

超高效液相色谱法分析蒲地蓝消炎口服液的化学成分

陈世雄¹ 翟 青¹ 袁平川² 柳春燕²

(1 安徽省芜湖市第二人民医院药剂科, 芜湖, 241000; 2 皖南医学院药物研发中心, 芜湖, 241000)

摘要 目的:通过超高效液相色谱法分析蒲地蓝消炎口服液的化学成分。方法:采用 Waters C₁₈ 色谱柱(型号为 Xbridge), 该色谱柱填料颗粒直径为 5 μm, 色谱柱的长度为 250 mm, 色谱柱内径为 4.6 mm, 柱温 30 ℃。进样量为 10 μL, 流动相采用乙腈(A相)和 0.2% 磷酸水溶液(B相)的二元体系进行梯度洗脱, 超高效液相色谱法方法严谨性考察, 包括线性关系、精密度、重复性、稳定性和加样回收试验考察, 基于超高效液相色谱法方法具有严谨性的前提下, 对蒲地蓝消炎口服液中成分的含量进行测定。结果:1) 线性考察结果显示回归方程、相关系数和线性范围分别是:结果表明黄芩苷在 90.59 ~ 1 449.36 μg 范围内与峰面积呈良好的线性关系, 其回归方程为 $Y = 17\,465X + 22\,879$ ($r = 0.999\,9$); 菊苣酸得回归方程 $Y = 39\,728X + 15\,520$ ($r = 0.999\,8$), 在 5.48 ~ 54.85 μg 范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系。2) 精密度的试验结果显示, 黄芩苷峰面积的 RSD = 0.18%, 菊苣酸峰面积的 RSD = 0.16%, 结果表明超高效液相仪器精密度良好。3) 稳定性试验结果显示黄芩苷峰面积的 RSD = 0.96%, 菊苣酸峰面积的 RSD = 0.87%, 符合色谱峰相对峰面积的 RSD < 3% 则说明稳定性良好, 提示蒲地蓝消炎口服液供试品溶液 24 h 内稳定性良好。4) 重复性试验研究结果显示黄芩苷峰面积的 RSD = 0.99%, 菊苣酸峰面积的 RSD = 1.06%, 符合色谱峰相对峰面积的 RSD < 3% 表示重复性良好, 提示蒲地蓝消炎口服液供试品溶液的重复性良好。5) 加样回收试验结果显示黄芩苷对照品溶液、菊苣酸对照品溶液平均回收率分别为 105.887%、99.033%, RSD 分别为 1.03%、1.11%, 提示高相液相检测方法所测加样回收率结果可靠。6) 3 个不同批次的蒲地蓝消炎口服液中黄芩苷成分和菊苣酸成分的含量差异无统计学意义, 另外 3 批蒲地蓝消炎口服液的相似度检测结果也比较相近。结论:超高效液相色谱法的操作简单, 方法严谨性强, 可作为蒲地蓝消炎口服液质量控制的有效方法, 而不同批次蒲地蓝消炎口服液中有效成分含量未见明显差异, 且相似度高。

关键词 超高效液相色谱法; 蒲地蓝消炎口服液; 黄芩苷; 菊苣酸; 精密度; 稳定性; 重复性; 专属性

Analysis of the Chemical Composition of Pudilan Xiaoyan Oral Liquid by Ultra High Performance Liquid Chromatography

Chen Shixiong¹, Zhai Qing¹, Yuan Pingchuan², Liu Chunyan²

(1 Department of Pharmacy, The Second People's Hospital of Wuhu, Wuhu 241000, China; 2 Drug Research
& Development Center, Wannan Medical College, Wuhu 24100, China)

