

基于小粒径色谱柱的哮喘颗粒 HPLC 指纹图谱研究及多成分快速测定

林 夏^{1,2}, 李 淼^{1,2}, 崔培超^{1,2}, 李家春^{1,2}, 黄文哲^{1,2}, 王振中^{1,2}, 萧 伟^{1,2*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

摘要: **目的** 采用小粒径色谱柱建立哮喘颗粒(XCG) HPLC 指纹图谱, 同时快速测定其中7个有效成分(莫诺苷、苦杏仁苷、马钱苷、升麻素苷、5-*O*-维斯阿米醇苷、木兰脂素、五味子醇甲)的方法。**方法** 采用 HPLC, 色谱柱为 Kromasil C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 3.5 μm); 流动相为甲醇-乙腈-水; 体积流量 1.0 mL/min; 梯度洗脱; 检测波长: 210 nm (苦杏仁苷、木兰脂素)、240 nm (莫诺苷、马钱苷、升麻素苷、5-*O*-维斯阿米醇苷、五味子醇甲及指纹图谱); 柱温 40 °C; 采用 UPLC-Q-TOF/MS 结合对照品对共有峰进行指认。**结果** 得到分离度和重现性良好的 HPLC 指纹图谱, 标定了 20 个共有峰, 10 批样品相似度在 0.90 以上; 采用 UPLC-Q-TOF/MS 对共有峰进行指认, 11 个成分经对照品比对, 分别为莫诺苷、苦杏仁苷、马钱苷、升麻素苷、5-*O*-维斯阿米醇苷、木兰脂素、五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素, 并对其中与功效相关的成分莫诺苷、苦杏仁苷、马钱苷、升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、木兰脂素、五味子醇甲进行定量分析, 平均回收率在 97.3%~103.8% (RSD 均小于 2.0%), 10 批次样品中 7 个成分量分别为莫诺苷 0.51~0.69 mg/g, 苦杏仁苷 5.01~5.95 mg/g, 马钱苷 1.02~1.33 mg/g, 升麻素苷 0.35~0.45 mg/g, 5-*O*-维斯阿米醇苷 0.45~0.55 mg/g, 木兰脂素 0.38~0.48 mg/g, 五味子醇甲 0.89~1.08 mg/g, 各成分量的 RSD 均小于 11.0%。**结论** 建立的指纹图谱和 7 个成分定量测定的方法, 快速、准确、可靠, 可以用于 XCG 的质量评价。

关键词: 哮喘颗粒; 小粒径色谱柱; HPLC; 指纹图谱; 莫诺苷; 苦杏仁苷; 马钱苷; 升麻素苷; 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷; 木兰脂素; 五味子醇甲; UPLC-Q-TOF/MS

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)22-4675-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.22.013

Fingerprint and multi-components quantitative determination of Xiaochuan Granula by fused-core column

LIN Xia^{1,2}, LI Miao^{1,2}, CUI Pei-chao^{1,2}, LI Jia-chun^{1,2}, HUANG Wen-zhe^{1,2}, WANG Zhen-zhong^{1,2}, XIAO Wei^{1,2}

1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To establish an HPLC fingerprint of Xiaochuan Granula (XCG), and to make a quantitative analysis of seven components by fused-core column. **Methods** Kromasil C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm) was used with the mobile phase of Methanol (A)-acetonitrile (B)-water (C), at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 210 nm for amygdalin and magnolin, 240 nm for morroniside, loganin, prim-*O*-glucosylcimifugin, 4'-*O*-β-glucopyranosyl-5-*O*-methylvisamminol, schizandrin, and fingerprint; And the column temperature was maintained at 40 °C. Common peaks had been identified by UPLC-Q-TOF/MS and standard compounds. **Results** The fingerprint chromatography included 20 mutual peaks, and the similarity was more than 0.90. Eleven chemical components were identified by UPLC-Q-TOF/MS and standard compounds, which were 3-morroniside, oxypaeoniflorin, 5-loganin, 6-prim-*O*-glucosylcimifugin, 9-4'-*O*-β-glucopyranosyl-5-*O*-methylvisamminol, 11-magnolin, 15-schisandrin, 16-schisandrol B, 18-schisantherin A, 19-deoxyschizandrin, and 20-γ-schizandrin B. Moreover, seven active components (morroniside, oxypaeoniflorin, loganin, prim-*O*-glucosylcimifugin, 4'-*O*-β-glucopyranosyl-5-*O*-methylvisamminol,

收稿日期: 2017-06-29

作者简介: 林 夏 (1985—), 中级工程师, 从事中药质量标准研究。Tel: 15105130710 E-mail: linxia297125856@163.com

