

小儿消积止咳口服液多指标成分分析及其 HPLC 指纹图谱研究

梁 琰^{1,2}, 张贵民³, 苏瑞强³, 耿岩玲¹, 赵恒强^{1*}, 王 晓^{1*}

1. 山东省分析测试中心, 山东省中药质量控制技术重点实验室, 山东 济南 250014

2. 山东农业大学食品科学与工程学院, 山东 泰安 271018

3. 鲁南制药集团股份有限公司, 中药制药共性技术国家重点实验室, 山东省中药制药新技术重点实验室, 山东 临沂 276006

摘要: **目的** 建立小儿消积止咳口服液 (XXZOL) 多指标成分分析方法及其 HPLC 指纹图谱, 为提高其质量标准提供方法和技术支持。**方法** 采用 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm) 色谱柱, 乙腈-0.4%冰醋酸水溶液流动相体系, 进行梯度洗脱, 体积流量为 0.6 mL/min, 柱温 25 °C, 检测波长 254 nm; 利用 HPLC-ESI-Q-TOF/MS 技术分析鉴别 XXZOL 中的成分, 采用 HPLC-DAD 法对 10 种成分 (峰 1-辛弗林、峰 13-绿原酸、峰 16-槲皮素-3-*O*-β-*D*-葡萄糖-7-*O*-β-*D*-龙胆双糖苷、峰 22-金丝桃苷、峰 24-连翘酯苷 A、峰 26-柚皮苷、峰 27-橙皮苷、峰 29-新橙皮苷、峰 33-连翘苷、峰 37-3,29-二苯甲酰基栝楼仁三醇) 进行定量测定, 在多批次样品分析的基础上建立其 HPLC 指纹图谱。**结果** 建立了 10 批样品的指纹图谱, 10 批样品的相似度分别为 0.999 3、0.999 6、0.999 2、0.999 2、0.999 4、0.999 3、0.999 4、0.999 5、0.999 1、0.999 7, 相似度均在 0.9 以上。XXZOL 共有峰 38 个, 确定了 32 个已知成分, 另外有 6 个未知成分; 10 个成分量分别为 2 542.42、158.61、147.02、34.35、432.42、1 813.01、1 339.70、2 580.71、175.32、1 615.17 μg/mL。**结论** 建立的 XXZOL HPLC 多指标成分分析及其指纹图谱, 为提高其质量标准提供了科学依据。

关键词: 小儿消积止咳口服液; HPLC-DAD-ESI-Q-TOF/MS; 指纹图谱; 多指标定量; 质量标准; 辛弗林; 绿原酸; 金丝桃苷; 槲皮素-3-*O*-β-*D*-葡萄糖-7-*O*-β-*D*-龙胆双糖苷; 连翘酯苷 A; 柚皮苷; 橙皮苷; 新橙皮苷; 连翘苷; 3,29-二苯甲酰基栝楼仁三醇

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)21-4440-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.21.012

Determination of chemical constituents and quantitative fingerprints of Xiao'er Xiaoji Zhike Oral Liquid by HPLC-ESI-Q-TOF/MS

LIANG Yan^{1,2}, ZHANG Gui-min³, SU Rui-qiang³, GENG Yan-ling¹, ZHAO Heng-qiang¹, WANG Xiao¹

1. Shandong Key Laboratory of TCM Quality Control Technology, Shandong Analysis and Test Center, Jinan 250014, China

2. Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China

3. State Key Laboratory of Generic Manufacture Technology of Chinese Traditional Medicine, Shandong Provincial Key Laboratory of New Manufacture Technology of Chinese Traditional Medicine, Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276006, China

Abstract: **Objective** To establish the HPLC multi-index quantitative fingerprints of Xiao'er Xiaoji Zhike Oral Liquid (XXZOL), and to provide methods and technical support for improving its quality standard. **Methods** Using an Agilent Zorbax SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm) column, acetonitrile-0.4% glacial acetic acid mobile phase system, gradient elution, flow rate of 0.6 mL/min, column temperature 25 °C, detection wavelength 254 nm; The HPLC-ESI-Q-TOF/MS technique was used to identify the chemical constituents (peak 1-synephrine, peak 13-chlorogenic acid, peak 16-quercetin-3-*O*-β-*D*-glucose-7-*O*-β-*D*-gentiobioside, peak 22-hyperoside, peak 24-forsythoside A, peak 26-naringin, peak 27-hesperidin, peak 29-neohesperidin, peak 33-phillyrin, peak 37-3,29-dibenzoyl rarounitriol) in the XXZOL, and the content of the main components was determined by HPLC-DAD. The HPLC fingerprint was

收稿日期: 2017-06-01

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划课题 (2011BAI06B06); 山东省自然科学基金资助项目 (ZR2013HL029, ZR2013HM075, ZR2016YL006); 山东省科技发展计划 (2016GSF202014); 山东省泰山学者岗位专家支持项目; 山东省科学院先导项目

作者简介: 梁 琰, 在读硕士, 主要从事中药质量控制研究。Tel: 13066030615 E-mail: JS_Michelle@yeah.net

***通信作者** 赵恒强, 博士, 副研究员, 主要从事中药分析与质量控制研究。Tel: (0531)82605319 E-mail: hqzhao2007@163.com

王 晓, 博士, 研究员, 主要从事中药质量控制研究。Tel: (0531)82605319 E-mail: wxjn1998@126.com

established on the basis of multi-batch analysis. **Results** The fingerprints of the 10 batches of samples were established, and the similarities of them were above 0.9, which were 0.999 3, 0.999 6, 0.999 2, 0.999 2, 0.999 4, 0.999 3, 0.999 4, 0.999 5, 0.999 1, and 0.999 7, respectively. XXZOL has 38 common peaks, 32 of them was identified, six of them was unknown; the contents of the 10 chemical constituents were 2 542.42, 158.61, 147.02, 34.35, 432.42, 1 813.01, 1 339.70, 2 580.71, 175.32, and 1 615.17 $\mu\text{g/mL}$.

