

UPLC 法同时测定小儿咳喘灵颗粒中 5 种成分

钱叶飞， 陆林玲*， 张华锋， 周 坚
(苏州市药品检验检测研究中心, 江苏 苏州 215104)

摘要：目的 建立 UPLC 法同时测定小儿咳喘灵颗粒（金银花、麻黄、板蓝根等）中 5 种成分的含有量。**方法** 该药物 50% 甲醇提取液的分析采用 Waters Acquity UPLC HSS T₃ 色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）；流动相乙腈-0.1% 磷酸，梯度洗脱；体积流量 0.3 mL/min；检测波长 207、237 nm；柱温 35 ℃。**结果** （R，S）-告依春、绿原酸、甘草苷、甘草酸、苦杏仁苷分别在 2.166 0~108.300 0、1.999 9~99.995 1、2.025 9~101.292 8、1.847 5~92.375 6、2.140 5~107.026 0 μg/mL 范围内线性关系良好（*r*=1.000 0），平均加样回收率分别为 97.94%、98.29%、102.03%、100.69%、99.78%，RSD 分别为 0.97%、1.09%、1.64%、1.09%、1.83%。**结论** 该方法简便准确，重复性好，可用于小儿咳喘灵颗粒的质量控制。

关键词：小儿咳喘灵颗粒；（R，S）-告依春；绿原酸；甘草苷；甘草酸；苦杏仁苷；UPLC

中图分类号：R927.2 文献标志码：A 文章编号：1001-1528(2020)09-2276-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.09.006

Simultaneous determination of five constituents in Xiao’er Kechuanling Granules by UPLC

QIAN Ye-fei， LU Lin-ling*， ZHANG Hua-feng， ZHOU Jian
(Suzhou Municipal Institute for Drug Control, Suzhou 215104, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish a UPLC method for the simultaneous content determination of five constituents in Xiao’er Kechuanling Granules (*Lonicerae japonicae Flos*, *Ephedrae Herba*, *Isatidis Radix*, etc.). **METHODS** The analysis of 50% methanol extract of this drug was performed on a 35 ℃ thermostatic Waters Acquity UPLC HSS T₃ column (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.1% phosphoric acid flowing at 0.3 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelengths were set at 207, 237 nm. **RESULTS** （R，S）-goitrin, chlorogenic acid, liquiritin, glycyrrhizic acid, amygdalin showed good linear relationships within the ranges of 2.166 0–108.300 0, 1.999 9–99.995 1, 2.025 9–101.292 8, 1.847 5–92.375 6, 2.140 5–107.026 0 μg/mL (*r*=1.000 0), whose average recoveries were 97.94%, 98.29%, 102.03%, 100.69%, 99.78% with the RSDs of 0.97%, 1.09%, 1.64%, 1.09%, 1.83%, respectively. **CONCLUSION** This simple, accurate and reproducible method can be used for the quality control of Xiao’er Kechuanling Granules.

KEY WORDS: Xiao’er Kechuanling Granules; （R，S）-goitrin; chlorogenic acid; liquiritin; glycyrrhizic acid; amygdalin; UPLC

收稿日期：2020-02-17

基金项目：苏州市科技计划项目（SYSD2018218）

作者简介：钱叶飞（1987—），男，主管中药师，研究方向为中药与保健品质量分析。Tel：（0512）67079943，E-mail：qian_yefei@126.com

* 通信作者：陆林玲（1988—），女，主管中药师，研究方向为中药质量分析与控制。Tel：（0512）68223525，E-mail：lulinling09@163.com

小儿咳喘灵颗粒是由金银花、麻黄、板蓝根、甘草、苦杏仁、石膏、瓜蒌 7 味药材组成的中药复方制剂，具有止咳祛痰、宣肺清热的功效，临床上广泛用于治疗上呼吸道感染及其引起的咳嗽等病症，是儿科常用中成药之一^[1-4]，但其现行质量标准中仅检测绿原酸或盐酸麻黄碱单一成分的含有量^[5-6]，过于简单，而且方法也不统一。目前，大多数文献[7-11]采用 HPLC 法分析小儿咳喘灵颗粒中主要成分，为了节约时间与成本，加快检验进度，本实验建立 UPLC 法同时测定其中板蓝根活性成分（R，S）-告依春、金银花活性成分绿原酸、苦杏仁活性成分苦杏仁苷、甘草活性成分甘草苷和甘草酸的含有量，以期为该制剂质量标准提高提供依据。

