

一测多评法同时测定芒果止咳片中6种药效成分的含量[△]

梁梓敏^{1*},覃洁萍^{1#},郭海姣¹,罗宇东²,胡 华²(1.广西中医药大学药学院,南宁 530001;2.广西中医药大学制药厂,南宁 530023)

中图分类号 R286 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)08-0963-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.08.12

摘要 目的:建立同时测定芒果止咳片中没食子酸、原儿茶酸、芒果苷、高芒果苷、金丝桃苷和异槲皮苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Phenomenex Gemini C₁₈,流动相为0.1%磷酸水溶液-乙腈(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为258 nm,柱温为30 ℃,进样量为5 μL。以没食子酸为内参物,计算原儿茶酸、芒果苷、高芒果苷、金丝桃苷和异槲皮苷的相对校正因子,并将一测多评法与外标法测定结果进行比较。结果:没食子酸、原儿茶酸、芒果苷、高芒果苷、金丝桃苷和异槲皮苷检测质量浓度的线性范围分别为45.75~1 830 μg/mL($r=0.999\ 9$)、2.525~101.0 μg/mL($r=0.999\ 9$)、65.33~2 613 μg/mL($r=0.999\ 6$)、9.058~362.3 μg/mL($r=0.999\ 9$)、3.885~155.4 μg/mL($r=0.999\ 9$)、1.870~74.8 μg/mL($r=0.999\ 9$);定量限分别为0.571、0.643、1.053、0.854、0.830、1.500 μg/mL,检测限分别为0.171、0.193、0.316、0.256、0.249、0.450 μg/mL;精密性、稳定性、重复性试验RSD均小于3%;加样回收率分别为98.8%~101.9%(RSD=1.3%, $n=6$)、94.3%~101.5%(RSD=3.3%, $n=6$)、97.9%~100.5%(RSD=0.9%, $n=6$)、98.2%~101.6%(RSD=1.2%, $n=6$)、102.3%~106.1%(RSD=1.3%, $n=6$)、96.6%~99.3%(RSD=1.0%, $n=6$)。以没食子酸为内参物,原儿茶酸、芒果苷、高芒果苷、金丝桃苷、异槲皮苷的相对校正因子分别为0.568 3、0.500 3、0.687 6、0.939 1、0.826 3;一测多评法测得原儿茶酸等5种成分的含量范围分别为0.197~0.440、3.263~11.250、0.201~1.196、0.168~0.381、0.115~0.293 mg/片,外标法测得的含量范围分别为0.198~0.441、3.329~11.570、0.206~1.194、0.171~0.380、0.119~0.298 mg/片,两种方法测量结果的相对误差为-3.80%~0.74%,且差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:所建一测多评含量测定方法准确、可靠、重复性好,可用于同时测定芒果止咳片中6种药效成分的含量。

关键词 芒果止咳片;高效液相色谱法;一测多评法;没食子酸;原儿茶酸;芒果苷;高芒果苷;金丝桃苷;异槲皮苷;含量测定

Simultaneous Determination of 6 Medicinal Components in Mango Zhike Tablets by Quantitative Analysis of Multi-components by Single Marker Method

LIANG Zimin¹, QIN Jieping¹, GUO Haijiao¹, LUO Yudong², HU Hua² (1. College of Pharmacy, Guangxi University of TCM, Nanning 530001, China; 2. Pharmaceutical Factory, Guangxi University of TCM, Nanning 530023, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of gallic acid, protocatechuic acid, mangiferin, homomangiferin, hyperoside and isoquercetin in Mangguo zhike tablets. METHODS: HPLC was adopted. The determination was performed on Phenomenex Gemini C₁₈ column with mobile phase consisted of 0.1% phosphoric acid water solution-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 258 nm. The column temperature was set at 30 ℃, and sample size was 5 μL. Gallic acid was used as the internal substance, and the correction factors of gallic acid, protocatechuic acid, mangiferin, homomangiferin, hyperoside and isoquercetin were calculated; the results of quantitative analysis of multi-components by single marker method (QAMS) were compared with those of external standard method (ESM). RESULTS: The linear range of gallic acid, protocatechuic acid, mangiferin, homomangiferin, hyperoside and isoquercetin were 45.75-183 0 μg/mL($r=0.999\ 9$), 2.525-101.0 μg/mL($r=0.999\ 9$), 65.33-261 3 μg/mL($r=0.999\ 6$), 9.058-362.3 μg/mL($r=0.999\ 9$), 3.885-155.4 μg/mL($r=0.999\ 9$), 1.870-74.8 μg/mL($r=0.999\ 9$), respectively. The limits of quantification were 0.571, 0.643, 1.053, 0.854, 0.830, 1.500 μg/mL, respectively. The limits of detection were 0.171, 0.193, 0.316, 0.256, 0.249, 0.450 μg/mL, respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 3%. The average recoveries were 98.8%-101.9%(RSD=1.3%, $n=6$), 94.3%-101.5%(RSD=3.3%, $n=6$), 97.9%-100.5%(RSD=0.9%, $n=6$), 98.2%-101.6%(RSD=1.2%, $n=6$), 102.3%-106.1%(RSD=1.3%, $n=6$), 96.6%-99.3%(RSD=1.0%, $n=6$), respectively. RCFs of protocatechuic acid, mangiferin, homomangiferin, hyperoside and isoquercetin were 0.568 3, 0.500 3, 0.687 6, 0.939 1 and 0.826 3, using gallic acid as internal substance. The content ranges of protocatechuic acid and other 4 components measured by QAMS were 0.197-0.440, 3.262-11.250, 0.201-1.196, 0.168-0.381, 0.115-0.293 mg/tablet, respectively.

