

小儿豉翘清热颗粒 HPLC-PAD 指纹图谱的建立 及有效成分含量测定

许文清^{1a}, 魏学涛^{1a}, 马青青², 崔向前^{1a}, 李伟^{1b}

(1.铁道警察学院 a.治安学系;b.刑事科学技术系,郑州 450053;2.河南省疾病预防控制中心,郑州 450000)

摘要:利用高效液相色谱-二极管阵列检测器(HPLC-PAD)分析检测技术,研究了提取条件(提取溶剂、提取时间)和色谱条件(洗脱溶剂、色谱柱、检测波长)的影响,最终建立了小儿豉翘清热颗粒的指纹图谱和有效成分栀子苷、连翘苷含量测定的方法。在 Waters Symmetry-C18 色谱柱温 30 °C、检测波长 225 nm 处,以甲醇和 0.1%(体积分数)的磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱建立的小儿豉翘清热颗粒 HPLC-PAD 的指纹图谱,30 个色谱峰分离度良好,10 批样品相似度较高(>0.98);栀子苷、连翘苷线性范围良好,相关系数(r)均大于 0.999 9,相对标准偏差(Relative Standard Deviation, RSD)均小于 3%,加样回收率均大于 97%,RSD<3% ($n=6$)。此方法特征性和专属性强,灵敏、准确,可作为小儿豉翘清热颗粒质量评价的方法。

关键词:小儿豉翘清热颗粒;HPLC-PAD;指纹图谱;含量测定

中图分类号:R286.0;O657.72

文献标志码:A

小儿豉翘清热颗粒是常用处方药,由连翘、栀子、淡豆豉、赤芍、黄芩等十几味药材加工而成。具有疏风解表,清热导滞之功效^[1]。现代医学证明,小儿豉翘清热颗粒在治疗上呼吸道感染发热、肺脾湿热证普通型手足病等疾病中均有良好的疗效^[2-6]。2015 版《中国药典(一部)》^[7]中,其功效成分为栀子苷和连翘苷,但是测定色谱条件不同,不能同时测定。据现有研究小儿豉翘清热颗粒质量控制的文献来看,多是以一个或几个有效成分的含量为指标来评价,不能全面体现中药多成分的特点^[8-11]。

中成药成分复杂,是以整体为活性体系,单靠测定某几种有效成分考查质量的稳定性或者评价其质量优劣是不全面的。指纹图谱是从化学成分的数量、种类及含量上来全面体现中药的特点,具有特征性、全面性、完整性。运用指纹图谱技术,已成为天然药物质量控制的常用有效手段^[12-23]。本文采用 HPLC-PAD 法建立了小儿豉翘清热颗粒的指纹图谱,并建立了栀子苷、连翘苷含量同时测定的方法,此种方法的建立,能够对小儿豉翘清热颗粒中含有的化学成分的数量和种类进行全面反映,进而可以全面的评价其质量。对其质量控制研究具有重要意义。

1 仪器与材料

1.1 仪器

美国沃特世公司 2695 高效液相色谱仪(自动进样装置,二极管阵列检测器 Waters2996,二元高压梯度);CX-250 型超声波清洗器(中国北京设备二厂);Thermo Fisher Lynx6000 型离心机(美国赛默飞公司);BP211D 型电子天平(德国 Sartorius 公司);Waters Symmetry-C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),填料:

收稿日期:2018-01-29;修回日期:2018-04-19.

基金项目:河南省科技攻关项目(132300410401);河南省科技厅项目(122400450334);铁道警察学院教学改革研究项目(JY2017028).

作者简介:许文清(1985-),男,安徽宿州人,铁道警察学院讲师,研究方向为微量物证分析,E-mail:xuwenqing@rpc.edu.cn.

通信作者:李伟,E-mail:liweili@rpc.edu.cn.

十八烷基硅烷键合硅胶(美国沃特世公司)。

1.2 试药

10 批小儿豉翘清热颗粒的批号分别为 1507142、1510142、1409012、1408042、1407182、140516、140550、140209、130854、1603182,相应分别简化为 S1、S2、S3、S4、S5、S6、S7、S8、S9、S10,栀子苷对照品(中国食品药品检定研究院 110749-201115),连翘苷对照品(中国药品生物制品检定所 110821-200111);磷酸(优级纯,北京化学试剂厂),甲醇(色谱纯,Fisher);超纯水(18.2 M Ω ·cm,Millipore 公司)

2 方法与结果

2.1 指纹图谱方法与结果

2.1.1 色谱条件

Waters Symmetry-C18 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm,5 μ m);进样量:10 μ L;流速:1.0 mL \cdot min $^{-1}$;流动相甲醇(A)-0.1%磷酸(B);梯度洗脱程序见表 1。