Conclusion The establishment of multi-index analysis by HPLC and fingerprints of XXZOL provides a scientific basis for improving its quality standards.

Key words: Xiao'er Xiaoji Zhike Oral Liquid; HPLC-DAD-ESI-Q-TOF/MS; fingerprint; multi-index quantitative; quality standards; synephrine; chlorogenic acid; hyperoside; quercetin-3-*O*- β -*D*-glucose-7-*O*- β -*D*-gentiobioside; forsythoside A; naringin; hesperidin; neohesperidin; phillyrin; 3,29-dibenzoyl rarounitriol

小儿消积止咳口服液(Xiao'er Xiaoji Zhike Oral Liquid, XXZOL)是由山楂、槟榔、枳实、枇杷叶、瓜蒌、莱菔子、葶苈子、桔梗、连翘、蝉蜕等10种中药材组成的复方制剂,具有清热肃肺、消积止咳等功效,对小儿食积咳嗽具有非常明显的疗效。《中国药典》2015年版一部中规定采用HPLC法测定辛弗林的量来用于XXZOL的质量控制^[1]。但是该制剂的化学成分极其复杂,仅靠单一成分的定量测定并不能完全反映中药复方多成分、多靶点的特点,难以实现对该品种的质量控制。

中药指纹图谱是整体评价多维组分复杂基质中药质量的有效控制方法^[2]。将能够标识中药材或制剂特征成分的光谱图或色谱图结合现代数理统计软件进行分析处理,得到的指纹图谱信息能全面、综合地反映所含成分的相对关系,较好地体现中药成分的复杂性和相关性,在中药质量评价和控制方面得到了大量应用^[3-4]。为了更全面地控制该制剂的质量,保证其临床疗效,应建立准确可靠的方法来量化其中的化学成分,对多种活性成分进行研究,并结合中药色谱指纹图谱对其进行质量控制^[8-9]。

近年来,研究者们采用单个或多个化学成分的量作为主要评价指标对XXZOL的分析和质量控制方法进行了大量研究。周佳宝等^[10]建立了HPLC测定XXZOL中辛弗林量的方法;郭时运等^[11]以连翘苷为控制指标来评价XXZOL质量;康四和等^[12-14]先后以XXZOL中的君药枳实和槟榔为研究药材,分别将其中的辛弗林、氢溴酸槟榔碱与柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷等成分作为定量指标对XXZOL进行研究。但以上研究主要测定了几种主要活性成分的量,缺乏对该制剂整体质量控制研究。

本研究采用HPLC-DAD-ESI-Q-TOF/MS^[15]技术分析鉴别XXZOL中化学成分,结合中药配伍原则选择质控指标,并在此基础上建立其HPLC多指标定量指纹图谱,以期对XXZOL的整体质量评价

研究提供较为全面的方法和技术支持。

1 仪器与材料

华普S6000高效液相色谱仪,滕州华普分析仪器有限公司;Agilent 6520 Q-TOF液质联用仪,美国Agilent Technologies;SQP型电子天平,德国Sartorius公司;指纹图谱相似度评价软件为“中药色谱指纹相似度评价系统”(国家药典委员会2012A);SB-5200D型高功率数控超声波仪,宁波新芝生物科技股份有限公司;色谱柱:XSELECTTM HSS T3 (150 mm $\times$ 3.0 mm, 3.5 μm),美国Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5.0 μm),美国Agilent Zorbax SB-C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5.0 μm)。

对照品辛弗林(批号Y2607Y17088)、槲皮素-3-*O*- β -*D*-葡萄糖-7-*O*- β -*D*-龙胆双糖苷(批号P23M7F11664)、金丝桃苷(批号Y20J7X9353)、连翘酯苷A(批号R21J7F16577)、新橙皮苷(批号Z31J6L2067)、3,29-二苯甲酰基栝楼仁三醇(批号P09J8F28357),质量分数均大于98%,购于上海源叶生物科技有限公司;绿原酸、柚皮苷、橙皮苷、连翘苷为实验室自制,结构经过波谱数据鉴定,峰面积归一法质量分数均大于98%;甲醇,色谱纯,山东禹王实业有限公司化工分公司;乙腈,色谱纯,美国Fisher Scientific;娃哈哈纯净水;其余试剂均为分析纯;10批XXZOL样品于2016年11月8日购于济南各大药店,生产厂家均为山东鲁南厚普制药有限公司,批号分别为00416044、00416218、00416267、00416295、00416314、00416313、00416316、00416344、00416343、00416372,分别编号为S1~S10。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 分别精密称取辛弗林、绿原酸、槲皮素-3-*O*- β -*D*-葡萄糖-7-*O*- β -*D*-龙胆双糖

