

基于 UHPLC-ESI-HRMSⁿ 的清热灵颗粒中 8 种活性成分定量研究

曾 锐^{1*}, 陈俊可¹, 雍 潘¹, 李燕芳¹, 徐 燕¹, 陈晓虎^{2*}

1. 西南民族大学药学院, 四川 成都 610041

2. 重庆市食品药品检验所, 重庆 401121

摘 要: 目的 基于 UHPLC-ESI-HRMSⁿ 建立一种快速定量检测清热灵颗粒中甘草苷、牡荆苷、黄芩苷、芦丁、隐绿原酸、绿原酸、槲皮素、山柰酚的分析方法, 为清热灵颗粒的质量控制提供实验基础。方法 采用 BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 以甲醇-0.1%甲酸水溶液为流动相梯度洗脱, 体积流量 0.3 mL/min; 质谱采用 ESI 离子源, 全扫描模式进行检测; 多批次清热灵颗粒定量测定结果采用 SIMCA14.1 软件进行模式判别分析, 评估其质量。结果 甘草苷、黄芩苷、芦丁、牡荆苷、槲皮素、绿原酸、隐绿原酸、山柰酚分别在 570~9 127、10 032~160 500、293~4 690、1 625~26 000、40.5~645、41~1 325、44~1 413、13~209 ng/mL 线性关系良好 ($r \geq 0.999 0$); 精密度、重复性、稳定性良好; 加样回收率在 98.83%~100.65%, RSD 值均小于 3%。5 批所测清热灵颗粒中甘草苷、黄芩苷、芦丁、牡荆苷、槲皮素、绿原酸、隐绿原酸、山柰酚的平均质量分数分别为 202.07~438.15、10 258.03~11 046.56、56.09~87.75、689.19~818.56、4.95~6.07、8.87~18.37、22.49~42.12、3.21~4.11 μg/g; 定量数据经 SIMCA 14.1 分析表明, 5 批清热灵颗粒质量标准偏差均在 ±2 范围内。结论 建立的定量测定方法简单快速, 灵敏度度高, 准确度好; 方法学考察结果符合测定要求; 可以作为清热灵颗粒多种活性成分定量方法, 为其质量控制提供新的依据。

关键词: 清热灵颗粒; UHPLC-ESI-HRMSⁿ; 甘草苷; 黄芩苷; 芦丁; 牡荆苷; 槲皮素; 绿原酸; 隐绿原酸; 山柰酚

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)16-3842-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.16.017

Quantitative research on multiple components in Qingreling Granules based on UHPLC-ESI-HRMSⁿ

ZENG Rui¹, CHEN Jun-ke¹, YONG Pan¹, LI Yan-fang¹, XU Yan¹, CHEN Xiao-hu²

1. College of Pharmacy, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

2. Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing 401121, China

Abstract: Objective To establish a quantitative analysis method of multiple active components liquiritin, vitexin, baicalin, rutin, cryptochlorogenic acid, chlorogenic acid, quercetin, and kaempferol in Qingreling Granules (QG) based on UHPLC-ESI-HRMSⁿ, in order to provide a comprehensive evaluation for the quality control of QG. **Methods** The chromatographic separation was carried on BEH C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) column with methanol-0.1% formic acid water as mobile phase at the flow rate of 0.3 mL/min. Full scan mode with an electrospray ionization (ESI) source was used for the detection. The quantitative determination results were calculated by the pattern recognition function of the software SIMCA 14.1 to evaluate the quality of QG. **Results** Liquiritin, baicalin, rutin, vitexin, quercetin, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, and kaempferol all showed good liners relationship ($r \geq 0.999 0$) in the ranges of 570—9 127, 10 032—160 500, 293—4 690, 1 625—26 000, 40.5—645, 41—1 325, 44—1 413, and 13—209 ng/mL, respectively. The precision, repeatability, and stability were all up to the standards. The recoveries of standard addition was 98.83% to 100.65% with precision of below 3% RSD ($n = 5$). The average mass fractions of liquiritin, baicalin, rutin, vitexin, quercetin, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, and kaempferol in five batches of QG were 202.07—438.15, 10 258.03—11 046.56, 56.09—87.7, 689.19—818.56, 4.95—6.0, 8.87—18.37, 22.49—42.12, 3.21—4.11 μg/g, respectively. The data analyzed by SIMCA