*通信作者 萧 伟, 研究员, 博士, 研究方向为中药新药的研究与开发。

Tel: (0518)81152367 Fax: (0518)81152327 E-mail: kanionlunwen@163.com

magnolin, and schisandrin) were quantified and the average recovery rates ranged from 97.3% to 103.8% with RSDs less than 2.0%. Seven components in 10 batches samples were morroniside 0.51—0.69 mg/g, amygdalin 5.01—5.95 mg/g, loganin 1.02—1.33 mg/g, prim-*O*-glucosylcimifugin 0.35—0.45 mg/g, 4'-*O*- β -glucopyranosyl-5-*O*-methylvisaminol 0.45—0.55 mg/g, magnolin 0.38—0.48 mg/g, schisandrin 0.89—1.08 mg/g, respectively, and RSD of each component was less than 11.0%. **Conclusion** The method for establishing HPLC fingerprint and quantitative analysis of seven components is rapid, simple, and accurate, and can be used for the quality control of XCG.

Key words: Xiaochuan Granula; fused-core column; HPLC; fingerprint; morroniside; oxypaeoniflorin; loganin; prim-*O*-glucosylcimifugin; 4'-*O*- β -glucopyranosyl-5-*O*-methylvisaminol; magnolin; schisandrin; UPLC-Q-TOF/MS

哮喘颗粒(Xiaochuan Granula, XCG)是由防风、紫苏叶、炙麻黄、苦杏仁、五味子、白果、紫菀、山萸肉、辛夷共9味中药经适宜工艺制得的中药复方制剂^[1]。处方以防风、紫苏叶为君药以疏风,炙麻黄、紫菀、杏仁为臣药以降气、润肺、平喘,以白果、五味子、山萸肉为佐药以纳气、敛肺、定喘,以辛夷为使药疏风通窍,诸药配伍共奏疏风缓急利窍、肃肺平喘的功效。主要用于哮喘之“风邪伤肺、肃降失常、气道挛急”突发或反复发作,或过敏因素而致喘息憋闷、气短、气息急迫,喉中哮喘有声等支气管哮喘急性发作等症状。该复方药味较多,化学成分复杂,且极性差异大,由于小粒径色谱柱(3.5 μm)可实现在常规高效液相色谱仪上进行测定分析,既高效又经济^[2],故本实验采用小粒径色谱柱结合UPLC-Q-TOF/MS对XCG HPLC指纹图谱进行研究^[3-5]。鉴于莫诺昔、苦杏仁苷、马钱苷、升麻素苷、5-*O*-维斯阿米醇苷、木兰脂素和五味子醇甲的生物活性广泛,药理作用明显^[6-11],同时结合不同工艺路线以对工艺过程进行控制,故而对以上成分进行定量研究^[12-16]。本研究所建立的指纹图谱及多成分快速定量方法为本品及类似制剂的质量标准研究提供了参考依据。

1 仪器与试药

Agilent 1260 高效液相色谱仪、Q-TOF (6538) 质谱仪、电喷雾离子源(ESI)及Agilent Masshunter 数据处理系统,美国Agilent公司;Millipore Milli-Q Century 纯水仪,美国Millipore公司;BSA224S-CW 型电子分析天平,德国Sartorius公司;Mettler Toledo X6 型电子分析天平,瑞士Mettler公司;KQ-250DB 型超声波清洗机,昆山市超声仪器有限公司。

对照品马钱苷(批号111640-201005,质量分数99.2%)、升麻素苷(批号111522-201310,质量分数95.0%)、5-*O*-维斯阿米醇苷(批号111523-201509,质量分数95.8%)、五味子醇甲(批号110857-201412,质量分数99.4%)、五味子乙素(批

号110765-200508,质量分数100%),中国食品药品检定研究院;对照品五味子醇乙(批号140330,质量分数 $\geq 98\%$)、五味子酯甲(批号141021,质量分数 $\geq 98\%$)、五味子甲素(批号141112,质量分数 $\geq 98\%$),成都普菲德生物技术有限公司。甲醇,上海星可生化有限公司,色谱纯;其余试剂均为分析纯。XCG,批号140805、140901、141001、141102、141203、150101、150201、150301、150401、150501,由江苏康缘药业股份有限公司制备,分别编号S1~S10。实验用药材防风 *Saposhnikovia Radix*、紫苏叶 *Perillae Folium*、麻黄(木贼麻黄蜜炙) *Ephedrae Herba*、苦杏仁(杏) *Armeniacae Semen Amarum*、五味子 *Schisandrae Chinensis Fructus*、白果 *Ginkgo Semen*、紫菀 *Asteris Radix et Rhizoma*、山萸肉(山萸肉) *Corni Fructus*、辛夷(玉兰) *Magnoliae Flos* 均购自连云港康济大药房,均由连云港康济大药房连锁有限公司吴舟执业药师鉴定,依次为伞形科防风属植物防风 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. 的干燥根、唇形科紫苏属植物紫苏 *Perilla frutescens* (L.) Britt. 的干燥叶(或带嫩枝)、麻黄科麻黄属植物木贼麻黄 *Ephedra equisetina* Bge. 的干燥草质茎的蜜炙品、蔷薇科杏属植物杏 *Prunus armeniaca* L. 的干燥成熟种子、五味子科五味子属植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实、银杏科银杏属植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 的干燥成熟种子、菊科紫菀属植物紫菀 *Aster tataricus* L. f. 的干燥根和根茎、山茱萸科山茱萸属植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉、木兰科玉兰属植物玉兰 *Magnolia denudata* Desr. 的干燥花蕾。