昔、金丝桃昔、连翘酯昔 A、柚皮昔、橙皮昔、新橙皮昔、连翘昔、3,29-二苯甲酰基栝楼仁三醇对照品各 1.0 mg，置于 1 mL 量瓶中。其中，3,29-二苯甲酰基栝楼仁三醇加少量二氯甲烷溶解并用甲醇定容，其余对照品均直接用甲醇定容至刻度线，配制质量浓度为 1.0 mg/mL 的对照品储备溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密量取 XXZOL100 μ L，置于 1 mL 量瓶中，加水至刻度线，摇匀，经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过，即得。

2.2 色谱条件

色谱柱为 XSELECT™ HSS T3 柱 (150 mm $\times$ 3.0 mm, 3.5 μ m, 美国 Waters Technologies 公司); 流动相为乙腈-0.4%冰醋酸水溶液, 梯度洗脱模式: 0~16 min, 0.4%冰醋酸水溶液; 16~22 min, 0%~3%乙腈; 22~34 min, 3%乙腈; 34~35 min, 3%~5%乙腈; 35~45 min, 5%~6%乙腈; 45~58 min, 6%~7%乙腈; 58~59 min, 7%~10%乙腈; 59~68 min, 10%~11%乙腈; 68~80 min, 11%~13%乙腈; 80~100 min, 13%~15%乙腈; 100~115 min, 15%~20%乙腈; 115~125 min, 20%~24%乙腈;

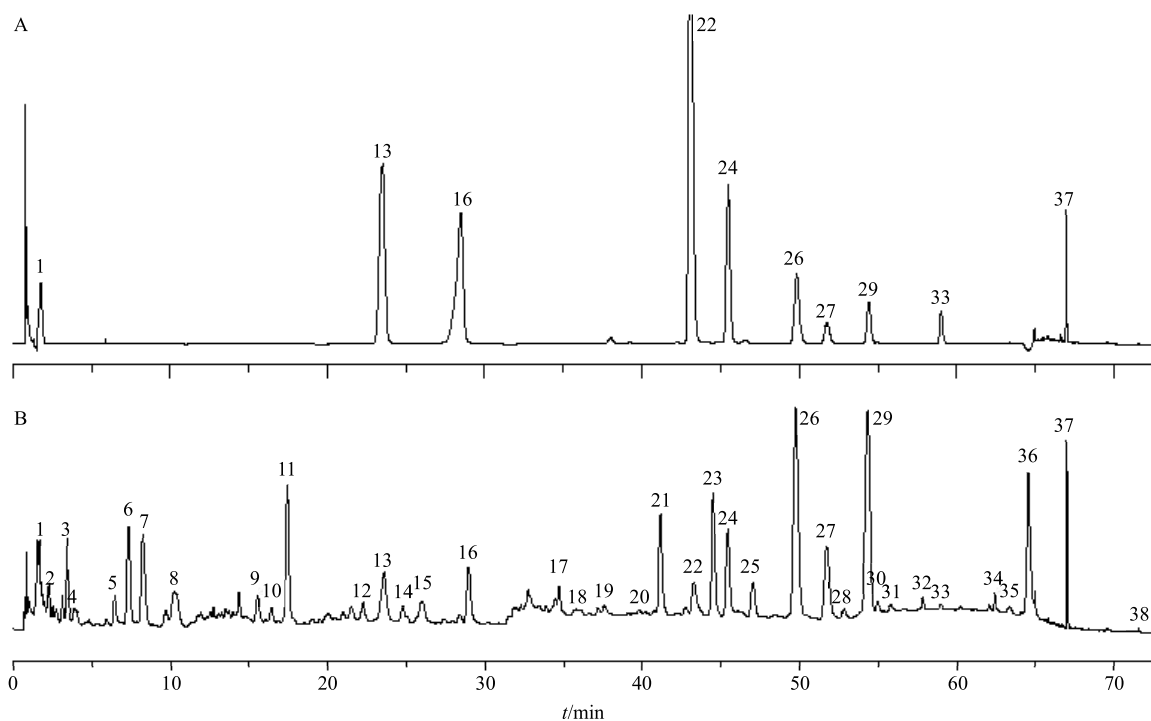
125~127 min, 24%~60%乙腈; 127~130 min, 60%~90%乙腈; 130~140 min, 90%~100%乙腈; 进样量 15 μ L; 检测波长 254 nm; 体积流量 0.6 mL/min; 柱温 25 $^{\circ}$ C。对照品及样品色谱图见图 1。

2.3 质谱条件

色谱柱后分流进入高分辨飞行时间质谱的体积流量为 0.4 mL/min。分别采用电喷雾正、负离子模式, 雾化气压力 310.275 kPa (45 psi), 干燥气 (N_2) 体积流量 10.0 mL/min, 干燥气体温度 350 $^{\circ}$ C, 毛细管电压 3 500 V, 裂解电压 175 V, 锥孔电压 65 V, 全扫描质荷比 (m/z) 范围 50~1 100。

