doi:10. 13407/j. cnki. jpp. 1672-108X. 2022. 10. 008

·论著·

高效液相一测多评法定量分析小儿清热化痰栓中 8 种主要成分含量

张传香[1],何苗[1],马丹凤[1],王海斌[2](1. 湖南省儿童医院,长沙　410007;2. 湖南省药品检验研究院,长沙　410001)

[摘要]目的:采用高效液相一测多评(HPLC-QAMS)法,建立小儿清热化痰栓中马钱子苷、当药苷、断氧化马钱子苷、甘草苷、甘草酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和连翘苷含量的检测方法。**方法**:采用 Agilent Zorbax SB-C_{18} 色谱柱,以乙腈-0. 2%磷酸水溶液为流动相,梯度洗脱;检测波长分别为 237 nm(检测马钱子苷、当药苷、断氧化马钱子苷、甘草苷和甘草酸)和 275 nm(检测连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和连翘苷);流速 1. 0 mL/min;柱温 30 ℃。以甘草苷为内参物,通过测定其与马钱子苷、当药苷、断氧化马钱子苷、甘草酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和连翘苷的相对校正因子(RCF),计算各成分含量,同时与外标法(ESM)实测值进行对比,验证 HPLC-QAMS 法的可行性。**结果**:马钱子苷、当药苷、断氧化马钱子苷、甘草苷、甘草酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和连翘苷质量浓度分别在 4. 08~102. 00、0. 77~19. 25、4. 59~114. 75、1. 35~33. 75、2. 74~68. 50、1. 61~40. 25、7. 73~193. 25、2. 19~54. 75 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r \geqslant 0.999\ 1$),平均加样回收率及 RSD 分别为 99. 45%(0. 96%)、97. 49%(1. 45%)、98. 85%(1. 08%)、99. 13%(0. 78%)、100. 04%(0. 76%)、98. 63%(1. 59%)、100. 07%(0. 60%)和 96. 99%(1. 26%)。小儿清热化痰栓中各成分 HPLC-QAMS 法计算含量值与外标法实测含量值无明显差异。**结论**:所建立的 HPLC-QAMS 法操作简便易行,成本较低,可用于小儿清热化痰栓多指标成分的质量评价。

[关键词]小儿清热化痰栓;高效液相一测多评法;多指标成分;相对校正因子;质量评价

[中图分类号]R974　　**[文献标识码]**A　　**[文章编号]**1672-108X(2022)10-0026-05

Determination of 8 Main Components in Xiao' er Qingre Huatan Suppository by High Performance Liquid Chromatography-Quantitative Analysis of Multi-Components by Single-Marker

Zhang Chuanxiang[1], He Miao[1], Ma Danfeng[1], Wang Haibin[2] (1. *Hunan Children' s Hospital*, *Changsha*　410007, *China*; 2. *Hunan Institute for Drug Control*, *Changsha*　410001, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To establish the determination method of loganin, sweroside, secoxyloganin, liquiritin, glycyrrhizic acid, forsythoside B, forsythoside A and forsythin in Xiao' er Qingre Huatan suppository based on high performance liquid chromatography-quantitative analysis of multi-components by single-marker (HPLC-QAMS) method. **Methods**: Agilent Zorbax SB-C_{18} was adopted, acetonitrile-0. 2% phosphoric acid solution was the mobile phase by gradient elution. The detection wavelength was set at 237 nm for loganin, sweroside, secoxyloganin, liquiritin and glycyrrhizic acid, and 275 nm for forsythoside B, forsythoside A and forsythin. The flow rate was 1. 0 mL/min at column temperature of 30 ℃. Liquiritin was used as an internal standard, the relative correction factors (RCF) of loganin, sweroside, secoxyloganin, glycyrrhizic acid, forsythoside B, forsythoside A and forsythin were calculated. The method was validated by comparison of the quantitative results between external standard method (ESM) and HPLC-QAMS method. **Results**: Loganin, sweroside, secoxyloganin, liquiritin, glycyrrhizic acid, forsythoside B, forsythoside A and forsythin showed good linear relationships within the ranges from 4. 08 to 102. 00, from 0. 77 to 19. 25, from 4. 59 to 114. 75, from 1. 35 to 33. 75, from 2. 74 to 68. 50, from 1. 61 to 40. 25, from 7. 73 to 193. 25 and from 2. 19 to 54. 75 μg/mL ($r \geqslant 0.999, 1$), the average recoveries and RSD were respectively 99. 45% (0. 96%), 97. 49% (1. 45%), 98. 85% (1. 08%), 99. 13% (0. 78%), 100. 04% (0. 76%), 98. 63% (1. 59%), 100. 07% (0. 60%) and 96. 99% (1. 26%). There was no significant difference between the contents calculated by HPLC-QAMS and measured by external standard method for each component in Xiao' er Qingre Huatan suppository. **Conclusion**: The HPLC-QAMS method is simple with lower cost, and can be used for the multi-index component quality evaluation of Xiao' er Qingre Huatan suppository.

