doi:10.3969 / j.issn.1006 - 4931.2022.06.020

柴银口服液超高效液相色谱指纹图谱及 6 组分含量测定研究*

关永霞[1,2],庄会芳[1,2],袁晓梅[1,2],金　凤[1,2],庄建林[1,2],孙晓兰[1,2],白　雪[1,2],范建伟[1,2△]

(1. 鲁南厚普制药有限公司,山东 临沂　276006;　2. 鲁南制药集团股份有限公司·中药制药共性技术国家重点实验室,山东 临沂　276006)

摘要:目的　建立柴银口服液的超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱,并同时测定制剂中 6 个成分的含量。**方法**　色谱柱为 Waters Cortecs®C_{18}柱(50 mm×4. 6 mm,2. 7 μm),流动相为乙腈 - 0. 1% 磷酸水溶液(梯度洗脱),检测波长为 230 nm,流速为 0. 4~0. 6 mL / min,柱温为 35 ℃。以葛根素峰为参照峰,建立 24 批样品的 UPLC 图谱,采用"中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)"进行相似度评价,确定共有峰。**结果**　24 批样品 UPLC 图谱有 30 个共有峰,相似度均 > 0. 97。葛根素、大豆苷、连翘酯苷 A、黄芩苷、连翘苷、汉黄芩苷质量浓度分别在 50. 55~505. 46 μg / mL(r = 0. 999 7)、11. 20~112. 04 μg / mL(r = 0. 999 6)、52. 80~528. 02 μg / mL(r = 0. 999 5)、149. 01~1 490. 08 μg / mL(r = 0. 999 6)、12. 41~124. 10 μg / mL(r = 0. 999 6)、39. 23~392. 26 μg / mL(r = 0. 999 7)范围内与峰面积线性关系良好;精密度、稳定性、重复性试验的 *RSD* 均小于 2. 0%;平均加样回收率分别为 98. 98%,98. 51%,98. 45%,98. 43%,98. 10%,98. 86%,*RSD* 分别为 0. 73%,1. 07%,0. 91%,0. 82%,1. 11%,0. 73%(n = 6)。**结论**　所建立的 UPLC 指纹图谱结合含量测定,能更全面地表征柴银口服液的产品质量。

关键词:柴银口服液;超高效液相色谱法;指纹图谱;含量测定

中图分类号:R932;R284.1;R286.0　　**文献标志码:A**　　**文章编号:1006 - 4931(2022)06 - 0081 - 05**

UPLC Fingerprint and Content Determination of Six Components in Chaiyin Oral Liquid

GUAN Yongxia[1,2], ZHUANG Huifang[1,2], YUAN Xiaomei[1,2], JIN Feng[1,2], ZHUANG Jianlin[1,2], SUN Xiaolan[1,2], BAI Xue[1,2], FAN Jianwei[1,2]

(1. Lunan Hope Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi, Shandong, China　276006;　2. Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., State Key Laboratory of Generic Manufacture Technology of Chinese Traditional Medicine, Linyi, Shandong, China　276006)

Abstract: Objective　To establish the fingerprint of Chaiyin Oral Liquid by ultra - high performance liquid chromatography (UPLC), and to simultaneously determine the contents of six components in the preparation. **Methods**　The chromatographic column was Waters Cortecs® C_{18} column (50 mm × 4. 6 mm, 2. 7 μm), the mobile phase was acetonitrile - 0. 1% phosphoric acid solution (gradient elution), the detection wavelength was 230 nm, the flow rate was 0. 4 - 0. 6 mL / min, and the column temperature was 35 ℃. The UPLC fingerprint of 24 batches of samples were established with puerarin peak as the reference peak, and The *Similarity Evaluation System* of *Chromatographic Fingerprints* of *Traditional Chinese Medicine* (Version 2012) was used for similarity evaluation to determine the common peaks. **Results**　There were 30 common peaks in the UPLC fingerprints of 24 batches of samples with the similarities all aboved 0. 97. The linear ranges of puerarin, daidzin, forsythoside A, baicalin, forsythin and wogonoside were 50. 55 - 505. 46 μg / mL (r = 0. 999 7), 11. 20 - 112. 04 μg / mL(r = 0. 999 6), 52. 80 - 528. 02 μg / mL(r = 0. 999 5), 149. 01 - 1 490. 08 μg / mL(r = 0. 999 6), 12. 41 - 124. 10 μg / mL(r = 0. 999 6), 39. 23 - 392. 26 μg / mL(r = 0. 999 7), respectively. The *RSD*s of precision, stability and repeatability tests were less than 2. 0%. The average recoveries of six components were 98. 98%, 98. 51%, 98. 45%, 98. 43%, 98. 10% and 98. 86% with *RSD*s of 0. 73%, 1. 07%, 0. 91%, 0. 82%, 1. 11% and 0. 73% (n = 6), respectively. **Conclusion**　The established UPLC fingerprint of content determination can more comprehensively characterize the product quality of Chaiyin Oral Liquid.

