

HPLC多波长切换法同时测定小儿咽扁颗粒中11种成分的含量

姜军华^{1#}, 陈建兰^{2#}, 许妍^{1*}, 吴良发^{1*} (1. 江西省药品检验检测研究院, 国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室, 江西省药品与医疗器械质量工程技术研究中心, 南昌 330029; 2. 南昌县中医院, 南昌 330200)

摘要 目的: 为更好地控制小儿咽扁颗粒的质量, 建立HPLC法同时测定小儿咽扁颗粒中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸B、3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、野鸢尾苷、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、哈巴俄苷、肉桂酸、野鸢尾苷元和次野鸢尾黄素11种成分的含量。方法: 基于波长切换技术的HPLC法, 色谱柱为Agilent 5T-C₁₈(2) (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相梯度洗脱, 流速为1.0 mL·min⁻¹, 柱温为30 °C, 进样量10 μL, 检测波长分别为327、280 nm。结果: 新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸B、3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、野鸢尾苷、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、哈巴俄苷、肉桂酸、野鸢尾苷元和次野鸢尾黄素线性范围分别为0.029~0.43、0.12~1.82、0.020~0.30、0.031~0.47、0.030~0.45、0.058~0.87、0.038~0.57、0.0090~0.13、0.012~0.19、0.026~0.39、0.0031~0.047 μg, 相关系数 $r \geq 0.9996$; 平均加样回收率分别为98.55%、98.58%、96.12%、93.22%、97.42%、93.88%、95.63%、101.73%、97.37%、97.50%、95.69%, RSD分别为0.69%、1.45%、2.08%、1.88%、1.75%、2.69%、1.46%、2.70%、1.26%、2.59%、1.62%。结论: 该方法简单准确, 重复性良好, 可用于小儿咽扁颗粒质量控制。

关键词: 小儿咽扁颗粒; 波长切换法; 高效液相色谱法; 含量测定; 质量控制

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2023)02-0199-06

doi:10.16153/j.1002-7777.2023.02.011

Simultaneous Determination of Eleven Compositions in Xiaoer Yanbian Granule by HPLC Multiwavelength Switching Method

Jiang Junhua^{1#}, Chen Jianlan^{2#}, Xu Yan^{1*}, Wu Liangfa^{1*} (1. Jiangxi Institute for Drug Control, NMPA Key Laboratory of Quality Evaluation of Traditional Chinese Patent Medicine, Jiangxi Province Engineering Research Center of Drug and Medical Device Quality, Nanchang 330029, China; 2. Nanchang County Hospital of TCM, Nanchang 330200, China)

Abstract Objective: To perform the quality control of Xiaoer Yanbian Granules, a HPLC method was established for the simultaneous determination of 11 components, including neochlorogenic acid, chlorogenic

基金项目: 江西省药品监督管理局科研项目(编号 2019JS05)

