

清热解毒口服液 HPLC 指纹图谱

尤立华, 杨秉呼, 叶萌, 侯扬, 杨燕宁, 聂然, 赵希贤*

(北京市东城区药品检验所, 北京 100027)

[摘要] 目的: 建立清热解毒口服液的高效液相色谱指纹图谱, 为科学评价及有效控制其质量提供可靠方法。方法: 利用 HPLC 方法, 梯度洗脱, 测定了 12 批清热解毒口服液样品。色谱条件为 Shim-pack VP-ODS 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 检测波长 270 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 流动相 A 乙腈-B 0.02% 磷酸水, 梯度洗脱(0~12 min, 1%~15% A; 12~22 min, 15%~20% A, 22~32 min, 20%~25% A, 32~40 min, 25%~45% A; 40~50 min, 45%~55% A)。结果: 12 批清热解毒口服液样品有 9 个共有峰。相似度在 0.911~0.972。结论: 清热解毒口服液的指纹图谱特征性及专属性强, 可用于全面控制清热解毒口服液的质量, 确保每批产品的均一性。

[关键词] 清热解毒口服液; 高效液相色谱; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)14-0084-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014140084

Fingerprint Chromatograms of Qingre Jiedu Koufuye by HPLC

YOU Li-hua, YANG Bing-hu, YE Meng, HOU Yang, YANG Yan-ning, NIE Ran, ZHAO Xi-xian*

(Dongcheng District Institute for Drug Control, Beijing 100027, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the fingerprint chromatograms for the quality evaluation of Qingre Jiedu Koufuye By HPLC. **Method:** The analysis was performed on a Shim-pack VP-ODS column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile-water (containing 0.02% (v/v) phosphoric acid) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wave-length was at 270 nm. Mobile phase A is acetonitrile; Mobile phase B for 0.02% phosphoric acid water, mobile phase A gradient elution (0-12 min, 1%-15% A; 12-22 min, 15%-20% A, 22-32 min, 20%-25% A, 32-40 min, 25%-45% A; 40-50 min, 45%-55% A). **Result:** Twelve batch of Qingre Jiedu Koufuye sample has nine common peak. The analysis results of similarity between 0.911 and 0.972. **Conclusion:** Qingre Jiedu Koufuye fingerprint of the characteristic and strong specificity, and can be used in the comprehensive control Qingre Jiedu Koufuye quality, ensure every batch of product uniformity.

[Key words] Qingre Jiedu Koufuye; HPLC; fingerprint

清热解毒口服液是治疗流行性感胃的常用中成药, 属于非处方乙类制剂, 由石膏、金银花、玄参、地黄、连翘、栀子、甜地丁、黄芩、龙胆、板蓝根、知母、麦冬 12 味制成, 收载于 2010 年版《中国药典》一部^[1], 具有清热解毒功效, 用于热毒壅盛所致的发热面赤、烦躁口渴、咽喉肿痛, 流感、上呼吸道感染见上述症候者。该药临床使用较多^[2-5], 生产厂家较多, 关于黄芩苷、绿原酸、栀子苷、龙胆苦苷等成分含

量测定的报道较多^[3-7], 为了更好地比较不同厂家生产的清热解毒口服液的质量差异, 本文建立清热解毒口服液高效液相色谱指纹图谱的检查方法, 以全面控制清热解毒口服液的质量。

1 材料

1.1 仪器 LC2010 型高效液相色谱仪(日本岛津公司), Waters2695 型高效液相色谱仪, Waters 2996DAD 检测器(Waters 公司)。

[收稿日期] 20130917(001)

[第一作者] 尤立华, 本科, 主管药师, 从事药品检验及其质量分析研究, Tel:010-64635612, E-mail:blue56789@sohu.com

[通讯作者] * 赵希贤, 硕士, 副主任药师, 从事药品检验及其质量分析研究, Tel:010-64628632, E-mail:zxx68@126.com

1.2 试药 黄芩苷(批号 110715-200815)、绿原酸(批号 110753-200413)、栀子苷(批号 110749-200714)、龙胆苦苷(批号 110770-201013)、哈巴俄苷(批号 111730-201106)、梓醇(批号 110808-201210)对照品,购于中国食品药品检定研究院。清热解暑口服液样品情况见表 1,经检验均符合 2010 年版《中国药典》清热解暑口服液各项规定。乙腈(Fisher 公司,色谱纯),水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

