

清火退热口服液的特征图谱及 5 种成分的含量测定

陈伟东¹, 张国勇¹, 夏丽军¹, 王慧玉², 刘帅英^{3*} (1.丽水市人民医院, 浙江 丽水 323000; 2.丽水市中医院, 浙江 丽水 323000, 3.丽水市食品药品与质量技术检验检测院, 浙江 丽水 323000)

摘要: 目的 采用 HPLC 建立清火退热口服液的特征图谱, 并同时测定 5 种成分的含量。方法 以绿原酸、葛根素、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和黄芩苷为对照品; 采用 CAPCELL PAKC₁₈ MGII S5 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱, 流动相为甲醇-0.5%磷酸水溶液, 线性梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 305 nm, 柱温 30 ℃。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统对结果进行分析。结果 绿原酸、葛根素、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和黄芩苷分别在 3.06~61.16, 6.51~130.22, 4.68~93.55, 3.43~68.56, 14.61~292.28 μg·mL⁻¹ 内呈良好的线性关系, 相关系数均≥0.999 9; 平均加样回收率分别为 98.81%, 98.32%, 95.99%, 98.59%, 97.26%。结论 所建立的特征图谱相关性强, 可结合 5 种成分含量测定全面控制清火退热口服液的质量。

关键词: 特征图谱; 绿原酸; 葛根素; 连翘酯苷 A; 连翘酯苷 B; 黄芩苷; 含量测定

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2019)15-1909-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.15.011

引用本文: 陈伟东, 张国勇, 夏丽军, 等. 清火退热口服液的特征图谱及 5 种成分的含量测定[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(15): 1909-1913.

Study on HPLC Characteristic Spectrum of Qinghuo Tuire Liquid and Determination of Five Active Components

CHEN Weidong¹, ZHANG Guoyong¹, XIA Lijun¹, WANG Huiyu², LIU Shuaiying^{3*} (1.Lishui People's Hospital, Lishui 323000, China; 2.Lishui Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lishui 323000, China; 3.Lishui Inspection Institute for Food and Drug & Quality and Technology Control, Lishui 323000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC characteristic spectrum of Qinghuo Tuire liquid and simultaneous determination of five active components. **METHODS** With chlorogenic acid, puerarin, forsythoside B, forsythoside A and baicalin as reference substance. HPLC was carried on a CAPCELL PAKC₁₈ MGII S5 column(4.6 mm×250 mm, 5 μm) with the column temperature of 30 ℃; the mobile phase was methanol-0.5% phosphoric acid solution(gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹; the detection wavelength was 305 nm. The similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of TCM was used to calculate the similar degree. **RESULTS** The linear ranges of chlorogenic acid, puerarin, forsythoside B, forsythoside A and baicalin were 3.06–61.16, 6.51–130.22, 4.68–93.55, 3.43–68.56, 14.61–292.28 μg·mL⁻¹ respectively ($r \geq 0.999\ 9$), and the average recoveries of 5 components were 98.81%, 98.32%, 95.99%, 98.59%, 97.26% respectively. **CONCLUSION** With a good correlation, the characteristic spectrum can be combined with the determination of 5 components to control the quality of Qinghuo Tuire liquid comprehensively.

KEYWORDS: characteristic spectrum; chlorogenic acid; puerarin; forsythoside A; forsythoside B; baicalin; determination

清火退热口服液由黄芩、葛根、金银花、连翘、板蓝根、大黄等 10 味中药配伍组成, 属于临床经验方, 具有清热解毒、泻火利咽等功效。目前该制剂的标准只限于大黄的薄层色谱鉴别, 以及相对密度等常规项目检查^[1]。指纹图谱是基于多指标成分对中药制剂进行质量控制的有效手段。因此, 本研究采用 HPLC-DAD 建立清火退热口服液的特征图谱, 同时对该制剂中 5 个成分即绿原

酸、葛根素、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、黄芩苷进行定量分析, 能更加全面、客观、科学地评价清火退热口服液的质量。