Abstract Objective: To analyze the chemical composition of Pudilan Xiaoyan oral liquid by ultra-high performance liquid chromatography. **Methods:** Waters C₁₈ column (model Xbridge) was used. The diameter of the column filler particle was 5 μm, and the length of the column was 250 mm. The inner diameter of the column was 4.6 mm, and the temperature of the column was 30 ℃. The sample intake was 10 μL. The flow phase used a binary system of acetonitrile (phase A) and 0.2 % phosphate aqueous solution (phase B) for gradient elution. The ultra-high performance liquid chromatography method was rigorous, including linear relationship, precision, repeatability, stability, and sample recovery. Based on the rigorous method of ultra-high performance liquid chromatography, the content of Pudilan Xiaoyan oral liquid was determined. **Results:** 1) The linear results showed that the regression equation, the correlation coefficient, and the linear range were: the results showed that baicalin had a good linear relationship with the peak area in the range of 90.59 to 1 449.36 μg. Its regression equation was $Y = 17\,465 X + 22\,879$ ($r = 0.999\,9$); The regression equation $Y = 39\,728X + 15\,520$ ($r = 0.999\,8$) of Chicory acid had a good linear relationship with the peak area integral value in the range of 5.48 to 54.85 μg. 2) The results of the precision test showed that the RSD = 0.18 in the peak area and the RSD = 0.16% in the peak area of Chicory acid. The results showed that the ultra-high liquid phase instrument had good precision. 3) The stability test results showed that the RSD = 0.96 in the peak area of Astragaloside, and the RSD = 0.87 % in the peak area of Chicory acid, which was in line with the RSD < 3% in the peak area of the chromatographic peak, which showed good stability, suggesting that the stability of the Pudilan Xiaoyan oral liquid for the test solution was good within 24 h. 4) The results of repetitive experiments showed that the RSD = 0.99 in the peak area of scutellaria, the RSD = 1.06 % in the peak area of Chicory, and the RSD < 3% in the relative peak area of the peak of the spectrum, which indicated good repeatability, suggesting that the Pudilan Xiaoyan oral liquid had good repeatability for trial solution. 5) The results of the sample recovery test showed that the average recovery rates

of baicalin reference solution and Chicory acid reference solution were 105.887 % and 99.033 % ,respectively ,and RSD was 1.03 % and 1.11 % ,respectively. It was suggested that the sample recovery rate measured by high phase liquid detection method was reliable.6) The content of baicalin and Chicory acid in 3 different batches of Pudilan Xiaoyan oral liquid was not significantly different ,and the similarity test results of three batches of Pudilan Xiaoyan oral liquid were similar. **Conclusion:** The high performance liquid chromatography (HPLC) method is simple and strict. It can be used as an effective method to control the quality of Pudilan Xiaoyan oral liquid ,but there is no significant difference in the content of active ingredients in different batches of Pudilan Xiaoyan oral liquid ,and the similarity is high.

Key Words Ultra-high performance liquid chromatography; Pudilan Xiaoyan oral liquid; Astragalin; Chicory acid; Precision; Stability; Repetition; Specificity

中图分类号:R284.1 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2019.04.011

蒲地蓝消炎口服液的药物组成主要有蒲公英、苦地丁、板蓝根、黄芩等 4 味中药,四味药经过现代化提取工艺制备而成中药口服制剂,具有清热解毒凉血,消肿散结利咽的功效,临床上对咽炎^[1]、扁桃体炎^[2]具有治疗效果,近来也有现代药理研究表明^[3-4],蒲地蓝消炎口服液具有抗菌、抗病毒、提高免疫力、抗炎、抗氧化等作用,对于“脾常不足”的小儿更适用,对小儿手足口病^[5-6]也具有良好的临床治疗效果。蒲地蓝消炎口服液方中有效成分众多,蒲公英为君药,专入肝经、胃经,善清泄热毒,朱丹溪指出;“蒲公英花味胃甘属土,入太阴阳明经”,不仅有利湿泄毒之功,可使热邪从小便而泄,但气性甘平,而不损脾土;而且蒲公英可去阳明之热兼可消肿散结,疏肝散滞。菊苣酸为方中君药蒲公英中的一种酚酸类化合物,集抗炎、抗菌、抗病毒、解热和促免疫等作用于一体^[7]。黄芩既能消肿,又能入血分而清热解毒,尤善泻上中焦之热,黄芩可入肺胃经,在蒲地蓝消炎口服液中可作为引经药引药直达病所,其中含量较高的活性成分为黄芩苷,具有抗菌、抗病毒、清除氧自由基、解热、镇静、调节免疫等作用^[8];2015 年版《中华人民共和国药典》中记载了方法对产品中的黄芩苷、菊苣酸的含量进行了测定^[9],该方法由于检测耗时较长,不利于生产过程中对产品进行质量控制,本文采用超超高效液相色谱法对蒲地蓝消炎口服液进行质量评价与控制,以缩短中间体检测时间,提高检测效率。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Waters 超高效液相(型号:2695 型),其中 Waters 氙灯(PDA,型号:2998 型)。购买于上海卓精电子科技有限公司的电子分析天平(型号:BSA-220 型)和超声波清洗器(型号:AS3120);购买于上海摩速科学器材有限公司的超纯水系统(型号:Milli-Q 型)。