2.4 色谱峰的指认

将色谱条件进一步优化后, 采用 HPLC-DAD-ESI-Q-TOF/MS^[15]对样品进行分析, 根据获得的化合物精确相对分子质量信息推断出可能的分子式, 结合 DAD 检测器获得的紫外吸收信息, 并参考以往研究报道的 XXZOL 中单味药材化学成分研究进展和中国科学院上海有机化学研究所中药化学成分数据库, 对指纹图谱中各共有峰进行指认。结果见表 1。



1-辛弗林 13-绿原酸 16-槲皮素-3-O- β -D-葡萄糖-7-O- β -D-龙胆双糖昔 22-金丝桃昔 24-连翘酯昔 A 26-柚皮昔
27-橙皮昔 29-新橙皮昔 33-连翘昔 37-3,29-二苯甲酰基栝楼仁三醇
1-synephrine 13-chlorogenic acid 16-quercetin-3-O- β -D-glucose-7-O- β -D-gentiobioside 22-hyperoside
24-forsythoside A 26-naringin 27-hesperidin 29-neohesperidin 33-phillyrin 37-3,29-dibenzoyl rarounitriol

图 1 混合对照品 (A) 和样品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed standard (A) and sample (B)

表 1 样品中 38 个化合物的 ESI-TOF/MS 测量结果

Table 1 ESI-TOF/MS measurements of 38 compounds in samples

峰号	t_R /min	化合物	离子类型	分子式	理论 (m/z)	实测 (m/z)	误差/($\times 10^{-6}$)	最大吸收波长/nm
1	2.88	辛弗林	$[M+H]^+$	$C_9H_{13}NO_2$	168.101 9	168.103 6	1.7	222
2	5.90	未知	$[M+H]^+$	—	—	399.133 4	—	221
3	6.50	未知	$[M+H]^+$	—	—	121.049 9	—	263
4	7.40	未知	$[M+H]^+$	—	—	407.106 9	—	222
5	12.20	苯丙氨酸	$[M-H]^-$	$C_9H_{11}NO_2$	164.071 7	164.070 6	-1.1	222
6	13.80	柠檬烯	$[M+H]^+$	$C_{10}H_{16}$	137.132 5	137.130 3	-2.2	203
7	15.60	α -松油醇-8 β -D-吡喃葡萄糖苷	$[M-H]^-$	$C_{16}H_{28}O_6$	315.181 3	315.182 8	1.5	229
8	19.40	芥子碱	$[M+H]^+$	$C_{16}H_{25}NO_6$	328.175 5	328.174 9	-0.6	326
9	29.50	连翘酯苷 D	$[M+Na]^+$	$C_{20}H_{30}O_{13}$	501.157 9	501.161 0	3.1	254
10	31.10	未知	$[M-H]^-$	—	—	313.055 0	—	240
11	32.80	枸橼酸	$[M-H]^-$	$C_6H_8O_7$	191.019 7	191.018 4	1.3	238
12	42.60	毛柳苷	$[M+Na]^+$	$C_{14}H_{20}O_7$	323.110 1	323.112 3	2.2	280
13	44.75	绿原酸	$[M-H]^-$	$C_{16}H_{18}O_9$	353.087 8	353.087 6	-0.2	240
14	47.10	吴茱萸内酯	$[M+H]^+$	$C_{26}H_{28}O_9$	485.180 6	485.179 0	-1.6	242
15	49.20	连翘环己醇氧化物	$[M+Na]^+$	$C_8H_{14}O_3$	181.083 5	181.080 2	-3.3	242
16	54.48	槲皮素-3-O- β -D-葡萄糖-7-O- β -D-龙胆双糖苷	$[M+H]^+$	$C_{33}H_{40}O_{22}$	789.208 4	789.205 3	-3.1	249
17	67.50	连翘苷元	$[M+Na]^+$	$C_{21}H_{24}O_6$	395.146 5	395.149 1	2.6	238
18	69.90	连翘种苷	$[M+Na]^+$	$C_{29}H_{36}O_{16}$	663.189 6	663.187 6	-2.0	240
19	72.10	连翘酯苷 C	$[M-H]^-$	$C_{29}H_{36}O_{16}$	639.193 1	639.194 7	1.6	240
20	77.00	忍冬苷	$[M+Na]^+$	$C_{27}H_{30}O_{15}$	595.165 8	595.167 9	2.1	240
21	79.60	柚皮素-4'-葡萄糖苷-7-芸香糖苷	$[M-H]^+$	$C_{33}H_{42}O_{19}$	741.224 8	741.223 2	1.6	234
22	83.73	金丝桃苷	$[M-H]^+$	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463.088 2	463.085 7	2.5	284
23	86.20	去甲基槟榔碱	$[M+Na]^+$	$C_7H_{11}NO_2$	164.068 2	164.064 6	-3.6	238
24	88.83	连翘酯苷 A	$[M+Na]^+$	$C_{29}H_{36}O_{15}$	647.194 6	647.193 1	-1.5	328
25	90.70	3,8-二葡萄糖基香叶木素	$[M+H]^+$	$C_{27}H_{32}O_{15}$	597.181 4	597.184 2	2.8	230
26	96.85	柚皮苷	$[M-H]^-$	$C_{27}H_{32}O_{14}$	579.171 9	579.172 1	-0.2	283
			$[M+H]^+$		581.186 5	581.185 9	-0.6	
27	100.75	橙皮苷	$[M-H]^-$	$C_{28}H_{34}O_{15}$	609.182 5	611.181 9	0.6	284
			$[M+H]^+$		611.197 1	611.196 4	-0.7	
28	102.00	表儿茶素	$[M-H]^-$	$C_{15}H_{14}O_6$	289.071 8	289.070 7	-1.1	243
29	106.51	新橙皮苷	$[M-H]^-$	$C_{28}H_{34}O_{15}$	609.182 5	609.182 4	0.1	284
			$[M+H]^+$		611.197 1	611.200 2	3.1	
30	107.10	川陈皮素-3-O- β -葡萄糖苷	$[M-H]^-$	$C_{27}H_{32}O_{14}$	579.171 9	579.174 9	-3.0	240
			$[M+H]^+$		581.186 5	581.185 1	-1.4	
31	108.90	栝楼萜二醇	$[M+H]^+$	$C_{30}H_{48}O_2$	441.372 7	441.372 1	-0.6	240
32	114.20	槲皮素-3-葡萄糖-7-鼠李糖苷	$[M-H]^-$	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609.146 1	609.145 3	0.8	240
			$[M+H]^+$		611.160 7	611.162 1	1.4	
33	116.32	连翘苷	$[M+Na]^+$	$C_{27}H_{34}O_{11}$	535.217 4	557.219 3	1.9	280
34	123.90	芸香苷	$[M+H]^+$	$C_{28}H_{32}O_{15}$	609.181 4	609.184 8	3.4	242
			$[M-H]^-$		607.166 8	607.166 5	0.3	
35	125.00	未知	$[M+COOH]^-$	—	—	593.224 9	—	238
36	129.00	未知	$[M+CH_3COOH]^-$	—	—	980.016 4	—	233
37	133.87	3,29-二苯甲酰基栝楼仁三醇	$[M+Na]^+$	$C_{44}H_{58}O_5$	689.417 7	689.416 4	-1.3	237
38	143.20	bis(2-ethyl hexyl)phthalate	$[M+H]^+$	$C_{24}H_{38}O_4$	391.284 3	391.285 2	2.3	250

