

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.20.020

热炎宁合剂高效液相色谱指纹图谱及其多指标成分定量分析

苏 若¹,李桂女²

(1. 海南医学院第二附属医院药学部,海南 海口 570102; 2. 海南医学院第一附属医院药学部,海南 海口 570100)

摘要:目的 建立热炎宁合剂的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并同时测定其中8个成分的含量。方法 色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-0.05% 磷酸水溶液(梯度洗脱),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 254 nm(大黄素)和 325 nm(绿原酸、秦皮乙素、咖啡酸、虎杖苷、野黄芩苷、木犀草素、芹菜素),柱温为 30 ℃。以虎杖苷峰为参照峰,建立 15 批样品的 HPLC 图谱,采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 A 版)进行相似度评价,确定共有峰。结果 15 批样品 HPLC 图谱有 25 个共有峰,相似度均在 0.994~0.999 范围内,确认的 8 个成分分别为绿原酸、秦皮乙素、咖啡酸、虎杖苷、野黄芩苷、木犀草素、芹菜素、大黄素,其质量浓度分别在 0.21~3.38 μg/mL($r=0.999\ 8$)、0.38~6.02 μg/mL($r=0.999\ 1$)、0.09~1.50 μg/mL($r=0.999\ 3$)、5.32~85.19 μg/mL($r=0.999\ 5$)、0.77~12.35 μg/mL($r=0.999\ 5$)、0.50~8.00 μg/mL($r=0.999\ 6$)、0.24~3.91 μg/mL($r=0.999\ 7$)、0.37~5.97 μg/mL($r=0.999\ 3$)范围内与峰面积线性关系良好;精密性、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 1.50%;平均加样回收率为 96.69%~104.36%,RSD 为 0.99%~1.63%($n=9$)。15 批样品中上述成分平均含量分别为 0.126,0.239,0.086,3.321,0.487,0.368,0.189,0.224 mg/mL。结论 热炎宁合剂不同批次间各指标成分的含量变化较小,样品质量较稳定;建立的分析方法适用于该制剂的质量控制与评价。

关键词:热炎宁合剂;高效液相色谱法;指纹图谱;相似度;含量测定;质量评价

中图分类号:R917;R927

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)20-0075-06

HPLC Fingerprints of Reyanning Mixture and Quantitative Analysis of Its Multi-Index Components

SU Ru¹,LI Guinyu²

(1. Department of Pharmacy, The Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou, Hainan, China 570102; 2. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou, Hainan, China 570100)

Abstract: Objective To establish high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprints of Reyanning Mixture, and to simultaneously determine the contents of eight components in Reyanning Mixture. **Methods** The chromatographic column was Agilent ZORBAX SB-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm,5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.05% phosphoric acid aqueous solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was set at 254 nm for emodin and 325 nm for chlorogenic acid, aesculetin, caffeic acid, polydatin, scutellarin, luteolin and apigenin, and the column temperature was 30 ℃. With the peak of polygonum cuspidatum glycoside as the reference peak, the HPLC fingerprints of 15 batches of samples were established. The Similarity Evaluation System of Chromatographic Fingerprints of Traditional Chinese Medicine (Version 2012 A) was used to evaluate the similarity and determine the common peaks. **Results** There were 25 common peaks in the HPLC fingerprints of 15 batches of samples, and the similarity was in the range of 0.994-0.999. The eight components identified were chlorogenic acid, aesculetin, caffeic acid, polydatin, scutellarin, luteolin, apigenin, and emodin. The linear ranges of the above eight components were 0.21-3.38 μg/mL ($r=0.999\ 8$), 0.38-6.02 μg/mL ($r=0.999\ 1$), 0.09-1.50 μg/mL ($r=0.999\ 3$), 5.32-85.19 μg/mL ($r=0.999\ 5$), 0.77-12.35 μg/mL ($r=0.999\ 5$), 0.50-8.00 μg/mL ($r=0.999\ 6$), 0.24-3.91 μg/mL ($r=0.999\ 7$) and 0.37-5.97 μg/mL ($r=0.999\ 3$), respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 1.50%. The average recoveries of the above eight components were in the range of 96.69%-104.36% with RSDs of 0.99%-1.63% ($n=9$). The average contents of the above eight components in 15 batches of samples were 0.126, 0.239, 0.086, 3.321, 0.487, 0.368, 0.189 and 0.224 mg/mL, respectively. **Conclusion** The content of each index component of Reyanning Mixture in different batches has little change, and the quality of the sample is stable. The established analytical method is suitable for the quality control and evaluation of the preparation.

