HPLC-QAMS法评价小儿咳喘灵口服液质量一致性研究

王 媛[1], 杨元硕[2], 师煜军[2], 李思治[1*]

(1. 中国人民解放军联勤保障部队第九八三医院药剂科, 天津 300142; 2. 天津医科大学药学院, 天津 300070)

摘要: 建立高效液相色谱−一测多评法 (high performance liquid chromatography-quantitative analysis of multi-components by single marker, HPLC-QAMS) 测定小儿咳喘灵口服液中15种成分的含量, 为小儿咳喘灵口服液的质量控制提供了方法依据。以水溶解样品, 色谱柱为Kromasil C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈−0.1%甲酸为流动相进行梯度洗脱, 柱温为30 ℃, 流速为1.0 mL·min^{-1}, 进样量为5 μL, 检测波长254 nm; 以绿原酸为内标, 计算其他14个成分的相对校正因子, 测定含量; 并对22批样品进行聚类分析与主成分分析。15种成分在各自浓度范围内线性关系良好 ($r \geqslant 0.9995$), 平均加样回收率96.52%～99.02%, RSD为0.57%～1.40%; 一测多评法法所得结果与外标法接近。22批样品聚类分析分成四类; 主成分分析提取了4个主成分, 贡献率达到81.706%。结果表明, 该方法准确、专属性强, 可用于该制剂的含量测定及质量评价。

关键词: 小儿咳喘灵口服液; 高效液相色谱法; 一测多评法; 化学成分; 聚类分析; 主成分分析

中图分类号: R917 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2025)11-3499-08

Study on the quality consistency of Xiao'er Kechuanling oral liquid evaluated by HPLC-QAMS

WANG Yuan[1], YANG Yuan-shuo[2], SHI Yu-jun[2], LI Si-zhi[1*]

(*1. Department of Pharmacy, 983 Hospital of the PLA Joint Logistic Support Force, Tianjin 300142, China; 2. School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China*)

Abstract: A HPLC-QAMS method was established for the simultaneous determination of 15 components in Xiao'er Kechuanling oral liquid, providing a method for its quality control. The analysis was performed on a 30 ℃ Kromasil C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile−0.1% formic acid flowing at 1.0 mL·min^{-1} in a gradient elution manner. The injection volume was 5 μL and the detection wavelength was set at 254 nm. Chlorogenic acid was used as an internal standard to calculate the relative correction factors of the other fourteen components, after which the content determination was made. Cluster analysis and principal component analysis were conducted on 22 batches of samples. Fifteen components showed good linear relationships within their own ranges ($r \geqslant 0.9995$), whose average recoveries were 96.52%−99.02% with the RSDs of 0.57%−1.40%. The result obtained by HPLC-QAMS approximated those obtained by external standard method. Cluster analysis of 22 batches of samples was divided into four classes. Four principal components were extracted by principal component analysis, and the contribution rate reached 81.706%. This accurate and specific method can be used for the quality control of Xiao'er Kechuanling oral liquid.

Key words: Xiao'er Kechuanling oral liquid; high-performance liquid chromatography; quantitative analysis of multi-components with single marker; chemical constituent; clustering analysis; principal component analysis

小儿咳喘灵口服液收载于中国药典一部 (2020年版) 的中药复方制剂, 由金银花、板蓝根、甘草等7味药组成, 具有宣肺清热等作用[1]。方中金银花含有新绿

收稿日期: 2025-05-12; 修回日期: 2025-08-24.
*通讯作者 Tel: 86-22-84683207, E-mail: li_huai1980_jim@126.com
DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0535

原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸B、异绿原酸A、异绿原酸C等成分, 具有清热解毒、疏散风热等作用[1-7]; 板蓝根含有 (*R*,*S*)-告依春、腺苷、尿苷等成分, 具清热解毒、凉血利咽等作用[1,8-11]; 甘草含有甘草苷、芹糖甘草苷、异甘草苷、甘草酸、异甘草素等成分[1,12-15]。目前对本制剂成分研究有麻黄碱、伪麻黄碱、细辛脂素、苦杏仁苷、防腐剂等报道[1,16-19], 但没有同时定量分析多成分的研究报道。因此, 本研究采用高效液相色谱−一测多评法 (high performance liquid chromatography-quantitative analysis of multi-components by single marker, HPLC-QAMS)[1,20-22]定量分析腺苷、尿苷、(*R*,*S*)-告依春、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸B、异绿原酸A、异绿原酸C、甘草苷、芹糖甘草苷、异甘草苷、甘草酸、异甘草素等15个成分, 同时对多批制剂进行分析与评价, 为制剂的生产过程及临床应用提供依据。

材料与方法

仪器 LC-2030C Plus高效液相色谱仪, 购自日本岛津公司; LC/Labsoluion色谱工作站, 购自日本岛津公司; MS105DU十万分之一电子分析天平, 购自梅特勒公司; KQ-100DA台式数控超声波清洗器, 购自昆山超声仪器有限公司。

试剂与样品 尿苷 (批号HA062725, M1)、腺苷 (编号HA062729, M2)、(*R*,*S*)-告依春 (编号HE131763, M3)、新绿原酸 (编号HN021137, M4)、绿原酸 (编号HC021133, M5)、隐绿原酸 (编号HC021134, M6)、咖啡酸 (编号HC230818, M7)、芹糖甘草苷 (编号HL042239, M8)、甘草苷 (编号HL042238, M9)、异绿原酸B (编号HI021136, M10)、异绿原酸A (编号HI021135, M11)、异绿原酸C (编号HN021138, M12), 异甘草苷 (HI042234, M13)、甘草酸 (编号HG042714, M14)、异甘草素 (编号HI042235, M15), 纯度均 ≥ 98%, 购自宝鸡晨光生物科技有限公司; 乙腈、甲醇 (色谱纯, 美国Fisher公司); 水为自制超纯水; 其余为分析纯。22批小儿咳喘灵口服液市售样品来源于22个厂家, 规格10 mL/瓶, 编号、厂家、批号分别为S1、A1、202303002, S2、A2、20221203, S3、A3、20230815, S4、A4、202302001, S5、A5、20230623, S6、A6、20230524, S7、A7、20230515, S8、A8、20230321, S9、A9、230604, S10、A10、20230924, S11、A11、20230519, S12、A12、20231203, S13、A13、20231108, S14、A14、20231014, S15、A15、231019, S16、A16、20231213, S17、A17、20230925, S18、A18、20230827, S19、A19、202311004, S20、A20、20231126, S21、A21、20230811, S22、A22、20231208。

