

咳特灵胶囊的 UPLC 指纹图谱及主成分的含量测定

员荣^{1,2}, 孙丽丽², 杨立伟^{2*}, 管淑玉^{1*}, 李将¹

(1. 广东药学院, 广州 510006; 2. 广东省食品药品检验所, 广州 510180)

[摘要] **目的:**建立咳特灵胶囊的超高效液相色谱指纹图谱方法,并测定牡荆苷和异牡荆苷的含量。**方法:**采用 Acquity UPLC HSS T₃C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),柱温 25 °C,流动相甲醇-0.05% 甲酸水(梯度洗脱),流速 0.2 mL·min⁻¹,进样体积 2 μL,检测波长 325 nm。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012.130723 版)软件计算相似度;利用 Acquity Waters system 进行含量测定。**结果:**在 14 批咳特灵胶囊测定的基础上,确立了对照指纹图谱,指出 13 个共有峰并对牡荆苷及异牡荆苷进行含量测定。**结论:**所建立的 UPLC 指纹图谱方法及含量测定方法准确、重复性好,有较好稳定性,能够表征咳特灵胶囊的整体质量,可为其生产和质量控制提供科学的依据。

[关键词] 咳特灵胶囊; 超高效液相色谱法; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)06-0037-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015060037

Fingerprint of Keteling Capsules and Content Determination of Main Components by UPLC
YUAN Rong^{1,2}, SUN Li-li², YANG Li-wei^{2*}, GUAN Shu-yu^{1*}, LI Jiang¹ (1. *Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China*; 2. *Guangdong Institute for Food and Drug Control, Guangzhou 510180, China*)

[Abstract] **Objective:** To establish the fingerprint of the Keteling capsules and content determination of vitexin and isovitexin by UPLC. **Method:** The Acquity UPLC HSS C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) column was used, the column temperature was 25 °C, the mobile phase consisted of methanol-0.05% formic acid with gradient elution. The flow rate was 0.2 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was 325 nm. Fingerprint Similarity Evaluation Software (edition 2012.130723) was used to calculate the similarity and Acquity Waters system was used for the assay. **Result:** The fingerprint of the Keteling capsules was established, 13 characteristic peaks were identified and the content of vitexin and isovitexin were determined. **Conclusion:** Established the UPLC fingerprint and content determination methods and reproducibility with good precision and stability, which could manifest the overall quality characteristics of the Keteling capsules. It could provide a scientific basis for the production and quality control of the Keteling capsules.

[Key words] Keteling capsules; UPLC; fingerprint

咳特灵胶囊(片)的主要组分为小叶榕干浸膏和马来酸氯苯那敏。小叶榕干浸膏为桑科植物小叶榕干燥叶的提取物,具有解痉止痛、镇咳、平喘消炎的作用,是治疗哮喘、慢性支气管炎常用药物,国外对于小叶榕的研究主要集中在化学成分分离鉴定方面。刘立恒^[1]指出小叶榕含有的一些三萜类成

分具有抗肿瘤活性,黄酮类化合物具有降血糖、抗炎镇痛、抗肿瘤等活性,并建立了小叶榕叶中总黄酮的含量测定方法^[2];方道硕等^[3]也对其总黄酮的抗炎镇痛作用进行了研究,初步确定黄酮类成分在咳特灵的镇咳平喘作用方面起到了重要作用。在咳特灵的整体控制方面,主要集中在对小叶榕的薄层鉴别

[收稿日期] 20140617(017)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81102146)

[第一作者] 员荣,在读硕士,从事中药质量控制研究,Tel:13602499922, E-mail:yunrong1029@126.com

[通讯作者] *杨立伟,主任药师,博士,从事中药质量控制与快速检测研究,E-mail:yangliwei33@aliyun.com;