1 仪器与试剂

1200 DAD 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); XS105DU 电子天平(瑞士梅特勒公司); DL-360D 智能超声波清洗器(上海之信仪器有限公司)。

基金项目: 丽水市科技计划项目(2017ZDYF16)

作者简介: 陈伟东, 男, 主管药师 Tel: 18957091569
(0578)2155869 E-mail: liushuaiying123@126.com

E-mail: 541963523@qq.com

*通信作者: 刘帅英, 女, 副主任药师

Tel:

连翘酯苷 B(批号: 111811-201001; 含量: 93.5%)、绿原酸(批号: 110753-201817; 含量: 96.8%)、葛根素(批号: 110752-201615; 含量: 95.4%)、连翘酯苷 A(批号: 111810-201606; 含量: 93.4%)、黄芩苷(批号: 110715-201619; 含量: 93.5%)对照品, 以及黄芩对照药材(批号: 120955-201309)、葛根对照药材(批号: 121551-201103)、金银花对照药材(批号: 121060-201107)、连翘对照药材(批号: 120908-201216)均购自中国食品药品检定研究院; 甲醇为色谱纯, 其他试剂为分析纯。样品为 2016—2018 年的制剂(批号分别为 20160722, 20161028, 20170303, 20170526, 20170623, 20170908, 20171201, 20180007, 20180032, 20180041)均由丽水市中医院提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 CAPCELL PAKC₁₈ MGII S5 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇(A)-0.5%磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~10 min, 15%A; 10~50 min, 15%→35%A; 50~80 min, 35%A; 80~115 min, 35%→45%A; 检测波长为 305 nm); 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃, 运行时间为 115 min; 进样量为 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 精密称取绿原酸、连翘酯苷 A、连翘酯苷 B、葛根素和黄芩苷对照品适量, 加甲醇分别制成 407.72, 685.56, 623.64, 434.07, 974.27 μg·mL⁻¹的对照品储备液。精密吸取 5 种储备液, 制成浓度分别为 61.16, 68.56, 93.55, 130.22, 292.28 μg·mL⁻¹的混合对照品溶液(已按各自质量分数折算)。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密吸取 2.0 mL 样品置 50 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 0.45 μm 的微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 根据清火退热口服液处方比例和工艺制备不含金银花、连翘、黄芩、葛根的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制备成相应的阴性对照溶液。

2.3 特征图谱^[2-4]

2.3.1 仪器精密度试验 精密吸取同一供试品溶液(批号: 20180032), 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图。以绿原酸为参照峰, 计

算特征峰的相对保留时间及相对峰面积, 结果各特征峰的相对保留时间 RSD<1%, 特征峰面积 RSD<1%, 采用中药指纹图谱相似度评价系统(2012 年版)进行分析, 相似度为 0.99, 表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 精密吸取同一份供试品溶液(批号: 20180032), 分别在 0, 2, 6, 8, 12, 18, 24, 36 h 按“2.1”项下色谱条件进样, 记录色谱图。各共有峰保留时间与峰面积的 RSD<3%, 采用中药指纹图谱相似度评价系统(2012 年版)进行分析, 相似度为 0.99, 表明供试品溶液在 36 h 内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 取同一供试品溶液(批号: 20180032), 平行取样 6 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 记录色谱图。各共有峰保留时间与峰面积的 RSD<2%, 采用中药指纹图谱相似度评价系统(2012 年版)进行分析, 相似度为 0.99, 表明该方法重复性良好。

2.3.4 特征图谱的建立 取本品 10 批, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 记录色谱图, 见图 1。依据结果, 采用中药指纹图谱相似度评价系统(2012 年版)进行处理, 生成清火退热口服液的特征图谱, 标定 5 个特征峰, 见图 2, 经过与对照品比对并结合 DAD 光谱, 可知分别为绿原酸、葛根素、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、黄芩苷。