收稿日期: 2018-03-11

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFC1700705); 国家留学基金委资助项目 (CSC201500850007); 四川省科技厅科技支撑计划 (2014SZ0131); 四川省基础研究重点项目 (2018JY0069); 西南民族大学 2018 中央高校重点项目 (2018NZD18)

***通信作者** 曾 锐, 副教授, 主要从事药物制剂及民族药研究。Tel: (028)85522099 E-mail: rzeng@swun.edu.cn
陈晓虎, 硕士, 主管中药师, 研究方向为中药质量研究。Tel: (023)86072753 E-mail: chenxiaohu78@126.com

14.1 showed that the quality deviation of five batches of QG were within ± 2 . **Conclusion** The method established in this study is simple, rapid, sensitive and accurate. The results of methodology conform to the relevant requirements and the method can be used as a quantitative method for the active ingredients in QG. The research also provides a new basis for the quality control at the same time.

Key words: Qingreling Granules; UHPLC-ESI-HRMSⁿ; liquiritin; baicalin; rutin; vitexin; quercetin; chlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; kaempferol

清热灵颗粒 (Qingreling Granules, QG) 收载于《中国药典》2015 年版第一部, 是由黄芩、连翘、甘草、大青叶 4 味中草药组成的成方制剂。方中黄芩清热燥湿、泻火解毒; 连翘清热解毒、消肿散结、疏散风热; 大青叶消肿散结凉血; 甘草调和诸药解毒^[1]。临床上用于感冒热邪壅肺, 症见发热、咽喉肿痛等。现代药理研究表明清热灵颗粒具有明显的解热、抗菌、抗炎作用^[2-3]。作为清热解毒常用药, 清热灵颗粒药典标准中仅对黄芩苷进行了含量测定, 质控标准比较简单。考虑到中药复方制剂多成分、多靶点的特性; 且质量容易受到工艺、储存等条件的影响, 质控仅对其中某单一成分进行检测, 并不能完全代表制剂质量^[4-7]。

现有文献关于清热灵颗粒质量控制的报道较少。仅有 HPLC-UV 对其中的 5 个成分 (黄芩苷、连翘苷、汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素) 进行了含量测定, 分析时间长达 35 min, 且分析效率较低^[8], 不利于中药质量评价朝着数字化、信息化、科学化的方向发展^[9]。本课题组前期对该制剂进行了高分辨质谱定性分析, 确定了其中主要含有黄酮类成分, 也包含木脂素类、有机酸类、三萜类、苯乙醇苷类成分^[10]。现有文献报道了黄酮类、有机酸类、苯乙醇苷类成分均具有抗菌、抗炎、抗氧化、抗病毒的药理活性^[11-13], 可以认为这些成分为清热灵颗粒发挥药效的物质基础。其中, 黄芩苷为黄芩主要活性成分, 具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等药理活性^[14-15]; 甘草苷为甘草的二氢黄酮类活性成分, 具有抗氧化、抗溃疡、神经保护等功效^[16-17]。

为了高效、精确地分析清热灵颗粒质量, 本研究采用 UHPLC-ESI-HRMSⁿ 法对清热灵颗粒中黄酮类成分 (芦丁、牡荆苷、甘草苷、黄芩苷、槲皮素、山柰酚) 和有机酸类成分 (绿原酸、隐绿原酸) 8 种活性成分进行质量分析。对该制剂进行多组分定性定量分析可以保证其临床疗效, 为质量稳定及质量标准提高提供一定的科学依据及分析方法。

1 仪器与材料

UHPLC-Q Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨

质谱, 美国赛默飞世尔科技公司; Ultimate 3000 超高效液相色谱系统, 美国戴安公司; Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μ m), 美国沃特世科技有限公司; BT25S 十万分之一电子天平, 北京赛多利斯科学仪器有限公司; ESJ200-4 万分之一电子天平, 沈阳龙腾电子有限公司; KQ5200E 型超声波清洗器, 昆山超声仪器有限公司。

