

清热解毒口服液 HPLC 指纹图谱 及 4 种主要成分的含量分析

吕萍^{1*}, 张娜娜², 张振巍³, 陈永祥⁴

(1. 河南中医学院第一附属医院, 郑州 450000; 2. 开封市中医院, 开封 475000;
3. 中国人民解放军第一五五中心医院, 开封 475000; 4. 郑州市食品药品检验所, 郑州 450006)

[摘要] 目的: 研究清热解毒口服液的 HPLC 指纹图谱及测定其 4 种主要有效成分的含量, 以建立其有效地质量评价方法。方法: 通过建立 HPLC 指纹图谱和含量测定方法, 对市售的产品质量进行分析; 色谱条件为 Shim-Pack VP-ODS C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.1% 磷酸梯度洗脱, 检测波长 227 nm。结果: 得到色谱参数较好的 HPLC 指纹图谱, 对 10 批次的市售清热解毒口服液指纹图谱进行了相似度评价, 结果显示不同厂家的该制剂成分含量差异较大。结论: 该方法简便准确, 灵敏度高、重复性好, 可以作为清热解毒口服液的质量控制方法; 市售的该品种的制剂有明显差异性。

[关键词] 清热解毒口服液; 指纹图谱; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0098-04

Analysis of HPLC Fingerprints of Qingrejiedu Oral Liquid and Content of Four Main Factors

LV Ping^{1*}, ZHANG Na-na², ZHANG Zhen-wei³, CHEN Yong-xiang⁴

(1. First Affiliated Hospital of Henan College of TCM, Zhengzhou 450000, China;
2. Kaifeng Hospital of TCM, Kaifeng 475000, China; 3. 155th Central Hospital of PLA,
Kaifeng 475000, China; 4. Zhenzhou Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou 450006, China)

[Abstract] **Objective:** To determine Qingrejiedu oral liquid by HPLC fingerprint of the 4 major effective component content in order to establish effective quality evaluation method. **Method:** The determination of HPLC fingerprint was established to analyze the quality of products sold in the market. The chromatographic conditions were as follows: Shim-Pack VP-ODS C₁₈ HPLC column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); mobile phase methanol-0.1% phosphate gradient elution, detection wavelength of 227 nm. **Result:** The chromatographic parameters of HPLC fingerprints were better. 10 batches of fingerprint evaluation by similarity showed that there were larger differences between sold in Qingrejiedu oral liquids by different manufacturers. **Conclusion:** The method is simple, accurate with high sensitivity and repeatability, which can serve as a quality control method of Qingrejiedu oral liquid; there are significant differences between the varieties of preparation sold in.

[Key words] Qingrejiedu oral liquid; fingerprints; determination

清热解毒口服液^[1]是 2010 年版《中国药典》成方制剂目录里收录的非处方药, 主要功能清热解毒, 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证候者。处方由 12 味中药组成, 选其臣药对制剂整体质量进行分析。本文选择了黄芩、栀子、金银花和连翘 4 种中药进行指纹图谱模式的综合质量评价, 并对这 4 种中药的主要活性成分进行含量分析。

1 仪器与试剂

岛津 LC2010CHT 型高效液相色谱仪 (四元泵、在线脱气、自动冷却装置、全自动进样器、紫外检测

[收稿日期] 20120618(012)

[通讯作者] * 吕萍, 本科, 药师, 从事医院药学和中药新药研究, Tel: 13837179920, E-mail: lyping2005129049@163.com

器),梅特勒-托利多 AB135-S 双量程电子天平(瑞士),岛津 UV-2010PC 型紫外可见分光光度计,AS10200ADT 型超声波清洗器。色谱甲醇(山东禹王实业有限公司化工分公司),实验用水采用双重蒸馏水,其他试剂均为分析纯。黄芩苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110715-201016),绿原酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110753-200413),连翘苷对照品(科翔生物科技有限公司,批号 08-2011,经检测纯度 >98%),栀子苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110749-200714)。清热解暑口服液购自不同生产厂家共 5 个厂家的 10 个批次的样品,放置于阴凉干燥处,备用。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称定黄芩苷、绿原酸、连翘苷、栀子苷对照品适量,置于 5 mL 量瓶中,用色谱甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,分别得到质量浓度为 0.450,0.598,0.428,0.460 g·L⁻¹ 的对照品储备液。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密吸取清热解暑提取液 2.00 mL 于 200 mL 量瓶中,甲醇稀释室温下定容,再精密取 2.00 mL 稀释液于 25 mL 量瓶中,甲醇定容,再采用 0.45 μm 的有机微孔滤膜过滤,取续滤液即得供试品溶液。

