

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.02.020

金茵利胆口服液高效液相色谱指纹图谱 及多成分含量同时测定研究*

赵丽娟,王 信,潘新波,李彩东[△]

(甘肃省兰州市第二人民医院,甘肃 兰州 730046)

摘要:目的 建立金茵利胆口服液的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,以及多成分含量同时测定的方法。方法 色谱柱为 DIKMA Diamonsil[®] C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液(梯度洗脱),流速为0.9 mL/min,检测波长为254 nm,柱温为25℃,进样量为20 μL。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)”绘制21批样品的特征图谱,计算相似度;确定共有峰并指认,进行主成分分析,并同时测定8种成分的含量。结果 21批样品的特征图谱共有18个共有峰,指认出其中8个特征峰,相似度均不小于0.947,不同批次样品中没食子酸、夏佛塔苷、新橙皮苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵在3种主成分中得分较高,8批样品中没食子酸、绿原酸、夏佛塔苷、甘草苷、柚皮苷、新橙皮苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵平均含量分别为0.136 1,0.119 3,0.091 9,0.198 7,1.390 5,1.655 0,0.089 9,0.028 9 g/L。结论 所建立的HPLC指纹图谱及8种成分含量同时测定的方法可用于金茵利胆口服液的质量控制。

关键词:金茵利胆口服液;高效液相色谱法;指纹图谱;同时测定;样品含量

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)02-0074-06

HPLC Fingerprint of Jinyin Lidan Oral Liquid and Simultaneous Determination of Multiple Components in Jinyin Lidan Oral Liquid

ZHAO Lijuan, WANG Xin, PAN Xinbo, LI Caidong

(The Second People's Hospital of Lanzhou, Lanzhou, Gansu, China 730046)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint of Jinyin Lidan Oral Liquid and an HPLC method for the simultaneous determination of multiple components in Jinyin Lidan Oral Liquid. **Methods** DIKMA Diamonsil[®] C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was adopted, the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid

*基金项目:甘肃省中医药管理局科研课题[GZK-2019-74];甘肃省兰州市人才创新创业项目[2019-RC-29];甘肃省兰州市城关区科技计划项目[2018KJGG0053]。

第一作者:赵丽娟,女,硕士,主管药师,研究方向为中药分析,(电子信箱)pharmzhao@126.com。

[△]通信作者:李彩东,女,博士,主任药师,研究方向为中药分析与药理,(电子信箱)lzlcaidong@163.com。

氯乙酸中带正电荷的碳原子进攻,发生亲核取代反应,氯原子作为离去基团。

3.4 小结

羧甲淀粉钠中氯乙酸影响马来酸氯苯那敏的稳定性,根据其反应机制推导,具有胺基基团的原料药由于存在未共用电子对,均存在与氯乙酸发生亲核反应的可能,且氯乙酸也可能影响其他带负电荷或未共享电子对的原料药,因此,该类原料药物在选择辅料时需关注辅料中残留的氯乙酸对其稳定性的影响。

参考文献

- [1] 白春昕. 羧甲淀粉钠溶液对儿童反复呼吸道感染的预防作用[J]. 中国实用医药, 2017, 12(24): 120-121.
- [2] 金 辉, 周 玲, 刘玲媛, 等. 羧甲淀粉钠溶液在临床的探讨[J]. 大家健康, 2012, 6(10): 89-90.
- [3] 江雄知, 崔丽丽, 李和平. 羧甲淀粉钠的合成与应用研究进展[J]. 精细与专用化学品, 2008, 16(17): 23-26.
- [4] 朱秋鸿, 黄金祥, 孟聪申, 等. 急性氯乙酸中毒研究进展[J].

中国工业医学杂志, 2009, 22(4): 275-278.

- [5] JOHNSON PD, DAWSON BV, GOLDBERG SJ. Cardiac teratogenicity of trichloroethylene metabolites [J]. Journal of the American College of Cardiology, 1998, 32(2): 540-545.
- [6] 陆 智, 李亚杰, 李钟瑞, 等. 化妆品中一氯乙酸和二氯乙酸的安全性评价[J]. 日用化学品科学, 2017, 2(40): 1-3.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 791-792.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 70-72.
- [9] 黄福星, 李 成, 张开礼. 小儿扑尔敏片的制备与质量控制[J]. 中国现代应用药学杂志, 2005, 22(8): 757-758.
- [10] 高鸿宾. 有机化学(第三版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 181.
- [11] 王兰芳, 吴英绵. 醇、胺类化合物的酸碱性与取代基的电子效应[J]. 石家庄大学学报, 1999, 11(4): 31-32.