1.2 试药 于中国药品生物制品检定所购买黄芩

苷对照品和菊苣酸对照品,批号分别为 110715-201016、111752-200902。广州丹旺贸易有限公司购买色谱纯乙腈和甲醇,批号分别为:A998-4、67-56-1。于山东佰仟化工有限公司购买的磷酸分析纯(AR 级,批号:7664-38-2)。

1.3 分析药品 蒲地蓝消炎口服液由济川药业集团有限公司,国药准字 Z20030095,选择 1311263、1311218、1311285,3 个不同批次。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 Waters C₁₈ 色谱柱(型号为 Xbridge),该色谱柱填料颗粒直径为 5 μm,色谱柱的长度为 250 mm,色谱柱内径为 4.6 mm,柱温 30 ℃。进样量为 10 μL,流动相采用乙腈(A 相)和 0.2% 磷酸水溶液(B 相)的二元体系进行梯度洗脱,具体的梯度洗脱程序和流速见表 1。

表 1 梯度洗脱程序(1.0)

时间(min)	流速(mL/min)
0.0	1.1
9.5	1.1
10.0	1.6
22.0	1.6
22.5	1.1
23.0	1.1

2.2 对照品溶液配制 精密称取 48.18 mg 黄芩苷对照品,放置于 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度定容,充分摇晃均匀,即得已知浓度黄芩苷对照品溶液;精密称取 13.7 mg 菊苣酸对照品,放置于 100 mL 量瓶中,加 20 mL 乙腈和 80 mL 水定容并,充分摇晃均匀,既得已知浓度菊苣酸对照品溶液。

2.3 供试品溶液配制 精密量取 5 mL 蒲地蓝消炎口服液,放置于 50 mL 量瓶中,加 12.5 mL 乙腈和 37.5 mL 水定容,摇匀,即得蒲地蓝消炎口服液供试品溶液。

2.4 专属性试验 取 10 μL 黄芩苷对照品溶液、菊

茛菪酸对照品溶液,根据 2.1 的色谱条件进行专属性试验,结果显示黄芩苷对照品溶液菊茛菪酸对照品溶液具有良好的专属性。

2.5 线性关系考察 精密量取已知浓度黄芩苷对照品溶液 0.5 mL、1 mL、2 mL、4 mL、8 mL,分别置 10 mL 量瓶中,用甲醇依次稀释成不同浓度的黄芩苷对照品溶液,按照“2.1”项下色谱方法进样。以峰面积积分值(Y)的自然对数为纵坐标,以进样量的自然对数(X)为横坐标,进行线性回归。精密量取已知浓度菊茛菪酸对照品溶液 10 mL、7.5 mL、4 mL、2 mL、1 mL,分别置 25 mL 量瓶中,用比例为 20: 80 乙腈和水依次稀释成不同浓度的菊茛菪酸对照品溶液,方法同黄芩苷进行线性回归。见表 2。

