doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2021.16.023

止得咳颗粒中连翘酯苷A成分鉴定及含量测定*

梁 洁[1,2,3],祁金丽[1],周昱杉[1],胡 珏[1],陈辉华[1],孙正伊[4],朱 华[1],赵立春[1,2,3△]

(1.广西中医药大学药学院,广西 南宁 530200; 2.广西中医药大学广西壮瑶药工程技术研究中心,广西 南宁 530200; 3.广西中医药大学广西优势中成药与民族药开发工程技术研究中心,广西 南宁 530200; 4.广西中医药大学附属瑞康医院,广西 南宁 530011)

摘要:目的 建立止得咳颗粒成分的鉴定方法及测定相应成分含量的高效液相色谱(HPLC)法。**方法** 采用超高效液相色谱－四极杆飞行时间串联质谱(UPLC－Q－TOF/MS)法,在负离子模式下采集数据,对止得咳颗粒的成分进行定性鉴别。采用高效液相色谱法测定鉴定出的成分含量,色谱柱为Phenomenex Kinetex XB－C_{18}柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇－0.2%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为330 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μL。**结果** 根据质谱数据鉴定出连翘酯苷A成分。连翘酯苷A质量浓度在0.023 7～0.236 8 mg/mL范围内与峰面积线性关系良好(r=0.999 8,n=6);精密度、稳定性、重复性试验的*RSD*均小于3.0%(n=6);平均加样回收率为99.14%,*RSD*为2.33%(n=9)。**结论** 所建立的方法操作简便,结果准确,重复性好,可用于鉴定止得咳颗粒的成分并测定其相应成分的含量。

关键词:超高效液相色谱－四极杆飞行时间串联质谱法;止得咳颗粒;连翘酯苷A;高效液相色谱法;含量测定

中图分类号:R932;R284.1;R286.0 **文献标志码:**A **文章编号:**1006－4931(2021)16－0088－04

Identification and Content Determination of Forsythiaside A in Zhideke Granules

LIANG Jie[1,2,3], *QI Jinli*[1], *ZHOU Yushan*[1], *HU Jue*[1], *CHEN Huihua*[1], *SUN Zhengyi*[4], *ZHU Hua*[1], *ZHAO Lichun*[1,2,3]

(*1. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, China 530200; 2. Guangxi Zhuang Yao Medicine Center of Engineering and Technology, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, China 530200; 3. Guangxi Superior Chinese Patent Medicine and National Medicine Development Engineering Technology Center, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, China 530200; 4. Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, China 530011*)

Abstract: Objective To identify the components of Zhideke Granules and to establish a high－performance liquid chromatography (HPLC) method for the content determination of the corresponding components. **Methods** Ultra high－performance liquid chromatography quadrupole－time of flight tandem mass spectrometry(UPLC－Q－TOF/MS) was used to collect data in negative ion mode to qualitatively analyze the components in Zhideke Granules. HPLC method was adopted to determine the content of identified components in

*基金项目:广西创新驱动发展专项资金项目[桂科AA17202046];广西科技计划项目[桂科AD20238058];广西高等学校千名中青年骨干教师培育计划[桂教人〔2019〕5号];广西一流学科建设项目[桂教科研〔2018〕12号];广西高等学校高水平创新团队及卓越学者计划项目[桂教师范〔2019〕52号];广西壮族自治区特聘专家项目[桂人才通字〔2019〕13号]。

第一作者:梁洁,女,博士,教授,研究方向为中药药效物质基础与质量控制,(电子信箱)liangjie1101@126.com。

△通信作者:赵立春,男,博士,研究员,研究方向为中药民族药化学成分及药理活性,(电子信箱)hyzlc@126.com。

中选择80 ℃、30 min作为最佳顶空平衡调节。

参考文献

[1] 周海钧.药品注册的国际技术要求[M].北京:人民卫生出版社,2001:343.

[2] 方秋雪,刁兴利,万谦宏,等.顶空气相色谱法测定瑞替加滨原料药中残留溶剂[J].分析测试学报,2013,32(3):308－313.