2.5 多指标定量测定

2.5.1 标准曲线及检出限 将每种对照品储备液充分混合并稀释, 得到 8 种不同质量浓度的混合对照品溶液 (分别为 266.67、200.00、133.33、66.67、40.00、26.67、6.67、3.33 $\mu\text{g/mL}$), 按“2.2”项下

色谱条件进行分析。以峰面积为纵坐标 (Y), 以各对照品质量浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 确定相关系数。以 3 倍信噪比计算检测限 (LOD), 以 10 倍信噪比计算定量限 (LOQ), 结果见表 2, 各成分在其相应质量浓度范围内线性关系良好。

表 2 10 种成分 HPLC-DAD 分析的线性回归数据及 LOD、LOQ 测定结果

Table 2 Linear regression data, LOD, and LOQ of 10 components analyzed by HPLC-DAD

峰号	化合物	回归方程	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	R^2	LOD/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	LOQ/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
1	辛弗林	$Y=0.896 X+83\ 849.000$	3.33~266.67	0.999 2	0.013	0.044
13	绿原酸	$Y=32.198 X+25.446$	3.33~266.67	0.999 8	0.044	0.147
16	槲皮素-3- O - β -D-葡萄糖-7- O - β -D-龙胆双糖苷	$Y=38.863 X+28.919$	3.33~266.67	0.999 7	0.042	0.141
22	金丝桃苷	$Y=79.518 X+79.513$	3.33~266.67	0.999 5	0.106	0.354
24	连翘酯苷 A	$Y=19.334 X+23.625$	3.33~266.67	0.999 5	0.021	0.069
26	柚皮苷	$Y=17.161 X-14.525$	3.33~266.67	0.999 7	0.078	0.260
27	橙皮苷	$Y=7.142 X-19.376$	3.33~266.67	0.999 8	0.202	0.674
29	新橙皮苷	$Y=11.920 X-20.010$	3.33~266.67	0.999 5	0.263	0.875
33	连翘苷	$Y=3.245 X+3.920$	3.33~266.67	0.999 9	0.421	1.403
37	3,29-二苯甲酰基栝楼仁三醇	$Y=0.267 X+455.250$	3.33~266.67	0.999 8	0.026	0.087

2.5.2 精密度试验 取 S7 号供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件连续进样 6 次, 测得 10 个特征峰的保留时间 RSD 分别为 0.35%、0.23%、0.47%、0.47%、0.42%、0.39%、0.42%、0.37%、0.22%、0.02%, 均小于 1%; 峰面积 RSD 分别为 0.36%、0.50%、0.79%、2.12%、1.80%、2.67%、0.10%、1.83%、4.18%、4.45%, 均小于 5%, 结果表明仪器精密度良好。