[**Keywords**] Xiao' er Qingre Huatan suppository; high performance liquid chromatography-quantitative analysis of multi-components by single-marker; multi-index components; relative correction factor; quality evaluation

小儿清热化痰栓由忍冬藤、甘草、连翘、茯苓等 11 味中药加工而成,具有清热解毒、化痰止咳之功效,临床上主要用于对痰热内盛、肺气下降而引起的咳嗽喘息、痰黄黏稠、便秘溲赤、高热惊抽等病症患者的治疗。中药及其制剂的产品质量直接影响中医临床辨证论治的疗效,尤其是中成药复方制剂具有成分复杂性、多样性以及多功效、多靶点的作用机制,单指标成分难以综合评价复方制剂的整体水平和质量优劣,基于中医整体观理论,多指标成分质量评价模式在中药及其制剂的质量控制中已得以广泛应用。高效液相一测多评(HPLC-QAMS)法通过测定一种对照品实现对多种成分含量的同时测定,现已广泛应用于中药材、中药饮片以及中药制剂多成分测定中,有效提高了中药质控水平,是一种适合中药特点的多指标成分质量评价模式[1],同时有效地解决了传统多指标成分评价存在对照品难以制备、检验成本高昂、难以普及应用等瓶颈,有力推动了中药多指标成分质量评价模式的普及应用。小儿清热化痰栓现行质量控制方法[2]和文献报道[3]仅对黄芩苷进行了

作者简介:张传香(1983. 10-),女,硕士,主管药师,主要从事医院药学与药物制剂工作,E-mail: sflfmr99@ 163. com

定量控制,难以对该制剂的整体质量进行综合评价。本研究按照中医配伍组方理论,结合中药质量标志物确认原则,采用 HPLC-QAMS 法对小儿清热化痰栓君药忍冬藤所含马钱子苷、当药苷和断氧化马钱子苷,臣药连翘所含连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和连翘苷,以及佐使药甘草所含甘草苷和甘草酸 8 种成分含量进行同时检测,建立小儿清热化痰栓多指标成分质量评价模式,以期为提升该制剂质量控制水平,确保临床治疗效果的稳定性和一致性提供数据支持。

1 材料和仪器

对照品马钱子苷、甘草苷、甘草酸铵、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和连翘苷来源于中国食品药品检定研究院,批号分别为 111640-201808、111610-201908、110731-202021、111811-201603、111810-201707 和 110821-201816,含量分别为 99.0%、95.0%、96.2%、96.6%、97.2%和 95.1%;对照品当药苷和断氧化马钱子苷来源于成都普瑞法科技开发有限公司,批号分别为 PRF8061441、PRF8071841,含量分别为 99.4%、98.8%;小儿清热化痰栓来源于哈药集团世一堂制药厂,批号分别为 1902401、1904412、1905403,规格为每粒 0.9 g。乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂为分析纯。LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),UltiMate 3000 型高效液相色谱仪(美国 Thermo Fisher 公司),AB-204 型电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司),BT-40A 型数控超声波清洗机(成都雅源科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Agilent Zorbax SB-C_{18}(250 mm×4.6 mm,5 μm)液相色谱柱;以乙腈(A)-0.2%磷酸(B)为流动相进行梯度洗脱(0~8 min,10.0%A;8~19 min,10.0%A→21.0%A;19~28 min,21.0%A→36.0%A;28~47 min,36.0%A→52.0%A;47~60 min,52.0%A→10.0%A);检测波长分别为 237 nm(0~28 min 检测马钱子苷、当药苷、断氧化马钱子苷、甘草苷和甘草酸)[4-9]和 275 nm(28~60 min 检测连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和连翘苷)[10];流速 1.0 mL/min;柱温 30 ℃;进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 取对照品马钱子苷、当药苷、断氧化马钱子苷、甘草苷、甘草酸铵、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和连翘苷各适量,用 70%甲醇溶液制成马钱子苷 0.816 mg/mL、当药苷 0.154 mg/mL、断氧化马钱子苷 0.918 mg/mL、甘草苷 0.270 mg/mL、甘草酸 0.548 mg/mL、连翘酯苷 B 0.322 mg/mL、连翘酯苷 A 1.546 mg/mL、连翘苷 0.438 mg/mL 的混合对照品贮备液(甘草酸质量=甘草酸铵质量/1.020 7)。精密吸取上述贮备液 1.0 mL,用 70%甲醇溶液稀释至 20 mL,制成混合对照品溶液(马钱子苷 40.8 μg/mL、当药苷 7.7 μg/mL、断氧化马钱子苷 45.9 μg/mL、甘草苷 13.5 μg/mL、甘草酸 27.4 μg/mL、连翘酯苷 B 16.1 μg/mL、连翘酯苷 A 77.3 μg/mL、连翘苷 21.9 μg/mL)。