2 指纹图谱研究

2.1 色谱条件

色谱柱为Kromasil 100-3.5 C_{18} (150 mm $\times$ 4.6 mm, 3.5 μm),流动相为甲醇-乙腈-水,洗脱程序为0~2 min, 15%甲醇;2~16 min, 15%~54%甲

醇, 16~30 min, 54%~72%甲醇; 30~36 min, 72%~98%甲醇; 0~36 min, 98%甲醇; 柱温 40 °C; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 240 nm; 进样量 5 μ L。理论塔板数按马钱苷峰计不小于 20 000。

2.2 参照物的选择

选择保留时间适中, 分离较好的 5-*O*-维斯阿米醇苷作为参照物。

2.3 供试品溶液的制备

取装量差异项下的本品, 混匀, 取适量, 研细, 取约 1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50%甲醇 25 mL, 称定质量, 超声处理(功率 200 W, 频率 40 kHz) 40 min, 再称定质量, 用甲醇补足缺失的质量, 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液。

2.4 精密度试验

取同一供试品(批号 140805)溶液连续进样 6 针, 以 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷为参照峰, 计算共有峰相对保留时间及主要共有峰相对峰面积, 结果 RSD 均小于 1.8%。又以第 1 次进样所得指纹图谱作为参照计算后 5 次进样所得指纹图谱的相似度, 结果相似度均不小于 0.99。

2.5 稳定性试验

取同一供试品(批号 140805)内容物适量, 取

约 1.0 g, 精密称定, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 精密吸取 5 μ L, 分别于 0、3、6、9、12、18 h 注入液相色谱仪。以 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷为参照峰, 计算共有峰相对保留时间及主要色谱峰相对峰面积, 结果 RSD 均小于 2%。又以第 1 次进样所得指纹图谱作为参照计算后 5 次进样所得指纹图谱的相似度, 结果相似度均不小于 0.99。

2.6 重复性试验

取同一供试品(批号 140805)内容物适量, 取约 1.0 g, 精密称定, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 平行制备 6 份, 测定。以 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷为参照峰, 计算共有峰相对保留时间及主要色谱峰相对峰面积, 结果 RSD 均小于 2%。又以第 1 次进样所得指纹图谱作为参照计算后 5 次进样所得指纹图谱的相似度, 结果相似度均不小于 0.99。

2.7 指纹图谱研究

2.7.1 指纹图谱的建立与技术参数 根据 10 批 XCG 检测所得图谱, 标定 20 个共有峰, 采用国家药典委员会颁布的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2012 年版进行分析, 以平均数法建立对照指纹图谱(R)。10 批样品(S1~S10)的指纹图谱与 R 比较, 相似度分别为 0.947、0.958、0.949、0.917、0.941、0.961、0.939、0.960、0.967、0.958, 见图 1。