作者简介: 姜军华 Tel: (0791) 88158716; E-mail: m13617004949@163.com

共同第一作者: 陈建兰 Tel: (0791) 87317988; E-mail: 463986738@qq.com

通信作者: 许妍 Tel: (0791) 88158716; E-mail: 1332408991@qq.com

吴良发 Tel: (0791) 88158780; E-mail: 757497260@qq.com

acid, cryptochlorogenic acid, isochlorogenic acid B, 3,5-di-O-caffeoylquinic acid, iridin, 4,5-di-O-caffeoylquinic acid, harpagoside, cinnamic acid, Irigenin, irisfloreantin in Xiaoer Yanbian Granules. **Methods:** Based on wavelength switching technology, HPLC method was used with Agilent 5T- C₁₈(2) column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile and 0.1% phosphoric acid with gradient elution, and flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The temperature was 30°C, and the sample volume was 10 μL, and the detection wavelength was 327, 280 nm respectively. **Results:** The linear ranges of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, isochlorogenic acid B, 3,6-di-O-caffeoylquinic acid, iridin, 4,5-di-O-caffeoylquinic acid, harpagoside, cinnamic acid, irigenin, irisfloreantin were 0.029-0.43, 0.12-1.82, 0.020-0.30, 0.031-0.47, 0.030-0.45, 0.058-0.87, 0.038-0.57, 0.0090-0.13, 0.012-0.19, 0.026-0.39, 0.0031-0.047 μg, respectively. The correlation coefficient $r \geq 0.9996$. The average recovery rates were 98.55%, 98.58%, 96.12%, 93.22%, 97.42%, 93.88%, 95.63%, 101.73%, 97.37%, 97.50%, 95.69% with RSD of 0.69%, 1.45%, 2.08%, 1.88%, 1.75%, 2.69%, 1.46%, 2.70%, 1.26%, 2.59%, 1.62%, respectively. **Conclusion:** This method is simple, accurate and reproducible and can be used for the quality evaluation of Xiaoer Yanbian Granules.

Keywords: Xiaoer Yanbian Granule; wavelength switching method; HPLC; content determination; quality control

小儿咽扁颗粒由金银花、射干、玄参等八味药组成,除人工牛黄和冰片直接入药外,金银花等6味药均为水煎煮,具有清热利咽、解毒止痛之功效^[1]。处方中金银花清热解毒,清宣疏散;射干祛痰利咽,清热解毒;合用清宣肺卫,解毒利咽,共为君药。绿原酸等酚酸类成分为金银花的主要活性成分^[2-3],次野鸢尾黄素等异黄酮类为射干的主要活性成分^[4-5]。小儿咽扁颗粒标准有《中华人民共和国药典》2020年版一部和国家药品标准 YBZ200562007-2014,两者质控项目完全一致,含量测定采用绿原酸作为指标成分,代表性较差,且另一味君药射干无含量测定项,仅以单一的组分为指标无法全面反映制剂的质量。课题组考虑到中药成方制剂由多味中药材组成,成分复杂,临床疗效多为多组分协同起效,多组分综合质量控制模式更能体现药物内在的真实情况。

目前小儿咽扁颗粒报道多见绿原酸^[6-8]的质量控制,偶见次野鸢尾黄素^[9]、新绿原酸、隐绿原酸^[10]等报道。本研究首次采用HPLC波长切换法^[11]同时测定小儿咽扁颗粒中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸B、3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、野鸢尾苷、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、哈巴俄苷、肉桂酸、野鸢尾苷元、次野鸢尾黄素11种成分的含量,为小儿咽扁颗粒质量控制及进一步质量标准提升提供参考。

1 材料

Agilent 1260 Infinity II高效液相色谱仪(包括四元泵, DAD检测器, 自动进样器); ML204T型万分之一电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司], Sartorius BT25S型十万分之一电子天平(德国赛托利斯公司)。

对照品: 绿原酸对照品(批号: 110753-201817, 含量以96.8%计)、肉桂酸对照品(批号: 110786-201604, 含量以98.8%计)、哈巴俄苷对照品(批号: 111730-201709, 含量以95.9%计)、次野鸢尾黄素对照品(批号: 1557-200101)、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸对照品(批号: 111894-201102, 含量以94.1%计), 均购于中国食品药品检定研究院; 异绿原酸B对照品(批号: 3089, 含量以99.7%计)、3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸对照品(批号: 10639, 含量以99.0%计)、野鸢尾苷元对照品(批号: 8998, 含量以99.2%计)、新绿原酸对照品(批号: 3209, 含量以99.3%计)、隐绿原酸对照品(批号: 3208, 含量以98.3%计), 均购于上海诗丹德标准技术服务有限公司; 野鸢尾苷对照品(批号: M2370009)购于上海安谱实验科技股份有限公司。

小儿咽扁颗粒[批号: 180104(无蔗糖)、210303, 贵州神奇药业有限公司], 小儿咽扁颗粒(批号: 181205、181206、190515, 江西药都仁和