2.5.3 重复性试验 取 S7 号样品 6 份, 按“2.1.2”项下方法制成供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进行测定, 测得 10 个特征峰的保留时间 RSD 分别为 0.04%、0.13%、0.23%、0.19%、0.22%、0.22%、0.24%、0.24%、0.37%、0.01%, 均小于 1%; 峰面积 RSD 分别为 1.02%、1.90%、1.52%、1.48%、1.43%、0.77%、0.39%、1.18%、2.21%、3.13%, 均小于 5%, 结果表明方法重复性良好。

2.5.4 稳定性试验 取 S7 号供试品溶液分别于 0、3、6、12、18、24 h 按“2.2”项下色谱条件进样分析, 测得 10 个特征峰的保留时间 RSD 分别为 0.67%、0.80%、0.85%、0.49%、0.51%、0.57%、0.56%、0.47%、0.22%、0.01%, 均小于 1%; 峰面积 RSD 分别为 1.48%、2.32%、3.27%、4.65%、1.82%、2.27%、3.37%、2.46%、1.33%、3.74%, 均小于 5%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5.5 加样回收率试验 取同一批号 (S7) 的样品, 分别按样品中各指标成分量 80%、100%、120% 共 3 个水平加入对照品溶液, 按“2.1.2”项下方法制成供试品溶液, 以上述色谱条件分别测定辛弗林、绿原酸、槲皮素-3- O - β -D-葡萄糖-7- O - β -D-龙胆双糖苷、金丝桃苷、连翘酯苷 A、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、连翘苷、3,29-二苯甲酰基栝楼仁三醇的量并计算回收率。结果各成分的平均回收率分别为 94.36%、94.74%、95.11%、95.60%、94.51%、93.95%、95.46%、93.91%、93.60%、91.78%, RSD 分别为 2.08%、3.05%、1.97%、5.56%、2.07%、1.01%、2.98%、2.81%、1.68%、2.10%。

2.5.6 样品测定 按上述“2.1.2”项方法制备供试品溶液, 按“2.2”项色谱条件分别测定 10 个批次 XXZOL 样品中 10 种成分的量 (表 3)。可以看出, 10 批样品中各化合物的 RSD 在 2.38%~4.89%, 说明不同批次样品中各成分的差异性不大。其中, 新橙皮苷和辛弗林的量最高, 柚皮苷、3,29-二苯甲酰基栝楼仁三醇、橙皮苷次之, 连翘酯苷 A、连翘苷、绿原酸、槲皮素-3- O - β -D-葡萄糖-7- O - β -D-龙胆双糖苷的量依次减少, 金丝桃苷的量最少。

2.6 指纹图谱

2.6.1 指纹图谱的建立 按“2.1.2”项下方法处理

表 3 样品中 10 种成分定量测定结果 ($n = 3$)
Table 3 Contents of 10 compounds in samples ($n = 3$)

样品	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)									
	辛弗林	绿原酸	槲皮素-3- <i>O</i> - β -D-葡萄糖-7- <i>O</i> - β -D-龙胆双糖苷	金丝桃苷	连翘酯苷 A	柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷	连翘苷	3,29-二苯甲酰基 栝楼仁三醇
S1	2 573.95	152.26	144.97	34.41	420.55	1 767.66	1 280.66	2 454.16	179.95	1 537.92
S2	2 501.53	156.45	151.44	33.97	438.67	1 708.33	1 275.78	2 464.06	182.88	1 585.53
S3	2 487.18	155.12	151.65	36.54	440.32	1 936.40	1 340.21	2 671.06	179.35	1 546.56
S4	2 499.54	157.44	150.87	33.38	431.76	1 939.24	1 373.65	2 502.44	182.76	1 763.98
S5	2 481.99	145.16	142.20	34.47	448.45	1 845.75	1 324.30	2 596.89	164.80	1 685.23
S6	2 608.66	165.32	144.76	33.25	435.79	1 824.91	1 352.13	2 553.01	162.71	1 601.31
S7	2 455.97	155.59	143.16	35.09	431.62	1 772.98	1 382.29	2 666.19	169.86	1 674.57
S8	2 536.06	161.69	147.88	33.68	402.83	1 893.97	1 361.70	2 636.12	183.31	1 651.19
S9	2 631.79	168.85	148.43	33.51	445.56	1 711.06	1 388.91	2 686.22	179.29	1 577.63
S10	2 647.51	168.21	144.89	35.21	428.63	1 729.83	1 317.34	2 576.90	168.33	1 527.79
均值	2 542.42	158.61	147.02	34.35	432.42	1 813.01	1 339.70	2 580.71	175.32	1 615.17
RSD/%	2.69	4.70	2.38	3.00	3.06	4.89	2.98	3.33	4.57	4.74

10 个批次 XXZOL 样品制备成供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件进行测定,不同批次 XXZOL 的 HPLC 指纹图谱见图 2。在样品的指纹图谱中选择了 38 个分离度较好且稳定出现的峰作为共有峰。各色谱峰保留时间 RSD 均在 1%以内,峰面积 RSD 均在 5%以内,说明不同批次样品的各共有峰重现性较好,可以选为指纹图谱的共有峰用于其质量评价。

2.6.2 相似度评价 采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004 A 版)对 10 批 XXZOL 样品的 HPLC 指纹图谱进行分析与评价,各批次样品图谱相对于上述标定的 38 个共有峰的相似度结果见表 4。从表中可看出 XXZOL 各批次间质量差异性较小。