2.3.5 相似度评价 采用中药指纹图谱相似度评价系统(2012 年版), 计算 10 批样品与“2.3.4”项下建立的特征图谱的相似度, 分别为 0.999, 0.997, 0.996, 0.998, 0.996, 1.000, 0.996, 0.997, 0.998, 0.993, 分析表明不同批次样品制备工艺较稳定。10 批清火退热口服液共有峰(1~5 号峰)保留时间的 RSD 分别为 0.10%, 0.09%, 0.06%, 0.08%, 0.06%, 表明各批次清火退热口服液中各峰相对保留时间具有良好的一致性。

2.3.6 专属性考察 分别精密称取黄芩、连翘、葛根、金银花对照药材 0.5 g, 加适量水煎煮 30 min, 浓缩至 30 mL, 制成各相应对照药材溶液, 精密吸取上述对照药材溶液各 5 μL, 分别进样, 记录色谱图, 通过 DAD 检测器选择稳定性好、吸收强、特征明显的色谱峰为共有峰, 结合与对照

品的保留时间及紫外光谱信息比对, 绿原酸为葛根、金银花共同所有, 黄芩苷存在于黄芩中, 连翘酯苷 A 和连翘酯苷 B 存在于连翘中。结果见图 2~3。

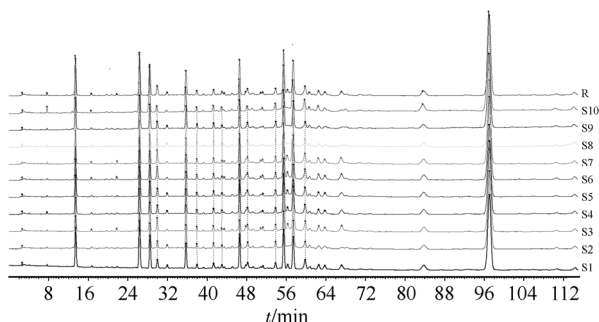


图 1 10 批清火退热口服液特征图谱叠加图

Fig. 1 HPLC overlapping characteristic spectrum of 10 batches of Qinghuo Tuire liquid

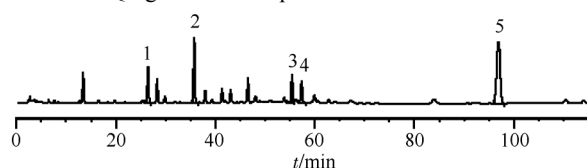


图 2 10 批清火退热口服液 HPLC 特征图谱的共有模式
1-绿原酸; 2-葛根素; 3-连翘酯苷 B; 4-连翘酯苷 A; 5-黄芩苷。

Fig. 2 Common pattern of HPLC characteristic spectrum of Qinghuo Tuire liquid

1-chlorogenic acid; 2-puerarin; 3-forsythoside B; 4-forsythoside A; 5-baicalin.

2.4 5 种成分的含量测定

2.4.1 系统适用性试验 分别精密吸取混合对照品溶液和供试品溶液各 10 μL , 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 并记录色谱图, 目标峰与其相邻色谱峰的分度 >1.5 , 理论板数 $>40\ 000$, 具有良好的分离效果, 结果见图 4。

2.4.2 线性关系考察 分别精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 10.0 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。按“2.1”项下色谱条件进样, 以绿原酸、葛根素、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和黄芩苷的峰面积(Y)为纵坐标, 各组分的质量浓度(X)为横坐标, 绘制标准曲线, 得到绿原酸、葛根素、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和黄芩苷线性回归方程分别为 $Y=25.985X+2.240\ 9(r=0.999\ 9)$ 、 $Y=15.747X+3.024\ 2(r=0.999\ 9)$ 、 $Y=11.102X+1.562(r=0.999\ 9)$ 、 $Y=14.216X+1.474\ 2(r=0.999\ 9)$ 、 $Y=19.761X+6.016\ 1(r=0.999\ 9)$, 分别在 3.06~61.16, 6.51~130.22, 4.68~93.55, 3.43~68.56, 14.61~292.28 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内呈良好的线性关系。