(收稿日期: 2021-06-23; 修回日期: 2021-08-02)

aqueous solution (gradient elution), the flow rate was 0.9 mL/min, the detection wavelength was 254 nm, the column temperature was 25 °C, and the injection volume was 20 µL. The Similarity Evaluation System for TCM Chromatographic Fingerprint (2012 Edition) was used to construct the characteristic spectra of 21 batches of samples to calculate the similarity. The common peaks were determined and identified, the principal component analysis was conducted, and the contents of eight components were simultaneously determined. **Results** There were 18 common peaks in the HPLC fingerprints of 21 batches of samples with similarities ≥ 0.947 , of which eight common peaks were identified. Gallic acid, schaftoside, neohesperidin, berberine hydrochloride and ammonium glycyrrhizate scored higher in the three principal components in different batches of samples. The average contents of gallic acid, chlorogenic acid, schaftoside, glycyrrhizin, naringin, neohesperidin, berberine hydrochloride, and ammonium glycyrrhizate in the eight batches of Jinyin Lidan Oral Liquid were 0.136 1, 0.119 3, 0.091 9, 0.198 7, 1.390 5, 1.655 0, 0.089 9, 0.028 9 g/L, respectively. **Conclusion** The established HPLC fingerprint and the method for simultaneous determination of eight components can be used for the quality control of Jinyin Lidan Oral Liquid.

Key words: Jinyin Lidan Oral Liquid; HPLC; fingerprint; simultaneous determination; content determination

金茵利胆口服液(甘药制备字Z20200419000)在我院临床应用已逾20年,由茵陈、广金钱草、枳壳、蒲公英、黄连、甘草等18味中药组方,主要含有蒽醌类、生物碱类、黄酮类、有机酸类等成分,具有疏肝利胆、清热解毒等功效,用于治疗黄疸、慢性肝炎、胆道结石、胆囊炎等症。现行质量标准对方中茵陈、枳壳、蒲公英和五味子进行了薄层色谱定性鉴别,并测定了柚皮苷和新橙皮苷的含量^[1]。本研究中参考2020年版《中国药典(一部)》^[2]及文献[3-6],采用高效液相色谱(HPLC)法构建了21批金茵利胆口服液的指纹图谱,运用主成分分析(PCA)法筛选了批次间的主要差异成分,同时测定了8种主要有效成分的含量,为建立该制剂的质量控制方法提供了参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20A型高效液相色谱仪(日本Shimadzu公司);FA2004N型电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司);XPE105型电子分析天平(梅特勒托利多仪器(上海)有限公司);TH-100BQ型超声波提取机(济宁天华超声电子仪器有限公司)。

1.2 试剂

没食子酸对照品(批号为110831-200302,含量91.5%),绿原酸对照品(批号为110753-201817,含量96.6%),夏佛塔苷对照品(批号为111912-201703,含量95.6%),甘草苷对照品(批号为111610-201106,含量93.7%),柚皮苷对照品(批号为110722-201111,含量93.2%),新橙皮苷对照品(批号为111857-201102,含量99.6%),盐酸小檗碱对照品(批号为110713-201212,含量86.7%),甘草酸铵对照品(批号为110731-201116,含量93.1%),均购自中国食品药品检定研究院;金茵利胆口服液(医院制剂室自制,批号分别为20181206, 20181213, 20181220, 20190314, 20190328, 20190411, 20190425, 20190516, 20190530, 20190704,

20190822, 20190919, 20190930, 20191024, 20191107, 20191113, 20191121, 20191128, 20191206, 20191213, 20200116,依次记为S1-S21;规格为10 mL/支);磷酸、甲醇、乙腈均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为双蒸水。广金钱草(批号为19112202,广西产),茵陈(批号为19090804,甘肃产),黄连(批号为20021002,四川产),厚朴(批号为20021202,四川产),甘草(批号为19111705,甘肃产),香附(批号为19031303,广西产),木香(批号为20021101,云南产),牡丹皮(批号为20020701,河南产),枳壳(批号为19102106,江西产),桃仁(批号为19111905,山东产),川楝子(批号为20021001,四川产),山楂(批号为20021102,山东产),麦芽(批号为19112602,甘肃产),神曲(批号为20020702,甘肃产),南五味子(批号为19040603,广西产),均购自兰州安泰堂药业有限公司;大黄(批号190410,甘肃产),虎杖(批号为B909181-01,甘肃产),蒲公英(批号为190601,甘肃产),均购自兰州九州通医药有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:DIKMA Diamonsil® C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 µm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~34 min时93%B→71%B,34~50 min时71%B→65%B,50~60 min时65%B→0B);流速:0.9 mL/min,检测波长:254 nm;柱温:25 °C;进样量:10 µL。