2.2 标准曲线的绘制 精密吸取 2.1.1 项下对照品储备液,用色谱甲醇稀释并混合成 5 个不同质量浓度梯度的黄芩苷、绿原酸、连翘苷、栀子苷混合对照品溶液,按照一定的色谱条件进样测定,绘制标准曲线并采用标准曲线对供试品含量进行测定,各对照品溶液绘制方程见表 1。

表 1 各组分线性关系测定

成分	回归方程	r	线性范围/g·L ⁻¹
黄芩苷	$Y = 3.168 \times 10^5 X - 733$	0.999 9	0.090 0 ~ 0.450 0
绿原酸	$Y = 2.445 \times 10^6 X + 408$	0.999 6	0.109 6 ~ 0.598 0
连翘苷	$Y = 6.611 \times 10^6 X + 299$	0.999 9	0.085 6 ~ 0.428 0
栀子苷	$Y = 3.715 \times 10^5 X - 270$	0.999 9	0.092 0 ~ 0.460 0

2.3 色谱条件 Shim-Pack VP-ODS C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.1% 磷酸梯度洗脱系统(0 ~ 5 min, 30% 甲醇; 5 ~ 40 min, 30% ~ 70% 甲醇), 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 227 nm, 进样量 10 μL。

2.4 清热解暑口服液 HPLC 指纹图谱方法学考察

2.4.1 精密度试验 取编号为 S1 供试品溶液,按

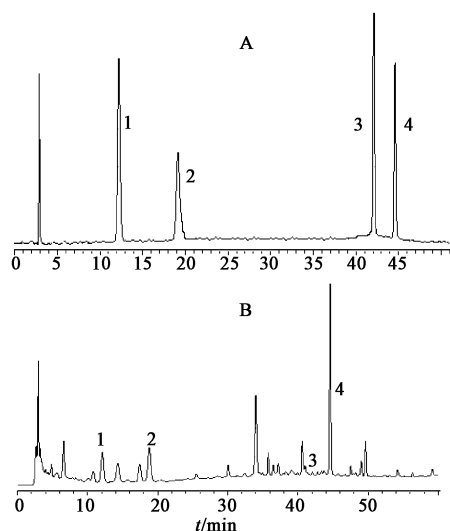
照 2.3 项下色谱条件,连续进样 6 次,记录色谱图,测得黄芩苷、绿原酸、连翘苷、栀子苷峰面积 RSD < 3%,表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取编号为 S1 供试品溶液,按照 2.3 项下色谱条件,分别与 0, 2, 8, 16, 24, 48 h 进样,记录黄芩苷、绿原酸、连翘苷、栀子苷的对应色谱峰峰面积,并计算其各自 RSD < 3%,表明 48 h 内供试品溶液的成分稳定,符合对指纹图谱的要求。

2.4.3 重复性试验 精密吸取清热解暑口服液原液 6 份,按照 2.1.2 项下供试品制备方法,平行制备 6 份供试品溶液,再按照 2.3 项下色谱条件,进行进样,测得供试品溶液中黄芩苷、绿原酸、连翘苷、栀子苷平均含量分别为 3.39, 2.21, 0.30, 1.89 mg, 计算其各自的峰面积 RSD 值分别为 0.96%, 1.05%, 2.66%, 1.18%, 表明实验重复性良好。

2.4.4 加样回收率试验 精密吸取已知含量的清热解暑口服液 1.00 mL, 平行制备 6 份, 加入适量体积的各对照品溶液, 按照 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 并测定供试品中各活性成分的含量, 结果见表 2。

2.5 样品测定及指纹图谱色谱峰的归属比较 取 10 批次的供试品, 并按照 2.2 项下方法制成供试品溶液, 将供试品溶液和对照品溶液在 2.3 项下色谱条件进行检测, 记录色谱图(见图 1)。