对照品甘草苷 (批号 111610-201005)、黄芩苷 (批号 110715-201318)、芦丁 (批号 100080-201409)、牡荆苷 (批号 111687-200501)、槲皮素 (批号 100081-201610)、绿原酸 (批号 110753-201415)、隐绿原酸 (批号 MUST-12113002) 均购于中国食品药品检定研究院; 对照品山柰酚 (批号 1509929) 购自成都普菲德生物技术有限公司; 各对照品质量分数均 $\geq 98\%$ 。甲醇为色谱纯, 美国默克公司; 色谱纯甲酸, 美国 Sigma-Aldrich 公司; 甲醇、甲酸均为 LC-MS 级; 水为纯净水, 美国 Milli-Q SP Regent Water system 生产; 甲醇为分析纯, 质量分数 $\geq 99.5\%$ 。清热灵颗粒, 每袋装 5 g, 购于正大青春宝药业有限公司, 批号为 1509007、1509008、1604109、1602112、1509003。

2 方法与结果

2.1 色谱和质谱条件

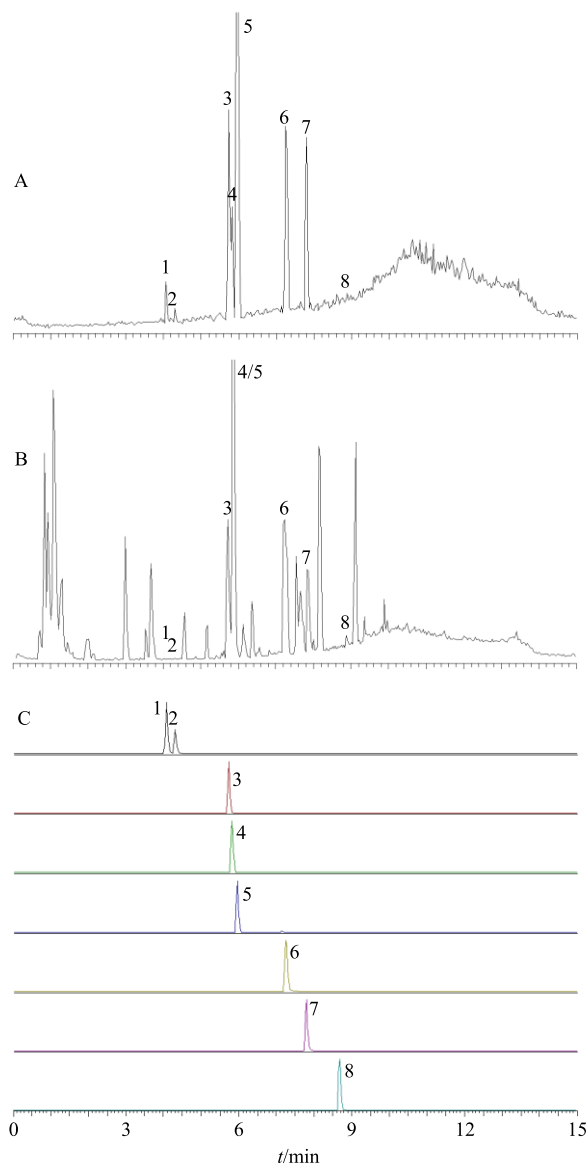
2.1.1 色谱条件 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μ m) 色谱柱, 流动相为甲醇-0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱程序为 0 min, 5%甲醇; 0~2 min, 5%~12%甲醇; 2~7 min, 12%~40%甲醇; 7~9 min, 40%~80%甲醇; 9~11 min, 80%甲醇; 11~12 min, 80%~5%甲醇; 12~15 min, 5%甲醇; 体积流量为 0.3 mL/min; 进样量 0.5 μ L; 进样室温度 10 $^{\circ}$ C; 柱温 35 $^{\circ}$ C。

2.1.2 质谱条件 离子源为 ESI 源 (heated ESI), 辅助气氮气体积流量 10 L/min; 辅助气温度 350 $^{\circ}$ C; 离子传输管温度 320 $^{\circ}$ C; 正负离子检测模式; 鞘气氮气压力 206.84 kPa; 喷雾电压 2.00 kV; 扫描模式为 Full MS/dd-MS², Full MS 分辨率 70 000, dd-MS² 分辨率 17 500, 扫描范围 m/z 80~1 200。MS/MS

模式时,所用碰撞能为阶梯能量 30、40 eV。设定分析物的理论质量数范围的质量数窗口为 5×10^{-6} ,混合对照品和样品的总离子流色谱图(TIC)及 8 种待测成分提取离子色谱见图 1。

2.2 定性定量分析

使用 Xcalibur 3.0 软件(美国赛默飞科技有限公司)进行质谱数据处理,通过高分辨率质谱信息及



1-绿原酸 2-隐绿原酸 3-芦丁 4-牡荆苷 5-甘草苷 6-黄芩苷
7-槲皮素 8-山柰酚
1-chlorogenic acid 2-cryptochlorogenic acid 3-rutin 4-vitexin
5-liquiritin 6-baicalin 7-quercetin 8-kaempferol

