

小儿七星茶颗粒指纹图谱

朱焕容^{1,2}, 赵小宁³, 王秀芬², 曾惠芳³, 苏子仁², 彭绍忠¹, 黄晓丹¹, 郑荣波^{1*}

(1. 广州王老吉药业股份有限公司, 广州 510450; 2. 广州中医药大学中药学院, 广州 510006;
3. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405)

[摘要] 目的: 建立广州王老吉药业股份有限公司三公仔牌小儿七星茶颗粒 HPLC 指纹图谱分析方法, 科学评价并有效控制其颗粒剂的质量, 保证其生产的稳定性。方法: 采用反相高效液相色谱法, Symmetry[®] C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 乙腈-0.2% 乙酸溶液梯度洗脱, 柱温 30 ℃, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm。结果: 以甘草苷为参照峰, 建立了三公仔牌小儿七星茶颗粒 HPLC 指纹图谱, 确立了 20 个共有峰, 10 批样品之间的共有峰相似度 > 0.9。结论: 该方法准确, 精密、重复性较好, 可作为控制广州王老吉药业股份有限公司三公仔牌小儿七星茶颗粒质量的依据。

[关键词] 小儿七星茶颗粒; 甘草苷; 绿原酸; 芹菜素; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)13-0093-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014130093

Fingerprint of Xiaoerqixingcha Granules

ZHU Huan-rong^{1,2}, ZHAO Xiao-ning³, WANG Xiu-fen², ZENG Hui-fang³, SU Zi-ren²,
PENG Shao-zhong¹, HUANG Xiao-dan¹, ZHENG Rong-bo^{1*}

(1. Guangzhou Wanglaoji Pharmaceutical Company Limited, Guangzhou 510450, China;
2. Guangzhou University of Chinese Medicine, School of Chinese Materia Medica, Guangzhou 510006, China;
3. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a sensitive HPLC fingerprint analytical method for evaluating scientifically and controlling the quality of Xiaoerqixingcha granule manufactured by Guangzhou wanglaoji Pharmaceutical Company Limited. **Method:** RP-HPLC analysis was performed at 30 ℃ by using a Symmetry[®] C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), with the gradient elute of mobile phase consisting of acetonitrile-0.2% glacial acetic acid at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The UV detection was set at 254 nm. **Result:** Liquiritin was used as the reference substance in the HPLC chromatographic fingerprint of Xiaoerqixingcha Granule, which showed 20 common peaks and the similarity was more than 0.90 among 10 samples. **Conclusion:** This method was accurate, repeatable and useful for the quality control of Xiaoerqixingcha granules of Guangzhou wanglaoji Pharmaceutical Company Limited.

[Key words] Xiaoerqixingcha granules; liquiritin; chlorogenic acid; apigenin; fingerprint

小儿七星茶颗粒是国家基本药物目录之一, 收载于《中国药典》2010年版一部^[1], 由薏苡仁、稻芽、

山楂、淡竹叶、钩藤、蝉蜕、甘草七味药材制成, 具有开胃消滞、清热定惊等功效, 主要用于小儿积滞化热、消化不良、不思饮食、烦躁易惊、夜寐不安、大便不畅、小便短赤等症状。在质量控制方面以往的研究较多集中于对小儿七星茶颗粒如钩藤碱、甘草苷等指标性成分的定性或者定量^[2-5], 尚无其整体化学成分的指纹图谱研究, 难以控制该颗粒剂的整体物质群, 无法保证制剂的质量。通过对处方中 7 种

[收稿日期] 20131125(016)

[第一作者] 朱焕容, 硕士, 工程师, 从事药品、食品研发工作,
E-mail: zhr97@163.com

[通讯作者] * 郑荣波, 高级工程师, 从事药品、食品研发及管理工作, Tel: 020-66830482, E-mail: zrb0819@sina.com

药材有关化学成分的文献研究表明,小儿七星茶颗粒中主要含有黄酮类、皂苷类、氨基酸类、糖类等成分群。因此本实验通过采用 AB-8 大孔树脂富集小儿七星茶颗粒中黄酮类等中等极性成分,用 HPLC 进行指纹图谱研究,完善其颗粒剂的质量标准同时能保证其生产的稳定性,阐明颗粒剂指纹图谱共有峰的来源。

