

小儿热速清口服液 HPLC 指纹图谱的建立及多指标成分的含量测定^Δ

崔俊凤^{1,2*}, 崔 帅^{1,2}, 梁秀坤^{1,2}, 李东旭^{1,2}, 王鑫瑞^{1,2}, 高 鹏³(1. 滨州市检验检测中心, 山东 滨州 256600; 2. 滨州市化学药物研发与质量控制重点实验室, 山东 滨州 256600; 3. 山东中医药大学药学院, 济南 250355)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)07-0801-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.07.06



摘要 目的 建立小儿热速清口服液高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并对其中12种指标成分进行含量测定。方法 采用HPLC法。以Venusil MP C₁₈为色谱柱;以乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱;流速为1.0 mL/min;检测波长为210 nm;柱温为30 ℃;进样量为10 μL。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》建立13批小儿热速清口服液的HPLC指纹图谱,并进行相似度评价,测定12种指标成分,即(*R,S*)告依春、3,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸、葛根素、连翘苷、连翘酯苷A、绿原酸、黄芩苷、柴胡皂苷d、汉黄芩苷、黄芩素、大黄素、大黄酚的含量。结果 13批小儿热速清口服液指纹图谱的相似度均大于0.97,指认了14个共有峰。13批小儿热速清口服液中上述12种指标成分的含量分别为0.078~0.172、1.564~2.736、1.338~2.578、0.426~0.872、1.477~2.628、1.396~2.447、4.052~9.146、0.367~0.692、1.974~4.674、1.274~2.969、0.085~0.167、0.155~0.307 mg/mL。结论 本研究建立的HPLC指纹图谱及含量测定方法准确度高、专属性好,可用于小儿热速清口服液的质量评价。

关键词 小儿热速清口服液;高效液相色谱法;指纹图谱;含量测定

Establishment of HPLC fingerprint and content determination of multiple index components in Xiao'er resuqing oral liquid

CUI Junfeng^{1,2}, CUI Shuai^{1,2}, LIANG Xiukun^{1,2}, LI Dongxu^{1,2}, WANG Xinrui^{1,2}, GAO Peng³(1. Binzhou Testing Center, Shandong Binzhou 256600, China; 2. Binzhou Key Laboratory of Chemical Drug Research and Quality Control, Shandong Binzhou 256600, China; 3. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To establish an HPLC fingerprint of Xiao'er resuqing oral liquid, and to determine the contents of twelve index components. **METHODS** HPLC method was adopted. The determination was performed on Venusil MP C₁₈ column with mobile phase consisting of acetonitrile-0.1% phosphate aqueous solution (gradient elution) at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 210 nm, the column temperature was 30 ℃, the injection volume was 10 μL. HPLC fingerprint of Xiao'er resuqing oral liquid was established by using the *Similarity Evaluation System of Chromatographic Fingerprint of TCM (2012 edition)* to evaluate the similarity. The contents of 12 components were determined, including (*R, S*)-goitrin, 3,5-*O*-dicaffeoyl quinic acid, puerarin, forsythin, forsythoside A, chlorogenic acid, baicalin, saikosaponins d, wogonoside, baicalein, emodin and chrysophanol. **RESULTS** The similarity of HPLC fingerprints of 13 batches of Xiao'er resuqing oral liquid was greater than 0.97, and 14 common peaks were confirmed. The contents of the above 12 index components in 13 batches of Xiao'er resuqing oral liquid were as follows: 0.078-0.172, 1.564-2.736, 1.338-2.578, 0.426-0.872, 1.477-2.628, 1.396-2.447, 4.052-9.146, 0.367-0.692, 1.974-4.674, 1.274-2.969, 0.085-0.167 and 0.155-0.307 mg/mL. **CONCLUSIONS** The established HPLC fingerprint and content determination methods have high accuracy and high specificity, which can be used for the quality evaluation of Xiao'er resuqing oral liquid.

KEYWORDS Xiao'er resuqing oral liquid; HPLC; fingerprint; content determination

小儿热速清口服液由柴胡、板蓝根、金银花、连翘、黄芩、葛根、大黄和水牛角8味药材制成。方中,柴胡解

肌退热、升举阳气,黄芩清肺泻火、除上焦湿热,二药表里双解,共为君药。金银花和连翘清热解毒、辛凉透表,葛根解肌清热、生津止渴,板蓝根和水牛角清热凉血解毒、利咽消肿,以上5味药材共为臣药。大黄泻热通便,导热下行,给邪气以出路,为佐药。全方配伍,表里双解,清上泻下,具有清热解毒、泻火利咽的功效,可用于治疗外感风热所致的感冒。