A. 对照品; B. 样品; 1. 栀子苷; 2. 绿原酸; 3. 连翘苷; 4. 黄芩苷

图 1 清热解暑口服液供试品溶液 HPLC

2.5.1 指纹图谱相似度计算^[2] 采用中国药典委员会推荐的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版》,对 10 批清热解暑口服液的指纹图谱进行相似度分析。将各批次测试数据导入到相似度评价系统软件中,采用平均数法进行各样品相似度评

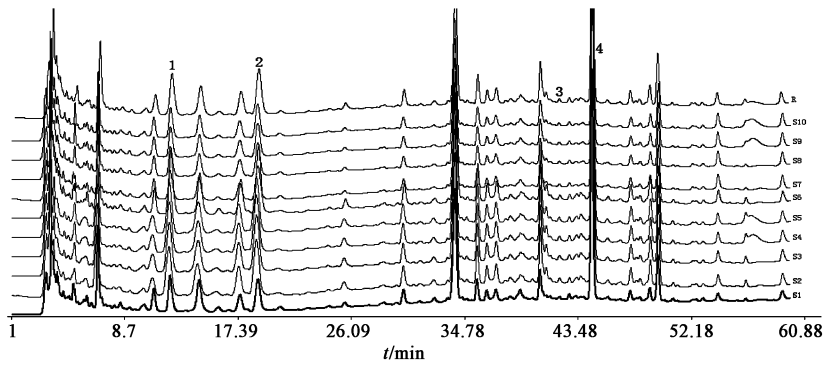


图 3 10 批样品的叠加色谱图

价^[3],其评价结果见表 1,其 HPLC 叠加色谱图见图 3。

表 2 4 种成分加样回收率试验 (n=6)

No.	成分	已知含量 /mg	加入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	黄芩苷	1.61	1.29	2.85	96.01	96.57	0.58
2		1.61	1.29	2.85	96.19		
3		1.61	1.61	3.18	97.46		
4		1.61	1.61	3.17	96.91		
5		1.61	1.93	3.48	96.69		
6		1.61	1.93	3.47	96.13		
1	绿原酸	1.15	0.92	2.04	96.87	97.04	1.68
2		1.15	0.92	2.05	98.21		
3		1.15	1.15	2.27	97.21		
4		1.15	1.15	2.29	98.97		
5		1.15	1.38	2.49	96.75		
6		1.15	1.38	2.45	94.21		
1	连翘苷	0.17	0.14	0.30	93.91	95.94	2.85
2		0.17	0.14	0.30	92.95		
3		0.17	0.17	0.33	96.59		
4		0.17	0.17	0.34	97.23		
5		0.17	0.20	0.36	94.54		
6		0.17	0.20	0.37	100.44		
1	栀子苷	0.96	0.77	1.71	97.69	98.68	1.05
2		0.96	0.77	1.72	98.99		
3		0.96	0.96	1.92	99.68		
4		0.96	0.96	1.89	97.16		
5		0.96	1.15	2.10	98.92		
6		0.96	1.15	2.11	99.65		

量,故在最后的含量测定中没有对其进行定量分析(表 2);由供试品溶液产生的指纹图谱共有模式(图 3)看出,10 个批次的供试品溶液成分差别不是很大。

2.5.2 样品含量测定 按照 2.2 项下标准曲线对 10 批样品的 4 种化学成分进行含量测定。其结果见表 4。

3 讨论

3.1 含量测定结果分析 在对 10 个批次的清热解毒口服液的含量测定中发现,连翘苷含量非常低,有些供试品溶液几乎检测不到其色谱峰的出现,说明连翘药材在制剂生产过程中主要成分已经损失殆尽(表 4),对方剂的整体性有一定的破坏,厂家在实际生产操作中应注意到该成分的变化,并采取积极有效的措施防止其成分的消失。

表 4 10 批样品中 4 种主要活性成分含量 mg

样品	黄芩苷	绿原酸	连翘苷	栀子苷
S1	3.42	2.19	0.35	2.03
S2	3.29	2.34	0.29	1.86
S3	1.76	1.15	0.07	1.06
S4	1.90	1.20	-	1.17
S5	1.51	1.16	-	1.01
S6	1.17	1.09	-	0.97
S7	1.85	1.39	0.04	1.16
S8	1.92	1.44	0.04	1.28
S9	1.80	1.14	0.03	1.20
S10	1.66	1.07	-	1.01
RSD% (n=10)	34.35	31.08	-	27.42