[3] 杨 园,谷亦平.顶空气相色谱法测定盐酸右美托咪定中残留溶剂含量[J].医药导报,2021,40(7):927－930.

[4] 邹 江,沈丹丹,王 东,等.气相色谱法同时测定甲磺酸伊马替尼原料药中7种有机溶剂残留量[J].中国药业,2021,30(12):59－62.

[5] 张继东,卢 江,张世应,等.顶空气相色谱法检测他达拉非原料药中4种溶剂残留量[J].中国药业,2020,29(9):125－127.

[6] 朱跃芳,姚 亮,陈珉珉,等.抗血栓药物阿哌沙班中6种残留溶剂测定[J].中国药事,2016,30(8):796－800.

[7] 温耀明,李国琴,范建辉,等.顶空气相色谱法测定盐酸普拉克索中残留溶剂[J].中国药事,2014,28(9):1001－1004.

[8] 郭 毅,赵 静,李振国,等.顶空气相色谱法测定利福霉素钠原料中残留溶剂[J].中国药事,2013,27(8):879－883.

[9] 韩 彬,高燕霞,庞文哲,等.气相色谱法同时测定卡莫司汀原料中3种有机溶剂残留量[J].中国药业,2019,28(3):29－31.

[10] 周 颖,魏宁漪,吴建敏.氯雷他定原料中残留溶剂检测方法的研究[J].中国药事,2007,21(9):759－760.

[11] 李伟强,李 继,王荪璇,等.顶空毛细管气相色谱法测定硫酸特布他林有机溶剂残留[J].中国药业,2017,26(18):22－24.

[12] 张 微,马长沙,黄晓光,等.气相色谱法测定达比加群酯中10种溶剂的残留[J].中国药事,2017,31(3):263－268.

[13] 张李冰,马明欣,姚 兰,等.顶空气相色谱法测定利福霉素钠中残留的有机溶剂[J].中国药事,2013,27(1):41－44.

[14] BERTHOD A, RUIZ－ANGEL MJ, CARDA－BROCH S. Ionic liquids in separation techniques[J]. J Chromatogr A, 2008, 11(84):6－18.

(收稿日期:2020－12－23;修回日期:2021－03－20)

Zhideke Granules, the chromatographic column was Phenomenex Kinetex XB－C_{18} column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol－0.2% phosphoric acid solution(gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 330 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** Forsythrine A was identified according to the mass spectrum data. The linear range of forsythiaside A was 0.023 7－0.236 8 mg/mL(r=0.999 8, n=6). The *RSD*s of precision, stability and repeatability tests were less than 3.0% (n=6). The average recovery of forsythiaside A was 99.14% with *RSD* of 2.33% (n=9). **Conclusion** The method is simple, accurate and reproducible, which can be used for the identification and content determination of corresponding components in Zhideke Granules.

Key words: UPLC－Q－TOF/MS; Zhideke Granules; forsythiaside A; HPLC; content determination

止得咳颗粒由龙胆叶、射干、桔梗、白前、黄芩、青天葵、枇杷叶、薄荷、荆芥、柴胡等组方[1]，具有清热解毒、止咳化痰、利咽功效[2]，可用于治疗上呼吸道感染[3]、头痛、急慢性支气管炎[4]、感冒咳嗽。方中龙胆叶、射干同为君药，射干中次野鸢尾黄素的含量测定[2]及龙胆叶中山柰酚－3－*O*－龙胆二糖苷成分的含量测定[5-7]均已有报道，且后者作为龙胆叶药材的指标成分收载于2020 年版《中国药典(一部)》[8]。由于山柰酚－3－*O*－龙胆二糖苷在缺龙胆叶阴性样品中存在干扰，故本研究中采用超高效液相色谱－四极杆飞行时间串联质谱(UPLC－Q－TOF/MS)法对止得咳颗粒进行成分鉴定[9]，并结合文献[10－14]及对照品验证，建立了测定制剂中连翘酯苷 A 含量的高效液相色谱(HPLC)法[15]，为完善制剂质量标准提供依据。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