Δ 基金项目 山东省重点研发计划(重大科技创新工程)(No. 2020CXGC010505);滨州市农社领域科技创新政策引导计划(No. 2022SHFZ044)

* 第一作者 副主任中药师。研究方向:药品质量检验和标准制定。E-mail: yjscjf@163.com

现代研究表明,小儿热速清口服液具有抗病毒、解热、抗炎、镇咳、祛痰、增强免疫等作用^[1],其质量标准收载于2020年版《中国药典》(一部)^[2],但仅规定了黄芩苷的含量测定。由于小儿热速清口服液组方药味多、化学成分复杂,单一指标的定量分析难以用于全面控制和评价该组方的质量。随着中药种植业的快速发展,中药质量的参差不齐使得临床用药的安全性和有效性受到直接影响。中药指纹图谱可反映中药及制剂所含化学成分的整体情况,对评估其质量优劣、真伪及保证质量的一致性、稳定性具有重要作用。基于此,本研究采用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法对小儿热速清口服液进行指纹图谱研究,并综合考虑图谱结果和各成分专属性,选定(*R,S*)告依春、3,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸、绿原酸、葛根素、柴胡皂苷d、连翘苷、连翘酯苷A、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、大黄素、大黄酚作为指标成分并进行含量测定,以期小儿热速清口服液的质量标准提升提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括1260 Infinity II型HPLC仪及配备的G7115A型二极管阵列检测器和Chemstation色谱工作站[安捷伦科技(中国)有限公司]、XSE205DU型电子分析天平[瑞士梅特勒-托利多(上海)公司]、Arium comfort II型超纯水仪(德国Sartorius公司)。

1.2 主要药品与试剂

13批(编号S1~S13)小儿热速清口服液[批号221205、221058、200558、220120、210984、210329、201192、210103、201080、220107、210546、220268、201048,规格为每支装10 mL(每1 mL相当于饮片1.162 5 g)]购自吉林一正药业集团有限公司;柴胡(批号120992-201509)、黄芩(批号120955-201810)、板蓝根(批号121177-202109)、金银花(批号121060-201608)、连翘(批号120908-201817)、葛根(批号121551-201805)、水牛角(批号121627-202002)和大黄(批号120902-201912)对照药材,以及(*R,S*)告依春(批号111753-202007,纯度100%)、3,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸(批号111782-202208,纯度95.9%)、绿原酸(批号110753-202018,纯度96.1%)、葛根素(批号110752-202217,纯度96.8%)、柴胡皂苷a(批号110777-21912,纯度94.8%)、柴胡皂苷d(批号110778-201912,纯度96.3%)、连翘苷(批号110821-202117,纯度94.9%)、连翘酯苷A(批号111810-202108,纯度96.2%)、黄芩苷(批号110715-202122,纯度94.2%)、汉黄芩苷(批号112002-201702,纯度98.5%)、黄芩素(批号111595-201808,纯度97.9%)、汉黄芩素(批号111515-202207,纯度100%)、大黄素(批号110756-201903,纯度96.0%)、大黄酚(批号110796-201922,纯度99.4%)对照品均购自中

国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈为色谱纯,乙醇、磷酸为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 小儿热速清口服液HPLC指纹图谱的建立

2.1.1 色谱条件

以Venusil MP C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)为色谱柱;以乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~5 min, 10%A; 5~30 min, 10%A→20%A; 30~40 min, 20%A; 40~50 min, 20%A→40%A; 50~65 min, 40%A; 65~80 min, 45%A→90%A);流速为1.0 mL/min;检测波长为210 nm;柱温为30 °C;进样量为10 μL。

2.1.2 混合对照品溶液的制备

精密称取(*R,S*)告依春、3,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸、绿原酸、葛根素、柴胡皂苷a、柴胡皂苷d、连翘苷、连翘酯苷A、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、大黄素、大黄酚对照品各适量,分别置于棕色容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度分别为840.2、1 167.4、1 123.1、1 064.4、624.3、706.2、1 388.6、1 021.1、1 541.5、1 562.3、974.2、908.6、740.3、645.3 μg/mL的单一对照品贮备液。分别精密量取上述单一对照品贮备液1.0、10.0、10.0、10.0、2.5、5.0、2.5、10.0、20.0、10.0、10.0、5.0、1.0、2.0 mL,置同一100 mL棕色量瓶中,加入甲醇定容至刻度,摇匀,即得上述各成分质量浓度分别为8.4、116.7、112.3、106.4、15.6、35.3、34.7、102.1、308.3、156.2、97.4、45.4、7.4、12.9 μg/mL的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备

