

小儿七星茶口服液指纹图谱研究

徐吉银^{1,2}, 孙丽丽³, 杨立伟^{3*}, 乔莉³, 王慧玲^{1,2}, 彭丽华^{1,2}, 乔卫林^{1,2}, 成金乐^{1,2*}

1. 国家中医药管理局中药破壁饮片技术与应用重点研究室, 广东 中山 528437

2. 中山市中智药业集团有限公司, 广东 中山 528437

3. 广东省药品检验所, 广东 广州 510180

摘要: 目的 建立小儿七星茶口服液 HPLC 指纹图谱, 表征小儿七星茶口服液的化学成分信息。方法 采用 HPLC 法建立指纹图谱并用液质联用仪鉴定指纹图谱主要色谱峰。采用 Ultimate AQ-C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 以乙腈-0.1% 冰醋酸溶液为流动相进行梯度洗脱; 检测波长为 300 nm; 柱温为 30 ℃; 体积流量为 1.0 mL/min。结果 建立了小儿七星茶口服液 HPLC 指纹图谱, 确认并鉴别出共有特征峰 12 个, 21 批样品的相似度达 0.89 以上; 方法学考察的精密度、重复性相似度均达 1.0, 36 h 内样品稳定性相似度达 0.98。结论 所建立的方法稳定、可靠、重复性好, 可用于小儿七星茶口服液质量控制。

关键词: 小儿七星茶口服液; HPLC; 指纹图谱; 质量控制; 化学成分信息表征

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)06-0928-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.06.012

HPLC fingerprint of Xiaoer Qixing Cha Oral Liquid

XU Ji-yin^{1,2}, SUN Li-li³, YANG Li-wei³, QIAO Li³, WANG Hui-ling^{1,2}, PENG Li-hua^{1,2}, QIAO Wei-lin^{1,2}, CHENG Jin-le^{1,2}

1. Key Laboratory of Herbal Ultrafine Granular Powder of Technology and Application of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Zhongshan 528437, China

2. Zhongzhi Pharmaceutical Group Co., Zhongshan 528437, China

3. Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou 510180, China

Abstract: Objective To establish HPLC fingerprint for Xiaoer Qixing Cha Oral Liquid and analyze its chemical constituents. **Methods** RP-HPLC method was performed on an Ultimate AQ-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with a gradient elution composed of acetonitrile-aqueous solution containing 0.5% acetic acid at the flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was set at 30 ℃, while the detective wavelength was set at 300 nm. HPLC-MS was used to identify the main chromatographic peaks of the fingerprint. **Results** The chromatographic fingerprint common pattern was established. Twelve mutual peaks were obtained and identified from the chromatograms of 21 batches of samples and the similarity of the sample was over 0.89. **Conclusion** The method has good precision, stability, and repeatability and can be used for the quality control of Xiaoer Qixing Cha Oral Liquid.

Key words: Xiaoer Qixing Cha Oral liquid; HPLC; fingerprint; quality control; chemical constituents information representation

小儿七星茶口服液组方由钩藤、蝉蜕、山楂、稻芽、薏苡仁、淡竹叶和甘草 7 种中药配伍而成, 具有开胃消滞、清热定惊的功效, 用于小儿积滞热、消化不良、不思饮食、夜寐不安等。目前, 《中国药典》2015 年版对该制剂的主要质量控制方法为

与山楂、钩藤和甘草对照药材进行 TLC 鉴别; UV 法测定总黄酮的量; HPLC 法测定甘草酸铵的量。

中药复方成分较复杂, 传统质量控制方法只能以其中 1~2 种化学成分的量作为检测指标, 难以全面控制复方的内在质量^[1-3]。本研究在文献研究的基础

收稿日期: 2015-07-20

基金项目: 2012 年度中山市科技计划项目 (20123A275)

作者简介: 徐吉银 (1978—), 男, 硕士, 研究方向为中药质量研究。Tel: (0760)85311918 E-mail: 283978183@qq.com

*通信作者 成金乐, 男, 学士, 教授, 博士生导师, 主要从事创新中药研究。Tel: (0760)85312928 E-mail: gdcjl9@126.com

杨立伟, 男, 硕士, 主要从事质量标准研究。Tel: (020)81853845 E-mail: 67159283@qq.com

上,采用 HPLC 分析技术,建立小儿七星茶口服液的指纹图谱,并对各色谱峰进行化学成分归属及分析其对应的来源药材,为小儿七星茶口服液的整体化学成分信息表征、质量控制、工艺改进及组效关系研究提供依据^[4-16]。