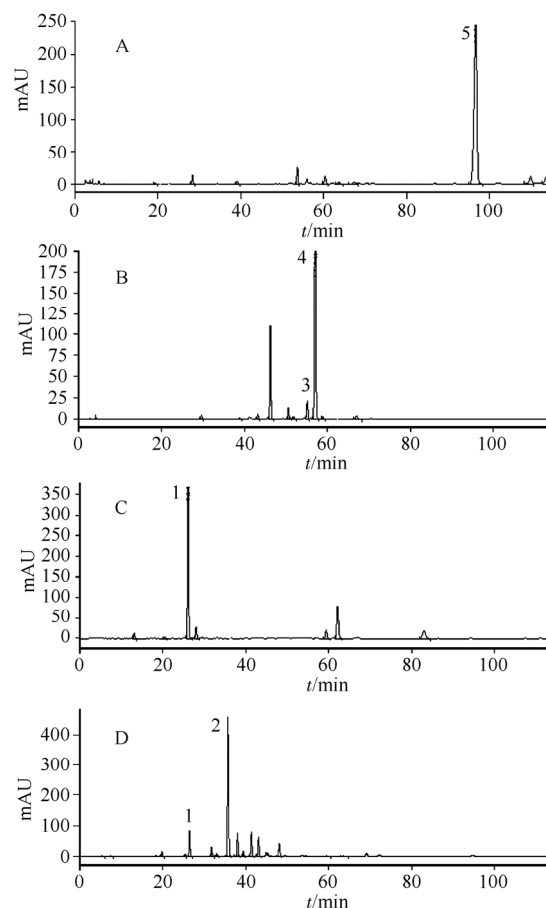


图 3 对照药材色谱图

A-黄芩; B-连翘; C-金银花; D-葛根; 1-绿原酸; 2-葛根素; 3-连翘酯苷 B; 4-连翘酯苷 A; 5-黄芩苷。

Fig. 3 Chromatogram of reference medicine material

A-*Scutellaria baicalensis* Georgi; B-*Forsythia suspensa* Vahl; C-*Lonicera japonica* Thunb; D-*Pueraria lobata*; 1-chlorogenic acid; 2-puerarin; 3-forsythoside B; 4-forsythoside A; 5-baicalin.

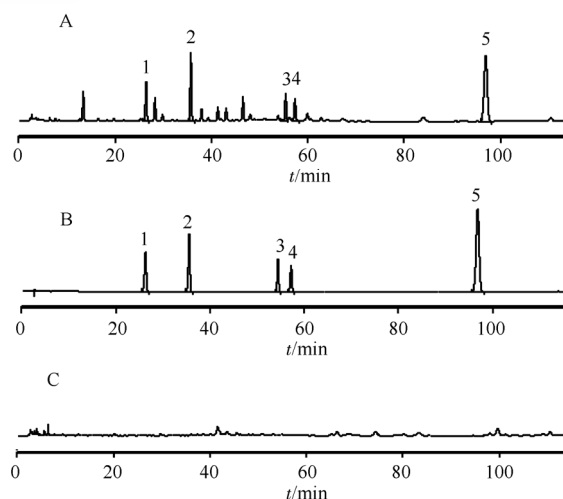


图 4 高效液相色谱图

A-供试品; B-对照品; C-阴性样品; 1-绿原酸; 2-葛根素; 3-连翘酯苷 B; 4-连翘酯苷 A; 5-黄芩苷。

Fig. 4 HPLC chromatograms

A-sample; B-reference substances; C-negative sample; 1-chlorogenic acid; 2-puerarin; 3-forsythoside B; 4-forsythoside A; 5-baicalin.

