

一测多评法测定抗病毒口服液成分含量

丁金有*, 余中霞, 徐鹏, 江锐

(上饶市检验检测认证院, 上饶 334000)

摘要: **目的** 建立一测多评法同时测定抗病毒口服液中(R,S)-告依春、芒果苷、连翘酯苷I、连翘苷、连翘酯苷A、松脂素吡喃葡萄糖苷和连翘脂素7个成分的含量。**方法** 采用高效液相色谱法测定, 采用Hydrosphere C18色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 以乙腈(A)-0.01%磷酸溶液(B)为流动相梯度洗脱; 检测波长为236 nm; 进样量10 μL。以连翘苷为内参物, 计算(R,S)-告依春、芒果苷、连翘酯苷I、连翘酯苷A、松脂素吡喃葡萄糖苷和连翘脂素的相对校正因子和含量, 比较外标法和一测多评法的结果差异。**结果** 7种成分的色谱峰面积与质量浓度呈良好的线性关系, 相关系数均大于0.999; 样品加标平均回收率分别为95.83%~100.27%; 测定结果的相对标准偏差为0.11%~2.02% (n=6)。**结论** 本研究建立的抗病毒口服液中7个成分的含量的测定方法准确, 简单可行, 可用于抗病毒口服液的质量控制。

关键词: 一测多评法; 高效液相色谱; 抗病毒口服液; 相对校正因子

0 引言

抗病毒口服液的组方选自东汉名医张仲景所著《伤寒论》“白虎汤”和清代名方“清瘟败毒饮”, 是一种根据悠久的传统中医实践理论, 经过多年的临床医学研究, 在近代药理趋于成熟的抗病毒处方药物, 处方由板蓝根、石膏、芦根、地黄、郁金、知母、石菖蒲、广藿香、连翘九味药材组成。具有清热祛湿, 凉血解毒的作用, 用于风热感冒, 温病发热及上呼吸道感染, 流感、腮腺炎病毒感染疾患^[1]。毛鑫等^[2-6]发现抗病毒口服液对甲型H1N1流感病毒体内外感染和流行性感冒有较好的治疗和预防作用。

抗病毒口服液现行标准《中华人民共和国药典》2020年版一部仅对连翘苷进行了含量测定。抗病毒口服液由九味中药材制备而成, 其中化学组分多, 采用多个对照品检验成本高。课题组将一测多评法(Quantitative Analysis of Multi-components by Single Marker, QAMS)应用于抗病毒口服液中(R,S)-告依春、芒果苷、连翘酯苷I、连翘苷、连翘酯苷A、松脂素吡喃葡萄糖苷和连翘脂素7个成分的含量测定^[7-8], 并将一测多评法结果与外标法(ESM)进行比较, 探讨一测多评法^[9-11]在抗病毒口服液质量控制的可行性, 为抗病毒口服液的研究

和质量控制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

戴尔 Uitimate 3000 高效液相色谱仪(赛默飞公司); 沃特斯 e2695 高效液相色谱仪(沃特斯公司); 分析电子天平(德国 Sartorius 公司); 超声仪(深圳市圳超科技有限公司)。(R,S)-告依春(批号: 111753-202007, 含量 100%)、连翘苷(批号: 110821-202117, 含量 94.9%)、连翘酯苷 A(批号: 111810-202108, 含量 100%)均购于中国食品药品检定研究院; 芒果苷(批号: wkq22022508, 含量 98%)、连翘酯苷 I(批号: wkq23031408, 含量 98%)、松脂素吡喃葡萄糖苷(批号: wkq23021705, 含量 98%)、连翘脂素(批号: wkq22110303, 含量 98%)均购于四川省维克奇公司。水为自制超纯水, 乙腈为色谱级, 其余试剂均为分析纯。

1.2 色谱条件

采用 Hydrosphere C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以乙腈(A)-0.01%磷酸溶液(B)为流动相, 梯度洗脱(0~22 min, 7%A~18%A; 22~29 min, 18%A; 29~31 min, 18%A~23%A; 31~40 min, 23%A; 40~53 min, 23%A~40%A; 53~60 min, 40%A;