[△]基金项目:广西创新驱动发展专项资金项目(No.桂科AA172040-73);广西教育厅高校中药提取纯化与质量分析重点实验室项目(No.桂教科研[2014]6号);广西中医药大学2019年研究生教育创新计划项目(No.YCSY2019030)

* 硕士研究生。研究方向:中药成分分析与质量控制。电话:0771-4928337。E-mail:2935688092@qq.com

通信作者:教授,硕士生导师,硕士。研究方向:中药成分分析与质量控制。电话:0771-4928337。E-mail:594724071@qq.com

The content ranges measured by ESM were 0.198-0.441, 3.239-11.570, 0.206-1.194, 0.171-0.380, 0.119-0.298 mg/tablet, respectively. By comparing the content determination results by QAMS and ESM, the relative errors were -3.80% -0.74%, and there was no statistical significance ($P>0.05$). CONCLUSIONS: The established QAMS method is accurate, reliable and repeatable, and can be used for content determination of 6 medicinal components in Mangguo zhike tablets.

KEYWORDS Mangguo zhike tablets; HPLC; Quantitative analysis of multi-components by single marker method; Gallic acid; Protocatechuic acid; Mangiferin; Homomangiferin; Hyperoside; Isoquercetin; Content determination

芒果止咳片是由芒果叶干浸膏、鱼腥草素钠、马来酸氯苯那敏制成的中西药复方制剂,具有宣肺化痰、止咳平喘的功效,临床上用于治疗咳嗽、气喘、多痰等症^[1]。现代研究表明,芒果止咳片中的主要原料药芒果叶具有平喘、止咳、祛痰^[2]、抗肿瘤^[3]、护肝^[4]等药理活性。目前,芒果止咳片的质量标准参照《国家药品标准》^[5],但该标准仅有理化鉴别方法,未对其相关成分含量进行质量控制。近年来,虽然有研究对芒果止咳片中芒果苷、鱼腥草素钠、马来酸氯苯那敏的含量进行了报道^[6-8],但由于芒果叶浸膏成分复杂,其主要化学成分除芒果苷外,还有高芒果苷、金丝桃苷、异槲皮苷等黄酮类成分,没食子酸、原儿茶酸等酚酸类成分及挥发油^[9-10]。有研究发现,没食子酸、原儿茶酸具有抗炎^[11]、抑菌^[12]等作用;芒果苷、高芒果苷具有祛痰、止咳^[13]、抑制哮喘^[14]、抗炎^[15]、抑菌^[16]等作用;金丝桃苷具有抗炎、镇痛、止咳^[17]、抗氧化^[18]等作用,异槲皮苷具抗炎、抑菌、抗病毒等作用^[19];以上6种成分均为芒果止咳片的主要药效成分,因此单一成分的定量检测无法全面评价其质量。

中药制剂发挥疗效是多成分、多靶点共同作用的结果,近年来多指标成分的测定已成为中药质量评价的发展趋势之一^[20],但多种成分含量测定会增加对照品的消耗量,加之部分对照品存在价格昂贵、制备困难、不稳定或难以获得的问题,从而导致检测成本增加。一测多评法(QAMS)是针对上述问题而开发的一种测量方法^[21],该方法只需要1~2个对照品就能实现对多个成分的同时检测,近年来已广泛应用于中药及其制剂的质量控制^[22-23]。基于此,本研究采用QAMS法同时测定芒果止咳片中没食子酸、原儿茶酸、芒果苷、高芒果苷、金丝桃苷和异槲皮苷等6种成分的含量;以没食子酸为内标,计算其他5种成分的相对校正因子(f),并将QAMS法测定结果与外标法(ESM)测定结果进行比较,旨在为完善其质量标准提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1260型高效液相色谱(HPLC)仪,包括紫外检测器、C0107色谱工作站(美国Agilent公司);e2695型HPLC仪,包括二极管阵列检测器、Empower 3色谱工作站(美国Waters公司);KQ5200B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);CPA225D型十万分之一电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];TGL-16G型离心机(上海安亭科学仪器厂);HWS-26型电热恒温

水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

11批芒果止咳片(广西中医药大学制药厂,批号:20161201、20161202、20170304、20170401、20170501、20170901、20180601、20180602、20180701、20180702、20181001,规格:每片相当于原药材2.5g);芒果叶对照药材(批号:121507-200501)、没食子酸对照品(批号:110831-201605,供含量测定用)、原儿茶酸对照品(批号:110809-201205,纯度:≥99.9%)均购自中国食品药品检定研究院;高芒果苷对照品(批号:ST216701,纯度:≥98%)、金丝桃苷对照品(批号:ST008801,纯度:≥98%)、异槲皮苷对照品(批号:ST114401,纯度:≥98%)均购自上海诗丹德标准技术服务有限公司;芒果苷对照品(批号:wkq18050201,纯度:≥98%)购自四川维克奇生物科技有限公司;乙腈为色谱纯,甲醇为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Phenomenex Gemini C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:0.1%磷酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~10 min, 5% B→7% B;10~20 min, 7% B→11% B;20~25 min, 11% B→13% B;25~40 min, 13% B→16% B;40~50 min, 16% B→20% B;50~60 min, 20% B→25% B;60~70 min, 25% B→35% B;70~75 min, 35% B);流速:1.0 mL/min;检测波长:258 nm;柱温:30℃;进样量:5 μL。

