

五味消毒饮口服液 HPLC 指纹图谱的建立及 6 种指标性成分定量测定

杨晓琴¹, 吴亿晗¹, 白俊毅^{1,2}, 章津铭^{1*}, 傅超美^{1*}

1. 成都中医药大学药学院, 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 四川 成都 611137

2. 成都市肛肠专科医院, 四川 成都 610000

摘要: **目的** 建立五味消毒饮口服液(WXOL)的 HPLC 法特征指纹图谱, 并同时测定绿原酸、木犀草苷、木犀草素、蒙花苷、咖啡酸、秦皮乙素 6 种主要指标成分的量。**方法** 采用 Agilent 1260 高效液相色谱仪进行色谱分析, 色谱柱为 Agilent TC-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.5%醋酸水溶液-甲醇, 梯度洗脱: 0~10 min, 10%~32%甲醇; 10~20 min, 32%甲醇; 20~25 min, 32%~46%甲醇; 25~31 min, 46%~48%甲醇; 31~41 min, 48%~80%甲醇; 体积流量为 1 mL/min; 检测波长为 320 nm; 柱温为 30 ℃; 采用国家药典委员会出版的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 年版)对 10 批 WXOL 化学成分指纹图谱进行相似度评价, 并采用多成分同时测定法对 6 种指标性成分进行定量测定。**结果** 10 批 WXOL HPLC 特征指纹图谱相似度均大于 0.98, 共 17 个共有峰, 各峰分离度较好。通过对照品比对确定了其中绿原酸(5 号峰)、秦皮乙素(7 号峰)、咖啡酸(8 号峰)、木犀草苷(12 号峰)、蒙花苷(16 号峰)、木犀草素(17 号峰)6 个成分, 10 批 WXOL 中绿原酸量为 54.038 3~105.551 1 μg/mL, 秦皮乙素量为 4.122 1~31.359 9 μg/mL, 咖啡酸量为 2.413 0~4.420 7 μg/mL, 木犀草苷量为 4.042 8~11.312 8 μg/mL, 蒙花苷量为 3.866 3~46.271 9 μg/mL, 木犀草素量为 0.990 8~2.126 8 μg/mL。不同批次间各指标性成分量变化较小, 样品质量较稳定。**结论** 所建立的 HPLC 特征指纹图谱结合多指标成分定量测定的方法, 稳定性、重复性较好, 有利于保证 WXOL 质量均一, 对其质量控制具有参考价值。

关键词: 五味消毒饮口服液; HPLC; 指纹图谱; 绿原酸; 秦皮乙素; 咖啡酸; 木犀草苷; 蒙花苷; 木犀草素; 质量控制
中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)24-5151-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.24.015

Study on chemical fingerprint of Wuwei Xiaoduyin Oral Liquid and simultaneous determination of six characteristic components

YANG Xiao-qin¹, WU Yi-han¹, BAI Jun-yi^{1,2}, ZHANG Jin-ming¹, FU Chao-mei¹

1. State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Coloproctology Hospital of Chengdu, Chengdu 610000, China

Abstract: **Objective** To establish the HPLC chemical fingerprints of Wuwei Xiaoduyin Oral Liquid (WXOL) and simultaneous determination method for six major characteristic components in this herbal preparation, i.e. chlorogenic acid, luteoloside, luteolin, linarin, caffeic acid, and esculetin. **Methods** Both chemical fingerprint analysis and quantitative determination were implemented by Agilent 1260 high performance liquid chromatography system with an Agilent 5 TC-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). A gradient elution program, with the mobile phase of 0.5% glacial acetic acid aqueous solution (A) and methanol (B), was employed as following: 0—10 min, 10%—32% B; 10—20 min, 32% B; 20—25 min, 32%—46% B; 25—31 min, 46%—48% B; 31—41 min, 48%—80% B at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength and column temperature were set at 320 nm and 30 ℃, respectively. Additionally, fingerprint similarity of 10 batches of WXOL was evaluated by software “Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM” published by GPC (Version 2012). The amounts of six characteristic components in WXOL were also simultaneously determined. **Results** The common fingerprint pattern derived from 10 batches of samples was obtained with

收稿日期: 2017-06-05

基金项目: 四川省中医药管理局科研项目(2015YS035)

作者简介: 杨晓琴(1992—), 女, 在读硕士, 主要从事于中药制剂研究与开发。Tel: 15971418673 E-mail: yangxiaolin1992515@163.com