2.2 溶液制备

单一对照品溶液:分别称取没食子酸对照品3.18 mg、绿原酸对照品2.96 mg、夏佛塔苷对照品2.13 mg、甘草苷对照品5.07 mg、柚皮苷对照品29.50 mg、新橙皮苷对照品49.64 mg、盐酸小檗碱对照品1.82 mg、甘草酸铵对照品0.51 mg,置不同25 mL棕色容量瓶中,用甲醇溶解并定容,制成质量浓度分别为没食子酸0.116 4 g/L、绿原酸0.114 4 g/L、夏佛塔苷0.081 5 g/L、

甘草苷 0.190 0 g/L、柚皮苷 1.099 8 g/L、新橙皮苷 1.977 7 g/L、盐酸小檗碱 0.063 1 g/L、甘草酸铵 0.019 0 的单一对照品溶液,4℃避光保存。

混合对照品溶液:分别取没食子酸、绿原酸、夏佛塔苷、甘草苷、柚皮苷、新橙皮苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵对照品 4.30, 1.45, 0.53, 1.35, 9.23, 9.65, 0.75, 0.30 mg,精密称定,置同一 25 mL 棕色容量瓶中,用 50% 甲醇溶解并定容,制成质量浓度分别为没食子酸 0.157 4 g/L、绿原酸 0.056 0 g/L、夏佛塔苷 0.020 7 g/L、甘草苷 0.050 6 g/L、柚皮苷 0.344 1 g/L、新橙皮苷 0.384 5 g/L、盐酸小檗碱 0.026 0 g/L、甘草酸铵 0.011 2 g/L 的混合对照品溶液,4℃避光保存。

供试品溶液:精密量取样品 5 mL,置 10 mL 容量瓶中,加甲醇定容,超声(功率为 250 W,频率为 50 kHz,下同)处理 10 min,放冷至室温,称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,1 000 r/min 离心 10 min,滤过,取续滤液,即得。

2.3 HPLC 指纹图谱研究

2.3.1 方法学考察

精密度试验:取 2.2 项下供试品溶液(S1)适量,按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,以柚皮苷(11 号峰)为参照峰,计算各特征峰的相对保留时间及相对峰面积。结果的 *RSD* 均小于 3.0%($n=6$),表明方法精密度良好。

稳定性试验:取 2.2 项下供试品溶液(S1)适量,分别于室温下放置 0,6,12,24,36,48 h 时按 2.1 项下色谱条件进样测定,以柚皮苷为参照峰,计算各特征峰的相对保留时间及相对峰面积。结果的 *RSD* 均小于 3.0%($n=6$),表明室温下供试品溶液在 48 h 内稳定。

重复性试验:取样品(S1)适量,精密称定,按 2.2 项下方法平行制备 6 份供试品溶液,分别进样分析,以柚皮苷为参照峰,计算各特征峰的相对保留时间及相对峰面积。结果的 *RSD* 均小于 3.0%($n=6$),表明方法重复性良好。

2.3.2 特征图谱建立及共有峰定位

取 21 批样品,按 2.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,将所得色谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”,以样品 S1 的 HPLC 图谱为参照,采用平均数法,设定时间窗宽度为 0.1 min,得 HPLC 叠加指纹图谱(图 1)及对照指纹图谱(图 2)。21 批样品的色谱图中共有 18 个共有峰,指认其中 8 个特征峰,分别为 1 号峰(没食子酸)、6 号峰(绿原酸)、8 号峰(夏佛塔苷)、9 号峰(甘草苷)、11 号峰(柚皮苷)、12 号峰(新橙皮苷)、15 号峰(盐酸小檗碱)、18 号峰(甘草酸铵)。21 批样品指纹图谱相似度均在 0.947~0.999(见表 1),表明各批次样品化学成分相似,制剂工艺稳定。