*管淑玉,博士,副教授,主要从事中药质量控制与生物活性研究,Email:guanshy3@163.com

及马来酸氯苯那敏的含量测定方面,中药指纹图谱具有整体性、宏观性和模糊性,能够综合、全面地反映出中药产品的内在质量,可有效地对中药及其制剂进行整体质量控制^[4];房志坚等^[5]对小叶榕叶的HPLC指纹图谱进行了研究,发现小叶榕叶中含有牡荆苷和异牡荆苷等黄酮类化合物,戴臻等^[4]对小叶榕叶的化学成分进行了研究并对异牡荆苷进行了含量测定。聂平等^[8]采用UPLC建立了元胡止痛片的特征图谱;陈晓虎等^[9]采用UPLC测定了栀子金花丸中11种成分的含量,但将指纹图谱与含量测定方法相统一的UPLC测定法报道甚少。本研究采用UPLC建立了咳特灵胶囊的指纹图谱,并对牡荆苷、异牡荆苷进行了含量测定,将指纹图谱与含量测定以相同的方法完成,大大节约了测定时间,提高了分析效率,同时能够起到完善和提高咳特灵胶囊质量标准的作用。

1 材料

Acquity型UPLC(包括二元泵处理器、样品处理器、UV检测器、柱温箱及Empower色谱工作站,美国Waters),Milli-Q纯水仪(美国Millipore公司);甲醇为色谱纯(Merck,德国),乙醇为分析纯(广州化学试剂厂),甲酸为色谱纯(安捷伦科技有限公司),其他试剂均为分析纯。

牡荆苷对照品(批号111678-200602)购于中国食品药品检定研究院,异牡荆苷对照品(20130725)购于国家标准物质信息中心。咳特灵胶囊由广东一力制药厂(S1:5140301,S2:5140302,S3:5130601,S4:5130602),白云山制药厂(S5:20140303,S6:1100265,S7:1100266),罗定制药厂(S8:140302,S9:130701,S10:130702),花城制药公司(S11:20140301,S12:20140302,S13:20130201,S14:20130202)提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Acquity UPLC HSS T₃C₁₈色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),流动相A(甲醇)-B(0.05%甲酸水)梯度洗脱(0~40 min, 10%~40% A; 40~45 min, 40%~10% A),流速0.2 mL·min⁻¹,检测波长325 nm,柱温25℃,进样量2 μL。

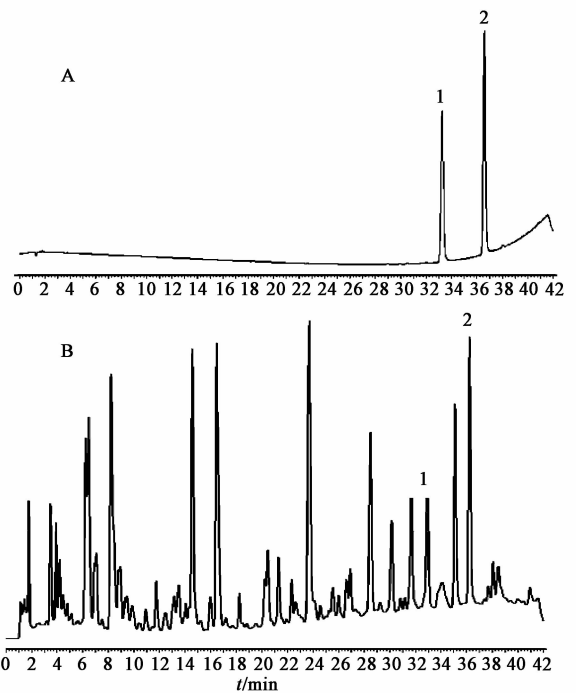
2.2 对照品溶液 精密称取牡荆苷、异牡荆苷对照品适量,加30%乙醇制成每1 mL含牡荆苷、异牡荆苷0.10, 0.13 mg的溶液,即得。

2.3 供试品溶液 取咳特灵胶囊(批号5140302)10粒,研细,精密称定0.5 g,置锥形瓶中,准确加入30%乙醇25 mL,超声处理30 min(功率250 W,频