表 2 对照品的线性关系考察结果

成分	回归方程	相关系数	线性范围(μg)
黄芩苷	$Y = 17\ 465X + 22\ 879$	0.999 9	90.59 ~ 1 449.36
菊茛菪酸	$Y = 39\ 728X + 15\ 520$	0.999 8	5.48 ~ 54.85

2.6 精密度试验 精密吸取同一蒲地蓝消炎口服液供试品溶液,在 2.1 色谱条件和室温仪器等相同的情况下,连续进样 6 次,记录峰面积,结果显示,黄芩苷峰面积的相对标准偏差(Relative Standard Deviation, RSD) = 0.18%,菊茛菪酸峰面积的 RSD = 0.16%,结果表明超高效液相仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验 取同一批号供试品溶液以检验供试品溶液的稳定性,分别室温放置 0、3、6、9、12、18、24 h 后进行 HPLC 检测,并记录峰面积,本研究稳定性结果显示黄芩苷峰面积的 RSD = 0.96%,菊茛菪酸峰面积的 RSD = 0.87%,符合色谱峰相对峰面积的 RSD < 3% 则说明稳定性良好,提示蒲地蓝消炎口服液供试品溶液 24 h 内稳定性良好。见表 3、表 4。

表 3 黄芩苷稳定性相似度评价结果

指标	稳定性 1	稳定性 2	稳定性 3	稳定性 4	稳定性 5	平均 值	RSD (%)
稳定性 1	1.000	0.997	0.998	0.999	0.997	0.997	0.94
稳定性 2	0.997	1.000	0.995	0.997	0.998	0.999	0.96
稳定性 3	0.997	0.999	1.000	1.000	0.999	1.000	0.98
稳定性 4	0.999	0.999	0.995	0.999	1.000	0.999	1.06
稳定性 5	0.997	0.996	1.000	1.000	0.997	0.999	1.02

2.8 重复性试验 精密量取 6 份同一批号供试品溶液,进行短时间内的 HPLC 连续重复性测试,连续进样,并根据已知浓度的黄芩苷和菊茛菪酸,本研究结果显黄芩苷峰面积的 RSD = 0.99%,菊茛菪酸峰面积的 RSD = 1.06%,符合色谱峰相对峰面积的 RSD <

3% 表示重复性良好,提示蒲地蓝消炎口服液供试品溶液的重复性良好。

表 4 菊茛菪酸稳定性相似度评价结果

指标	稳定性 1	稳定性 2	稳定性 3	稳定性 4	稳定性 5	平均 值	RSD (%)
稳定性 1	1.000	0.997	0.996	0.999	0.997	0.997	0.85
稳定性 2	0.997	1.000	0.996	0.997	0.999	0.999	1.88
稳定性 3	0.997	0.999	1.000	1.000	0.998	1.000	0.83
稳定性 4	0.999	0.999	0.999	0.996	1.000	0.999	0.89
稳定性 5	0.997	0.999	1.000	1.000	0.997	0.995	0.82

2.9 回收率试验 精密吸取已知含量的蒲地蓝消炎口服液供试品溶液 6 份,每份均为 5 mL,分别置于 50 mL 容量瓶中,每一份均精密加入等量已知浓度的黄芩苷对照品溶液、菊茛菪酸对照品溶液,加入超纯水稀释至刻度定容混合均匀后,进行加样回收试验的检测,根据 2.1 的色谱条件进行检测并计算加样回收率。结果显示黄芩苷对照品溶液、菊茛菪酸对照品溶液平均回收率分别为 105.887%、99.033%,RSD 分别为 1.03%、1.11%,提示高相液相检测方法所测加样回收率结果可靠。见表 5。