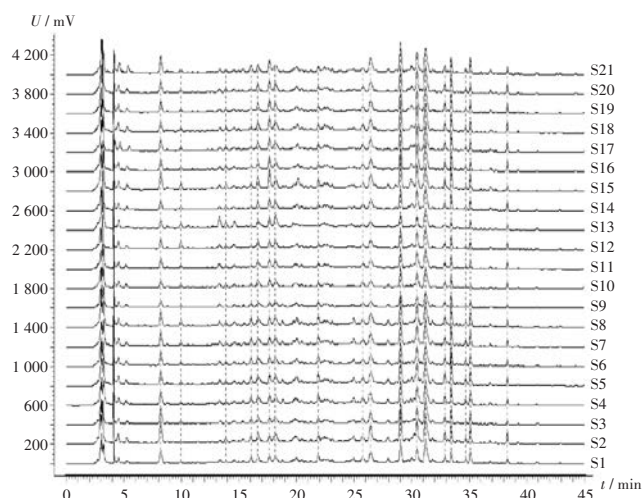


图 1 21 批金茵利胆口服液 HPLC 叠加指纹图谱

Fig. 1 HPLC superimposed fingerprints of 21 batches of Jinyin Lidan Oral Liquid

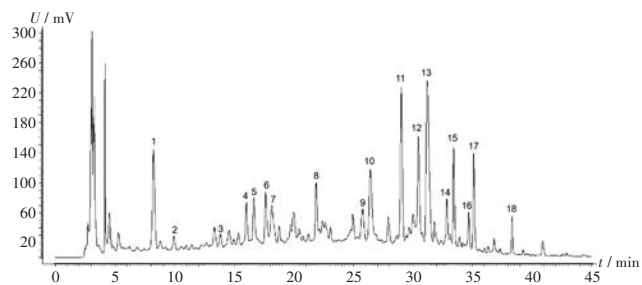


图 2 金茵利胆口服液对照指纹图谱

Fig. 2 Reference fingerprints of Jinyin Lidan Oral Liquid

2.4 主成分分析

采用 SPSS 19.0 统计学软件对样品进行主成分分析,发现前 3 个主成分(PC1, PC2, PC3)分别表征了原始数据的 27.289%, 22.502%, 15.182%, 累计 64.973% 的信息量,且均包含了 8 种化学成分组成信息。结果显示,盐酸小檗碱和甘草酸铵在 PC1 中得分较高,新橙皮苷在 PC2 中得分最高(0.810),夏佛塔苷和没食子酸在 PC3 中得分较高,说明这 5 种成分的含量在不同批次样品间有相对差异,提示在实际生产质控过程中需重点监测。主成分得分系数矩阵见表 2。

2.5 含量测定

2.5.1 方法学考察

系统适用性试验:精密量取 2.2 项下混合对照品溶液、供试品溶液各适量,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液色谱中,在与混合对照品溶液色谱相应位置有吸收峰。理论板数按没食子酸峰计应不低于 3 000,分离度均大于 1.5,基线分离良好。详见图 3。

线性关系及检测限、定量限考察:分别精密吸取 2.2 项下混合对照品溶液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 7.5 mL,置 10 mL 容量瓶中,加 50% 甲醇定容,制成系

表1 21批金茵利胆口服液指纹图谱相似度分析

Tab.1 Similarity analysis of fingerprints of 21 batches of Jinyin Lidan Oral Liquid