精密量取本品2.0 mL,置于100 mL分液漏斗中,用乙醚振摇提取2次,每次10 mL;弃去乙醚液,水液通过D101型大孔吸附树脂柱(内径约为1.5 cm,柱高12 cm)以1.5 mL/min的流速用100 mL水洗脱,弃去洗脱液,再用40%乙醇洗脱,弃去10 mL洗脱液,收集40%乙醇洗脱液于50 mL容量瓶至刻度,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液即得。

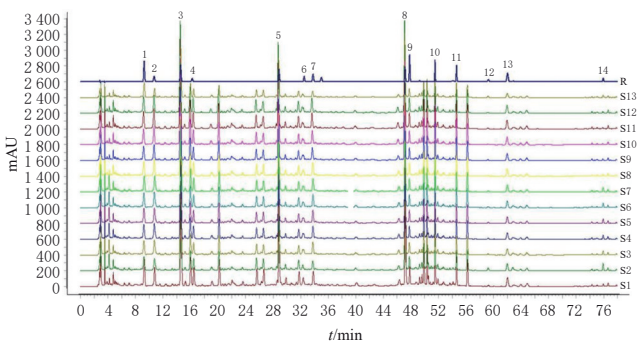
2.1.4 HPLC指纹图谱的建立及分析

(1)精密度试验:按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液(批号221205),按“2.1.1”项下色谱条件连续进样6次,记录色谱图,选择黄芩苷色谱峰为参照(该峰分离度好,峰面积较大,下同),计算得各共有峰相对保留时间的RSD≤0.10%,相对峰面积的RSD≤2.0%(*n*=6),表明该方法精密度良好。

(2)稳定性试验:按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液(批号221205),于室温放置0、4、8、12、18、24、36 h后,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,以黄芩苷色谱峰为参照,计算得各共有峰相对保留时间的RSD≤0.13%,相对峰面积的RSD≤2.5%(*n*=7),表明供试品溶液在室温下放置36 h内稳定性良好。

(3)重复性试验:按“2.1.3”项下方法平行制备供试品溶液(批号221205)6份,按“2.1.1”项下色谱条件进样分析,以黄芩苷色谱峰为参照,计算得各共有峰相对保留时间的RSD $\leq$ 0.12%,相对峰面积的RSD $\leq$ 3.5%($n=6$),表明该方法的重复性良好。

(4)HPLC指纹图谱的建立及相似度分析:取13批小儿热速清口服液,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图并导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》,设置编号S2样品指纹图谱(峰数最多)为参照,将时间窗宽度设为0.1 min,使用平均数法进行多点校正,得到13批供试品溶液叠加的HPLC指纹图谱和对照指纹图谱R(见图1),并进行相似度评价。结果显示,13批小儿热速清口服液样品指纹图谱与其对照指纹图谱R的相似度均大于0.97,表明各批次小儿热速清口服液的相似性较好,整体质量差异不大。以分离度较好、峰面积较大的黄芩苷色谱峰为参照,得到13批小儿热速清口服液中14个共有峰相对保留时间的RSD为0.02%~0.13%($n=13$),相对峰面积的RSD为1.2%~29.4%($n=13$),表明各批次小儿热速清口服液在部分成分的含量上存在差异。



1:(R,S)告依春;2:3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸;3:葛根素;4:柴胡皂苷a;5:连翘苷;6:连翘酯苷A;7:绿原酸;8:黄芩苷;9:柴胡皂苷d;10:汉黄芩苷;11:黄芩素;12:大黄素;13:汉黄芩素;14:大黄酚。

图1 13批小儿热速清口服液样品的HPLC叠加指纹图谱与对照指纹图谱R

(5)共有峰归属与确认:精密吸取“2.1.2”项下混合对照品溶液和“2.1.3”项下供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,通过保留时间和紫外吸收光谱定性,确定小儿热速清口服液HPLC指纹图谱各共有峰的归属。结果显示,共确认14个共有成分,其中1号峰为(R,S)告依春,2号峰为3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸,3号峰为葛根素,4号峰为柴胡皂苷a,5号峰为连翘苷,6号峰为连翘酯苷A,7号峰为绿原酸,8号峰为黄芩苷,9号峰为柴胡皂苷d,10号峰为汉黄芩苷,11号峰为黄芩素,12号峰为大黄素,13号峰为汉黄芩素,14号峰为大黄酚。

2.2 指标成分含量测定

2.2.1 色谱条件

除检测波长为210 nm(柴胡皂苷d)、254 nm[连翘苷、(R,S)告依春、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、大黄素、大