表 1 清热解暑口服液样品

No.	批号	厂家
1	091223	成都天银制药有限公司
2	091113	成都天银制药有限公司
3	9263861	北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂
4	9263859	北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂
5	20091110	河南百年康鑫药业有限公司
6	20091014	河南百年康鑫药业有限公司
7	09040733	哈药集团三精制药股份有限公司
8	09112453	哈药集团三精制药股份有限公司
9	091001	江西济民可信药业有限公司
10	091201	江西济民可信药业有限公司
11	091115	江西三九药业有限公司
12	090917	江西三九药业有限公司

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Shim-pack VP-ODS 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈 A, 0.02% 磷酸水 B, 线性梯度洗脱见表 2, 检测波长 270 nm, 柱温室温, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 进样量 10 μL。

表 2 流动相梯度洗脱时间

t/min	A/%	B/%
0 ~ 7	1	99
7 ~ 12	1 ~ 15	99 ~ 85
12 ~ 22	15 ~ 20	85 ~ 80
22 ~ 32	20 ~ 25	80 ~ 75
32 ~ 40	25 ~ 45	75 ~ 55
40 ~ 50	45 ~ 55	55 ~ 45

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品(参照物)溶液制备 精密称取黄芩苷、栀子苷、绿原酸、龙胆苦苷、梓醇、哈巴俄苷对照品适量加 70% 乙醇制成每 1 mL 含黄芩苷 20 μg、栀子苷 60 μg、绿原酸 50 μg、龙胆苦苷 70 μg、梓醇 50 μg、哈巴俄苷 50 μg 的混合溶液,作为对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密量取本品 2 mL, 置 100 mL 量瓶中,加 70% 乙醇适量,超声提取

10 min, 放置室温,用 70% 乙醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,作为供试品溶液。

2.3 方法学考察

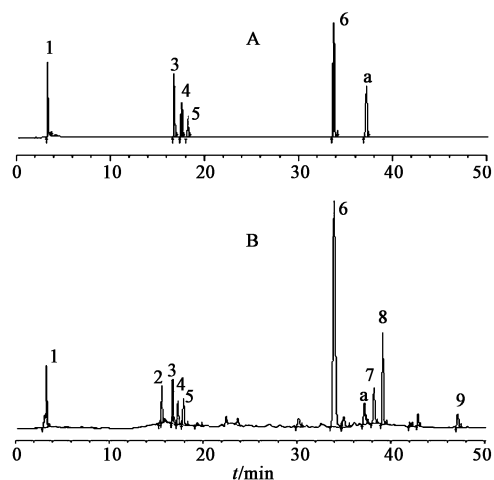
2.3.1 精密度试验 精密称取 3 号样品,按供试品溶液制备方法操作,连续进样 6 次,记录其指纹图谱。9 个共有色谱峰与内参比峰(黄芩苷峰)的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 0.03% ~ 1.09%, 0.11% ~ 1.53%。

2.3.2 稳定性试验 精密称取 3 号样品,按供试品溶液制备方法操作,分别在 0, 2, 4, 8, 16, 24 h 检测, 9 个共有色谱峰与内参比峰(黄芩苷峰)的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 0.67% ~ 1.54%, 0.72% ~ 2.35%。

2.3.3 重复性试验 精密称取 3 号样品,按供试品溶液制备方法操作,制备 6 份,进样检测,记录其指纹图谱。9 个共有色谱峰与内参比峰(黄芩苷峰)的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 0.36% ~ 0.83%, 0.23% ~ 1.04%。

2.4 清热解暑口服液指纹图谱的构建及相关技术参数

2.4.1 指纹图谱的构建 精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL 进样测定,结果见图 1。6 号峰为黄芩苷,以 6 号峰黄芩苷峰为内参比峰,以其他色谱峰对内参比峰的相对保留时间定性,计算各色谱峰相对于其内参比峰的峰面积比。从中确定了 9 个共有峰,其相对保留时间构筑了清热解暑口服液的 HPLC 指纹特征,可作为定性鉴别的依据;相对峰面积比则反映了清热解暑口服液的定量差异。12 批清热解暑口服液共有峰相对峰面积值见表 3。