2.2 溶液的制备

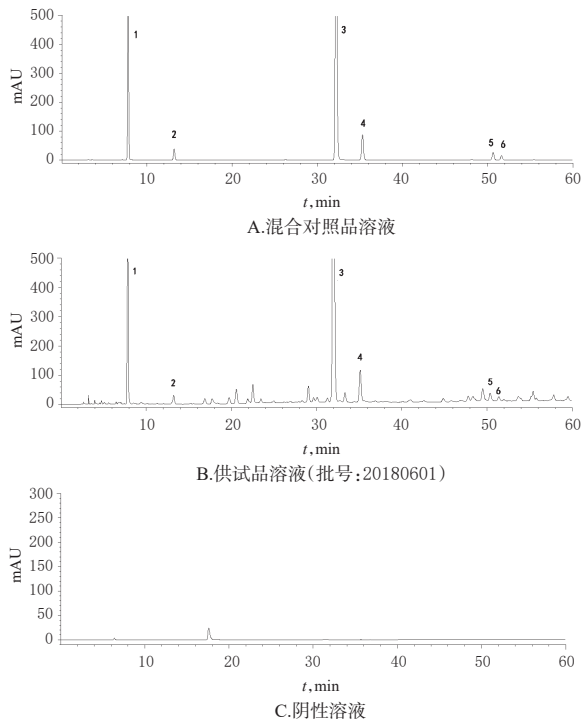
2.2.1 混合对照品溶液的制备 分别取没食子酸、原儿茶酸、芒果苷、高芒果苷、金丝桃苷和异槲皮苷对照品适量,精密称定,加70%甲醇溶解,制成上述6种成分质量浓度分别为1.830 0、0.101 0、2.613 0、0.362 3、0.155 4、0.074 8 mg/mL的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取芒果止咳片20片,去糖衣,研细,取粉末0.3 g,精密称定,加70%甲醇25 mL,超声(功率:200 W,频率:40 kHz,下同)处理40 min,滤过,残渣加70%甲醇25 mL,超声处理40 min,滤过,合并滤液,水浴挥干,残渣加70%甲醇复溶并定容至10 mL量瓶中,摇匀,以13 000 r/min离心10 min,取上清液,即得供试品溶液。

2.2.3 阴性溶液的制备 按处方工艺制备缺芒果叶的阴性样品,按“2.2.2”项下方法制备阴性溶液。

2.3 系统适用性试验

分别取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液(批号:20180601)和阴性溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,混合对照品溶液与供试品溶液在相同保留时间处均有相应的色谱峰出现,各色谱峰分离较好;阴性溶液在相应保留时间处没有色谱峰出现,且对测定无干扰;理论板数以金丝桃苷峰计不低于120 000,详见图1。



注:1.没食子酸;2.原儿茶酸;3.芒果苷;4.高芒果苷;5.金丝桃苷;6.异槲皮苷

Note: 1. gallic acid; 2. protocatechuic acid; 3. mangiferin; 4. homomangiferin; 5. hyperoside; 6. isoquercetin

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.4 线性关系考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液0.125、0.5、1.0、2.0、4.0 mL,分别置于5 mL量瓶中,加70%甲醇稀释至刻度,得到5个不同质量浓度的混合对照品溶液,另取“2.2.1”项下混合对照品溶液(共6种不同质量浓度的溶液),按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以各待测成分质量浓度($x, \mu\text{g/mL}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,结果见表1。

表1 回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equation and linear range

待测成分	回归方程	r	线性范围, $\mu\text{g/mL}$
没食子酸	$y=10.14x+73.91$	0.999 9	45.75~1 830
原儿茶酸	$y=18.13x+0.282 4$	0.999 9	2.525~101.0
芒果苷	$y=19.73x+454.6$	0.999 6	65.33~2 613
高芒果苷	$y=14.99x+0.980 4$	0.999 9	9.058~362.3
金丝桃苷	$y=10.96x+0.567 5$	0.999 9	3.885~155.4
异槲皮苷	$y=12.46x+0.395 1$	0.999 9	1.870~74.8

2.5 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,加70%甲醇逐级稀释,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,分别以信噪比10:1、3:1计算定量限、检测限。结果,没食子酸、原儿茶酸、芒果苷、高芒果苷、金丝桃苷和异槲皮苷的定量限分别为0.571、0.643、1.053、0.854、0.830、1.500 $\mu\text{g/mL}$,检测限分别为0.171、0.193、0.316、0.256、0.249、0.450 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液1.25 mL,置于5 mL量瓶中,加70%甲醇稀释并定容,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,没食子酸、原儿茶酸、芒果苷、高芒果苷、金丝桃苷和异槲皮苷峰面积的RSD分别为0.17%、0.18%、0.19%、0.22%、0.17%、0.27% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:20180601)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 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、原儿茶酸、芒果苷、高芒果苷、金丝桃苷和异槲皮苷峰面积的RSD分别为0.29%、0.76%、0.32%、0.48%、0.70%、2.00% ($n=6$),表明供试品溶液于室温下放置24 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