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

XXZOL 共由 10 种中药配伍而成,成分复杂。为了获得最佳的色谱分离效果和较少的分离时间,在本研究中对色谱柱类型、流动相组成、梯度洗脱程序、体积流量、柱温和检测波长等色谱条件进行了考察。

在相同的梯度和流动相条件下,考察了 3 根不同的反相色谱柱,即 Agilent Zorbax SB-C₁₈、Agilent Eclipse XDB-C₁₈、Waters XselectTM HSS T3 的分析效果。结果 Waters XselectTM HSS T3 柱分离效果较好。进一步对比了甲醇-水和乙腈-水体系组成的各

种流动相的分离效果,结果发现乙腈-水体系对样品的色谱峰分离效果更好。

在不同的梯度洗脱模式下对一些改性剂包括不同比例的甲酸和冰醋酸也进行了研究,考虑到峰的对称性、分离度以及分离时间等因素,发现乙腈-0.4%冰醋酸水溶液的梯度洗脱模式更适合于分离研究。不同体积流量(0.4、0.6、0.8、1.0 mL/min)以及柱温(25、30、35 ℃)对色谱分离效果的影响也做了相应的研究对比。发现当体积流量为 0.6 mL/min 时柱效高,可缩短分析时间且不影响分离效果,故选择 0.6 mL/min 的恒定体积流量;而柱温对分离效果影响较小,故柱温选择 25 ℃。

通过紫外检测器在 190~400 nm 波长内对样品进行检测,结果显示在 254 nm 时样品溶液中色谱峰个数较多且各峰比例适中,基线较平稳,故选择以 254 nm 作为检测波长。

3.2 质控指标的选择

XXZOL 系根据中医对小儿食积咳嗽发病机制的认识和古医籍治疗食积咳嗽的有关方药并结合其长期临床经验研制而成。具有清热肃肺、消积止咳的功效,针对食积咳嗽有很好的疗效^[16]。方中山楂、槟榔,消食导滞为君药,以治其本,食积得消,则蕴郁的痰浊无以依附,生热生痰无源。以枇杷叶、瓜蒌、桔梗、连翘清肺化痰,宣散肺气为臣药,使咳嗽易愈。葶苈子泻肺平喘,莱菔子消食化积兼降