图 1 负离子模式下混合对照品 (A) 和 QG 样品 (B) 的 TIC 及 8 种待测成分的提取离子色谱 (C)

Fig. 1 TIC of mixed reference substances (A) and QG sample (B), extracted ion chromatograms of mixed standards of eight active compounds (C) at negative ion mode

对照品比对进行分析和鉴别。8 种成分在负离子模式下比正离子模式下灵敏度高,具有较好的丰度,质谱偏差范围 $\delta \leq 5 \times 10^{-6}$ 。定量离子选取离子强度最高的准分子离子即 8 成分定量离子均为 $[M-H]^{-}$ 离子。8 种待测成分的保留时间及质谱参数见表 1。

2.3 溶液制备

2.3.1 混合对照品溶液的制备 分别精密称取甘草苷、黄芩苷、牡荆苷对照品 7.30、16.05、2.60 mg 置 10 mL 量瓶中,芦丁、槲皮素、绿原酸、隐绿原酸、山柰酚对照品 4.69、10.31、5.30、5.65、1.67 mg 置 100 mL 量瓶中。用甲醇做溶剂分别溶解稀释,制成含甘草苷、黄芩苷、芦丁、牡荆苷、槲皮素、绿原酸、隐绿原酸、山柰酚分别为 730.0、1 605.0、46.9、260.0、103.1、53.0、56.5、16.7 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品储备液。

再分别依次量取 8 种对照储备液各 1 mL 置于同一 10 mL 量瓶中,加甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,即得含甘草苷、黄芩苷、芦丁、牡荆苷、槲皮素、绿原酸、隐绿原酸、山柰酚分别为 73.00、160.50、4.69、26.00、10.31、5.30、5.65、1.67 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。对照品储备液及混合对照品溶液均在 -4°C 条件下储存备用。

2.3.2 供试品溶液的制备 取装量差异下的 QG,研细,取 0.3 g,精密称定,置于 25 mL 量瓶中,精密加入 50% 甲醇适量,室温下超声处理(功率 500 W,频率 40 kHz) 30 min,放冷,定容,摇匀,0.20 μm 微孔滤膜(Xaboshi)滤过,即得。

2.4 线性关系考察

精密量取“2.3.1”项下的 8 成分混合对照品溶液,纯甲醇连续稀释配制成不同质量浓度梯度的混合对照品溶液,其中甘草苷质量浓度 36.500、18.250、9.125、4.563、2.282、1.141、0.570、0.285、0.143、0.071 5、0.035 8 $\mu\text{g/mL}$,黄芩苷质量浓度 80.250、40.125、20.063、10.032、5.016、2.508、1.254、0.627、0.314、0.157、0.078 5 $\mu\text{g/mL}$,芦丁质量浓度 2.345、1.173、0.586、0.293、0.147、0.073 5、0.036 8、0.184、0.092、0.046、0.023 $\mu\text{g/mL}$,牡荆苷质量浓度 13.000、6.500、3.250、1.625、0.813、0.407、0.204、0.102、0.051、0.025 5、0.012 8 $\mu\text{g/mL}$,槲皮素质量浓度 5.155、2.578、1.289、0.645、0.322、0.161、0.081、0.040 5、0.020 3、0.010 2、0.005 1 $\mu\text{g/mL}$,绿原酸质量浓度 2.650、1.325、0.663、0.331、0.166、0.083、0.041、0.021、0.011、0.005 5、0.002 8 $\mu\text{g/mL}$,隐

