

· 质量分析研究 ·

## 消炎退热颗粒高效液相色谱指纹图谱及多成分含量测定研究

何艳<sup>1</sup>, 周艳玲<sup>1</sup>, 胡小祥<sup>2</sup>, 陈新明<sup>2</sup>(1. 湘南学院药学院, 湖南 郴州 423099; 2. 郴州市食品药品检验检测中心, 湖南 郴州 423002)

**摘要:** **目的** 建立消炎退热颗粒的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱、化学模式识别和多成分同时定量的质量评价方法。**方法** 采用 HPLC 法, 色谱柱为 Waters Atlantis T3 C<sub>18</sub>(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈-0.2%磷酸溶液为流动相梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温为 30 °C, 检测波长分别为 330、252 nm, 进样量: 10 μL。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 年版)对 21 批消炎退热颗粒进行相似度评价, 结合聚类分析(CA)、主成分分析(PCA)以及正交偏最小二乘-判别分析(OPLS-DA)对消炎退热颗粒进行整体质量评价, 筛选出不同批次消炎退热颗粒质量差异性标志物, 同时对质量差异性标志物和指标成分进行定量分析。**结果** 建立了消炎退热颗粒的 HPLC 指纹图谱, 共确定 12 个共有峰, 21 批样品相似度为 0.888~0.990。CA、PCA 将 21 批样品分为 3 类, 结合 OPLS-DA, 筛选出 4 个质量差异性标志物, 其中指出单咖啡酰酒石酸(1 号峰), 秦皮乙素(4 号峰), 菊苣酸(11 号峰)。定量分析的 4 个成分(单咖啡酰酒石酸, 秦皮乙素, 菊苣酸和甘草酸)的分离度 > 1.5, 精密度、稳定性和重复性试验的 RSD 均小于 2.32%, 平均加样回收率为 97.88%~100.08%, 21 批消炎退热颗粒中单咖啡酰酒石酸、秦皮乙素、菊苣酸和甘草酸的含量范围分别为 0.032 3~0.425 6、0.086 7~0.520 5、0.035 9~0.637 1、0.041 8~0.641 0 mg·g<sup>-1</sup>。**结论** 所建立的分析方法简单、准确, 可用于消炎退热颗粒的质量控制和评价。

**关键词:** 消炎退热颗粒; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 化学模式识别; 含量测定

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2021)05-0693-08

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.05.014

### Study on HPLC Fingerprint and Multi-component Quantitative Analysis of Xiaoyan Tuire Granules

HE Yan<sup>1</sup>, ZHOU Yanling<sup>1</sup>, HU Xiaoxiang<sup>2</sup>, CHEN Xinming<sup>2</sup> (1. School of Pharmacy, Xiangnan University, Chenzhou 423099 Hunan, China; 2. Chenzhou Institute Center for Food and Drug Control, Chenzhou 423002 Hunan, China)

**Abstract: Objective** To establish a quality evaluation method of Xiaoyan Tuire granules (XTG) based on HPLC fingerprint, chemical pattern recognition and simultaneous determination of multi-components. **Methods** The HPLC analysis was performed on a column of Waters Atlantis T3 C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with gradient elution of acetonitrile-0.2% phosphoric acid at a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was set at 330 nm and 252 nm, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 10 μL. The similarity of 21 batches of XTG was compared by using Traditional Chinese Medicine Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System (2012 edition). Cluster Analysis (CA), Principal Component Analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were used to screen the components that caused the quality differences in the batches. Combined with index components of each medicinal materials in ChP, quantitative method of the screened

收稿日期: 2020-11-09

作者简介: 何艳, 女, 硕士, 实验师, 研究方向: 中药制剂与质量分析。Email: 526378710@qq.com。通信作者: 胡小祥, 男, 硕士, 主管技师, 研究方向: 中药质量分析与标准研究。Email: hxx3318@126.com。

基金项目: 湖南省“双一流”药学应用特色学科基金(湘教通[2018]469号)。

quality markers and index components was established. **Results** The HPLC fingerprint of XTG was established and 12 common peaks were found. The similarities of 21 batches of samples were 0.888–0.990. The samples were divided into three categories by CA and PCA. Four common peaks were identified from 12 common peaks as marker compounds of XTG by OPLS-DA, and peak 1, 4 and 11 were identified as monocaffeoyltartaric acid, esculetin and chicoric acid, respectively. The resolution of 4 components of quantitative analysis (monocaffeoyltartaric acid, esculetin, chicoric acid and glycyrrhizic acid) was larger than 1.5, the RSDs of precision, stability and reproducibility tests were less than 2.32%, and the average recovery rates of four compounds were between 97.88% and 100.08%. The contents of monocaffeoyltartaric acid, esculetin, chicoric acid and glycyrrhizic acid in 21 batches of XTG were 0.0323–0.4256, 0.0867–0.5205, 0.0359–0.6371, 0.0418–0.6410 mg·g<sup>-1</sup>, respectively. **Conclusion** The method was simple and accurate, which can be used for the quality control and evaluation of XTG.