1 材料

1.1 仪器 Waters Acquity H-Class UPLC 超高效液相色谱仪，配置二极管阵列检测器（PDA）、Empower 3 化学工作站（美国 Waters 公司）；电子天平（瑞士梅特勒-托利多公司）；Millipore Synergy 超纯水机（美国密理博公司）。

1.2 试剂与药物 （R，S）-告依春、甘草苷、苦杏仁苷、绿原酸（批号分别为 111753-201706、111610-201607、110820-201607、110753-201716，纯度分别为 93.1%、90.7%、99.3%）对照品均购于中国食品药品检定研究院；甘草酸（批号 MUST-17060805，纯度 99.65%）对照品购于成都曼思特生物科技有限公司。36 批小儿咳喘灵颗粒来自全国 11 个厂家。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters Acquity UPLC HSS T₃ 色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）；流动相乙腈（A）-0.1% 磷酸（B），梯度洗脱，程序见表 1；体积流量 0.3 mL/min；柱温 35 ℃；检测波长 207 nm（苦杏仁苷）、237 nm〔（R，S）-告依春、绿原酸、甘草苷、甘草酸〕；进样量 1 μL。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 分别精密称取（R，S）-告依春、甘草酸、甘草苷、苦杏仁苷、绿原酸对照品 10.83、9.27、10.88、11.80、10.07 mg，置于 10 mL 量瓶中，50% 甲醇定容至刻度，作为贮备液（质量浓度分别为 1.083 0、0.923 8、1.012 9、1.070 3、1.000 0 mg/mL）。各精密吸取 2 mL，置于 20 mL 量瓶中，50% 甲醇定容至刻度，即得（质量浓度分别为 108.300 0、99.995 1、92.375 6、101.292 8、107.026 0 μg/mL）。

表 1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution programs		
时间/min	A 乙腈/%	B 0.1% 磷酸/%
0	5	95
4.5	6	94
12	20	80
17	30	70
21	45	55
22	90	10
24	90	10
24.1	5	95
26	5	95

2.2.2 供试品溶液 取颗粒适量，研磨成细粉后精密称取 2.0 g，置于 20 mL 量瓶中，加入 15 mL 50% 甲醇超声（250 W、33 kHz）处理 30 min，放冷至室温，50% 甲醇定容至刻度，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.2.3 阴性样品溶液 按照颗粒处方比例和制备工艺，分别制备缺板蓝根、缺苦杏仁、缺甘草、缺金银花的阴性样品，按“2.2.2”项下方法制备，即得。

2.3 专属性试验 精密吸取对照品、供试品、阴性样品溶液各 1 μL，在“2.1”项色谱条件下进样测定，结果见图 1。由此可知，各成分色谱峰分离度理想，表明该方法专属性良好。

2.4 线性关系考察 精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液 0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 mL，置于 10 mL 量瓶中，50% 甲醇稀释并定容至刻度，摇匀，在“2.1”项色谱条件下进样测定。以溶液质量浓度为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行回归，结果见表 2，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

2.5 精密度试验 精密吸取同一份供试品溶液（批号 170908），在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得（R，S）-告依春、绿原酸、甘草苷、甘草酸、苦杏仁苷峰面积 RSD 分别为 0.63%、0.55%、0.07%、0.79%、0.12%，表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 精密吸取同一份供试品溶液（批号 170908），于 0、6、12、18、24 h 在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得（R，S）-告依春、绿原酸、甘草苷、甘草酸、苦杏仁苷峰面积 RSD 分别为 2.37%、1.78%、0.64%、1.86%、2.29%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 精密称取同一批颗粒（批号 170908）6 份，按“2.2.2”项下方法制备 6 份供