精密称取芒果止咳片(批号:20180601)粉末,共6份,每份0.3 g,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按标ESM法计算样品含量。结果,没食子酸、原儿茶酸、芒果苷、高芒果苷、金丝桃苷和异槲皮苷的平均含量分别为4.823、0.226 9、10.89、1.198、0.381 3、0.183 6 mg/片,RSD分别为0.39%、0.33%、0.59%、0.50%、1.70%、2.30% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取已知含量的芒果止咳片粉末(批号:20180601)0.15 g,共6份,分别精密加入含没食子酸0.953 6 mg/mL、原儿茶酸0.049 0 mg/mL、芒果苷2.187 mg/mL、高芒果苷0.130 0 mg/mL、金丝桃苷0.070 0 mg/mL、异槲皮苷0.050 0 mg/mL的混合对照品溶液3 mL,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“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,结果见表2。

2.10 相对校正因子的测定

2.10.1 不同质量浓度混合对照品溶液的相对校正因子

取“2.2.1”项下混合对照品溶液0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mL,分别置于5 mL量瓶中,加70%甲醇稀释至刻度,得5个不同质量浓度的混合对照品溶液,另取“2.2.1”项下混合对照品溶液(共6种不同质量浓度的溶液),按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。重复测定3次。以没食子酸峰为内参峰(S),分别计算原儿茶酸、芒果苷、高芒果苷、金丝桃苷和异槲皮苷相对于没食子酸的

表2 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 2 Results of recovery tests(n=6)

待测成分	取样量, g	已知含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
没食子酸	0.153 57	2.523 6	2.860 8	5.350 7	98.8	99.9	1.3
	0.154 76	2.543 1	2.860 8	5.373 9	99.0		
	0.154 62	2.540 8	2.860 8	5.368 5	98.8		
	0.154 88	2.545 1	2.860 8	5.415 0	100.3		
	0.155 32	2.552 3	2.860 8	5.431 3	100.6		
	0.156 20	2.566 8	2.860 8	5.483 0	101.9		
原儿茶酸	0.153 57	0.118 7	0.147 0	0.257 4	94.3	97.1	3.3
	0.154 76	0.119 6	0.147 0	0.258 6	94.5		
	0.154 62	0.119 5	0.147 0	0.259 0	94.9		
	0.154 88	0.119 7	0.147 0	0.261 8	96.7		
	0.155 32	0.120 1	0.147 0	0.268 1	100.7		
	0.156 20	0.120 8	0.147 0	0.270 0	101.5		
芒果苷	0.153 57	5.698 0	6.561 0	12.159 6	98.5	99.0	0.9
	0.154 76	5.742 2	6.561 0	12.195 6	98.4		
	0.154 62	5.737 0	6.561 0	12.158 3	97.9		
	0.154 88	5.746 7	6.561 0	12.242 0	99.0		
	0.155 32	5.763 0	6.561 0	12.286 9	99.5		
	0.156 20	5.795 6	6.561 0	12.388 8	100.5		
高芒果苷	0.153 57	0.626 8	0.390 0	1.014 5	99.5	99.8	1.2
	0.154 76	0.631 7	0.390 0	1.023 6	100.6		
	0.154 62	0.631 1	0.390 0	1.014 4	98.2		
	0.154 88	0.632 2	0.390 0	1.023 1	99.7		
	0.155 32	0.634 0	0.390 0	1.020 8	99.2		
	0.156 20	0.637 6	0.390 0	1.033 8	101.6		
金丝桃苷	0.153 57	0.199 5	0.210 0	0.418 0	104.0	104.1	1.3
	0.154 76	0.201 1	0.210 0	0.416 0	102.3		
	0.154 62	0.200 9	0.210 0	0.417 2	103.0		
	0.154 88	0.201 2	0.210 0	0.421 2	104.8		
	0.155 32	0.201 8	0.210 0	0.421 1	104.4		
	0.156 20	0.202 9	0.210 0	0.425 8	106.1		
异槲皮苷	0.153 57	0.096 1	0.150 0	0.242 9	97.9	97.8	1.0
	0.154 76	0.096 8	0.150 0	0.242 4	97.1		
	0.154 62	0.096 7	0.150 0	0.241 6	96.6		
	0.154 88	0.096 9	0.150 0	0.243 7	97.9		
	0.155 32	0.097 2	0.150 0	0.244 1	98.0		
	0.156 20	0.097 7	0.150 0	0.246 7	99.3		

相对校正因子($f_{k/s}$), $f_{k/s} = (A_s \times C_i) / (C_s \times A_i)$, 式中 A_s 为内参物对照品峰面积, C_s 为内参物对照品质量浓度, A_i 为待测成分峰面积, C_i 为待测成分质量浓度。计算结果见表3。结果, 不同质量浓度混合对照品溶液中各成分相对校正因子的RSD均小于2.5%, 提示在不同质量浓度范围内各成分质量浓度变化对其相对校正因子基本无影响。