**Keywords:** Xiaoyan Tuire granules; HPLC; fingerprint; chemical pattern recognition; content determination

消炎退热颗粒为《中国药典》2015年版收录的中药制剂,是由大青叶、蒲公英、紫花地丁、甘草等中药制成的复方制剂,具有清热解毒、凉血消肿之功效,临床上用于外感热病、发热头痛、口干口渴、咽喉肿痛等症。现行质量标准是采用薄层色谱法对大青叶、紫花地丁、甘草进行鉴别以及高效液相色谱法测定秦皮乙素的含量<sup>[1]</sup>;其质量分析研究集中在中药材鉴别和单一化学成分含量测定<sup>[2-4]</sup>。中药是多成分、多靶点联合作用的结果,单一成分的质量控制无法反映中药复方制剂的整体质量。中药指纹图谱能表征中药制剂所含化学成分的整体信息,是评价中药整体质量的有效手段<sup>[5-8]</sup>;而指纹图谱结合化学模式识别的方法可对指纹图谱大量信息进行降维处理,并能筛选出影响各批次样品质量差异的标志物,已广泛应用于中药制剂质量控制的研究中<sup>[9-11]</sup>。因此,本研究采用高效液相色谱(HPLC)法建立消炎退热颗粒指纹图谱,结合聚类分析(CA)、主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)进行整体质量分析,从而筛选出批次间质量差异性标志物,同时结合《中国药典》中各药材的指标性成分,对单咖啡酰酒石酸、秦皮乙素、菊苣酸和甘草酸进行定量分析,为系统、全面地控制该制剂质量提供参考。

## 1 仪器与试剂

**1.1 仪器** Agilent 1260 高效液相色谱仪,配置 DAD 检测器(美国 Agilent 公司); XSE-205 十万分之一电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司), KQ-300DE 超声清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

**1.2 试剂** 秦皮乙素、菊苣酸和甘草酸铵对照品(中

国食品药品检定研究院,批号分别为:110741-201708、111752-201703、110731-201720;纯度分别为:99.0%、97.6%、97.7%);单咖啡酰酒石酸(成都普瑞法科技开发有限公司,批号:PRF10012701,纯度:99.84%);甲醇、乙腈为色谱纯(美国 MERCK 公司);其余试剂为分析纯,水为怡宝纯净水;21批消炎退热颗粒来自12个不同生产企业。厂家A,批号:180502(S1)、180403(S2)、190604(S3);厂家B,批号:181101(S4)、190201(S5)、190101(S6);厂家C,批号:181203(S7)、181008(S8)、180703(S9);厂家D,批号:190301(S10)、190303(S11);厂家E,批号:181101(S12)、190501(S13);厂家F,批号:180721(S14)、191136(S15);厂家G,批号:ZAA1801(S16);厂家H,批号:190501(S17);厂家I,批号:20190301(S18);厂家J,批号:181201(S19);厂家K,批号:190315(S20);厂家L,批号:181104(S21)。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱:Waters Atlantis T3 C<sub>18</sub>(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.2%磷酸(B),梯度洗脱(0~15 min, 5% A→10% A; 15~30 min, 10% A→20% A; 30~45 min, 20% A→25% A; 40~50 min, 25% A→45% A; 50~60 min, 45% A→60% A; 60~61 min, 60% A→5% A; 61~65 min, 5% A);流速:1.0 mL·min<sup>-1</sup>;柱温 30 ℃;检测波长为 330 nm(0~50 min)、252 nm(50~65 min);进样量:10 μL。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 混合对照品溶液** 精密称取单咖啡酰酒石酸对

照品 5.08 mg、秦皮乙素对照品 6.53 mg、菊苣酸对照品 7.11 mg、甘草酸铵对照品 7.65 mg(甘草酸质量=甘草酸铵质量/1.020 7)，分别置 25 mL 容量瓶中，加 70% 甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，制成各对照品储备液；再分别精密吸取各对照品储备液 2 mL 置 10 mL 容量瓶中，振摇，加 70% 甲醇定容至刻度，摇匀，即得含单咖啡酰酒石酸  $40.57 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、秦皮乙素  $51.72 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、菊苣酸  $55.52 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  甘草酸  $58.58 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的混合对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液** 取消炎退热颗粒样品适量，研细，取粉末约 2 g，精密称定，置锥形瓶中，精密加入 70% 甲醇 25 mL，称定质量；超声(功率 300 W，频率 40 kHz)20 min，放冷；再次称定质量，用 70% 甲醇补足减失的质量，摇匀，0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

**2.2.3 单味药与阴性样品溶液** 按消炎退热颗粒制备工艺，分别制备大青叶、蒲公英、紫花地丁、甘草的单味药样品和缺蒲公英、缺紫花地丁、缺甘草的阴性样品，按“2.2.2”项下方法制成单味药样品溶液和阴性样品溶液。

### 2.3 HPLC 指纹图谱的建立

**2.3.1 精密度试验** 分别精密吸取同一供试品溶液(批号：20190301)10  $\mu\text{L}$ ，按“2.1”项下的色谱条件，连续进样 6 次，记录色谱图。以秦皮乙素为参照峰，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果各共有峰的相对保留时间 RSD 均小于

0.7%，相对峰面积 RSD 均小于 3.0%，表明仪器精密度良好，符合指纹图谱的技术要求。

**2.3.2 稳定性试验** 精密吸取同一供试品溶液(批号：20190301)10  $\mu\text{L}$ ，按“2.1”项下的色谱条件，分别在 0、6、12、18、24、30 h 进样，记录色谱图。以秦皮乙素为参照峰，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果相对保留时间 RSD 均小于 0.3%，相对峰面积 RSD 均小于 2.0%，表明供试品在 30 h 内稳定。