*通信作者 章津铭(1987—), 男, 博士。Tel: 13551043885 E-mail: cdutcmzjm@126.com

傅超美(1961—), 男, 教授。Tel: 13981855638 E-mail: chaomeifu@126.com

the similarity over 0.98 and 17 common peaks defined. Meanwhile, some common peaks were identified via peak pattern match with standard substances, showing that the peak No.5, No.7, No.8, No.12, No.16, and No.17 was chlorogenic acid, esculetin, caffeic acid, luteoloside, linarin, and luteolin, respectively. Chlorogenic acid content range of 54.038 3—105.551 1 $\mu\text{g/mL}$, esculetin content range of 4.122 1—31.359 9 $\mu\text{g/mL}$, caffeic acid content range of 2.413 0—4.420 7 $\mu\text{g/mL}$, luteoloside content range of 4.042 8—11.312 8 $\mu\text{g/mL}$, linarin content range of 3.866 3—46.271 9 $\mu\text{g/mL}$, and luteolin content range of 0.990 8—2.126 8 $\mu\text{g/mL}$. In combination with the non-significant difference of multiple characteristic components content among 10 batches of samples, the quality of home-made WXOL would be stable. **Conclusion** A novel quality control method, which is HPLC fingerprint in combination with simultaneous quantitative analysis of multiple components, was established in this study, with high repeatability and reliability. Therefore, this method provides an applicable approach for the quality control of WXOL.

Key words: Wuwei Xiaoduyin Oral Liquid; HPLC; fingerprints; chlorogenic acid; esculetin; caffeic acid; luteoloside; linarin; luteolin; quality control

五味消毒饮又称“消毒饮”，源自清代《医宗金鉴》，由金银花、蒲公英、野菊花、紫花地丁、天葵子 5 味中药组成，为临床治疗各种疮疡疔肿的常用复方，具有清热解毒、消散疮毒等功效^[1]。该方组方精妙、疗效显著，方中金银花、野菊花功擅解中、上焦热结，清肝胆之火；蒲公英配伍紫花地丁，泻下焦之湿热并清血分之热结；天葵子善除三焦之火。五药合用，气血同清，三焦同治。现代研究表明，本方具有广谱抗菌、抗炎、抗氧化、抗病毒、抗肿瘤、增强机体免疫功能等作用，适宜于外科、妇科、儿科、五官科等火毒湿热所致感染性疾患，极具开发前景。古代医家李东垣云：“汤者荡也，去大病用之”。五味消毒饮临床应用目前以传统汤剂为主，然而汤剂具有煎煮携带服用均不便、口感较差等不足，目前已有其微丸、分散片及滴丸等固体剂型的相关研究^[2-3]，但还未有现代成药品种上市。课题组前期与成都市肛肠专科医院通过优化提取纯化工艺，将五味消毒饮联合研制成为五味消毒饮口服液（Wuwei Xiaoduyin Oral Liquid, WXOL），既保留了汤剂的原有特色，符合其主治证“火毒势猛”之特点，同时具有吸收快、作用迅速、服用量小、口感较好、适合工业化生产等优点。在临床上可内服或外洗，用于内痔、外痔、肛周感染、直肠急慢性炎症、直肠术后并发症等。但如何建立科学合理的质量控制方法是保证中药制剂质量均一稳定的关键核心问题。中药复方制剂成分复杂，目前采用定量部分指标性成分的方法难以全面控制其质量，中药指纹图谱技术有利于整体获取中药活性组分群，已成为中药真伪优劣鉴别、质量一致性评价和产品稳定性考察的可行模式^[4-5]，《中国药典》2015 年版一部共收载 28 个特征图谱和 9 个指纹图谱的中药品种。本实验采用 HPLC 法建立 WXOL 指纹图谱^[6-7]，并

对其中绿原酸、木犀草苷、木犀草素、蒙花苷、咖啡酸、秦皮乙素 6 种主要指标成分进行定量测定^[8-11]，为 WXOL 的质量控制评价提供参考。

1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪，美国 Agilent 公司；Adventurer 十万分之一电子天平，奥豪斯仪器有限公司；DL-720D 数控超声波清洗器，上海之信仪器有限公司。甲醇，美国 Sigma-Aldrich 公司，色谱纯；水为超纯水；其余试剂均为分析纯。

