口炎清颗粒指纹图谱研究*

关倩怡[1]，黄 琳[2]，彭 维[1]，王德勤[2]，苏薇薇[1]
（1. 中山大学生命科学学院，广东 广州 510275；
2. 广州白云山和记黄埔中药有限公司，广东 广州 510515）

摘 要：采用 HPLC 法构建了口炎清颗粒的指纹图谱，用 Dikma PLATISIL ODS 色谱柱，以乙腈 - φ = 0.1% 甲酸溶液为流动相，检测波长为 254 nm。该指纹图谱有 23 个共有特征峰，确认了其中 7 个色谱峰的成分分别为绿原酸、咖啡酸、木犀草苷、哈巴俄苷、肉桂酸、甘草酸铵、甘草苷。构建的指纹图谱，操作简便，专属性强、重复性好，为该产品的质量监控提供了有效手段。

关键词：口炎清颗粒；高效液相色谱；指纹图谱
中图分类号：R917 **文献标志码**：A **文章编号**：0529 - 6579（2011）01 - 0115 - 04

The Fingerprint of Kouyanqing Granule

GUAN Qianyi[1], *HUANG Lin*[2], *PENG Wei*[1], *WANG Deqin*[2], *SU Weiwei*[1]
(1. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275; China;
2. Guangzhou Baiyunshan Hutchison Whampoa Traditional Chinese Medicine Co. Ltd., Guangzhou 510515, China)

Abstract: In this paper, the HPLC fingerprint of Kouyanqing Granule was established with Dikma PLATISIL ODS (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column, acetonitrile and 0.1% (φ) formic acid as mobile phase, and the detection wavelength was 254 nm. 23 common peaks were selected as the fingerprint peaks. Seven of these common peaks were identified as chlorogenic acid, caffeic acid, luteolin-7-O-glucoside, harpagoside, cinnamic acid, ammonium glycyrrhetate and glycyrrhizic acid. The method established is selective, simple and reproducible, which can be used for the quality control of Kouyanqing Granule.

Key words: Kouyanqing Granule; HPLC; fingerprint

口炎清颗粒是由山银花、玄参、天冬、麦冬、甘草五味药组成的中药制剂（国家中药保护品种），具有清热养阴、解毒消肿的功效，用于治疗阴虚火旺所致的口腔溃疡[1]，药效确切[2]。本研究建立了口炎清颗粒的指纹图谱，为其质量监控提供了依据，有利于确保该产品质量的稳定和均一。

1 仪器与试药

Dionex P680 型高效液相色谱仪（四元梯度泵、自动进样器、ATH-585 柱温箱、PDA-100 检测器及 Chromeleon 工作站，美国戴安公司）；BP211D 电子分析天平（瑞士沙多利斯公司）；T660/H 超声波清洗器（美国埃玛公司）。

绿原酸（批号：110753-200413）、咖啡酸（批号：110885-200102）、木犀草苷（批号：111720-200602）、哈巴俄苷（批号：111730-200604）、肉桂酸（批号：110786-200503）、甘草酸铵（批号：110731-200614）、甘草苷（批号：110610-200604）等对照品，均购自中国药品生物制品检定所；口炎清颗粒及其半成品由广州白云山和记黄埔中药有限

* 收稿日期：2010 - 03 - 09
基金项目：广东省科技计划资助项目（2010B050100013）
作者简介：关倩怡（1984 年生），女，硕士研究生；通讯作者：苏薇薇；E-mail：lssww@mail.sysu.edu.cn

公司提供。

乙腈（美国 Burdick & Jackson）为色谱纯；甲醇（广东光华化学厂有限公司）、甲酸（天津市富宇精细化工有限公司）均为分析纯；水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 *对照品溶液的制备* 分别精密称取绿原酸、咖啡酸、木犀草苷、哈巴俄苷、肉桂酸、甘草苷、甘草酸铵对照品约 2 mg，置 10 mL 量瓶中，用甲醇溶解并定容至刻度，摇匀，制成每 mL 含绿原酸、咖啡酸、木犀草苷、哈巴俄苷、肉桂酸、甘草苷、甘草酸铵各 0.2 mg 的对照品溶液。

2.1.2 *成品供试品溶液的制备* 取口炎清颗粒 10 袋，研细，取约 10 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 50 mL，密塞，称定质量，超声处理（功率 360 W，频率 35 kHz）30 min，放冷，再称定质量，用甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，精密量取续滤液 10 mL，减压回收溶剂至干，残渣加水约 5 mL 溶解，定量转移至固相萃取小柱（填料：C_{18}，规格：6 mL，500 mg），加水 15 mL 分次淋洗，淋洗液弃去，再用甲醇 15 mL 分次洗脱，收集洗脱液，回收溶剂至干，残渣定量加入甲醇 2 mL，使完全溶解，用 0.45 μm 微孔滤膜滤过，作为成品供试品溶液。