**2.3.3 重复性试验** 取同一批消炎退热颗粒样品(批号：20190301)，依照“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.1”项下的色谱条件进行分析，记录色谱图。以秦皮乙素为参照峰，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果相对保留时间 RSD 均小于 0.4%，相对峰面积 RSD 均小于 1.5%，表明该方法重复性良好，符合指纹图谱的技术要求。

**2.3.4 指纹图谱建立及相似度评价** 取消炎退热颗粒 21 批(S1~S21)，依照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下的色谱条件分别进样，记录色谱数据。将色谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价软件”(2012 年版)，以 S1 号样品色谱图参照，采用中位数法，时间宽度设定为 0.2，多点校正，经全谱匹配共确定 12 个共有峰，并生成指纹图谱共有模式(R)，见图 1。21 批供试品相对于共有模式的相似度分别为 0.969、0.990、0.894、0.932、

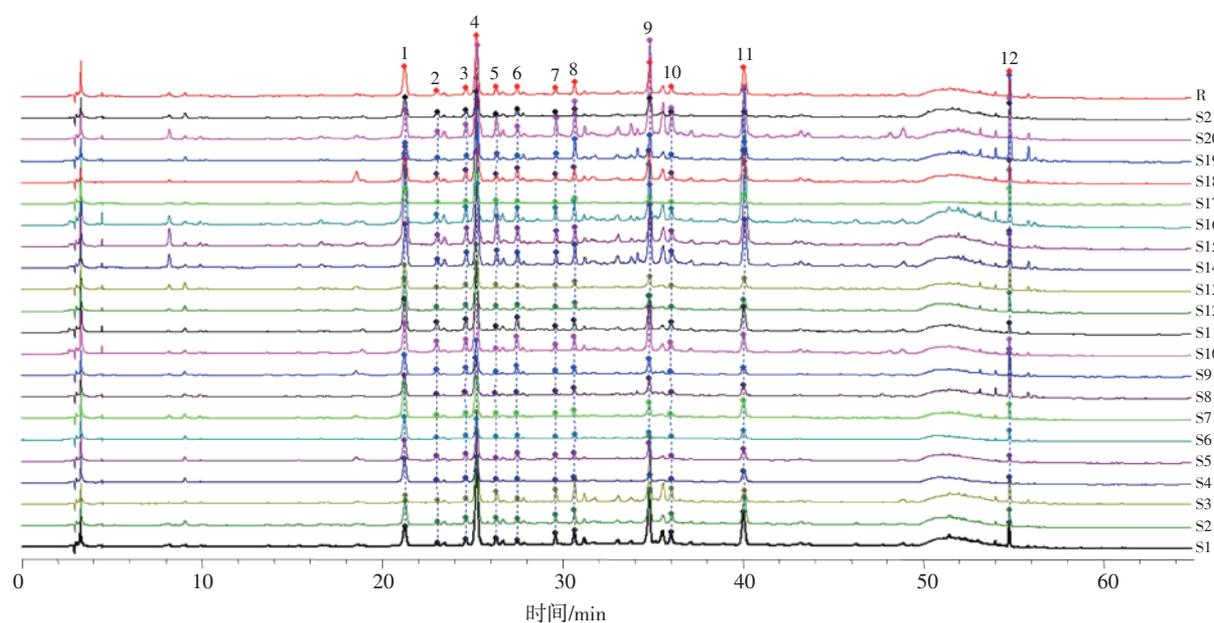


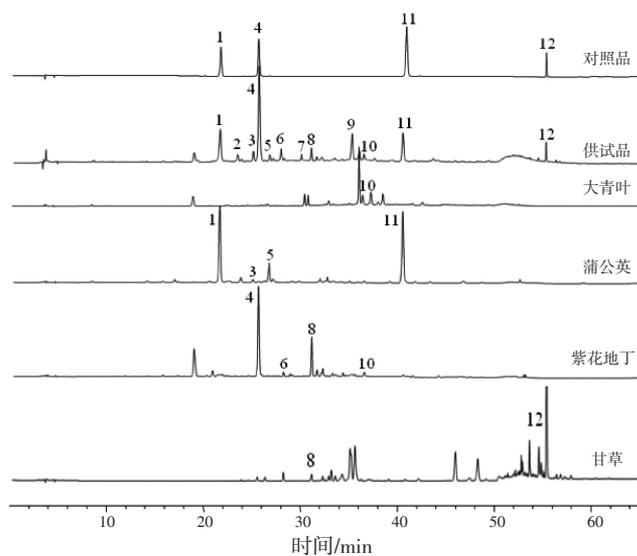
图 1 21 批消炎退热颗粒 HPLC 指纹图谱和对照指纹图谱

Figure 1 HPLC fingerprint and control fingerprint of 21 batches of Xiaoyan Tuire granules

0.977、0.918、0.953、0.950、0.967、0.969、0.990、0.946、0.971、0.986、0.943、0.929、0.973、0.977、0.888、0.948、0.953。结果表明各厂家消炎退热颗粒样品化学成分差异不明显，总体质量稳定。