对照品蒙花苷（批号 PS000691）、木犀草苷（批号 PS000708）购于成都普思生物科技股份有限公司；对照品绿原酸（批号 wkq16052705）、木犀草素（批号 wkq16051201）、咖啡酸（批号 wkq16081501）、秦皮乙素（批号 wkq16022404）购于四川省维克奇生物科技有限公司；以上对照品质量分数均 $\geq 98\%$ 。制备 10 批次 WXOL 所用饮片均购于四川省新荷花中药饮片股份有限公司，经成都中医药大学药教研室卢先明教授鉴定金银花为忍冬科忍冬属植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾、野菊花为菊科植物野菊 *Ghrysanthemum indicum* L. 的干燥头状花序、蒲公英为菊科植物蒲公英 *Taraxacum mongolicum* Hand. -Mazz. 的干燥全草、紫花地丁为堇菜科植物紫花地丁 *Viola yedoensis* Makino 的干燥全草、天葵子为毛茛科植物天葵 *Semioquilegia adoxoides* (DC.) Makino 的干燥块根。药材形状特征与《中国药典》2015 年版描述一致，各饮片产地来源、批号信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent TC-C₁₈ 柱（250 mm $\times$ 4.6mm，5 μm ）；流动相为 0.5%醋酸水溶液-甲醇，洗脱梯度：0~10 min，10%~32%甲醇；10~20 min，32%甲

表 1 10 批 WXOL 药材饮片样品产地及批号

Table 1 Origin places and batch numbers of herbs in ten batches of WXOL

样品批次	金银花		野菊花		蒲公英		紫花地丁		天葵子	
	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号
S1	河南	1604023	湖北	1607067	四川	1605011	江苏	1602042	河北	1603017
S2	河南	1603011	湖北	1602001	四川	1607087	江苏	1603130	河北	1604054
S3	山东	1606097	四川	1603011	湖北	1609031	四川	1605083	四川	1607042
S4	四川	1607048	四川	1602024	四川	1610101	四川	1607063	四川	1608054
S5	山东	1608094	四川	1604034	四川	1611104	四川	1609067	贵州	1610143
S6	河南	1612054	四川	1606058	四川	1612067	四川	1610011	四川	1612078
S7	四川	1701078	四川	1608056	四川	1701014	四川	1612048	四川	1701068
S8	四川	1702054	四川	1610045	湖北	1702058	四川	1701021	贵州	1702044
S9	山东	1704043	四川	1612078	四川	1704036	四川	1702038	四川	1704187
S10	四川	1705068	四川	1701035	四川	1705043	四川	1704057	四川	1705101

醇; 20~25 min, 32~46%甲醇; 25~31 min, 46%~48%甲醇; 31~41 min, 48%~80%甲醇; 体积流量 1 mL/min; 检测波长 320 nm; 柱温 30 °C; 进样量 10 μ L。

2.2 对照品储备液的制备

精密称定绿原酸、木犀草苷、木犀草素、蒙花苷、秦皮乙素、咖啡酸对照品, 用甲醇溶解配制成绿原酸 432 μ g/mL、木犀草苷 152 μ g/mL、木犀草素 40 μ g/mL、蒙花苷 104 μ g/mL、秦皮乙素 160 μ g/mL、咖啡酸 108 μ g/mL 的对照品储备液。

2.3 供试品溶液的制备

金银花、野菊花、蒲公英、紫花地丁、天葵子五味药材按照 2:1.5:1.5:1.5:1.5 比例进行投料, 加 10 倍量水煎煮 3 次, 每次 1 h, 合并提取液, 减压浓缩至相对密度约 1.02 (60 °C), 加入乙醇至含醇量达到 70%醇沉, 静置 36 h, 滤过取上清液并减压回收乙醇至无醇味, 加入适量附加剂后定容至 1 000 mL, 得 WXOL。

取上述制备的口服液样品 1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加入甲醇定容, 摇匀, 经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

10 批 WXOL 均采用同一条件下制备的不同批次供试品溶液。

2.4 指纹图谱方法学考察

2.4.1 精密度试验 取“2.3”项下方法制备得 WXOL S1 供试品溶液, 连续进样 6 次, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图。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, 以绿原酸作为参照峰 (S), 计算得到各