黄酚]和327 nm(葛根素、绿原酸、3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、连翘酯苷A)外,其他条件同“2.1.1”项。

2.2.2 系列混合对照品溶液的制备

按“2.1.2”项下方法制备除柴胡皂苷a、汉黄芩素外的混合对照品溶液,再取上述溶液0、0.2、0.5、1.0、5.0、10.0 mL置于10 mL量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,即得各成分系列质量浓度混合对照品溶液①、②、③、④、⑤、⑥。

2.2.3 供试品溶液的制备

供试品溶液的制备同“2.1.3”项下。

2.2.4 阴性供试品溶液的制备

按照2020年版《中国药典》(一部)收录的本品处方组成和制备工艺,分别制成缺柴胡、缺板蓝根、缺金银花、缺连翘、缺黄芩、缺葛根和缺大黄的阴性样品,再按“2.2.3”项下方法制备相应的阴性供试品溶液。

2.2.5 专属性试验及峰纯度检测

精密吸取混合对照品溶液④、供试品溶液、阴性供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果见图2。由图2可知,在与对照品溶液各成分相应的色谱图位置上,供试品溶液色谱图中均有相同保留时间的色谱峰;阴性供试品溶液色谱图在对应保留时间处未见相应检测成分的色谱峰,不干扰含量测定,表明该方法的专属性良好。供试品溶液中检测的各成分均达到基线分离,分离度均大于1.0,理论板数以各成分峰计,均不低于5 000。同时,采用二极管阵列检测器对各成分色谱峰进行紫外光谱扫描和峰纯度检测发现,12种成分的紫外吸收光谱和相应对照品完全一致,峰纯度因子均大于1 000。

2.2.6 线性关系考察

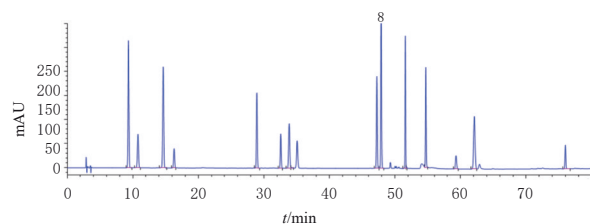
分别取系列混合对照溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分峰面积(Y)对质量浓度(X)进行线性回归,结果见表1。

2.2.7 精密度的试验

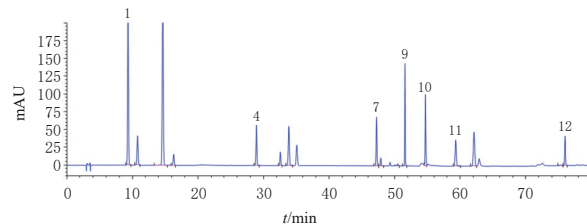
取混合对照品溶液④,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积,计算得(R,S)告依春、3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、葛根素、连翘苷、连翘酯苷A、绿原酸、黄芩苷、柴胡皂苷d、汉黄芩苷、黄芩素、大黄素、大黄酚峰面积的RSD分别为0.49%、0.37%、0.26%、0.45%、0.38%、0.56%、0.39%、0.47%、0.58%、0.67%、0.71%、0.74%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.2.8 稳定性试验

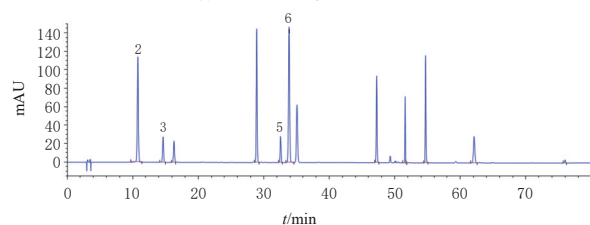
按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液(批号221205),于室温放置0、4、8、12、18、24、36 h后,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算得各指标成分峰面积RSD分别为0.97%、0.75%、0.43%、0.47%、0.44%、0.53%、0.37%、1.12%、0.97%、1.38%、1.62%、1.79%($n=6$),表明供试品溶液在室温放置36 h内稳定性良好。



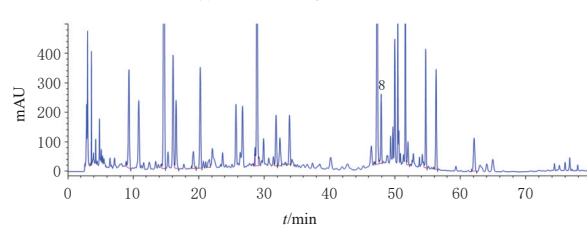
A. 混合对照品溶液④(波长 210 nm)



