

小儿退热洗剂 HPLC 指纹图谱及指标成分测定

蒋 爱^{1,2}, 陈 健^{1,2}, 韩加伟^{1,2}, 王洪兰^{1,2*}, 李俊松^{1,2*}, 狄留庆^{1,2}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 江苏省中药高效给药系统工程技术研究中心, 江苏 南京 210023

摘要: **目的** 建立小儿退热洗剂 HPLC 指纹图谱, 并测定其中 10 种成分(新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、连翘酯苷 A、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、迷迭香酸、连翘苷)的含量。**方法** 采用 Kromasil 100-5 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以 0.1% 磷酸水溶液-乙腈为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 1 mL/min, 柱温 35 ℃, 检测波长 330 nm, 以连翘酯苷 A 为参照峰, 建立 11 批样品的 HPLC 指纹图谱; 基于指纹图谱色谱条件, 在 330、280 nm 检测波长下测定 10 种主要成分含量, 并对 11 批制剂进行多指标含量测定。**结果** 建立了 HPLC 指纹图谱, 共标定 22 个共有峰, 指出 13 个色谱峰, 11 批制剂相似度在 0.987~0.999。新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、连翘酯苷 A、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、迷迭香酸、连翘苷分别在 14.18~141.78、20.53~205.63、14.38~143.78、5.62~56.19、22.22~222.22、8.40~83.98、5.70~57.02、7.46~76.36、16.95~169.48、8.59~85.94 μg/mL 线性关系良好, 平均加样回收率分别为 109.51%、98.73%、99.41%、90.63%、92.73%、95.39%、91.87%、106.50%、95.23%、108.71%。11 批制剂中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、连翘酯苷 A、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、迷迭香酸、连翘苷质量浓度分别在 306.38~457.85、607.67~854.71、306.81~469.02、95.65~170.64、484.41~819.44、234.28~322.01、145.42~226.85、219.11~292.21、347.94~507.74、201.35~261.94 mg/mL。**结论** 该方法准确简单, 稳定可靠, 可用于小儿退热洗剂质量控制。

关键词: 指纹图谱; 多指标; 小儿退热洗剂; HPLC; 新绿原酸; 绿原酸; 隐绿原酸; 咖啡酸; 连翘酯苷 A; 异绿原酸 B; 异绿原酸 A; 异绿原酸 C; 迷迭香酸; 连翘苷

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)13-3077-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.13.013

HPLC fingerprint and multi-index content determination of children antifebrile lotion

JIANG Ai^{1,2}, CHEN Jian^{1,2}, HAN Jia-wei^{1,2}, WANG Hong-lan^{1,2}, LI Jun-song^{1,2}, DI Liu-qing^{1,2}

1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Engineering Research Center for Efficient Delivery System of TCM, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To establish HPLC fingerprint of antipyretic lotion for children and determine the content of 10 components (neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, caffeic acid, forsythiae A, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid C, rosmarinic acid and forsythoside). **Methods** The analysis of antipyretic lotion for children was performed on the Kromasil 100-5 C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) chromatographic column, with mobile phase comprising of 0.1% phosphate acid-acetonitrile flowing at 1 mL/min in a gradient elution manner, and the column temperature was 35 ℃, and detection wavelength was set at 330 nm. With forsythia A as reference peak, HPLC fingerprint of 11 batches of preparations was established; Based on the conditions of fingerprint chromatogram, the content of 10 components was determined at the detection wavelength of 330 and 280 nm and the multi-index content of 11 batches of the preparation was determined. **Results** HPLC fingerprint was established, a total of 37 peaks were selected as the common peaks, of which 22 peaks were identified, and the similarities of 11 batches of preparations were between 0.987 and 0.999. The linear relationships of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, caffeic acid, forsythiae A, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid C, rosmarinic acid, and forsythoside were good in the

收稿日期: 2019-04-01

作者简介: 蒋 爱 (1992—), 女, 硕士生, 研究方向为中药新制剂与新技术。Tel: (025)85811517 E-mail: 18260095219@163.com

*通信作者 王洪兰 (1977—), 女, 博士, 副教授, 研究方向为中药新制剂与新技术。Tel: (025)85811517 E-mail: honglanwang2004@163.com