对照品溶液制备 精密称取各对照品适量, 加甲醇配成每1 mL含尿苷258.72 μg、腺苷442.96 μg、(*R*,*S*)-告依春444.92 μg、新绿原酸1 025.80 μg、绿原酸4494.28 μg、隐绿原酸419.44 μg、咖啡酸980 μg、芹糖甘草苷384.16 μg、甘草苷578.20 μg、异绿原酸B 2 097.20 μg、异绿原酸A 1 058.40 μg、异绿原酸C 1 587.60 μg、异甘草苷526.75 μg、甘草酸1 470.00 μg、异甘草素156.80 μg对照品溶液, 作为储备液。

供试品溶液制备 精密量取本品1 mL于10 mL量瓶中, 加入纯净水至刻度, 摇匀, 滤过, 即得。

色谱条件 色谱柱为Kromasil C18 (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: 0～12 min, 2%→8% A; 12～40 min, 8%→20% A; 40～60 min, 20%→32% A; 60～82 min, 32%→51% A; 记录时间为82 min; 流速: 1.0 mL·min^{-1}; 柱温: 30 ℃; 检测波长: 254 nm; 进样量5 μL。

方法学验证

专属性试验 按处方比例分别制备缺金银花阴性样品、缺板蓝根阴性样品、缺甘草阴性样品, 依据“供试品溶液制备”方法, 分别制备缺金银花阴性样品溶液 (即新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸B、异绿原酸A、异绿原酸C阴性对照溶液)、缺板蓝根阴性样品溶液 [即尿苷、腺苷、(*R*,*S*)-告依春阴性对照溶液]、缺甘草阴性样品溶液 (即芹糖甘草苷、甘草苷、异甘草苷、甘草酸、异甘草素阴性对照溶液)。取供试品、对照品及各阴性对照溶液进样测定。

线性关系 分别精密量取储备液0.01、0.05、0.10、0.25、0.50、1.00 mL, 分别置于各个1 mL量瓶中, 分别加甲醇定容至1 mL, 分别得对照品系列溶液。进样测定, 记录峰面积, 考察对照品浓度 (x) 与峰面积 (y) 的线性关系。

精密度试验 取供试品溶液 (S1), 连续测定6次, 按“色谱条件”进样分别测得M1～M15峰面积, 计算相对标准偏差 (RSD) 值。

稳定性试验 取供试品溶液 (S1), 分别于0、2.0、4.0、8.0、12.0、24.0 h, 按“色谱条件”进样分别测得M1～M15峰面积, 计算RSD值。

重复性试验 精密量取样品 (S1) 1 mL, 按“供试品溶液制备”方法制备6份供试品溶液及按“色谱条件”测定方法测得M1～M15含量, 计算RSD值。

回收试验 精密量取样品 (S1) 0.5 mL, 量取6份, 分别添加M1～M15的量依次为0.05、0.05、0.08、0.45、1.80、0.18、0.02、0.05、0.26、0.96、0.48、0.77、0.09、0.72、0.01 mg, 再依据“供试品溶液制备”方法制备溶液, 进样, 测定峰面积, 计算各成分的平均加样回收率及其

RSD值。

相对校正因子的测定　相对校正因子计算采用多点校正法, 精密吸取“线性关系”项下1、2、5、10、15、20 μL对照品溶液, 按照“色谱条件”测定15个成分的峰面积, 以对照品易得、稳定且含量最高的绿原酸为内参物, 按照相对校正因子计算公式 [$f_{sx}=f_s/f_x=(A_s\times C_x)/(A_x\times C_s)$] 计算除内参物外其余成分的相对校正因子 (其中$A_s$与$C_s$分别为内参物绿原酸对照品峰面积和浓度, A_x与C_x为其余各待测成分对照品峰面积和浓度)。

耐用性试验

相对校正因子的重复性考察　精密吸取混合对照品溶液10 μL, 分别在岛津HPLC-2030C Plus型和Nexera XR型色谱系统及Kromasil C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Intersil C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 和Welchrom C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 3种色谱柱进样测定对相对校正因子, 计算RSD值。

不同柱温对相对校正因子的影响　考察不同柱温 (20、25、30、35、40 ℃) 对各成分相对校正因子的影响。精密吸取选取的混合对照品溶液, 按照“色谱条件”进样测定对相对校正因子, 计算RSD值。

不同流速对相对校正因子的影响　考察不同流速 (0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL·min^{-1}) 对各成分相对校正因子的影响。精密吸取选取的混合对照品溶液, 按照“色谱条件”进样测定对相对校正因子, 计算RSD值。

QAMS法待测成分色谱峰的定位　根据测得的保留时间计算内参物与待测成分的相对保留值 ($r_{s/x}=t_{Rs}/t_{Rx}$, 其中t_{Rs}、t_{Rx}分别为内参物和待测成分的保留时间) 及其RSD。

QAMS法与外标法测定结果的比较　取15批小儿咳喘灵口服液按照“供试品溶液制备”的方法制备供试品溶液, 并在“色谱条件”项下进行检测, 分别采用QAMS与外标法 (external standard method, ESM) 计算小儿咳喘灵口服液中15个成分的含量及相对误差 (relative error, RE), RE = (QAMS−ESM)/ESM × 100%。

QAMS法的再验证　另取7批小儿咳喘灵口服液样品, 按“供试品溶液制备”方法制备供试品溶液。分别在岛津HPLC-2030C Plus型和Nexera XR型色谱系统及Kromasil C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Intersil C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 和Welchrom C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 3种色谱柱按“色谱条件”项下进样测定, 计算和比较测定值和计算值的RSD值 (计算公式为标准差s/均数$\bar{x}$×100%)。