1 仪器与材料

Waters 2695-2487 高效液相色谱仪,美国 Waters 公司; AB SCIEX TripleTOF™ 4600 液相色谱-质谱联用仪,美国 AB SCIEX 公司; 色谱柱为 Ultimate AQ-C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm)、资生堂 MGII-C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm)、Sepax Bio-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); Shimadzu (SIL-HTC/SPD-20A/C70-20AC/LC-20AT) 高效液相色谱仪,日本岛津公司; KQ-300DA 型超声波清洗器,昆山舒美超声仪器有限公司; CP224S 万分之一及 CP225D 十万分之一电子天平,赛多利斯公司; VOS-201SD 真空干燥箱,东京理化公司。

乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。甘草苷 (批号为 111610-2011106,质量分数按 93.7%计),购于中国食品药品检定研究院。

钩藤、蝉蜕、山楂、稻芽、薏苡仁、淡竹叶、甘草及 21 批小儿七星茶口服液 (批号分别为 20120201、20120202、20120203、20120302、20120501、20120502、20120503、20120504、20120602、20120606、20120608、20120610、20120702、20120703、20120710、20120802、20120806、20120812、20120905、20100914、20121002)均由中山市中智药业集团有限公司提供。7 味原料药材均经中智药业集团贾世清药师鉴定为正品,其中钩藤 *Uncariae cum Uncis Ramulus* 来源于茜草科 (Rubiaceae) 植物钩藤 *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil 的干燥带钩茎枝; 蝉蜕 *Cicadae Cordyceps* 来源于蝉科昆虫黑蚱 *Cryptotympana pustulata* Fabricius 的若虫羽化时脱落的皮壳; 山楂 *Crataegi Fructus* 来源于蔷薇科 (Rosaceae) 植物山楂 *Crataegus pinnatifida* Bge. 的干燥成熟果实; 稻芽 *Oryzae Sativae Fructus* 来源于禾本科 (Gramineae) 植物稻 *Oryza sativa* L. 的成熟果实经发芽干燥的炮制加工品; 薏苡仁 *Coicis Semen* 来源于禾本科 (Gramineae) 薏苡 *Coix lacryma-jobi* L. var. *mayuen* (Roman.) Stapf 的干燥成熟种仁; 淡竹叶 *Lophatheri Herba* 来源于禾本科 (Gramineae) 植物淡竹叶 *Lophatherum gracile*

Brongn. 的干燥茎叶; 甘草 *Glycyrrhizae Radix* 来源于豆科 (Leguminosae) 植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎。

2 方法与结果

2.1 色谱及质谱条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 检测波长为 300 nm; 柱温为 30 °C; 体积流量为 1.0 mL/min; 进样量为 5 μL; 以乙腈-0.1% 冰醋酸水溶液为流动相,梯度洗脱: 0~30 min, 5%~15%乙腈; 30~60 min, 15%~25%乙腈。

2.1.2 质谱条件 使用 CDS 自动校正; 使用信息依赖性扫描 (IDA) 进行设置; MS 范围为 m/z 100~1 000, MS/MS 范围为 8 MS/MS, 每组为 m/z 50~1 000; 采用动态背景扣除 (DBS)。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取甘草苷对照品 1.40 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇适量使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配成质量浓度为 0.14 mg/mL 的对照品溶液。

2.3 小儿七星茶口服液供试品溶液的制备

取本品溶液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.4 药材供试品溶液制备

称取处方中 7 味药材, 参照《中国药典》2015 年版中小儿七星茶口服液的制备方法制备相应的单味药材溶液, 即得各味药材供试液。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 取批号为 20120503 的小儿七星茶口服液, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 连续进样 6 次, 按“2.1”项下方法测定, 记录色谱图, 6 张谱图经国家药典委员会的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》的操作规范计算, 相似度不小于 0.999, 各主要色谱峰相对保留时间及峰面积的 RSD 均小于 3%, 说明仪器精密度较高。

2.5.2 重复性试验 取批号为 20120503 的小儿七星茶口服液, 共 6 份, 分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 各取 5 μL 注入液相色谱仪, 按“2.1”项下方法测定, 记录色谱图, 6 张谱图经国家药典委员会的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》操作规范计算, 相似度不小于 0.999, 各主要色谱峰相对保留时间及峰面积的 RSD 均小于 3%, 表明方法的重复性较好。