2.1.2 对照品溶液的制备

精密称取栀子苷和连翘苷对照品 2.00、10.00 mg,分别置于棕色容量瓶(10.0 mL)中,用甲醇溶解、稀释、定容至刻度,摇匀,分别得到质量浓度为 200 μ g \cdot mL $^{-1}$ 栀子苷和 1000 μ g \cdot mL $^{-1}$ 连翘苷的对照品储备液。精密吸取上述 2 种对照品的储备液依次为 1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 mL 于 50.0 mL 容量瓶中,甲醇定容至刻度,摇匀,制得混合对照品溶液,其中栀子苷质量浓度分别为 4、8、12、16、20 μ g \cdot mL $^{-1}$,连翘苷质量浓度为 20、40、60、80、100 μ g \cdot mL $^{-1}$ 。

2.1.3 供试品溶液的制备

分别精密称取 10 批小儿豉翘清热颗粒 0.5 g,置于锥形瓶中,准确加入甲醇-水(体积比为 1:1)溶液 50 mL,超声(功率 500 W)提取 20 min,放冷后再称量,甲醇-水(1:1)溶液补充后摇匀,转移至离心管,置离心机,以 5 000 r \cdot min $^{-1}$ 转速离心 10 min,上清液过 0.45 μ m 滤膜,取续滤液作为供试品溶液。

2.1.4 方法学考察

2.1.4.1 精密度试验

取供试品溶液,混合对照品溶液精密吸取 10 μ L,连续进样 6 次,分别记录 30 个共有峰相对保留时间与相对峰面积,参照色谱峰为连翘苷色谱峰,计算 30 个共有峰相对保留时间与相对峰面积,其中 30 个共有峰相对保留时间的 RSD($n=6$)结果均在 0.21%~0.83% 范围之内,30 个共有峰相对峰面积的 RSD($n=6$)具体结果见表 2,均 $<3\%$ 。表明仪器的精密度良好。

表 2 30 个共有峰相对峰面积的 RSD 值

| 峰号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| RSD/% | 1.52 | 0.98 | 0.65 | 1.42 | 0.61 | 0.79 | 1.26 | 1.43 | 0.75 | 1.14 | 1.06 | 1.16 | 1.63 | 1.52 | 1.25 |
| 峰号 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 |
| RSD/% | 2.05 | 1.46 | 1.52 | 1.07 | 0.84 | 0.75 | 0.96 | 1.34 | 1.28 | 1.14 | 1.07 | 0.78 | 1.04 | 0.62 | 0.52 |

2.1.4.2 考察稳定性

取供试品溶液,分别于 0、2、4、8、12、16、24 h 进行进样,参照色谱峰为翘苷色谱峰,计算 30 个共有峰相对保留时间与相对峰面积,其中 30 个共有峰相对保留时间的 RSD($n=6$)结果均在 0.56%~1.97% 范围之内,30 个共有峰相对峰面积的 RSD($n=6$)具体结果见表 3,均 $<3\%$ 。表明仪器的稳定性良好。