聚类分析　以22批样品中15种成分含量为变量, 运用SPSS26.0软件, 采用组间联接法, 以平方欧氏距离为测度, 进行系统聚类分析。

主成分分析　以22批样品中15种成分含量为变量, 将22批制剂中15种成分的含量通过SPSS 26.0软件进行主成分分析, 以特征值大于0.8为提取标准。

结果

1　方法学验证

1.1　专属性

取供试品、对照品及各阴性对照溶液进样测定; 结果见图1, 目标峰处无干扰峰出现, 且分离效果良好, 表明该方法专属性良好。

1.2　线性关系

结果在相应浓度范围内, 线性关系良好 (r均在0.999 0以上), 结果见表1。

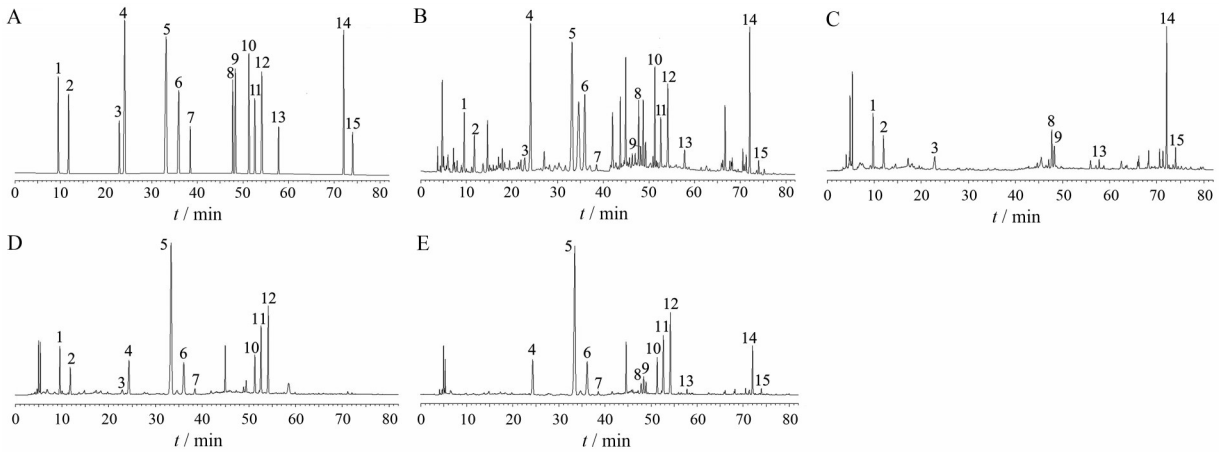


Figure 1　HPLC Chromatogram of mixed reference substance (A) and Xiao'er Kechuanling Koufuye (B) and lack of Lonicerae Japonicae Flos sample (C) and lack of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma sample (D) and lack of Isatidis Radix sample (E). 1: Uridine; 2: Adenosine; 3: Goitrin; 4: Neochlorogenic acid; 5: Chlorogenic acid: 6: Cryptochlorogenic acid; 7: Caffeic acid; 8: Liquiritin apioside; 9: Liquiritin; 10: Isochlorogenic acid B; 11: Isochlorogenic acid A; 12: Isochlorogenic acid C; 13: Isoliquiritin; 14: Glycyrrhizic acid; 15: Isoliquiritigenin

Table 1 Regressive equations, correlation coefficients and linear ranges

Analyte	Regressive equation	Linear range /μg·mL^{-1}	r
Uridine	y = 1 459.22 x + 163.58	2.59−258.72	0.999 7
Adenosine	y = 905.39 x − 1 157.13	4.43−442.96	0.999 8
Goitrin	y = 389.43 x − 209.24	4.45−444.92	0.999 7
Neochlorogenic acid	y = 454.46 x − 710.83	10.25−1 025.08	0.999 6
Chlorogenic acid	y = 155.78 x − 564.67	44.94−4 494.28	0.999 9
Cryptochlorogenic acid	y = 857.26 x − 425.08	4.19−419.44	0.999 7
Caffeic acid	y = 105.09 x + 14.40	9.80−980.00	0.999 7
Liquiritin apioside	y = 900.69 x + 122.14	3.84−384.16	0.999 6
Liquiritin	y = 242.85 x + 388.16	5.78−578.20	0.999 8
Isochlorogenic acid B	y = 112.04 x − 94.84	20.97−2 097.20	0.999 7
Isochlorogenic acid A	y = 113.32 x + 784.86	10.58−1 058.40	0.999 8
Isochlorogenic acid C	y = 113.95 x − 6.93	15.88−1 587.60	0.999 8
Isoliquiritin	y = 233.97 x + 134.86	5.27−526.75	0.999 8
Glycyrrhizic acid	y = 172.65 x − 10.09	14.70−1 470.00	0.999 6
Isoliquiritigenin	y = 1 232.66 x + 194.19	1.57−156.80	0.999 8

1.3 精密度

15 种成分峰面积的 RSD 分别为 0.56%、0.65%、0.73%、0.49%、0.76%、0.57%、0.87%、0.93%、0.81%、0.67%、0.86%、0.87%、0.69%、0.93%、0.59%, 说明仪器精密度良好。

1.4 稳定性

15 种成分峰面积的 RSD 分别为 0.52%、0.74%、0.61%、0.88%、0.92%、0.83%、1.07%、1.11%、1.04%、1.09%、1.05%、1.13%、1.08%、1.07%、1.02%, 说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

1.5 重复性

15 种成分含量的 RSD 分别为 1.56%、1.26%、0.70%、1.04%、1.09%、0.73%、0.73%、1.16%、1.04%、1.12%、1.34%、1.37%、1.25%、0.99%、1.44%, 说明该方法重复性良好。

1.6 加样回收率

15 种成分含量的平均加样回收率分别为 97.5%、97.4%、97.3%、96.5%、97.8%、97.2%、98.4%、96.8%、97.4%、98.1%、97.7%、98.4%、98.2%、99.0% 和 97.2%, RSD 分别 1.40%、1.21%、1.05%、1.17%、1.19%、1.15%、1.23%、1.08%、0.57%、0.94%、0.86%、0.99%、1.18%、0.86% 和 1.39%; 表明本方法加样回收率良好。

1.7 相对校正因子的测定

相对校正因子计算结果, 内参物与 14 个成分 $f_{s/x}$ 的 RSD 均 < 3%, 结果见表 2。

1.8 耐用性试验

1.8.1 相对校正因子的重复性 3 种色谱柱各成分相对校正因子的 RSD 均小于 4%, 表明建立的相对校正因子在不同型号色谱系统和色谱柱重现性良好, 见表 3。

1.8.2 不同柱温对相对校正因子 不同柱温 (20、25、30、35、40 ℃) 各成分相对校正因子的 RSD 均小于 3%, 表明柱温对各成分校正因子无显著影响, 见表 4。

1.8.3 不同流速对相对校正因子 不同流速 (0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL·min^{-1}) 各成分相对校正因子的 RSD 均小于 3%, 表明体积流量对各成分校正因子无显著影响, 见表 5。