Key words: Chaiyin Oral Liquid; UPLC; fingerprint; content determination

柴银口服液源自《伤寒六书》中的柴葛解肌汤方和《温病条辨》中的银翘散方,由柴胡、金银花、黄芩、葛根、连翘等11味中药材组方,临床用于治疗上呼吸道感染(外感风热证),症见发热恶风、头痛、咽痛、汗出、鼻塞流涕、咳嗽、舌边尖红、苔薄黄[1]。该制剂现收载于2020年版《中国药典(一部)》,其标准分别对苦杏仁、薄荷、柴胡、连翘、青蒿、葛根进行定性鉴别,并采用高效液相色谱(HPLC)法测定黄芩苷含量[1],但未能全面反映和评价制剂的整体质量。基于中药化学物质群组成及其含量特征所建立的中药化学指纹图谱,能较全面地反映中药的整体质量,成为中药真实性鉴别、质量一致性评价和稳定性研究的可靠模式[2]。采用HPLC法建立柴银口服液的快速特征指纹图谱,但其分析时间过短,色谱峰及共有峰数量较少,图谱信息欠丰富[3]。本研

*基金项目:山东省重点研发计划(重大科技创新工程)项目[2020CXGC010505];山东省临沂市兰山区科技创新发展计划专项[2026]。

第一作者:关永霞,女,硕士,高级工程师,研究方向为中药制剂及其质量控制,(电子信箱)jmsgyx@163. com。

△通信作者:范建伟,男,硕士,高级工程师,研究方向为中药制剂及其质量控制,(电子信箱)lunanfanjianwei@163. com。

究中基于中药化学指纹图谱定性分析与主要药效成分定量测定结合的模式，采用超高效液相色谱（UPLC）法建立柴银口服液的指纹图谱，同时测定葛根中葛根素、大豆苷[4]，黄芩中黄芩苷、汉黄芩苷[5]，连翘中连翘苷、连翘酯苷A[6]6个成分的含量，旨在为全面控制和评价制剂质量提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters Acquity Arc型超高效液相色谱系统，包括PDA检测器、四元梯度泵、Empower色谱工作站（美国Waters公司）；XSR105DU/A型电子分析天平（瑞士Mettler Toledo公司，精度为十万分之一）；KS-5200DE型液晶超声波清洗器（昆山洁力美超声仪器有限公司）；Milli-Q EQ7000型超纯水仪（法国Merck公司）。

1.2 试药

柴银口服液（鲁南厚普制药有限公司，批号分别为05200081，05200091，05200101，05200171，05200191，05200211，05200231，05200251，05200261，05200271，05200281，05200441，05200451，05200461，05200471，05200481，05200491，05200501，05200511，05200521，05200531，05200541，05200551，05200561，依次编号为S1～S24）；葛根素对照品（批号为110752-201816，含量95.4%），大豆苷对照品（批号为111738-201904，含量93.4%），连翘酯苷A对照品（批号为111810-201707，含量97.2%），黄芩苷对照品（批号为110715-201821，含量95.4%），连翘苷对照品（批号为110821-201816，含量95.1%），汉黄芩苷对照品（批号为112002-201702，含量98.5%），均购自中国食品药品检定研究院；甲醇、乙腈均为色谱纯，其余试剂均为分析纯，水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：Waters Cortecs® C_{18}柱（50 mm×4.6 mm，2.7 μm）；流动相：乙腈（A）-0.1%磷酸水溶液（B），梯度洗脱（0～30 min时6%A→16%A，0.4 mL/min；30～40 min时16%A→28%A，0.4 mL/min；40～48 min，28%A→60%A，0.4→0.6 mL/min；48～55 min时60%A，0.6 mL/min；55～56 min时60%A→6%A，0.6→0.4 mL/min）；检测波长：230 nm；柱温：35 ℃；进样量：2 μL。