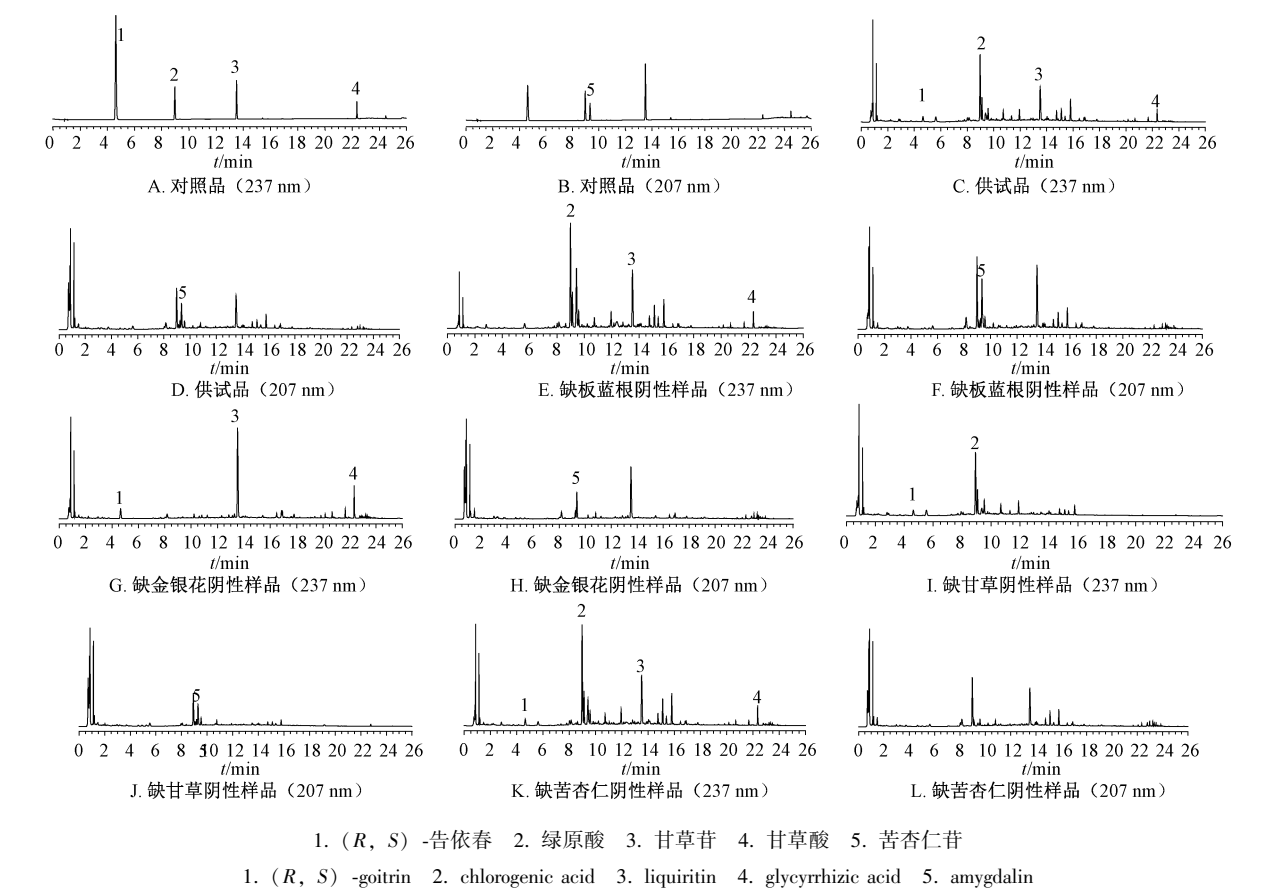


图 1 各成分 UPLC 色谱图

Fig.1 UPLC chromatograms of various constituents

表 2 各成分线性关系

Tab.2 Linear relationships of various constituents			
成分	回归方程	r	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
(R, S)-告依春	$Y=2.59\times10^4X-1.77\times10^4$	1.000 0	2.166 0~108.300 0
绿原酸	$Y=5.91\times10^3X-1.44\times10^3$	1.000 0	1.999 9~99.995 1
甘草苷	$Y=6.35\times10^3X-1.83\times10^3$	1.000 0	2.025 9~101.292 8
甘草酸	$Y=2.02\times10^3X+2.39\times10^2$	1.000 0	1.847 5~92.375 6
苦杏仁苷	$Y=3.37\times10^3X-7.45\times10^2$	1.000 0	2.140 5~107.026 0

试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得 (R, S)-告依春、绿原酸、甘草苷、甘草酸、苦杏仁苷峰面积 RSD 分别为 0.47%、0.98%、0.14%、0.95%、0.24%，表明该方法的重复性良好。