2.2.2 供试品溶液 (1)小儿清热化痰栓供试品溶液的制备:取小儿清热化痰栓数粒,剪碎,取 0.4 g,精密称定,加 70%甲醇 20 mL,在(45±5)℃水浴中进行 45 min 超声提取处理,放凉后用 70%甲醇稀释至 25 mL,摇匀,过滤,制得小儿清热化痰栓供试品溶液。(2)阴性供试品溶液的制备:取按小儿清热化痰栓质量标准项下处方比例和制法制备的缺忍冬藤、缺甘草和缺连翘的阴性供试品适量,按上述方法分别制成 3 种阴性供试品溶液。

2.3 方法学考察

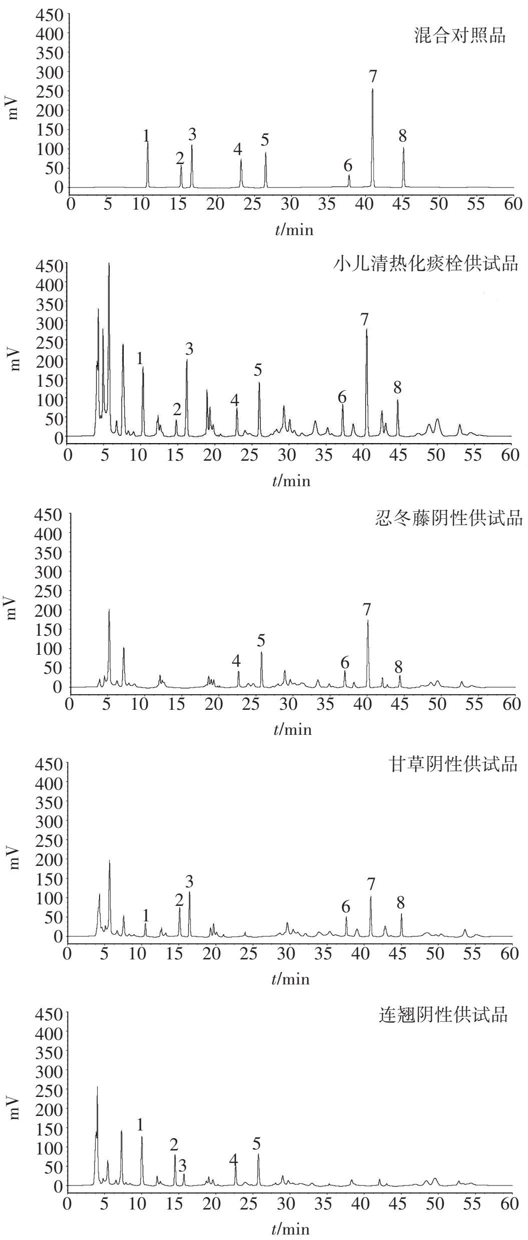
2.3.1 专属性实验 精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液及“2.2.2”项下供试品溶液各 10 μL,注入高效液相色谱仪中依法检测,记录色谱图(图 1)。结果显示小儿清热化痰栓中马钱子苷、当药苷、断氧化马钱子苷、甘草苷、甘草酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和连翘苷与相邻色谱峰能够有效分离(分离度>1.5);色谱峰峰形对称,拖尾因子符合中国药典规定;理论塔板数按各成分色谱峰计均≥4 000。阴性供试品对小儿清热化痰栓中马钱子苷、当药苷、断氧化马钱子苷、甘草苷、甘草酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和连翘苷的同时检测无干扰。