基金项目: 上饶市科学技术局科研项目(20242CZDX65)。

* 通信作者: 丁金有, 工程师, 研究方向为药物分析和实验室安全管理。E-mail: 249257162@qq.com

60~65 min, 40%A~7%A), 流速为 1.0 mL/min, 进样量为 10 μ L, 柱温为 30 $^{\circ}$ C, 检测波长为 236 nm。

1.3 溶液制备

1.3.1 混合对照品溶液

分别精密称取 (R,S)-告依春、芒果苷、连翘酯苷 I、连翘苷、连翘酯苷 A、松脂素吡喃葡萄糖苷和连翘脂素配制成质量浓度分别为 60.550、59.878、98.000、1261.000、78.400、48.921、60.417 μ g/mL 的混合对照品储备溶液。将上述混合对照品溶液稀释成 6 个不同质量浓度, 备用。

1.3.2 供试品溶液的制备

精密量取本品 25 mL, 每次用 25 mL 乙酸乙酯振荡提

取 6 次, 置水浴上蒸干, 残渣置 10 mL 量瓶中, 加体积分数 70% 甲醇至刻度, 摇匀, 以 0.45 μ m 微孔滤膜过滤, 即得。

2 结果与分析

2.1 特征图谱研究

分别精密吸取混合对照品溶液和供试品溶液各 10 μ L, 分别按照 1.2 项下的色谱条件测定, 出峰顺序依次为 (R,S)-告依春、芒果苷、连翘酯苷 I、连翘酯苷 A、松脂素吡喃葡萄糖苷、连翘苷、连翘酯素, 结果见图 1~2。

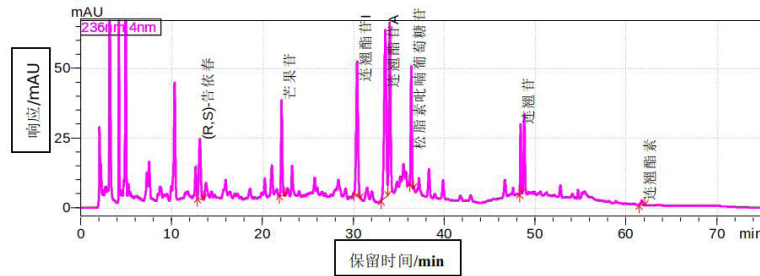


图 1 混合对照品液相图谱

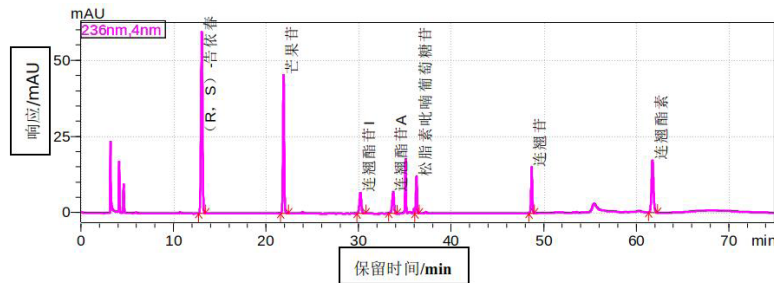


图 2 样品液相图谱

2.2 方法学考察

(1) 线性关系: 分别精密量取 1.3 项下各 6 个不同质量浓度对照品溶液各 10 μ L, 稀释成 (R,S)-告依春质量浓度为 0.2402~60.55 μ g/mL, 按上述色谱条件, 测定峰面积, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制 (R,S)-告依春、芒果苷、连翘酯苷 I、连翘苷、连翘酯苷 A、松脂素吡喃葡萄糖苷和连翘脂素的标准曲线。结果表明, 7 个成分质量浓度在相应的范围内线性关系良好。结果见表 1。

(2) 精密度试验: 精密吸取 1.3 项下混合对照品溶液, 按照 1.2 项下的色谱条件, 连续测定 6 次, 测得 (R,S)-告依春、芒果苷、连翘酯苷 I、连翘酯苷 A、松脂素吡喃葡萄糖苷、连翘苷、连翘酯素峰面积的相对标准偏差 (RSD) 值分别为 0.11%、0.20%、0.93%、0.56%、0.35%、0.47%、0.82%, 结果显示精密度良好。