2.8 加样回收率试验 取各成分含有量已知的同一批颗粒（批号 170908）6 份，每份约 1 g，精密称定，精密加入适量对照品溶液，按“2.2.2”项下制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率，结果见表 3。

2.9 耐用性试验 本实验考察了 Waters Acquity BEH C₁₈（2.1 mm×100 mm，1.7 μm）、Waters Acquity HSS T₃（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）色谱

柱，发现各成分均能达到比较理想的分离效果，表明该方法耐用性良好。

2.10 样品含有量测定 取 11 个厂家生产的 36 批样品，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算含有量，结果见表 4。

3 讨论

3.1 检测指标筛选 麻黄为小儿咳嗽灵颗粒君药，对制剂宣肺止咳的功效发挥着关键作用，但其主要成分麻黄碱和伪麻黄碱具有挥发性，提取方法与其他成分不同，而且普通的 C₁₈ 色谱柱对两者分离效果不佳^[12-13]，故今后课题组将对相关质量评价方法进行改进。另外，方中石膏、瓜蒌主要成分尚不明确，也未纳入研究。因此，本实验选择板蓝根、苦杏仁、甘草、金银花所含主要成分作为检测指标。

3.2 检测波长筛选 本实验采用二极管阵列检测器在 200~400 nm 波长处进行扫描，并结合 2015 年版《中国药典》，以物质吸收大小和与其他色谱峰分离度为指标，最终确定为 207、237 nm 双波长检测。

表 3 各成分加样回收率试验结果 (n=6)

Tab.3 Results of recovery tests for various constituents (n=6)

成分	原有量/g	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/% (RSD/%)
(R,S)-告依春	1.007 5	0.054 2	0.099 2	98.02	97.94 (0.97)
	1.006 9	0.054 2	0.099 2	98.15	
	1.003 5	0.054 2	0.098 2	96.55	
	1.004 1	0.054 2	0.098 5	97.13	
	1.005 8	0.054 2	0.099 6	98.90	
	1.006 2	0.054 2	0.099 6	98.91	
绿原酸	1.007 5	0.680 0	1.376 9	99.14	98.29 (1.09)
	1.006 9	0.680 0	1.374 8	98.90	
	1.003 5	0.680 0	1.372 7	98.94	
	1.004 1	0.680 0	1.355 0	96.27	
	1.005 8	0.680 0	1.371 5	98.53	
	1.006 2	0.680 0	1.367 8	97.94	
甘草苷	1.007 5	0.658 4	1.253 6	103.92	102.03 (1.64)
	1.006 9	0.658 4	1.254 7	104.14	
	1.003 5	0.658 4	1.227 4	100.28	
	1.004 1	0.658 4	1.228 6	100.42	
	1.005 8	0.658 4	1.239 2	101.89	
	1.006 2	0.658 4	1.236 9	101.50	
甘草酸	1.007 5	0.554 3	1.165 4	100.89	100.69 (1.09)
	1.006 9	0.554 3	1.168 0	101.42	
	1.003 5	0.554 3	1.154 4	99.33	
	1.004 1	0.554 3	1.154 4	99.28	
	1.005 8	0.554 3	1.168 8	101.69	
	1.006 2	0.554 3	1.168 0	101.50	
苦杏仁苷	1.007 5	0.642 2	1.431 7	101.63	99.78 (1.83)
	1.006 9	0.642 2	1.434 4	102.14	
	1.003 5	0.642 2	1.403 8	97.77	
	1.004 1	0.642 2	1.405 1	97.90	
	1.005 8	0.642 2	1.417 3	99.61	
	1.006 2	0.642 2	1.417 7	99.62	

3.3 供试品溶液提取方法筛选 根据文献 [14] 报道, 本实验考察了提取溶剂 30% 甲醇、50% 甲醇、70% 甲醇, 溶剂用量 10、20、30、50 mL, 提取时间 15、30、45 min 对各成分提取效果的影响。最终确定, 最优供试品溶液提取方法为 20 mL 50% 甲醇提取 30 min。