李俊松 (1964—), 男, 博士, 教授, 研究方向为中药新制剂与新技术。Tel: (025)85811517 E-mail: Lijunsong1964@163.com

range of 14.18—141.78, 20.53—205.63, 14.38—143.78, 5.62—56.19, 22.22—222.22, 8.40—83.98, 5.70—57.02, 7.46—76.36, 16.95—169.48, 8.59—85.94 g/mL, respectively. The average recoveries were 109.51%, 98.73%, 99.41%, 90.63%, 92.73%, 95.39%, 91.87%, 106.50%, 95.23%, and 108.71%. The content of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, caffeic acid, forsythiae A, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid C, rosmarinic acid, and forsythidin in the 11 batches were in the range of 306.38—457.85, 607.67—854.71, 306.81—469.02, 95.65—170.64, 484.41—819.44, 234.28—322.01, 145.42—226.85, 219.11—292.21, 347.94—507.74, 201.35—261.94 mg/mL, respectively. **Conclusion** The method is accurate, simple, stable and reliable, which can be used for the quality control of antipyretic lotion for children.

Key words: fingerprint; multi-component; antipyretic lotion for children; HPLC; neochlorogenic acid; chlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; caffeic acid; forsythiaside A; isochlorogenic acid B; isochlorogenic acid A; isochlorogenic acid C; rosmarinic acid; forsythidin

小儿退热洗剂由薄荷、金银花、连翘、大青叶、艾叶、紫苏、柴胡 7 味药组成, 具有清热解毒、凉血, 辅以解表、散寒功效; 主治风热感冒、各种热性病、寒热往来之证, 具有抗菌、抗病毒、清热等作用。

近年来现代分析测试技术迅速发展, 对中药质量的控制已从传统的基原鉴别、性状鉴别、显微鉴别、理化鉴别发展到光谱和色谱时代^[1-5]。中药指纹图谱是一种综合的、可量化的鉴定手段^[1-11], 从中药物质基础的角度出发, 运用现代分析检测技术, 以具有特征性的某类或几类成分的色谱或光谱图谱表征中药中所共有的以及中药的内在特征, 能系统地、整体地、专属地评价中药质量真实性、优良性和稳定性^[1-5]。目前中药指纹图谱已成世界卫生组织接受作为有效评价中药质量的方法, 是国际公认的控制中药或天然药材质量的技术手段^[1-5]。常见的指纹图谱技术有薄层色谱 (TLC)^[12]、HPLC^[13-14]、气相色谱 (GC)^[15]、紫外色谱 (UV)^[16]、红外光谱 (IR)^[17-18]、气质联用色谱 (GC-MS)^[15]、液质联用色谱 (LC-MS)^[19]、物理指纹图谱^[20]等。为了更好地控制该制剂质量, 保证临床疗效, 本实验建立小儿退热洗剂 HPLC 指纹图谱, 并在指纹图谱基础上, 选择君药 (薄荷与金银花) 与臣药 (连翘) 中主要成分进行多指标测定。从定性和定量角度对该制剂进行质量控制。

1 仪器与材料

2695 型高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; XP6 型电子分析天平, 梅特勒-托利多国际股份有限公司; RE-52AA 型旋转蒸发器, 常州国宇仪器制造公司。薄荷、金银花、连翘、大青叶、艾叶、柴胡、紫苏饮片均购于亳州市中药饮片厂, 经南京中医药大学刘训红教授鉴定分别为唇形科植物薄荷 *Mentha haplocalyx* Briq. 的干燥地上部分、忍冬科植

物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾、木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实、十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥叶、菊科植物艾叶 *Artemisia argyi* Lévl et Vant. 的干燥叶、伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 的干燥根、唇形科植物紫苏 *Perilla frutescens* (L.) Britt. 的干燥叶, 均符合《中国药典》2015 年版的相关项下要求。对照品绿原酸 (批号 110753-201716, 质量分数 99.3%)、木犀草苷 (批号 111720-201609, 质量分数 94.9%)、连翘酯苷 A (批号 111810-201707, 质量分数 97.2%)、靛玉红 (批号 110717-200204, 质量分数 100.0%)、连翘苷 (批号 110821-201615, 质量分数 100.0%)、芦丁 (批号 100080-201408, 质量分数 92.8%)、槲皮素 (批号 10081-9905, 质量分数 100.0%) 均购于中国食品药品检定研究院; 对照品异绿原酸 A (批号 P28O7F23862, 质量分数 ≥ 98%)、异绿原酸 B (批号 P25J6F1793, 质量分数 ≥ 98%)、异绿原酸 C (批号 P28D4S1, 质量分数 ≥ 98%)、隐绿原酸 (批号 Z30A6B2, 质量分数 ≥ 98%)、新绿原酸 (批号 P27A6F2713, 质量分数 ≥ 98%)、咖啡酸 (批号 Y17D6C7672, 质量分数 ≥ 98%)、迷迭香酸 (批号 P25M8F32575, 质量分数 ≥ 98%) 均购于源叶生物有限公司; 甲醇 (色谱级, 批号 20180106)、乙腈 (色谱级, 批号 20180305)、乙醇 (分析纯, 批号 20180303) 均购于国药集团化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 指纹图谱研究