Key words: Reyanning Mixture; HPLC; fingerprint; similarity; content determination; quality evaluation

热炎宁合剂由蒲公英、虎杖、北败酱、半枝莲4味中药材组方,具有清热解毒功效,主治外感风热、内郁化火所致风热感冒,证见发热、咽喉肿痛、口苦咽干、咳嗽痰黄、尿黄便结,也可用于化脓性扁桃体炎、急性咽炎、急性支气管炎等见上述证候者。现代临床多用其治疗

急性扁桃体炎^[1]、小儿急性上呼吸道感染^[2]、疱疹性咽峡炎^[3]、小儿肺炎^[4]、普通型手足口病^[5]。该方收载于2020年版《中国药典(一部)》,质量标准仅有大黄素和虎杖苷含量的限度检测,未能反映药品整体质量,相关文献也主要集中在制剂中少数几个药效成分的定量分

析^[6]。为更好地反映热炎宁合剂内在质量,完善质量标准,本研究中建立了其高效液相色谱(HPLC)指纹图谱分析方法,并对其主要药效成分绿原酸、秦皮乙素、咖啡酸、虎杖苷、野黄芩苷、木犀草素、芹菜素和大黄素含量进行测定,为高效控制和评价热炎宁合剂的质量提供依据。现报道如下。

1 仪器与试药

仪器:e2695 Alliance型高效液相色谱仪,包含DAD紫外检测器(美国Waters公司);Mettler XP6型电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司);BSA124S型电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);KQ-250E型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

试药:热炎宁合剂(清华德人西安幸福制药有限公司,批号分别为190503,190621,190724,190811,190915,191024,191029,191125,191208,200326,200413,200714,200907,200919,201123,编号为S1~S15);绿原酸对照品(批号为1108753-201817,含量96.8%),秦皮乙素对照品(批号为110741-201708,含量99.9%),咖啡酸对照品(批号为110885-201703,含量99.7%),虎杖苷对照品(批号为111575-201603,含量87.3%),野黄芩苷对照品(批号为110842-202010,含量91.5%),木犀草素对照品(批号为111520-202006,含量94.4%),芹菜素对照品(批号为111901-202004,含量99.4%),大黄素对照品(批号为110756-201913,含量96.0%),均购自中国食品药品检定研究院;乙腈、甲醇均为色谱纯,磷酸为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.05%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~5 min时7%A,5~20 min时7%A→25%A,20~55 min时25%A→65%A,55~65 min时65%A,65~70 min时65%A→85%A,70~75 min时85%A→7%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:325 nm(0~55 min,绿原酸、秦皮乙素、咖啡酸、虎杖苷、野黄芩苷、木犀草素和芹菜素)和254 nm(55~70 min,大黄素);柱温:30℃;进样量:10 μL。

2.2 溶液制备

混合对照品溶液:分别取各对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL分别含绿原酸4.22 μg、秦皮乙素7.52 μg、咖啡酸1.88 μg、虎杖苷106.49 μg、野黄芩苷15.43 μg、木犀草素10.00 μg、芹菜素4.88 μg、大黄素7.46 μg的溶液,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

供试品溶液:精密量取样品10 mL,置100 mL具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇100 mL,摇匀,滤过,精密

量取续滤液10 mL,置100 mL容量瓶中,加70%甲醇定容,滤过,取续滤液,即得。

2.3 HPLC 指纹图谱建立

2.3.1 方法学考察

精密度试验:取样品(编号S1)适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件连续进样测定5次。以虎杖苷峰(S)为参照峰,计算各特征峰的相对保留时间及相对峰面积。结果的RSD均小于3.7%(n=5),表明方法精密度良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液适量,分别于室温下放置0,4,8,16,20,24 h时按2.1项下色谱条件进样测定。以虎杖苷峰(S)为参照峰,计算各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及相对峰面积的RSD均小于2.6%(n=6),表明供试品溶液室温下放置24 h内基本稳定。