表 5 加样回收试验结果

成分	样品中含量 (mg)	添加量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
黄芩苷	1.171	0.943	1.859	111.649	113.271	
	1.171	0.943	1.862	114.404		
	1.171	0.943	1.86	113.76		
	1.484	0.269	0.377	100.899	100.357	
	1.484	0.269	0.375	98.642		1.03
	1.484	0.269	0.378	101.53		
	0.67	0.556	0.975	103.902	104.033	
	0.67	0.556	0.973	104.08		
	0.67	0.556	0.976	104.116		
	0.524	0.429	0.781	99.079	99.117	
菊茛菪酸	0.524	0.429	0.776	96.977		
	0.524	0.429	0.787	101.294		
	0.465	0.386	0.679	99.086	99.147	
	0.465	0.386	0.677	98.463		1.11
	0.465	0.386	0.681	99.892		
	0.406	0.342	0.577	99.582	98.834	
	0.406	0.342	0.574	97.714		
	0.406	0.342	0.576	99.205		

2.10 样品检测结果 取 1311263、1311218、1311285 等 3 个不同批次号的蒲地蓝消炎口服液,根据 2.2 供试品溶液配制,每批样品都根据 2.1 的色谱条件进行重复测试 3 次,蒲地蓝消炎口服液中成分的含量取 3 次测定的平均值,结果显示如表 5 所示,3 个不同批次的蒲地蓝消炎口服液中黄芩苷成分和菊茛菪酸成分的含量未见明显差异。另外 3 批蒲地蓝消炎口服液的相似度检测结果也比较相近。见表 6。

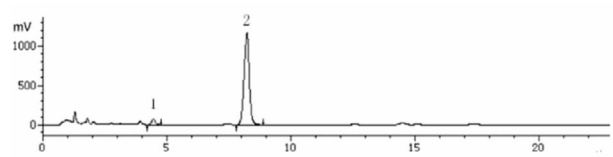


图 1 蒲地蓝消炎口服液超高效液相色谱图

注:1. 菊苣酸,2. 黄芩苷

表 6 3 个不同批次蒲地蓝消炎口服液中成分的含量和不同批次相似度 (mg/mL)

成分	批次号 1311263	批次号 1311218	批次号 1311285
黄芩苷	0.264	0.306	0.276
菊苣酸	10.797	10.696	10.728
相似度	0.996	0.998	0.997

3 讨论

蒲地蓝消炎口服液的超高效液相色谱法检测的过程中,分别采用紫外-可见分光光度计及二极管阵列检测器在 210~400 nm 波长范围内分析黄芩苷对照品和菊苣酸对照品和蒲地蓝消炎口服液供试品溶液,发现当检测波长是 326 nm 时菊苣酸有最大吸收峰,而检测波长为 278 nm 和 315 nm 时,黄芩苷均可见最大吸收峰,为了同时检测到高含量的黄芩苷和菊苣酸,参阅文献得^[10],由于黄芩苷在蒲地蓝消炎口服液样品中含量较高,而菊苣酸在蒲地蓝消炎口服液样品中含量偏低,有研究表明在 326 nm 处测定黄芩苷与原方法选定的 315 nm 测定结果基本一致。因此为提高菊苣酸的检测灵敏度,只能选择 326 nm 波长,因为在这个波长处可同时获得 2 种成分最大吸收峰并测定 2 种成分的含量。

在蒲地蓝消炎口服液高效液相检测时间方面,根据《中华人民共和国药典》2015 年版中蒲地蓝消炎口服液关于黄芩(黄芩苷)的基础检测指标不变的同时,增加了其中蒲公英(菊苣酸)含量指标的检测,但在《中华人民共和国药典》中蒲公英(菊苣酸)的检测采用的是长达 65 min 的单针进样分析。因此,仅在蒲地蓝消炎口服液配制液的检测过程,单批次的 4 针检测时间就长达 260 min^[11-13],这大大的增加了产品的制备和检测的周期,所以本研究使用的检测方法对此进行了优化,可同时对黄芩苷、菊苣酸含量进行检测分析,还大大的缩短了检测时间,故而有利于减少蒲地蓝消炎口服液中间体配置液在待检测时的污染风险,降低生产、分析成本,提高产品生产的控制力度。