注:某些批次的连翘苷含量偏低,信噪比偏小,测量误差较大,故以未检出计算。

3.2 HPLC 指纹图谱分析 结果表明,10 批次不同厂家的清热解毒口服液其色谱整体相貌基本相同,特征指纹峰的相对保留时间一致,各样品指纹图谱与共有模式相似度较高(见表 3),说明了各生产厂

结果显示:经混合对照品对的 4 个色谱峰分离度较好,其中 3 号峰(连翘苷)含量较低,在进行含量分析中发现,其峰面积误差较大,不适宜进行定

表 3 10 批样品指纹图谱相似度分析

样品来源	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照图谱
S1	1	0.975	0.965	0.962	0.960	0.979	0.978	0.986	0.977	0.978	0.986
S2	0.975	1	0.988	0.985	0.989	0.978	0.974	0.976	0.969	0.969	0.993
S3	0.965	0.988	1	0.996	0.992	0.971	0.965	0.974	0.969	0.966	0.991
S4	0.962	0.985	0.996	1	0.995	0.969	0.966	0.972	0.972	0.970	0.991
S5	0.960	0.989	0.992	0.995	1	0.973	0.967	0.970	0.971	0.969	0.991
S6	0.979	0.978	0.971	0.969	0.973	1	0.974	0.969	0.964	0.963	0.986
S7	0.978	0.974	0.965	0.966	0.967	0.974	1	0.982	0.977	0.979	0.986
S8	0.986	0.976	0.974	0.972	0.970	0.969	0.982	1	0.991	0.991	0.990
S9	0.977	0.969	0.969	0.972	0.971	0.964	0.977	0.991	1	0.998	0.988
S10	0.978	0.969	0.966	0.970	0.969	0.963	0.979	0.991	0.998	1	0.987
对照图谱	0.986	0.993	0.991	0.991	0.991	0.986	0.986	0.990	0.988	0.987	1

家处方化学成分基本上一致。有些色谱峰数目不尽相同,并且不同厂家的产品在指纹图谱共有模式中相对比例大小有一定的差别,说明各厂家在选取药材时,药材的质量成分差异性。

3.3 色谱运行时间的确定 以色谱中最后出现的色谱峰保留时间为准,当色谱运行其 2 倍时间的时候没有色谱峰出现为最后检测时间。由供试品溶液可以看出,其最后出峰时间在 58 min,在其之后的 58 min 内色谱记录中没有色谱峰的出现,故确定色谱运行最佳时间为 60 min。

3.4 流动相的选择 参照药典及相关技术文献,发现所检测的化合物偏酸性,故采用甲醇-0.1% 的磷酸梯度系统作为流动相,取得了较好的成效,色谱峰出现较多,且大部分色谱峰参数较好,能够满足指纹图谱对供试品溶液色谱峰的要求。

3.5 检测波长的确定 采用岛津 UV-2010PC 型紫外可见分光光度计对供试品溶液及各自对照品溶液进行全波段扫描,发现在 300 nm 以后连翘苷和栀子苷没有吸收^[4],考虑到成分检测的一致性,决定在 300 nm 之前寻找既能对连翘苷和栀子苷进行含量

测定又能对黄芩苷和绿原酸进行定量分析的波长,并且又能尽量避开溶剂吸收的波段,最终确定检测波长定在 227 nm 处最为合适。

3.6 供试品溶液制备 由于采用甲醇作为溶媒进行稀释,故在样品溶液制备过程中产生絮状沉淀,沉淀的包藏作用有可能导致在进行加样回收率实验时回收率偏低(表 2)。针对此类情况,在以后的实验过程中尝试采用适当浓度的有机溶剂作为溶媒以改善沉淀包藏的问题。

[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] 彭晓霞,张振巍. 二次正交旋转组合设计法优化赤芍醇提工艺[J]. 中药材,2010,33(6):991.
- [3] 焦玉,刘晓秋. 五灵脂药材的 HPLC 指纹图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(5):98.
- [4] 庞晓侠. 反相高效液相色谱法测定清热解暑口服液中栀子苷含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2000,6(5):13.

[责任编辑 顾雪竹]