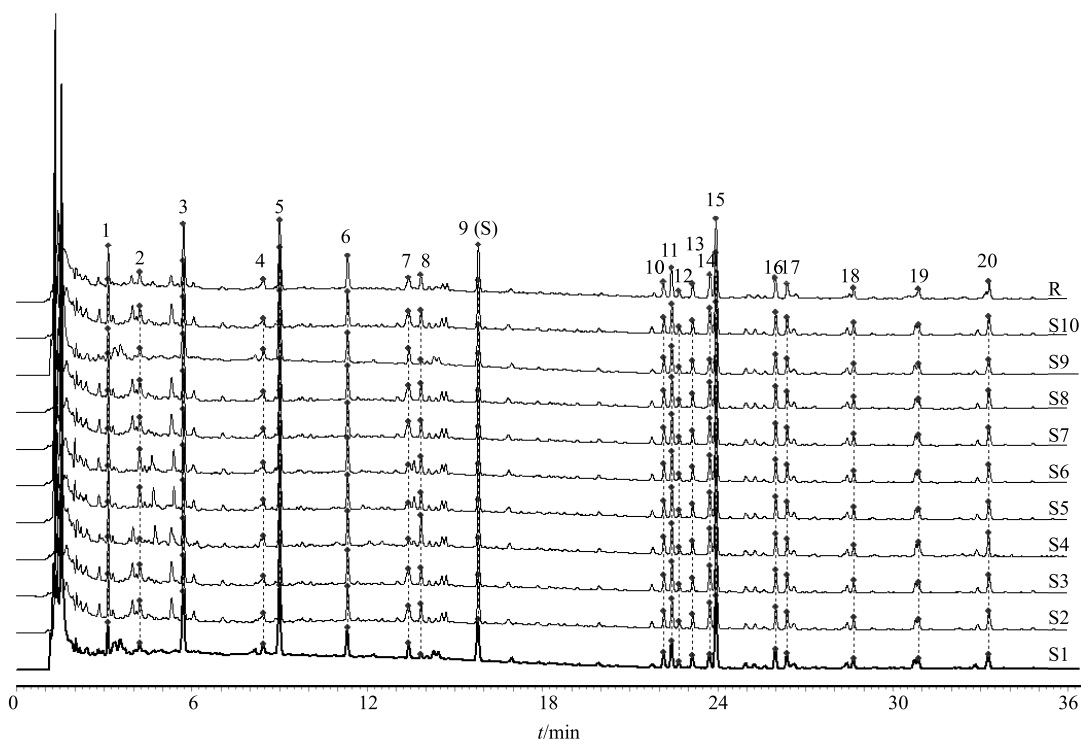


图 1 10 批 XCG 指纹图谱及对照指纹图谱 (R)

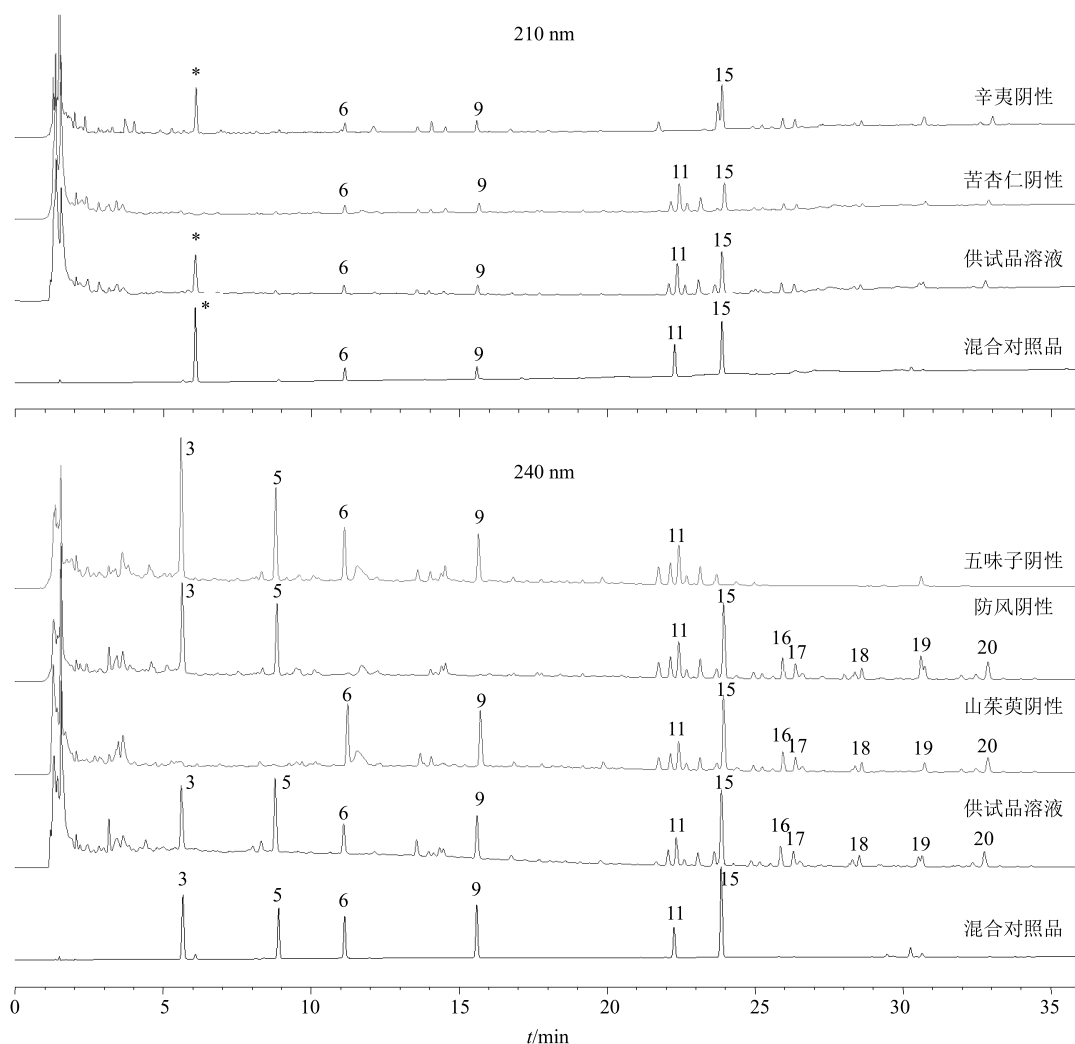
Fig. 1 HPLC fingerprint for 10 batches and control fingerprint (R) of XCG