2.2 溶液制备

取对照品各适量，精密称定，置同一50 mL容量瓶中，加50%甲醇溶解并定容，制成每1 mL分别含葛根素、大豆苷、连翘酯苷A、黄芩苷、连翘苷、汉黄芩苷0.505 5，0.112 0，0.528 0，1.490 1，0.124 1，0.392 3 mg的混合对照品贮备液；精密量取5 mL，置10 mL容量瓶中，加50%甲醇定容，摇匀，即得每1 mL分别含葛根素、大豆苷、连翘酯苷A、黄芩苷、连翘苷、汉黄芩苷252.73，56.02，264.01，745.04，62.05，196.13 μg的混合对照品溶液。精密量取样品2 mL，置10 mL容量瓶中，加50%甲醇定容，摇匀，滤过，取续滤液，即得供试品溶液。按柴银口服液处方和工艺分别制备缺葛根、黄芩、连翘药材的阴性样品，按供试品溶液制备方法制备，即得阴性对照品溶液。

2.3 指纹图谱的建立

2.3.1 参照峰选择

取2.2项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各适量，按2.1项下色谱条件进样测定，记录色谱图，详见图1。结果葛根素峰（11号峰）的分离度好，保留时间适中，故选择以此为参照峰，标记为11（S）。

2.3.2 方法学考察

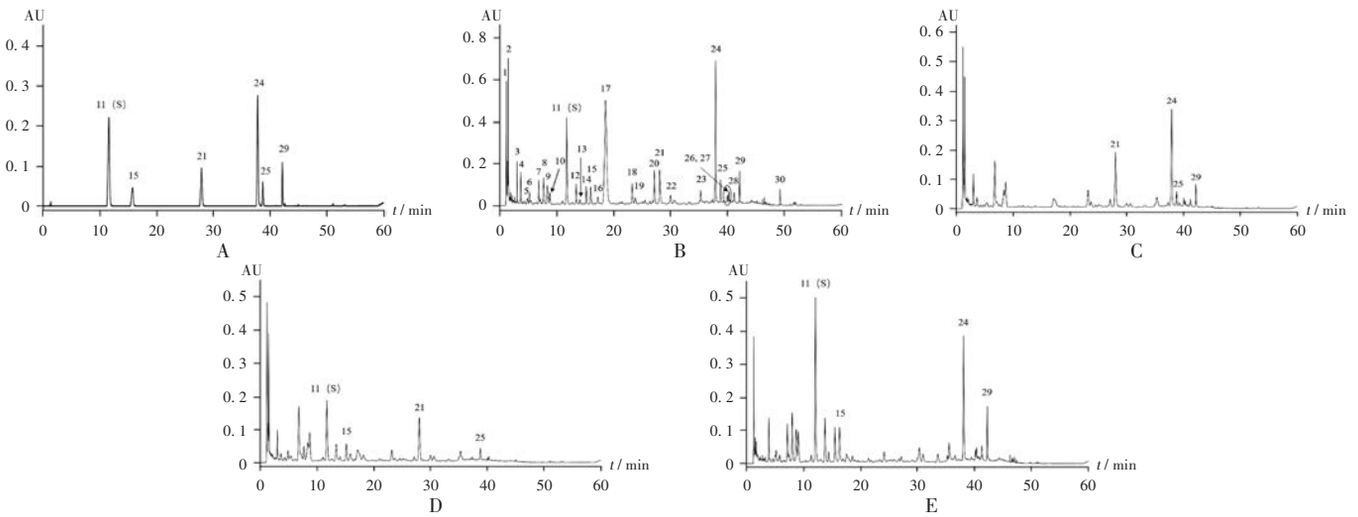
精密度试验：取样品（编号为S1）适量，按2.2项下方法制备供试品溶液，按2.1项下色谱条件连续进样测定6次，以葛根素峰为参照峰，计算各特征峰的相对保留时间及相对峰面积。结果各特征峰相对保留时间和相对峰面积的*RSD*均小于2.0%（$n=6$），表明方法精密度良好。