批号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21
S1	1.000	0.992	0.996	0.993	0.983	0.989	0.994	0.987	0.991	0.980	0.987	0.985	0.958	0.992	0.986	0.983	0.988	0.985	0.991	0.991	0.993
S2	0.992	1.000	0.992	0.993	0.984	0.992	0.991	0.990	0.988	0.975	0.987	0.976	0.959	0.984	0.981	0.975	0.977	0.973	0.984	0.984	0.989
S3	0.996	0.992	1.000	0.991	0.983	0.991	0.994	0.987	0.994	0.984	0.989	0.987	0.962	0.989	0.981	0.983	0.985	0.983	0.989	0.989	0.990
S4	0.993	0.993	0.991	1.000	0.995	0.997	0.998	0.994	0.994	0.980	0.987	0.979	0.960	0.991	0.988	0.981	0.983	0.979	0.990	0.989	0.989
S5	0.983	0.984	0.983	0.995	1.000	0.996	0.994	0.988	0.992	0.975	0.982	0.971	0.947	0.985	0.985	0.978	0.977	0.971	0.987	0.985	0.979
S6	0.989	0.992	0.991	0.997	0.996	1.000	0.997	0.992	0.996	0.985	0.991	0.982	0.963	0.990	0.989	0.984	0.983	0.98	0.991	0.991	0.988
S7	0.994	0.991	0.994	0.998	0.994	0.997	1.000	0.996	0.995	0.983	0.990	0.987	0.960	0.992	0.989	0.986	0.987	0.983	0.992	0.992	0.988
S8	0.987	0.990	0.987	0.994	0.988	0.992	0.996	1.000	0.986	0.973	0.986	0.982	0.954	0.987	0.985	0.978	0.979	0.975	0.986	0.985	0.985
S9	0.991	0.988	0.994	0.994	0.992	0.996	0.995	0.986	1.000	0.992	0.993	0.987	0.966	0.994	0.985	0.991	0.989	0.987	0.995	0.995	0.986
S10	0.980	0.975	0.984	0.980	0.975	0.985	0.983	0.973	0.992	1.000	0.994	0.989	0.979	0.992	0.979	0.993	0.989	0.992	0.992	0.993	0.983
S11	0.987	0.987	0.989	0.987	0.982	0.991	0.99	0.986	0.993	0.994	1.000	0.991	0.976	0.995	0.985	0.995	0.991	0.992	0.996	0.996	0.990
S12	0.985	0.976	0.987	0.979	0.971	0.982	0.987	0.982	0.987	0.989	0.991	1.000	0.977	0.991	0.983	0.989	0.990	0.988	0.990	0.993	0.988
S13	0.958	0.959	0.962	0.960	0.947	0.963	0.960	0.954	0.966	0.979	0.976	0.977	1.000	0.971	0.968	0.964	0.963	0.967	0.968	0.971	0.973
S14	0.992	0.984	0.989	0.991	0.985	0.990	0.992	0.987	0.994	0.992	0.995	0.991	0.971	1.000	0.99	0.996	0.997	0.996	0.999	0.998	0.991
S15	0.986	0.981	0.981	0.988	0.985	0.989	0.989	0.985	0.985	0.979	0.985	0.983	0.968	0.990	1.000	0.982	0.987	0.983	0.991	0.992	0.992
S16	0.983	0.975	0.983	0.981	0.978	0.984	0.986	0.978	0.991	0.993	0.995	0.989	0.964	0.996	0.982	1.000	0.998	0.996	0.997	0.996	0.981
S17	0.988	0.977	0.985	0.983	0.977	0.983	0.987	0.979	0.989	0.989	0.991	0.990	0.963	0.997	0.987	0.998	1.000	0.998	0.997	0.997	0.985
S18	0.985	0.973	0.983	0.979	0.971	0.980	0.983	0.975	0.987	0.992	0.992	0.988	0.967	0.996	0.983	0.996	0.998	1.000	0.995	0.995	0.984
S19	0.991	0.984	0.989	0.990	0.987	0.991	0.992	0.986	0.995	0.992	0.996	0.990	0.968	0.999	0.991	0.997	0.997	0.995	1.000	0.999	0.990
S20	0.991	0.984	0.989	0.989	0.985	0.991	0.992	0.985	0.995	0.993	0.996	0.993	0.971	0.998	0.992	0.996	0.997	0.995	0.999	1.000	0.992
S21	0.993	0.989	0.990	0.989	0.979	0.988	0.988	0.985	0.986	0.983	0.990	0.988	0.973	0.991	0.992	0.981	0.985	0.984	0.99	0.992	1.000

表2 金茵利胆口服液主成分得分系数矩阵

Tab.2 Rotated component matrix of principal components of Jinyin Lidan Oral Liquid

主成分	没食子酸	绿原酸	夏佛塔苷	甘草苷	柚皮苷	新橙皮苷	盐酸小檗碱	甘草酸铵
PC1	0.265	-0.273	-0.150	0.004	0.107	0.481	0.839	0.836
PC2	0.243	0.584	0.152	0.257	-0.802	0.810	-0.010	-0.028
PC3	0.661	0.446	0.740	-0.535	0.088	0.144	0.197	-0.242

列混合对照品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,以进样量($X, \mu\text{g}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。以信噪比(S/N)3:1和10:1时的进样量记作检测限和定量限。结果见表3。

精密度试验:精密吸取2.2项下混合对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录色谱图。结果没食子酸、绿原酸、夏佛塔苷、甘草苷、柚皮苷、新橙皮苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵峰面积的 RSD 分别为