1.9 QAMS 法待测成分色谱峰的定位

各待测成分相对保留值的 RSD 均小于 3%, 表明相对保留值数值稳定, 可用于待测成分色谱峰的定位。

2 含量测定

2.1 QAMS 法与外标法测定结果的比较

取 15 批小儿咳喘灵口服液两种方法测定结果如表 6 所示。两种方法无明显差异 (RE < 5%)。

Table 2 Relative correction factors ($f_{s/x}$) of 14 components to chlorogenic acid. *f:* Relative correction factor; $f_{E/A}$: Chlorogenic acid / uridine; $f_{E/B}$: Chlorogenic acid / adenosine; $f_{E/C}$: Chlorogenic acid / goitrin; $f_{E/D}$: Chlorogenic acid / neochlorogenic acid; $f_{E/F}$: Chlorogenic acid / cryptochlorogenic acid; $f_{E/G}$: Chlorogenic acid / caffeic acid; $f_{E/H}$: Chlorogenic acid / liquiritin apioside; $f_{E/I}$: Chlorogenic acid / liquiritin; $f_{E/J}$: Chlorogenic acid / isochlorogenic acid B; $f_{E/K}$: Chlorogenic acid / isochlorogenic acid A; $f_{E/L}$: Chlorogenic acid / isochlorogenic acid C; $f_{E/M}$: Chlorogenic acid / isoliquiritin; $f_{E/N}$: Chlorogenic acid / glycyrrhizic acid; $f_{E/O}$: Chlorogenic acid / isoliquiritigenin

Mixed reference solution	$f_{E/A}$	$f_{E/B}$	$f_{E/C}$	$f_{E/D}$	$f_{E/F}$	$f_{E/G}$	$f_{E/H}$	$f_{E/I}$	$f_{E/J}$	$f_{E/K}$	$f_{E/L}$	$f_{E/M}$	$f_{E/N}$	$f_{E/O}$
1	0.118	0.190	0.399	0.377	0.194	1.498	0.172	0.642	1.407	1.377	1.381	0.665	0.983	0.126
2	0.115	0.195	0.404	0.367	0.196	1.519	0.175	0.624	1.427	1.384	1.403	0.674	0.976	0.128
3	0.116	0.196	0.393	0.377	0.200	1.504	0.173	0.651	1.461	1.354	1.422	0.624	1.006	0.122
4	0.117	0.193	0.397	0.375	0.197	1.490	0.171	0.604	1.459	1.312	1.372	0.661	0.978	0.123
5	0.111	0.196	0.407	0.364	0.192	1.405	0.176	0.634	1.414	1.313	1.302	0.664	0.999	0.127
6	0.118	0.199	0.399	0.367	0.194	1.498	0.172	0.641	1.407	1.377	1.380	0.665	0.963	0.126
Mean	0.12	0.19	0.40	0.37	0.20	1.49	0.17	0.63	1.43	1.35	1.38	0.66	0.98	0.13
RSD/%	2.28	1.57	1.25	1.57	1.44	2.74	1.12	2.64	1.75	2.43	2.97	2.67	1.61	1.87

Table 3　Relative correction factors ($f_{s/x}$) of chlorogenic acid to 14 components determined by different instruments and different columns

Instrument	C18 column	$f_{E/A}$	$f_{E/B}$	$f_{E/C}$	$f_{E/D}$	$f_{E/F}$	$f_{E/G}$	$f_{E/H}$	$f_{E/I}$	$f_{E/J}$	$f_{E/K}$	$f_{E/L}$	$f_{E/M}$	$f_{E/N}$	$f_{E/O}$
LC-2030C Plus	Kromasil	0.118	0.192	0.403	0.381	0.196	1.494	0.171	0.640	1.403	1.373	1.377	0.672	0.993	0.127
	Intersil	0.116	0.197	0.408	0.371	0.198	1.534	0.177	0.630	1.441	1.398	1.417	0.681	0.986	0.127
	Welchrom	0.117	0.195	0.397	0.381	0.202	1.495	0.172	0.647	1.452	1.346	1.413	0.620	1.000	0.124
Nexera XR	Kromasil	0.118	0.192	0.405	0.383	0.201	1.481	0.170	0.600	1.450	1.304	1.364	0.657	0.972	0.123
	Intersil	0.114	0.198	0.411	0.368	0.194	1.419	0.178	0.640	1.428	1.326	1.315	0.671	1.009	0.128
	Welchrom	0.117	0.201	0.403	0.371	0.196	1.513	0.174	0.647	1.421	1.391	1.394	0.672	0.973	0.127
Mean		0.12	0.20	0.40	0.38	0.20	1.49	0.17	0.63	1.43	1.36	1.38	0.66	0.99	0.13
RSD/%		1.18	1.84	1.20	1.74	1.59	2.62	1.78	2.80	1.33	2.74	2.75	3.30	1.50	1.75

Table 4　Effect of column temperature on relative correction factor of each component

Column temperature /℃	$f_{E/A}$	$f_{E/B}$	$f_{E/C}$	$f_{E/D}$	$f_{E/F}$	$f_{E/G}$	$f_{E/H}$	$f_{E/I}$	$f_{E/J}$	$f_{E/K}$	$f_{E/L}$	$f_{E/M}$	$f_{E/N}$	$f_{E/O}$
20	0.118	0.197	0.416	0.370	0.197	1.522	0.176	0.637	1.437	1.384	1.414	0.679	0.984	0.129
25	0.116	0.199	0.405	0.380	0.201	1.483	0.172	0.645	1.467	1.332	1.399	0.645	0.998	0.124
30	0.118	0.196	0.413	0.382	0.205	1.525	0.172	0.598	1.442	1.317	1.356	0.653	0.971	0.122
35	0.119	0.198	0.410	0.379	0.198	1.462	0.178	0.638	1.420	1.339	1.341	0.677	1.008	0.128
40	0.115	0.201	0.402	0.382	0.200	1.528	0.175	0.654	1.435	1.377	1.385	0.678	0.972	0.129
Mean	0.12	0.20	0.41	0.38	0.20	1.50	0.17	0.63	1.44	1.35	1.38	0.67	0.99	0.13
RSD/%	1.39	0.97	1.41	1.30	1.54	1.99	1.60	3.37	1.19	2.15	2.19	2.43	1.65	2.48

Table 5　Effect of column temperature on relative correction factor of each component