UPLC－Q－TOF/MS 仪，包括二元泵、自动进样器、柱温箱、PDA 检测器、电喷雾离子源(ESI)、XEVO G2－S 型质谱仪(美国 Waters 公司)；1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)；KQ－100DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)；AFZ－1001－U 型艾科浦超纯水系统(重庆颐洋企业发展有限公司)；XS104 型分析天平(梅特勒－托利多仪器<上海>有限公司，精度为十万分之一)；TGL－16G 型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 试药

止得咳颗粒(广西中医药大学附属瑞康医院，批号分别为 20190701，20190702，20190703，规格为每袋 15 g)；缺龙胆叶的阴性样品；连翘酯苷 A 对照品(中国食品药品检定研究院，批号为 111810－201707，含量为 97.2%)；甲醇、甲酸、磷酸均为色谱纯，其余试剂均为分析纯，水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

2.1.1 试验条件

色谱条件：色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T3 C_{18} 柱(100 mm×2.1 mm，1.8 μm)；流动相为甲醇(A)－0.1%甲酸溶液(B)，梯度洗脱(0～1 min 时 10% A→30% A，1～2 min 时 30% A→35% A，2～2.5 min 时 35% A→40% A，2.5～5 min 时 40% A→43% A，5～7 min 时 43% A→60% A，7～9 min 时 60% A→90% A，9～12 min 时 90%→95% A，12～12.1 min 时 95% A→10% A，12.1～14 min 时 10% A)；流速为 0.4 mL/min；柱温为 40 ℃；进样量为 0.5 μL。

质谱条件：离子扫描方式为 ESI^-；毛细管电压为 2.8 kV；锥孔电压为 40 V；离子源温度为 100 ℃；溶剂挥散温度为 400 ℃；脱溶气流量为 700 L/h；扫描范围为 100～1 500 Da。

2.1.2 溶液制备

称取连翘酯苷 A 11.84 mg，精密称定，置 5 mL 容量瓶，加甲醇溶解并定容，摇匀，即得质量浓度为 2.368 mg/mL 的对照品溶液。取样品粉末约 5.0 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 15 mL 甲醇，称定质量，超声(功率为 250 W，频率为 50 kHz)处理 30 min，放冷，再称定质量，用甲醇补足减失的质量，13 000 r/min 离心 10 min，取上清液，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，即得供试品溶液。按止得咳颗粒处方和工艺制备缺龙胆叶的阴性样品，按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.1.3 化学成分分析

取 2.1.2 项下供试品溶液适量，按 2.1.1 项下试验条件进样测定，记录色谱图，详见图 1。结果所测得的精确分子量与理论分子量比较，误差 $<3\times10^{-6}$，表明检测结果准确。一级质谱图(图 2)中可见负离子 m/z 为 623.199 2$[M-H]^-$，精准分子式为 $C_{29}H_{36}O_{15}$，表明相对分子质量为 624；二级质谱图(图 3)中可见碎片离子峰 m/z 623.194 1，461.165 6，179.032 4，161.023 5，135.043 3，113.023 3。根据质谱数据，并结合文献[9－10]，推测该成分是连翘酯苷 A。

2.2 定量分析

2.2.1 色谱条件

色谱柱：Phenomenex Kinetex XB－C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)；流动相：甲醇(A)－0.2%磷酸溶液(B)，梯度洗脱(0～5 min 时 35% A→40% A，5～15 min 时