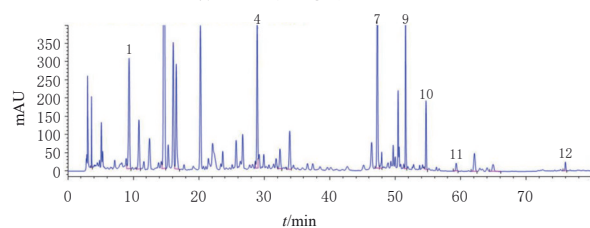
B. 混合对照品溶液④(波长 254 nm)



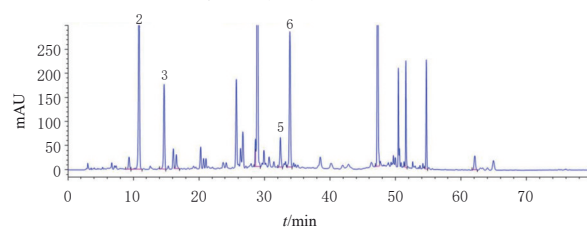
C. 混合对照品溶液④(波长 327 nm)



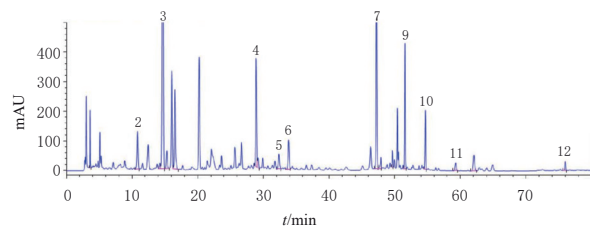
D. 供试品溶液(波长 210 nm)



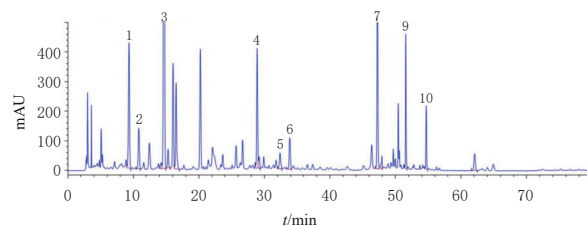
E. 供试品溶液(波长 254 nm)



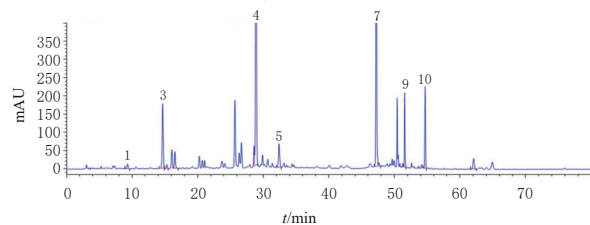
F. 供试品溶液(波长 327 nm)



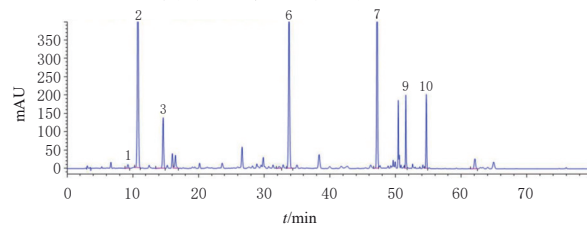
G. 缺板蓝根阴性供试品溶液(波长 254 nm)



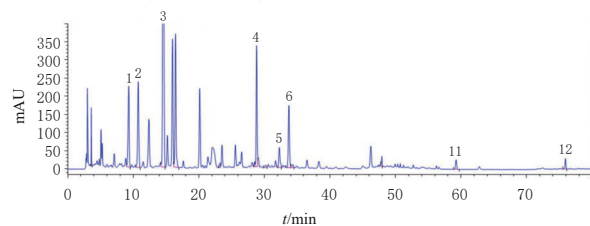
H. 缺大黄阴性供试品溶液(波长 254 nm)



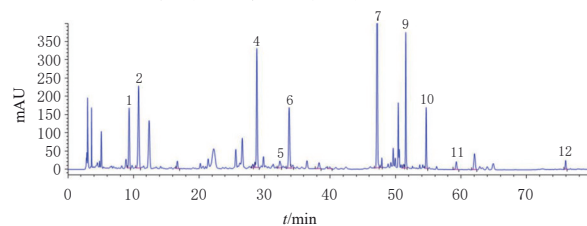
I. 缺金银花阴性供试品溶液(波长 327 nm)