共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 2%、相对峰面积 RSD 均小于 3%, 相似度为 0.99 以上, 表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 根据“2.3”项下方法平行制备 6 份 WXOL S1 供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图, 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, 以绿原酸作为参照峰, 计算得到各共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 2%、相对峰面积 RSD 均小于 3%, 相似度为 0.99 以上, 表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取“2.3”项下方法制备得 WXOL S1 供试品溶液, 于 0、2、4、8、12、24 h 进样, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图, 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, 以绿原酸作为参照峰, 计算得到各共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 2%、相对峰面积 RSD 均小于 3%, 相似度均为 0.99 以上, 表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定性良好。

2.5 WXOL 特征指纹图谱的建立

根据“2.3”项下方法制备 10 批 WXOL S1~S10 供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 采集 41 min 色谱图, 去除因流动相梯度变化而出现的不规则色谱峰。

采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”进行数据处理, 设定其中 1 个批次 S1 样品的色谱图作为参照图谱, 采用中位数法, 将其他样品的色谱峰与参照图谱进行自动匹配生成 WXOL 特征指纹图谱, 见图 1。结果发现 10 批 (S1~S10) 样品图谱的相似度分别为 0.999、0.984、0.994、0.996、

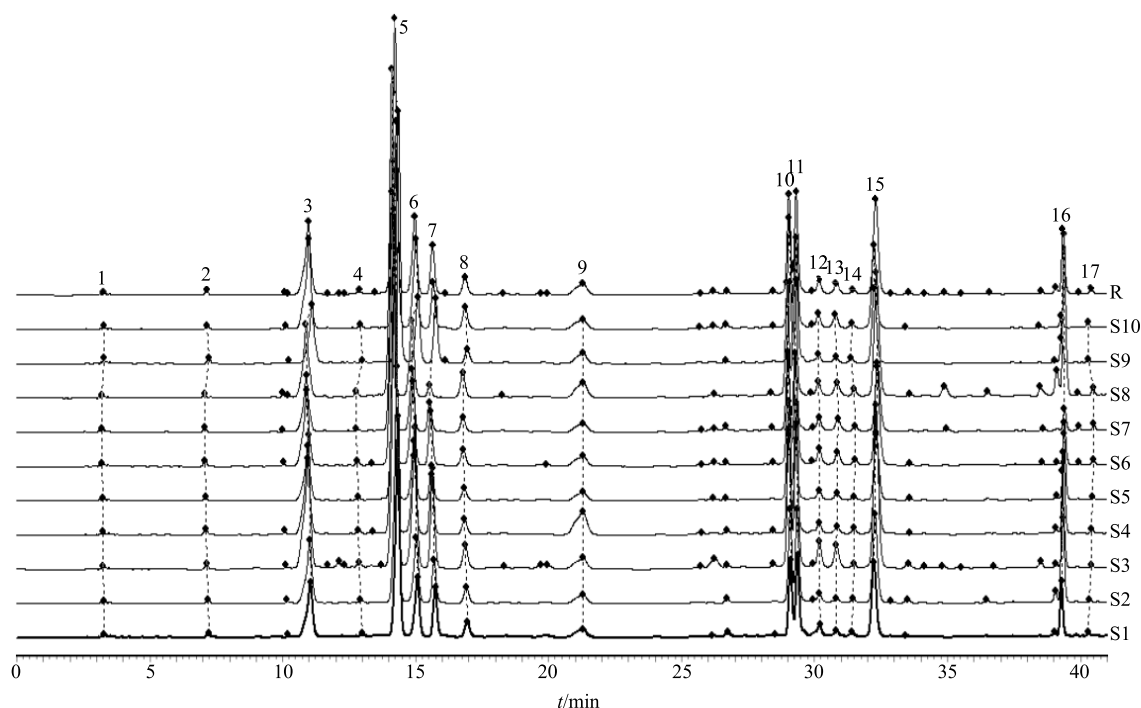


图1 10批WXOL HPLC特征指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of ten batches of WXOL

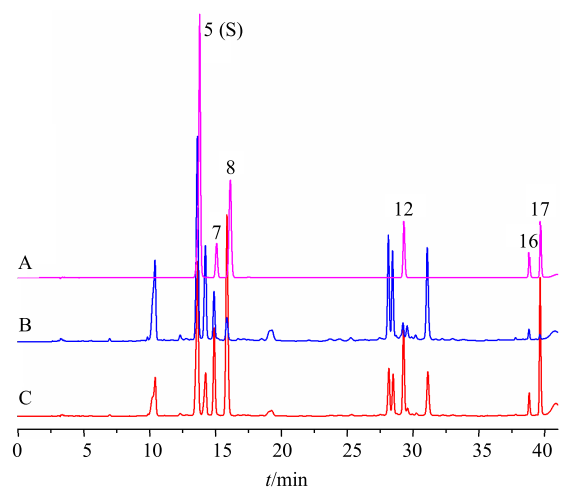
0.998、0.998、0.996、0.980、0.993、0.980，均 ≥ 0.98 ，表明课题组前期建立的制剂工艺所得样品的质量较稳定均一。