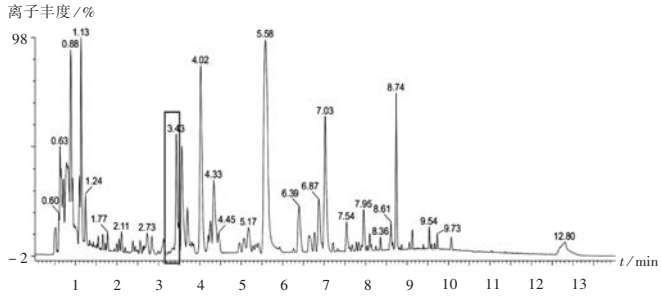


图1 UPLC－Q－TOF/MS ESI⁻模式下止得咳颗粒的基峰离子流色谱图

Fig. 1 Base－peak ion flow chromatogram of Zhideke Granules in UPLC－Q－TOF/MS ESI⁻ mode

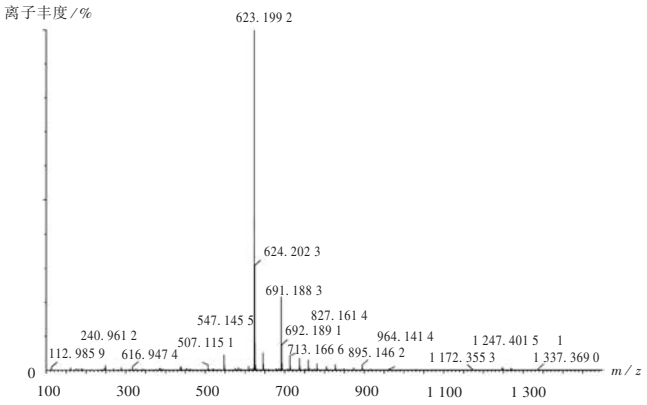


图2 一级质谱图

Fig. 2 Primary mass spectrum

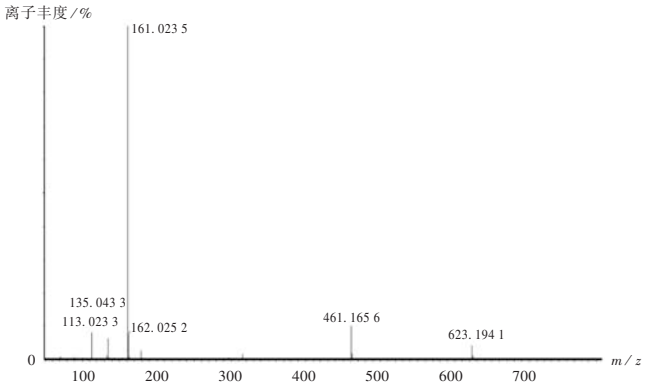


图3 二级质谱图

Fig. 3 Secondary mass spectrum

40% A→42% A，15～20 min时42% A，20～30 min，42% A→60% A）；流速：1.0 mL/min；检测波长：330 nm；柱温：30 ℃；进样量：10 μL。

2.2.2 *方法学考察*

专属性试验：取2.1.2项下3种溶液各适量，按2.2.1项下色谱条件进样测定，记录色谱图，详见图4。阴性对照品溶液色谱图中，在与对照品溶液色谱相同保留时间处无干扰峰，表明专属性良好。

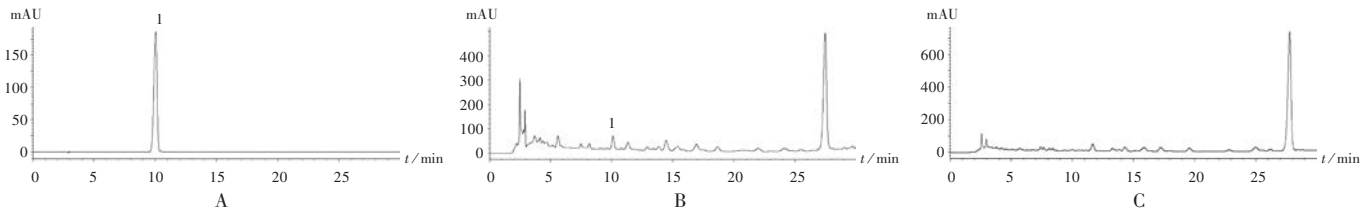
线性关系考察：分别精密量取2.1.2项下对照品溶液0.1，0.2，0.4，0.6，0.8，1.0 mL，置10 mL容量瓶中，加甲醇定容，摇匀，制成系列对照品溶液。精密量取10 μL，按2.2.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积。以连翘酯苷A质量浓度（X，mg/mL）为横坐标、峰面积（Y）为纵坐标进行线性回归，得回归方程 $Y = 18\,523.525\,1X - 56.976\,6$（$r = 0.999\,8$，$n = 6$）。结果表明，连翘酯苷A质量浓度在0.023 7～0.236 8 mg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