3.4 含有量分析 36 批小儿咳喘灵颗粒中 (R, S)-告依春、绿原酸、甘草苷、甘草酸、苦杏仁苷最高含有量分别是最低含有量的 9.67、60.72、23.22、22.49、88.89 倍。由此可知, 不同厂家和同一厂家不同批次生产的样品中各成分含有量差异均较大, 质量参差不齐, 可能与药材产地、采收季节、生产工艺等因素有关, 具体原因有待进一步研究。

4 结论

本实验建立的 UPLC 法能在 30 min 内同时测

表 4 各成分含有量测定结果 (mg/g)

Tab.4 Results of content determination of various constituents (mg/g)

厂家	批号	(R,S)-告依春	绿原酸	苦杏仁苷	甘草苷	甘草酸
湖北 A 厂	170908	0.042	0.721	0.766	0.561	0.608
	170888	0.062	0.652	0.961	0.458	0.581
	170891	0.047	0.518	0.713	0.393	0.502
	170217	0.030	0.348	0.391	0.231	0.352
	171139	0.050	1.023	0.876	0.528	0.596
	171028	0.071	0.673	1.065	0.566	0.568
湖南 B 厂	1707033	0.037	0.139	0.583	0.321	0.570
	171002	0.056	0.098	0.371	0.236	0.338
	170601	0.050	0.123	0.517	0.251	0.455
	1711063	0.031	0.072	0.321	0.207	0.308
四川 C 厂	170507	0.015	0.519	0.423	0.575	1.608
	171103	0.020	0.325	0.294	1.408	2.121
	161102	0.020	0.350	0.442	0.201	0.366
吉林 D 厂	171208	0.017	0.314	0.293	0.906	1.287
	4161214	0.029	0.805	0.502	0.249	0.286
	4171010	0.095	0.879	0.677	0.388	0.507
湖北 E 厂	4161201	0.030	0.744	0.576	0.212	0.290
	1712004Z	0.028	0.265	0.652	0.137	0.271
	1710003Z	0.023	0.387	0.500	0.116	0.250
四川 F 厂	1710002Z	0.028	0.253	0.622	0.174	0.332
	171106	0.012	0.265	0.259	0.163	0.419
	170904	0.008	0.375	0.300	0.163	0.503
四川 G 厂	171102	0.019	0.718	0.679	0.377	1.115
	170904	0.018	0.734	0.556	0.277	0.963
	170508	0.116	4.315	2.663	1.403	1.823
黑龙江 H 厂	170206	0.100	4.050	4.089	2.090	3.508
	171002	0.106	4.372	3.013	1.287	1.713
	20170227	0.055	1.554	1.234	0.321	0.207
河南 I 厂	20170803	0.051	1.464	1.759	0.462	0.285
	20170634	0.043	1.554	1.462	0.309	0.206
	17082612	0.031	0.235	0.046	0.090	0.156
广东 J 厂	17103011	0.032	0.365	0.102	0.152	0.247
	16083111	0.012	0.209	0.068	0.112	0.181
	171102	0.015	0.974	0.371	0.324	0.182
山西 K 厂	171101	0.014	0.992	0.364	0.313	0.188
	6170903	0.039	0.122	0.204	0.103	0.169

定小儿咳喘灵颗粒中 (R, S)-告依春、绿原酸、甘草苷、甘草酸、苦杏仁苷的含有量, 而且简便准确, 重复性好, 可提高检验效率, 全面评价该制剂质量, 从而为完善其质量标准提供依据。

参考文献:

[1] 罗世惠. 小儿咳喘灵颗粒的临床应用[J]. 中医儿科杂志, 2008, 4(2): 25-26.

[2] 郑艳青, 马 斐, 张 静, 等. 小儿咳喘灵颗粒中金银花的质量分析[J]. 中成药, 2015, 37(12): 2660-2664.

[3] 冯改梅. 小儿咳喘灵颗粒联合孟鲁司特钠治疗咳嗽变异性哮喘疗效观察[J]. 中国中西医结合儿科学, 2015, 7(3): 250-251.

[4] 冯泽喜. 小儿咳喘灵颗粒治疗小儿哮喘的临床效果观察[J]. 临床合理用药杂志, 2018, 11(14): 66-67.

[5] YBZ08702004, 小儿咳喘灵冲剂[S].

[6] YBZ01852005, 小儿咳喘灵颗粒[S].

[7] 曾 桢, 刘 莉, 李 峰, 等. 一测多评法测定小儿咳喘灵颗粒中 6 种绿原酸类成分的含量[J]. 儿科药学杂志, 2019, 25(5): 46-51.