2.6 WXOL 特征峰的归属分析

取WXOL各批次供试品溶液及“2.2.1”项下混合对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件的指纹图谱检测结果，利用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012版）”，在WXOL对照图谱上共标定17个共有峰，通过各峰与混合对照品色谱峰保留时间对比分析，确定了部分峰的归属，见图2，分别为5号峰（绿原酸）、7号峰（秦皮乙素）、8号峰（咖啡酸）、12号峰（木犀草苷）、16号峰（蒙花苷）、17号峰（木犀草素）。通过紫外光谱图对比分析^[12]，见图3，WXOL与混合对照品的纯度因子均大于阈值，并且在960以上，表明在此液相条件下6个指标性成分的出峰处无其他干扰峰，均为单一物质。通过对五味消毒饮供试品、混合对照品的光谱图与光谱库进行匹配，纯度因子均大于阈值，并且在960以上（表2），表明供试品中相应的色谱峰的光谱与混合对照品的光谱图相似，认为是同一物质。

2.7 WXOL 中6种指标成分定量测定^[13-15]

2.7.1 线性关系考察 取混合对照品储备液，用甲醇分别稀释2、4、8、16、32、64倍得到6个质量浓度混合对照品溶液。分别精密吸取10 μL ，按“2.1”



A-混合对照品 B-WXOL 与对照品混合样品 C-WXOL 特征图谱
5-绿原酸 7-秦皮乙素 8-咖啡酸 12-木犀草苷 16-蒙花苷 17-木犀草素

A-mixed control products B-WXOL and mixed control products
C-characteristic spectrum of WXOL 5-chlorogenic acid 7-esculetin
8-caffeic acid 12-luteoloside 16-linarin 17-luteolin

图2 WXOL 特征图谱中色谱峰归属分析

Fig. 2 Peaks identification of characteristic spectrum in WXOL

项下色谱条件测定，以样品质量浓度为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y），绘制线性回归曲线，得到回归方程和相关系数（ r ），结果分别为绿原酸 $Y=28.625 X-70.874$ ， $r=0.999$ 9，线性范围 6.75~