重复性试验:取同一批样品(编号S1)适量,共6份,按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。以虎杖苷峰(S)为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间及相对峰面积,结果的RSD均小于2.8%(n=6),表明方法重复性良好。

2.3.2 HPLC 指纹图谱的建立及共有峰指认

取15批样品各适量,按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,记录色谱图,见图1。将15批样品的色谱数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 A版)评价分析,以编号S1样品色谱图作为参考图谱,采用多点校正全谱匹配生成指纹图谱共有模式,时间窗宽度设为0.1 min,见图2。结果15批样品中,共检测到25个共有峰,通过与混合对照品溶液图谱(图3)比对,指认出其中8个共有峰,6号峰为绿原酸、7号峰为秦皮乙素、8号峰为咖啡酸、13号峰为虎杖苷、14号峰为野黄芩苷、21号峰为木犀草素、23号峰为芹菜素、24号峰为大黄素,其保留时间分别为19.69,20.43,22.22,33.39,35.71,47.63,53.92,60.18 min。以13号峰为参照峰,计算其他共有峰相对峰面积,结果见表1。

2.3.3 相似度评价

将15批样品的色谱数据导入前述相似度评价系统,以共有模式为对照图谱进行相似度计算。结果15批样品的相似度分别为0.997,0.999,0.995,0.994,0.998,0.997,0.996,0.999,0.999,0.998,0.999,0.999,0.998,0.996,0.999,均大于0.99,表明热炎宁合剂各批次制备工艺一致性较好,质量较稳定。

2.4 含量测定

2.4.1 方法学考察

系统适用性试验:取2.2项下供试品溶液适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液色谱中8个待测成分与相邻色谱峰之间分离较好