**2.3.5 色谱峰的指认、归属及相对峰面积的计算** 取混合对照品溶液、供试品溶液和单味药材溶液，按“2.1”项下色谱条件依次进样测定。混合对照品溶液、供试品溶液和单味药材溶液色谱图见图2。通过各峰保留时间、紫外光谱图信息并结合混合对照品色谱图信息，指认出其中4个色谱峰，分别为1号单咖啡酰酒石酸、4号峰秦皮乙素、11号峰菊苣酸、12号峰甘草酸。将各单味药材色谱图与供试品色谱图比对分析，峰10来源于大青叶，峰1、3、5、11来源于蒲公英，峰4、6、8、10来源于紫花地丁，峰8、12来源于甘草，峰7、9未找到归属，可能是煎煮过程中产生的。其中4号峰分离度良好，峰位居中，峰面积较大且为所有样品共有，因此选作参考峰，计算其他共有峰相对峰面积。结果各共有峰相对峰面积的RSD为32.6%~80.50%，表明各

批次间共有峰存在较大差异，不同厂家之间、相同厂家不同批次间样品的质量存在差异。结果见表1。



注：1. 单咖啡酰酒石酸；4. 秦皮乙素；11. 菊苣酸；12. 甘草酸

图2 混合对照品、供试品和各单味药材 HPLC 图

Figure 2 HPLC chromatograms of mixed reference substances, sample and crude drugs

表 1 21 批消炎退热颗粒样品共有峰相对峰面积

Table 1 The relative areas of common peaks of 21 batches of *Xiyanan Tuire granules*

样品	峰号											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
S1	0.274	0.036	0.065	1.000	0.084	0.055	0.093	0.128	0.625	0.120	0.449	0.144
S2	0.388	0.038	0.078	1.000	0.079	0.060	0.081	0.129	0.467	0.117	0.437	0.114
S3	0.086	0.021	0.041	1.000	0.122	0.037	0.080	0.166	0.576	0.095	0.130	0.120
S4	1.076	0.065	0.108	1.000	0.072	0.079	0.040	0.108	0.231	0.076	0.466	0.116
S5	0.823	0.146	0.180	1.000	0.079	0.199	0.095	0.152	0.494	0.114	0.399	0.095
S6	1.217	0.074	0.117	1.000	0.091	0.100	0.043	0.126	0.278	0.070	0.422	0.222
S7	0.975	0.048	0.086	1.000	0.084	0.072	0.059	0.100	0.294	0.084	0.439	0.163
S8	0.660	0.060	0.079	1.000	0.065	0.084	0.058	0.130	0.351	0.112	0.284	0.542
S9	0.672	0.142	0.155	1.000	0.052	0.189	0.055	0.123	0.381	0.079	0.270	0.354
S10	0.399	0.140	0.122	1.000	0.033	0.151	0.047	0.113	0.434	0.076	0.216	0.085
S11	0.644	0.139	0.155	1.000	0.056	0.195	0.042	0.109	0.493	0.100	0.465	0.080
S12	0.795	0.060	0.093	1.000	0.072	0.093	0.043	0.097	0.240	0.033	0.209	0.182
S13	0.630	0.035	0.084	1.000	0.082	0.062	0.045	0.101	0.351	0.031	0.232	0.294
S14	0.582	0.090	0.144	1.000	0.162	0.134	0.085	0.174	0.730	0.214	0.588	0.213
S15	1.054	0.102	0.140	1.000	0.234	0.156	0.073	0.115	0.468	0.105	0.981	0.076
S16	0.685	0.045	0.107	1.000	0.160	0.094	0.069	0.117	0.476	0.096	1.221	0.211
S17	0.507	0.042	0.048	1.000	0.048	0.042	0.030	0.099	0.209	0.039	0.367	0.239
S18	0.388	0.072	0.090	1.000	0.060	0.099	0.045	0.087	0.262	0.052	0.343	0.098
S19	0.363	0.048	0.069	1.000	0.100	0.069	0.072	0.262	0.414	0.063	0.359	0.812
S20	0.293	0.053	0.103	1.000	0.185	0.088	0.118	0.226	0.820	0.242	0.494	0.170
S21	0.828	0.172	0.208	1.000	0.096	0.228	0.069	0.172	0.545	0.162	0.327	0.234
RSD/%	46.53	57.67	39.77	-	52.30	51.74	35.25	32.69	37.64	54.12	57.94	80.50

## 2.4 化学模式识别分析

**2.4.1 聚类分析(CA)** 以 21 批消炎退热颗粒指纹图谱中 12 个共有峰峰面积为变量, 导入 SPSS 19.0 统计软件, 进行标准化处理, 采用 Ward 法, 以平方欧氏距离作为样品的测度, 进行聚类分析, 结果见图 3。结果显示, 当平方欧氏距离为 10 时, 21 批 12 个厂家的样品可分为 2 类, 其中 S1~S13、S17~S19、S21 等 9 个厂家样品聚为第 I 类; S14~S16、S20 等 3 个厂家样品聚为第 II 类。当平方欧氏距离为 5 时, 第 I 类中的 9 个厂家样品又可分为 2 类, 其中 S4~S9、S12、S13、S17、S21 等 5 个厂家样品聚为第 I 类, S1、S2、S3、S10、S11、S18、S19 等 4 个厂家样品聚为第 II 类。结果表明同一厂家内部产品质量基本稳定, 不同厂家之间样品质量具有差异, 可能与不同厂家所用原料药材不同(产地、采收时间等)、生产工艺不同(提取设备、浓缩时间、干燥方式等)等有关。