(3) 重复性试验: 按照 1.3 项下方法制备供试品溶液

6 份, 按照 1.2 项下的色谱条件测定, 测得 (R,S)-告依春、芒果苷、连翘酯苷 I、连翘酯苷 A、松脂素吡喃葡萄糖苷、连翘苷、连翘酯素峰面积的 RSD 值分别为 0.40%、0.52%、0.66%、0.28%、0.79%、0.56%、0.37%, 结果显示重复性良好。

表 1 各成分回归方程

成分	回归方程	r^2	线性范围 / (μ g/mL)
(R,S)-告依春	$Y=73451X+20207$	0.9997	0.2402~60.55
芒果苷	$Y=40705X-9858.5$	0.9995	0.2395~59.878
连翘酯苷 I	$Y=10293X+1779.4$	0.9998	4.90~98.00
连翘酯苷 A	$Y=12209X-5695.4$	0.9998	6.3050~1261.0
松脂素吡喃葡萄糖苷	$Y=13906X-5259.9$	0.9994	3.92~78.40
连翘苷	$Y=18780X+4424.3$	0.9996	0.1957~48.921
连翘酯素	$Y=25500X+358.27$	0.9999	0.2417~60.417

(4)稳定性试验: 取 1.3 项下的供试品溶液, 室温放置 24 h, 按照 1.2 项下的色谱条件每隔 2 h 测定一次, 测得 (R,S)-告依春、芒果苷、连翘酯苷 I、连翘酯苷 A、松脂素吡喃葡萄糖苷、连翘苷、连翘酯素峰面积的 RSD 值分别为 0.45%、0.68%、0.84%、1.1%、0.95%、0.71%、0.88%, 表明供试品溶液 24 h 内稳定。

(5)加样回收率试验: 取已知含量的供试品, 精密量取 6 份, 分别加入与供试品 7 个成分含量的约 80%、100%、120% 的对照品储备溶液, 按照 1.3 项下方法制备供试品溶液, 按照 1.2 项下的色谱条件测定峰面积, 计算

得到 (R,S)-告依春、芒果苷、连翘酯苷 I、连翘酯苷 A、松脂素吡喃葡萄糖苷、连翘苷和连翘酯素的平均回收率在 95.85%~100.27% 范围内, RSD 在 0.11%~2.02% 范围内。

2.3 一测多评法测定

2.3.1 相对校正因子 ($f_{s/i}$) 的计算

精密吸取 1.3 项下混合对照品溶液, 按照 1.2 项下的色谱条件, 连续测定 6 次, 记录各成分的色谱峰面积, 以连翘苷为内参物, 根据公式 $f_{s/i} = f_s/f_i = (C_i A_s)/(C_s A_i)$, 式中 A_s 为内参物峰面积, C_s 为内参物质量浓度, A_i 为被测组分峰面积, C_i 为被测组分质量浓度, 结果见表 2。

表 2 各组分的相对校正因子

进样量/ μL	$f_{s/i}$ (R,S)-告依春	$f_{s/i}$ 芒果苷	$f_{s/i}$ 连翘酯苷 I	$f_{s/i}$ 连翘酯苷 A	$f_{s/i}$ 松脂素吡喃葡萄糖苷	$f_{s/i}$ 连翘酯素
5	3.1232	2.0503	1.7351	0.8689	0.9664	1.2909
10	3.1352	2.0841	1.7563	0.8728	0.9804	1.2978
15	3.1578	2.0927	1.7349	0.8821	0.9735	1.3002
20	3.1479	2.0678	1.7466	0.8735	0.9834	1.3147
25	3.1583	2.0591	1.7621	0.8804	0.9609	1.3185
30	3.1692	2.0866	1.7206	0.8651	0.9824	1.3212
平均值	3.1486	2.0734	1.7426	0.8738	0.9745	1.3072
RSD/%	0.54	0.82	0.88	0.75	0.94	0.96

2.3.2 不同仪器和色谱柱对相对校正因子的影响

采用戴尔 Uitimate3000、沃特斯 e2695 两种高效液相色谱系统及 COSMOSIL C18 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)、Hydrosphere C18 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)和 Titank C18 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)三种不同品牌的色谱柱, 测定不同仪器和色谱柱对各待测成分的相对校正因子的影响, 结果表明, (R,S)-告依春、芒果苷、连翘酯苷 I、连翘苷、连翘酯苷 A、松脂素吡喃葡萄糖苷和连翘酯素在不同仪器色谱柱下重现性良好, RSD 在 0.63%~1.2% 之间。