Volume flow /mL·min^{-1}	$f_{E/A}$	$f_{E/B}$	$f_{E/C}$	$f_{E/D}$	$f_{E/F}$	$f_{E/G}$	$f_{E/H}$	$f_{E/I}$	$f_{E/J}$	$f_{E/K}$	$f_{E/L}$	$f_{E/M}$	$f_{E/N}$	$f_{E/O}$
0.4	0.118	0.196	0.415	0.369	0.196	1.517	0.175	0.635	1.433	1.380	1.410	0.677	0.981	0.129
0.6	0.119	0.199	0.420	0.374	0.199	1.537	0.178	0.643	1.451	1.398	1.428	0.686	0.994	0.130
0.8	0.116	0.199	0.404	0.379	0.201	1.480	0.172	0.644	1.464	1.329	1.396	0.644	0.996	0.124
1.0	0.118	0.195	0.412	0.381	0.204	1.520	0.171	0.596	1.438	1.313	1.352	0.651	0.968	0.127
1.2	0.119	0.198	0.409	0.378	0.198	1.459	0.178	0.637	1.417	1.336	1.338	0.676	1.006	0.128
Mean	0.12	0.20	0.41	0.38	0.20	1.50	0.17	0.63	1.44	1.35	1.38	0.67	0.99	0.13
RSD/%	1.12	0.76	1.45	1.29	1.55	2.14	1.77	3.14	1.25	2.66	2.77	2.73	1.48	1.90

2.2　QAMS法的再验证

另取7批小儿咳喘灵口服液样品, 测定结果见表7, RSD均小于5%, 证明所建立的QAMS法具有实用价值。

3　化学计量分析

3.1　聚类分析

结果见图2。依据聚类分析树状图, 类间距在0～10之间, 22批样品可聚为4类, S3、S5、S6、S9、S12、S15、S16、S17、S21、S22为第Ⅰ类, S2、S4、S11、S14、S18、S20为第Ⅱ类, S7、S8、S10、S13、S19为第Ⅲ类; S1为第Ⅳ类; 结果显示小儿咳喘灵口服液中所测15种成分的含量差异可能与小儿咳喘灵口服液生产所用原药材的种属来源、产地、生长年限、采收季节及加工炮制方式等因素有关。

3.2　主成分分析

结果得到4个主成分, 累积贡献率达到81.706%。其中, 第一主成分λ = 6.854, 方差贡献率为45.695%,

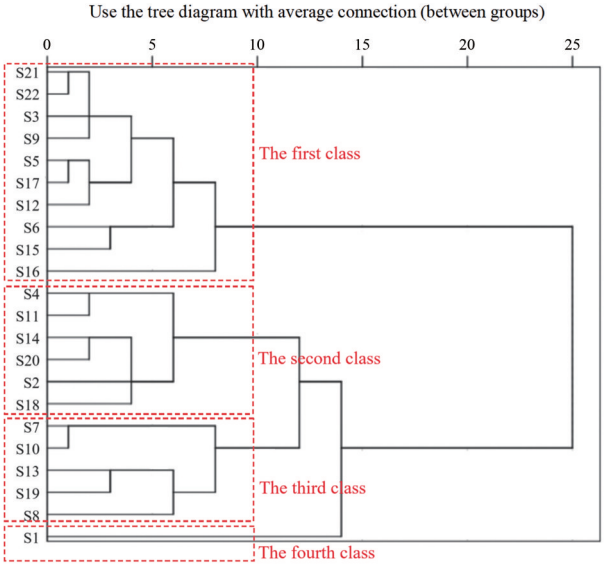


Figure 2　Cluster analysis tree diagram of 22 batches of Xiao'er Kechuanling oral liquid. Use the tree diagram with average connection (between groups)

Table 6 Comparison of content determination results between QAMS and ESM (mg·mL^{-1}). M stands for components; M1: Uridine; M2: Adenosine; M3: Goitrin; M4: Neochlorogenic acid; M5: Chlorogenic acid; M6: Cryptochlorogenic acid; M7: Caffeic acid; M8: Liquiritin apioside; M9: Liquiritin; M10: Isochlorogenic acid B; M11: Isochlorogenic acid A; M12: Isochlorogenic acid C; M13: Isoliquiritin; M14: Glycyrrhizic acid; M15: Isoliquiritigenin. S stands for batch number; S1: 202303002; S2: 20221203; S3: 20230815; S4: 202302001; S5: 20230623; S6: 20230524; S7: 20230515; S8: 20230321; S9: 230604; S10: 20230924; S11: 20230519; S12: 20231203; S13: 20231108; S14: 20231014; S15: 231019. ESM: External standard method; QAMS: Quantitative analysis of multi-components by single marker; RE: Relative error

Analyte	S1			S2			S3			S4			S5		
	ESM	QAMS	RE/%	ESM	QAMS	RE/%	ESM	QAMS	RE/%	ESM	QAMS	RE/%	ESM	QAMS	RE/%
M1	0.093 1	0.091 5	−1.72	0.088 7	0.087 5	−1.35	0.045 3	0.044 4	−1.99	0.069 6	0.068 4	−1.72	0.043 8	0.042 1	−3.88
M2	0.103 2	0.100 8	−2.33	0.083 5	0.082 2	−1.56	0.029 4	0.029 1	−1.02	0.088 5	0.087 3	−1.36	0.019 6	0.019 2	−2.04
M3	0.156 4	0.151 3	−3.26	0.182 8	0.177 1	−3.12	0.022 3	0.021 9	−1.79	0.125 7	0.123 2	−1.99	0.128 6	0.126 4	−1.71
M4	0.912 1	0.893 6	−2.03	0.523 6	0.511 4	−2.33	0.209 1	0.204 5	−2.20	0.533 4	0.524 3	−1.71	0.372 4	0.366 5	−1.58
M5	3.598 3	–	–	2.294 4	–	–	0.967 4	–	–	2.355 2	–	–	0.932 5	–	–
M6	0.356 4	0.352 6	−1.07	0.239 9	0.234 6	−2.21	0.028 4	0.027 8	−2.11	0.182 3	0.179 6	−1.48	0.208 5	0.205 7	−1.34
M7	0.030 2	0.029 2	−3.31	0.193 4	0.192 4	−0.52	0.094 5	0.090 9	−3.81	0.094 3	0.090 6	−3.92	0.087 7	0.086 5	−1.37
M8	0.098 3	0.096 4	−1.93	0.138 3	0.135 3	−2.17	0.109 2	0.107 7	−1.37	0.034 5	0.033 3	−3.48	0.009 3	0.008 9	−4.30
M9	0.527 4	0.518 5	−1.69	0.428 4	0.425 8	−0.61	0.173 4	0.173 2	−0.12	0.157 6	0.154 1	−2.22	0.263 4	0.259 4	−1.52
M10	1.932 2	1.893 2	−2.02	1.318 3	1.299 1	−1.46	2.448 1	2.407 5	−1.66	0.981 7	0.965 4	−1.66	2.648 6	2.604 6	−1.66
M11	0.964 4	0.958 4	−0.62	0.358 7	0.354 3	−1.23	0.885 6	0.877 6	−0.90	1.002 5	0.985 3	−1.72	0.894 6	0.879 3	−1.71
M12	1.534 5	1.523 5	−0.72	1.062 5	1.054 6	−0.74	0.362 3	0.356 4	−1.63	0.894 4	0.879 2	−1.70	0.949 8	0.933 4	−1.73
M13	0.177 7	0.176 3	−0.79	0.173 8	0.171 6	−1.27	0.117 6	0.115 6	−1.70	0.123 3	0.121 1	−1.78	0.113 3	0.111 3	−1.77
M14	1.445 2	1.401 4	−3.03	0.984 8	0.968 0	−1.71	0.194 7	0.191 5	−1.64	1.111 5	1.093 7	−1.60	0.665 4	0.654 4	−1.65
M15	0.018 4	0.018 1	−1.63	0.017 9	0.017 4	−2.79	0.008 8	0.008 6	−2.27	0.024 3	0.024 1	−0.82	0.013 2	0.013 1	−0.76