2.10.2 不同色谱柱的相对校正因子 分别考察不同色谱柱[Phenomenex Gemini C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Waters SunFireR C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Shimadzu Shim-pack CLC-ODS C₁₈(6.0 mm×15 cm, 5 μm), 下同]对各成分相对校正因子的影响。重复测定3次。以没食子酸峰为内参峰(S), 分别计算原儿茶酸、芒果苷、高芒果苷、金丝桃苷和异槲皮苷相对于没食子酸的相对校正因子($f_{k/s}$), 结果见表4。结果表明, 不同色谱柱下各成分相对校正因子的RSD均小于1.5%, 符合QAMS法的相关规定^[21]。

表3 不同质量浓度混合对照品溶液相对校正因子测定结果(n=6)

Tab 3 Relative correction factors of different concentrations of mixed control(n=6)

序号	$f_{原儿茶酸/s}$	$f_{芒果苷/s}$	$f_{高芒果苷/s}$	$f_{金丝桃苷/s}$	$f_{异槲皮苷/s}$
1	0.576 4	0.491 7	0.698 3	0.952 4	0.839 5
2	0.574 5	0.492 6	0.696 6	0.948 5	0.834 8
3	0.569 9	0.493 7	0.687 8	0.941 1	0.827 5
4	0.566 1	0.497 8	0.684 1	0.935 3	0.822 5
5	0.562 8	0.506 6	0.681 1	0.931 0	0.818 3
6	0.560 2	0.519 2	0.677 7	0.926 2	0.815 5
平均值	0.568 3	0.500 3	0.687 6	0.939 1	0.826 3
RSD, %	1.1	2.2	1.2	1.1	1.1

表4 不同色谱柱的相对校正因子测定结果(n=3)

Tab 4 Relative correction factors of different columns(n=3)

色谱柱	$f_{原儿茶酸/s}$	$f_{芒果苷/s}$	$f_{高芒果苷/s}$	$f_{金丝桃苷/s}$	$f_{异槲皮苷/s}$
Gemini C ₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)	0.573 6	0.492 7	0.694 2	0.947 4	0.833 9
SunFireR C ₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)	0.561 6	0.486 4	0.683 8	0.949 4	0.825 8
Shim-pack CLC-ODS C ₁₈ (6.0 mm×15 cm, 5 μm)	0.568 6	0.498 4	0.700 3	0.956 9	0.839 0
平均值	0.567 9	0.492 5	0.692 8	0.951 2	0.832 9
RSD, %	1.1	1.2	1.2	0.5	0.8

2.10.3 不同仪器的相对校正因子 分别考察不同色谱柱在不同仪器(Agilent 1260型和Waters e2695型HPLC仪)上对各成分相对校正因子的影响。重复测定3次。以没食子酸峰为内参峰(S), 分别计算原儿茶酸、芒果苷、高芒果苷、金丝桃苷和异槲皮苷相对于没食子酸的相对校正因子($f_{k/s}$), 结果见表5。结果提示, 不同仪器下各成分相对校正因子的RSD均小于3.0%, 符合QAMS法的相关规定^[21]。

表5 不同仪器的相对校正因子测定结果(n=3)

Tab 5 Relative correction factors of different instruments(n=3)

仪器	色谱柱	$f_{原儿茶酸/s}$	$f_{芒果苷/s}$	$f_{高芒果苷/s}$	$f_{金丝桃苷/s}$	$f_{异槲皮苷/s}$
Agilent 1260型	Gemini C ₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)	0.573 6	0.492 7	0.694 2	0.947 4	0.833 9
	SunFireR C ₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)	0.561 6	0.486 4	0.683 8	0.949 4	0.825 8
	Shim-pack CLC-ODS(6.0 mm×15 cm, 5 μm)	0.568 6	0.498 4	0.700 3	0.956 9	0.839 0
Waters e2695型	Gemini C ₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)	0.544 8	0.467 1	0.707 5	0.909 9	0.787 9
	SunFireR C ₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)	0.547 0	0.473 8	0.725 4	0.911 0	0.798 3
	Shim-pack CLC-ODS(6.0 mm×15 cm, 5 μm)	0.544 2	0.473 9	0.729 5	0.920 0	0.810 9
平均值		0.556 6	0.482 0	0.706 8	0.932 4	0.816 0
RSD, %		2.3	2.6	2.5	2.3	2.5

2.10.4 不同柱温和不同流速的相对校正因子 分别考察不同柱温(25、30、35 ℃)及不同流速(0.8、1.0、1.2 mL/min)对各成分相对校正因子的影响, 以没食子酸峰为内参峰(S), 分别计算原儿茶酸、芒果苷、高芒果苷、金丝桃苷和异槲皮苷相对于没食子酸的相对校正因子($f_{k/s}$), 结果见表6。结果, 不同柱温和不同流速下各成分相对校正因子的RSD均小于1.5%, 符合QAMS法的相关规定^[21]。