2.7.2 指纹图谱相关性考察 分别取处方中各药味粉末 0.5 g, 精密称定, 按照“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.1”项下色谱条件进样分析, 结果 1 号峰主要来自于山茱萸和五味子, 2、11、12、13 号峰来自于辛夷, 3、4、5 号峰来自于山萸肉, 6、7、8、9 号峰主要来自于防风, 10 号峰主要来自于紫苏叶, 11、12、13 号峰来自于辛夷, 14 号峰来自于紫菀, 15、16、17、18、19、20 号峰来自于五味子。见图 2。

2.7.3 指纹图谱中色谱峰的指认 取莫诺苷、苦杏仁苷、马钱苷、升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、木兰脂素、五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素和五味子乙素对照品适量, 加 50% 甲醇制成混合对照品溶液, 同时取“2.3”项下供试品溶

液, 采用 UPLC-Q-TOF/MS 获得目标化合物的精确质量数, 同时结合对照品信息, 通过比对, 指认指纹图谱中色谱峰, 20 个共有峰中 3 号峰为莫诺苷, 5 号峰为马钱苷, 6 号峰为升麻素苷, 9 号峰为 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷, 11 号峰为木兰脂素, 15 号峰为五味子醇甲, 16 号峰为五味子醇乙, 18 号峰为五味子酯甲, 19 号峰为五味子甲素, 20 号峰为五味子乙素。结果见表 1。

UPLC-Q-TOF/MS 分析条件: 采用 ESI 源, 通过正、负离子模式分别扫描, 毛细管电压, 正离子模式 4 000 V; 负离子模式 3 500 V, 雾化气压力 310.320 kPa (45 psi), 干燥气体积流量 10 L/min, 加热毛细管温度 350 °C, 源内裂解电压 175 V, 锥孔电压 65 V, 质量数扫描范围 m/z 100~2 000。



3-莫诺苷 *苦杏仁苷 5-马钱苷 6-升麻素苷 9-5-*O*-甲基维斯阿米醇苷 11-木兰脂素 15-五味子醇甲

3-morroniside *-amygdalin 5-loganin 6-prim-*O*-glucosylcimifugin 9-4'-*O*-beta-glucopyranosyl-5-*O*-methylvisaminol 11-magnolin 15-schizandrin

图2 XCG的HPLC图(210 nm和240 nm)

Fig. 2 HPLC of XCG (210 nm and 240 nm)

表 1 11 种成分 UPLC-Q-TOF/MS 的质谱分析鉴定结果

Table 1 UPL-Q-TOF/MS analysis results of 11 chemical constituents in XCG

峰号	t/min	分子式	一级离子	实际值 (<i>m/z</i>)	理论值 (<i>m/z</i>)	偏差/($\times 10^{-6}$)	鉴定化合物	归属药材
3	5.695	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₁	[M-H] ⁻	405.135 8	405.139 7	0.12	莫诺苷	山萸肉
*	6.169	C ₂₀ H ₂₇ NO ₁₁	[M+Na] ⁺	480.168 2	480.158 2	0.24	苦杏仁苷	苦杏仁
5	9.051	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₀	[M-H] ⁻	389.140 4	389.144 7	-0.78	马钱苷	山萸肉
6	11.409	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₁	[M+H] ⁺	469.401 9	469.451 1	0.27	升麻素苷	防风
9	15.901	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₀	[M+H] ⁺	453.176 1	453.451 7	0.57	5- <i>O</i> -甲基维斯阿米醇苷	防风
11	22.519	C ₂₃ H ₂₈ O ₇	[M+H-H ₂ O] ⁺	399.201 8	399.217 8	-1.39	木兰脂素	辛夷
15	24.034	C ₂₄ H ₃₂ O ₇	M ⁺	432.214 0	432.507 0	0.14	五味子醇甲	五味子
16	26.088	C ₂₃ H ₂₈ O ₇	[M+Na] ⁺	439.172 9	439.444 2	0.86	五味子醇乙	五味子
			[M-H] ⁻	415.175 8	415.167 7	0.12		
18	28.745	C ₃₀ H ₃₂ O ₉	[M+H] ⁺	537.209 7	537.570 1	-1.44	五味子酯甲	五味子
19	31.014	C ₂₄ H ₃₂ O ₆	[M+H] ⁺	417.227 4	417.507 3	0.27	五味子甲素	五味子
20	33.601	C ₂₃ H ₂₈ O ₆	[M+H] ⁺	401.195 7	401.460 1	-3.98	五味子乙素	五味子
			[M+Na] ⁺	423.178 4	423.078 4	0.26		