1 材料

1.1 仪器 LC-20AD 型高效液相色谱仪(岛津公司),CP225D 型 1/10 万分析天平(德国 Sartorius 公司),Ratavapor R-II 型旋转蒸发仪(瑞士步琪公司)。

1.2 试药 10 批小儿七星茶颗粒,由广州王老吉药业股份有限公司提供(批号 1202018, 1206027, 1207002, 1208001, 1208003, 1209012, 1209026, 1211001, 1211005, 1212002);薏苡仁、稻芽、山楂、淡竹叶、钩藤、蝉蜕、甘草等药材均由广州王老吉药业股份有限公司提供;甘草苷(11610-200604)、绿原酸(110753-200413)对照品均购自中国药品生物制品检定所,芹菜素对照品为广州中医药大学新药开发研究中心自制(纯度 >98%),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 测定条件 Symmetry® C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 0.2% 乙酸溶液-乙腈,梯度洗脱(表 1),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,进样量 10 μL。

表 1 流动相梯度洗脱程序

t/min	A/%	B/%
0.01	100	0
2	94	6
20	90	10
27	87	13
48	82	18
80	60	40
90	50	50
105	20	80
115	96	4
118	96	4

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取甘草苷、绿原酸、芹菜素对照品适量,加甲醇分别制备成 0.1 g·L⁻¹ 的溶液,即得。

2.3 样品溶液的制备 取小儿七星茶样品颗粒 3 g,用少量蒸馏水溶解,上预先处理好的 AB-8 大孔树脂柱,先用 100 mL 蒸馏水洗脱,弃去水洗液;再用

200 mL 75% 乙醇洗脱,收集醇洗液。将上述醇洗液减压浓缩至 10 mL,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得小儿七星茶颗粒供试液。

2.4 药材供试液的制备 称取处方中 7 味药材,参照《中国药典》中小儿七星茶颗粒的制备方法制备相应的单味药材溶液。并分别上预先处理好的 AB-8 大孔树脂柱,按照 2.3 项下方法进行洗脱,即得各味药材供试液。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液(批号 1209012),连续进样 5 次,按上述色谱条件测定。结果显示,各个特征共有峰的相对保留时间 RSD 在 0.29% ~ 0.52%,相对峰面积的 RSD 在 0.59% ~ 1.735%,图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004A 版)处理,相似度均 > 0.984,表明仪器精密度良好。

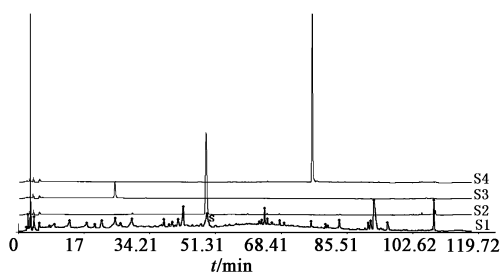
2.5.2 重复性试验 取小儿七星茶样品 5 份,按照 2.3 项下方法制备,分别进样。结果显示,各个特征共有峰的相对保留时间的 RSD 0.29% ~ 0.87%,相对峰面积的 RSD 0.25% ~ 1.26%,图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004A 版)处理,相似度均 > 0.975,表明本方法重复性好。

2.5.3 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,分别在 0, 4, 8, 12, 24 h 进样。结果显示,各特征共有峰的相对保留时间的 RSD 0.13% ~ 0.26%,相对峰面积的 RSD 为 0.25% ~ 0.98%,图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004A 版)处理,相似度均 > 0.986,表明供试品溶液在 24 h 内稳定,稳定性良好。

3 指纹图谱的建立以及技术参数

3.1 参照色谱峰的建立 在相同色谱条件下,小儿七星茶颗粒供试品(批号 1209012)与对照品(甘草苷、绿原酸、芹菜素)分别进样,得图 1。甘草苷、绿原酸、芹菜素占总峰面积的 11.86%。根据《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》规定,实验选取甘草苷(第 S 号峰)作为参照物峰,进行相对保留时间和相对峰面积的计算,符合指纹图谱研究需要。

3.2 共有指纹峰的标定及归属 借助《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版》软件,对指纹图谱的相关参数进行自动匹配,标定药材的 20 个共有指纹峰。选择编号为 S9 的小儿七星茶颗粒图谱为参照图谱,以中位数法作为对照指纹图谱的生成方法,提取小儿七星茶颗粒的共有模式建立对照指纹图