2.1.4.3 重复性试验

精密称定 6 份小儿豉翘清热颗粒 0.5 g,分别制备 6 份供试品溶液,以连翘苷色谱峰为参照,供试品溶液

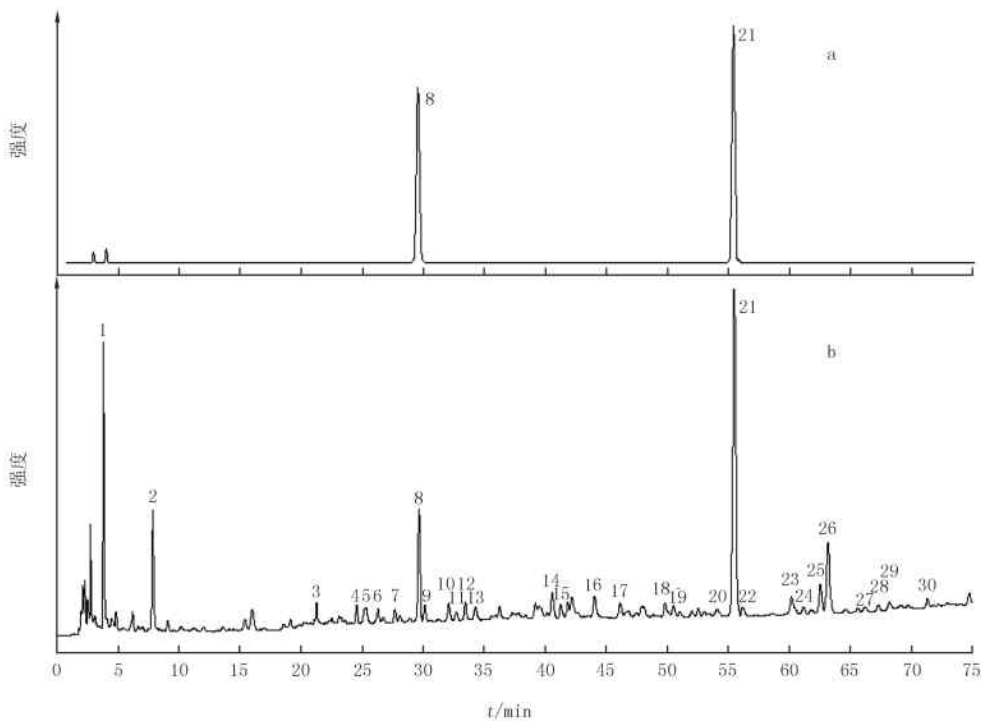
分别进样 10 μL 进行测定,对 30 个共有峰相对保留时间和相对峰面积进行计算,结果表明:30 个共有峰相对保留时间 RSD($n=6$)结果在 0.94%~2.31%范围内,30 个共有峰相对峰面积的 RSD($n=6$)结果均 $<3\%$.表明本方法重复性良好.

表 3 30 个共有峰相对峰面积的 RSD 值

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 峰号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
| RSD/% | 1.34 | 1.64 | 1.47 | 0.96 | 1.11 | 1.57 | 1.63 | 2.02 | 1.41 | 1.07 | 0.94 | 1.25 | 1.04 | 0.76 | 1.16 |
| 峰号 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 |
| RSD/% | 1.37 | 1.01 | 0.86 | 0.72 | 0.63 | 0.93 | 0.41 | 0.76 | 1.24 | 1.49 | 1.36 | 1.07 | 0.75 | 0.96 | 1.31 |

2.1.5 建立与分析指纹图谱

2.1.5.1 建立指纹图谱 以上述色谱条件为标准进行测定,得到 10 批供试品 S1~S10 的 HPLC 指纹图谱,共有峰是根据图谱中各色谱峰的相对保留时间而确定,根据分离度和峰面积选取了 30 个共有峰为特征指纹峰,并确认了 8 号峰为栀子苷,21 号峰为连翘苷.以分离度好,峰面积较大且稳定的连翘苷峰作为参照峰.见图 1.



(a) 对照品;(b) 指纹图谱.

图 1 小儿豉翘清热颗粒的指纹图谱

2.1.5.2 标定共有峰 参照色谱峰选取 21 号连翘苷的色谱峰,对各共有峰的相对保留时间、相对峰面积值进行计算,共有指纹峰特征参数见表 4、表 5.

表 4 小儿豉翘清热颗粒(10 批)供试品共有峰相对保留时间

| 编号 | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 |
|----|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1 | 0.068 1 | 0.068 4 | 0.068 3 | 0.068 5 | 0.068 6 | 0.068 2 | 0.068 1 | 0.068 2 | 0.068 4 | 0.068 0 |
| 2 | 0.141 0 | 0.140 9 | 0.140 8 | 0.141 1 | 0.141 0 | 0.140 8 | 0.141 3 | 0.140 5 | 0.140 9 | 0.140 7 |
| 3 | 0.381 8 | 0.382 1 | 0.381 9 | 0.382 0 | 0.382 2 | 0.382 1 | 0.382 2 | 0.382 3 | 0.382 0 | 0.381 9 |
| 4 | 0.441 7 | 0.441 1 | 0.441 2 | 0.442 2 | 0.441 6 | 0.441 1 | 0.444 3 | 0.441 2 | 0.441 3 | 0.442 4 |
| 5 | 0.454 7 | 0.455 1 | 0.454 9 | 0.455 3 | 0.455 5 | 0.455 6 | 0.455 6 | 0.455 5 | 0.455 3 | 0.454 4 |