表 1 8 成分保留时间及质谱参数

Table 1 Retention times and mass parameters of eight compounds

成分	分子式	t_R/min	相对分子质量 $[M-H]^-$		偏差/ ($\times 10^{-6}$)	二级质谱 (m/z)
			理论值	实际值		
绿原酸	$C_{16}H_{18}O_9$	4.07	353.086 71	353.088 17	4.139	191.055 28, 179.034 07, 161.023 27, 85.028 05
隐绿原酸	$C_{16}H_{18}O_9$	4.30	353.086 71	353.088 26	4.394	191.055 30, 179.034 06, 173.044 56, 155.034 18, 135.043 96, 93.033 09
芦丁	$C_{27}H_{30}O_{16}$	5.73	609.145 01	609.146 67	2.723	609.146 67, 301.035 46, 271.024 29, 178.997 70, 151.002 46
牡荆苷	$C_{21}H_{20}O_{10}$	5.82	431.097 27	431.098 51	3.008	431.098 48, 341.066 83, 311.056 46, 283.061 31, 269.046 02, 191.034 38, 117.033 04
甘草苷	$C_{21}H_{22}O_9$	5.96	417.118 01	417.119 32	3.144	255.066 19, 135.007 55, 119.048 73, 91.017 45
黄芩苷	$C_{21}H_{18}O_{11}$	7.24	445.076 54	445.077 85	2.948	269.045 72, 113.023 13, 103.002 27, 95.012 50, 85.028 10, 59.012 49
槲皮素	$C_{15}H_{10}O_7$	7.80	301.034 28	301.035 49	4.023	301.035 55, 273.040 68, 151.002 56, 121.028 23, 107.012 50, 65.001 78
山柰酚	$C_{15}H_{10}O_6$	8.67	285.039 37	285.040 70	4.405	269.472 25, 257.045 14, 229.049 19, 213.055 86, 197.210 47, 169.065 45, 107.012 60, 65.545 79

绿原酸质量浓度 2.825、1.413、0.706、0.353、0.177、0.088、0.044、0.022、0.011、0.005 5、0.002 8 $\mu\text{g/mL}$ ，山柰酚质量浓度 0.835、0.418、0.209、0.105、0.052、0.026、0.013、0.006 5、0.003 3、0.001 7、0.000 85 $\mu\text{g/mL}$ 。不同成分选取 5~6 个合适的质量浓度绘制标准曲线，其中甘草苷 0.570、1.141、2.282、4.563、9.127 $\mu\text{g/mL}$ ；黄芩苷 10.032、20.063、40.125、80.250、160.50 $\mu\text{g/mL}$ ；芦丁 0.293、0.586、1.173、2.345、4.690 $\mu\text{g/mL}$ ；牡荆苷 1.625、3.250、6.500、13.000、26.000 $\mu\text{g/mL}$ ；槲皮素 0.040 5、0.081、0.161、0.322、0.645 $\mu\text{g/mL}$ ；绿原酸 0.041、0.083、0.166、0.331、0.663、1.325 $\mu\text{g/mL}$ ；隐绿原酸 0.044、0.088、0.177、0.353、0.706、1.413 $\mu\text{g/mL}$ ；山柰酚 0.013、0.026、0.052、0.105、0.209 $\mu\text{g/mL}$ 。在“2.1”项下色谱及

质谱条件下进样分析，分析得到的数据使用 Xcalibur 3.0 软件处理，得到以待测物质量浓度为横坐标 (Y)，峰面积为纵坐标 (X) 的标准曲线，得到回归方程及 r 。以稀释后待测物响应的信噪比 (S/N) 大于 3 计算测定方法检测限 (LOD)， S/N 大于 10 计算测定方法定量限 (LOQ)，结果见表 2。结果表明，8 种待测化合物在质量浓度范围内线性关系良好， $r \geq 0.999 0$ 。

2.5 精密度试验

取“2.3.1”项下的稀释 32 倍混合对照品溶液，其中甘草苷、黄芩苷、芦丁、牡荆苷、槲皮素、绿原酸、隐绿原酸、山柰酚质量浓度分别为 2.282、5.018、0.814、0.143、0.322、0.166、0.177、0.052 $\mu\text{g/mL}$ ，按“2.1”项下色谱、质谱条件连续进样 6

表 2 8 种成分的回归方程、相关系数、线性范围、检测限、定量限

Table 2 Liner regressions, correlation coefficients, liner ranges, LODs, and LOQs of eight compounds

成分	回归方程	r	线性范围/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LOD/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LOQ/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
甘草苷	$Y=4\ 099\ 400+14\ 090\ 800\ X$	0.999 2	570~9 127	0.304	1.012
黄芩苷	$Y=78\ 391\ 900+4\ 477\ 980\ X$	0.999 0	10 032~160 500	0.096	0.321
芦丁	$Y=6\ 939\ 990+56\ 091\ 800\ X$	0.999 5	293~4 690	0.079	0.262
牡荆苷	$Y=10\ 098\ 200+10\ 101\ 800\ X$	0.999 2	1 625~26 000	0.620	2.066
槲皮素	$Y=1\ 699\ 090+37\ 565\ 600\ X$	0.999 5	40.5~645	0.244	0.805
绿原酸	$Y=514\ 190+14\ 904\ 600\ X$	0.999 7	41~1 325	0.236	0.786
隐绿原酸	$Y=208\ 657+6\ 636\ 470\ X$	0.999 7	44~1 413	0.660	2.201
山柰酚	$Y=433\ 749+119\ 325\ 000\ X$	0.999 7	13~209	0.057	0.190