2.1.3 *药材供试品溶液的制备* 分别取药材粗粉，山银花 1 g、玄参 0.8 g、甘草 0.5 g，精密称定，分别置于圆底烧瓶中，加入 $\varphi = 50\ \%$ 乙醇 50 mL，回流提取 2 h，滤过，滤液减压浓缩至干，残渣加水约 5 mL 溶解，定量转移至 SPE 固相萃取小柱（填料：C_{18}，规格：6 mL，500 mg），加水 15 mL 分次淋洗，淋洗液弃去，再用甲醇 15 mL 分次洗脱，收集洗脱液，回收溶剂至干，残渣用少量甲醇溶解，定容至 10 mL，用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过，作为药材供试品溶液。

2.1.4 *阴性供试品溶液的制备* 分别取缺山银花、缺玄参、缺甘草的阴性样品适量，按“2.1.2 成品供试品溶液的制备”的方法操作。

2.2 色谱条件

Dikma PLATISIL ODS（250 mm × 4.6 mm，5 μm）色谱柱；以乙腈为流动相 A，以 $\varphi = 0.1\%$ 甲酸溶液为流动相 B，梯度洗脱：0 ~ 15 min，B（98 →90）；15 ~ 120 min，B（90 →59）；120 ~ 125 min，B（59 →59）；流速：0.8 mL/min；检测波长：254 nm；柱温：25 ℃。理论塔板数以绿原酸计算不低于 4 000。

3 方法学考察

3.1 精密度试验

按“成品供试品溶液的制备”方法制备口炎清颗粒供试品溶液，连续进样 6 次，记录 HPLC 色谱图，以保留时间 28 min 峰面积较大、较稳定的 2 号色谱峰（绿原酸）作为参照峰，计算各特征峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD。结果相对保留时间的 RSD 为 0.05 % ~ 0.20%，相对峰面积的 RSD 为 0.48 % ~ 1.78 %；采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版》进行评价，相似度大于 0.999，表明精密度好。

3.2 稳定性考察

按“供试品溶液的制备”方法制备口炎清颗粒供试品溶液，分别在 0、3、6、9、12、24、48 h 进样分析，记录 HPLC 色谱图，以绿原酸色谱峰作为参照峰，计算各特征峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD。结果相对保留时间的 RSD 为 0.05 % ~ 0.44 %，相对峰面积的 RSD 为 0.38 % ~ 1.93 %；采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版》进行评价，相似度大于 0.999，表明供试品溶液在放置 48 h 内稳定性良好。

3.3 重复性试验

取同一批口炎清颗粒，按“成品供试品溶液的制备”方法平行操作，制备 6 份口炎清颗粒供试品溶液，分别进样分析，记录 HPLC 色谱图，以绿原酸色谱峰作为参照峰，计算各特征峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD。结果相对保留时间的 RSD 为 0.09 % ~ 0.34 %，相对峰面积的 RSD 为 0.19 % ~ 2.04 %；采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版》进行评价，相似度大于 0.980，表明重复性好。

4 口炎清颗粒指纹图谱的构建及相关技术参数

4.1 指纹图谱的构建

取 10 个批号的口炎清颗粒供试品溶液，按“2.2”项下色谱条件进行 HPLC 分析，记录色谱图，见图 1。10 批口炎清颗粒共检测到 23 个共有特征峰，通过《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 A 版》对 10 批口炎清颗粒高效液相指纹图谱进行评价，获得共有模式（参照指纹图谱）见图 2。