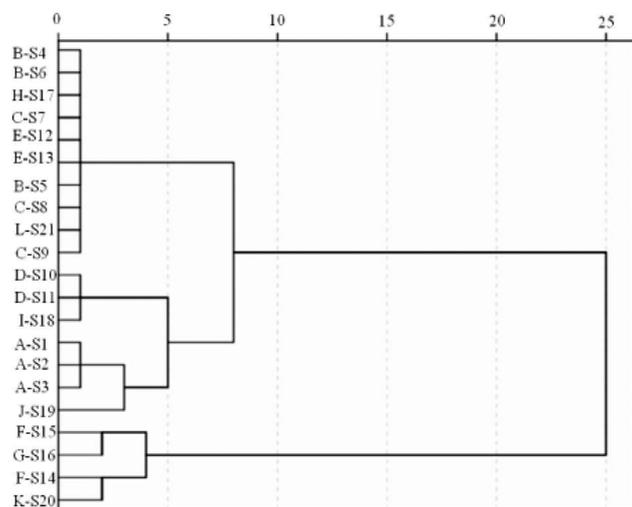


图 3 21 批消炎退热颗粒样品的聚类分析  
Figure 3 Dendrogram of cluster analysis of 21 batches of Xiaoyan Tuire granules

**2.4.2 主成分分析(PCA)** 以 21 批消炎退热颗粒指纹图谱中 12 个共有峰峰面积为变量, 导入 SIMCA 14.1 软件中进行 PCA 分析。PCA 模型中  $R^2_x$  值(反映累计解释能力参数)为 0.862,  $Q^2$  值(反映预测能力参数)为 0.660, 均大于 0.5, 说明该模型稳定性和预测性良好, 能较为全面地反映样品间的差异, 结果见图 4。21 批样品可以分为 3 类, 其中 S4~S9、S12、S13、S17、S21 聚为第 I 类, S1、S2、S3、S19、S10、S11、S18 聚为第 II 类, S14~S16、S20 聚为第 III 类。图 5 为样品 PCA 载荷图, 表示每个色谱峰对样本分布贡献的大小, 每个点代表一个色谱峰, 距

离载荷图原点越远的变量, 权重越大, 代表该色谱峰对样本整体分布所起作用就越大, 图中 1、4、9、11 号色谱峰距离原点较远, 表明其对该制剂整体质量的影响起主要作用。

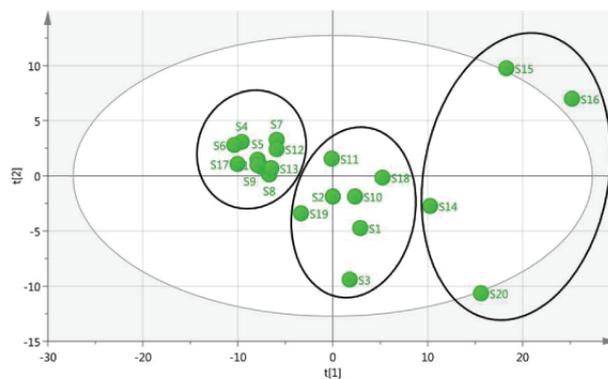


图 4 21 批消炎退热颗粒样品的 PCA 得分图  
Figure 4 The PCA score plots of 21 batches of Xiaoyan Tuire granules

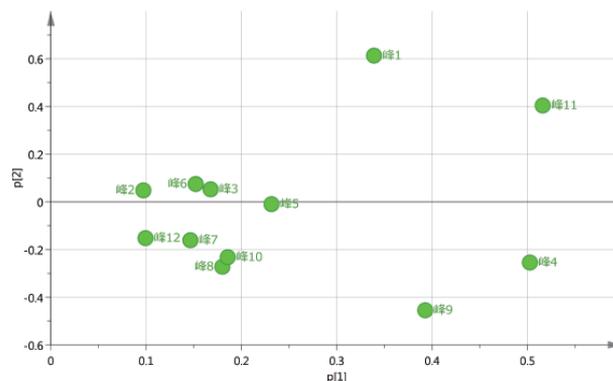


图 5 21 批消炎退热颗粒样品的 PCA 载荷图  
Figure 5 Loading plot of 21 batches of Xiaoyan Tuire granules

**2.4.3 正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)** 为了更好地分析样品之间的差异, 采用 SIMCA 14.1 对 21 批消炎退热颗粒样品进行判别分析。根据 CA 和 PCA 得到的分类结果, 使用有监督模式识别方法 OPLS-DA 建模分析, OPLS-DA 得分图见图 6。该模型中  $R^2_x$ (cum)(反映 X 矩阵的解释率)、 $R^2_y$ (cum)(反映模型的稳定性)和  $Q^2$ (cum)(反映模型的预测性)的值分别为 0.894、0.792 和 0.555, 均大于 0.5, 说明建立的模型稳定性和预测性均良好, 可用来判别分析不同批次消炎退热颗粒样品之间的质量差异。由图 6 可知, 21 批样品可以很好地分为 3 类, 与聚类分析、主成分分析结果一致。结合变量重要性投影值(VIP), 筛选出造成不同批次消炎退热颗粒样品差异的主要标志性化合物, VIP 值越大, 对样品的分类贡献越大, 即为最能导致样品间具有差异的成分,

见图 7。以  $VIP \geq 1$  为标准, 筛选得到 4 个影响较大的峰, 从大到小依次为 4、11、1 和 9 号峰。生产企业在生产过程中应对这 4 个成分予以重视, 建立合理的内控指标, 确保制剂质量的稳定。