制药有限公司), 均为市售品, 编号S1~S5。

乙腈为Sigma公司生产的色谱纯试剂、磷酸为上海麦克林生化科技有限公司生产的色谱纯试剂、水为Milli-Q IQ7000制备的超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent 5T-C₁₈(2) (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相A: 乙腈, 流动相B: 0.1%磷酸溶液; 梯度洗脱 (0~5 min, 1%~5%A; 5~20 min, 5%~20%A; 20~35 min, 20%~30%A; 35~40 min, 30%~20%A; 40~70 min, 20%~28%A), 流速为 1.0 mL · min⁻¹; 柱温30 °C; 进样量10 μL; 0~52 min采用327 nm检测新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸B、3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、野鸢尾苷、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸; 52~70 min采用280 nm检测哈巴俄苷、肉桂酸、野鸢尾苷元、次野鸢尾黄素。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备

分别取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸B、3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、野鸢尾苷、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、哈巴俄苷、肉桂酸、野鸢尾苷元、次野鸢尾黄素对照品适量, 精密称定, 加50%甲醇制成每1 mL含新绿原酸0.7144 mg、绿原酸3.0376 mg、隐绿原酸0.4949 mg、异绿原酸B 0.7811

mg、3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸0.7470 mg、野鸢尾苷1.4480 mg、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸0.9570 mg、哈巴俄苷0.2238 mg、肉桂酸0.3087 mg、野鸢尾苷元0.6537 mg、次野鸢尾黄素0.07830 mg的混合对照品溶液, 摇匀, 即得。

2.2.2 供试品溶液的制备

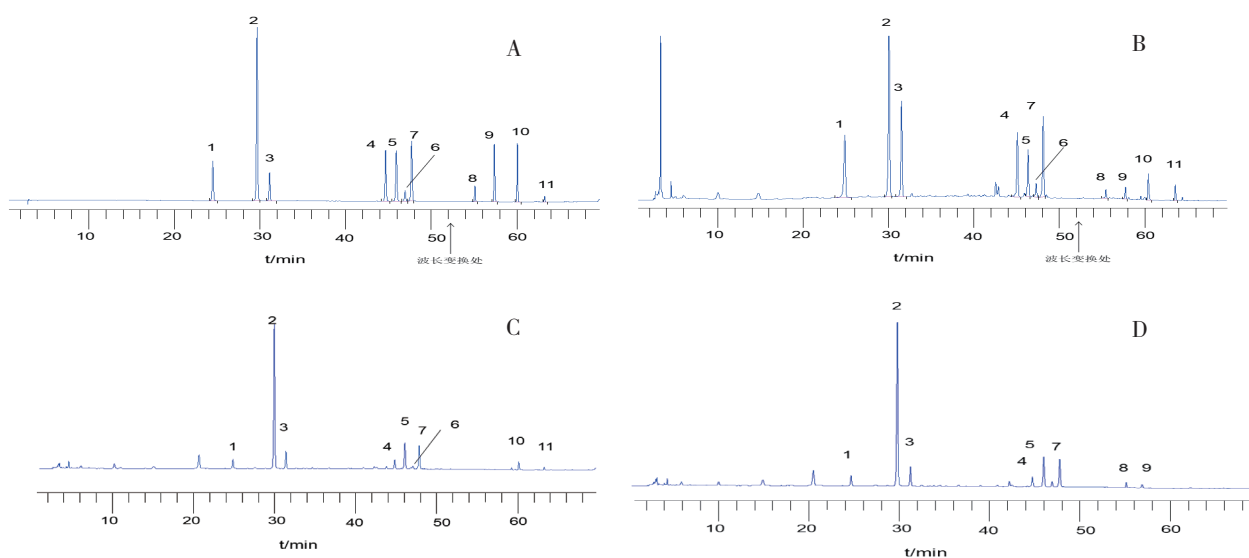
取小儿咽扁颗粒适量, 混匀, 研细, 取约1.5 g或0.75 g (无糖型), 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入50%甲醇100 mL, 密塞, 称定重量, 置超声仪 (功率500 W, 频率40 kHz) 中超声45 min, 放置至室温, 用50%甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液50 mL, 回收溶剂至干, 用少量50%甲醇使溶解, 并转移置5 mL容量瓶中, 加50%甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