*表示该成分非 240 nm 指纹图谱中共有峰

* the composition is not the common peaks of fingerprint at 240 nm

3 定量测定方法与结果

3.1 色谱条件

色谱柱为 Kromasil 100-3.5 C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 3.5 μm), 流动相为甲醇-乙腈-水, 洗脱程序为 0~2 min, 15%甲醇; 2~16 min, 15%~54%甲醇; 16~30 min, 54%~72%甲醇; 30~36 min, 72%~98%甲醇; 0~36 min, 98%甲醇; 柱温 40 ℃; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 210 nm (苦杏仁苷、木兰脂素)、240 nm (莫诺苷、马钱苷、升麻素苷、5-*O*-维斯阿米醇苷、五味子醇甲); 进样量 5 μL。色谱图见图 2。

3.2 对照品溶液制备

精密称取莫诺苷、苦杏仁苷、马钱苷、升麻素苷、5-*O*-维斯阿米醇苷、木兰脂素和五味子醇甲对照品适量, 加 50%甲醇制成混合对照品溶液母液, 其中含莫诺苷 250.75 μg/mL、苦杏仁苷 2320.78 μg/mL、马钱苷 640.93 μg/mL、升麻素苷 171.78 μg/mL、5-*O*-维斯阿米醇苷 283.62 μg/mL、木兰脂素 211.01 μg/mL、五味子醇甲 547.99 μg/mL。

3.3 供试品溶液制备

同“2.3”项下供试品溶液的制备方法。

3.4 定量限

按“3.1”项色谱条件, 用混合对照品母液溶液稀释进行试验, 结果莫诺苷、苦杏仁苷、马钱苷、升麻素苷、5-*O*-维斯阿米醇苷、木兰脂素和五味子

醇甲的定量限分别为 1.010 ng (*S/N*=10.2)、0.339 ng (*S/N*=9.8)、0.941 ng (*S/N*=10.3)、0.563 ng (*S/N*=10.5)、0.632 ng (*S/N*=10.5)、0.754 ng (*S/N*=10.5)、0.441 ng (*S/N*=10.5)。

3.5 线性关系考察

精密量取上述混合对照品溶液母液 0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 mL 分别于 5 mL 量瓶内, 加甲醇稀释定容至刻度, 摇匀制成 6 个质量浓度的混合对照品溶液, 依次含莫诺苷 5.02、10.03、25.08、50.15、75.23、100.30 μg/mL, 苦杏仁苷 46.42、92.83、232.08、464.16、696.23、928.31 μg/mL, 马钱苷 12.82、25.64、64.09、128.19、192.28、256.37 μg/mL, 升麻素苷 3.44、6.87、17.18、34.36、51.35、68.71 μg/mL, 5-*O*-维斯阿米醇苷 5.67、11.34、28.36、56.72、85.08、113.45 μg/mL, 木兰脂素 4.22、8.44、21.20、42.20、63.30、84.40 μg/mL, 五味子醇甲 10.96、21.92、54.80、109.60、164.40、219.20 μg/mL, 按“2.1”项下色谱条件测定, 记录色谱图。

以峰面积为纵坐标 (*Y*), 进样质量浓度为横坐标 (*X*), 绘制标准曲线。结果表明, 各成分在相应质量浓度范围内呈良好线性关系, 线性范围、回归方程、相关系数 (*r*) 分别为莫诺苷 5.02~100.30 μg/mL, $Y=12.444 0 X+2.823 8$, $r=0.999 9$; 苦杏仁苷 46.42~928.31 μg/mL, $Y=4.309 7 X+1.008 8$, $r=1.000 0$; 马钱苷 12.82~256.37 μg/mL, $Y=$

7.571 1 X - 1.134 4, $r=1.000$ 0; 升麻素苷 3.44~68.71 $\mu\text{g/mL}$, $Y=10.601$ 0 X - 0.910 2, $r=1.000$ 0; 5- O -甲基维斯阿米醇苷 5.67~113.45 $\mu\text{g/mL}$, $Y=11.872$ 0 X - 0.237 1, $r=1.000$ 0; 木兰脂素 4.22~84.40 $\mu\text{g/mL}$, $Y=36.032$ 0 X + 4.615 7, $r=0.999$ 9; 五味子醇甲 10.96~219.20 $\mu\text{g/mL}$, $Y=11.658$ 0 X - 34.001 0, $r=0.999$ 9。