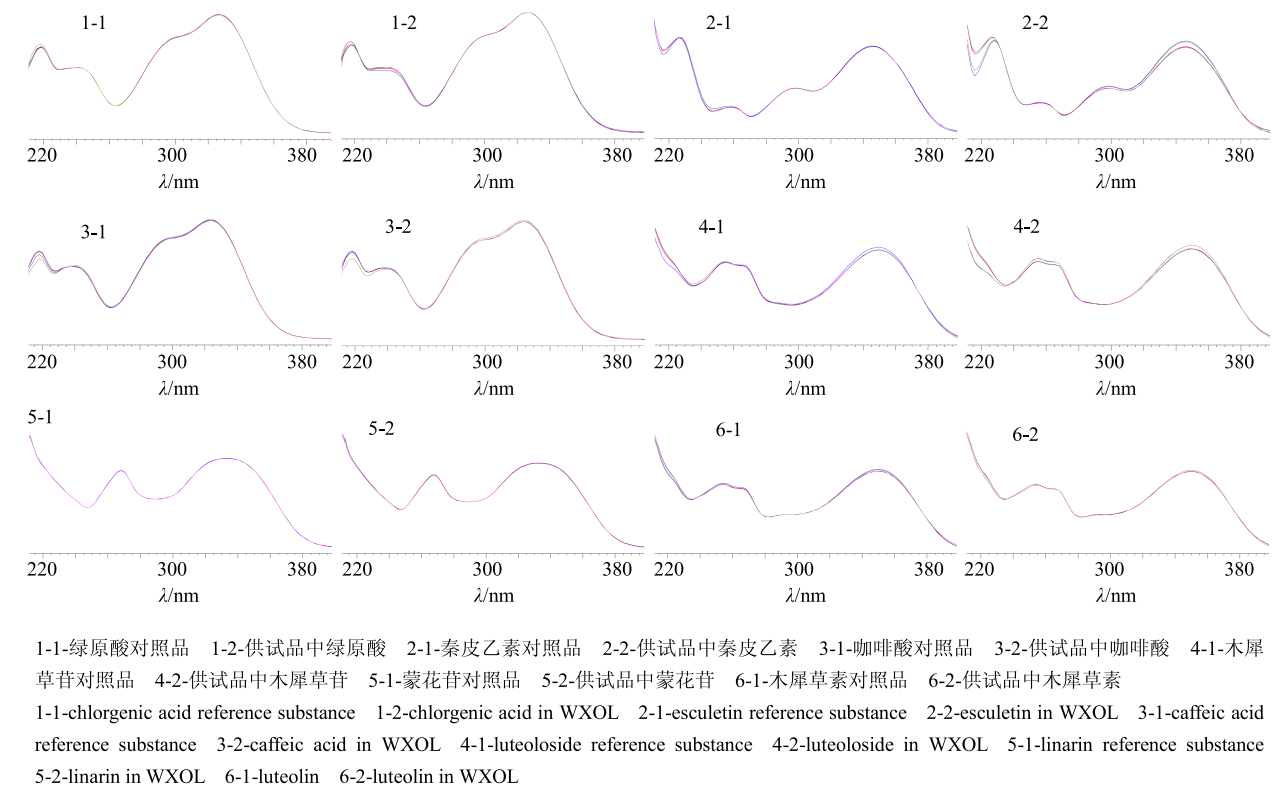


图 3 混合对照品与 WXOL 供试品紫外光谱图
 Fig. 3 Spectrum of reference standards and test article in WXOL

表 2 峰纯度、光谱相似度检查结果

Table 2 Peak purity and spectral similarity of WXOL					
样品来源	成分	纯度因子	阈值	纯度检查	光谱相似度结果
WXOL 供试品	绿原酸	998.490	960	单一物质峰	光谱相似
	秦皮乙素	995.518	960	单一物质峰	光谱相似
	咖啡酸	998.632	960	单一物质峰	光谱相似
	木犀草苷	992.082	960	单一物质峰	光谱相似
	蒙花苷	999.894	960	单一物质峰	光谱相似
	木犀草素	997.048	960	单一物质峰	光谱相似
混合对照品	绿原酸	999.567	960	单一物质峰	光谱相似
	秦皮乙素	999.855	960	单一物质峰	光谱相似
	咖啡酸	999.354	960	单一物质峰	光谱相似
	木犀草苷	996.426	960	单一物质峰	光谱相似
	蒙花苷	999.961	960	单一物质峰	光谱相似
	木犀草素	999.387	960	单一物质峰	光谱相似

216.00 μg/mL; 秦皮乙素 $Y=20.484 X-8.3215$, $r=0.9998$, 线性范围 2.5~80.0 μg/mL; 木犀草苷 $Y=16.096 X-11.902$, $r=0.9996$, 线性范围 2.375~76.000 μg/mL; 木犀草素 $Y=24.260 X-10.834$, $r=0.9992$, 线性范围 0.625~20.000 μg/mL; 咖啡酸 $Y=51.114 X-25.033$, $r=0.9994$, 线性范围 1.687~

54.000 μg/mL; 蒙花苷 $Y=17.590 X-5.3142$, $r=0.9999$, 线性范围 1.625~52.000 μg/mL.
2.7.2 精密度试验 精密吸取“2.3”项下方法制备所得 WXOL S1 供试品溶液,连续进样 6 次,按“2.1”项下色谱条件测定,结果绿原酸、木犀草苷、木犀草素、秦皮乙素、咖啡酸、蒙花苷的峰面积 RSD 分

别为 0.28%、1.68%、1.24%、0.52%、0.48%、1.51%，表明仪器精密性良好。

2.7.3 重复性试验 根据“2.3”项下方法平行制备 6 份 WXOL S1 供试品溶液，分别精密吸取 10 μL 供试品溶液并按“2.1”项下色谱条件进行测定，结果绿原酸、木犀草苷、木犀草素、秦皮乙素、咖啡酸、蒙花苷质量浓度 RSD 分别为 0.32%、1.53%、1.33%、0.49%、1.05%、1.26%，表明该方法重复性良好。