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱 (表 1), 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 330 nm; 柱温 35 °C; 进样量 10 μL。

2.1.2 制剂制备 取处方量药材加入 10 倍量的水,

表 1 流动相梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution table of mobile phase

t/min	乙腈/ %	0.1%磷酸 水溶液/%	t/min	乙腈/ %	0.1%磷酸 水溶液/%
0	8	92	100	45	55
5	8	92	105	75	25
15	10	90	110	75	25
25	12	88	115	8	92
50	15	85	120	8	92
80	22	78			

浸泡 30 min, 煎煮 3 次, 每次 1 h, 用 100 目筛网趁热滤过, 合并 3 次滤液, 同时收集挥发油。3 次合并汤液采用低温减压浓缩至 200 mL, 4 500 r/min 低速离心 5 min, 取全部上清液备用。取挥发油, 向其中加入 1.2 mL 聚山梨酯-80 (体积分数为 0.6%), 搅拌均匀后, 缓慢加入上清液稀释, 最后用蒸馏水定容至 200 mL。灌装, 采用 105 °C 湿热灭菌 40 min。制备 11 批次制剂, 分别为 20190101 (S1)、20190102 (S2)、20190103 (S3)、20190104 (S4)、20190105 (S5)、20190106 (S6)、20190107 (S7)、20190108 (S8)、20190109 (S9)、20190110 (S10)、20190111 (S11)。

2.1.3 阴性制剂制备 按照制剂制备流程, 分别制备缺薄荷、金银花、连翘、大青叶、艾叶、紫苏、柴胡的阴性制剂。

2.1.4 供试品溶液的制备 取小儿退热洗剂, 用甲醇稀释 4 倍, 供试品中甲醇体积分数为 50%, 以 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.1.5 对照品的制备 取绿原酸、木犀草苷、连翘酯苷 A、靛玉红、连翘苷、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C、隐绿原酸、新绿原酸、咖啡酸、迷迭香酸、芦丁、槲皮素对照品, 加甲醇溶解, 制成对照品溶液。

2.1.6 对照药材溶液制备 分别取薄荷、金银花、连翘、大青叶、艾叶、紫苏、柴胡药材, 按照成型制剂制备过程制备, 并按照供试品制备方法制备对照药材溶液。

2.1.7 阴性对照液制备 分别取缺薄荷、金银花、连翘、大青叶、艾叶、紫苏、柴胡阴性制剂并按照供试品制备方法制备相应阴性对照液。

2.1.8 精密度考察 取 S2 批次小儿退热洗剂成型

制剂, 按照“2.1.4”项下方法及“2.1.1”项下色谱条件, 连续进样 6 针, 以 13 号峰为参照峰, 计算共有峰的相对保留时间、相对峰面积和相似度, 各共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 1.00%, 各相对峰面积 RSD 均小于 3.00%, 相似度大于 0.999, 结果表明仪器精密度良好。

2.1.9 稳定性考察 取同一份小儿退热洗剂 (S2 批次) 供试品制备溶液, 分别放置 0、2、4、8、12、24 h, 以 13 号峰为参照峰, 计算共有峰的相对保留时间、相对峰面积和相似度, 各共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 0.65%, 各相对峰面积 RSD 均小于 2.94%, 相似度大于 0.998, 结果表明此方法制备的供试品溶液 24 h 内稳定。

2.1.10 重复性考察 取 S2 批次小儿退热洗剂, 按照“2.1.4”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按照“2.1.1”项下色谱条件进样分析, 计算共有峰的相对保留时间、相对峰面积和相似度, 各共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 0.43%, 各相对峰面积 RSD 均小于 2.88%, 相似度大于 0.998, 结果表明此方法重复性良好。