率40 kHz),放冷,用30%乙醇补足减失的质量,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 系统适用性试验 将供试品溶液和异牡荆苷、牡荆苷对照品溶液分别进样2 μL,记录色谱图。比较保留时间与紫外吸收光谱,确定1号峰(33.199 min)为牡荆苷,2号峰(36.533 min)为异牡荆苷,见图1。在此系统下各样品中峰2的理论塔板数均≥10 000,色谱分离条件较好,满足系统适用性试验要求。



A. 混合对照品; B. 样品; 1. 牡荆苷; 2. 异牡荆苷

图1 咳特灵胶囊的UPLC

Fig.1 UPLC of Keteling capsules

2.4.2 线性关系考察 分别取2.2项下的牡荆苷、异牡荆苷对照品溶液1 mL,加入10 mL量瓶中,用30%乙醇稀释至刻度,作为混合对照品溶液(牡荆苷0.010 61 mg·g⁻¹,异牡荆苷0.012 83 mg·g⁻¹)。分别精密吸取1, 2, 3, 4, 5 μL注入液相色谱仪中,记录峰面积,以进样量为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),进行线性回归,线性回归方程为 $Y_{\text{牡荆苷}} = 2.26 \times 10^6 X + 3.99 \times 10^4$ ($r = 0.999 8$), $Y_{\text{异牡荆苷}} = 2.83 \times 10^6 X + 774$ ($r = 0.999 9$),结果表明牡荆苷在0.010 61~0.053 05 μg,异牡荆苷在0.012 83~0.064 15 μg线性关系良好。

2.4.3 精密度试验 取牡荆苷-异牡荆苷混合对照品溶液,连续进样6次,检测指纹图谱,结果表明,相

似度为 1.000, 各色谱图相似度高, 符合色谱指纹图谱的要求, 结果表明该方法精密度良好。

2.4.4 重复性试验 取相同批次样品(批号 5140302), 按 2.3 项下方法制备 6 份供试品溶液, 分别注入高效液相色谱仪, 检测指纹图谱, 得相似度为 1.000, 各主要色谱峰相对保留时间与相对峰面积比值无明显差异, 相似度高, 符合指纹图谱的要求, 结果表明该方法重复性良好; 分别计算牡荆苷与异牡荆苷的含量, 结果咳特灵胶囊牡荆苷、异牡荆苷的平均质量分数分别为 0.283 5, 0.593 8 mg·g⁻¹, RSD 分别为 1.2%, 2.7%。

2.4.5 稳定性试验 取同一批次供试品溶液(批号 130602A), 放置于室温下, 分别于 0, 9, 12, 15, 18, 24 h 吸取供试品溶液注入液相色谱仪, 进行指纹图谱测定, 结果相似度 0.995 9 ~ 1.000, 各个主要色谱峰相对保留时间与相对峰面积比无明显差异, 符合指纹图谱的要求; 牡荆苷与异牡荆苷峰面积的 RSD 分别为 2.0%, 2.5%, 说明供试品溶液在 24 h 内测定稳定。

2.4.6 加样回收试验 精密量取牡荆苷对照品溶液(0.1061 g·L⁻¹) 0.5 mL 和异牡荆苷对照品溶液(0.128 3 g·L⁻¹) 1 mL, 置锥形瓶中, 精密称取已知含量的供试品(批号 5140302, 含牡荆苷 0.283 5 mg·g⁻¹, 异牡荆苷 0.593 8 mg·g⁻¹) 0.25 g, 按拟定的含量测定方法测定, 结果牡荆苷、异牡荆苷的回收率分别为 102.8% (RSD 1.1%), 101.3% (RSD 1.8%), 结果见表 1。

2.5 样品测定 取 14 批样品, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 分别注入高效液相色谱仪, 记录峰面积, 并用外标法计算牡荆苷与异牡荆苷的含量。结果见表 2。