[8] 王爱娜, 冯 贞. 同时测定小儿咳喘灵颗粒中 4 种成分的方法研究[J]. 中国药事, 2017, 31(8): 933-939.

[9] 朱泽兵, 张德伟, 牟腊梅, 等. HPLC 法同时测定小儿咳喘灵颗粒中 6 种成分[J]. 中国药师, 2018, 21(2): 354-357.

[10] 郑 娟, 茅 纯. HPLC 波长转换法同时测定小儿咳喘灵颗粒中 (R, S) -告依春、绿原酸和甘草苷的含量[J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(6): 727-731.

[11] 高海燕. HPLC 双波长法同时测定小儿咳喘灵颗粒中绿原酸与苦杏仁苷的含量[J]. 亚太传统医药, 2018, 14(12): 42-44.

[12] 彭 玲, 朱倩云, 张 洁, 等. HPLC 法测定小儿咳喘灵中麻黄碱、伪麻黄碱的含量 [J]. 广州化工, 2017, 45(18): 112-114.

[13] 李 翔, 刘皈阳, 马建丽, 等. HPLC 法测定麻杏口服液中盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的含量 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34(1): 190-192.

[14] 姚 晓, 蒋骊龙, 陈建伟. 双波长 HPLC 同时测定小儿咳喘灵颗粒中 8 种有效成分的含量[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(7): 1036-1040.

一测多评法同时测定积雪草总苷及其 2 种制剂中 3 种成分

陈 铭, 刘文倩, 苗 水, 周 恒, 兰 岚, 李雯婷, 季 申*
(上海市食品药品检验所, 国家药品监督管理局中药质量控制重点实验室, 上海 201203)

摘要: **目的** 建立一测多评法同时测定积雪草总苷及积雪苷片、积雪苷霜软膏中 3 种成分的含有量。**方法** 各样品甲醇提取液的分析采用 Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈- (2 mmol/L 羟丙基-β-环糊精) (24 : 76); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 205 nm。以羟基积雪草苷为内标, 计算其他 2 种成分的相对校正因子, 测定含有量。**结果** 积雪草苷 B、羟基积雪草苷、积雪草苷在各自范围内线性关系良好 ($r \geq 0.999\ 8$), 平均加样回收率 97.93%~102.05%, RSD 0.61%~2.06%。一测多评法所得结果与外标法接近。**结论** 该方法稳定可靠, 可用于积雪草总苷及其 2 种制剂的质量控制。

关键词: 积雪草总苷; 积雪苷片; 积雪苷霜软膏; 积雪草苷 B; 羟基积雪草苷; 积雪草苷; 一测多评
中图分类号: R927.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2020)09-2280-05
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.09.007

Simultaneous determination of three constituents in *Centella asiatica* total glucosides and their two preparations by QAMS

CHEN Ming, LIU Wen-qian, MIAO Shui, ZHOU Heng, LAN Lan, LI Wen-ting, JI Shen*
(National Medical Products Administration Key Laboratory for Quality Control of Traditional Chinese Medicine, Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish a quantitative analysis of multi-components by single-marker (QAMS) method for the simultaneous content determination of three constituents in *Centella asiatica* total glucosides, Jixuegan Tablets and Jixuegan Cream Ointment. **METHODS** The analyses of methanol extracts of various samples were performed on a 30 ℃ thermostatic Eclipse XDB-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile- (2 mmol/L hydroxypropyl-β-cyclodextrin) (24 : 76) flowing at 1.0 mL/min in a

收稿日期: 2020-02-06
基金项目: 国家科技部重点研发计划 (2017YFC1700800); 上海市科委研发平台专项 (18DZ2292200); 上海市科委技术标准专项 (18DZ2200900); 国家药典委员会药品医疗器械审评审批制度改革项目 (ZG2016-1)
作者简介: 陈 铭 (1983—), 男, 硕士, 主管药师, 从事药物分析、中药质量控制研究。Tel: (021) 38839900-26606, E-mail: cncmchen@126.com
* **通信作者:** 季 申 (1963—), 女, 主任药师, 博士生导师, 从事药学领域研究。Tel: (021) 38839900-26601, E-mail: jishen2013@163.com