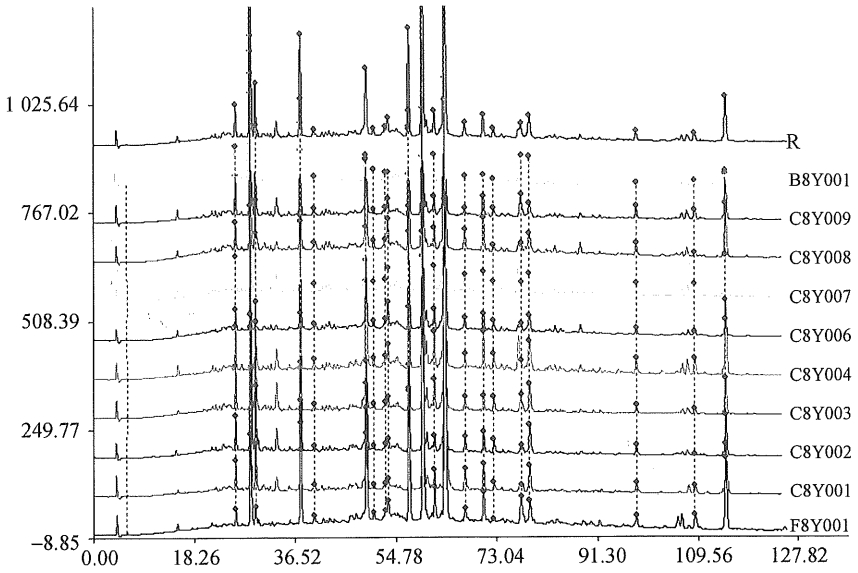

图 1　10 批口炎清颗粒 HPLC 指纹图谱

Fig. 1　HPLC fingerprint of 10 batches of Kouyanqing granule

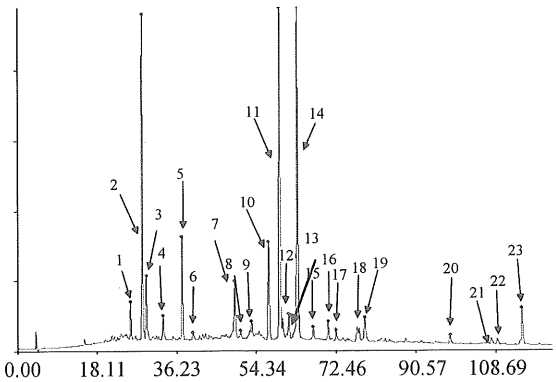

图 2　口炎清颗粒 HPLC 参照指纹图谱

Fig. 2　HPLC referential fingerprint of Kouyanqing granule

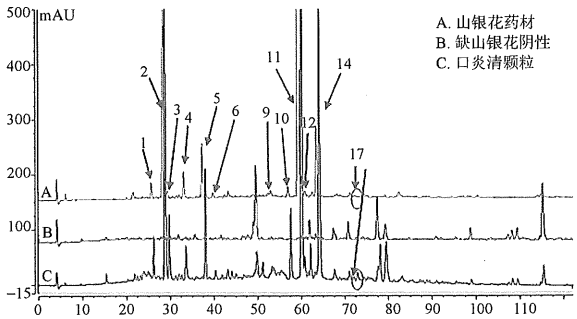

图 3　口炎清颗粒指纹图谱、山银花药材色谱图及缺山银花阴性色谱图

Fig. 3　HPLC chromatograms of Kouyanqing granule fingerprint, Flos Lonicera, negative sample without Flos Lonicera

（A：山银花药材色谱图；B：缺山银花阴性色谱图；C：口炎清颗粒指纹图谱）

4.2　10 批口炎清颗粒指纹图谱比较

10 批口炎清颗粒相似度系数均大于 0.90，证明口炎清颗粒的生产工艺稳定，产品的均一性较好。

4.3　共有峰的标定及归属

分别精密吸取药材及阴性供试品溶液，注入液相色谱仪，采集色谱图。通过保留时间及 PDA 光谱对比，确定口炎清颗粒 23 个共有特征峰中，归属于山银花的色谱峰应有 12 个，归属于玄参的色谱峰有 4 个，归属于甘草的色谱峰应有 8 个，其中 18 号峰为玄参与甘草共有，见图 3 ~ 5。取对照品溶液，按“2.2”项下色谱条件，进样分析，根据保留时间定性，采用 PDA 光谱对比，确定 2、4、7、9、18、19、23 号峰分别为绿原酸、咖啡酸、甘草酸铵、木犀草苷、哈巴俄苷、肉桂酸、甘草苷，结果见图 6。

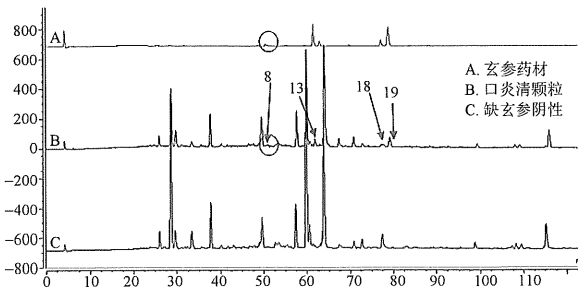

图 4　口炎清颗粒指纹图谱、玄参药材色谱图及缺玄参阴性色谱图

Fig. 4　HPLC chromatograms of Kouyanqing granule fingerprint, Radix Scrophulariae, negative sample without Radix Scrophulariae