2.6 指纹图谱分析与评价

2.6.1 共有峰的确定 测定 14 批咳特灵胶囊的 UPLC 指纹图谱, 利用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012.130723 版)生成共有模式的对照指纹图谱, 见图 2。其中特征的共有峰有 13 个, 保留时间分别为峰 1(11.842 min), 峰 2(14.702 min), 峰 3(16.113 min), 峰 4(16.647 min), 峰 5(18.359 min), 峰 6(21.520 min), 峰 7(23.930 min), 峰 8(28.732 min), 峰 9(30.426 min), 峰 10(31.973 min), 峰 11(33.199 min), 峰 12(35.401 min), 峰 13(36.533 min), 其中峰 11 和峰 13 分别为牡荆苷和异牡荆苷。考虑到峰 13 色谱峰与相邻峰分离较好, 其峰高与峰面积适中, 因此选其作为该指纹图谱的

表 1 咳特灵胶囊中牡荆苷、异牡荆苷加样回收试验

Table 1 Recovery result of vitexin and isvitexin

名称	取样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得值 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
牡荆苷	0.254 1	0.072	0.076	0.150	103.3	102.8	1.1
	0.252 9	0.072	0.076	0.150	102.7		
	0.251 0	0.071	0.076	0.150	104.3		
	0.252 0	0.072	0.076	0.148	101.4		
	0.251 7	0.071	0.076	0.149	102.1		
	0.250 0	0.071	0.076	0.150	103.9		
异牡荆苷	0.254 1	0.151	0.138	0.289	100.2	101.3	1.8
	0.252 9	0.150	0.138	0.289	101.2		
	0.251 0	0.149	0.138	0.287	100.3		
	0.252 0	0.150	0.138	0.294	104.6		
	0.251 7	0.150	0.138	0.287	100.4		
	0.250 0	0.149	0.138	0.287	101.1		

表 2 咳特灵胶囊样品中的牡荆苷与异牡荆苷含量测定 mg/粒

Table 2 Concent result of Keteling capsules mg/pills

厂家	样品批号	牡荆苷	异牡荆苷
一力制药厂	5140301	0.121 1	0.295 3
	5140302	0.118 9	0.317 9
	5130601	0.136 7	0.297 2
	5130602	0.132 1	0.309 4
白云山制药厂	20140303	0.119 8	0.296 4
	1100265	0.134 5	0.302 0
	1100266	0.138 4	0.328 1
罗定制药厂	140302	0.138 7	0.288 6
	130701	0.138 4	0.287 4
	130702	0.137 2	0.276 2
花城制药厂	20140301	0.118 7	0.247 9
	20140302	0.134 7	0.280 3
	20130201	0.131 4	0.260 6
	20130202	0.129 7	0.261 8

参照物峰(S)。

2.6.2 相似度评价 利用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012.130723 版)软件, 经过校正选峰并设定匹配模式, 将色谱峰进行自动匹配, 分别对 14 批咳特灵胶囊图谱进行匹配, 并将 14 批样品生成的对照指纹图谱作为对照, 进行色谱峰差异性和整体相似性评价, 以中位数法计算各图谱的相似度, 结果相似度均在 0.971 ~ 1.000, 见图 3。