3.6 精密度试验

取线性中间点(含莫诺苷 25.08 $\mu\text{g/mL}$ 、苦杏仁苷 232.08 $\mu\text{g/mL}$ 、马钱苷 64.09 $\mu\text{g/mL}$ 、升麻素苷 17.18 $\mu\text{g/mL}$ 、5- O -维斯阿米醇苷 28.36 $\mu\text{g/mL}$ 、木兰脂素 21.10 $\mu\text{g/mL}$ 、五味子醇甲 54.80 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液), 按“3.1”项下色谱条件测定, 重复进样 6 次, 测得峰面积, 计算莫诺苷、苦杏仁苷、马钱苷、升麻素苷、5- O -维斯阿米醇苷、木兰脂素和五味子醇甲峰面积的 RSD 分别为 0.6%、0.1%、0.2%、0.2%、0.1%、0.4%、0.1%, 结果表明仪器精密度良好。

3.7 重复性试验

取 XCG (批号 140805) 按“2.3”项下方法平行制备供试品溶液 6 份, 按“3.1”项下色谱条件测定, 6 次测定的 RSD 分别为 1.22%、0.39%、1.18%、1.27%、0.55%、1.01%、0.34%。RSD 均小于 2.0%, 结果表明本方法重复性良好。

3.8 稳定性试验

取 XCG (批号 140805) 供试品溶液, 在室温条件下分别于 0、4、8、12、16、20、24 h 按“3.1”项下色谱条件测定, 莫诺苷、苦杏仁苷、马钱苷、升麻素苷、5- O -维斯阿米醇苷、木兰脂素和五味子醇甲的峰面积 RSD 分别为 1.5%、0.8%、1.8%、1.3%、1.1%、1.7%、0.5%。结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

3.9 加样回收率试验

取本品适量(批号 140805, 含莫诺苷、苦杏仁苷、马钱苷、升麻素苷、5- O -维斯阿米醇苷、木兰脂素和五味子醇甲的量分别为 0.65、5.43、1.28、0.40、0.54、0.45、1.03 mg/g) 研细, 分别称取 6 份, 每份约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 每份分别精密加入混合对照品溶液母液 1.0 mL, 待混合对照品溶液与供试品充分混合后, 每份再精密加入 50% 甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理(功率 200 W, 频率 40 kHz) 40 min, 放冷至室温, 用 50% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过(0.22 μm 微

孔滤膜), 取续滤液, 作为供试品溶液, 测定。计算回收率, 结果莫诺苷、苦杏仁苷、马钱苷、升麻素苷、5- O -维斯阿米醇苷、木兰脂素和五味子醇甲平均回收率分别为 98.4%、101.7%、99.0%、103.8%、98.2%、99.5%、97.3%, RSD 分别为 1.3%、0.7%、0.6%、1.0%、0.6%、1.1%、0.5%。结果表明本方法准确度良好。

3.10 样品测定

取本品 10 批, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“3.1”项下色谱条件测定, 记录色谱图, 计算每克 XCG 中含莫诺苷、苦杏仁苷、马钱苷、升麻素苷、5- O -维斯阿米醇苷、木兰脂素和五味子醇甲的量。

结果 10 批次样品中 7 个成分量分别为莫诺苷 0.51~0.69 mg/g、苦杏仁苷 5.01~5.95 mg/g、马钱苷 1.02~1.33 mg/g、升麻素苷 0.35~0.45 mg/g、5- O -维斯阿米醇苷 0.45~0.55 mg/g、木兰脂素 0.38~0.48 mg/g、五味子醇甲 0.89~1.08 mg/g, 各成分的 RSD 均在 11.0% 以下, 表明本品制剂工艺比较稳定, 但需要积累更多批次样品, 同时结合转移率情况, 制定本制剂中 7 个成分量的限度。结果见表 2。

4 讨论

4.1 检测波长优选

为使各个待测成分得到较好分离, 且获得较高的灵敏度, 本实验采用 DAD 检测器, 在波长 200~400 nm 处扫描, 因在 240 nm 下色谱峰较多, 故选择 240 nm 为指纹图谱检测波长, 同时也是莫诺苷、马钱苷、升麻素苷、5- O -维斯阿米醇苷和五味子醇甲定量测定的检测波长; 预实验发现 210 nm 处苦杏仁苷和木兰脂素有较大吸收, 且峰形稳定, 故 210 nm 作为苦杏仁苷和木兰脂素定量测定的检测波长。

4.2 色谱条件优选

比较了乙腈-水、甲醇-水、甲醇-乙腈-水 3 种流动相系统, 结果采用甲醇-乙腈-水系统色谱峰分离较好, 并优化洗脱条件, 最终确定梯度洗脱条件下完成 7 个待测成分的同时测定和指纹图谱检查。考察了 35、40、45 $^{\circ}\text{C}$ 不同柱温及 0.8、1.0、1.2 mL/min 不同体积流量对各待测成分的影响, 结果在柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ 、体积流量 1.0 mL/min 时分离效果最佳。比较了 Agilent C₁₈ 柱和 Waters Xbridge C₁₈ 柱, 结果在本方法的色谱条件下, 各待测成分均可得到较好分离。