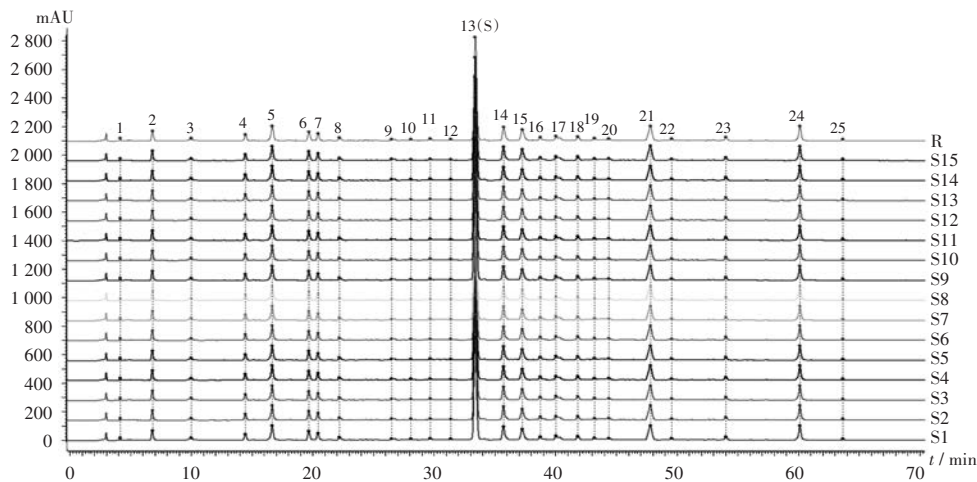


图1 15批热炎宁合剂高效液相色谱叠加指纹图谱

Fig. 1 Superimposed HPLC fingerprints of 15 batches of Reyanning Mixture

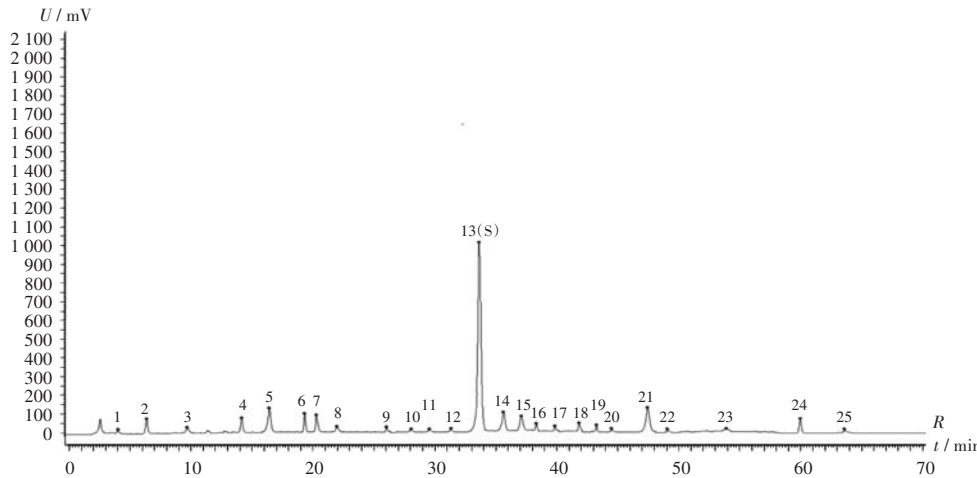
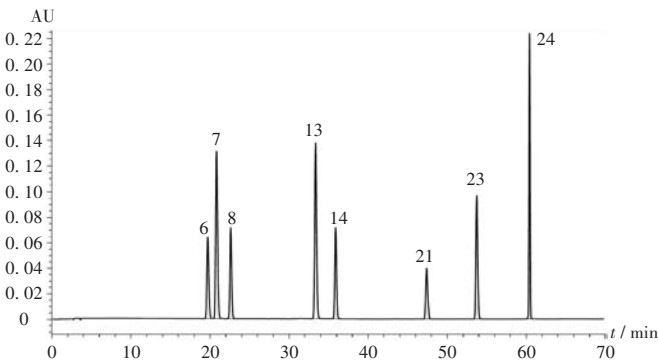


图2 热炎宁合剂高效液相色谱对照指纹图谱

Fig. 2 Reference HPLC fingerprint of Reyanning Mixture



6. 绿原酸 7. 秦皮乙素 8. 咖啡酸 13. 虎杖苷 14. 野黄芩苷
21. 木犀草苷 23. 芹菜素 24. 大黄素

图3 混合对照品溶液高效液相色谱图

6. Chlorogenic acid 7. Aesculetin 8. Caffeic acid 13. Polydatin
14. Scutellarin 21. Luteolin 23. Apigenin 24. Emodin

Fig. 3 HPLC chromatogram of mixed reference solution

(分离度 > 1.5), 理论板数按虎杖苷峰计应大于 7 000, 拖尾因子 < 1.05. 供试品溶液色谱图见图 4。

线性关系考察: 精密量取混合对照品溶液 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 mL, 分别置 10 mL 容量瓶中, 加 70% 甲醇定容,

摇匀, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。以待测成分质量浓度 ($X, \mu\text{g} / \text{mL}$) 为横坐标, 峰面积 (Y) 为纵坐标, 进行线性回归, 结果见表 2。

检测限和定量限考察: 精密量取混合对照品溶液适量, 加 70% 甲醇, 倍比稀释, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 以信噪比 (S / N) 为 3:1 和 10:1 时的质量浓度分别记作检测限和定量限, 结果见表 2。

精密度试验: 取供试品溶液适量, 按 2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果见表 3, 表明方法精密度良好。

稳定性试验: 取同一供试品溶液适量, 分别于室温下放置 0, 4, 8, 16, 20, 24 h 时按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果见表 3, 表明供试品溶液在室温下放置 24 h 内基本稳定。

重复性试验: 取样品 (编号 S1) 适量, 精密称定, 共 6 份, 按 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, 记录峰面积, 并计算含量。结果见表 3, 表明方法重复性良好。