2.1.11 指纹图谱的建立 取 11 批 (S1~S11) 不同批次的小儿退热洗剂, 按照“2.1.4”项下方法及“2.1.1”项下色谱条件进样分析, 按照《中药色谱指纹图谱》要求, 将 11 批制剂 HPLC 色谱图谱导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)》中进行数据分析。设定时间窗为 0~120 min, 时间宽度为 0.5 min, 自动匹配色谱峰, 生成小儿退热洗剂指纹图谱以及对照指纹图谱 (图 1)。

选择稳定性好、分离度好、特征明显、信号强的色谱峰作为共有峰, 最终从中选出 22 个共有峰, 并指出 13 个色谱峰。以对照指纹图谱为参照, 对 S1~S11 批次小儿退热洗剂色谱图谱进行相似度计算。S1~S11 批次小儿退热洗剂与对照指纹图谱相似度分别为 0.994、0.998、0.996、0.997、0.997、0.992、0.999、0.996、0.998、0.987、0.994, 表明小儿退热洗剂制备工艺稳定。

2.1.12 共有峰的药材归属 取对照药材、阴性对照溶液、供试品溶液按照“2.1.1”项下色谱条件进样, 记录色谱图, 比对色谱图中各峰, 将主要色谱峰进行药材的归属。

由图 2 可知, 指纹图谱中来源于金银花的有 1、2、4、5、10、11、14~16 号峰, 来源于薄荷的有 1~5、10、11、15~18 号峰, 来源于连翘的有 5、8~

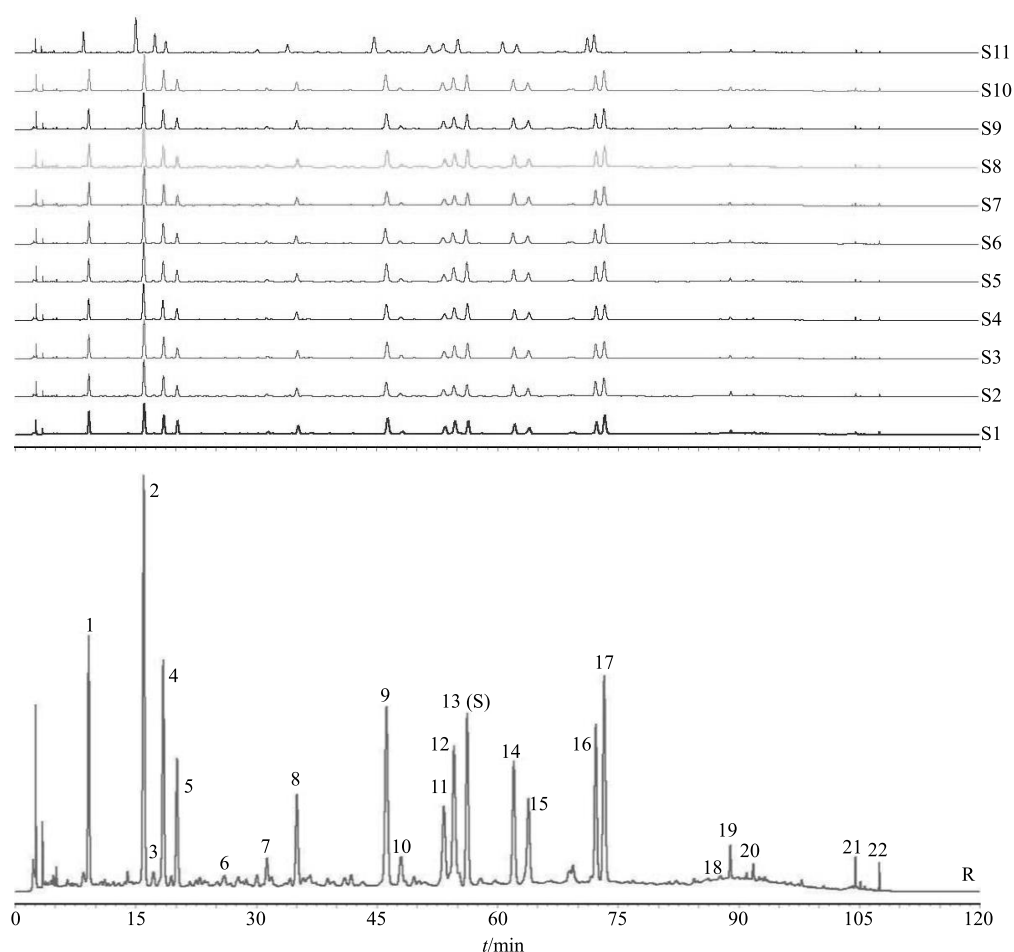
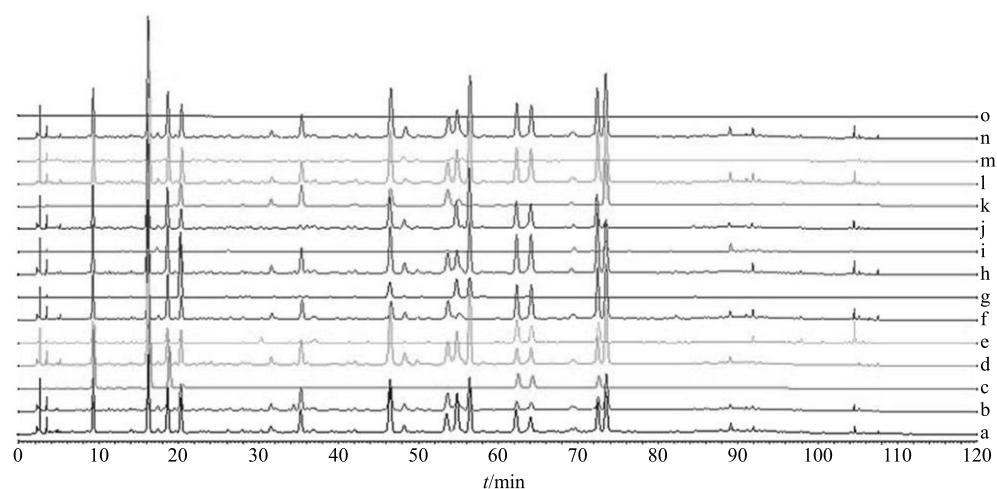