续表

| 编号 | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 |
|----|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 6 | 0.471 4 | 0.471 7 | 0.470 8 | 0.470 9 | 0.471 2 | 0.470 9 | 0.472 0 | 0.471 1 | 0.471 8 | 0.471 5 |
| 7 | 0.497 6 | 0.497 3 | 0.496 7 | 0.497 2 | 0.497 6 | 0.497 5 | 0.498 0 | 0.497 5 | 0.497 9 | 0.497 3 |
| 8 | 0.532 7 | 0.532 3 | 0.531 4 | 0.531 5 | 0.531 9 | 0.531 2 | 0.532 6 | 0.531 8 | 0.531 9 | 0.530 7 |
| 9 | 0.541 4 | 0.541 2 | 0.540 5 | 0.541 0 | 0.541 5 | 0.541 4 | 0.541 8 | 0.541 4 | 0.541 8 | 0.541 0 |
| 10 | 0.577 1 | 0.576 9 | 0.576 2 | 0.576 5 | 0.576 9 | 0.577 0 | 0.577 6 | 0.577 0 | 0.577 5 | 0.576 5 |
| 11 | 0.589 4 | 0.589 2 | 0.588 9 | 0.589 2 | 0.588 8 | 0.588 9 | 0.589 8 | 0.590 2 | 0.589 8 | 0.588 6 |
| 12 | 0.601 4 | 0.601 6 | 0.601 2 | 0.601 3 | 0.601 7 | 0.601 9 | 0.601 9 | 0.601 7 | 0.601 8 | 0.601 1 |
| 13 | 0.618 3 | 0.618 3 | 0.617 9 | 0.617 9 | 0.617 9 | 0.618 9 | 0.618 2 | 0.618 1 | 0.618 2 | 0.617 3 |
| 14 | 0.729 8 | 0.729 8 | 0.729 2 | 0.729 8 | 0.729 2 | 0.729 1 | 0.730 6 | 0.730 5 | 0.730 6 | 0.729 2 |
| 15 | 0.760 1 | 0.760 6 | 0.760 1 | 0.759 8 | 0.760 6 | 0.760 8 | 0.760 5 | 0.760 5 | 0.760 5 | 0.759 6 |
| 16 | 0.793 2 | 0.793 5 | 0.792 8 | 0.793 1 | 0.794 1 | 0.794 2 | 0.793 8 | 0.794 0 | 0.793 7 | 0.792 2 |
| 17 | 0.830 7 | 0.830 9 | 0.830 7 | 0.830 7 | 0.830 8 | 0.830 2 | 0.831 5 | 0.831 1 | 0.831 4 | 0.830 1 |
| 18 | 0.879 2 | 0.879 4 | 0.879 4 | 0.879 1 | 0.879 3 | 0.879 1 | 0.879 9 | 0.879 7 | 0.879 8 | 0.878 0 |
| 19 | 0.897 3 | 0.897 8 | 0.897 4 | 0.897 2 | 0.898 0 | 0.897 2 | 0.897 8 | 0.898 0 | 0.898 3 | 0.895 9 |
| 20 | 0.973 5 | 0.973 7 | 0.973 4 | 0.974 1 | 0.974 8 | 0.974 7 | 0.974 8 | 0.974 9 | 0.974 7 | 0.972 6 |
| 21 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 |
| 22 | 1.011 3 | 1.011 3 | 1.011 0 | 1.010 9 | 1.010 9 | 1.012 4 | 1.012 6 | 1.012 7 | 1.012 5 | 1.010 6 |
| 23 | 1.084 3 | 1.084 4 | 1.083 6 | 1.084 7 | 1.083 8 | 0.363 7 | 1.085 3 | 1.084 5 | 1.085 2 | 1.083 2 |
| 24 | 1.100 8 | 1.100 8 | 1.100 5 | 1.101 6 | 1.102 3 | 1.102 2 | 1.102 2 | 1.102 5 | 1.102 2 | 1.100 2 |
| 25 | 1.125 7 | 1.125 8 | 1.125 4 | 1.126 4 | 1.127 2 | 1.127 2 | 1.127 1 | 1.127 3 | 1.127 4 | 1.124 3 |
| 26 | 1.137 2 | 1.138 3 | 1.137 7 | 1.137 3 | 1.138 4 | 1.138 3 | 1.138 4 | 1.138 5 | 1.138 1 | 1.136 3 |
| 27 | 1.193 2 | 1.192 5 | 1.192 1 | 1.192 5 | 1.193 3 | 1.193 1 | 1.193 4 | 1.193 3 | 1.193 3 | 1.190 7 |
| 28 | 1.211 5 | 1.211 8 | 1.211 5 | 1.212 6 | 1.213 6 | 1.213 1 | 1.213 2 | 1.213 4 | 1.213 2 | 1.210 5 |
| 29 | 1.228 2 | 1.228 1 | 1.227 4 | 1.228 2 | 1.228 7 | 1.228 3 | 1.229 0 | 1.229 0 | 1.228 9 | 1.226 6 |
| 30 | 1.284 4 | 1.284 5 | 1.283 7 | 1.284 3 | 1.284 8 | 1.284 4 | 1.285 6 | 1.285 1 | 1.285 5 | 1.282 9 |