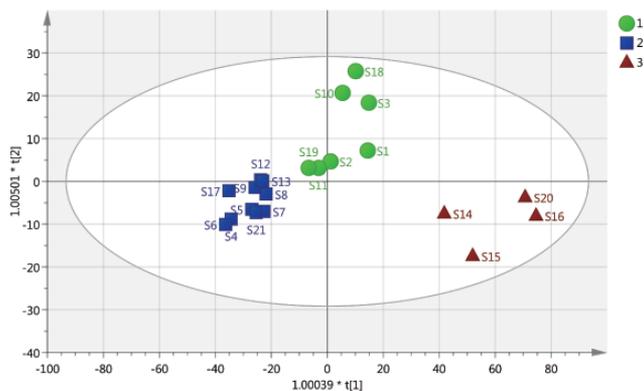


图 6 21 批消炎退热颗粒样品的 OPLS-DA 得分图  
Figure 6 The OPLS-DA score plots of 21 batches of *Xiaoyan Tuire granules*

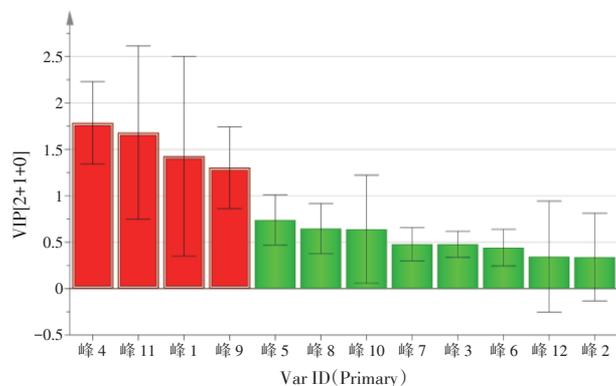
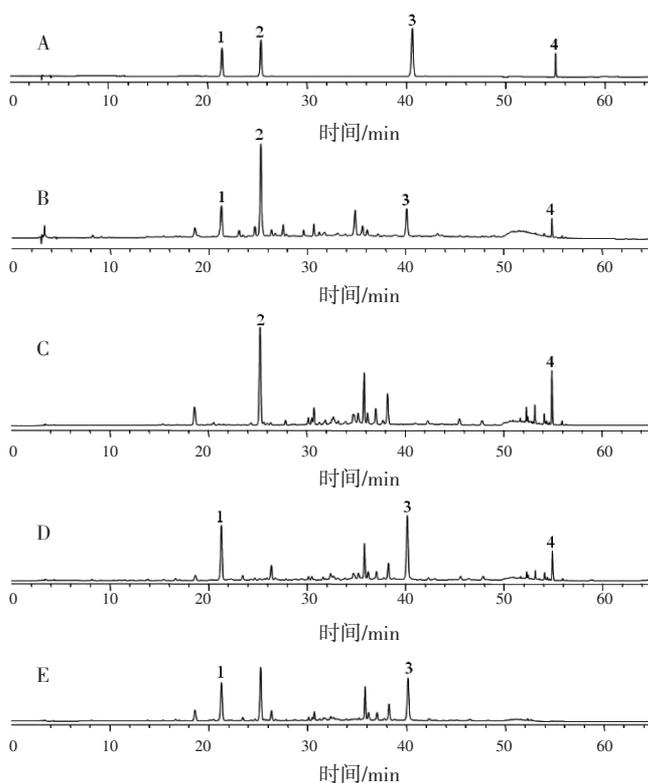


图 7 OPLS-DA 模型的 VIP 图  
Figure 7 The VIP plot of OPLS-DA

**2.5 多指标成分的含量测定** 指纹图谱结合化学模式识别技术筛选出消炎退热颗粒的 4 个质量标志物, 指认了其中 3 个, 分别为秦皮乙素、菊苣酸、单咖啡酰酒石酸。同时参考《中华人民共和国药典》(2020 年版) 相关定量指标, 本实验选择秦皮乙素、菊苣酸、单咖啡酰酒石酸和甘草酸作为指标成分, 建立 HPLC 含量测定方法。

**2.5.1 系统适用性试验** 分别精密吸取混合对照品、供试品、阴性样品溶液各 10  $\mu\text{L}$ , 按“2.1”项下色谱条件分析, 记录色谱图, 见图 8。结果 4 种成分之间的分离度均大于 1.5, 理论塔板数均大于 10 000, 拖尾因子为 0.98 ~ 1.15, 阴性样品溶液色谱图中在与对照品单咖啡酰酒石酸、秦皮乙素、菊苣酸、甘草酸保留时间相应位置上无色谱峰, 表明对测定无干扰, 方法专属性良好。



注: A. 混合对照品; B. 供试品; C. 缺蒲公英阴性样品; D. 缺紫花地丁阴性样品; E. 缺甘草阴性样品; 1. 单咖啡酰酒石酸; 2. 秦皮乙素; 3. 菊苣酸; 4. 甘草酸

图 8 消炎退热颗粒 HPLC 色谱图  
Figure 8 The HPLC chromatograms of *Xiaoyan Tuire granules*

**2.5.2 线性关系考察** 分别精密吸取混合对照品储备液 0.5、1、2、4、6、10 mL 置于 10 mL 量瓶中, 用 70% 甲醇定容至刻度。分别精密吸取 10  $\mu\text{L}$  注入高效液相色谱仪中, 按“2.1”项下色谱条件分析, 测定峰面积。以峰面积(Y)对质量浓度(X)进行线性回归, 得回归方程及相关系数, 见表 2。结果表明, 4 种有效成分在相应的浓度范围内呈良好的线性关系。取“2.2.1”项下混合对照品溶液, 用 70% 甲醇逐步稀释, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 取信噪比 10:1(S/N=10)时的混合对照品溶液浓度为定量限(LOQ), 见表 2。