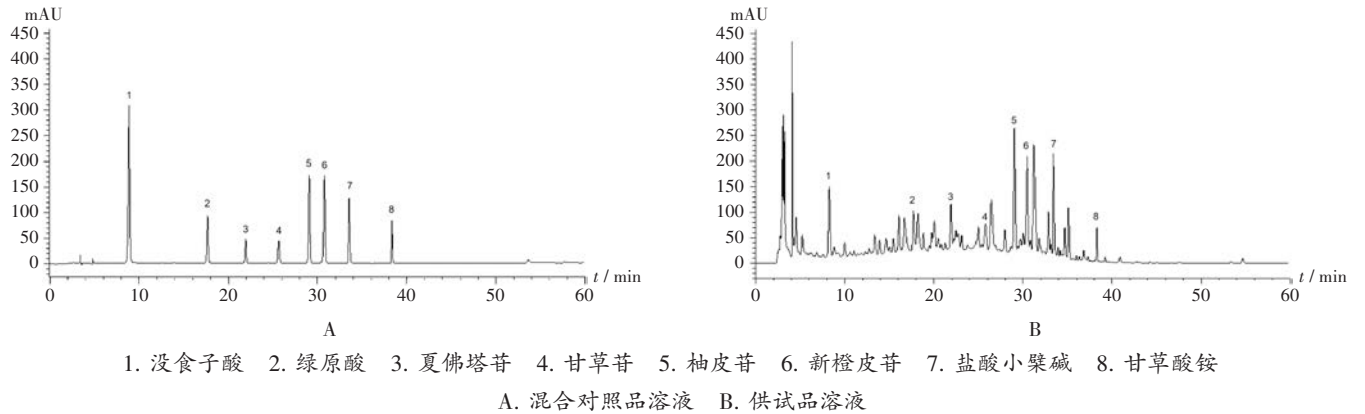


图3 高效液相色谱图

1. Galic acid 2. Chlorogenic acid 3. Schaftoside 4. Liquiritin 5. Naringin 6. Neohesperidin 7. Berberine hydrochloride 8. Ammonium glycyrrhizinate
A. Mixed reference solution B. Test solution

Fig.3 HPLC chromatograms

表3 8个成分的线性关系、线性范围和检测限、定量限($n=6$)
Tab.3 Linear relationship, linear range, LOD and LOQ of eight components ($n=6$)

成分	回归方程	r	线性范围(μg)	检测限(μg)	定量限(μg)
没食子酸	$Y_1=1.832\times10^3X_1+93\,794.024\,4$	0.999 7	0.079~3.148	0.018	0.053
绿原酸	$Y_2=1.158\times10^3X_2+6\,587.162\,7$	0.999 7	0.056~1.121	0.015	0.045
夏佛塔苷	$Y_3=1.279\times10^3X_3+6\,111.970\,4$	0.999 6	0.021~0.402	0.007	0.020
甘草苷	$Y_4=6.270\times10^2X_4+9\,191.166\,2$	0.999 7	0.051~1.012	0.017	0.051
柚皮苷	$Y_5=3.508\times10^3X_5+45\,803.424\,2$	0.999 7	0.344~6.878	0.046	0.138
新橙皮苷	$Y_6=3.121\times10^3X_6+46\,580.578\,2$	0.999 7	0.384~7.689	0.051	0.154
盐酸小檗碱	$Y_7=3.058\times10^3X_7+46\,450.126\,7$	0.999 5	0.026~0.520	0.056	0.168
甘草酸铵	$Y_8=2.597\times10^3X_8+6\,231.241\,7$	0.999 6	0.011~0.223	0.003	0.010

0.55%, 1.31%, 0.86%, 0.81%, 0.76%, 1.31%, 0.78%, 0.81% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(S21),按2.2项下方法制备供试品溶液,分别于室温下放置0,6,12,24,48 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果没食子酸、绿原酸、夏佛塔苷、甘草苷、柚皮苷、新橙皮苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵峰面积的RSD分别为0.55%, 1.10%, 0.68%,

1.54%, 1.33%, 2.68%, 1.82%, 1.39% ($n=5$), 表明室温下供试品溶液放置48 h内稳定。

重复性试验:取样品(S21),按2.1项下方法平行制备供试品溶液6份,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算样品含量。结果没食子酸、绿原酸、夏佛塔苷、甘草苷、柚皮苷、新橙皮苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵含量的RSD分别为1.46%, 1.68%, 1.85%, 1.97%, 1.96%, 1.92%, 2.76%, 0.17% ($n=6$), 表明方法重复性良好。

加样回收试验:精密量取已知含量的供试品溶液(S21)适量,分别加入2.2项下单一对照品溶液,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算加样回收率。结果见表4。

2.5.2 含量测定

取8批样品,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算各成分的含量。结果见表5。

3 讨论

3.1 测定指标确定

金茵利胆口服液方中君药茵陈含绿原酸、异绿原

表4 加样回收试验结果($n=6$)

Tab.4 Results of the recovery test($n=6$)