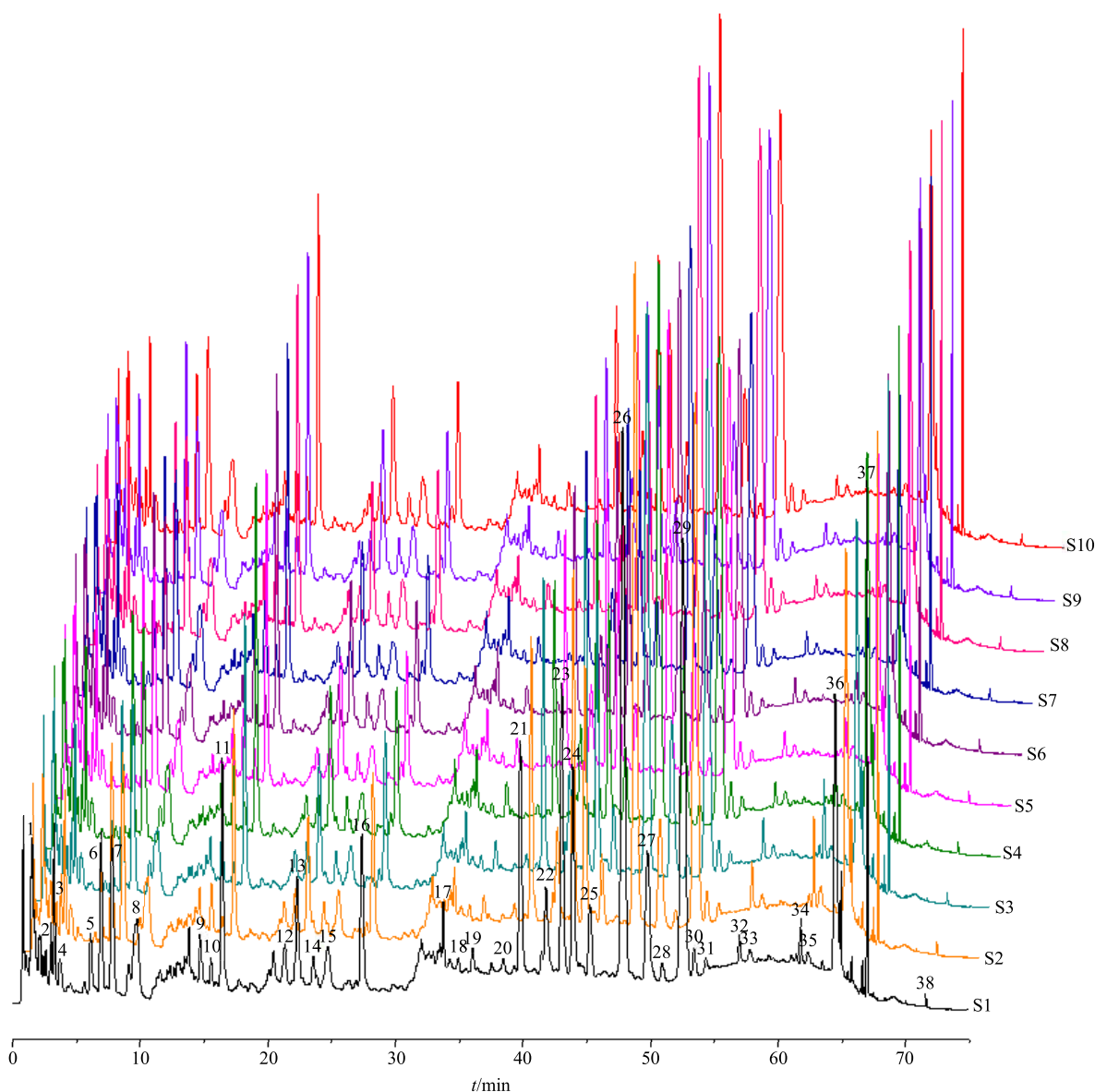


图 2 10 批样品的 HPLC 指纹图谱
Fig. 2 HPLC fingerprint of 10 batches of samples

表 4 相似度评价结果 Table 4 Similarity evaluation and analysis					
序号	相似度		序号	相似度	
	夹角余弦	相关系数		夹角余弦	相关系数
S1	0.999 7	0.999 3	S6	0.999 7	0.999 3
S2	0.999 8	0.999 6	S7	0.999 7	0.999 4
S3	0.999 6	0.999 2	S8	0.999 8	0.999 5
S4	0.999 6	0.999 2	S9	0.999 6	0.999 1
S5	0.999 7	0.999 4	S10	0.999 9	0.999 7

气化痰，蝉蜕清肺热、宣肺气，枳实行气消痰，以上均为佐药。桔梗除宣肺祛痰止咳外，还能引导诸

药直达病所，是为使药^[17-18]。本研究结合中药“君臣佐使”配伍原则，并参考《中国药典》2015 年版中单味药质控指标和 XXZOL 指纹图谱共有峰指认结果来选择质控指标，建立其多指标定量测定方法，以提高质量控制的整体性和特征性。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [1] 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.
- [2] 许怀勇. 中药指纹图谱在药品质量控制中的应用 [J]. 医药导报, 2009, 28(2): 218-220.
- [3] 王春雷, 姜建伟, 侯桂兰. 急支糖浆 HPLC 特征指纹图

- 谱研究及多成分定量测定 [J]. 中草药, 2016, 47(23): 4192-4197.
- [4] 熊淑雯, 章开, 陈东, 等. 指纹图谱技术结合 PLS-DA 在黄连上清丸质量控制中的应用 [J]. 南昌大学学报: 医学版, 2015, 55(6): 15-19.
- [5] 韩燕全, 洪燕, 高家荣, 等. 基于 UPLC 特征指纹图谱和指标成分定量测定研究炮姜的炮制工艺 [J]. 中草药, 2013, 44(1): 42-46.
- [6] Yu F, Kong L, Zou H, *et al.* Progress on the screening and analysis of bioactive compounds in traditional Chinese medicines by biological fingerprinting analysis [J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2010, 13(10): 855-868.
- [7] 张萍, 杨燕, 鄢丹, 等. 多指标成分含量测定与指纹图谱分析在中药制备工艺与质量控制中的应用 [J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(1): 120-123.
- [8] Liu S, Liang Y Z, Liu H T. Chemometrics applied to quality control and metabolomics for traditional Chinese medicines [J]. *J Chromatogr B*, 2016, 1015/1016: 82-91.
- [9] 周佳宝, 李进启. HPLC 法测定小儿消积止咳口服液中辛弗林的含量 [J]. 中国药师, 2010, 13(10): 1474-1475.
- [10] 郭时运, 王民合, 闫光军, 等. HPLC 法测定小儿消积止咳口服液中连翘苷的含量 [J]. 山东医药工业, 2001, 20(4): 15-16.
- [11] 康四和. HPLC 测定小儿消积止咳口服液中辛弗林、氢溴酸槟榔碱的含量 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(10): 1298-1300.
- [12] 康四和, 周锐, 聂晶, 等. HPLC 测定小儿消积止咳口服液中柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的含量 [J]. 中国中药杂志, 2010, 32(12): 2088-2091.
- [13] 康四和, 周锐, 聂晶, 等. HPLC 测定小儿消积止咳口服液中槟榔碱的含量 [J]. 中国药师, 2011, 14(1): 65-66.
- [14] 朱姮, 崔莉, 刘倩, 等. HPLC-DAD-ESI-Q-TOF/MS 法测定金银忍冬花中的化学成分 [J]. 中草药, 2017, 48(11): 2300-2305.
- [15] 王卉, 胡思源, 魏小维, 等. 小儿消积止咳口服液治疗痰热咳嗽兼食积证的多中心临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2010, 25(5): 376-380.
- [16] 张雪, 向希雄. 小儿消积止咳口服液/颗粒治疗痰热咳嗽兼食积证疗效观察 [J]. 中国中西医结合儿科学, 2010, 12(2): 521-523.
- [17] 陈新, 王洪, 谢颖, 等. 小儿消积止咳口服液治疗小儿咳嗽 118 例疗效观察 [J]. 西南军医, 2007, 9(3): 47-48.