针。记录甘草苷、黄芩苷、芦丁、牡荆苷、槲皮素、绿原酸、隐绿原酸、山柰酚的峰面积。结果显示,各成分峰面积 RSD 分别为 2.84%、3.57%、2.83%、2.51%、3.84%、2.00%、2.41%、2.06%。结果表明方法精密度良好。

2.6 重复性试验

按“2.3.2”项下方法制备 6 份供试品溶液(批号 1509007),分别进样测定并计算质量分数,按质量分数分别计算 8 成分的 RSD 值。结果显示甘草苷、黄芩苷、芦丁、牡荆苷、槲皮素、绿原酸、隐绿原酸、山柰酚平均质量分数分别为 189.39、10 543.58、80.11、726.09、5.97、18.12、41.51、3.56 $\mu\text{g/g}$; RSD 值分别为 3.20%、1.28%、2.29%、2.01%、4.89%、1.39%、2.64%、1.37%。表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性试验

取“2.3.2”项下制备的供试品溶液(批号 1509007),分别于 0、2、6、10、12、24 h 进样分析,测定甘草苷、黄芩苷、芦丁、牡荆苷、槲皮素、绿原酸、隐绿原酸、山柰酚峰面积的 RSD 分别为 2.91%、1.33%、2.33%、1.75%、2.93%、3.64%、2.69%、1.12%。结果表明,供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验

称取已测得的样品粉末(批号 1509007)约 0.15 g,共 6 份,精密称定,分别加入甘草苷、黄芩苷、芦丁、牡荆苷、槲皮素、绿原酸、隐绿原酸、山柰酚对照品适量,使加入后的各成分含量分别为清热灵颗粒中相应成分的 100%,按照“2.3.2”项下平行制备供试品样品 6 份,滤过后进样分析。分别计算各成分的平均加样回收率以及 RSD 值。结果显示甘草苷、黄芩苷、芦丁、牡荆苷、槲皮素、绿原酸、隐绿原酸、山柰酚的平均加样回收率分别为

98.83%、99.01%、98.85%、100.08%、98.97%、100.64%、100.65%、100.21%; RSD 值分别为 2.05%、1.79%、2.68%、2.49%、2.27%、2.11%、1.52%、2.35%。表明方法准确度良好,适合 8 成分的含量测定。

2.9 样品定量测定与模式识别分析

取不同批次的热灵颗粒(批次 1509007、1509008、1604109、1602112、1509003),按照“2.3.2”项下每批分别制备 3 份样品,平行制样共 15 份,分别在“2.1”项下色谱、质谱条件下进样分析。数据使用 Xcalibur 3.0 软件定量浏览器功能处理,计算 8 种待测成分的质量分数,结果见表 3。从测定结果可以看出,5 批清热灵颗粒中甘草苷、黄芩苷、芦丁、牡荆苷、槲皮素、绿原酸、隐绿原酸、山柰酚的质量分数分别为 202.07~438.15、10 258.03~11 046.56、56.09~87.75、689.19~818.56、4.95~6.07、8.87~18.37、22.49~42.12、3.21~4.11 $\mu\text{g/g}$ 。8 种成分在 5 批清热灵颗粒中有着显著差异。其中,黄芩苷具有最高质量分数,其次是牡荆苷、甘草苷和芦丁,槲皮素、绿原酸、隐绿原酸、山柰酚含量最低。对于药典规定的含量检测标准黄芩苷($>2 \text{ mg/g}$),其含量在 5 批样品中是最稳定的(RSD $<3\%$),质量符合药典规定。

SIMCA14.1 是专门处理多元变量数据的统计分析软件,其分析方法中的主成分分析(PCA)法可将多指标转化为较少的新指标,且其彼此互不相关,又可综合反映原指标信息,即可反映出各样品的总体信息,来达到综合评估药物质量的目的^[18-19]。因此,为了评价 5 批清热灵颗粒的整体质量,采用 SIMCA14.1 软件对不同批次之间含量数据进行 PCA 分析。得分图和荷载图如图 2-A 和 2-B 所示。得分图用于评价 5 批清热灵颗粒的整体质量的稳定