表1 15批热炎宁合剂指纹图谱共有峰相对峰面积

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15
1	0.008	0.009	0.009	0.008	0.007	0.008	0.005	0.006	0.007	0.009	0.008	0.007	0.008	0.007	0.007
2	0.068	0.061	0.069	0.063	0.059	0.066	0.064	0.063	0.065	0.064	0.064	0.063	0.060	0.062	0.058
3	0.013	0.013	0.050	0.016	0.012	0.011	0.012	0.019	0.017	0.017	0.012	0.015	0.016	0.012	0.014
4	0.052	0.054	0.052	0.052	0.059	0.058	0.053	0.054	0.055	0.056	0.057	0.052	0.051	0.059	0.057
5	0.151	0.152	0.151	0.154	0.153	0.158	0.152	0.159	0.154	0.151	0.153	0.152	0.155	0.151	0.153
6	0.078	0.074	0.072	0.071	0.076	0.073	0.071	0.070	0.075	0.076	0.075	0.077	0.069	0.072	0.075
7	0.056	0.058	0.052	0.054	0.051	0.053	0.052	0.056	0.056	0.057	0.052	0.051	0.056	0.058	0.059
8	0.029	0.027	0.028	0.021	0.020	0.023	0.025	0.024	0.025	0.022	0.02	0.026	0.024	0.026	0.021
9	0.018	0.019	0.018	0.018	0.018	0.020	0.019	0.017	0.018	0.017	0.017	0.016	0.018	0.018	0.017
10	0.013	0.013	0.012	0.013	0.013	0.012	0.012	0.014	0.012	0.014	0.012	0.013	0.013	0.013	0.015
11	0.018	0.018	0.018	0.014	0.017	0.016	0.018	0.017	0.016	0.016	0.017	0.017	0.017	0.16	0.017
12	0.008	0.008	0.008	0.005	0.006	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.009	0.008	0.007	0.008	0.008
13	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
14	0.126	0.128	0.124	0.126	0.125	0.125	0.123	0.124	0.124	0.126	0.125	0.125	0.127	0.128	0.125
15	0.124	0.122	0.123	0.122	0.122	0.121	0.121	0.120	0.123	0.120	0.125	0.126	0.122	0.124	0.122
16	0.036	0.036	0.036	0.032	0.035	0.036	0.031	0.035	0.035	0.036	0.033	0.034	0.037	0.036	0.034
17	0.041	0.044	0.042	0.045	0.041	0.043	0.044	0.042	0.045	0.041	0.044	0.041	0.041	0.042	0.044
18	0.037	0.037	0.036	0.039	0.035	0.036	0.036	0.038	0.034	0.031	0.032	0.034	0.034	0.035	0.034
19	0.015	0.016	0.014	0.014	0.014	0.017	0.015	0.015	0.015	0.013	0.014	0.015	0.016	0.014	0.017
20	0.022	0.021	0.023	0.024	0.023	0.025	0.026	0.024	0.024	0.023	0.026	0.025	0.021	0.020	0.23
21	0.198	0.201	0.203	0.199	0.197	0.192	0.203	0.204	0.203	0.202	0.198	0.198	0.202	0.203	0.201
22	0.008	0.007	0.007	0.008	0.008	0.004	0.009	0.006	0.008	0.008	0.008	0.007	0.007	0.008	0.008
23	0.020	0.023	0.021	0.021	0.024	0.02	0.02	0.021	0.020	0.023	0.022	0.022	0.021	0.023	0.021
24	0.031	0.031	0.032	0.031	0.032	0.033	0.032	0.032	0.032	0.030	0.031	0.035	0.031	0.031	0.032
25	0.007	0.007	0.006	0.006	0.007	0.007	0.005	0.006	0.006	0.006	0.007	0.007	0.007	0.008	0.007

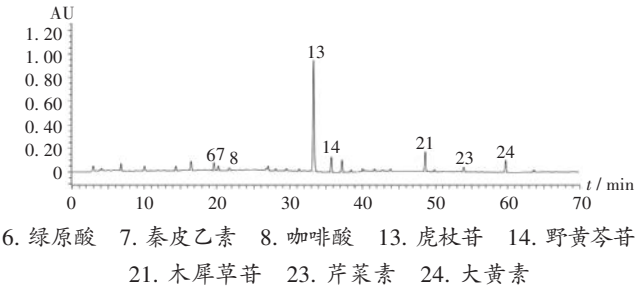


图4 供试品溶液高效液相色谱图

6. Chlorogenic acid 7. Aesculetin 8. Caffeic acid 13. Polydatin
14. Scutellarin 21. Luteolin 23. Apigenin 24. Emodin

Fig. 4 HPLC chromatogram of test solution

加样回收率试验:精密量取已知含量样品(编号S1) 5 mL,共9份,分为3组,分别精密加入每1 mL含绿原酸0.256 mg、秦皮乙素0.456 mg、咖啡酸0.150 mg、虎杖苷6.454 mg、野黄芩苷0.936 mg、木犀草素0.606 mg、芹菜素0.296 mg、大黄素0.452 mg的混合对照品溶液2, 2.5, 3 mL,按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,记录峰面积并计算加样回收率。结