稳定性试验：取2.2项下供试品溶液适量，分别于室温下放置0，2，4，8，12，16，20，24 h时按2.1项下色谱条件进样测定，以葛根素峰为参照峰，计算特征峰的相对保留时间及相对峰面积。结果各特征峰相对保留时间和相对峰面积的*RSD*均小于2.0%（$n=8$），表明供试品溶液室温下放置24 h内基本稳定。

重复性试验：取样品（编号为S1）适量，共6份，按2.2项下方法制备供试品溶液，再按2.1项下色谱条件进样测定。以葛根素峰为参照峰，计算特征峰的相对保留时间及相对峰面积。结果各特征峰相对保留时间和相对峰面积的*RSD*均小于2.0%（$n=8$），表明方法重复性良好。

2.3.3 指纹图谱的建立及共有峰指认

取24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2。将24批样品的色谱数据以CDF文件格式导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012版）”，以S1号样品图谱为参照，以葛根素峰为参照峰，经多点校正后自动匹配色谱峰，以平均值法生成指纹图谱共有模式，详见图3。结果24批样品中有30个色谱峰被确认为共有峰，相应共有峰峰面积超过总峰面积的90%。30个共有峰中，通过与对照品图谱比对，结合各峰紫外吸收特征，指认出11号峰为葛根素峰、15号峰为大豆苷峰、21号峰为连翘酯苷A峰、24号峰为黄芩苷峰、25号峰为连翘苷峰、29号峰为汉黄芩苷峰，且11号及15号峰来自葛根，21号及25号峰来自连翘，24号及29号峰来自黄芩。



11. 葛根素　15. 大豆苷　21. 连翘酯苷 A　24. 黄芩苷　25. 连翘苷　29. 汉黄芩苷

A. 混合对照品溶液　B. 供试品溶液　C. 缺葛根的阴性对照品溶液　D. 缺黄芩的阴性对照品溶液　E. 缺连翘的阴性对照品溶液

图 1　超高效液相色谱图

11. Puerarin　15. Daidzin　21. Forsythoside A　24. Baicalin　25. Forsythin　29. Wogonoside

A. Mixed reference solution　B. Test solution　C. Negative reference solution without Puerariae Lobatae Radix　D. Negative reference solution without Scutellariae Radix　E. Negative reference solution without Forsythlae Fructus