图1 11批小儿退热洗剂 (S1~S11) 指纹图谱及对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 Fingerprint (S1—S11) and control fingerprint (R) for 11 batches of antifebrile lotion for children



a-供试品 b-金银花阴性 c-金银花 d-艾叶阴性 e-艾叶 f-连翘阴性 g-连翘 h-薄荷阴性 i-薄荷 j-紫苏阴性 k-紫苏 l-大青叶阴性
m-大青叶 n-柴胡阴性 o-柴胡
a-sample b-negative of *Lonicera japonica* c-*Lonicera japonica* d-negative of *Artemisia argyi* e-*Artemisia argyi* f-negative of *Forsythia suspensa* g-*Forsythia suspensa* h-negative of *Mentha haplocalyx* i-*Mentha haplocalyx* j-negative of *Perilla frutescens* k-*Perilla frutescens* l-negative of *Isatis indigotica* m-*Isatis indigotica* n-negative of *Bupleurum chinense* o-*Bupleurum chinense*

图2 小儿退热洗剂 HPLC 指纹图谱共有峰药材归属

Fig. 2 Common peak attribution in fingerprint of antifebrile lotion for children

10、12、13 号峰,来源于大青叶的有 2、4、5、10、12、22 号峰,来源于艾叶的有 1、2、4、5、14~16 号峰,来源于紫苏的有 5、7~9、11、12、17、21 号峰,330 nm 下未检测出来自柴胡的色谱峰。

2.1.13 主要色谱峰的成分指认 取对照品溶液、供试品溶液按照“2.1.1”项下色谱条件进样,记录色谱图,比对色谱图中各峰,将主要色谱峰进行成分

指认。

由图 3 可知,指纹图谱中 1 号峰为新绿原酸,2 号峰为绿原酸,4 号峰为隐绿原酸,5 号峰为咖啡酸,10 号峰为芦丁,11 号峰为木犀草苷,13 号峰为连翘酯苷 A,14 号峰为异绿原酸 B,15 号峰为异绿原酸 A,16 号峰为异绿原酸 C,17 号峰为迷迭香酸,18 号峰为槲皮素,22 号峰为靛玉红。