2.5.3 稳定性试验 取批号为 20120503 的小儿七星茶口服液, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下方法, 分别在 0、3、6、9、12、15、

24、30、36 h 取样测定,记录色谱图,9 张谱图经国家药典委员会的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》的操作规范计算,相似度均大于 0.98,说明供试品溶液在 36 h 内稳定。

2.5.4 耐用性试验

(1) 不同色谱柱的耐用性试验:取批号为 20120503 的小儿七星茶口服液,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,分别采用 4 根不同的色谱柱进样,按“2.1”项下方法测定,记录色谱图。色谱柱分别为 Ultimate AQ-C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 资生堂 MGII-C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); Sepax Bio-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。4 张谱图经国家药典委员会的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》操作规范计算,相似度均大于 0.95。说明本法对不同色谱柱的适用性广。

(2) 不同液相色谱仪的耐用性试验:取批号为 20120503 的小儿七星茶口服液,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,分别采用 Waters 2695-2487 和 Shimadzu (SIL-HTC/SPD-20A/C70-20AC/LC-20AT) 液相色谱仪进样,色谱柱均为 Ultimate AQ-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm),按“2.1”项下方法测定,记录色谱图。2 张谱图经国家药典委员会的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》操作规范计算,相似度均大于 0.98,说明本法对不同色谱仪的选择性低。

2.6 指纹图谱分析

2.6.1 参照色谱峰的确定 精密吸取小儿七星茶口服液供试品溶液(批号 20120503) 5 μL,注入液相色谱仪,测定,记录色谱图。其中 11 号峰(甘草苷)峰形好,分离度好,选为参照峰(S)。

2.6.2 指纹图谱的建立及共有峰的确定 取小儿七星茶口服液 21 批,分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下方法测定,记录色谱图(图 1)。对 21 批样品指纹图谱进行数据分析:平均值法生成对照指纹图谱(图 1),时间窗宽度为 0.1 min,校正方式为多点校正。确定了 12 个色谱峰为小儿七星茶口服液所共有,确定其为共有指纹峰,且共有峰的总面积占总峰面积的 90%以上。

2.6.3 相似度计算 采用国家药典委员会的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》,将测定的 21 批样品指纹图谱数据与生成的对照指纹图谱进行相似度分析,结果 21 批样品的指纹图谱与对照图谱的相似度分别为 0.92、0.90、0.89、0.90、0.99、0.97、0.99、0.99、0.98、0.99、0.98、0.98、0.98、0.98、0.95、0.97、0.98、0.98、0.99、0.98、0.98。21 批样品的指纹图谱与对照图谱比较,仅 1 批样品的相似度为 0.89,其余 20 批样品的相似度均在 0.90 以上,说明本品的质量稳定性较好。