成分	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)	成分	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
没食子酸	0.308	0.291	0.602	101.03	98.57	2.03	柚皮苷	2.778	2.749	5.539	100.44	99.80	0.63
	0.308	0.291	0.587	95.88				2.778	2.749	5.501	99.05		
	0.308	0.291	0.601	100.69				2.778	2.749	5.515	99.56		
	0.308	0.291	0.593	97.94				2.778	2.749	5.546	100.69		
	0.308	0.291	0.591	97.25				2.778	2.749	5.517	99.64		
	0.308	0.291	0.595	98.63				2.778	2.749	5.511	99.42		
绿原酸	0.267	0.286	0.565	104.20	101.28	2.17	新橙皮苷	4.915	4.944	9.817	99.15	99.48	1.45
	0.267	0.286	0.552	99.65				4.915	4.944	9.851	99.84		
	0.267	0.286	0.549	98.60				4.915	4.944	9.826	99.33		
	0.267	0.286	0.562	103.15				4.915	4.944	9.963	102.10		
	0.267	0.286	0.559	102.10				4.915	4.944	9.762	98.04		
	0.267	0.286	0.553	100.00				4.915	4.944	9.780	98.40		
夏佛塔苷	0.189	0.204	0.385	96.08	99.59	2.56	盐酸小檗碱	0.161	0.158	0.309	93.67	96.41	2.30
	0.189	0.204	0.387	97.06				0.161	0.158	0.317	98.73		
	0.189	0.204	0.398	102.45				0.161	0.158	0.315	97.47		
	0.189	0.204	0.395	100.98				0.161	0.158	0.312	95.57		
	0.189	0.204	0.392	99.51				0.161	0.158	0.31	94.30		
	0.189	0.204	0.396	101.47				0.161	0.158	0.317	98.73		
甘草苷	0.492	0.475	0.942	94.74	97.33	2.36	甘草酸铵	0.049	0.047	0.099	106.38	102.48	3.06
	0.492	0.475	0.962	98.95				0.049	0.047	0.098	104.26		
	0.492	0.475	0.950	96.42				0.049	0.047	0.096	100.00		
	0.492	0.475	0.956	97.68				0.049	0.047	0.098	104.26		
	0.492	0.475	0.971	100.84				0.049	0.047	0.095	97.87		
	0.492	0.475	0.945	95.37				0.049	0.047	0.097	102.13		

表5 金茵利胆口服液8个成分含量测定结果(g/L)

Tab. 5 Results of content determination of eight components in Jinyin Lidan Oral Liquid (g/L)

批号	没食子酸	绿原酸	夏佛塔昔	甘草昔	柚皮昔	新橙皮昔	盐酸小檗碱	甘草酸铵
20191128	0.121 1	0.164 4	0.066 4	0.242 3	1.617 4	1.629 3	0.075 5	0.025 4
20191206	0.129 1	0.079 2	0.092 4	0.209 5	1.489 6	2.344 1	0.077 2	0.029 8
20191213	0.163 1	0.093 4	0.119 9	0.210 3	1.504 1	1.241 6	0.099 6	0.035 1
20191220	0.174 0	0.076 0	0.112 1	0.199 1	1.456 5	1.177 7	0.111 2	0.036 1
20200401	0.125 2	0.186 5	0.081 0	0.161 2	1.440 3	1.768 2	0.108 6	0.030 2
20200408	0.094 6	0.119 1	0.079 6	0.158 1	1.101 8	1.240 0	0.093 5	0.023 0
20200415	0.159 0	0.128 9	0.108 3	0.212 2	1.403 3	1.873 2	0.089 3	0.032 5
20200429	0.123 0	0.106 6	0.075 6	0.196 9	1.111 1	1.965 9	0.064 4	0.019 4
$\bar{X}$	0.136 1	0.119 3	0.091 9	0.198 7	1.390 5	1.655 0	0.089 9	0.028 9

酸、咖啡酸等有机酸^[7],广金钱草含皂昔、黄酮昔、生物碱、多糖等成分^[8-9],可清热除湿、利胆退黄。黄连含小檗碱等异喹啉生物碱类,蒲公英含甾醇、有机酸等,虎杖、大黄主含蒽醌类,共为臣药,可利胆排石、通腑泻热。木香、枳壳、厚朴、桃仁等为佐药,可疏肝行气、化郁止痛、软坚散结;五味子、甘草等为使药,可健脾和胃、调和诸药^[10]。根据2020年版《中国药典(一部)》及相关文献报道^[11-14],对方中各药材有效成分进行峰归属和含量测定研究^[15],发现厚朴酚、和厚朴酚、丹皮酚、苦杏仁昔、甘草次酸、枸橼酸等在制剂中无法检出,大黄酸、大黄素等蒽醌类成分在煎煮过程中易发生变化,最终确定以没食子酸、绿原酸等8种成分为检测指标。