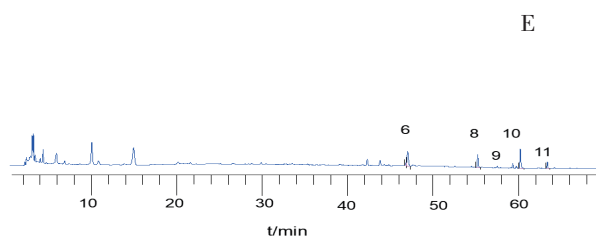
2.2.3 阴性样品溶液的制备

采用小儿咽扁颗粒标准中规定的处方和制备工艺, 分别制成缺少金银花、玄参、射干的3种阴性样品, 再按“2.2.2”项下小儿咽扁颗粒供试品溶液制备方法, 分别制成相应的阴性样品溶液。

2.3 专属性试验

分别精密吸取适当浓度的混合对照品溶液、“2.2.2”“2.2.3”项下的小儿咽扁颗粒供试品溶液和各阴性样品溶液各10 μL, 采用“2.1”项下方法进样测定, 结果见图1, 阴性样品对测定不产生干扰。





A. 混合对照品溶液；B. 小儿咽扁颗粒供试品溶液；C. 缺玄参阴性样品溶液；D. 缺射干阴性样品溶液；E. 缺金银花阴性样品溶液；1. 新绿原酸；2. 绿原酸；3. 隐绿原酸；4. 异绿原酸B；5. 3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸；6. 野鸢尾苷；7. 4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸；8. 哈巴俄苷；9. 肉桂酸；10. 野鸢尾苷元；11. 次野鸢尾黄素。

图1 HPLC 色谱图

2.4 线性关系考察

分别精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液0.2、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 mL，置于50 mL量瓶中，加50%甲醇稀释至刻度，摇匀，用0.45 μm膜

滤过，依照“2.1”项下色谱条件进样检测，记录峰面积。分别以各待测组分的进样量（ X ，μg）为横坐标，峰面积（ Y ）为纵坐标，绘制回归曲线。结果见表1。

表1 新绿原酸等11种成分的回归方程与线性范围

待测组分	回归方程	r	线性范围/μg
新绿原酸	$y=3069.52x+4.59$	1.0000	0.029~0.43
绿原酸	$y=3164.51x+9.14$	1.0000	0.12~1.82
隐绿原酸	$y=2928x+1.18$	0.9998	0.020~0.30
异绿原酸B	$y=3592.98x+0.38$	0.9999	0.031~0.47
3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸	$y=4020.63x+0.58$	0.9999	0.030~0.45
野鸢尾苷	$y=419.44x+0.077$	0.9999	0.058~0.87
4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸	$y=3722.56x+1.06$	0.9999	0.038~0.57
哈巴俄苷	$y=2589.9x+0.4446$	0.9996	0.0090~0.13
肉桂酸	$y=8359.2x+0.4338$	0.9998	0.012~0.19
野鸢尾苷元	$y=3269.2x+1.5234$	0.9999	0.026~0.39
次野鸢尾黄素	$y=2918.1x+1.4276$	0.9997	0.0031~0.047

2.5 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下制备的混合对照品溶液1.0 mL，置于5 mL量瓶中，用50%甲醇稀释至刻度，摇匀，即得；采用“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次，记录峰面积。结果显示，新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸B、3,5-二-O-