2.3.3 不同柱温和不同体积流量对相对校正因子的影响

同一台液相色谱仪上, 考察了不同柱温 (25、30、35 $^{\circ}\text{C}$), 以及不同体积流量 (0.9、1.0、1.1 mL/min)对相对

校正因子的影响, RSD 为 0.71%~1.30%, 结果表明无明显影响。

2.3.4 色谱峰定位

采用相对保留时间法定位, 以连翘苷为参照, 计算其他各成分相对保留值, 考察了戴尔 Uitimate 3000、沃特斯 e2695 2 种高效液相色谱仪及 COSMOSIL C18(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)、Hydrosphere C18 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)和 Titank C18 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) 3 种不同品牌的色谱柱所测得的 (R,S)-告依春、芒果苷、连翘酯苷 I、连翘酯苷 A、松脂素吡喃葡萄糖苷和连翘酯素与内参物连翘苷的相对保留值, 结果见表 3, 表明本方法稳定可行。

表 3 各成分相对保留值

仪器	色谱柱	$r_{i/s}$					
		$r_{(R,S)-告依春/s}$	$r_{芒果苷/s}$	$r_{连翘酯苷 I/s}$	$r_{连翘酯苷 A/s}$	$r_{松脂素吡喃葡萄糖苷/s}$	$r_{连翘酯素/s}$
安捷伦 1260	Agilent 5 TC-C C18	0.2681	0.4496	0.6200	0.6928	0.7444	1.268
	YMC Hydrosphere C18	0.2709	0.4569	0.6283	0.6924	0.7514	1.2753
	Shimadzu AcclaimTM120 C18	0.2596	0.4474	0.6167	0.6831	0.7468	1.2513
岛津 LC-2030C 3D Plus	Agilent 5 TC-C C18	0.2608	0.4469	0.6164	0.6829	0.7613	1.2512
	YMC Hydrosphere C18	0.2633	0.4484	0.6178	0.6849	0.7466	1.2498
	Shimadzu AcclaimTM120 C18	0.2706	0.4567	0.6281	0.6922	0.7539	1.2757
平均值	0.2656	0.4510	0.6212	0.6881	0.7507	1.2619	
RSD/%	1.9	1.0	0.89	0.71	0.83	0.99	

2.3.5 一测多评法和外标法结果的比较

取 10 批样品, 按 1.3 项下方法制备供试品溶液, 按 1.2 项下色谱条件测定, 所测结果与外标法测得的结果比较,

RSD 值均小于 3.0%, 无显著差异。结果见表 4, 表明一测多评法测定含量可行。

表 4 一测多评法和外标法测定结果

批号	连翘苷 / ($\mu\text{g/mL}$)		(R,S)-告依春 / ($\mu\text{g/mL}$)		芒果苷 /($\mu\text{g/mL}$)		连翘酯苷 I/($\mu\text{g/mL}$)		连翘酯苷 A/($\mu\text{g/mL}$)		松脂素吡喃 葡萄糖苷 /($\mu\text{g/mL}$)		连翘酯素 / ($\mu\text{g/mL}$)	
	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS
S1	95.07	24.37	24.85	52.43	52.71	46.53	46.99	679.89	680.33	23.17	23.46	5.87	5.95	
S2	89.82	21.42	21.90	55.27	54.63	66.76	66.62	577.34	576.27	28.32	27.96	5.55	5.48	
S3	88.74	37.34	36.08	50.38	49.59	65.81	65.16	598.47	599.25	27.64	27.31	4.79	4.83	
S4	106.42	19.88	19.16	10.26	9.70	103.97	104.50	688.62	688.03	26.08	25.16	4.53	4.44	
S5	111.49	20.66	20.95	19.07	18.32	98.32	98.08	657.91	657.26	25.83	26.45	3.39	3.28	
S6	122.09	10.46	10.39	15.09	14.54	20.64	20.86	757.15	756.24	12.33	12.85	5.48	5.11	
S7	120.64	26.08	25.36	12.74	12.51	21.38	21.32	532.44	533.19	11.79	11.90	10.27	10.51	
S8	93.97	18.15	17.54	7.85	7.78	81.06	80.38	517.27	517.71	20.16	20.70	13.64	13.96	
S9	125.11	21.33	20.80	13.61	13.82	100.54	100.63	693.29	694.62	28.52	28.08	7.61	7.55	
S10	87.73	17.45	17.33	10.28	10.06	82.41	82.68	566.94	567.39	20.44	20.83	2.58	2.63	