2.10.5 色谱峰的定位 QAMS法用于同时定量多指标成分时需要对各待测成分色谱峰进行定位^[21]。目前, QAMS法用于色谱峰定位的方法主要有相对保留时间

表6 不同柱温和不同流速的相对校正因子测定结果 (n=3)

Tab 6 Relative correction factors of different column temperatures and velocities (n=3)

因素	条件	$f_{\text{原儿茶酸}}$	$f_{\text{芒果苷}}$	$f_{\text{高芒果苷}}$	$f_{\text{金丝桃苷}}$	$f_{\text{异槲皮苷}}$
柱温, °C	25	0.554 1	0.502 3	0.732 3	0.930 8	0.832 7
	30	0.553 4	0.500 5	0.716 3	0.931 0	0.808 9
	35	0.557 4	0.500 7	0.716 7	0.931 8	0.807 3
平均值	0.555 0	0.501 2	0.721 8	0.931 2	0.816 3	
RSD, %	0.4	0.2	1.3	0.1	1.7	
流速, mL/min	0.8	0.549 3	0.502 1	0.716 5	0.931 5	0.816 0
	1.0	0.553 4	0.500 5	0.716 3	0.931 0	0.808 9
	1.2	0.556 5	0.502 8	0.724 5	0.941 1	0.821 2
平均值	0.554 6	0.501 6	0.720 4	0.935 0	0.815 3	
RSD, %	0.3	0.2	0.6	0.6	0.8	

定位法和保留时间差值定位法^[23]。本研究在 Agilent 1260 型和 Waters e2695 型 HPLC 仪上分别采用 3 种不同色谱柱考察了各待测成分色谱峰的相对保留时间(t)和保留时间差值(Δt)的重现性。结果显示,在相同色谱条件下,除原儿茶酸的 RSD 大于 5% 外,芒果苷、高芒果苷、金丝桃苷和异槲皮苷相对保留时间的 RSD $\leq 3.7\%$; 而保留时间差值的 RSD $\leq 3.0\%$ 。因此,采用 QAMS 法进行含量测定时,除原儿茶酸需用定性对照品进行色谱峰定位外,其余成分可采用保留时间差值法定位,结果见表 7、表 8。

2.11 QAMS 法与 ESM 法含量测定结果比较

取 11 批芒果止咳片样品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样,采用 QAMS 法(按“2.10.5”项下方法对各目标成分进行色谱峰定位,记录峰面积,再按“2.10.1”项下建立的校正因子计算各成分的含量)测定样品中各成分的含量,并将测定结果与 ESM 法进行比较,平行测定 3 次。两种方法含量测定结

表9 QAMS 法与 ESM 法含量测定结果比较 (n=3, mg/片)

Tab 9 Comparison of content determination results of QAMS and ESM (n=3, mg/tablet)

批号	没食子酸			原儿茶酸			芒果苷			高芒果苷			金丝桃苷			异槲皮苷		
	ESM/QAMS法	ESM法	QAMS法	RE, %	ESM法	QAMS法	RE, %	ESM法	QAMS法	RE, %	ESM法	QAMS法	RE, %	ESM法	QAMS法	RE, %		
20161201	1.910	0.232	0.227	-2.30	3.570	3.567	-0.08	0.206	0.201	-2.00	0.213	0.209	-2.20	0.161	0.155	-3.80		
20161202	1.860	0.226	0.221	-2.20	3.538	3.528	-0.29	0.215	0.211	-1.90	0.233	0.228	-2.10	0.188	0.181	-3.70		
20170304	2.573	0.280	0.277	-1.20	4.722	4.689	-0.71	0.240	0.238	-1.00	0.296	0.292	-1.20	0.222	0.215	-2.80		
20170401	2.014	0.227	0.222	-2.10	3.239	3.263	0.74	0.229	0.225	-1.80	0.171	0.168	-1.90	0.119	0.115	-3.50		
20170501	4.816	0.217	0.217	0.13	9.873	9.685	-1.90	1.146	1.147	0.13	0.324	0.325	0.14	0.131	0.129	-1.40		
20170901	4.878	0.219	0.220	0.13	10.000	9.809	-1.90	1.161	1.162	0.13	0.329	0.329	0.14	0.133	0.131	-1.40		
20180601	4.819	0.233	0.234	0.19	10.960	10.720	-2.20	1.194	1.196	0.19	0.380	0.381	0.18	0.189	0.186	-1.40		
20180602	3.904	0.203	0.202	-0.14	9.222	9.026	-2.10	0.816	0.815	-0.12	0.295	0.294	-0.12	0.144	0.142	-1.70		
20180701	3.564	0.198	0.197	-0.31	8.241	8.075	-2.00	0.654	0.652	-0.27	0.281	0.280	-0.29	0.164	0.161	-1.90		
20180702	3.651	0.208	0.208	-0.27	8.849	8.659	-2.10	0.616	0.615	-0.22	0.286	0.285	-0.24	0.182	0.178	-1.90		
20181001	3.583	0.441	0.440	-0.34	11.570	11.250	-2.70	0.269	0.269	-0.13	0.261	0.260	-0.27	0.298	0.293	-2.00		