表 3 8 种待测成分的测定结果 ($n=3$)

Table 3 Determination of eight components ($n=3$)

批次	质量分数/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$							
	甘草苷	黄芩苷	芦丁	牡荆苷	槲皮素	绿原酸	隐绿原酸	山柰酚
1509007	202.07	10 342.83	81.65	735.63	6.07	18.37	42.12	3.52
1509008	280.54	11 046.56	87.75	755.87	5.22	13.18	38.91	4.05
1604109	438.15	10 258.03	67.72	689.19	5.15	8.87	27.27	3.21
1602112	336.07	10 423.68	61.17	720.37	4.95	9.13	25.13	3.77
1509003	202.78	10 418.47	56.09	818.56	5.15	9.34	22.49	4.11
平均值	291.92	10 497.91	70.88	743.92	5.31	11.78	31.18	3.73
RSD/%	6.81	2.99	18.98	6.49	8.25	34.71	28.09	10.05

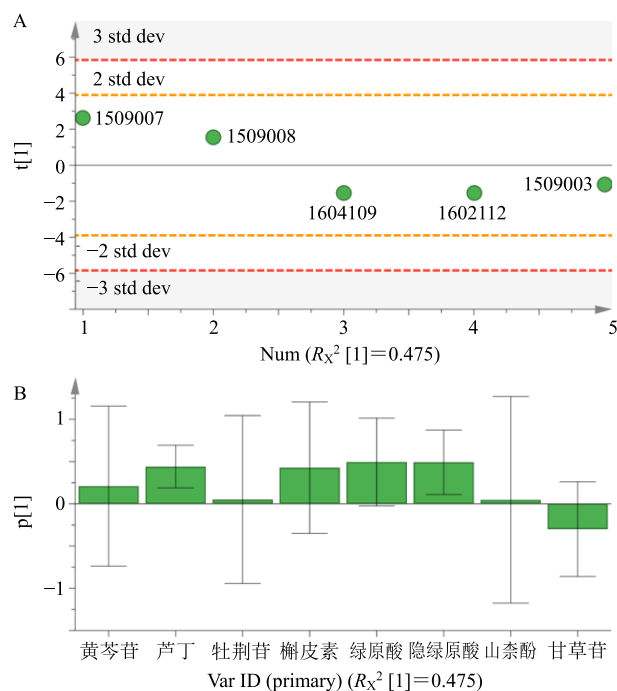


图 2 5 批清热灵颗粒质量得分散点图 (A) 和 8 种成分荷载图 (B)

Fig. 2 Score scatter plot in five batches of QG (A) and loading plot of eight compounds (B)

性, 偏差越小则质量越稳定。结果表明 5 批样品质量较为稳定, 质量标准偏差均在 ± 2 之内。通过 8 成分荷载图分析导致批次差异的主要因素。可知, 芦丁、槲皮素、绿原酸和隐绿原酸能明显影响清热灵颗粒的整体质量。因此质控指标可以考虑这 4 个成分。

3 讨论

本实验首次采用 UHPLC-ESI-HRMSⁿ 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱全扫描模式下对清热灵颗粒多组分进行同时测定, 在质谱条件优化选择过程中, 发现 8 个活性成分在负离子模式下比正离子模式下灵敏度高, 具有较好的丰度, 因此采用负离子模式进行数据采集。

实验所建方法非常简单、快速, 定性定量可以同时进行。甘草苷、黄芩苷、芦丁、牡荆苷、槲皮素、绿原酸、隐绿原酸、山柰酚 8 种成分同时定量分析而不要求复杂的样品前处理和梯度洗脱模式。成分在 3~10 min 能被完全检测。全扫描模式结合软件 Xcalibur 3.0 软件定量浏览器功能使得定量分析变得自动化, 对于大量样品的分析可以省略人工数据的计算。