2.3.2 线性关系 精密吸取“2.2.1”项下贮备液 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL,分别用 70%甲醇溶液制成 6 个系列质量浓度溶液,各进样 10 μL 注入高效液相色谱仪中,测定马钱子苷、当药苷、断氧化马钱子苷、甘草苷、甘草酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和连翘苷的峰面积,以峰面积 Y 对质量浓度 X 进行线性回归,得回归方程和线性范围,见表 1。

2.3.3 精密度实验 精密吸取同一份小儿清热化痰栓供试品溶液 10 μL,注入高效液相色谱仪中,连续操作 6 次,测得马钱子苷、当药苷、断氧化马钱子苷、甘草苷、甘草酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和连翘苷峰面积的 RSD 依次为 0.69%、1.12%、0.71%、0.98%、0.83%、1.04%、0.55%和 0.79%。

2.3.4 重复性实验 取批号 1902401 小儿清热化痰栓适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液 6 份,各进样 10 μL,检测马钱子苷、当药苷、断氧化马钱子苷、甘草苷、甘草酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和连翘苷的峰面积,计算得 8 种成分含量的 RSD 依次为 0.98%、1.86%、0.95%、1.69%、1.08%、1.30%、0.85%和 1.14%。

2.3.5 稳定性实验 取批号 1902401 小儿清热化痰栓同一份供试品溶液,于制备后 0、3、6、12、18、24 h 各进样 10 μL 检测马钱子苷、当药苷、断氧化马钱子苷、甘草苷、甘草酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和连翘苷的峰面积,结果小儿清热化痰栓供试品溶液 24 h 内稳定,8 种成分峰面积的 RSD 依次为 0.76%、1.21%、0.63%、1.01%、0.79%、1.18%、0.67%和 0.82%。



1. 马钱子苷;2. 当药苷;3. 断氧化马钱子苷;4. 甘草苷;
5. 甘草酸;6. 连翘酯苷 B;7. 连翘酯苷 A;8. 连翘苷

图 1 HPLC 图

表 1 小儿清热化痰栓中各待测成分的回归方程和线性范围

成分	回归方程	线性范围/(μg/mL)	r
马钱子苷	$Y=1.381\ 1\times10^6X+616.2$	4.08~102.00	0.999 6
当药苷	$Y=5.863\ 7\times10^5X-1\ 140.9$	0.77~19.25	0.999 2
断氧化马钱子苷	$Y=1.310\ 4\times10^6X+859.5$	4.59~114.75	0.999 1
甘草苷	$Y=7.988\ 4\times10^5X-1\ 006.8$	1.35~33.75	0.999 6
甘草酸	$Y=1.270\ 2\times10^6X-399.3$	2.74~68.50	0.999 7
连翘酯苷 B	$Y=7.420\ 2\times10^5X+1\ 182.7$	1.61~40.25	0.999 9
连翘酯苷 A	$Y=1.623\ 6\times10^6X-786.2$	7.73~193.25	0.999 7
连翘苷	$Y=9.728\ 1\times10^5X+1\ 065.6$	2.19~54.75	0.999 8

2.3.6 加样回收率 取批号 1902401 马钱子苷、当药苷、断氧化马钱子苷、甘草苷、甘草酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和连翘苷含量已知的小儿清热化痰栓适量,剪碎后取 9 份,每份 0.2 g,精密称定,随机分成 3 组,每组 3 份,依次精密加入混合对照品溶液(马钱子苷 0.293 mg/mL、当药苷 0.057 mg/mL、断氧化马钱子苷 0.365 mg/mL、甘草苷 0.092 mg/mL、甘草酸 0.217 mg/mL、连翘酯苷 B 0.125 mg/mL、连翘酯苷 A 0.522 mg/mL、连翘苷 0.171 mg/mL)1.0、2.0 和 3.0 mL 各一组,再按“2.2.2”项下方法制备加样供试品溶液。精密吸取 10 μL 进样检测马钱子苷、当药苷、断氧化马钱子苷、甘草苷、甘草酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和连翘苷的峰面积,计算得 8 种成分的平均加样回收率及 RSD 分别为 99.45%(0.96%)、97.49%(1.45%)、98.85%(1.08%)、99.13%(0.78%)、100.04%(0.76%)、98.63%(1.59%)、100.07%(0.60%)和 96.99%(1.26%)。