3 讨论

本研究通过对水、甲醇、乙醇、40% 甲醇、70% 甲醇、40% 乙醇、70% 乙醇为提取溶剂进行考察。结果显示,以 70% 甲醇为提取溶剂时各待测成分提取效率最好,故选择 70% 甲醇为提取溶剂。此外,笔者还考察了冷浸、超声、回流 3 种提取方式的提取效果。结果发现,超声和

表7 不同色谱柱及不同仪器的相对保留时间测定结果 (n=3)

Tab 7 Results of relative retention time of different columns and instruments (n=3)

仪器	色谱柱	$t_{\text{原儿茶酸}}$	$t_{\text{芒果苷}}$	$t_{\text{高芒果苷}}$	$t_{\text{金丝桃苷}}$	$t_{\text{异槲皮苷}}$
Agilent 1260 型	Gemini C ₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)	1.685	4.128	4.533	6.492	6.622
	SunFireR C ₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)	1.932	4.166	4.669	6.625	6.780
	Shim-pack CLC-ODS(6.0 mm × 15 cm, 5 μm)	1.813	4.381	4.853	6.787	6.971
Waters e2695 型	Gemini C ₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)	1.756	4.302	4.721	6.733	6.867
	SunFireR C ₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)	1.970	4.184	4.691	6.634	6.788
	Shim-pack CLC-ODS(6.0 mm × 15 cm, 5 μm)	1.841	4.538	5.017	7.004	7.198
平均值		1.833	4.283	4.747	6.712	6.871
RSD, %		5.8	3.7	3.5	2.6	2.9

表8 不同色谱柱及不同仪器的保留时间差值测定结果 (n=3)

Tab 8 Results of retention time differences of different columns and instruments (n=3)

仪器	色谱柱	$\Delta t_{\text{原儿茶酸}}$	$\Delta t_{\text{芒果苷}}$	$\Delta t_{\text{高芒果苷}}$	$\Delta t_{\text{金丝桃苷}}$	$\Delta t_{\text{异槲皮苷}}$
Agilent 1260 型	Gemini C ₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm)	5.296	24.184	27.318	42.462	43.473
	SunFireR C ₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)	6.846	23.262	26.956	41.327	42.469
	Shim-pack CLC-ODS(6.0 mm × 15 cm, 5 μm)	5.659	23.518	26.808	40.257	41.537
Waters e2695 型	Gemini C ₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm)	5.691	24.870	28.022	43.176	44.189
	SunFireR C ₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)	7.081	23.250	26.954	41.147	42.272
	Shim-pack CLC-ODS(6.0 mm × 15 cm, 5 μm)	5.588	23.517	26.701	39.904	41.196
平均值		6.027	23.767	27.126	41.379	42.523
RSD, %		1.2	2.7	1.8	3.0	2.7

果的差异采用相对误差(RE)进行评价,结果见表 9。结果,两种方法原儿茶酸、芒果苷、高芒果苷、金补桃苷、异槲皮苷含量测定结果的 RE 为 -3.80% ~ 0.74%。经 SPSS 22.0 软件进行 t 检验,结果显示两种方法上述成分的测定结果比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),提示 QAMS 法以没食子酸为内参物同时测定芒果止咳片中其余 5 种成分的准确性良好。

回流提取的提取率均较高,且差异不大,考虑到操作简便性,故选择超声提取。同时,本研究对不同提取时间(20、30、40、50、60 min)的提取效果进行考察。结果发现,提取 40 min 时,各待测成分提取率不再增加,故选择提取时间为 40 min; 对不同提取溶剂体积(25、50、75 mL)和提取次数(1、2、3 次)进行考察。结果发现,25 mL

提取2次和25 mL提取3次时含量较高,且差异不大,提示以70%甲醇25 mL提取2次可基本提取完全。与此同时,本研究通过二极管阵列检测器对各待测成分在190~400 nm全波长范围内进行扫描。结果显示,在258 nm波长处各待测成分均有较好吸收,且芒果苷、高芒果苷、金丝桃苷和异槲皮苷在258 nm波长处有最大吸收,故选择258 nm为检测波长。

没食子酸为芒果叶中含量较高的酚酸类成分^[24],其在芒果止咳片中含量较高,且稳定性好,同时没食子酸对照品价格便宜、易得,因此本研究以没食子酸为内参物,测定了其他5种成分的相对校正因子,同时考察了不同对照品质量浓度、流速、柱温、仪器、色谱柱对相对校正因子的影响。结果显示,相对校正因子的RSD均小于3%,提示所建QAMS法的相对校正因子耐用性良好,符合相关规定(RSD<5%)^[21]。

本研究结果显示,以没食子酸峰为内参峰进行各待测成分色谱峰定位时,除原儿茶酸相对保留时间的RSD大于5%外,其他4种成分无论采用相对保留时间法还是保留时间差值法进行定位的RSD均小于4%,但采用保留时间差定位的RSD值相对较小,故除原儿茶酸外的其余成分本研究采用保留时间差法定位。原儿茶酸虽无法采用相对保留时间法定位,但其对照品便宜、易得,故采用QAMS法进行含量测定时,原儿茶酸色谱峰可用定性对照品进行定位^[21,24]。