S1. 供试品溶液;S2. 甘草苷对照品;
S3. 绿原酸对照品;S4. 芹菜素对照品
图1 小儿七星茶颗粒指纹谱比较

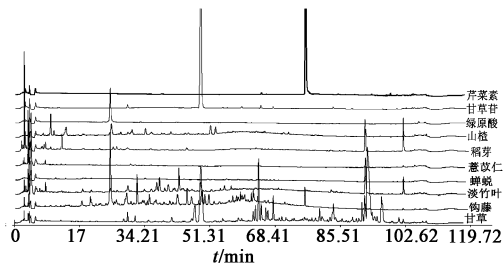


图4 芹菜素、甘草苷和绿原酸和7味药材的指纹谱比较

谱,结果见图2。分别取处方中7种药材供试品溶液,按上述色谱条件进样分析,7种药材和小儿七星茶颗粒的比较图谱见图3。根据各色谱峰保留时间认定共有峰中1号和5号来源于山楂;共有峰2,3,4,5,6,7,9~11和15为钩藤提供。共有峰2,3,7,8,9,10和11为淡竹叶提供。11~15和17~19为甘草提供。如图4中所示,芹菜素由甘草、钩藤提供,甘草苷由淡竹叶、钩藤和甘草提供,绿原酸由山楂和钩藤提供。由于薏苡仁、稻芽和蝉蜕多含氨基酸、糖类水溶性成分,样品经过AB-8大孔树脂处理后,未能保留其大极性成分。因此在此样品处理方法和色谱条件下,小儿七星茶颗粒指纹图谱中并未归属相应的薏苡仁、稻芽、蝉蜕色谱峰。

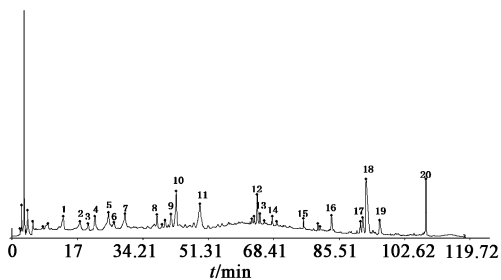


图2 小儿七星茶颗粒共有模式对照指纹谱

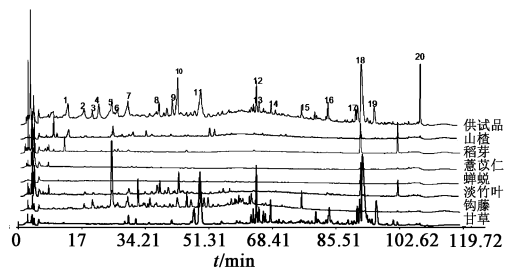


图3 小儿七星茶颗粒与7味中药指纹谱比较

3.3 样品指纹图谱测定 按照2.3项下的方法制备10批小儿七星茶颗粒供试品溶液,建立HPLC指纹图谱。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软

件(2004A版)对10批样品HPLC图谱进行评价,以相对面积平均数为对照,以S9样品为参照进行相似度计算。匹配后图谱见图5,共有模式对照指纹图谱见图2。相似度计算见表2。比较各批样品与参照图谱的相似度,相似度均在0.97~1之间,说明各批样品与参照图谱的相似度较高;比较各批样品与对照图谱的相似度,相似度均在0.98~1之间,说明各批样品与对照图谱的相似度较高。

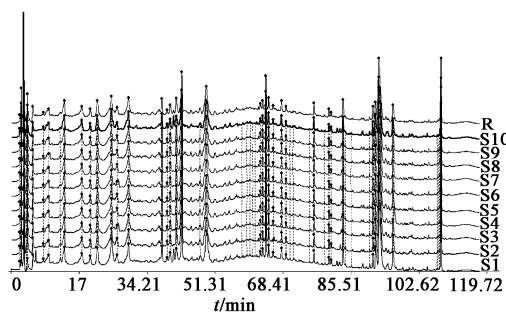


图5 10批小儿七星茶颗粒指纹谱

表2 10批小儿七星茶颗粒指纹谱相似度

No.	参照图谱	对照图谱
S1	0.971	0.98
S2	0.99	0.994
S3	0.991	0.996
S4	0.985	0.988
S5	0.997	0.997
S6	0.993	0.995
S7	0.996	0.996
S8	0.995	0.996
S9	1.000	0.997
S10	0.981	0.987