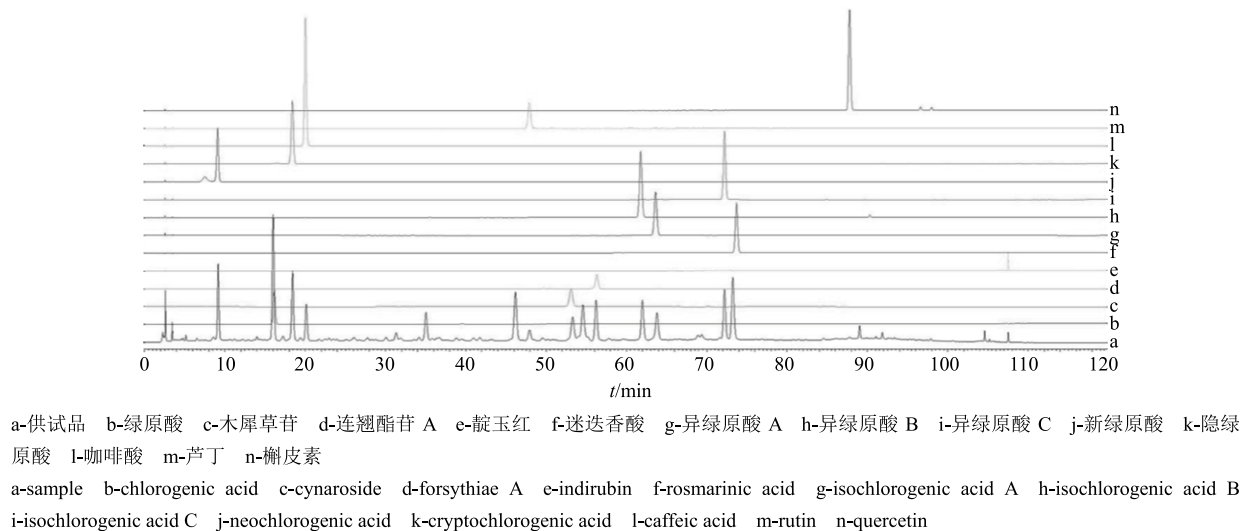


图 3 小儿退热洗剂 HPLC 指纹图谱共有峰成分指认

Fig. 3 Identification of common peaks in HPLC fingerprint of antifebrile lotion for children

2.2 多指标定量测定

2.2.1 色谱条件 按照“2.1.1”项下色谱条件,同时在 280、330 nm 波长下检测。

2.2.2 精密度 精密吸取混合对照品溶液注入高效液相色谱仪中,连续进样 6 次,计算各成分峰面积的 RSD, RSD 均小于 3%,表明仪器精密度良好。

2.2.3 线性关系考察 取混合对照品母液,分别稀释 1、2、4、6、8、10 倍,吸取不同质量浓度混合对照品溶液,按照“2.2.1”项下色谱条件进样。以峰面积为纵坐标 (Y),质量浓度为横坐标 (X),进行线性回归,得回归方程分别为新绿原酸 $Y=21\,797X+74\,441$, $r^2=0.998\,2$, 线性范围 14.18~141.78 $\mu\text{g/mL}$; 绿原酸 $Y=23\,855X+133\,213$, $r^2=0.997\,9$, 线性范围 20.53~205.63 $\mu\text{g/mL}$; 隐绿原酸 $Y=24\,542X+63\,981$, $r^2=0.998\,8$, 线性范围 14.38~143.78 $\mu\text{g/mL}$; 咖啡酸 $Y=48\,817X+26\,086$, $r^2=0.999\,7$, 线性范围 5.62~56.19 $\mu\text{g/mL}$; 连翘酯苷 A $Y=15\,063X+48\,985$, $r^2=0.999\,1$, 线性范围 22.22~222.22 $\mu\text{g/mL}$; 异绿原酸 B $Y=29\,369X+25\,180$, $r^2=0.999\,5$, 线性范围 8.40~83.98 $\mu\text{g/mL}$; 异绿原酸 A $Y=36\,320X+16\,301$, $r^2=0.999\,6$, 线

性范围 5.70~57.02 $\mu\text{g/mL}$; 异绿原酸 C $Y=36\,518X+20\,748$, $r^2=0.999\,7$, 线性范围 7.46~76.36 $\mu\text{g/mL}$; 迷迭香酸 $Y=28\,259X+35\,598$, $r^2=0.999\,7$, 线性范围 16.95~169.48 $\mu\text{g/mL}$; 连翘苷 $Y=5\,447.6X+4\,313.7$, $r^2=0.999\,7$, 线性范围 8.59~85.94 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2.4 稳定性考察 精密吸取同一供试品溶液 (S2 批次), 分别放置 0、2、4、8、12、24 h, 取 10 μL , 分别注入高效液相色谱仪测定。分别计算各成分含量, RSD 分别为 1.37%、0.55%、2.52%、0.66%、0.31%、0.51%、0.64%、0.30%、0.51%、0.77%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.5 重复性考察 取 S2 批次小儿退热洗剂, 按照“2.1.4”项下方法平行制备 6 份, 分别取 10 μL , 分别注入高效液相色谱仪测定。计算各成分含量, 各成分 RSD 分别为 0.90%、0.94%、0.82%、0.82%、0.95%、0.69%、2.91%、1.12%、0.74%、2.36%, 表明此方法重复性良好。