含量测定结果显示,QAMS法与ESM法原儿茶酸、芒果苷、高芒果苷、金丝桃苷、异槲皮苷含量的测定结果无显著性差异,表明本方法准确、可行,结果可靠,这为芒果止咳片的质量控制提供了新的思路;但不同批次芒果止咳片中各成分含量存在差异,其中以芒果苷和高芒果苷的含量差异尤为明显,其中4批(20161201、20161202、20170304、20170401)的芒果苷和高芒果苷含量较低,其原因可能为存放时间较久造成含量下降,或与芒果叶药材来源于不同产地或采收季节不同有关^[26]。

综上所述,所建QAMS含量测定方法准确、可靠,重复性好,可用于同时测定芒果止咳片中6种成分的含量。

参考文献

[1] 郑作文,邓家刚,林启云.芒果止咳片的药效学研究[J].中医药学报,2002,20(3):358-359.
 [2] 邓家刚,郑作文,曾春晖.芒果苷的药效学实验研究[J].中医药学报,2002,20(6):802-803.
 [3] GARRIDO G, DELGADO R, LEMUS Y, et al. Protection against septic shock and suppression of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production on macrophages and microglia by a standard aqueous extract of *Mangifera indica* L. (VIMANG): role of mangiferin isolated from the extract[J]. *Pharmacol Res*, 2004, 50(2):165-172.
 [4] 楚策.芒果苷抗酒精性肝损伤作用机制的实验研究[D].保定:河北大学,2018.
 [5] 国家食品药品监督管理总局.国家药品标准 WS3: B-0920-91-1[S].2014-12-09.
 [6] 刘华钢,黄海滨,陈燕军. HPLC法测定芒果止咳片中芒

果苷的含量[J].中成药,1997,19(10):14-15.
 [7] 田辉,陈卫卫,蔡毅.高效液相色谱法测定芒果止咳片中鱼腥草素钠[J].中草药,2006,37(8):1179-1180.
 [8] 莫慧贞,许则省.对芒果止咳片中马来酸氯苯那敏的含量测定[J].今日药学,2009,19(4):40-42.
 [9] 潘晶.芒果叶活性成分研究[D].广州:广东药科大学,2017.
 [10] 冯旭,邓家刚,覃洁萍,等.芒果叶挥发油化学成分研究[J].时珍国医国药,2011,22(1):83-84.
 [11] PAL C, BINDU S, DEY S, et al. Gallic acid prevents non-steroidal anti-inflammatory drug-induced gastropathy in rat by blocking oxidative stress and apoptosis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 49(2):258-267.
 [12] 柴贝贝,姜维佳,王莉贞,等.原儿茶酸或绿原酸与抗菌药联用对鱼源链球菌的抑菌效果[J].南方农业学报,2018,49(3):580-585.
 [13] 周智.芒果苷药理实验研究新进展[J].内科,2011,6(5):462-464.
 [14] 郭宏伟,邓家刚,运晨霞,等.芒果苷抑制哮喘小鼠气道炎症的机制[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(9):187-190.
 [15] 卫智权,闫莉,邓家刚,等.芒果苷对脂多糖诱导的慢性炎症大鼠 MAPK 通路及血清细胞因子的影响[J].中草药,2013,44(1):52-58.
 [16] 王志萍,邓家刚,谭珍媛.芒果苷片体外抑菌杀虫作用的实验研究[J].时珍国医国药,2009,20(9):2167-2168.
 [17] 舒庆,郑其萍.金丝桃苷抗心/脑缺血损伤作用的药理学研究进展[J].中国药房,2016,27(10):1415-1417.
 [18] PIAO MJ, KANG KA, ZHANG R, et al. Hyperoside prevents oxidative damage induced by hydrogen peroxide in lung fibroblast cells via an antioxidant effect[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1780(12):1448-1457.
 [19] 陈燕,詹羽姣,李晨阳,等.异槲皮苷的生物活性研究进展[J].中国现代中药,2018,20(12):1579-1582,1592.
 [20] 谭红声,覃洁萍,朱智德,等.十味鹅黄颗粒 HPLC 指纹图谱及 8 种主要成分含量测定[J].中国医院药学杂志,2019,39(8):826-832.
 [21] 王智民,钱忠直,张启伟,等.一测多评法建立的技术指南[J].中国中药杂志,2011,36(6):657-658.
 [22] 马昌豪,李怀伟,仝桂平,等.一测多评法同时测定咽炎片中 5 种指标性成分的含量[J].中国药房,2019,30(16):2232-2236.
 [23] 沈洁,王琴,熊维建,等. HPLC-一测多评法测定参芪延肾颗粒中淫羊藿药材中的 6 个黄酮类成分的含量[J].中国药房,2019,30(17):2327-2331.
 [24] 冯旭,王胜波,邓家刚,等. HPLC 法测定芒果叶中没食子酸的含量[J].山西中医学院学报,2008,9(1):45-46.
 [25] 李金花,冯有龙,张再平,等.一测多评法测定西洋参类保健食品中 9 个皂苷类成分的含量[J].药物分析杂志,2018,38(12):2160-2166.
 [26] 邓家刚,冯旭,王勤,等.不同产地及不同品种芒果叶中芒果苷的含量对比研究[J].中成药,2006,28(12):1755-1756.

(收稿日期:2019-09-22 修回日期:2020-02-13)

(编辑:陈宏)