A. 对照品; B. 样品; 1. 梓醇; 3. 绿原酸; 4. 栀子苷; 5. 龙胆苦苷; 6. 黄芩苷; a. 哈巴俄苷

图 1 清热解暑口服液 HPLC 指纹谱

表 3 12 批清热解毒口服液共有峰相对峰面积

批次	1	2	3	4	5	6	7	8	9
S1	0.046	0.027	0.010	0.020	0.034	1	0.080	0.055	0.007
S2	0.045	0.025	0.010	0.020	0.033	1	0.083	0.042	0.005
S3	0.169	0.078	0.083	0.056	0.071	1	0.106	0.217	0.044
S4	0.174	0.076	0.090	0.056	0.073	1	0.104	0.213	0.041
S5	0.121	0.037	0.017	0.027	0.025	1	0.094	0.185	0.023
S6	0.130	0.029	0.013	0.025	0.016	1	0.134	0.235	0.016
S7	0.076	0.041	0.036	0.027	0.035	1	0.053	0.022	0.008
S8	0.079	0.058	0.046	0.040	0.048	1	0.067	0.070	0.011
S9	0.098	0.058	0.042	0.039	0.057	1	0.043	0.127	0.015
S10	0.094	0.059	0.042	0.039	0.057	1	0.042	0.128	0.015
S11	0.177	0.067	0.033	0.044	0.050	1	0.109	0.319	0.017
S12	0.168	0.067	0.032	0.043	0.050	1	0.108	0.315	0.018

2.4.2 色谱峰的定性分析 色谱峰的定性分析采用对照品对照法和紫外光谱对照法。取梓醇、绿原酸、栀子苷、龙胆苦苷、黄芩苷、哈巴俄苷对照品溶液及清热解毒口服液 3 号供试品溶液适量,按 2.1 项下色谱条件进样分析,采集色谱图,根据对照品与供试品色谱峰的保留时间定位以及供试品与对照品色谱峰的紫外光谱图信息对比的一致性,确定清热解毒口服液指纹图谱的 1,3,4,5,6, a 号峰,分别为梓醇、绿原酸、栀子苷、龙胆苦苷、黄芩苷、哈巴俄苷。

2.5 样品相似度计算 采用国家药典委员会推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统的操作规范”软件(版本 2004 A)处理数据。6 厂家 12 批次的清热解毒口服液指纹图谱相似,相似度在

0.911 ~ 0.972,12 批次清热解毒口服液的指纹图谱见图 2。相似度计算结果见表 4。

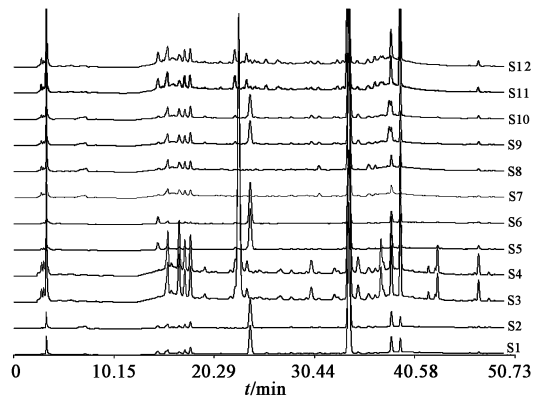


图 2 6 厂家 12 批次清热解毒口服液指纹谱

表 4 12 批清热解毒口服液 HPLC 指纹图谱相似度计算

样品号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	对照指纹图谱
S1	1	1	0.785	0.793	0.986	0.950	0.991	0.991	0.995	0.995	0.958	0.959	0.956
S2	1	1	0.782	0.790	0.986	0.952	0.99	0.989	0.993	0.993	0.953	0.954	0.953
S3	0.785	0.782	1	1	0.787	0.742	0.788	0.796	0.797	0.796	0.837	0.838	0.928
S4	0.793	0.790	1	1	0.794	0.749	0.796	0.804	0.805	0.804	0.844	0.844	0.933
S5	0.986	0.986	0.787	0.794	1	0.986	0.96	0.966	0.988	0.988	0.965	0.966	0.954
S6	0.950	0.952	0.742	0.749	0.986	1	0.904	0.912	0.950	0.951	0.922	0.923	0.911
S7	0.991	0.990	0.788	0.796	0.960	0.904	1	0.998	0.988	0.988	0.955	0.956	0.952
S8	0.991	0.989	0.796	0.804	0.966	0.912	0.998	1	0.992	0.992	0.968	0.969	0.959
S9	0.995	0.993	0.797	0.805	0.988	0.950	0.988	0.992	1	1	0.974	0.975	0.963
S10	0.995	0.993	0.796	0.804	0.988	0.951	0.988	0.992	1	1	0.974	0.975	0.963
S11	0.958	0.953	0.837	0.844	0.965	0.922	0.955	0.968	0.974	0.974	1	1	0.971
S12	0.959	0.954	0.838	0.844	0.966	0.923	0.956	0.969	0.975	0.975	1	1	0.972
对照指纹图谱	0.956	0.953	0.928	0.933	0.954	0.911	0.952	0.959	0.963	0.963	0.971	0.972	1