表2 线性关系及检测限、定量限考察结果

Tab.2 Results of the linear relationship investigation, LOD and LOQ

待测成分	回归方程	r	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	检测限 ($\mu\text{g/mL}$)	定量限 ($\mu\text{g/mL}$)
绿原酸	$Y_1 = 1.69 \times 10^3 X_1 + 2.31 \times 10^2$	0.999 8	0.21~3.38	0.005 1	0.017 0
秦皮乙素	$Y_2 = 2.63 \times 10^3 X_2 + 1.09 \times 10^2$	0.999 1	0.38~6.02	0.003 2	0.013 0
咖啡酸	$Y_3 = 5.46 \times 10^3 X_3 + 2.19 \times 10^2$	0.999 3	0.09~1.50	0.002 6	0.009 4
虎杖苷	$Y_4 = 3.30 \times 10^3 X_4 - 2.63 \times 10^2$	0.999 5	5.32~85.19	0.002 0	0.006 1
野黄芩苷	$Y_5 = 2.86 \times 10^3 X_5 + 2.97 \times 10^2$	0.999 5	0.77~12.35	0.006 1	0.019 0
木犀草素	$Y_6 = 6.94 \times 10^3 X_6 - 1.26 \times 10^2$	0.999 6	0.50~8.00	0.001 2	0.003 9
芹菜素	$Y_7 = 2.24 \times 10^3 X_7 + 4.54 \times 10^2$	0.999 7	0.24~3.91	0.003 2	0.010 0
大黄素	$Y_8 = 1.45 \times 10^3 X_8 + 1.92 \times 10^2$	0.999 3	0.37~5.97	0.002 1	0.007 4

果见表3。

2.4.2 样品含量测定

取15批样品适量,按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,平行3次,记录峰面积并计算含量,结果见表4。

表3 精密度、稳定性、重复性及加样回收试验结果

Tab. 3 Results of the precision, stability, repeatability tests and the recovery test

待测成分	精密度试验	稳定性试验	重复性试验		加样回收试验	
	RSD(% , n = 6)	RSD(% , n = 6)	含量(mg / mL)	RSD(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
绿原酸	0.36	0.99	0.128	0.92	101.31	1.12
秦皮乙素	0.28	0.81	0.228	0.28	100.63	1.63
咖啡酸	0.41	1.07	0.075	0.63	99.52	1.57
虎杖苷	0.72	1.01	3.227	0.52	100.99	0.99
野黄芩苷	0.53	0.63	0.468	0.88	104.36	1.21
木犀草素	0.24	1.45	0.303	0.63	97.36	1.35
芹菜素	0.31	1.26	0.148	0.59	100.05	1.39
大黄素	0.60	0.89	0.226	0.64	96.69	1.06

表4 15批热炎宁合剂中8个成分含量测定结果(mg / mL, n = 3)

Tab. 4 Results of content determination of eight components in batches of Reyanning Mixture (mg / mL, n = 3)

编号	绿原酸	秦皮乙素	咖啡酸	虎杖苷	野黄芩苷	木犀草素	芹菜素	大黄素
S1	0.128	0.228	0.075	3.227	0.468	0.303	0.148	0.226
S2	0.131	0.204	0.124	3.415	0.519	0.411	0.182	0.279
S3	0.103	0.261	0.041	3.026	0.354	0.386	0.244	0.162
S4	0.124	0.226	0.096	3.821	0.433	0.337	0.178	0.189
S5	0.135	0.234	0.117	3.219	0.662	0.412	0.132	0.203
S6	0.132	0.289	0.091	3.221	0.491	0.205	0.216	0.284
S7	0.109	0.225	0.069	3.331	0.629	0.496	0.262	0.244
S8	0.124	0.257	0.124	3.024	0.413	0.372	0.156	0.153
S9	0.128	0.246	0.086	3.316	0.365	0.321	0.128	0.179
S10	0.130	0.215	0.117	3.220	0.511	0.405	0.179	0.204
S11	0.129	0.216	0.075	3.417	0.606	0.359	0.224	0.236
S12	0.119	0.282	0.054	3.124	0.429	0.334	0.238	0.287
S13	0.125	0.274	0.063	3.706	0.571	0.412	0.176	0.316
S14	0.131	0.210	0.083	3.519	0.353	0.399	0.161	0.155
S15	0.147	0.223	0.079	3.226	0.496	0.371	0.205	0.239
$\bar{X}$	0.126	0.239	0.086	3.321	0.487	0.368	0.189	0.224