咖啡酰奎宁酸、野鸢尾苷、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、哈巴俄苷、肉桂酸、野鸢尾苷元、次野鸢尾黄素峰面积的RSD分别为0.16%、0.16%、0.13%、0.14%、0.14%、0.29%、0.43%、0.15%、0.04%、0.07%、0.33%（ $n=6$ ），结果表明本次研究所用仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下方法制备的同一小儿咽扁颗粒溶液（批号：190515），分别于室温下放置0 h、4 h、8 h、12 h、20 h、24 h时，并采用“2.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果显示，新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸B、3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、野鸢尾苷、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、哈巴俄苷、肉桂酸、野鸢尾苷元、次野鸢尾黄素峰面积的RSD分别为0.22%、0.17%、0.54%、0.20%、0.60%、1.43%、0.44%、1.03%、0.39%、0.19%、0.21%（ $n=6$ ），表明供试品溶液于室温下放置24 h内稳定良好。

2.7 重复性试验

取小儿咽扁颗粒样品（批号：190515）适量，混匀，研细，每份取1.5 g，精密称定，共称取6份，采用“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，再采用“2.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积并按外标法计算样品含量。结果显示，含量的RSD分别为0.62%、1.12%、0.78%、1.15%、0.98%、1.80%、1.21%、1.20%、1.62%、0.69%、1.70%

（ $n=6$ ），表明拟建立的方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

精密称取已知11种成分含量的小儿咽扁颗粒（批号：190515），每份0.75 g，共称取6份，分别加入相当于样品含量100%的对照品，采用供试品溶液制备法制备，按照“2.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积并计算加样回收率，结果新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸B、3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、野鸢尾苷、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、哈巴俄苷、肉桂酸、野鸢尾苷元、次野鸢尾黄素的平均回收率分别为98.55%、98.58%、96.12%、93.22%、97.42%、93.88%、95.63%、101.73%、97.37%、97.50%、95.69%，RSD分别为0.69%、1.45%、2.08%、1.88%、1.75%、2.69%、1.46%、2.70%、1.26%、2.59%、1.62%。

2.9 含量测定

对本次收集的5批小儿咽扁颗粒，分别采用“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，再按照“2.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积并按外标法计算样品含量，结果见表2。

表2 含量测定结果

mg · g⁻¹

成分	含量				
	S1 (n=2)	S2 (n=2)	S3 (n=2)	S4 (n=2)	S5 (n=6)
新绿原酸	0.210	0.253	0.229	0.230	0.228
绿原酸	0.534	0.543	0.586	0.595	0.521
隐绿原酸	0.231	0.285	0.263	0.260	0.260
异绿原酸 B	0.145	0.243	0.162	0.163	0.147
3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸	0.084	0.177	0.116	0.117	0.098
野鸢尾苷	0.311	0.360	0.522	0.506	0.262
4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸	0.165	0.322	0.228	0.230	0.185
哈巴俄苷	0.045	0.051	0.032	0.032	0.020
肉桂酸	0.020	0.015	0.012	0.013	0.010
野鸢尾苷元	0.035	0.043	0.051	0.051	0.051
次野鸢尾黄素	0.026	0.038	0.025	0.025	0.029

3 讨论

3.1 供试品溶液制备的相关因素考察

考察了不同的提取溶剂：乙醇、甲醇、50%甲醇、70%甲醇等，结果发现用50%甲醇为溶剂时，拟测组分提取效果最佳；考察了不同提取方法（超声仪提取、水浴加热回流提取）和不同提取时间（15 min、45 min、60 min），结果表明超声提取45 min能基本提取完全；同时考虑哈巴俄苷、肉桂酸、野鸢尾苷元及次野鸢尾黄素含量偏小，故对样品溶液增加了浓缩步骤：精密量取续滤液50 mL，回收溶剂至干，用少量50%甲醇使溶解，并转移置5 mL容量瓶中，加50%甲醇稀释至刻度，摇匀，即得。