研究建立的超高效液相色谱法同时测定黄芩苷及菊苣酸的含量,操作简便,结果准确,重复性好,适用于蒲地蓝消炎口服液生产过程中的质量控制。本

文以 3 批蒲地蓝消炎口服液的超高效液相色谱图建立共有模式,相似度>0.99,采用图谱聚类分析方法,所有样品聚为一类,聚类趋势与相似度计算结果一致^[14],符合超高效液相色谱图要求,可以作为评价蒲地蓝消炎口服液质量的方法。中药超高效液相色谱法技术是中药质量控制的成熟方法,中药复方成分多、靶点多,对具有多种有效成分,且相互间可发生直接影响,单一或几个成分不能体现整体复方的特点,在中成药生产、检验和研究过程中起到重要作用^[15-16]。本文采用超高效液相色谱法对蒲地蓝消炎口服液质量进行评价,从整体上判断和控制蒲地蓝消炎口服液质量,在控制工艺稳定性、确保不同批次产品质量稳定方面具有现实意义。

参考文献

[1]周晓玲,李根,傅慧敏.蒲地蓝消炎口服液药理作用及儿科临床应用研究进展[J].四川生理科学杂志,2019,12(1):1-7.

[2]杜洪洪,胡思源,钟成梁,等.蒲地蓝消炎口服液不同剂量治疗小儿急性咽-扁桃体炎肺胃实热证的多中心临床研究[J].中草药,2017,48(4):753-759.

[3]羊慧丹.开喉剑喷雾剂联合蒲地蓝消炎口服液治疗小儿疱疹性咽峡炎效果观察[J].中国乡村医药,2017,76(22):44-45.

[4]马爱霞,管欣,田磊,等.疏风解毒胶囊和蒲地蓝消炎口服液治疗成人急性上呼吸道感染的药物经济学评价[J].中国医院药学杂志,2018,38(5):523-528.

[5]张钧侠.蒲地蓝消炎口服液治疗小儿手足口病临床观察及成本-效果分析[J].中国中西医结合儿科学,2018,10(2):143-146.

[6]张钧侠.蒲地蓝消炎口服液治疗小儿手足口病临床观察及成本-效果分析[J].中国中西医结合儿科学,2018,10(2):143-146.

[7]杨依霏,马丽娜,张广平,等.蒲地蓝消炎口服液对免疫低下小鼠免疫功能的影响[J].中药药理与临床,2018,41(1):140-142.

[8]蔡秋晗,胡思源,刘颖,等.儿童清咽解热口服液治疗小儿急性咽(肺胃实热证)的药物经济学评价[J].药物评价研究,2018,41(4):519-526.

[9]程阳阳,于泳泳,林灵,等.《中国药典》收载民族药成方制剂的统计与分析[J].中成药,2017,39(4):804-808.

[10]王立立,张云,孙玲.香附丸中 4 种成分的多波长 HPLC 法测定[J].中国医药工业杂志,2017,48(12):1796-1799.

[11]车珂科,杨帆,邓开英.HPLC 法测定养阴合剂中黄芩苷的含量[J].中国药房,2016,27(24):3410-3412.

[12]张丁丁.2005 年版《中国药典》一部中的一些问题[J].中国药品标准,2006,7(5):15-17.

[13]王伟,闫翠起,赵曼茜,等.DTOPSIS 法在黄芩商品药材质量综合评价中的应用[J].华西药学杂志,2015,30(1):105-108.

[14]唐德智.HPLC 法测定复方黄芩片中 6 个成分的含量[J].药物分析杂志,2016,26(10):1870-1874.

[15]刘燕,兰瑞容,兑靖冬,等.HPLC 法同时测定蒲公英中单咖啡酰酒石酸、绿原酸、咖啡酸、菊苣酸的含量[J].中国药师,2017,20(9):1677-1679.

[16]胡君萍,迪丽拜尔·马木提,李渊,等.UPLC 同时测定维药毛茛苣和菊苣中 5 种化学成分的含量[J].中国实验方剂学杂志,2014,39(17):65-68.