表 5 小儿豉翘清热颗粒(10 批)供试品共有峰相对峰面积

| 编号 | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 |
|----|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1 | 0.322 9 | 0.323 5 | 0.323 6 | 0.324 5 | 0.323 7 | 0.322 8 | 0.321 5 | 0.332 0 | 0.324 6 | 0.322 3 |
| 2 | 0.227 7 | 0.211 1 | 0.221 0 | 0.212 5 | 0.217 7 | 0.213 9 | 0.210 1 | 0.210 2 | 0.214 8 | 0.213 6 |
| 3 | 0.037 1 | 0.023 3 | 0.030 4 | 0.034 5 | 0.033 4 | 0.034 4 | 0.032 0 | 0.032 4 | 0.032 1 | 0.033 1 |
| 4 | 0.034 7 | 0.035 6 | 0.032 2 | 0.031 1 | 0.033 9 | 0.033 4 | 0.029 3 | 0.027 9 | 0.029 4 | 0.030 5 |
| 5 | 0.062 0 | 0.064 3 | 0.060 8 | 0.060 7 | 0.061 0 | 0.060 9 | 0.061 5 | 0.061 3 | 0.060 1 | 0.061 4 |
| 6 | 0.033 1 | 0.033 3 | 0.034 0 | 0.034 0 | 0.033 2 | 0.032 3 | 0.033 2 | 0.032 7 | 0.032 5 | 0.033 3 |
| 7 | 0.029 1 | 0.030 5 | 0.031 2 | 0.030 4 | 0.031 3 | 0.031 6 | 0.030 5 | 0.030 9 | 0.031 5 | 0.031 0 |
| 8 | 0.246 0 | 0.250 0 | 0.255 4 | 0.250 5 | 0.253 1 | 0.254 4 | 0.250 0 | 0.248 8 | 0.252 6 | 0.250 8 |
| 9 | 0.033 7 | 0.035 9 | 0.041 5 | 0.038 3 | 0.040 5 | 0.041 7 | 0.038 4 | 0.038 3 | 0.041 5 | 0.039 1 |
| 10 | 0.046 0 | 0.048 9 | 0.046 8 | 0.047 2 | 0.048 2 | 0.048 6 | 0.047 8 | 0.051 1 | 0.048 0 | 0.047 2 |
| 11 | 0.026 2 | 0.027 3 | 0.024 8 | 0.025 3 | 0.024 5 | 0.024 1 | 0.023 7 | 0.027 1 | 0.024 6 | 0.025 7 |
| 12 | 0.045 9 | 0.045 6 | 0.044 9 | 0.046 8 | 0.045 9 | 0.045 4 | 0.044 9 | 0.048 1 | 0.047 4 | 0.046 3 |