Fig. 1　UPLC chromatograms

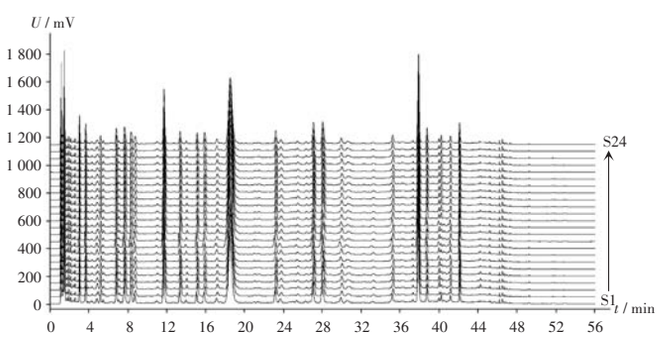


图 2　24 批柴银口服液超高效液相色谱叠加指纹图谱

Fig. 2　Superimposed UPLC fingerprint of 24 batches of Chaiyin Oral Liquid

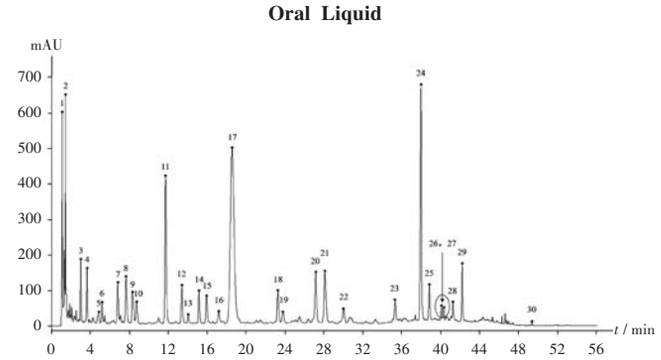


图 3　柴银口服液超高效液相色谱对照指纹图谱

Fig. 3　Reference UPLC fingerprint of Chaiyin Oral Liquid

2.3.4　相似度分析

将 24 批样品的指纹图谱数据依次导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”,以共有模式为对照图谱进行相似度计算。结果 24 批样品的相似度依次为 0.998, 0.975, 0.998, 0.998, 0.981, 0.999, 0.987, 0.989, 0.991, 0.998, 0.999, 0.999, 0.993, 0.995, 0.998, 0.996, 0.979, 0.991, 0.999, 0.972, 0.999, 0.998, 0.995, 0.989, 平均 0.992, *RSD* 为 0.80%, 表明柴银口服液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

专属性试验:取 2.2 项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照品溶液各适量,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果 6 个目标成分在混合对照品溶液和供试品溶液色谱中均有相同保留时间的色谱峰,相邻色谱峰分离度均大于 1.5,对称因子均在 0.90～1.10 之间,且阴性对照无干扰,表明方法专属性良好。

线性关系考察:分别精密量取 2.2 项下混合对照品贮备液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL,置 5 mL 容量瓶中,加 50% 甲醇制成系列混合对照品溶液。精密吸取 2 μL,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度(X, μg / mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表 1。

表 1　线性关系考察结果(n = 6)

Tab. 1　Results of the linear relation test (n = 6)

待测成分	回归方程	r	线性范围(μg / mL)
葛根素	$Y_1 = 1.570 \times 10^7 X_1 + 1.542 \times 10^2$	0.999 7	50.55～505.46
大豆苷	$Y_2 = 1.478 \times 10^7 X_2 + 2.671 \times 10^3$	0.999 6	11.20～112.04
连翘酯苷 A	$Y_3 = 6.522 \times 10^6 X_3 + 5.459 \times 10^3$	0.999 5	52.80～528.02
黄芩苷	$Y_4 = 8.008 \times 10^6 X_4 + 1.728 \times 10^4$	0.999 6	149.01～1 490.08
连翘苷	$Y_5 = 1.044 \times 10^7 X_5 + 1.222 \times 10^3$	0.999 6	12.41～124.10
汉黄芩苷	$Y_6 = 6.337 \times 10^6 X_6 + 4.984 \times 10^3$	0.999 7	39.23～392.26

精密度试验：取2.2项下混合对照品溶液适量，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2，可见仪器精密度良好。

稳定性试验：取2.2项下供试品溶液适量，分别于室温下放置0，2，4，8，12，16，20，24 h时按2.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果见表2，可见供试品溶液室温下放置24 h内基本稳定。

重复性试验：精密量取样品（编号为S1）适量，共6份，按2.2项下方法制备供试品溶液，再按拟订色谱条件进样测定，记录峰面积，并计算含量。结果见表2，可见方法重复性良好。

加样回收试验：取已知含量的样品（编号为S1）1 mL，共6份，置10 mL容量瓶中，分别精密加入2.2项下混合对照品溶液各5 mL，按2.2项下方法制备供试品溶液，再按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。结果见表2。

表2 精密度、稳定性、重复性及加样回收试验结果

Tab. 2 Results of precision, stability, repeatability and recovery test

待测成分	精密度试验	稳定性试验	重复性试验（$n=6$）		加样回收试验（$n=6$）	
	RSD（%，$n=6$）	*RSD*（%，$n=6$）	含量（μg/mL）	*RSD*（%）	含量（μg/mL）	*RSD*（%）
葛根素	0.69	0.84	1 271.54	1.07	98.98	0.73
大豆苷	0.62	0.79	273.91	0.96	98.51	1.07
连翘酯苷A	0.68	0.78	1 331.63	0.59	98.45	0.91
黄芩苷	0.56	0.89	3 721.45	0.62	98.43	0.82
连翘苷	0.65	0.65	308.19	0.96	98.10	1.11
汉黄芩苷	0.79	0.52	999.91	0.92	98.86	0.73

2.4.2 样品含量测定

取24批（S1~S24）样品各适量，按2.2项下方法制备供试品溶液，再按2.1项下色谱条件进样测定，平行测定3次，以外标法计算样品中各成分的含量。结果见表3。

表3 24批样品中6个成分含量测定结果（μg/mL，$n=3$）

Tab. 3 Results of content determination of six components in 24 batches of samples（μg/mL，$n=3$）