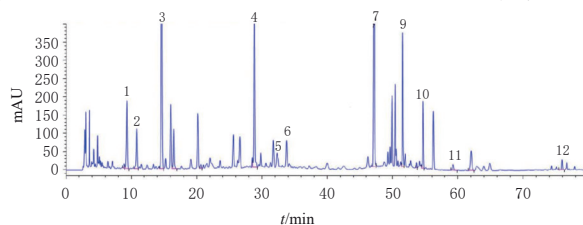
J. 缺连翘阴性供试品溶液(波长 327 nm)



K. 缺黄芩阴性供试品溶液(波长 254 nm)



L. 缺葛根阴性供试品溶液(波长 327 nm)



M. 缺柴胡阴性供试品溶液(波长 210 nm)

1: (*R,S*) 告依春; 2: 3,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸; 3: 葛根素; 4: 连翘苷; 5: 连翘酯苷A; 6: 绿原酸; 7: 黄芩苷; 8: 柴胡皂苷d; 9: 汉黄芩苷; 10: 黄芩素; 11: 大黄素; 12: 大黄酚。

图2 混合对照品溶液④、供试品溶液和阴性供试品溶液的HPLC指纹图谱

表1 各成分的线性关系

待测成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/(μg/mL)
(<i>R,S</i>)告依春	<i>Y</i> =93.38 <i>X</i> -7.64	0.999 8	0.168~8.4
3,5-二- <i>O</i> -咖啡酰奎宁酸	<i>Y</i> =74.61 <i>X</i> +6.48	0.999 8	2.334~116.7
葛根素	<i>Y</i> =106.17 <i>X</i> +7.53	0.999 9	2.128~106.4
连翘苷	<i>Y</i> =73.57 <i>X</i> -6.61	0.999 9	0.694~34.7
连翘酯苷 A	<i>Y</i> =112.57 <i>X</i> -9.46	0.999 9	2.042~102.1
绿原酸	<i>Y</i> =67.34 <i>X</i> -3.49	0.999 9	2.246~112.3
黄芩苷	<i>Y</i> =265.52 <i>X</i> -20.71	0.999 9	6.166~308.3
柴胡皂苷 d	<i>Y</i> =21.26 <i>X</i> -2.34	0.999 7	0.706~35.3
汉黄芩苷	<i>Y</i> =187.46 <i>X</i> +9.05	0.999 8	3.124~156.2
黄芩素	<i>Y</i> =212.44 <i>X</i> +11.23	0.999 8	1.948~97.4
大黄素	<i>Y</i> =59.37 <i>X</i> -5.36	0.999 7	0.148~7.4
大黄酚	<i>Y</i> =36.58 <i>X</i> -2.77	0.999 7	0.258~12.9

2.2.9 重复性试验

取同一批样品(批号 221205),按“2.2.3”项下方法制备 6 份供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积和保留时间,按标准曲线法计算各指标成分含量,得各成分含量的 RSD 分别为 0.78%、0.68%、0.52%、0.84%、0.69%、0.65%、0.41%、1.57%、1.42%、1.53%、1.76%、1.88%(*n*=6),表明该方法的重复性良好。

2.2.10 加样回收率试验

取各成分含量已知的小儿热速清口服液(批号 221205)[(*R,S*)告依春、3,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸、葛根素、连翘苷、连翘酯苷 A、绿原酸、黄芩苷、柴胡皂苷 d、汉黄芩苷、黄芩素、大黄素、大黄酚的含量分别为 0.152、2.357、2.441、0.727、2.184、2.076、6.253、0.653、3.314、1.876、0.127、0.236 mg/mL]1.0 mL,各 6 份,分别精密加入“2.2.2”项下混合对照品溶液 20.0 mL,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算得各指标成分平均加样回收率为 91.10%~96.69%,RSD 为 1.90%~3.36%(*n*=6),表明该方法的准确度良好。

2.2.11 含量测定

取 13 批小儿热速清口服液,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,精密吸取供试品溶液和对照品溶液各 10 μL,按“2.2.1”项下色谱条件下进样测定,各成分含量测定结果见表 2。

表2 小儿热速清口服液中 12 种指标成分的含量测定结果(mg/mL, *n*=3)