3 讨论与结论

3.1 液相色谱条件的考察

经高效液相色谱仪的 DAD 检测器扫描 200~400 nm 范围内的光谱图, 结果显示 7 个成分在 236 nm 均有较大吸收, 与其他峰分离度较好。流动相分别比较了乙腈-水、乙腈-0.01% 磷酸溶液、甲醇-0.01% 磷酸溶液; 柱温比较了室温、30、35 °C。当流动相为乙腈-0.01% 磷酸溶液梯度洗脱, 柱温为 30 °C 时主峰与其他成分峰分离度较好, 可用于抗病毒口服液中 7 种成分的含量测定。

3.2 内参物的选择

连翘苷是抗病毒口服液现行标准中含量测定的成分, 且稳定存在, 在本次试验测定的 7 个成分中, 发现连翘苷的含量较大, 连翘苷对照品相对价廉易得, 有利于其他成分色谱峰的相对保留时间的计算, 故选择连翘苷为内参物。

抗病毒口服液样品中含多种化学成分, 且对照品购买费用高周期长, 为节约对照品, 本试验以 (R,S)-告依春作内参物, 建立了内参物 (R,S)-告依春与其他待测成分芒果苷、连翘酯苷 I、连翘酯苷 A、松脂素吡喃葡萄糖苷、连翘苷和连翘酯素的 $f_{s,i}$, 采用相对保留值对样品中待测成分色谱峰进行准确的预测和定位。结果显示, 一测多评法与外标法测定结果无明显差异, 且与外标法相比操作简便, 成本较低, 在对照品难于取得的时候, 可以通过测定抗病毒口服液中 (R,S)-告依春的含量来计算其他 6 个成分的含量, 实现抗病毒口服液中多成分的含量测定, 为提高抗病毒口服液质量控制标准提供了科学、简便的方法。

参考文献

- [1] 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: 282
- [2] 毛鑫, 姚荣妹, 包蕾, 等. 抗病毒口服液防治甲型流感病毒感染药效学研究[J]. 方药药理研究, 2021, 34(12): 12-15.
- [3] 秦勇. 磷酸奥司他韦与抗病毒口服液治疗流行性感患者效果比较[J]. 中国民康医学, 2021, 33(19): 126-128.
- [4] 李洪皎, 李凌香, 牟梓君, 等. 抗病毒口服液治疗普通感冒临床应用专家共识[J]. 中医杂志, 2021, 62(11): 1008-1012.
- [5] 李晓彦, 于涛, 温泽淮, 等. 广州医院门诊使用香雪抗病毒口服液不良反应调查[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(2): 111-116.
- [6] 刘红, 徐瑞芳. 磷酸奥司他韦联合抗病毒口服液治疗甲型H1N1流感的临床观察[J]. 中国中医急症, 2017, 26(8): 1474-1476.
- [7] 邱陈劲, 孟鹤, 谢小燕, 等. 高效液相法同时测定抗病毒口服液中三种成分的含量测定及其指纹图谱[J]. 中国药学会, 2017, 5(9): 250-254.
- [8] 刘兴宝. 提高抗病毒口服液连翘苷含量的工艺优化研究[J]. 黑龙江医药科学, 2018, 41(1): 166-167.
- [9] 余中霞, 张继红, 彭丹, 等. 基于一测多评法的麸炒金樱子成分含量测定[J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(24): 2770-2775.
- [10] 王佳佳, 李希, 冯建安, 等. HPLC指纹图谱结合一测多评法控制马齿苋药材质量[J]. 中国药房, 2023, 34(9): 1081-1085.
- [11] 邝敏, 严玉晶, 林嘉明, 等. 一测多评法同时测定丹参配方颗粒中7个酚酸类成分[J]. 中南药学, 2023, 21(5): 1352-1357.