2.7.4 稳定性试验 精密吸取“2.3”项下方法制备所得 WXOL S1 供试品溶液，分别于 0、2、4、8、12、24 h，精密吸取 10 μL 供试品溶液并按“2.1”项下色谱条件进行测定，结果绿原酸、木犀草苷、木犀草素、秦皮乙素、咖啡酸、蒙花苷峰面积的 RSD 分别为 0.38%、0.68%、0.75%、0.91%、0.35%、0.45%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7.5 加样回收率试验 精密吸取 6 份已知各成分量的 WXOL S1 样品 10 mL，分别精密加入绿原酸

0.81 mg、秦皮乙素 0.45 mg、木犀草苷 0.22 mg、木犀草素 0.27 mg、蒙花苷 0.4 mg、咖啡酸 0.29 mg，按“2.1”项下色谱条件进行测定，结果得到绿原酸、木犀草苷、木犀草素、秦皮乙素、咖啡酸、蒙花苷的平均加样回收率分别为 99.15%、100.54%、97.32%、98.65%、98.18%、101.22%，RSD 分别为 1.25%、1.21%、1.49%、1.34%、1.06%、2.18%，表明该方法回收率良好。

2.7.6 样品测定 取 10 批 WXOL 样品，按“2.3”项下方法分别制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进行测定，根据标准曲线计算其中各指标成分量，结果见表 3。结果表明 10 批 WXOL 中绿原酸量为 54.038 3~105.551 1 $\mu\text{g/mL}$ ，秦皮乙素量为 4.122 1~31.359 9 $\mu\text{g/mL}$ ，咖啡酸量为 2.413 0~4.420 7 $\mu\text{g/mL}$ ，木犀草苷量为 4.042 8~11.312 8 $\mu\text{g/mL}$ ，蒙花苷量为 3.866 3~46.271 9 $\mu\text{g/mL}$ ，木犀草素量为 0.990 8~2.126 8 $\mu\text{g/mL}$ 。

表 3 10 批 WXOL 中 6 种指标性成分量测定结果

Table 3 Contents of six characteristic compounds in ten batches of WXOL

编号	质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$					
	绿原酸	秦皮乙素	木犀草苷	木犀草素	蒙花苷	咖啡酸
S1	54.038 3	15.841 9	6.824 7	1.319 9	15.805 8	2.898 0
S2	58.455 8	14.133 9	4.042 8	0.990 8	36.780 0	3.025 5
S3	105.551 1	31.359 9	11.312 8	1.039 9	14.048 6	4.215 8
S4	81.980 1	19.228 4	6.624 3	1.380 6	22.354 6	2.887 6
S5	55.465 9	11.030 2	5.130 3	1.140 1	18.512 1	2.413 0
S6	76.675 8	17.603 0	7.548 0	1.515 2	11.900 2	3.128 4
S7	57.756 2	10.108 4	6.532 9	1.842 8	6.870 0	2.743 1
S8	80.367 9	4.122 1	6.313 1	2.126 8	46.271 9	4.420 7
S9	61.460 8	20.214 1	4.825 4	1.190 7	7.101 0	2.652 9
S10	53.410 6	15.057 9	6.508 9	1.858 4	3.866 3	3.753 4

3 讨论

中药制剂的生产是一个复杂的过程，涉及多个生产环节且影响因素较多，倘若生产中任何一环节出现问题，均可对制剂产品的安全有效造成影响。中药自身的毒性或潜在的毒性、中药之间相互作用、配伍禁忌或者临床用药不合理等因素会引发中药制剂的安全问题。中药制剂的药材来源、处方、制备成型工艺、辅料、储存、运输等涉及到中药制剂的质量问题^[16]。中药制剂指纹图谱则通过各色谱峰的峰面积或峰高比值来确定样品中化学成分的相对量，并结合数理统计方法通过相似度的比较来评价

该制剂质量的优劣。它能较为全面地反映中药制剂中所含化学成分的种类与数量，尤其是在现阶段有效成分大部分未明确的情况下，能较全面地反映中药制剂的内在质量^[17]。

本研究首次建立 WXOL 的 HPLC 特征指纹图谱，并同时测定 6 种指标性成分的量，该方法方便简便，重复性好，为 WXOL 质量综合评价提供了科学依据。由结果可知，尽管 10 批 WXOL 由不同产地、不同批次的药材经课题组前期优化所得工艺制备得到，其总体化学成分可能具有一定的差异，但通过本研究建立的特征指纹图谱进行一致性评价，