续表

| 编号 | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 |
|----|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 13 | 0.041 2 | 0.042 6 | 0.042 5 | 0.045 1 | 0.042 9 | 0.045 6 | 0.044 9 | 0.049 5 | 0.046 1 | 0.047 6 |
| 14 | 0.072 1 | 0.073 0 | 0.072 7 | 0.073 6 | 0.073 8 | 0.074 4 | 0.075 8 | 0.076 8 | 0.074 3 | 0.076 9 |
| 15 | 0.050 5 | 0.065 1 | 0.065 3 | 0.068 0 | 0.067 0 | 0.068 6 | 0.068 5 | 0.067 4 | 0.065 1 | 0.067 4 |
| 16 | 0.061 1 | 0.057 4 | 0.057 1 | 0.059 4 | 0.059 3 | 0.062 0 | 0.061 2 | 0.060 9 | 0.060 1 | 0.060 8 |
| 17 | 0.043 6 | 0.047 1 | 0.044 9 | 0.048 4 | 0.045 5 | 0.050 1 | 0.029 8 | 0.042 0 | 0.043 8 | 0.043 1 |
| 18 | 0.046 4 | 0.045 1 | 0.043 3 | 0.043 5 | 0.043 4 | 0.043 0 | 0.042 4 | 0.042 4 | 0.041 5 | 0.042 1 |
| 19 | 0.033 7 | 0.034 1 | 0.033 1 | 0.034 2 | 0.033 1 | 0.033 4 | 0.033 9 | 0.033 1 | 0.033 8 | 0.034 7 |
| 20 | 0.028 2 | 0.028 6 | 0.028 3 | 0.029 9 | 0.031 0 | 0.029 1 | 0.030 7 | 0.028 6 | 0.029 4 | 0.029 3 |
| 21 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 |
| 22 | 0.033 3 | 0.032 9 | 0.033 5 | 0.032 5 | 0.034 9 | 0.035 2 | 0.035 2 | 0.034 2 | 0.035 7 | 0.034 9 |
| 23 | 0.076 5 | 0.066 5 | 0.079 0 | 0.066 7 | 0.073 2 | 0.066 4 | 0.074 0 | 0.068 1 | 0.069 5 | 0.068 3 |
| 24 | 0.021 4 | 0.021 3 | 0.023 0 | 0.020 6 | 0.020 4 | 0.020 6 | 0.022 3 | 0.022 2 | 0.021 7 | 0.021 1 |
| 25 | 0.084 3 | 0.085 3 | 0.087 3 | 0.085 9 | 0.083 4 | 0.084 6 | 0.083 3 | 0.084 8 | 0.083 8 | 0.081 2 |
| 26 | 0.222 9 | 0.225 6 | 0.224 5 | 0.225 0 | 0.220 3 | 0.222 1 | 0.221 0 | 0.223 8 | 0.222 9 | 0.220 8 |
| 27 | 0.014 6 | 0.016 4 | 0.016 4 | 0.016 9 | 0.018 2 | 0.015 7 | 0.017 6 | 0.017 3 | 0.017 6 | 0.016 6 |
| 28 | 0.016 8 | 0.016 5 | 0.016 9 | 0.017 0 | 0.017 1 | 0.015 9 | 0.016 7 | 0.017 4 | 0.017 5 | 0.016 4 |
| 29 | 0.022 2 | 0.023 5 | 0.025 0 | 0.025 6 | 0.024 0 | 0.024 9 | 0.025 1 | 0.025 2 | 0.025 4 | 0.024 3 |
| 30 | 0.022 2 | 0.021 7 | 0.021 8 | 0.020 7 | 0.021 9 | 0.019 7 | 0.019 6 | 0.019 8 | 0.019 4 | 0.020 0 |

2.1.5.3 指纹图谱的相似度评价

采用国家药典委员会 2004 A 版的“中药色谱指纹图谱相似度评价软件”对小儿豉翘清热颗粒(S1~S10)的指纹图谱进行叠加^[24],如图 2.计算 S1~S10 相似度,结果见表 6.

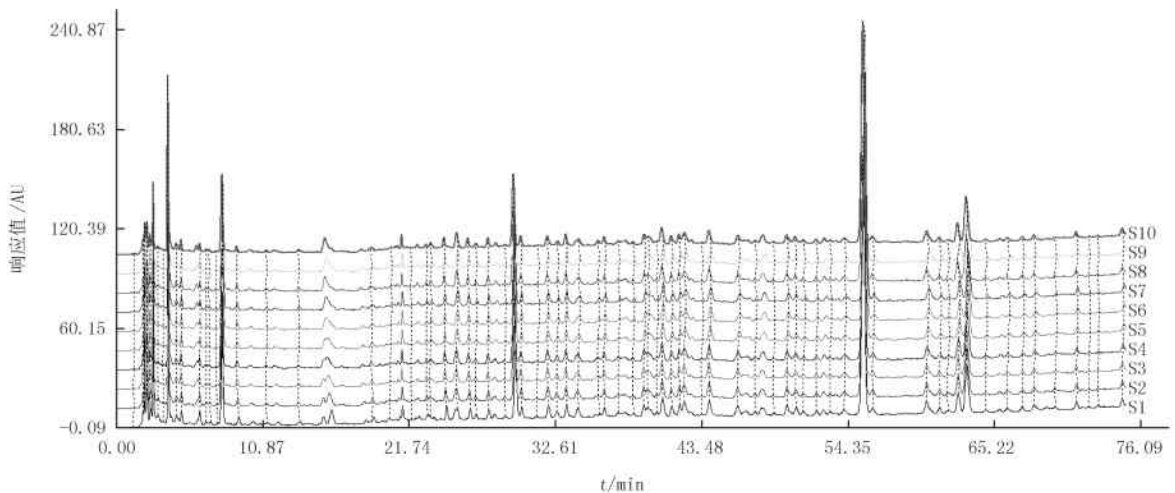


图2 小儿豉翘清热颗粒(10批)HPLC指纹图谱共有模式

表6 10批小儿豉翘清热颗粒相似度

| 样品 | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 相似度 | 0.991 | 0.996 | 0.992 | 0.989 | 0.991 | 0.993 | 0.995 | 0.994 | 0.989 | 0.992 |