Analyte	S6			S7			S8			S9			S10		
	ESM	QAMS	RE/%	ESM	QAMS	RE/%	ESM	QAMS	RE/%	ESM	QAMS	RE/%	ESM	QAMS	RE/%
M1	0.085 7	0.084 3	−1.63	0.069 5	0.068 4	−1.58	0.066 4	0.065 3	−1.66	0.043 6	0.042 9	−1.61	0.066 4	0.065 5	−1.36
M2	0.087 6	0.084 5	−3.54	0.088 7	0.087 6	−1.24	0.084 5	0.081 1	−4.02	0.029 5	0.029 3	−0.68	0.084 3	0.083 4	−1.07
M3	0.176 3	0.173 7	−1.47	0.125 3	0.123 3	−1.60	0.121 6	0.118 3	−2.71	0.028 3	0.028 1	−0.71	0.125 2	0.119 7	−4.39
M4	0.503 5	0.495 5	−1.59	0.673 7	0.662 7	−1.63	0.514 7	0.505 4	−1.81	0.272 4	0.267 3	−1.87	0.812 1	0.799 4	−1.56
M5	1.216 4	–	–	2.355 3	–	–	3.269 2	–	–	0.931 2	–	–	2.263 3	–	–
M6	0.231 2	0.227 7	−1.51	0.312 2	0.307 8	−1.41	0.272 4	0.265 4	−2.57	0.117 3	0.115 6	−1.45	0.271 3	0.267 3	−1.47
M7	0.192 4	0.189 3	−1.61	0.097 7	0.094 5	−3.28	0.077 6	0.075 1	−3.22	0.082 5	0.081 7	−0.97	0.095 4	0.093 3	−2.20
M8	0.255 4	0.253 7	−0.67	0.134 6	0.132 4	−1.63	0.033 6	0.032 3	−3.87	0.009 6	0.009 4	−2.08	0.033 6	0.032 9	−2.08
M9	0.511 3	0.500 3	−2.15	0.457 3	0.449 3	−1.75	0.114 7	0.113 6	−0.96	0.262 3	0.258 6	−1.41	0.439 8	0.433 2	−1.50
M10	1.852 2	1.821 0	−1.68	1.181 5	1.161 2	−1.72	1.638 8	1.626 3	−0.76	2.642 4	2.558 5	−3.18	1.135 3	1.116 3	−1.67
M11	0.785 3	0.767 0	−2.33	1.902 4	1.857 7	−2.35	1.832 4	1.802 8	−1.62	0.892 5	0.887 7	−0.54	1.828 4	1.798 9	−1.61
M12	0.542 2	0.533 5	−1.60	0.894 3	0.879 2	−1.69	1.461 5	1.447 5	−0.96	0.348 4	0.338 3	−2.90	0.959 2	0.943 8	−1.61
M13	0.167 6	0.164 6	−1.79	0.123 9	0.121 5	−1.94	0.119 3	0.117 4	−1.59	0.113 3	0.112 4	−0.79	0.118 7	0.116 4	−1.94
M14	0.335 4	0.329 3	−1.82	0.911 4	0.896 7	−1.61	0.478 5	0.474 7	−0.79	0.763 4	0.754 6	−1.15	0.876 4	0.861 5	−1.70
M15	0.017 6	0.016 9	−3.98	0.014 5	0.014 1	−2.76	0.026 5	0.025 9	−2.26	0.019 9	0.019 4	−2.51	0.027 9	0.027 5	−1.43