**2.5.3 精密度试验** 精密吸取混合对照品储备液 5 mL 置 10 mL 量瓶中, 用 70% 甲醇定容至刻度。精密吸取 10  $\mu\text{L}$ , 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录得峰面积。结果单咖啡酰酒石酸、秦皮乙素、菊苣酸、甘草酸峰面积的 RSD 分别为 0.27%、0.24%、0.18%、0.27%(n=6), 表明仪器的精密度良好。

**2.5.4 稳定性试验** 精密吸取同一份供试品溶液(批号: 20190301) 10  $\mu\text{L}$ , 分别在 0、6、12、18、24、

表 2 4 种有效成分回归方程和定量限

Table 2 Results of linear equations of 4 components and LOQ

成分	线性方程	r	线性范围/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	定量限/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
单咖啡酰酒石酸	$Y=33.58X+0.6106$	0.9999	2.029~40.58	0.1276
秦皮乙素	$Y=32.72X+0.7233$	0.9999	2.586~51.72	0.1261
菊苣酸	$Y=32.65X-0.5891$	0.9999	2.776~55.52	0.1311
甘草酸	$Y=8.948X+0.3910$	0.9999	2.929~58.58	0.2219

30 h 按“2.1”项下色谱条件依次进样，记录峰面积。单咖啡酰酒石酸、秦皮乙素、菊苣酸、甘草酸峰面积的 RSD 分别为 1.08%、0.93%、0.74% 和 0.78% ( $n=6$ )。结果表明供试品溶液在 30 h 内稳定性良好。

**2.5.5 重复性试验** 精密称取同一批样品(批号: 20190301)6 份, 按“2.2.2”项下制备, 得供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果单咖啡酰酒石酸、秦皮乙素、菊苣酸、甘草酸含量分别为 0.159 5、0.414 6、0.137 3、0.145 7  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , RSD 分别为 2.32%、1.65%、1.77%、1.97% ( $n=6$ ), 表明本方法重复性良好。

**2.5.6 加样回收率试验** 取已知含量的消炎退热颗粒(批号: 20190301)6 份, 每份约 1 g, 精密称定, 分别置具塞锥形瓶中, 按 100% 样品含量精密加入各对照品溶液, 按“2.2.2”项下方法, 制备供试品溶液; 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图, 计算各成分加样回收率。结果单咖啡酰酒石酸、秦皮乙素、菊苣酸、甘草酸的平均加样回收率分别为 100.08%、99.40%、97.88%、98.65%; RSD 分别为 1.50%、2.72%、2.14%、2.03% ( $n=6$ )。结果见表 3。

**2.5.7 样品含量测定** 取 21 批消炎退热颗粒样品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按照“2.1”项下色谱条件进行测定, 计算含量, 见表 4。

### 3 讨论

**3.1 色谱条件的选择** 消炎退热颗粒由 4 味药材制得, 各成分分析波长不尽相同。通过对供试品溶液在 190~400 nm 范围进行全波长扫描, 发现 0~50 min 在 330 nm 波长下色谱峰数量最多, 50~65 min 在 252 nm 波长下色谱峰数量最多, 因此本试验采用波长变换功能, 分段进行测定。本实验还考察了甲醇-磷酸(0.1%, 0.2%)溶液、乙腈-磷酸(0.1%, 0.2%)溶液<sup>[12-13]</sup>进行梯度洗脱。结果表明, 以乙腈-0.2%磷酸溶液为流动相时, 各色谱峰分离效果好, 峰型最佳。

**3.2 供试品溶液制备的考察** 本实验考察了不同体积

表 3 消炎退热颗粒 4 种成分的加样回收率试验结果

Table 3 Results of recovery tests of four components

成分	取样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
单咖啡酰酒石酸	1.0470	0.1670	0.1629	0.3254	97.24	100.08	1.50
	1.0171	0.1622	0.1629	0.3273	101.35		
	1.0109	0.1612	0.1629	0.3244	100.18		
	1.0023	0.1599	0.1629	0.3249	101.29		
	1.0054	0.1604	0.1629	0.3241	100.49		
	1.0065	0.1605	0.1629	0.3233	99.94		
秦皮乙素	1.0470	0.4341	0.4386	0.8676	98.84	99.40	2.72
	1.0171	0.4217	0.4386	0.8549	98.77		
	1.0109	0.4191	0.4386	0.8557	99.54		
	1.0023	0.4156	0.4386	0.8401	96.79		
	1.0054	0.4168	0.4386	0.8462	97.90		
	1.0065	0.4173	0.4386	0.8760	104.58		
菊苣酸	1.0470	0.1438	0.1425	0.2797	95.37	97.88	2.14
	1.0171	0.1396	0.1425	0.2804	98.81		
	1.0109	0.1388	0.1425	0.2817	100.28		
	1.0023	0.1376	0.1425	0.2797	99.72		
	1.0054	0.1380	0.1425	0.2741	95.51		
	1.0065	0.1382	0.1425	0.2773	97.61		
甘草酸	1.0470	0.1525	0.1466	0.2962	98.02	98.65	2.03
	1.0171	0.1482	0.1466	0.2974	101.77		
	1.0109	0.1473	0.1466	0.2928	99.25		
	1.0023	0.1460	0.1466	0.2921	99.66		
	1.0054	0.1465	0.1466	0.2882	96.66		
	1.0065	0.1466	0.1466	0.2881	96.52		