2.4 相对校正因子(RCF)的测定

取“2.3.2”项下 6 个系列质量浓度溶液各 10 μL 进样检测马钱子苷、当药苷、断氧化马钱子苷、甘草苷、甘草酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和连翘苷的峰面积,以甘草苷为内参物,按 $RCF_{k/s}=f_k/f_s=(X_k\times Y_s)/(X_s\times Y_k)$(式中 X、Y 分别代表 8 种成分的质量浓度和峰面积,下标 k 和 s 分别代表其他待测成分和内参物)计算马钱子苷、当药苷、断氧化马钱子苷、甘草酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和连翘苷的 RCF,见表 2。

表 2 以甘草苷为内参物的 RCF

序号	马钱子苷	当药苷	断氧化马钱子苷	甘草酸	连翘酯苷 B	连翘酯苷 A	连翘苷
1	0.582 6	1.357 9	0.624 6	0.636 4	1.086 9	0.495 4	0.819 9
2	0.592 0	1.362 2	0.617 5	0.611 8	1.060 6	0.490 8	0.802 7
3	0.578 9	1.367 2	0.602 9	0.628 3	1.078 9	0.497 7	0.832 8
4	0.564 9	1.376 5	0.610 1	0.633 9	1.066 9	0.484 5	0.814 5
5	0.579 7	1.352 1	0.603 4	0.633 8	1.085 3	0.491 8	0.823 8
6	0.581 2	1.366 1	0.613 7	0.624 1	1.072 1	0.493 5	0.819 3
均值	0.579 9	1.363 7	0.612 0	0.628 1	1.075 1	0.492 3	0.818 8
RSD/%	1.50	0.62	1.37	1.45	0.97	0.91	1.22

2.5 RCF 耐用性考察

2.5.1 不同仪器、色谱柱的 RCF 在不同仪器(LC-20AT 型高效液相色谱仪、UltiMate 3000 型高效液相色谱仪)和色谱柱[Agilent Zorbax SB-C_{18}(250 mm×4.6 mm,5 μm)、Waters Xbridge C_{18}(250 mm×4.6 mm,5 μm)和 Thermo C_{18}(250 mm×4.6 mm,5 μm)]条件下,精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 10 μL 进样检测马钱子苷、当药苷、断氧化马钱子苷、甘草苷、甘草酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和连翘苷的峰面积并计算各成分的 RCF,考察不同仪器和色谱柱对 RCF 的影响,见表 3。结果马钱子苷、当药苷、断氧化马钱子苷、甘草酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和连翘苷 RCF 的 RSD 为 0.87%~1.65%,表明不同仪器及色谱柱对所建立的 RCF 无显著差异。

2.5.2 不同柱温的 RCF 在不同柱温(28、29、30、31、32 ℃)条件下,精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 10 μL 进样检测马钱子苷、当药苷、断氧化马钱子苷、甘草苷、甘草酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和连翘苷的峰面积并计算各成分的 RCF,考察不同柱温对 RCF 的影响,

见表 4。结果马钱子苷、当药苷、断氧化马钱子苷、甘草酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和连翘苷 RCF 的 RSD 为 0.81%~1.75%,表明不同柱温对所建立的 RCF 无显著差异。

表 3 不同仪器、色谱柱目标成分 RCF

仪器	色谱柱	马钱子苷	当药苷	断氧化马钱子苷	甘草酸	连翘酯苷 B	连翘酯苷 A	连翘苷
LC-20AT	Agilent Zorbax SB-C_{18}	0.583 5	1.366 9	0.617 4	0.631 5	1.078 0	0.494 9	0.820 1
	Waters Xbridge C_{18}	0.570 1	1.350 3	0.608 2	0.650 9	1.092 3	0.500 6	0.839 0
	Thermo C_{18}	0.598 4	1.382 7	0.635 9	0.641 1	1.060 2	0.487 5	0.810 1
UltiMate 3000	Agilent Zorbax SB-C_{18}	0.580 9	1.359 4	0.613 5	0.628 0	1.069 8	0.491 3	0.817 6
	Waters Xbridge C_{18}	0.579 6	1.358 2	0.609 7	0.644 4	1.072 9	0.498 2	0.822 1
	Thermo C_{18}	0.587 3	1.374 4	0.621 8	0.637 3	1.058 1	0.485 8	0.810 6
均值		0.583 3	1.365 3	0.617 8	0.638 9	1.071 9	0.493 1	0.819 9
RSD/%		1.60	0.87	1.65	1.32	1.16	1.19	1.29