2.4.3 仪器精密度试验 将“2.2.1”项下的混合对照品溶液注入液相色谱仪,连续进样 6 次,每次 10 μL ,记录保留时间和峰面积,绿原酸、葛根素、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和黄芩苷峰面积 RSD 分别为 1.25%, 1.23%, 1.40%, 1.82%, 1.22%, 保留时间 RSD<0.5%,表明仪器精密度符合要求。

2.4.4 稳定性试验 取同一批供试品溶液(批号: 20180041),分别在 0, 2, 6, 8, 12, 18, 24, 36 h 按“2.1”项下色谱条件进样,结果绿原酸、葛根素、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和黄芩苷峰面积 RSD 分别为 1.61%, 1.92%, 2.38%, 1.10%, 0.92%。表明供试品溶液在 36 h 内稳定性良好。

2.4.5 重复性试验 精密吸取同一批样品(批号: 20180041) 6 份,各 2.0 mL。按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,结果绿原酸、葛根素、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和黄芩苷峰面积的 RSD 分别为 0.55%, 0.58%, 1.96%, 1.92%, 0.73%。表明提取方法的重复性良好。

2.4.6 加样回收率考察 取已知含量的同一批样品(批号: 20180041)6 份,每份精密吸取 1 mL,分别精密加入绿原酸、葛根素、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和黄芩苷对照品溶液适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,计算加样回收率。结果见表 1。

2.4.7 样品 5 种成分含量的测定 取各批次样品按“2.2.2”项下方法制备,按“2.1”项下色谱条件测定,计算含量,结果显示,10 批样品中绿原酸含量为 0.383~0.602 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、葛根素的含量为 1.083~1.412 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、连翘酯苷 B 的含量为 0.767~1.217 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、连翘酯苷 A 的含量为 0.474~0.793 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、黄芩苷的含量为 2.451~3.526 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, RSD 分别为 14.93%, 8.26%, 16.18%, 34.83%, 12.00%,说明不同批次质量差别较大。结果见表 2。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

根据文献报道^[5-6],结合二极管阵列检测器全波长扫描,分别采用 210, 254, 305, 327 nm 波长进行考察,发现 305 nm 基线平稳,色谱特征性强,峰型较好。因此选择 305 nm 作为检测波长。

3.2 特征图谱

10 批清火退热口服液 HPLC 图谱与特征图谱

之间的相似度均>0.90,相似度良好,表明制备工艺较稳定。

表 1 加样回收率结果($n=6$)

Tab. 1 Result of recovery tests($n=6$)

组分	原含量/ μg	加入量/ μg	检出量/ μg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
绿原酸	0.213 7	0.244 6	0.453 1	97.87	98.81	0.73
	0.213 7	0.244 6	0.457 6	99.71		
	0.213 7	0.244 6	0.456 2	99.14		
	0.213 7	0.244 6	0.454 7	98.53		
	0.213 7	0.244 6	0.453 9	98.20		
	0.213 7	0.244 6	0.456 9	99.43		
葛根素	0.663 8	0.520 9	1.170 6	97.29	98.32	1.05
	0.663 8	0.520 9	1.173 1	97.77		
	0.663 8	0.520 9	1.172 3	97.62		
	0.663 8	0.520 9	1.174 0	97.94		
	0.663 8	0.520 9	1.183 2	99.71		
	0.663 8	0.520 9	1.182 4	99.56		
连翘酯苷 B	0.588 1	0.354 2	0.931 0	96.81	95.99	1.06
	0.588 1	0.354 2	0.930 6	96.70		
	0.588 1	0.354 2	0.923 9	94.81		
	0.588 1	0.354 2	0.923 1	94.58		
	0.588 1	0.354 2	0.929 4	96.36		
	0.588 1	0.354 2	0.930 5	96.67		
连翘酯苷 A	0.393 7	0.274 2	0.661 3	97.59	98.59	1.15
	0.393 7	0.274 2	0.660 4	97.26		
	0.393 7	0.274 2	0.663 1	98.25		
	0.393 7	0.274 2	0.664 1	98.61		
	0.393 7	0.274 2	0.667 1	99.71		
	0.393 7	0.274 2	0.668 2	100.11		
黄芩苷	1.390 5	1.169 1	2.530 1	97.48	97.26	0.64
	1.390 5	1.169 1	2.528 9	97.37		
	1.390 5	1.169 1	2.523 4	96.90		
	1.390 5	1.169 1	2.540 1	98.33		
	1.390 5	1.169 1	2.522 8	96.85		
	1.390 5	1.169 1	2.520 1	96.62		