2.2 含量测定方法与结果

2.2.1 考察线性关系

依次精密吸取 10 μL “2.1.2”项下不同质量浓度的混合对照品溶液,按照“2.1.1”项下的色谱条件注入液

相色谱仪,对峰面积依次测定,横坐标选取为单个对照品浓度、纵坐标选取为峰面积积分值,进行线性回归,各被测成分回归方程和线性范围见表7。

表7 两种成分的回归方程、相关系数(r)和线性范围

| 成分 | 回归方程 | r | 线性范围 |
|-----|--------------------------|----------|-------------------|
| 栀子苷 | $Y=1\ 404.93X-1\ 063.25$ | 0.999 97 | 19.50~1 452.00 ng |
| 连翘苷 | $Y=5\ 394.32X-2\ 163.18$ | 0.999 96 | 3.90~218.00 ng |

2.2.2 加样回收试验

同批样品取9份,以3份为一组,分为3组,将连翘苷对照品溶液和栀子苷对照品溶液以高、中、低3种质量浓度分别加入各组,每个质量浓度分别制备3份回收率供试品溶液,测定连翘苷和栀子苷的含量,计算连翘苷和栀子苷的加样回收率分别为97.27%和98.61%,RSD分别为2.63%和1.78%。

2.2.3 检出限与定量限测定

取一定量混合对照品溶液,用甲醇逐级稀释,色谱条件参照“2.1.1”项,进样量为10 μ L,进行测定。当信噪比为3时,测得栀子苷和连翘苷的检出限分别为1.6和1.3 ng;当信噪比为10时,测得上述栀子苷和连翘苷的定量限分别为5.4和4.9 ng。

3 讨论

在试验过程中,首先对蒸馏水、20%甲醇(体积分数,下同)、50%甲醇、75%甲醇、100%甲醇进行了优化,从峰的数目和峰面积来看,50%甲醇提取效果相对较好,超声提取时间分别定为10、20、30、40 min,通过对比研究发现:超声时间大于20 min时,提取效果没有明显差别。溶剂用量分别选取25、50、100、200 mL,通过对比研究发现:溶剂用量大于50 mL时,提取效果没有明显差别,所以溶剂用量选定为50 mL。

本实验中,对不同梯度洗脱进行了研究(乙腈-水、甲醇-水、甲醇-0.1%醋酸、甲醇-0.2%磷酸、甲醇-0.1%磷酸、乙腈-0.1%磷酸等),最终发现甲醇-0.1%磷酸为流动相时,指纹图谱显示的峰数目较全面,基线比较平缓,对称性和分离度均较好,确定了甲醇-0.1%磷酸为流动相进行梯度洗脱。考察了Waters Xbridge-C18、Agilent ZORBAX SB-C18和Waters Symmetry-C18等色谱柱,发现分离度和峰型比较好的是Waters Symmetry-C18柱。同时,采用二极管阵列检测器3D图谱对检测波长进行了筛选,既能体现指纹图谱的全面性,又能保证连翘苷和栀子苷有较大吸收,故选择225 nm作为检测波长。

4 结论

通过相似度评价软件得到小儿豉翘清热颗粒 HPLC-PAD 的指纹图谱,并建立了栀子苷和连翘苷含量的同时测定方法。在指纹图谱上确认了30个共有特征峰并指认了8号峰和21号峰分别为栀子苷和连翘苷。10批小儿豉翘清热颗粒指纹图谱研究发现,各供试品的指纹图谱主要峰整体一致,相似度较高。为小儿豉翘清热颗粒的质量控制提供了方便可行的实践基础。

参 考 文 献

- [1] 周蓬,宋青,马帅,等.HPLC法同时测定小儿豉翘清热颗粒中栀子苷、芍药苷、黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素[J].中成药,2013,35(8):1693-1696.
- [2] 宋根伟,王鑫,金萍,等.小儿豉翘清热颗粒临床应用进展[J].中国药业,2015,24(2):91-92.
- [3] 袁丹,谢辉辉,汪受传,等.小儿豉翘清热颗粒治疗急性上呼吸道感染临床疗效的Meta分析[J].中华中医药杂志,2016,31(1):89-92.
- [4] 郑言丰,吴秋英.小儿豉翘清热颗粒联合西药治疗手足口病28例疗效观察[J].中医儿科杂志,2015,11(1):35-37.
- [5] 袁小亮.小儿豉翘清热颗粒治疗疱疹性咽峡炎100例的效果分析[J].当代临床医刊,2016,29(1):1917-1918.
- [6] 江儒文,龙允杰,余德钊,等.小儿豉翘清热颗粒治疗急性上呼吸道感染(外感风热证)临床研究[J].中国中医急症,2015,35(4):324-325.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:2015年版.一部[M].北京:中国医药科技出版社,2015.
- [8] 吴嫣艳.HPLC法测定小儿豉翘清热颗粒中连翘苷的含量[J].海峡药学,2014,26(3):49-51.
- [9] 李伟,钟世华.小儿豉翘清热颗粒中栀子苷含量的测定[J].中医药导报,2009,15(12):72-73.