2.6.4 对照药材归属 取小儿七星茶口服液供试品溶液(批号为 20120503)、甘草苷对照品及 7 味药

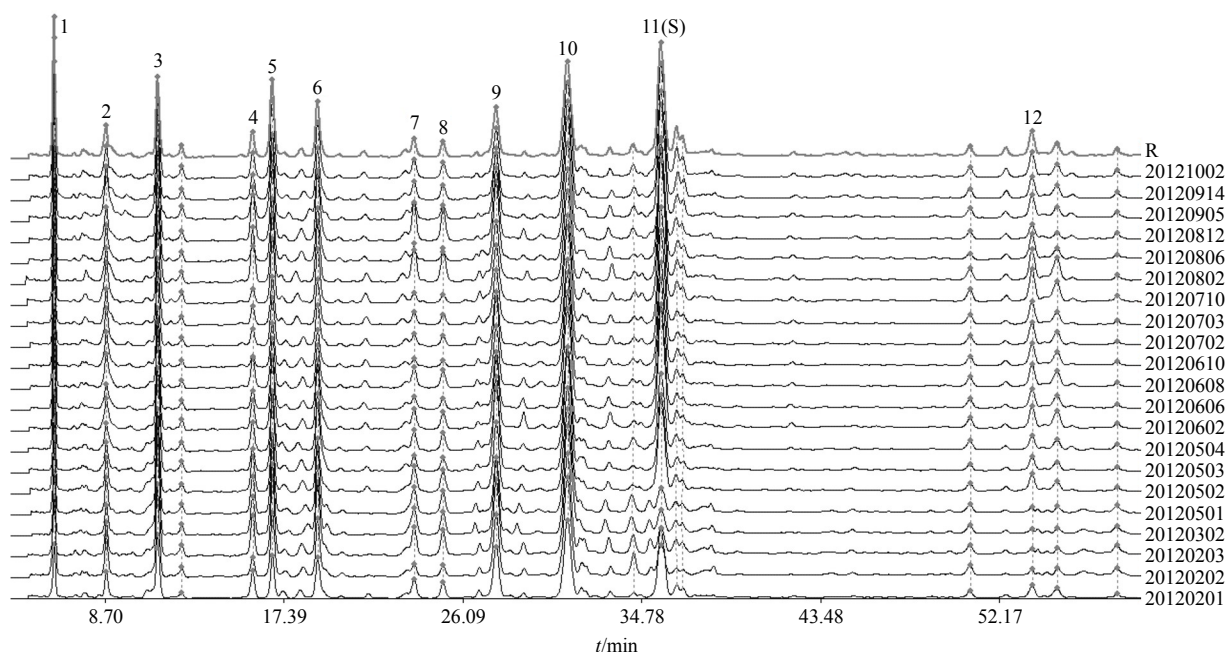


图 1 21 批小儿七星茶口服液指纹图谱及其对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 HPLC fingerprint of 21 batches of Xiaoer Qixing Cha Oral Liquid and their reference fingerprints (R)

材供试品溶液,按“2.1”项下方法用DAD检测器测定,记录色谱图。通过各共有峰的保留时间和DAD光谱图比较分析,可知1号峰主要来源于薏苡仁、山楂、稻芽药材;2号峰来源于蝉蜕;3、4、6~9号峰主要来源于淡竹叶药材;5号峰来源于钩藤和淡竹叶;11、12号峰主要来源于甘草药材。10号峰未得到归属。处方中7味药的化学成分都在本指纹图谱中体现(图2)。

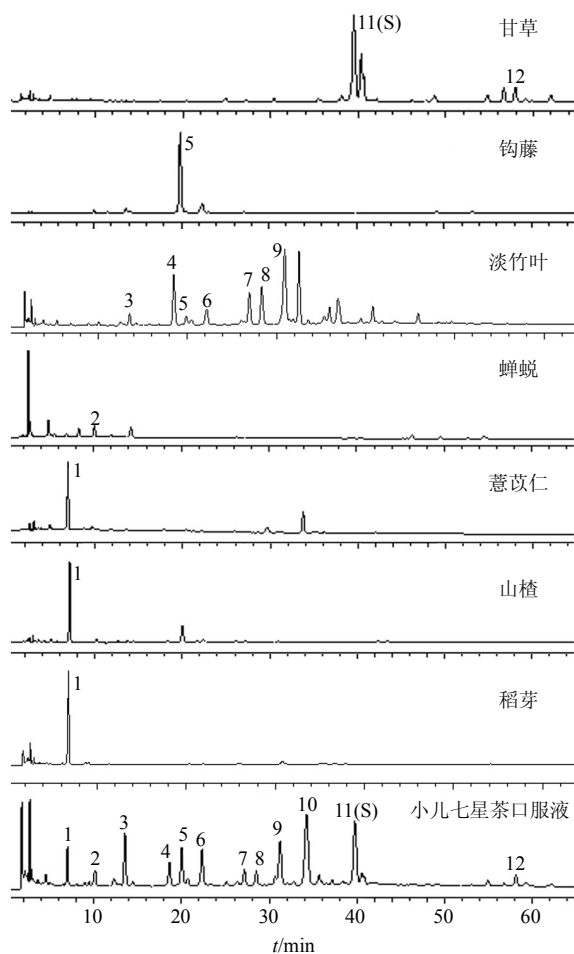


图2 小儿七星茶口服液指纹图谱中各共有峰归属

Fig. 2 Chromatogram of each common peak attribution in fingerprint of Xiaoer Qixing Cha Oral Liquid

2.6.5 共有色谱峰的指认 用 AB SCIEX Triple TOF™ 4600 液相色谱-质谱联用仪分析小儿七星茶口服液样品, Peakview 软件判断化合物结构, 各共有峰的成分指认结果如下: 1号峰为 vanillobioside, 2号峰为 protocatechuic acid, 3号峰为 neochlorogenic acid, 4号峰为 5-O-coumaroyl-quinic acid, 5号峰为 chlorogenic acid, 6号峰为 cryptochlorogenic acid, 7号峰为 3-O-coumaroyl-quinic acid, 8号峰为