运用本方法对多个批次的清热灵颗粒进行多组

分分析, 发现黄芩苷的质量分数 > 2 mg/g、RSD 值 $< 3\%$, 与现行药典标准相符, 但药典质量控制标准中并未对其他成分进行具体规定。本实验含量测定结果表明, 清热灵颗粒中甘草苷、黄芩苷、牡荆苷、槲皮素含量差异性较小, RSD 值均在 10% 以内, 再通过 PCA 分析可知 5 批样品质量较为稳定, 其质量标准偏差均在 ± 2 之内, 而通过 8 成分荷载图分析不同批次质量差异的主要因素, 发现芦丁、槲皮素、绿原酸和隐绿原酸对颗粒的质量偏差贡献大, 能明显影响清热灵颗粒的整体质量, 建议以后在生产和质控中对这 4 种成分进行质量控制, 以减少批次之间的质量差异。

中药中含有众多有效成分, 以多组分, 多靶点的特有属性达到治疗目的^[20], 因此, 对多个组分进行质量控制才能使中药质量的稳定性更好, 而本实验采用 UHPLC-ESI-HRMSⁿ 对清热灵颗粒多组分进行同时测定, 简单、快速, 可全面的评估药材的质量, 为清热灵颗粒以及相关制剂的质量控制提供科学依据和参考标准。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 郑高利, 张信岳, 孟倩超, 等. 清热灵颗粒抗菌作用观察 [J]. 浙江省医学科学院学报, 2002, 13(1): 19-20.
- [3] 郑高利, 张信岳, 陈 凯, 等. 清热灵颗粒药效学研究 [J]. 中药药理与临床, 2001, 17(4): 30-32.
- [4] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [5] 刘昌孝. 基于中药质量标志物的中药质量追溯系统建设 [J]. 中草药, 2017, 48(18): 3669-3676.
- [6] Liu C X, Cheng Y Y, Guo D A, et al. A new concept on quality marker for quality assessment and process control of Chinese medicines [J]. Chin Herb Med, 2017, 9(1): 3-13.
- [7] 郝 敏, 陆兔林, 毛春琴, 等. 基于中药质量标志物的饮片质量控制研究 [J]. 中草药, 2017, 48(9): 1699-1708.
- [8] 徐金钟, 邢丽红, 王书芳, 等. HPLC-UV 定量分析清热灵颗粒中的 5 个成分 [J]. 中国药学杂志, 2010, 45(2): 147-149.
- [9] 孙 志, 姜晓芳, 胡玉荣, 等. 基于 UPLC-MS/MS-模式识别技术的丹灯通脑胶囊中多种活性成分定量研究 [J]. 中草药, 2017, 48(6): 1126-1132.
- [10] 周秀娟, 李燕芳, 陈 莹, 等. 基于 UPLC-Q Exactive 四级杆-轨道阱液质联用法快速建立清热灵颗粒中潜在

- 中药质量标志物 (Q-Marker) 成分库 [J]. 中草药, 2017, 48(1): 67-74.
- [11] 方一杰, 徐岩成, 安毛毛, 等. 黄酮类化合物的药动学和药理作用研究进展 [J]. 药学服务与研究, 2015, 15(1): 6-9.
- [12] 宋光西, 马玲云, 魏 锋, 等. 苯乙醇苷的分布及药理活性研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2011, 7(4): 169-171.
- [13] 吴启南, 王立新, 蒋小文, 等. 大青叶中有机酸药理作用研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2008, 24(3): 187-189.
- [14] 侯艳宁, 朱秀媛, 程桂芳. 黄芩苷的抗炎机理 [J]. 药学学报, 2000, 35(3): 161-164.
- [15] 延卫东, 王瑞君, 何 琰, 等. 黄芩苷药理作用研究进展 [J]. 陕西中医, 2002, 23(12): 1127-1129.
- [16] 刘睿婷, 卞广兴, 邹莉波, 等. 甘草苷的神经保护及对胆碱酯酶的抑制作用 [J]. 中国新药杂志, 2008, 17(7): 574-577.
- [17] 季宇彬, 姜 薇, 范玉玲, 等. 甘草黄酮的研究进展 [J]. 中草药, 2004, 35(9): 1081-1082.
- [18] 高文远, 李志亮. 主成分分析法评价中药贝母的内在质量 [J]. 中草药, 1992, 23(11): 602-604.
- [19] 李 莉, 杨 梅, 李德坤, 等. 注射用益气复脉 (冻干) 味的测定 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(3): 469-474.
- [20] 郝海平, 郑超滴, 王广基. 多组分、多靶点中药整体药代动力学研究的思考与探索 [J]. 药科学报, 2009, 44(3): 270-275.