4 讨论

考察了超声处理,D101、AB-8型大孔树脂处理等方法。以尽可能将处方中主要有效成分提取表征为原则,以色谱图的信息量及分离度为评价指标进行筛选,简便易行,最终确定直接以AB-8型大孔树

脂为处理方法。

考察了不同体积分数的乙醇洗脱 AB-8 的方法。以 20% 乙醇、50% 乙醇、75% 乙醇、95% 乙醇对以上小儿七星茶颗粒的大孔树脂进行洗脱,结果表明以 75% 乙醇为洗脱溶剂时,色谱峰峰数多、峰面积值大、整体基线好。

比较了流动相中不同体积分数乙酸(0.05%, 0.1%, 0.2%),结果显示体积分数为 0.2% 时,各峰分离效果最好,故选用此浓度,见图 6。

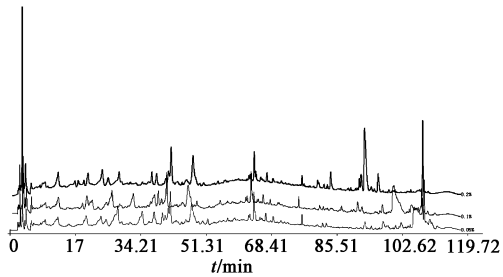


图6 流动相乙酸体积分数的选择

进行了不同波长的比较,共试验来了 4 个波长,分别为 256, 280, 300, 320 nm,结果显示,各组分的最大吸收波长主要集中在 254 nm 附近,故选用此波长。

小儿七星茶颗粒因药味多,化学成分复杂,个别成分测定不能全面表征该方整体药效。而指纹图谱分析是对中药及其制剂进行综合宏观分析的可行手段之一^[6]。通过中药指纹图谱分析技术,可提高对

中药复方质量的控制。建立小儿七星茶颗粒 HPLC 指纹图谱,可控制其质量,保证其生产的稳定性。该方法目前明确了甘草苷、绿原酸和芹菜素的药材来源,虽然甘草苷和绿原酸没有太好的专属性,但还是指明了该对照图谱上的相应化学成分。而成品对照图谱中如 8 号为淡竹叶的特征峰,4,5 和 10 号为钩藤的特征峰,因此该方法能比较好的对应大部分药材的特征,但是具体的成分有待研究,特别是液相-质谱的联用技术的研究。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:475.
- [2] 曾常青,许李文,罗泉珍. 小儿七星茶冲剂质量标准研究[J]. 中成药, 2006, 28(3):363.
- [3] 李亚萍,雷晓林,罗义修. 高效液相色谱法测定小儿七星茶冲剂中钩藤碱的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(12):1783.
- [4] 颜仁梁,刘志刚,罗佳波. HPLC 测定小儿七星茶冲剂中甘草苷的含量[J]. 中国中医药学刊, 2009, 27(10):2226.
- [5] 李冬,李志刚. HPLC 测定小儿七星茶冲剂中槲皮素含量[J]. 药物研究, 2012, 12(6):44.
- [6] 聂晶,田颂久,王国荣. 中药指纹图谱的研究现状[J]. 中国中药杂志, 2000, 31(12):881.

[责任编辑 顾雪竹]

天津中医药大学期刊编辑部 2014 年征订启事

《天津中医药》月刊,每期 8 元,年定价 96 元,联系电话:022-59596310,联系人:张震之。邮局订阅:邮发代号 6-83 电子邮件:zhongyiyao@vip.126.com, xuebaobj@126.com,网址:http://www.tjzhongyiyao.com,地址:天津市南开区鞍山西道 312 号,邮政编码:300193。

《天津中医药大学学报》双月刊,每期 6 元,年定价 36 元,联系电话:022-59596310,联系人:张震之。邮局订阅:邮发代号 6-153,电子邮件:xuebaobj@vip.126.com, xuebaotxd@126.com,网址:http://www.tjzhongyiyao.com,地址:天津市南开区鞍山西道 312 号,邮政编码:300193。