表 4 不同柱温目标成分的 RCF

柱温	马钱子苷	当药苷	断氧化马钱子苷	甘草酸	连翘酯苷 B	连翘酯苷 A	连翘苷
28 ℃	0.587 3	1.382 8	0.622 2	0.637 1	1.088 2	0.504 9	0.822 7
29 ℃	0.579 6	1.375 1	0.615 3	0.631 8	1.076 6	0.502 4	0.817 4
30 ℃	0.575 1	1.360 6	0.608 7	0.624 2	1.071 5	0.490 6	0.813 9
31 ℃	0.572 5	1.357 4	0.603 5	0.617 9	1.063 9	0.488 3	0.810 2
32 ℃	0.564 9	1.348 6	0.597 1	0.609 6	1.054 3	0.486 8	0.805 6
均值	0.575 9	1.364 9	0.609 4	0.624 1	1.070 9	0.494 6	0.814 0
RSD/%	1.44	1.01	1.61	1.75	1.20	1.70	0.81

2.5.3 不同流速的 RCF 在不同流速(0.8、0.9、1.0、1.1、1.2 mL/min)条件下,精密吸取"2.2.1"项下混合对照品溶液 10 μL 进样检测马钱子苷、当药苷、断氧化马钱子苷、甘草苷、甘草酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和连翘苷的峰面积并计算各成分的 RCF,考察不同流速对 RCF 的影响,见表 5。结果马钱子苷、当药苷、断氧化马钱子苷、甘草酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和连翘苷 RCF 的 RSD 为 0.56%~1.61%,表明不同流速对所建立的 RCF 无显著差异。

2.6 目标成分色谱峰的定位

在不同仪器(LC-20AT 型高效液相色谱仪、UltiMate 3000 型高效液相色谱仪)和色谱柱[Agilent Zorbax SB-C_{18}(250 mm×4.6 mm,5 μm)、Waters Xbridge C_{18}(250 mm×4.6 mm,5 μm)和 Thermo C_{18}(250 mm×4.6 mm,5 μm)]条件下,精密吸取"2.2.1"项下混合对照品溶液 10 μL 进样检测,记录马钱子苷、当药苷、断氧化马钱子苷、甘草苷、甘草酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和连翘苷的保留时间,采用相对保留时间值(其他目标化合物与内参物甘草苷保留时间的比值)法对目标成分色谱峰进行定位,见表 6。结果马钱子苷、当药苷、断氧化马钱子苷、甘草酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和连翘苷与甘草苷相对保留时间值的 RSD 为 0.30%~1.77%,表明采用相对保留时间值法可以对目标化合物色谱峰进行准确定位。

表 5 不同流速目标成分的 RCF

流速	马钱子苷	当药苷	断氧化马钱子苷	甘草酸	连翘酯苷 B	连翘酯苷 A	连翘苷
0.8 mL/min	0.562 0	1.353 6	0.600 8	0.619 5	1.060 2	0.481 6	0.800 4
0.9 mL/min	0.566 4	1.357 1	0.607 1	0.621 3	1.064 0	0.485 3	0.809 2
1.0 mL/min	0.577 1	1.361 3	0.610 2	0.626 8	1.073 5	0.490 1	0.815 7
1.1 mL/min	0.580 3	1.366 8	0.615 9	0.630 6	1.077 9	0.494 7	0.823 1
1.2 mL/min	0.583 5	1.372 9	0.620 4	0.637 2	1.082 7	0.496 2	0.829 0
均值	0.573 9	1.362 3	0.610 9	0.627 1	1.071 7	0.489 6	0.815 5
RSD/%	1.61	0.56	1.25	1.14	0.88	1.26	1.38