3.2 检测波长的选择

本课题组采用DAD检测器，在190~400 nm波长内对小儿咽扁颗粒样品进行扫描分析，结果金银花中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸B、3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸在327 nm处峰面积响应值较大，玄参中哈巴俄苷和肉桂酸在280 nm处有最大吸收，射干中野鸢尾苷、野鸢尾苷元、次野鸢尾黄素在265 nm处有最大吸收；虽然野鸢尾苷及野鸢尾苷元190~400 nm光谱图很类似，但两者出峰先后不一，为了兼顾其他测定组分、消除相应位置干扰峰对测定组分的干扰及相应位置基线的平稳，故采用了波长切换法。

3.3 流动相及梯度洗脱条件的筛选

考察了不同有机（甲醇、乙腈）和无机相（水、0.1%磷酸溶液、0.3%磷酸溶液、0.1%甲酸溶液、0.5%甲酸溶液），以及不同的梯度洗脱程序，最终确定为以乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱。

3.4 测定指标成分的确定

小儿咽扁颗粒为清热剂，属儿科用药。具有清热利咽、解毒止痛之功效。根据制剂的配伍原则可知处方中金银花、射干共为君药，玄参为臣药。处方中各组分协同作用共同发挥疗效，选择该三味药可能发挥疗效的金银花（酚酸类成分）、射干（异黄酮类成分）和玄参（哈巴俄苷、肉桂酸）中的11种活性成分为待测指标，采用HPLC-DAD法同时对样品中拟测定的11种组分进行定量分析。

此次建立的HPLC多波长切换法同时测定小儿咽扁颗粒中11种有效成分的含量，具备简单、准确、重现性好等特点，可为完善小儿咽扁颗粒质量标准提供方法依据，为其多指标成分研究奠定基础。

参考文献：

- [1] 中华人民共和国药典：一部[S]. 2020: 541-542.
- [2] 宋亚玲, 王红梅, 倪付勇, 等. 金银花中酚酸类成分及其抗炎活性研究[J]. 中草药, 2015, 46(4): 490-495.
- [3] 索彩仙, 程学仁, 潘礼业, 等. 忍冬属药材川银花与金银花 山银花的鉴别研究[J]. 中国现代中药, 2021, 23(10): 1747-1754.
- [4] 卞娅, 刘孟生, 张丽媛, 等. 射干、鸢尾不同部位6种活性成分定量分析及抗炎作用初探[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(1): 119-122.
- [5] 姜鸿, 王光函, 辛旭阳, 等. UPLC法测定射干药材中10个异黄酮类成分的含量[J]. 中国药房, 2019, 30(23): 3216-3220.
- [6] 段杨, 刘应华, 宋愿智. 高效液相色谱法测定小儿咽扁颗粒中绿原酸含量[J]. 中国药业, 2014, 23(3): 38-39.
- [7] 刘安, 秦孝波, 黄艳. 小儿咽扁颗粒含量测定方法研究[J]. 中国实用医药, 2013, 8(35): 236-237.
- [8] 梁玉香, 韩丹, 洪岩斌. HPLC法测定小儿咽扁颗粒中绿原酸的含量[J]. 中国医药指南, 2013, 11(14): 481-482.
- [9] 谢清萍, 彭文明, 刘萍绿. RP-HPLC法同时测定小儿咽扁颗粒中5个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(12): 2163-2167.
- [10] 王银红, 文庆, 李瑞莲, 等. 一测多评法测定小儿咽扁颗粒中3种有机酸类成分含量[J]. 中国药师, 2022, 25(2): 346-350.
- [11] 郑晓萍, 杨晓娟, 杨自荣, 等. HPLC波长切换法同时测定白益镇惊丸中的京尼平龙胆二糖苷、栀子苷、西红花苷-I、去氢茯苓酸和茯苓酸[J]. 中国药事, 2017, 31(3): 275-280.

(收稿日期 2022年4月25日 编辑 王雅雯)