2.2.6 加样回收率考察 吸取小儿退热洗剂 (S2 批次) 0.5 mL, 按照与各成分质量比为 1:1 加入混合对照品溶液, 参照“2.1.4”项下方法平行制备 6

份, 再依据“2.2.1”项下色谱条件进样, 计算各成分加样回收率。新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、连翘酯苷 A、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、迷迭香酸、连翘苷的平均加样回收率分别为 109.51%、98.73%、99.41%、90.63%、92.73%、95.39%、91.87%、106.50%、95.23%、108.71%, RSD 分别为 1.62%、2.42%、2.32%、2.77%、2.44%、

3.65%、3.94%、2.98%、3.02%、1.29%。

2.2.7 样品测定 取不同批次样品按照“2.1.4”项下方法供试品溶液, 再按照“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 结果见表 2。

3 讨论

本实验在优化指纹图谱色谱条件过程中比较了供试品中甲醇体积分数, 供试品中甲醇体积分数为

表 2 11 批小儿退热洗剂中 10 种指标性成分含量

Table 2 Content of 10 indicative compounds in antipyretic lotion for children

批次	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)									
	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	咖啡酸	连翘酯苷 A	异绿原酸 B	异绿原酸 A	异绿原酸 C	迷迭香酸	连翘苷
S1	385.48	607.67	396.19	141.00	583.43	234.28	145.42	235.72	439.34	215.60
S2	391.35	722.31	366.50	138.46	656.48	245.41	157.38	219.11	439.07	233.77
S3	457.85	840.94	409.58	95.65	784.87	319.32	172.57	292.21	507.74	261.94
S4	454.34	854.71	469.02	115.64	574.08	322.01	169.16	291.43	491.85	236.36
S5	426.13	810.49	440.81	105.20	629.48	263.19	161.40	267.14	386.50	253.84
S6	405.00	778.39	425.11	113.99	819.44	285.73	194.78	256.44	463.95	249.02
S7	385.91	744.59	408.86	120.27	654.46	234.45	210.10	232.74	347.94	249.58
S8	445.31	817.20	461.63	113.00	678.80	282.12	161.37	256.19	392.91	234.85
S9	406.32	741.72	419.96	109.96	484.41	263.42	160.65	232.34	419.24	201.35
S10	314.70	797.17	306.81	170.12	801.86	267.61	224.92	246.37	353.26	225.94
S11	306.38	789.60	309.87	170.64	800.58	265.40	226.85	260.62	377.17	228.86

50%时, 色谱峰分离度及响应值最佳; 小儿退热洗剂指纹图谱建立时为体现指纹图谱的整体性和模糊性, 在全波长扫描下进行, 发现大部分成分的最大吸收波长在 330 nm 附近, 在 330 nm 波长下, 色谱峰信息最丰富, 分离度较好, 各峰响应值较高; 在 280 nm 波长下色谱峰虽然丰富, 但各峰整体相应较低, 吸收不均匀, 此外在此波长下可指认连翘苷色谱峰, 故后续多指标含量测定在指纹图谱色谱条件下增加 280 nm 检测波长, 用于测定制剂中连翘苷含量; 另外在 211 nm 波长下可指认柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 色谱峰, 柴胡中主要成分具有末端吸收特质, 故在 330 nm 下, 几乎未检测到柴胡中有效成分; 同时对乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液 3 个流动相进行了考察, 发现乙腈-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液作为流动相进行梯度洗脱各色谱峰分离度均较好, 但采用乙腈-0.1%甲酸水溶液洗脱时, 16 号 (异绿原酸 C) 与 17 号 (迷迭香酸) 2 个色谱峰合为 1 个响应值更高的色谱峰, 为方便成分指认及后续多指标含量测定选择乙腈-0.1%磷酸水溶液作为流动相。

本实验依据文献报道各药材指纹图谱涉及到的指标性成分^[21-24], 指认出 13 个成分。综合君药及臣药中主要成分、各成分色谱峰分离度及含量, 最终确定选择绿原酸、连翘酯苷 A、连翘苷、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C、隐绿原酸、新绿原酸、咖啡酸、迷迭香酸作为多指标性成分。