Analyte	S11			S12			S13			S14			S15		
	ESM	QAMS	RE/%	ESM	QAMS	RE/%	ESM	QAMS	RE/%	ESM	QAMS	RE/%	ESM	QAMS	RE/%
M1	0.089 3	0.087 8	−1.68	0.045 3	0.044 1	−2.65	0.069 5	0.068 2	−1.87	0.085 3	0.089 3	0.087 8	0.089 5	0.088 5	−1.12
M2	0.083 4	0.082 6	−0.96	0.049 4	0.048 5	−1.82	0.088 6	0.087 2	−1.58	0.095 8	0.083 4	0.082 6	0.084 5	0.083 3	−1.42
M3	0.183 2	0.182 2	−0.55	0.039 8	0.038 7	−2.76	0.125 7	0.123 6	−1.67	0.176 3	0.183 2	0.182 2	0.184 3	0.182 4	−1.03
M4	0.323 6	0.312 8	−3.34	0.783 6	0.772 1	−1.47	0.534 3	0.525 4	−1.67	0.501 8	0.323 6	0.312 8	0.753 9	0.752 6	−0.17
M5	2.323 5	–	–	0.965 4	–	–	3.436 2	–	–	2.234 4	2.323 5	–	1.306 5	1.294 3	−0.93
M6	0.243 7	0.233 9	−4.02	0.127 7	0.125 3	−1.88	0.283 5	0.278 3	−1.83	0.348 3	0.243 7	0.233 9	0.241 2	0.239 1	−0.87
M7	0.102 8	0.101 1	−1.65	0.094 5	0.092 1	−2.54	0.081 6	0.081 2	−0.49	0.127 4	0.102 8	0.101 1	0.185 1	0.184 3	−0.43
M8	0.135 4	0.133 6	−1.33	0.009 2	0.008 9	−3.26	0.134 7	0.132 1	−1.93	0.055 5	0.135 4	0.133 6	0.169 8	0.168 4	−0.82
M9	0.329 5	0.325 4	−1.24	0.273 4	0.268 4	−1.83	0.158 3	0.155 3	−1.90	0.522 6	0.329 5	0.325 4	0.431 3	0.428 5	−0.65
M10	0.927 7	0.921 2	−0.70	2.755 3	2.709 5	−1.66	1.184 9	1.164 5	−1.72	1.848 2	0.927 7	0.921 2	1.929 8	1.918 3	−0.60
M11	0.812 3	0.793 9	−2.27	0.935 6	0.915 7	−2.13	1.906 8	1.854 6	−2.74	0.778 8	0.812 3	0.793 9	0.821 5	0.808 2	−1.62
M12	0.564 5	0.557 5	−1.24	1.363 1	1.342 1	−1.54	0.896 4	0.881 3	−1.68	1.241 5	0.564 5	0.557 5	0.571 6	0.562 3	−1.63
M13	0.174 3	0.173 1	−0.69	0.118 8	0.116 3	−2.10	0.123 6	0.121 6	−1.62	0.167 7	0.174 3	0.173 1	0.176 5	0.173 7	−1.59
M14	1.088 7	1.070 0	−1.72	0.796 6	0.783 6	−1.63	0.813 7	0.807 0	−0.82	1.248 6	1.088 7	1.070 0	0.998 2	0.984 3	−1.39
M15	0.018 9	0.018 4	−2.65	0.012 3	0.012 1	−1.63	0.022 2	0.021 4	−3.60	0.027 1	0.018 9	0.018 4	0.021 6	0.021 2	−1.85

Table 7　Contents of chlorogenic acid determined and the contents of 14 other components calculated by QAMS method in seven batches of Xiao'er Kechuanling oral liquid. S16: 20231213; S17: 20230925; S18: 20230827; S19: 202311004; S20: 20231126; S21: 20230811; S22: 20231208

Analyte	S16	S17	S18	S19	S20	S21	S22
M1	0.045 6	0.045 5	0.085 2	0.069 3	0.088 3	0.043 5	0.044 5
M2	0.039 7	0.024 4	0.072 3	0.088 4	0.115 4	0.009 3	0.019 6
M3	0.045 3	0.054 6	0.175 5	0.126 4	0.183 2	0.028 4	0.022 7
M4	0.183 4	0.484 3	0.345 7	0.536 7	0.922 4	0.273 5	0.245 3
M5	1.967 3	0.968 6	2.206 2	3.317 3	2.332 2	0.934 6	0.921 4
M6	0.122 3	0.333 3	0.109 3	0.183 5	0.239 3	0.218 3	0.213 2
M7	0.079 6	0.065 2	0.175 5	0.087 7	0.191 6	0.045 4	0.048 7
M8	0.123 2	0.032 3	0.154 4	0.134 6	0.069 4	0.139 8	0.102 8
M9	0.273 1	0.174 5	0.419 7	0.359 3	0.449 3	0.263 2	0.238 9
M10	2.748 3	2.761 7	1.844 8	0.886 4	1.923 4	2.654 3	2.625 4
M11	0.927 2	0.932 3	0.777 1	1.911 2	0.816 7	0.896 4	0.827 3
M12	0.362 4	0.864 4	0.543 2	0.898 3	1.163 6	0.749 5	0.724 5
M13	0.117 5	0.118 8	0.167 7	0.124 5	0.174 5	0.113 1	0.111 6
M14	1.034 6	0.798 3	0.946 5	1.425 1	0.986 2	0.267 2	0.254 7
M15	0.012 7	0.008 1	0.016 3	0.024 9	0.017 3	0.011 3	0.021 3

贡献率最大, 包含信息最多; 第二主成分λ = 2.970, 方差贡献率为19.800%; 第三主成分λ = 1.587, 方差贡献率为10.582%; 第四主成分λ = 0.845, 方差贡献率为5.630%, 因子载荷矩阵结果显示, 成分M2、M1、M3、M13在第一主成分中有明显的正相负荷, 表明它们在增加, 第一主成分增大; 成分M11、M12、M55、M6在第二主成分有明显的正相负荷, 成分M13、M9、M1、M3有逆负荷; 成分M12、M10、M5、M6; 在第三主成分对主成分起到正相关的作用; 成分M8、M6、M11、M9是第四主成分中主要决定因子, 见PCA碎石图3。

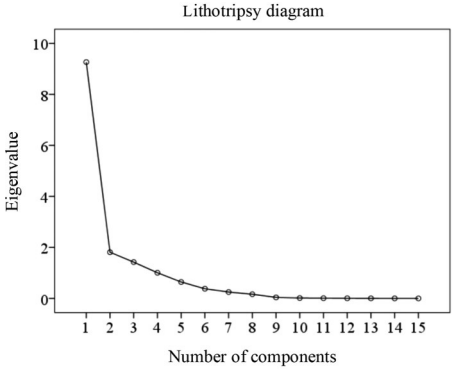


Figure 3　PCA scree plot of various samples

讨论

本研究运用二极管阵列检测器在200～800 nm扫描, 确定在254 nm时有15个成分的有理想的分离度等, 故作为检测波长。依据文献[2,3]采用梯度洗脱, 经过试验确定了梯度洗脱方法。比较了不同品牌的反相C18色谱柱。依据文献[14,15]选择流动相系统为甲醇−0.1%甲酸水溶液、比较不同柱温 (20、25、30、35、40 ℃)、不同流速 (0.6、0.8、1.0、1.2 mL·min^{-1}); 结果采用Kromasil C18柱、流动相系统甲醇−0.1%甲酸水溶液、柱温为30 ℃、流速为1.0 mL·min^{-1}, 作为检测色谱条件。

小儿咳喘灵口服液样品目标峰的出峰时间及其最大吸收波长与对照品、各阴性对照溶液比对, 以及文献研究; 文献报道板蓝根含有尿苷、腺苷、(*R*,*S*)-告依春等成分[8-10]; 金银花含有新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸B、异绿原酸A、异绿原酸C等成分[2-4]; 甘草含有甘草苷、芹糖甘草苷、异甘草苷、甘草酸、异甘草素等成分[12-15]; 通过试验确定该方法目标峰处无干扰峰出现, 说明该方法专属性强。