检测限和定量限考察：分别精密量取2.1.2项下对照品溶液适量，倍比稀释，并按2.2.1项下色谱条件进样测定，以信噪比（S/N）3∶1、10∶1时分别计算检测限和定量限。结果连翘酯苷A的检测限和定量限分别为0.592 μg/mL，1.972 μg/mL。

精密度试验：取2.1.2项下对照品溶液适量，按2.2.1项下色谱条件连续进样测定6次，记录峰面积。结果连翘酯苷A峰面积的 *RSD* 为0.58%（$n = 6$），表明仪器精密度良好。

稳定性试验：取样品（批号为20190703）适量，按2.1.2项下方法制备供试品溶液，分别于室温下放置0，2，4，8，16，24 h时按2.2.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果连翘酯苷A峰面积的 *RSD* 为2.27%（$n = 6$），表明供试品溶液在室温放置24 h内基本稳定。

重复性试验：精密称取样品（批号为20190703）适量，共6份，每份5.0 g，按2.1.2项下方法制备供试品



1. 连翘酯苷A

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图4 高效液相色谱图

1. forsythiaside A

A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 4 HPLC chromatograms

溶液，再按 2.2.1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积并计算含量。结果连翘酯苷 A 平均含量为 0.176 3 mg/g，*RSD* 为 1.61%（$n=6$），表明方法重复性良好。

加样回收试验：取已知含量的样品（批号为 20190703）适量，共 9 份，分别加入低、中、高质量浓度的连翘酯苷 A 对照品溶液，按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液，再按 2.2.1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积，并计算回收率。结果见表 1。

表 1 加样回收试验结果（$n=9$）

Tab. 1 Results of the recovery test（$n=9$）

取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$(%)	*RSD*(%)
2.500 3	0.438 1	0.211	0.641 6	96.45		
2.502 1	0.438 4	0.211	0.647 8	99.24		
2.501 4	0.438 2	0.211	0.643 9	97.49		
2.509 7	0.439 7	0.422	0.877 3	103.70		
2.507 3	0.439 3	0.422	0.865 7	101.05	99.14	2.33
2.509 9	0.439 7	0.422	0.849 3	97.06		
2.501 3	0.438 3	0.633	1.065 4	99.07		
2.503 8	0.438 7	0.633	1.074 6	100.46		
2.504 5	0.438 8	0.633	1.057 3	97.71		

2.2.3 样品含量测定

取 3 批样品各适量，分别按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液，再按 2.2.1 项下色谱条件平行进样测定 3 次，记录峰面积，并计算含量。结果批号为 20190701，20190702，20190703 的样品中连翘酯苷 A 含量分别为 0.194 9，0.198 1，0.178 2 mg/g，平均 0.190 4 mg/g（*RSD* = 4.58%）。

3 讨论

3.1 提取溶剂、提取时间和提取方式考察

预试验中考察了甲醇（100%，75%，50%）及乙醇（100%，75%，50%），以及超声和回流提取的效果，还考察了超声提取 15，30，60 min 的效果，结果以 100% 甲醇溶液提取效果最好，超声提取法优于回流提取法，提取 30 min 和 60 min 的含量差异不大。考虑到连翘酯苷 A 较不稳定，故选择提取时间为 30 min。