表 2 样品含量测定结果($n=2$)

Tab. 2 Results of the content determination of samples($n=2$)

批号	绿原酸	葛根素	连翘酯苷	连翘酯苷	黄芩苷
20160722	0.483	1.083	0.895	0.487	2.472
20161028	0.431	1.113	1.217	0.685	2.814
20170303	0.388	1.160	0.931	0.458	2.744
20170526	0.437	1.191	0.904	0.475	2.824
20170623	0.502	1.243	0.923	0.500	2.924
20170908	0.602	1.311	0.973	0.511	3.276
20171201	0.551	1.412	1.185	0.730	3.526
20180007	0.383	1.207	0.767	0.474	2.564
20180032	0.477	1.272	0.821	0.574	2.451
20180041	0.427	1.327	1.176	0.793	2.781
RSD/%	14.93	8.26	16.18	34.83	12.00

3.3 含量测定

不同批次质量差别较大,可能与每批采用的原料质量的差异有关,建议加强对原料的相关性指标成分的含量进行检测,并同时严格控制提取生产工艺参数。

3.4 指标成分的选择

本复方药味较多,处方复杂,绿原酸为方中金银花有效成分之一,具有抗氧化、抗菌、抗炎等作用^[7];连翘酯苷 A、连翘酯苷 B 为方中连翘的有效成分,具有很强的抗菌和抗氧化活性^[8];黄芩苷为方中黄芩的主要成分,具有抗菌抗病毒、抗氧化、解热镇痛的作用^[9];葛根素为方中葛根的有效成分,具有解肌退热等作用^[10]。为全面控制中药复方制剂的质量,保证临床应用,采用多指标成分控制的方法来反映该制剂的内在质量。

4 结论

本研究建立了清火退热口服液的特征指纹图谱测定方法及 5 个成分的含量测定方法,方法简便、稳定、可靠,可为清火退热口服液的质量控制提供参考。

REFERENCES

[1] 浙江省医疗机构制剂规范[S]. 2005: 147.

- [2] DONG T, ZHOU J L, ZHAO W L, et al. Quality evaluation of Yinqiao Jiedu Granules by HPLC fingerprint [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 9(35): 1337-1341.
- [3] QIN J P, LANG Y, LI J C, et al. Quality assessment of Shuangyu Granules based on simultaneous determination by HPLC fingerprint and multi-components [J]. Chin Tradit Herb Drug(中草药), 2016, 19(47): 3426-3431.
- [4] LIU S Y, ZHANG X Q, WANG H Y, et al. Study on HPLC characteristic spectrum of Jiangzhi Qingshen Tea and determination of four active components [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(1): 77-80.
- [5] 张国勇, 梁晓美, 刘帅英. HPLC 测定清火退热口服液中绿原酸、黄芩苷的含量[J]. 中国中医药科技, 2015, 6(22): 650-651.
- [6] HUANG Y C, ZHU Y, CHEN L H. Simultaneous determination of chlorogenic acid, puerarin and hesperidin in Kangshen granules by HPLC [J]. Central South Pharmacy(中南药学), 2017, 9(15): 1307-1309.
- [7] WANG L P, GUO D, WANG G, et al. Advancement of chlorogenic acid in traditional Chinese medicine [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2011, 22(4): 961-963.
- [8] ZHANG Y J, HAN Y X, LIANG L P, et al. Preparation and antibacterial antioxidant activity of phillyrin, forsythiaside A on n-butanol part extract from Qingqiao of *Forsythia suspensa* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2014, 20(21): 192-196.
- [9] XIAO L Z. Pharmacology and application of traditional Chinese medicine *Scutellaria baicalensis* [J]. Clin J Chin Med(中医临床研究), 2014, 6(3): 134-135.
- [10] 中国药典. 一部[S]. 2015: 333.

收稿日期: 2019-01-11

(本文责编: 蔡珊珊)