参考文献

- [1] 马丽娜, 张 岩, 陶遵威. 色谱分析技术在中药指纹图谱研究中的应用 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(1): 58-62.
- [2] 刘东方, 赵丽娜, 李银峰, 等. 中药指纹图谱技术的研究进展及应用 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 4085-4094.
- [3] 徐 妍, 杨华蕊, 杨永寿, 等. 中药指纹图谱研究现状及展望 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(76): 91-94.
- [4] 孙仁爽, 赵敏婧, 孟 军. 中药质量控制的研究进展 [J]. 人参研究, 2018, 30(2): 52-55.
- [5] Gao S M, Liu J S, Wang M, et al. Quantitative and HPLC fingerprint analysis combined with chemometrics for quality evaluation of *Codonopsis Radix* processed with different methods [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(2):

- 160-168.
- [6] 刁嘉茵, 徐 灿, 王淑美, 等. 中药指纹图谱与药效相关性研究进展 [J]. 药学研究, 2018, 37(3): 165-168.
- [7] 王 琰, 王虹熙. 中药谱效关系的研究进展 [J]. 中国民族民间医药, 2018, 27(4): 50-52.
- [8] 陈林伟, 秦昆明, 徐雪松, 等. 中药指纹图谱数据库的研究现状及展望 [J]. 中草药, 2014, 45(21): 3041-3047.
- [9] 秦建平, 吴建雄, 郎 悦, 等. 痛宁凝胶的 HPLC-MS 指纹图谱研究 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(4): 427-430.
- [10] 方 琳, 姚 帅, 崔亚君. 二维薄层色谱技术的研究进展 [J]. 中成药, 2014, 36(3): 589-592.
- [11] Xie R F, Zhao Q H, Li Z C, *et al.* Comparison on HPLC fingerprints between *Fraxini Cortex* and its eye drop [J]. *Chin Herb Med*, 2013, 5(4): 301-306.
- [12] 杨锦玲, 梅文莉, 李 薇, 等. 国产沉香 TLC 的指纹图谱分析 [J]. 热带生物学报, 2015, 6(2): 189-196.
- [13] 侯 文, 刘宏胜, 王树森, 等. 基于 HPLC 指纹图谱和多成分同时测定的护肝剂质量评价研究 [J]. 中草药, 2018, 49(24): 5830-5835.
- [14] 李国强, 王运来, 周 敏, 等. 当归芍药散含药血浆 UPLC-UV 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2017, 48(19): 4017-4023.
- [15] 孙 绪, 付思红, 熊丹丹, 等. 艾纳香及其提取物的 GC-MS 指纹图谱和相关性研究 [J]. 中草药, 2017, 48(4): 693-699.
- [16] 郑春松, 叶蕪芝. 药对川芎-白芍与其单味药挥发油的衰减全反射-傅里叶变换红外光谱指纹图谱研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2009, 14(6): 646-649.
- [17] 周红涛, 胡世林, 冯学锋, 等. 不同产地赤芍的 FTIR 指纹图谱对比分析 [J]. 中草药, 2002, 33(9): 69-72.
- [18] 李文庆, 甄达明, 田 野, 等. 冬虫夏草蛋白 LC-MS 指纹图谱研究 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(10): 2414-2416.
- [19] 李 岩, 刘兴国, 朱仁愿, 等. 北柴胡中皂苷类的 HPLC 指纹图谱分析研究 [J]. 甘肃科技, 2018, 34(20): 129-132.
- [20] 周蔚昕, 刘 涛, 刘 钱, 等. 川芎饮片标准汤剂的 HPLC 及物理指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2018, 49(21): 5107-5115.
- [21] 王宇卿, 庄 果, 张须学, 等. 多元统计分析比较宛艾及 31 个产地艾叶 HPLC 指纹图谱 [J]. 中成药, 2018, 40(3): 653-658.
- [22] 陈育鹏, 赵 倩, 王贵金, 等. 连花清瘟胶囊超高效液相指纹图谱研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(12): 77-80.
- [23] 常志惠, 胡军华, 胡 杨. 基于 HPLC 结合化学计量学方法的紫苏叶指纹图谱研究 [J]. 中国处方药, 2017, 15(11): 24-26.
- [24] 李环环, 王英姿, 梁丽丽, 等. 不同产地大青叶饮片反相高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24): 81-85.