待测成分	批号 221205	批号 221058	批号 200558	批号 220120	批号 210984	批号 210329	批号 201192	批号 210103	批号 201080	批号 220107	批号 210546	批号 220268	批号 201048
(<i>R,S</i>)告依春	0.156	0.135	0.097	0.164	0.118	0.089	0.106	0.172	0.078	0.143	0.128	0.144	0.107
3,5-二- <i>O</i> -咖啡酰奎宁酸	2.357	2.628	2.042	2.417	1.936	1.878	1.721	2.583	1.564	2.397	2.557	2.736	1.582
葛根素	2.076	1.844	2.271	1.875	1.427	2.366	2.578	1.714	1.338	2.546	2.203	2.432	1.526
连翘苷	0.727	0.558	0.634	0.685	0.472	0.794	0.618	0.872	0.426	0.773	0.638	0.689	0.553
连翘酯苷 A	2.184	1.927	1.736	2.628	1.554	2.312	2.478	2.296	1.477	1.846	2.236	2.401	1.670
绿原酸	2.076	2.318	1.975	2.287	1.584	1.866	1.483	2.447	1.396	2.168	2.104	2.319	1.472
黄芩苷	6.253	7.374	4.052	8.941	5.698	4.976	6.027	9.146	5.125	7.022	7.012	8.563	5.681
柴胡皂苷 d	0.653	0.514	0.367	0.626	0.481	0.394	0.421	0.457	0.413	0.686	0.602	0.692	0.413
汉黄芩苷	3.314	3.931	2.346	2.832	1.974	2.243	3.327	4.674	3.105	4.077	4.027	4.528	2.526
黄芩素	1.876	2.017	1.290	1.469	1.327	1.638	2.082	2.969	1.274	2.443	2.128	2.362	1.452
大黄素	0.127	0.141	0.093	0.136	0.085	0.132	0.114	0.142	0.106	0.152	0.136	0.167	0.085
大黄酚	0.236	0.268	0.155	0.249	0.174	0.217	0.168	0.278	0.214	0.307	0.271	0.298	0.178

3 讨论

3.1 评价指标的选择

2020 年版《中国药典》(一部)仅规定了小儿热速清口服液中黄芩苷的含量测定方法,然而(*R,S*)告依春是板蓝根中含量较高的指标成分,3,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸、绿原酸是金银花中含量较高的指标成分,葛根素是葛根中含量较高的指标成分,柴胡皂苷 d 是柴胡中含量较高的指标成分,连翘苷、连翘酯苷 A 是连翘中含量较高的成分,汉黄芩苷、黄芩素是黄芩中含量较高的成分,大黄素、大黄酚是大黄中含量较高的指标成分^[2],对该制剂的临床疗效均发挥着重要作用,但现行标准中并未进行含量规定,不能保证投料质量,容易造成不同批次药品间的质量存在差异。另外,本研究前期采用“2.2.1”项下色谱条件对柴胡皂苷 a 和汉黄芩素进行定量分析发现,部分样品无法检测出这两种成分。因此,本研究选择除柴胡皂苷 a、汉黄芩素外的 12 种成分作为含量测定指标。

3.2 检测波长的选择

参照 2020 年版《中国药典》(一部)中小儿热速清口服液和板蓝根、葛根、柴胡、连翘、黄芩和大黄药材质量标准和相关文献^[3-6],并根据对照品在 200~400 nm 的紫外吸收图谱,确定在 210、254、327 nm 处同时测定 12 种指标成分即能保证各个指标成分在相应波长处有最大吸收,同时也提高了检测灵敏度,减小了干扰因素。

3.3 流动相的选择

参考文献[7-12]方法,本研究考察了甲醇-0.05% 磷酸溶液、乙腈-0.1% 磷酸溶液、乙腈-水、乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液进行等度和梯度洗脱对色谱峰的影响。结果显示,以乙腈-0.1% 磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱时,所得色谱图基线更加平稳,各指标成分色谱峰的分离度、对称因子和理论板数良好。

3.4 提取方法的考察

根据小儿热速清口服液的处方和制备工艺,分别考察了本品用 40% 乙醇溶液直接溶解,用乙醚萃取后水相直接用 40% 乙醇溶解,用乙醚萃取后水相通过 D101 型大孔吸附树脂柱洗脱分离并收集 40% 乙醇洗脱液作为