（A：玄参药材色谱图；B：口炎清颗粒指纹图谱；C：缺玄参阴性色谱图）

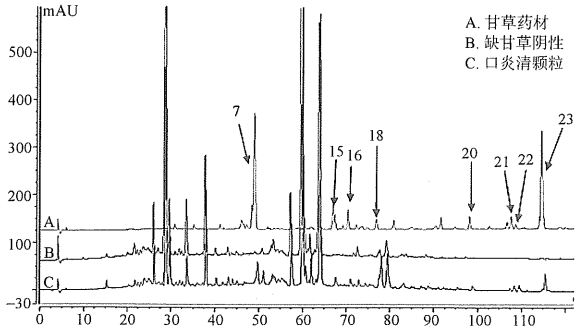

图 5 口炎清颗粒指纹图谱、甘草药材色谱图及缺甘草阴性色谱图

Fig. 5 HPLC chromatograms of Kouyanqing granule fingerprint, Licorice, negative sample without Licorice

（A：甘草药材色谱图；B：缺甘草阴性色谱图；C：口炎清颗粒指纹图谱）

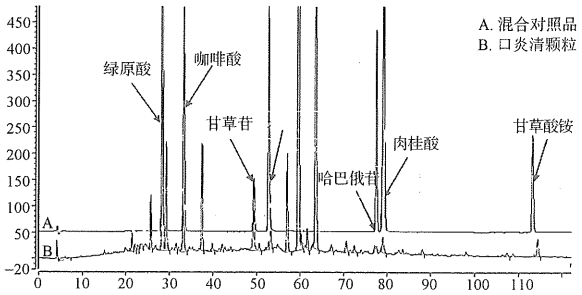

图 6 口炎清颗粒指纹图谱及混合对照品色谱图

Tab. 6 Chromatogram of Kouyanqing granule fingerprint and mixture of standards

（A：混合对照品色谱图；B：口炎清颗粒指纹图谱）

5 讨 论

1）口炎清颗粒含有机酸、环烯醚萜、多羟基黄酮等成分[3-5]，这些成分易溶于水，在色谱柱上不被保留，导致出峰时间太快。因此，选择流动相时，在水相中加入 $\varphi = 0.1\%$ 甲酸，可有效控制出峰时间，使指纹图谱各色谱峰分离效果良好。

2）采用二极管阵列检测器（PDA），考察了 200～400 nm 范围波长的图谱，分别在波长 254、278、290、355、208 nm 测试样品[6-8]，254 nm 能涵盖绝大多数的峰，基线平稳，分离度良好。虽然绿原酸、咖啡酸、甘草苷在此紫外吸收较低，但其在口炎清颗粒中的含量大，仍能被检出，最终综合考虑选用 254 nm 作为检测波长。

3）通过对照品加入法及 PDA 光谱定性，分别确证了绿原酸、咖啡酸、木犀草苷、哈巴俄苷、肉桂酸、甘草酸铵、甘草苷 7 个已知成分的色谱峰。本研究构建的指纹图谱，操作简便，专属性强、重复性好，为该产品的质量监控提供了有效手段，有利于确保产品质量的稳定、均一。

参考文献：

[1] 中华人民共和国药典委员会. 中国药典：一部[M]. 北京：化学工业出版社，2005：334.

[2] 李忠思，张小娜，梁永，等. 口炎清药效学研究. 中药新药与临床药理，1999，10(4)：216－217.

[3] 柴兴云，李萍，唐力英. 山银花化学成分研究[J]. 中国中药杂志，2004，29(9)：865－866.

[4] 赵国玲，刘佳佳，林丹，等. 金银花化学成分及药理研究进展[J]. 中成药，2002，24(12)：973－976.

[5] 师怡，许晖，阙慧卿，等. 玄参化学成分的药理作用和分析方法[J]. 海峡药学，2006，18(4)：58－60.

[6] 张宇平，黄可龙. 高效液相色谱法同时测定金银花中 5 种有机酸[J]. 分析试验室，2007，26(7)：68－69.

[7] 刘承伟，毕志明，祝艳斐，等. 玄参中 4 种主要活性成分的 HPLC 定量分析[J]. 中国药学杂志，2007，42(21)：1614－1616.

[8] 吴昭晖，罗佳波，游文玮. 甘草药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药，2005，36(12)：1868－1872.