分数甲醇溶液(100%, 70%, 50%)和不同体积分数乙醇溶液(95%, 70%, 50%)对消炎退热颗粒提取的影响, 结果以 70% 甲醇溶液提取时, 特征峰最丰富, 峰型最好; 然后考察了加热回流和超声 2 种提取方式, 结果表明超声提取时, 各待测成分提取率高; 最后考察了超声提取时间(10, 20, 30 min)对各成分提取的影响, 结果表明超声提取 20 min 效果为最佳。

**3.3 指纹图谱和成分含量分析** 指纹图谱相似度结果显示消炎退热颗粒有 2 批样品的相似度低于 0.9, 这表明同一厂家不同批次以及不同厂家之间的样品存

表 4 21 批消炎退热颗粒样品中 4 种成分含量测定结果  
( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $n=2$ )

Table 4 The content results of four compounds in 21 batches of samples( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $n=2$ )

样品	单咖啡酰酒石酸	秦皮乙素	菊苣酸	甘草酸
S1	0.088 8	0.332 5	0.149 9	0.175 4
S2	0.109 8	0.291 0	0.127 8	0.121 3
S3	0.032 3	0.386 7	0.050 6	0.169 9
S4	0.110 1	0.105 1	0.049 2	0.041 8
S5	0.096 4	0.120 4	0.048 4	0.049 3
S6	0.102 9	0.086 7	0.037 0	0.070 1
S7	0.159 3	0.167 5	0.074 0	0.099 9
S8	0.105 4	0.163 8	0.047 1	0.324 3
S9	0.094 4	0.144 5	0.035 9	0.187 1
S10	0.139 5	0.359 5	0.078 0	0.111 2
S11	0.157 6	0.251 4	0.117 6	0.073 3
S12	0.151 6	0.195 8	0.041 4	0.130 7
S13	0.113 3	0.184 4	0.043 4	0.197 6
S14	0.199 9	0.415 3	0.208 4	0.273 9
S15	0.426 5	0.215 5	0.408 9	0.115 6
S16	0.347 3	0.520 5	0.637 1	0.401 1
S17	0.062 5	0.126 7	0.047 1	0.109 4
S18	0.158 1	0.415 9	0.137 1	0.145 7
S19	0.076 2	0.215 5	0.077 9	0.641 0
S20	0.123 8	0.454 9	0.225 7	0.283 2
S21	0.093 0	0.115 2	0.037 5	0.098 7

在一定的差异,这可能与原料来源、采收时间、生产工艺的不同有一定的关系。结合 CA、PCA 和 OPLS-DA 分析可将消炎退热颗粒 21 批样品分成 3 类,筛选得到 4 个差异性物质标志物。建议厂家在生产过程中对这些标志物在各个生产环节中的变化进行跟踪,通过生产过程的优化,以更全面、稳定地控制药品质量。由表 4 可知,单咖啡酰基酒石酸含量的差异为 13 倍,秦皮乙素为 6 倍,菊苣酸为 17 倍,甘草酸为 15 倍,4 种成分的含量差异显著。建议生产厂家对原材料进行严格把控,同时增加蒲公英、

甘草等药材成分的含量测定,从而保证该制剂的临床疗效的稳定。

本研究首次采用指纹图谱结合化学模式识别技术对消炎退热颗粒不同批次之间的质量进行了深入分析,筛选出不同批次间质量差异性标志物,并建立了含量测定方法。该方法简单、准确,可为该产品的质量控制在提供全面依据。

#### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 1417.
- [2] 张俊燕. RP-HPLC法测定消炎退热颗粒中靛玉红的含量[J]. 药学与临床研究, 2007, 15(2): 163-164.
- [3] 方建和,熊胜泉,颜冬梅,等. 高效液相色谱法测定消炎退热颗粒中咖啡酸的含量[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(5): 1134-1135.
- [4] 胡莲. 消炎退热颗粒质量标准的研究[J]. 北方药学, 2015, 12(10): 10-11.
- [5] 胡彩云,刘紫薇,黄圆圆,等. 儿宝颗粒HPLC指纹图谱研究[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(2): 45-49.
- [6] 何艳,胡小祥,曾卫阳,等. 裸花紫珠分散片高效液相色谱指纹图谱研究及多指标成分定量分析[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(8): 969-974.
- [7] 宋兴发,周军,郭守城,等. 杏仁止咳合剂HPLC指纹图谱及7种成分的含量测定[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(1): 51-56.
- [8] 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): 5830-5836.
- [9] 何艳,胡小祥. 小儿解表颗粒HPLC指纹图谱研究及多指标成分定量分析[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(8): 1355-1363.
- [10] 周霖,孙志,薛文华,等. 基于UPLC指纹图谱结合化学模式识别的丹通脑软胶囊质量控制研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(16): 3279-3284.
- [11] 柴玉爽,曾瑚瑚,何源峰,等. 安宫牛黄丸的UPLC特征指纹图谱与化学模式识别[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(3): 565-571.
- [12] 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.
- [13] 梁梓敏,覃洁萍,郭海姣. 二丁颗粒HPLC指纹图谱建立及5种成分测定[J]. 中成药, 2019, 41(11): 2591-2596.

(编辑: 梁进权)