校正因子有绝对校正因子和相对校正因子之分。对色谱法而言, 中国药典将绝对校正因子定义为单位面积的色谱峰代表的待测物质的量, 将相对校正因子定义为测定物质与所选定的参照物质的绝对校正因子之比[23]。近年来, QAMS应用于中药多成分定量的研究报道逐渐增多, 但几乎均只有所报道的样品QAMS计算结果与ESM测定结果的比较, 很少采用其他样品在其他仪器、色谱柱验证所建立方法的实际应用价值。本研究另取多批样品, 在不同仪器不同色谱柱对所建立的方法进行了实用性验证, 结果证明所建立的方法可实际应用于该制剂中15成分含量测定, 而进行质量评价。

22批做聚类分析与主成分分析研究, 结果22批样品聚类分析分成4类; 主成分分析提取了4个主成分, 贡献率达到81.706%。

本研究建立了HPLC-QAMS 同时测定小儿咳喘灵口服液物中15个成分的含量, 该方法测得结果与外

标法测得结果无显著差异。因此, 该方法操作简便, 结果准确, 重复性好, 能够更全面有效地控制质量及为药品质量评价提供方法; 多成分的定量分析为临床应用提供依据, 为后续研究提供基础。

作者贡献: 王媛为第一作者, 负责实验设计、液相条件的摸索和稿件编写; 杨元硕负责液相数据分析、文献的研究和整理; 师煜军提出实验思路, 负责指导实验设计; 通讯作者李思治全面负责实验设计、稿件撰写与修改等。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

[1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2020 Ed. Vol 1. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 77, 88, 116, 210, 214, 230, 569.

[2] Song YL, Wang HM, Ni FY, et al. Study on anti-inflammatory activities of phenolic acids from Lonicerae Japonicae Flos [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2015, 46: 490-495.

[3] Zhang MM, Zhao ZG, Liu Q, et al. Rapid discovery of trace antioxidants in Lonicerae Japonicae Flos by 2D- HPLC-DPPH-ESI-TOF/MS [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2021, 52: 3193-3200.

[4] Liu MY, Gao SL, Liu LH, et al. Simultaneous determination of six organic acids in Lonicerae Japonicae Flos and Lonicerae Flos in different habitats by HPLC [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2013, 36: 196-198.

[5] Tai J, Ma HY. Research progress on the anti-virus effect of Lonicerae Flos [J]. Chin Med Mod Distance Educ China (中国中医药现代远程教育), 2022, 20: 200-203.

[6] Ma L. Research on the pharmacological effects of honeysuckle [J]. Guangming J Chin Med (光明中医), 2020, 35: 3308-3310.

[7] Yang ZZ, Lu DW, Lu ZY. Research progress on pharmacological effect of Lonicerae Japonicae Flos [J]. Guangzhou Chem Ind (广州化工), 2016, 44: 18-19, 39.

[8] Yin SN, Zhang CH, Wang HY. Study on specific chromatograms of Isatidis Radix and content determination of three components in Isatidis Radix [J]. China Pharm (中国药业), 2018, 27: 15-18.

[9] Huang Y, Dong FY, Li CY. Research progress on the determination methods of main chemical components in Radix Isatidis [J]. China Pharm (中国药业), 2020, 29: 150-156.

[10] Yang CW. Pharmacological research progress of Isatidis Radix [J]. Chin J Mod Drug Appl (中国现代药物应用), 2016, 10: 282-283.

[11] Yi N. Discussion on the progress of the anti-influenza virus effect of traditional Chinese medicine [J]. Heilongjiang Med J (黑龙江医药), 2021, 34: 306-308.

[12] Han WW, Fang DJ, Li LJ, et al. Research progress on chemical constituents and biological activities of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch [J]. Chem Eng (化学工程师), 2022, 36: 56-58, 67.

[13] Xiao X, Li CY, Liu XL, et al. Research progress of main chemical constituents and pharmacological effects of Glycyrrhize Radix et Rhizoma [J]. J Xinxiang Med Univ (新乡医学院学报), 2023, 40: 280-285.

[14] Song X, Liu SJ, Fan J, et al. Discussion on clinical application based on the differences of chemical composition and pharmacological action between Radix Glycyrrhizae Preparata and raw Radix Glycyrrhizae [J]. China Med Pharm (中国医药科学), 2022, 12: 114-117, 159.

[15] Li N, Zhang C, Zhong GS, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of different varieties of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma and predictive analysis of quality markers [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2021, 52: 7680-7692.

[16] Han L, Shi QY. Quantitative analysis of main components in Xiao'er Kechuanling oral solution by high performance liquid chromatography-diode array detector [J]. J Pediatr Pharm (儿科药学杂志), 2020, 26: 51-55.

[17] Qian YF, Lu LL, Zhang HF, et al. Quality evaluation of Xiao'er Kechuanling oral liquid based on multi-component determination [J]. Cent South Pharm (中南药学), 2021, 19: 276-281.

[18] Bi FJ, Lin T. Simultaneous determination of ephedrine hydrochloride and pseudoephedrine hydrochloride in Xiao'er Kechuanling oral liquid by HPLC [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol (中药新药与临床药理), 2014, 25: 490-493.

[19] Yuan Y, Zhong SS, Zhang HF, et al. Simultaneous determination of seven preservatives in Xiao'er Kechuanling oral liquid by HPLC [J]. China Pharm (中国药师), 2020, 23: 2473-2476.

[20] Qin KM, Yang B, Hu J, et al. Application status and thinking of quantitative analysis of multi-components by single marker in quality control of multi-components traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2018, 49: 725-731

[21] Zhu C, Li X, Zang B, et al. Quantitative analysis of multi-components by single marker-a rational method for the internal quality of Chinese herbal medicine [J]. Integr Med Res, 2017, 6: 1-11. https://doi.org/10.1016/j.imr.2017.01.008.

[22] Dong Y, Guo Q, Liu J, et al. Simultaneous determination of seven phenylethanoid glycosides in Cistanches Herba by a single marker using a new calculation of relative correction factor [J]. J Sep Sci, 2018, 41: 1913.

[23] Liu YL, Cai WH, Dou ZH, et al. Simultaneous determination of 12 lignans in Schisandrae Chinensis Fructus by quantitative analysis of multi-components with single marker [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2019, 39: 1207-1216.