4.3 供试品制备方法优选

考察了甲醇、80% 甲醇、50% 甲醇、乙醇、80%

表 2 XCG 中 7 种成分量
Table 2 Contents of seven compounds in XCG samples

批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)						
	莫诺昔	苦杏仁苷	马钱苷	升麻素苷	5- <i>O</i> -维斯阿米醇苷	木兰脂素	五味子醇甲
140805	0.65	5.43	1.28	0.40	0.54	0.45	1.03
140901	0.64	5.45	1.27	0.41	0.50	0.47	1.01
141001	0.63	5.44	1.23	0.39	0.51	0.42	1.08
141102	0.60	5.21	1.25	0.35	0.48	0.41	1.07
141203	0.58	5.01	1.05	0.38	0.45	0.48	1.02
150101	0.54	5.68	1.33	0.45	0.52	0.39	0.89
150201	0.52	5.94	1.25	0.36	0.55	0.38	0.95
150301	0.63	5.11	1.10	0.38	0.45	0.45	0.96
150401	0.69	5.49	1.33	0.44	0.46	0.47	0.94
150501	0.51	5.69	1.02	0.35	0.47	0.41	0.98
平均值	0.60	5.45	1.21	0.39	0.49	0.43	0.99
RSD/%	10.0	5.2	9.3	8.9	7.4	8.2	6.0

乙醇及 50%乙醇对 7 个成分定量测定的影响,结果乙醇、80%乙醇、甲醇、80%甲醇为提取溶剂时马钱苷、苦杏仁苷、升麻素苷峰形差,50%甲醇与 50%乙醇提取时 7 个成分提取率无显著差异,但 50%乙醇提取样品苦杏仁苷峰形差,综合考虑选择 50%甲醇作为提取溶剂。

本研究建立的 XCG 指纹图谱及多成分测定方法,指认了 11 个成分,并对其中与药效相关的 7 个成分进行了定量分析,能够较全面控制 XCG 的质量。

参考文献

- [1] 周恩丽,康小东,付娟,等.基于制剂原料物理特性的哮喘颗粒干法制粒工艺优选[J].中草药,2017,48(4): 681-685.
- [2] 邹亮,王战国,胡慧玲,等.HPLC-小粒径色谱柱法测定红景天提取物中红景天苷、酪醇和络赛维[J].中草药,2011,42(7): 1334-1337.
- [3] 秦建平,林夏,潘有智,等.基于指纹图谱分析和多成分同时定量的龙血通络胶囊质量评价研究[J].中草药,2015,46(20): 3028-3033.
- [4] 林夏,崔培超,徐桂红,等.基于 UPLC 的注射用活血通络指纹图谱研究及多成分定量测定[J].中草药,2016,47(2): 262-266.
- [5] 程巧鹭,唐登峰,马临科,等.基于指纹图谱及多指标成分定量的健儿消食口服液质量评价[J].药物分析杂志,2016,36(1): 148-154.
- [6] 薛宝云,李文.防风色原酮甙类成分的药理活性研

究[J].中国中药杂志,2000,25(5): 297-299.

- [7] 黄晓东,任旷.五味子木脂素研究进展[J].吉林医药学院学报,2010,31(1): 46.
- [8] Cao G, Zhang Y, Cong X D, *et al.* Research progress on the chemical constituents and pharmacological activities of *Fructus corni* [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2009, 18(3): 208-213.
- [9] 颜永刚,雷国莲,刘静,等.中药桃仁的研究概况[J].时珍国医国药,2011,22(9): 2262-2264.
- [10] 吕建珍,邓家刚.苦杏仁苷的药理作用研究进展[J].现代药物与临床,2012,27(5): 530-535.
- [11] 牛德斌.HPLC 测定防风通圣丸中 2 个色原酮苷类成分含量[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(16): 113-115.
- [12] 刘伟,周建良,陈碧莲,等.HPLC 同时测定五子衍宗丸中 5 种活性成分的含量[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(3): 74-78.
- [13] 施祖勇,谭军.高效液相色谱法测定复方益肝灵片中五味子醇甲,五味子醇乙和五味子甲素的含量[J].中南药学,2011,9(4): 264-267.
- [14] 郭盛,段金彪,朱邵晴,等.基于多元功效成分的山茱萸药材质量标准提升研究[J].中国中药杂志,2015,40(15): 3017-3021.
- [15] 黄月纯,尹雪,魏刚.玉屏风方饮片及汤剂中毛蕊异黄酮苷,升麻素苷,5-*O*-甲基维斯阿米醇苷的含量相关性研究[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(6): 6-8.
- [16] 胡海聪,于珊珊,张晓静,等.HPLC 法测定清肺止咳颗粒中木兰脂素,秦皮甲素,秦皮乙素的含量[J].药物分析杂志,2013,33(5): 866-869.