表 6 不同仪器、色谱柱目标成分色谱峰的相对保留时间值

仪器	色谱柱	马钱子苷	当药苷	断氧化马钱子苷	甘草酸	连翘酯苷 B	连翘酯苷 A	连翘苷
LC-20AT	Agilent Zorbax SB-C_{18}	0.457 1	0.651 2	0.714 3	1.142 9	1.627 6	1.763 5	1.943 8
	Waters Xbridge C_{18}	0.446 9	0.643 7	0.705 9	1.130 7	1.621 5	1.750 9	1.931 5
	Thermo C_{18}	0.463 5	0.658 6	0.720 1	1.149 2	1.632 9	1.769 8	1.952 1
UltiMate 3000	Agilent Zorbax SB-C_{18}	0.459 2	0.653 7	0.715 8	1.145 2	1.630 2	1.768 5	1.949 2
	Waters Xbridge C_{18}	0.447 1	0.649 8	0.713 2	1.138 7	1.625 3	1.759 3	1.938 9
	Thermo C_{18}	0.465 9	0.659 1	0.721 5	1.150 3	1.634 9	1.776 3	1.954 8
均值		0.456 6	0.652 7	0.715 1	1.142 8	1.628 7	1.764 7	1.945 1
RSD/%		1.77	0.89	0.78	0.64	0.30	0.50	0.45

2.7 含量测定结果比较

取 3 批小儿清热化痰栓适量,分别按"2.2.2"项下方法制备小儿清热化痰栓供试品溶液,每批制备 3 份供试品溶液,在上述色谱条件下,检测马钱子苷、当药苷、断氧化马钱子苷、甘草苷、甘草酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和连翘苷的峰面积,先采用外标法(ESM)计算小儿清热化痰栓中 8 种成分的含量,再采用 HPLC-QAMS 法以甘草苷为内参物,按照 RCF 计算公式计算马钱子苷、当药苷、断氧化马钱子苷、甘草酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和连翘苷的含量,见表 7。

表 7　目标成分含量测定结果

成分	批号 1902401(*n*=3)			批号 1904412(*n*=3)			批号 1905403(*n*=3)		
	ESM	QAMS	RSD/%	ESM	QAMS	RSD/%	ESM	QAMS	RSD/%
甘草苷	0.937	-	-	0.847	-	-	1.030	-	-
马钱子苷	2.921	2.958	0.63	2.629	2.670	0.77	3.501	3.476	0.36
当药苷	0.554	0.541	1.19	0.475	0.482	0.73	0.659	0.645	1.07
断氧化马钱子苷	3.629	3.657	0.38	3.268	3.303	0.53	4.170	4.149	0.25
甘草酸	2.169	2.133	0.84	2.491	2.457	0.69	1.963	1.980	0.43
连翘酯苷 B	1.257	1.271	0.55	1.069	1.085	0.74	1.504	1.473	1.04
连翘酯苷 A	5.213	5.267	0.52	6.244	6.201	0.35	4.696	4.738	0.45
连翘苷	1.706	1.719	0.38	1.367	1.390	0.83	2.024	2.003	0.52

3　讨论

3.1　指标性成分的筛选

小儿清热化痰栓为中成药复方制剂,由 11 味中药组方而成,方中忍冬藤清热解毒、疏风通络,平贝母清热润肺、化痰止咳,合为君药;连翘清热解毒、消肿散结、疏散风热,黄芩苷清热燥湿、泻火解毒,竹叶清热泻火、生津利尿,水牛角清热凉血、解毒定惊,石膏清热泻火、除烦止渴,合为臣药;大黄泻下攻积、清热泻火、凉血解毒,人工牛黄清心豁痰、开窍息风,青礞石坠痰下气、平肝镇惊,甘草祛痰止咳、缓急止痛、调和诸药,共为佐使药。11 种药味所含成分相互协调、相互制约,共达清热解毒、化痰止咳的临床功效。本文根据中医药配伍理论,参考中药质量标志物选取原则,以忍冬藤活性成分马钱子苷、当药苷和断氧化马钱子苷,连翘活性成分连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和连翘苷,甘草活性成分甘草苷和甘草酸为定量测定目标成分,采用 HPLC-QAMS 法同时测定,以期建立小儿清热化痰栓多指标成分评价方法。

3.2　色谱条件的考察

以马钱子苷、当药苷、断氧化马钱子苷、甘草苷、甘草酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和连翘苷的分离效果为主要指标,流动相体系考察了甲醇-水[11]、乙腈-0.1%甲酸溶液[7-8]、乙腈-0.5%冰醋酸溶液[9]、乙腈-0.1%磷酸溶液[4]和乙腈-0.2%磷酸溶液[10],结果以乙腈-0.2%磷酸溶液为流动相,8 种目标成分马钱子苷、当药苷、断氧化马钱子苷、甘草苷、甘草酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和连翘苷色谱峰与相邻色谱峰的分离效果良好,色谱峰拖尾因子符合《中国药典》规定要求。