4-O-coumaroyl-quinic acid, 9号峰为 *p*-coumaric acid, 10号峰为 phloridzin, 11号峰为甘草苷 (liquiritin), 12号峰为异甘草苷 (isoliquiritin)。

3 讨论

3.1 样品溶液制备考察

本研究考察了直接微孔滤膜滤过进样、醋酸乙酯萃取回收溶剂后甲醇溶解、正丁醇萃取回收溶剂后甲醇溶解、正丁醇萃取过聚酰胺柱纯化甲醇洗脱液、加40%盐酸加热回流提取回收溶剂甲醇溶解,共6种小儿七星茶口服液供试品溶液制备方法,比较6种不同制备方法所得样品的分析图谱,结果直接滤过进样所得的图谱检测的成分相对较多、各峰高之间的比例适中,且基线比较平稳,样品不经过前处理有利于保存化学成分,故采用小儿七星茶口服液直接微孔滤膜滤过作为供试品溶液制备方法。

3.2 检测波长考察

本研究比较了280、300、320、340 nm波长处的样品图谱,结果在300 nm波长下检测到的成分相对较多、各峰高比例适中、基线比较平稳,故确定检测波长为300 nm。

3.3 流动相系统考察

考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.1%醋酸、乙腈-0.1%甲酸溶液、乙腈-0.1%冰醋酸溶液、乙腈-0.5%冰醋酸、乙腈-0.05%冰醋酸、乙腈-0.02%冰醋酸、乙腈-0.01%冰醋酸共10组流动相洗脱系统,采用乙腈-0.1%冰醋酸作为流动相,检测供试品所得峰的信息较多,基线较平稳,分离度、峰形和柱效均较佳。

参考文献

- [1] 蒋永和,袁继承,李卓亚,等. HPLC法测定小儿七星茶口服液有效成分的含量[J]. 安徽医药, 2009, 13(11): 1337-1338.
- [2] 张海珠,肖小河,王伽伯,等. 中药质量评控的第一要义: 效应当量一致性[J]. 中草药, 2015, 46(11): 1571-1575.
- [3] 肖小河,金城,鄢丹,等. 中药大质量观及实践[J]. 中草药, 2010, 41(4): 505-508.
- [4] 曾常青,许李文,罗泉珍. 小儿七星茶冲剂质量标准研究[J]. 中成药, 2006, 28(3): 363-366.
- [5] 李亚萍,雷晓林,庄义修,等. 高效液相色谱法测定小儿七星茶冲剂中钩藤碱含量[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(12): 1873-1874.
- [6] 肖树雄,贾宜军. 小儿七星茶糖浆质量标准提高研究[J]. 中成药, 2008, 30(7): 附3-附6.

- [7] 张立峰, 刘灿仿. HPLC 法测定保儿安颗粒中熊果酸的含量 [J]. 中国药师, 2009, 12(8): 1072-1073.
- [8] 曹进, 叶兆波, 车镇涛. 大中药复方的色谱指纹图谱应用研究 [J]. 中成药, 2006, 28(3): 313-317.
- [9] 陈勇, 陈碧莲, 何云珍, 等. 薏苡仁药材指纹图谱的研究与应用 [J]. 药学实践杂志, 2003, 21(6): 357-359.
- [10] 汤树良, 杨滨, 黄璐琦, 等. 山楂高效液相指纹图谱研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(4): 9-13.
- [11] 张俐伟, 付玉梅, 廖群, 等. 不同产地山楂指纹图谱的比较研究 [J]. 江西中医学院学报, 2005, 17(6): 49-50.
- [12] 邬云霞, 吴启南. 淡竹叶药材 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2009, 25(3): 209-211.
- [13] 刘佳, 富志军. 钩藤的研究概况 [J]. 海峡药学, 2006, 18(5): 91-93.
- [14] 樊天宇, 王跃飞, 过科家. 内蒙古产甘草药材 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(1): 45-46.
- [15] 禹晓梅, 徐红颖, 梁逸曾. 甘草药材 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(4): 1009-1012.
- [16] 朱焕容, 赵小宁, 王秀芬, 等. 小儿七星茶颗粒指纹图谱 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(13): 93-95.