- [10] 李伟,钟世华,张卡.高效液相色谱法测定小儿豉翘清热颗粒中黄芩苷含量[J].中国药师,2009,12(2):216-217.
- [11] 莫遗盛,许海棠,王冬梅,等.高效液相色谱法测定小儿豉翘清热颗粒中栀子苷含量[J].中国药业,2008,17(17):21-22.
- [12] 吕志祥.中药指纹图谱的研究进展[J].求医问药(学术版),2013,11(3):175-176.
- [13] 袁琴琴.中药材指纹图谱研究进展[J].安徽农业科学,2017,45(4):132-134.
- [14] 展浩,言方荣,陆涛.中药指纹图谱数据分析方法研究进展[J].安徽农业科学,2017,45(16):203-205.
- [15] 杨颂,刘文,王群,等.中药指纹图谱的研究进展[J].贵阳中医学院学报,2012,34(4):21-24.
- [16] 朱精英,魏丽萍,吴春敏.中药指纹图谱的研究进展[J].海峡药学,2011,23(4):5-8.
- [17] 肖花艳,易延逵.中药材指纹图谱的研究概况[J].中国医药指南,2012,25:292-294.
- [18] 彭川丛,梁英娇.中药指纹图谱研究进展[J].实用中医杂志,2010,26(11):810-812.
- [19] 李玉娟,王瑞,车镇涛,等.中药材指纹图谱质量控制方法研究[J].中药新药与临床药理杂志,2001,12(3):192-195.
- [20] 姚美村,袁月梅,艾路,等.中药材指纹图谱研究的方法学初探[J].中药材,2002,25(9):674-683.
- [21] 陈林伟,秦昆明,徐雪松,等.中药指纹图谱数据库的研究现状及展望[J].中草药,2014,45(21):3041-3047.
- [22] 刘东方,赵丽娜,李银峰,等.中药指纹图谱技术的研究进展及应用[J].中草药,2016,47(22):4085-4094.
- [23] 邵建强.中药指纹图谱的研究进展[J].中草药,2009,40(6):994-998.
- [24] 邱宏聪,马军花,陈露,等.复方金钱草颗粒的指纹图谱[J].中国实验方剂学杂志,2006,22(1):36-39.

HPLC-PAD fingerprint of Xiaoer Chiqiao Qingre Granules and determination of functional components

Xu Wenqing^{1a}, Wei Xuetao^{1a}, Ma Qingqing², Cui Xiangqian^{1a}, Li Wei^{1b}

(1.a.Department of public security;b.Department of criminal science and technology,Railway Police College,Zhengzhou 450053,China;2. Henan Center For Disease Control and Prevention,Zhengzhou 450000,China)

Abstract: The extraction conditions (extraction solvent, extraction time) and chromatographic conditions (elution solvent, chromatographic column, detection wavelength) were investigated by high performance liquid chromatography - photodiode array detector(HPLC-PAD), it established an HPLC-PAD method for fingerprint analysis of Xiaoer Chiqiao Qingre Granules to determine the contents of geniposide and forsythin. Separation was performed using HPLC-PAD and Waters Symmetry-C18 column, the gradient elution was performed by the mobile phase consisting of methanol-0.1% (volume fraction) phosphoric acid at 30 °C column temperature, and the detection wavelength of 225 nm, thirty peaks were selected as the specific fingerprint peaks through 10 batches Xiaoer Chiqiao Qingre Granules with the identified of geniposide and forsythin, good similarities were obtained in the established fingerprint through similarity analysis and the resolution was good, the method showed good linearity of geniposide and forsythin with correlation coefficients greater than 0.98, the correlation coefficients all greater than 0.999 9, the relative standard deviation (RSD) of precision repeatability and stability were all less than 3%, the recovery rates was all greater than 97%, and the RSD was less than 3% ($n=6$). The method is specific, sensitive and accurate, and can be used for the quality control of Xiaoer Chiqiao Qingre Granules.

Keywords: Xiaoer Chiqiao Qingre Granules; HPLC-PAD; fingerprint; determination of components

[责任编辑 赵晓华]