发现 10 批口服液样品的化学特征指纹相似度较好, 所选 17 个共有峰相似度达 0.98 以上, 为 WXOL 的进一步研究奠定基础。

此外, 本研究前期还对口服液制备工艺进行优化, 对加水量 (8、10、12 倍)、提取时间 (0.5、1.0、1.5 h)、提取次数 (1、2、3 次) 和纯化条件醇沉体积分数 (60%、70%、80%)、醇沉时间 (12、24、36 h)、相对密度 (1.02、1.06、1.10) 采用正交试验设计进行考察, 最终确定口服液的提取条件为加 10 倍量的水, 提取 3 次, 每次 1 h, 纯化条件为醇沉浓度为 70%, 相对密度为 1.02, 醇沉 36 h。

在本实验中对 0.4%磷酸水溶液-乙腈、0.5%醋酸水溶液-乙腈、0.5%醋酸水溶液-甲醇、0.4%磷酸水溶液-甲醇等流动相体系进行比较, 对 254、320、327、344 nm 等波长进行比较, 最终确定以 0.5%醋酸水溶液-甲醇为流动相体系, 以 320 nm 为检测波长, 能够获得色谱峰相对较多、基线平稳、峰形对称、分离效果好的色谱图。还考察了不同品牌色谱柱、不同品牌高效液相色谱仪、柱温及体积流量的耐用性, 发现各项条件下所得样品图谱变化较小, 色谱峰分离情况均较好, 表明该方法耐用性较好。

参考文献

- [1] 张晓青, 陈伶俐, 李 斌, 等. 应用压电微生物传感仪研究五味消毒饮抑菌作用的量效关系 [J]. 中草药, 2013, 44(18): 2569-2572.
- [2] 李红菊. 五味消毒饮微丸的研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2007.
- [3] 张 宇. 五味消毒饮分散片及滴丸的研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2008.
- [4] 李 强, 杜思邈, 张忠亮, 等. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3095-3104.
- [5] 侯湘梅, 岳洪水, 张 磊, 等. 中药质量一致性评价探讨 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(1): 38-45.
- [6] 徐吉银, 孙丽丽, 杨立伟, 等. 小儿七星茶口服液指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2016, 47(6): 928-932.
- [7] 尤春雪, 张振秋, 李 峰, 等. HPLC 波长切换技术对葛根中 8 种成分的测定及指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2013, 44(5): 616-621.
- [8] 李 淼, 王永香, 孟 谨, 等. HPLC 法测定金银花中新绿原酸等 8 种成分的量 [J]. 中草药, 2014, 45(7): 1006-1010.
- [9] 谭晓杰, 贾 英, 李 清, 等. RP-HPLC 法同时测定野菊花中木犀草素-7-O-葡萄糖苷和蒙花苷 [J]. 中草药, 2006, 37(8): 1261-1262.
- [10] 李 超, 董自波, 蒋金来, 等. HPLC 法测定蒲公英中菊苣酸、咖啡酸与绿原酸 [J]. 中草药, 2015, 46(23): 3577-3580.
- [11] 陈胡兰, 汤沛然, 张 梅, 等. 紫花地丁药材及其混淆品的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国药理学杂志, 2010, 45(18): 1372-1375.
- [12] 李树纲, 丁兴莉, 张 蕾, 等. HPLC-DAD 法检测三种兽用中药注射液中非法添加唑乙醇和乙酰甲唑的方法研究 [J]. 中兽医医药杂志, 2016(4): 29-33.
- [13] 杨宏静, 陈 瑛, 方应权. HPLC 法同时测定五味消毒饮中 4 种成分 [J]. 中成药, 2015, 37(4): 778-781.
- [14] 刘婷婷, 何 瑶, 王丽娟, 等. HPLC 法同时测定四物汤中 6 种成分的含量 [J]. 中药材, 2016, 39(7): 1602-1604.
- [15] Xu M, Tan H S, Fu W W, *et al.* Simultaneous determination of seven components in gamboge and its processed products using a single reference standard [J]. *Chin Herb Med*, 2017, 9(1): 42-49.
- [16] 顾俊菲, 封 亮, 张明华, 等. 中药产品“多维结构过程动态质量控制技术体系”构建与应用 (I) [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(21): 3613-3617.
- [17] 梁小银, 陈少旭, 吴 垠. 中药制剂质量控制研究的发展趋势 [J]. 中国药房, 2014, 25(3): 280-283.