供试品溶液。结果显示,采用D101型大孔吸附树脂柱分离之后,各指标成分的分离效果更好,回收率达到含量测定的要求。

综上所述,本研究成功建立了小儿热速清口服液HPLC指纹图谱,并进行了多指标成分的含量测定,可为小儿热速清口服液的质量标准提高提供依据。

参考文献

- [1] 苗明三,李中心,朱志军,等. 小儿热速清口服液解热抗炎作用的研究[J]. 河南中医,1991,11(6):11-12,14.
MIAO M S, LI Z X, ZHU Z J, et al. Study on antipyretic and anti-inflammatory effects of Xiaoe resuqing oral liquid [J]. Henan Tradit Chin Med, 1991, 11(6): 11-12, 14.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 2020年版. 北京:中国医药科技出版社, 2020:24-25, 177-178, 214-215, 230-231, 293, 314, 347, 577.
National Pharmacopoeia Commission. Chinese pharmacopoeia: part I [M]. 2020 edition. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020:24-25, 177-178, 214-215, 230-231, 293, 314, 347, 577.
- [3] 冯亚茹,周荣荣,耿佳乐,等. 一测多评法同时测定大黄药材中8个结合型蒽醌含量的系统研究[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(11):1884-1894.
FENG Y R, ZHOU R R, GENG J L, et al. Systematic study on simultaneous determination of eight anthraquinone glycosides in Rhei Radix et Rhizoma by QAMS[J]. Chin J Pharm Anal, 2022, 42(11):1884-1894.
- [4] 岳超,徐普,张文婷,等. 基于HPLC指纹图谱和多指标成分含量测定及化学模式分析的玉屏风丸的质量评价[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(11):2019-2028.
YUE C, XU P, ZHANG W T, et al. Quality evaluation of Yupingfeng pills based on HPLC fingerprint and determination of multi-index components and chemometrics analysis[J]. Chin J Pharm Anal, 2022, 42(11):2019-2028.
- [5] 徐境荣,于钦川,赖莉,等. 基于多指标成分含量测定探索黄芩药材质量综合评价模式[J]. 药学学报, 2021, 56(11):3141-3152.
XU J R, YU Q C, LAI L, et al. Comprehensive quality evaluation of *Scutellaria baicalensis* Georgi by determination of multi-index components[J]. Acta Pharm Sin, 2021, 56(11):3141-3152.
- [6] 姜艳雯,邹恺平,陈梦娇,等. 加味柴胡疏肝散基准样品HPLC指纹图谱及关键质量属性量值传递规律研究[J]. 中草药, 2024, 55(1):85-100.
JIANG Y W, ZOU K P, CHEN M J, et al. Study on HPLC fingerprint and key quality attribute quantity transfer law of reference samples of Jiawei chaihu shugan san[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(1):85-100.
- [7] 于密密,王安琪,杜小伟,等. 基于HPLC指纹图谱结合化学计量学的痢泻灵片质量评价[J]. 中成药, 2023, 45(9):2846-2852.
YU M M, WANG A Q, DU X W, et al. Quality evaluation of Lixieling tablets based on HPLC fingerprints combined with chemometrics[J]. Chin Tradit Pat Med, 2023, 45(9): 2846-2852.
- [8] 叶彬,闫小巧,雷婷,等. 葛根药材HPLC指纹图谱与6种成分含量测定研究[J]. 中草药, 2023, 54(24):8222-8227.
YE B, YAN X Q, LEI T, et al. HPLC fingerprint of *Puerariae Lobatae Radix* and content determination of six components[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(24): 8222-8227.
- [9] 倪素丽,董岳峰. UPLC-QAMS法同时测定连翘花中5种成分的含量[J]. 中国药房, 2023, 34(15):1826-1829.
NI S L, DONG Y F. Simultaneous determination of five components in *Forsythia suspensa* flowers using UPLC-QAMS method[J]. Chin Pharm, 2023, 34(15):1826-1829.
- [10] 王淑,张翠翠,郭凤丹,等. 基于UPLC多指标含量测定和指纹图谱的不同种质金银花药材质量评价研究[J]. 中草药, 2024, 55(3):947-955.
WANG S, ZHANG C C, GUO F D, et al. Quality evaluation of different germplasm of *Lonicera japonica* based on UPLC multi index content determination and fingerprint analysis[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(3):947-955.
- [11] 李沁,张聪,陈亮,等. 基于超高效液相色谱指纹图谱、多指标成分定量及化学计量学的小儿感冒颗粒质量评价[J]. 药物分析杂志, 2023, 43(9):1612-1622.
LI Q, ZHANG C, CHEN L, et al. Quality evaluation of pediatric cold granules based on ultra-high performance liquid chromatography fingerprint, multi index component quantification, and chemometrics [J]. J Pharm Anal, 2023, 43(9):1612-1622.
- [12] 荣晓惠,刘艳,王秋茹,等. 不同产区掌叶大黄酒蒸前后指纹图谱的建立及3种差异性成分的含量测定[J]. 中国药房, 2022, 33(3):280-286.
RONG X H, LIU Y, WANG Q R, et al. Establishment of fingerprint and content determination of 3 differential components in *Rheum palmatum* before and after steaming with wine derived from different producing areas[J]. China Pharm, 2022, 33(3):280-286.

(收稿日期:2023-10-17 修回日期:2024-02-20)

(编辑:唐晓莲)