3.2 色谱条件选择

预试验中，为了确定测定连翘酯苷 A 含量的最优色谱条件，分别对流动相系统、柱温、流速等进行了考察。流动相体系考察了甲醇溶液、乙腈溶液、甲醇 - 0.2% 磷酸溶液及乙腈 - 0.2% 磷酸溶液，结果表明，后两者洗脱效果均优于前两者，最终选用稳定性最好的甲醇 - 0.2% 磷酸溶液；考察洗脱方式时发现，等度洗脱时始终不能将目标峰与其他峰分开，分离度低，故选择了梯度洗脱方式，并筛选出了最佳梯度洗脱程序；流速考察了 0.8，1.0，1.2 mL/min，最终采用了洗脱效果较好的 1.0 mL/min；柱温考察了 25，30，35 ℃，发现柱温对目标峰的整体影响较小，故选用分离度及峰形较好的 30 ℃；通过对连翘酯苷 A 对照品溶液的全波长扫描，发现其在 330 nm 波长处具有最佳吸收波长，故作为检测波长。

3.3 方法评价

本研究中对止得咳颗粒中目标峰进行 UPLC - Q - TOF/MS 定性鉴别，判断该成分为连翘酯苷 A，并采用 HPLC 法测定了止得咳颗粒中连翘酯苷 A 的含量，所建立的方法简便，结果准确，重复性好，专属性强，可用于测定止得咳颗粒中连翘酯苷 A 的含量。

参考文献

[1] 周昱杉，梁 洁，黄光强，等. 基于化学模式识别方法分析止得咳颗粒的抗炎谱效关系[J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26(22)：156 - 163.

[2] 黄 敏，黄国东，韦瑀龙，等. 止得咳颗粒质量标准的研究[J]. 中国医药导报，2018，15(30)：106 - 110.

[3] 丘 琴，刘玉雯，甄汉深，等. 龙利叶抗炎活性部位筛选及其作用机制的研究[J]. 中华中医药学刊，2020，38(4)：37 - 42.

[4] 辛 静，李丽丽，凌爱思. 止得咳冲剂治疗支气管哮喘急性发作期的临床观察[J]. 广西中医药大学学报，2013，16(1)：35 - 36.

[5] 李 蒙，黄晓雷，王 璐，等. 龙脷叶化学成分研究[J]. 中药材，2019，42(7)：1541 - 1545.

[6] 李 蒙. 龙脷叶的化学成分研究[D]. 苏州：苏州大学，2019.

[7] 黄 慧，左 婷. 龙脷叶配方颗粒的制备及质量分析[J]. 中国当代医药，2017，24(15)：90 - 92.

[8] 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，2020：100.

[9] 陈志谦，符旭东，钟昌平. 高分辨液质联用法测定奥司他韦原料药中有关物质[J]. 中国药业，2020，29(17)：86 - 89.

[10] 胡 青，于 泓，冯 睿，等. UHPLC/QTOF 法下连翘提取物 HPLC 指纹图谱的建立[J]. 中成药，2018，40(3)：749 - 753.

[11] 张振华，钟苹苹，徐 英. 基于 HPLC - ESI - MS/MS 技术分析痰热清胶囊和痰热清注射液化学成分的差异[J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23(12)：44 - 51.

[12] 曾建勋，马 斌，李瑞明，等. 高效液相色谱飞行时间质谱分析连翘水煎液的有效成分[J]. 中药材，2013，36(4)：581 - 583.

[13] 张晨曦，刘素香，赵艳敏，等. 基于液质联用技术的连翘化学成分分析[J]. 中草药，2016，47(12)：2053 - 2060.

[14] 任卫琼，许海玉，王松松，等. 连翘酯苷 A 和连翘苷 LTQ Orbitrap MS 裂解途径[J]. 中国实验方剂学杂志，2015，21(12)：65 - 68.

[15] 姬雪礼，李文烈，郑晓杰，等. 高效液相色谱法同时测定连翘叶中连翘酯苷 A 和连翘苷含量[J]. 中国药业，2014，23(7)：33 - 34.

（收稿日期：2020 - 11 - 30；修回日期：2021 - 01 - 27）