3 讨论

3.1 检测波长确定 取样品溶液,分别在 210, 270 nm 处检测。结果表明,以 270 nm 检测,峰数多,基线平稳。

3.2 提取方法的考察 对 50% 乙醇、70% 乙醇、95% 乙醇、水等不同溶剂进行了考察。70% 乙醇超声提取 20 min 后,所得色谱峰的峰数为最多。用 70% 乙醇分别超声提取 10, 20, 30 min,发现三者之间无显著性变化,本试验采用 70% 乙醇作为提取溶剂超声 10 min 的提取方法。

3.3 一测多评 2010 年版《中国药典》一部清热解暑口服液的检验方法主要是采用 5 个薄层色谱鉴别的方法判定绿原酸、栀子苷、连翘苷、菝葜皂苷元、麦冬等的有无,采用高效液相色谱法检测黄芩苷的含量。清热解暑口服液中的其他原料如地黄、玄参、龙胆、板蓝根等则无法判定其有无。采用单一对照品的薄层色谱鉴别法及高效液相色谱法检验时常常无法判定制剂中所用原料的真伪,即处方中是否为中药饮片投料,还是以化学成分或提取物代替中药饮片投料等无法判定。

本实验所用方法在 12 批次样品中同时检出了梓醇、绿原酸、栀子苷、龙胆苦苷、黄芩苷、哈巴俄苷等成分,同时本实验的色谱条件还可检测出连翘苷、咖啡酸、木犀草苷、靛玉红等成分,查阅文献也可见相关报道^[7-9]。

指纹图谱色谱峰的多少和峰面积的大小可以比较多种原料成分的有无和含量的高低,可同时较全面地反映清热解暑口服液中多种原料的质量。

本实验的色谱条件可以分离检测出 10 个有效成分,但在 12 批次样品的检测中,除梓醇、绿原酸、栀子

苷、龙胆苦苷、黄芩苷、哈巴俄苷(有的批次未检出)外,其余连翘苷、咖啡酸、木犀草苷、靛玉红等几种成分的色谱峰很低或检测不到,分析原因应为原药材含量偏低或提取过程中该类成分未完全提出。

指纹图谱的建立能够全面地反映清热解暑口服液中多种成分的有无及成分间比例的相似程度,6 厂家产品指纹图谱的相似度接近,表明 6 个厂家的产品在成分含量的分布上相似度较高,因此通过指纹图谱的检测可以较全面地控制和评价清热解暑口服液的质量。

[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,2010:1126.
- [2] 任雪红. 清热解暑口服液佐治上呼吸道感染疗效观察[J]. 基层医学论坛,2008,12(10):921.
- [3] 周可军,庄严. 清热解暑口服液对免疫功能的影响[J]. 河南中医,1997,17(5):280.
- [4] 姜锋卫,高丽娟. HPLC 法测定清热解暑口服液中绿原酸的含量[J]. 中国医药导报,2010,7(31):54.
- [5] 罗曼,周兰,熊慧林. 清热解暑口服液中所含药味龙胆的质量评价[J]. 中国药房,2010,21(31):2931.
- [6] 张继东. HPLC 法测定清热解暑口服液中连翘苷的含量[J]. 中医学报,2011,26(8):970.
- [7] 许海棠,黄涵涵,徐远金. 高效液相色谱-质谱法同时测定清热解暑口服液中的 5 种有效成分[J]. 色谱,2008,26(5):599.
- [8] 王雪芹,邢向伟,刘乃强,等. HPLC 法测定清热解暑口服液中木犀草苷的含量[J]. 药物分析杂志,2010,30(12):2366.

[责任编辑 顾雪竹]

欢迎订阅 2015 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物,已成为“中国中文核心期刊”、“中国科技核心期刊(遴选)”、“中国学术期刊综合评价数据库来源”期刊、“中国期刊网、中国学术期刊光盘版”全文收录期刊、美国《化学文摘》统计源期刊;并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊优秀期刊”。本刊创建于 1995 年 10 月,主要设置栏目:学术专论、综述、工艺与制剂、化学与分析、药物代谢、药理、毒理、临床、数据挖掘等。本刊的读者对象是从事中西医药,尤其是方剂教学、科研、医疗、生产的高、中级工作者,以及中医药院校的高年级学生等。

本刊现为半月刊,16 开本,242 页,标准刊号:ISSN1005-9903;CN11-3495/R。每期定价 35 元,全年 840 元。国内外公开发行,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号:2-417;国外由中国国际图书贸易总公司办理发行,代号:SM4655,欢迎订阅。本刊编辑部也办理邮购。地址:北京市东直门内南小街 16 号,《中国实验方剂学杂志》编辑部,邮编:100700,联系电话:(010)84076882,电子邮件:syfxj_2010@188.com,网址:www.syfxjzz.com。