3.3　供试品溶液提取方法筛选

以马钱子苷、当药苷、断氧化马钱子苷、甘草苷、甘草酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和连翘苷的综合提取率为主要指标,提取溶剂考察了 50%甲醇[4-5,7]、50%乙醇[6]、70%甲醇[10]和 80%甲醇[11],最终优选 70%甲醇为提取物溶剂。提取方式考察了加热回流、常温条件下超声提取和(45±5)℃水浴条件下超声提取,结果显示加热回流提取和(45±5)℃水浴中超声提取所得结果无明显差异,但明显高于常温超声提取。通过对提取时间不断优化,最终确定以 70%甲醇为提取溶剂(45±5) ℃水浴条件下对小儿清热化痰栓样品进行超声处理 45 min。

从"2.7"项 8 种成分的含量检验结果来看,HPLC-QAMS 法计算值和外标法实测值之间无明显差异,表明本文所建立的方法结果准确,可用于小儿清热化痰栓的综合评价。同时检测结果也反映出目标成分含量存在一定的批间差异,尤其马钱子苷、当药苷、连翘酯苷 B 和连翘苷较为明显,可能与制剂生产的原药材质量控制有关,表明建立多指标成分评价模式有助于确保产品质量的稳定性,提示药品生产企业关注原药材种属来源、产地差异、采收季节、加工方法等影响产品质量的因素,进一步完善原药材内控质量标准,最终达到临床疗效的稳定性,便于该制剂在临床上的合理应用。

本文采用 HPLC-QAMS 法对小儿清热化痰栓中马钱子苷、当药苷、断氧化马钱子苷、甘草苷、甘草酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A 和连翘苷含量进行了同时测定,建立了小儿清热化痰栓多指标成分质量评价方法,为全面评价小儿清热化痰栓整体质量提供了参考。

参考文献:

[1] 秦昆明,杨冰, 胡静, 等. 一测多评法在中药多组分质量控制中的应用现状与思考[J]. 中草药, 2018, 49(3): 725-731.

[2] 国家药典委员会. 国家药品标准 WS-10102(ZD-0102)-2002-2012Z[S]. 2012.

[3] 卢德刚. HPLC 法测定小儿清热化痰栓中黄芩苷的含量[J]. 黑龙江科技信息, 2013, 17(2): 2.

[4] 代品, 石明芯, 王佳慧, 等. 高效液相色谱法同时测定忍冬藤中 7 个活性成分的含量[J]. 中国测试, 2015, 41(8): 44-47.

[5] 于晓, 李松涛, 刘建升, 等. RP-HPLC 法同时测定忍冬藤中绿原酸, 马钱苷, 当药苷含量的研究[J]. 山东农业科学, 2015, 47(9): 124-126.

[6] 纪瑞锋, 刘素香, 刘毅, 等. HPLC 法测定不同产地忍冬藤中 4 种环烯醚萜苷[J]. 药物评价研究, 2013, 36(4): 289-292.

[7] 王琼珺, 谢伟容, 邰艳妮, 等. 基于 Q-Marker 成分定性与定量的双黄连制剂质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(18): 36-46.

[8] 裴玉琼, 石海培, 严辉, 等. 基于 HPLC 指纹图谱及多成分一测多评法定量的炙甘草饮片质量评价研究[J]. 中草药, 2019, 50(18): 4293-4304.

[9] 侯嘉, 郭鸿儒, 杨扶德, 等. 多指标成分结合化学计量学综合评价甘肃产甘草的质量[J]. 中草药, 2019, 50(16): 3923-3929.

[10] 付云飞, 李清, 毕开顺. RP-HPLC 法同时测定不同产地连翘中的 7 种成分[J]. 中草药, 2013, 44(8): 1043-1046.

[11] 支旭然, 苑霖, 生宁, 等. HPLC-MS/MS 法测定不同采收期连翘叶中 9 种成分[J]. 中草药, 2013, 44(22): 3231-3235.

(编辑:曾敏莉)

(收稿日期:2020-11-25　修回日期:2021-03-12)