3.2 流动相和检测波长选择

预试验中考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸、乙腈-磷酸等流动相对检测结果的影响,结果发现,以乙腈-0.1%磷酸水体系为流动相、流速为0.9 mL/min时,色谱峰峰形良好,分离度高,无杂质干扰。全波长扫描发现,没食子酸在215,271 nm波长处吸收较强,绿原酸在218,326 nm波长,夏佛塔昔在271,336 nm波长处吸收较强,柚皮昔、新橙皮昔在283 nm波长处有最大吸收峰,盐酸小檗碱在228,264,345 nm波长处有较大吸收峰,甘草昔最大吸收波长在216,276 nm处,甘草酸铵最大吸收波长在254 nm处。设定检测波长210,254,326 nm,对比各峰,发现210 nm波长处存在强吸收杂质峰,326 nm波长处没食子酸、甘草昔基本无吸收,254 nm波长处色谱图基线平稳,各成分在考察范围内线性关系均良好,故选择检测波长为254 nm。

3.3 主成分分析评价

金茵利胆口服液处方含有药材种类多,化学成分复杂,极性差异较大,会对实际质控检测待测物质造成干扰。主成分分析作为一种化学计量学方法,在处理复

杂数据降维后代替原始指标,能较充分地反映原始数据信息的特性^[16]。本研究在构建金茵利胆口服液指纹图谱的基础上,应用主成分分析法对21批样品中8种成分进行评价,发现盐酸小檗碱、甘草酸铵、新橙皮昔、夏佛塔昔和没食子酸的含量在不同批次样本间存在一定差异。

3.4 方法评价

本研究建立的金茵利胆口服液指纹图谱,及其其中8种成分含量测定方法,简便快速,稳定性、重复性均较好,准确度较高,可用于该制剂的质量评价。

参考文献

[1] 李彩东,王 信,潘新波,等. 金茵利胆口服液质量标准研究[J]. 中国中医药信息杂志,2015,22(6):87-90.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2020:24,46,316.

[3] 相 婷,霍晓奎,丛海建,等. HPLC法同时测定双花百合片中绿原酸、表小檗碱、巴马汀、小檗碱的含量[J]. 中华中医药杂志,2017,32(4):1775-1778.

[4] 姜玉霞,李向阳,李振国. HPLC同时测定清肝利胆口服液中7种成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(8):128-132.

[5] 张玉珊,刘谢英,姚新成,等. 高效液相色谱法同时测定茵栀黄颗粒中14个化学成分[J]. 药物分析杂志,2019,39(7):1229-1238.

[6] 杨丽宏. 黄连解毒汤中13种活性成分的HPLC检测及其有效部位的筛选[J]. 中草药,2019,50(16):3794-3801.

[7] 刘玉萍,邱小玉,刘 烨,等. 茵陈的药理作用研究进展[J]. 中草药,2019,50(9):2235-2241.

[8] 陈铁柱,林 娟,黄 清,等. 不同来源和部位的广金钱草中化学成分研究[J]. 中药材,2018,41(5):1133-1137.

[9] 马 杰,李瑞莲,王湘波. HPLC法测定广金钱草茎、叶中4种黄酮类成分的含量[J]. 中国药师,2019,22(7):1354-1356.

[10] 侯 嘉,郭鸿儒,杨扶德,等. 多指标成分结合化学计量学综合评价甘肃产甘草的质量[J]. 中草药,2019,50(16):3923-3929.

[11] 李 欢,黑小斌,李依民,等. HPLC分析不同年限药用大黄不同部位中10种成分的积累特征[J]. 中草药,2019,50(7):1690-1697.

[12] 闫红斌,王正俐,刘雅琳,等. UPLC同时测定枳壳厚朴8种成分含量[J]. 时珍国医国药,2019,30(9):2090-2092.

[13] 郑艳萍,朱红军,秦昆明,等. 川产建曲中5种成分含量的测定及HPLC指纹图谱的初步建立[J]. 中药材,2018,41(5):1138-1141.

[14] 肖何芳. 抗炎退热片高效液相色谱指纹图谱的建立及其7种成分含量测定[J]. 中国药业,2020,29(21):62-66.

[15] 王 信,冯翠娟,王艳红,等. 金茵利胆口服液指纹图谱及峰归属研究[J]. 中国药师,2021,24(2):269-272.

[16] 郭 龙,焦 倩,张 丹,等. 基于指纹图谱和多组分含量测定的艾叶药材质量控制研究[J]. 中国中药杂志,2018,43(5):977-984.

(收稿日期:2021-03-31;修回日期:2021-08-13)