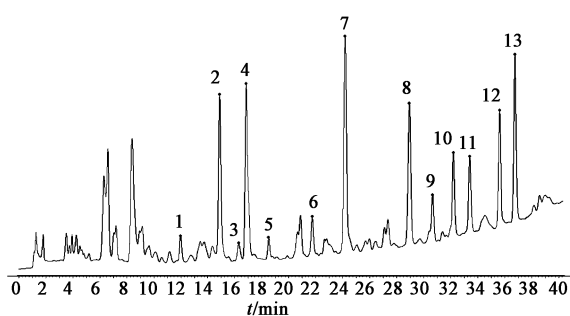


图 2 14 批咳特灵胶囊的对照指纹谱

Fig. 2 Reference fingerprints of 14 batches of keteling capsules

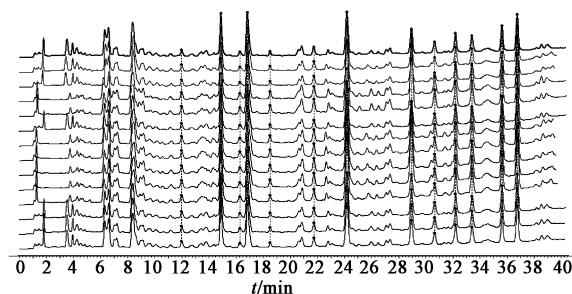


图 3 14 批咳特灵胶囊的指纹谱叠加

Fig. 3 UPLC fingerprints of 14 batches of Keteling capsules

3 讨论

本文采用 3 根色谱柱进行测定,分别为柱 A: Acquity UPLC HSS T₃C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 柱 B: Acquity BEH C₁₈ (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) 和柱 C: Unitary C₁₈ (3.0 mm × 10 mm, 2.8 μm), 结果相似度均在 0.98 以上,说明该方法对色谱柱的选择性不强,3 根色谱柱均适用于该指纹图谱检测。

本文将含量测定与指纹图谱的方法相统一,充分利用超高效液相快速准确的优点,使指纹图谱与含量测定同时完成,简化了实验操作,节约了时间与实验材料。国内外已有部分关于小叶榕化学成分的报道,本实验所得指纹图谱初步确定了牡荆苷与异牡荆苷,对于其他色谱峰与成分之间的关系归属,有待于进一步的研究。

中药所含化学成分复杂,有效成分往往不明确。本研究收集的 14 批样品,来源于 4 个生产企业,4

个企业的咳特灵胶囊的原料药材小叶榕叶均来自于广东 GAP 基地,其相似度在 0.971 ~ 1.000,说明在保证原料药材来源的基础上,不同生产厂家的制剂相似度较高,生产工艺差异不大,由此建立指纹图谱统一咳特灵胶囊的质量标准,保证小叶榕的来源及咳特灵的生产工艺是可行的。考虑到提高小叶榕干浸膏的质量控制水平,初步拟定相似度限度为 0.90。

咳特灵胶囊是日常镇咳平喘、消炎的常用制剂,其疗效确切,临床应用广泛。本研究建立的咳特灵胶囊指纹图谱的整体质量控制及成分含量测定方法,通过方法学验证,证明该方法的精密性、稳定性、耐用性及重复性较好。该方法对咳特灵片及咳特灵胶囊的质量标准提高工作具有实际的指导意义。

[参考文献]

- [1] 刘力恒,王立升,王天文,等.小叶榕化学成分及药理活性的研究进展[J].时珍国医国药,2008,19(2):390-392.
- [2] 刘力恒,王立升,王天文,等.小叶榕叶总黄酮含量测定、鉴别及其对羟自由基清除作用的研究[J].时珍国医国药,2008,19(5):1078-1080.
- [3] 方道硕.小叶榕叶总黄酮的抗炎镇痛作用研究[J].中国药房,2012,23(39):3673-3675.
- [4] 戴臻.小叶榕叶化学成分及质量控制研究[D].广州:广东药学院,2008.
- [5] 房志坚,戴臻,李书渊.小叶榕叶 HPLC 指纹图谱的研究[J].中药材,2008,31(10):1485-1489.
- [6] 罗国安,王义明,曹进,等.中药指纹图谱理论和实际应用[J].临床药物治疗杂志,2006,4(6):6-8.
- [7] 詹雪艳,林兆洲,段天璇,等.色谱指纹图谱相似度方法的适用性研究[J].中国中医药信息杂志,2012,19(5):61.
- [8] 肖炳焱,聂平,蒋秋桃,等.元胡止痛片 UPLC 特征图谱的研究[J].中南药学,2014,12(4):294-296.
- [9] 陈晓虎,苏晶,王慧,等.UPLC 法同时测定栀子金花丸中 11 种成分[J].中草药,2014,45(7):955-959.

[责任编辑 顾雪竹]