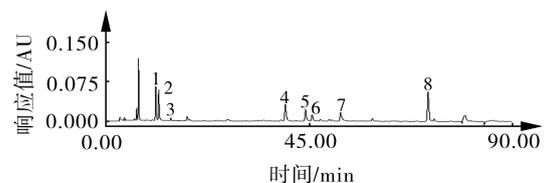
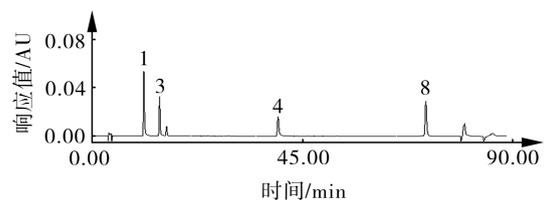
2.4.2 重复性实验 对同一批供试品(批号:14090010)取样6份,照前述供试品制备方法制成供试品溶液,同法测定,测得RSD值为1.12%,表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性实验 取供试品溶液,于室温下放置,分别在0、3、6、9、12、18、24 h进样分析,记录各色图谱。结果表明,各色谱图中8个共有峰保留时间均RSD < 0.33%、均峰面积RSD < 2.74%,故该方法在24 h内稳定性良好,符合特征图谱的要求,见表4、5。

3 结果

3.1 特征峰的确定 取野菊花注射液9批供试品,按“2.2”项下方法制备,按“2.1”项下色谱条件进行测定,对得到的色谱图进行特性图谱的研究。共确认了9个色谱峰。通过比对保留时间和紫外吸收图谱的方法,指认了4个色谱峰,分别为1号峰

为绿原酸,3号峰为咖啡酸,4号峰为木犀草苷,8号峰为蒙花苷。如图1所示。选择8个共有峰中保留时间适中,且为检测指标性成分的木犀草苷峰作为S峰,保留时间为40.08 min。



注:1. 绿原酸;3. 咖啡酸;4. 木犀草苷;8. 蒙花苷。

图1 混合对照溶液及样品图谱

表 6 不同批次样品相对保留时间

序号	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4(S)	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8
1	0.279	0.296	0.361	1	1.114	1.148	1.485	1.795
2	0.278	0.296	0.361	1	1.114	1.148	1.485	1.796
3	0.279	0.296	0.361	1	1.114	1.148	1.483	1.794
4	0.275	0.292	0.357	1	1.098	1.132	1.465	1.772
5	0.278	0.295	0.361	1	1.114	1.148	1.483	1.795
6	0.278	0.295	0.361	1	1.115	1.147	1.484	1.797
7	0.279	0.296	0.361	1	1.116	1.149	1.480	1.790
8	0.278	0.296	0.361	1	1.116	1.149	1.484	1.796
9	0.279	0.297	0.362	1	1.117	1.149	1.474	1.794
平均值	0.278	0.296	0.361		1.113	1.146	1.480	1.792
RSD%	0.441	0.475	0.425		0.506	0.473	0.452	0.436

3.2 特征图谱的建立^[4] 选择 8 个共有峰中保留时间适中,且为检测指标性成分的木犀草苷峰作为 S 峰。供试品图谱与木犀草苷对照色谱峰进行比较,其中 4 号峰,即 S 峰应与木犀草苷色谱峰保留时间(40.08 min)一致,并计算其他 7 个共有特征峰的相对保留时间,要求分离度不小于 1.5。结果见表 6 及图 2。

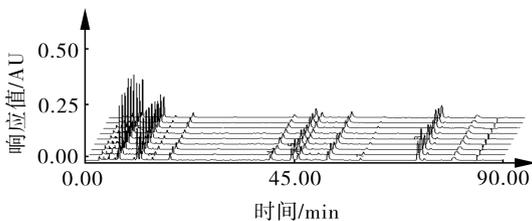


图 2 不同批次样品图谱比较

4 结论

因此次样品收集量较少且均为同一厂家,故仅对不同批次样品进行比较批间差异。利用指纹图谱系统比较得 9 批供试品图谱相似度均大于 0.98,得出该制剂批间差异小,质量较为稳定。

5 讨论

实验开始前,在国家药监局网站上查询发现,野菊花注射液生产厂家有三家,除本实验中所选用厂家外,仅有江西一家厂家仍在生产,但样品收集存在困难,故仅分析了一个厂家的样品,分析其批间质量差异,针对该厂家样品进行初步质量方法的建立。

在野菊花注射液中,绿原酸,蒙花苷,木犀草素,木犀草苷,咖啡酸为原料野菊花的主要活性成分^[5-7],根据 5 种成分的 UV 光谱的特征吸收,从野菊花注射液供试品 DAD 图谱中提取不同波长下的色谱图进行比较,结果表明,326 nm 下得到的色谱基线平稳,并兼顾各个成分检测灵敏度,且有较大的吸收值,因此选为测定波长为 326 nm。

实验过程中发现供试品中绿原酸峰与另一色谱峰极性相似,猜测为绿原酸的同系物,分离度不高,故调整流动相比例后发现,在乙腈:0.1%磷酸比例为 15:85 时分离度可达 2.1,分离度较好。

参考文献

- [1] 李晓波,谭晓杰,贾英,等.野菊花注射液的 GC 指纹图谱[J].沈阳药科大学学报,2007,24(9):556-559.
- [2] 林丽美,李春,刘塔斯,等.野菊花药材 HPLC 指纹图谱[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(22):120-123.
- [3] 陶君彦,张晓昱,黄志军,等.HPLC 法同时测定木瓜中绿原酸、咖啡酸的含量[J].中国药房,2007,18(12):912-914.
- [4] 耿家玲,王祥红,田润涛,等.灯盏花素注射液 HPLC 特征图谱研究[J].药物分析杂志,2011,31(8):1511-1513.
- [5] 郭巧生,房海灵,申海进.不同产地野菊花中绿原酸、咖啡酸和蒙花苷含量[J].中国中药杂志,2010,35(9):1160-1163.
- [6] 刘婷娜,朱恩圆,俞桂新等.野菊花高效液相色谱指纹图谱及质量评价方法的建立[J].时珍国医国药,2009,20(4):823-825.
- [7] 郭巧生,房海灵,申海进.不同产地野菊花中绿原酸、咖啡酸和蒙花苷含量[J].中国中药杂志,2010,35(9):1160-1163.

(收稿日期:2016-05-17,修回日期:2016-08-05)