编号	葛根素	大豆苷	连翘酯苷A	黄芩苷	连翘苷	汉黄芩苷
S1	1 271.54	273.91	1 331.63	3 721.45	308.19	999.91
S2	1 428.94	300.79	1 698.12	3 800.20	350.44	943.33
S3	1 343.36	299.36	1 516.20	3 803.40	317.47	876.67
S4	1 303.90	283.80	1 419.20	3 722.34	322.96	911.06
S5	1 115.86	248.90	1 304.12	3 880.34	271.83	829.47
S6	1 054.74	233.55	1 191.79	2 968.75	248.24	732.48
S7	1 345.50	293.07	1 470.08	3 719.96	326.83	879.21
S8	1 298.79	275.68	1 548.52	3 650.24	348.54	869.50
S9	1 240.72	263.71	1 383.38	3 615.71	382.15	843.57
S10	1 356.18	296.00	1 453.43	3 717.23	409.46	914.19
S11	1 176.91	255.26	1 260.42	3 690.16	286.41	847.45
S12	1 251.30	271.93	1 651.50	3 611.63	461.26	781.56
S13	1 139.66	309.38	1 658.56	3 723.16	418.01	753.05
S14	1 144.66	329.06	1 663.11	3 597.74	424.31	791.29
S15	1 264.04	322.96	1 624.05	3 767.56	394.71	805.67
S16	1 222.25	305.99	1 485.69	3 652.36	357.70	758.03
S17	1 304.27	308.93	1 603.84	3 798.77	391.05	835.18
S18	1 237.39	267.56	1 476.88	3 615.31	352.96	781.11
S19	1 194.58	345.91	1 664.09	3 770.95	417.64	806.18
S20	1 148.49	308.41	1 473.01	3 698.05	361.40	795.43
S21	1 185.58	300.81	1 645.10	3 704.90	419.04	758.09
S22	1 122.30	302.53	1 537.10	3 703.95	438.16	749.08
S23	1 228.73	331.79	1 649.47	3 700.87	421.28	778.33
S24	1 243.23	315.53	1 623.90	3 841.12	478.07	793.50

3 讨论

柴银口服液方中金银花、连翘清热解毒，共为君药；柴胡解表退热，葛根解肌透邪，薄荷清利头目，青蒿清透热邪，助君药加强疏散风热之力，共为臣药；黄芩善清上焦热，鱼腥草清热解毒，二者助君药以清热，桔梗、杏仁宣降肺气以止咳，共为佐药；桔梗引药上行，兼为使药。诸药合用，共奏清热解毒、利咽止咳之功效[7]。该制剂成分较复杂，单一波长下难以检测全部成分。本试验中采用PDA检测器于190~400 nm波长范围内对供试品溶液进行全波长扫描，并参考文献[8-16]，比较了230，254，280，327 nm波长处色谱峰的数量、峰形、分离度及基线是否平稳等因素。结果显示，230 nm波长处色谱峰数较多，峰间分离度良好，基线相对平稳，故确定检测波长为230 nm。本试验中以色谱峰峰形、峰间分离度为评价指标，对流动相系统（甲醇-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液、甲醇-0.1%乙酸水溶液、乙腈-0.1%乙酸水溶液、甲醇-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液），柱温（30，35，40 ℃），流速（0.4，0.5，0.6 mL/min）等条件进行考察，结果在以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相、柱温35 ℃、流速0.4~0.6 mL/min条件下，经梯度洗脱，所得供试品溶液的色谱图基线平稳，各主要色谱峰分离效果最佳。

针对现行标准的不足，本试验中采用了UPLC法建立了柴银口服液指纹图谱共有模式，确认了30个共有峰。结合对照品图谱信息，对葛根素（11号峰）、大豆苷（15号峰）、连翘酯苷A（21号峰）、黄芩苷（24号峰）、连翘苷（25号峰）和汉黄芩苷（29号峰）6个成分进行了指认，并实现了对上述6个成分含量的同时测定。

综上所述，所建立的UPLC指纹图谱结合含量测定的UPLC法，能更全面地表征柴银口服液的产品质量。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典（一部）[M]. 北京：中国医药科技出版社，2020：1458-1459.