3 讨论

3.1 指标成分

热炎宁合剂能有效改善人型冠状病毒肺炎病毒袭肺证模型小鼠的各项指标^[7-9]。其于2020年2月1日入选《陕西省新冠病毒感染的肺炎中医药治疗方案(试行第二版)》^[10],作为预防和治疗新型冠状病毒肺炎轻、重症用药。方中蒲公英味苦、甘,性寒,苦以降泄,甘以解毒,寒能清热兼散滞气,为清热解毒、消痈散结之佳品,以绿原酸、咖啡酸等酚酸类及芹菜素、木犀草素等黄酮类成分为主要活性成分^[11];虎杖清热解毒,降泄肝胆湿热,泻下通便,以虎杖苷为代表的二苯乙烯类及以大黄素为代表的蒽醌类是其主要药效成分^[12];败酱草清热解毒、消痈排脓、祛瘀止痛,以秦皮乙素为代表的香豆素类及芹菜素、木犀草素等黄酮类成分为主要活

性成分^[13];半枝莲清热解毒、利水消肿,黄芩能清热燥湿和泻火解毒,以野黄芩苷为代表的黄酮类成分为其主要药效成分^[14]。因此本研究中选择上述8个成分作为热炎宁合剂的定量分析指标。

3.2 检测波长选择

本研究中采用DAD检测器全波长扫描样品溶液,结果绿原酸、秦皮乙素、咖啡酸、虎杖苷、野黄芩苷、木犀草素、芹菜素的^{max}吸收波长分别为325, 323, 232, 306, 335, 349, 338 nm, 大黄素^{max}吸收波长为254 nm,以指纹图谱基线平稳、色谱峰较多,各色谱峰间分离效果好为指标,使用仪器固定波长变换程序功能经多次试验确定采用325, 254 nm分段波长法作为样品指纹图谱和8个有效成分含量测定的采集波长。

3.3 色谱条件

在流动相选择时,重点比较了乙腈-水溶液(添加不同比例磷酸)、甲醇-水溶液(添加不同比例磷酸)对指纹图谱和8个成分含量测定的影响。结果发现,乙腈-0.05%磷酸水溶液作为流动相系统时洗脱效果较好;同时比较了不同流速(0.8, 1.0, 1.2, 1.5 mL/min)、不同体积流量(5, 10, 20 μ L)及不同柱温(20, 25, 30, 35 $^{\circ}$ C)对试验结果的影响,结果发现,流速1.0 mL/min、进样量10 μ L、柱温30 $^{\circ}$ C为最佳条件。

3.4 样品提取方法

本研究中分别考察了不同比例甲醇水溶液和乙醇水溶液作为提取溶剂,超声和加热回流两种提取方法,以及不同提取时间(30, 45, 60 min)对8个指标成分和指纹图谱的影响。结果发现,70%甲醇溶液超声处理30 min为最佳提取方法。

3.5 含量测定结果分析

2020年版《中国药典(一部)》规定热炎宁合剂“每1 mL含虎杖以大黄素计,不得少于0.15 mg”“每1 mL含虎杖以虎杖苷计,不得少于0.35 mg”,本研究中15批样品大黄素含量为0.214~0.236 mg/mL,虎杖苷含量为3.206~3.316 mg/mL,均符合限量标准。

综上所述,本研究中建立了热炎宁合剂HPLC法指纹图谱及8个有效成分定量分析方法,精密度、重复性、稳定性均良好,能系统评价制剂质量,实现多成分同时定量分析。

参考文献

[1] 吕健,杨翠,王连心,等.热炎宁合剂治疗急性扁桃腺炎的随机对照双盲多中心试验[J].中国中药杂志,2020,45(14):3282-3291.
[2] 王海,褚亚军,刘英副,等.热炎宁合剂治疗小儿急性上呼吸道感染多中心临床研究[J].天津中医药,2019,36(2):141-144.
[3] 张惠,段捷华.抗病毒口服液联合热炎宁颗粒治疗疱疹性咽峡炎的疗效观察[J].临床合理用药杂志,2018,11(31):32-33.
[4] 杨伟琴.头孢他啶联合热炎宁治疗小儿肺炎的临床效果观