

桔贝合剂 HPLC 特征图谱的建立和 HPLC-ELSD 同时测定 6 种成分含量

刘斌, 王涛, 张明, 丁富娟(泰安市食品药品检验检测研究院, 山东 泰安 271000)

摘要: 目的 建立桔贝合剂的 HPLC 特征图谱, 并采用 HPLC-ELSD 同时测定其中 6 种成分的含量。方法 建立桔贝合剂 HPLC 特征图谱, 色谱柱为 Agilent ZORBAX-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B), 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温为 30 ℃, 检测波长为 250 nm; 含量测定采用 HPLC-ELSD, 色谱柱为 Waters T3 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈(A)-1%乙酸水溶液(B), 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温为 30 ℃。结果 建立了以黄芩苷为参照峰的 HPLC 特征图谱, 确定了 8 个共有特征峰; 苦杏仁苷、甘草苷、贝母素甲、贝母素乙、桔梗皂苷 D 和麦冬皂苷 D 在各自范围内线性关系良好($r \geq 0.999$), 平均回收率分别为 99.1%, 98.6%, 100.9%, 97.7%, 98.9% 和 98.0%, RSD 分别为 0.4%, 1.0%, 1.1%, 1.2%, 0.7%, 1.3%。结论 本研究建立的方法可对桔贝合剂进行定性鉴别和定量测定, 能够有效评价与控制桔贝合剂质量。

关键词: 桔贝合剂; HPLC 特征图谱; 苦杏仁苷; 甘草苷; 贝母素甲; 贝母素乙; 桔梗皂苷 D; 麦冬皂苷 D

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2023)13-1827-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20221510

引用本文: 刘斌, 王涛, 张明, 等. 桔贝合剂 HPLC 特征图谱的建立和 HPLC-ELSD 同时测定 6 种成分含量[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(13): 1827-1832.

Establishment of Characteristic HPLC Chromatograms and Simultaneous Determination of Six Components by HPLC-ELSD of Jubei Mixture

LIU Bin, WANG Tao, ZHANG Ming, DING Fujuan(Tai'an Testing Institute for Food and Drug Control, Tai'an. 271000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish characteristic HPLC chromatograms for Jubei mixture, and to simultaneous determine its six components by HPLC-ELSD. **METHODS** An HPLC specific chromatogram of the Jubei mixture was established. The chromatographic column was Agilent ZORBAX-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), gradient elution was conducted with acetonitrile(A)-0.1% phosphoric acid aqueous solution(B) as the mobile phase, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the column temperature was 30 ℃, the detection wavelength was 250 nm. An HPLC-ELSD method was established and the chromatography was accomplished on a Waters T3 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column, the mobile phase consisted of acetonitrile(A)-1% acetic acid aqueous solution(B) in a gradient mode, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the column temperature was set at 30 ℃. **RESULTS** The characteristic chromatograms of the HPLC with baicalin as the reference peak was established, and eight common peaks were defined. The linear ranges of amygdalin, liquiritin, peimine, peiminine, platycodin D and ophiopogonin D were good within their own ranges($r \geq 0.999$). The average recovery were 99.1%, 98.6%, 100.9%, 97.7%, 98.9% and 98.0%, RSD were 0.4%, 1.0%, 1.1%, 1.2%, 0.7% and 1.3%, respectively. **CONCLUSION** The established methods can be used to qualitative identification and quantitative determination of Jubei mixture, can effectively used for evaluation and quality control of Jubei mixture.

KEYWORDS: Jubei mixture; HPLC specific chromatogram; amygdalin; liquiritin; peimine; peiminine; platycodin D; ophiopogonin D

桔贝合剂由桔梗、浙贝母、苦杏仁、麦冬、黄芩、枇杷叶、甘草 7 味中药组成, 具有润肺止咳功效, 用于治疗肺热咳嗽、痰稠色黄、咯痰不爽^[1]。桔贝合剂现行标准为卫生部颁药品标准《中药成方制剂》第二册, 检验项目仅规定了性状以及检查项^[1], 未涉及处方中药味的定性及定量等质量控制项目, 产品易出现质量不均一, 品质降低,

疗效不佳的情况。查阅文献, 对桔贝合剂的研究多是单一指标成分或个别药味的定性和定量试验^[2-5], 未见关于桔贝合剂中多指标的综合评价和探索的研究。本研究以黄芩苷为参照峰建立了桔贝合剂的 HPLC 特征图谱, 并采用 HPLC-ELSD 对桔贝合剂中的苦杏仁苷、甘草苷、贝母素甲、贝母素乙、桔梗皂苷 D 和麦冬皂苷 D 6 种成分进行了含量测

作者简介: 刘斌, 男, 硕士, 主管药师 E-mail: 185799841@qq.com

定,可以较快速地评价桔贝合剂的质量,为其质量控制提供一些科学依据。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AT 高效液相色谱仪、SPD-M20A 二极管阵列检测器、LC-2030 高效液相色谱仪、LC solution 工作站均购自日本岛津公司; Alltech CHROM ELSD6000 蒸发光检测器(美国奥泰公司); XS205DU 型十万分之一电子天平(梅特勒托利多)。

1.2 试药

对照药材:枇杷叶(批号:121261-201804)、苦杏仁(批号:121554-201204)、黄芩(批号:120955-201810)、甘草(批号:120904-202021)均购自亳州金芍堂中药饮片有限公司。对照品:绿原酸(批号:110753-201314;纯度:96.6%)、苦杏仁苷(批号:110820-201607;纯度:90.7%)、苯甲酸(批号:100419-201703;纯度:99.9%)、黄芩苷(批号:110715-202122;纯度:94.2%)、汉黄芩苷(批号:112002-201702;纯度:98.5%)、黄芩素(批号:111595-201808;纯度:97.9%)、甘草酸铵(批号:110731-202021;纯度:按100%计)、汉黄芩素(批号:111514-201706;纯度:100%)、甘草苷(批号:111610-201106;纯度:93.7%)、贝母素甲(批号:110750-201913;纯度:98.4%)、贝母素乙(批号:110751-201712;纯度:97.7%)、桔梗皂苷D(批号:111851-201708;纯度:97.9%)均购自中国食品药品检验研究院;麦冬皂苷D对照品(成都曼斯特生物科技有限公司,批号:MUST-21051503;纯度:98.72%)。桔贝合剂样品共13批次,1~5号样品批号分别为323210161,323210181,323210201,323200081,323200071,均购自鲁南厚普制药有限公司;6~10号样品批号分别为200313,210116,210203,210306,210506,均购自江西诚志永丰药业有限公司;11~13号样品批号分别为20030018,20070014,20090005,均购自太极集团重庆涪陵制药厂。甲醇、乙腈为色谱纯,磷酸、冰醋酸、三氯甲烷、氨水均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 特征图谱

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Agilent ZORBAX-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(0~10 min,20%→25%A;10~35 min,25%→40%A;35~40 min,40%→50%A;40~45 min,50%A);柱温30℃;流速1.0 mL·min⁻¹;检测波长250 nm;进样量10 μL。

2.1.2 溶液的制备

2.1.2.1 混合对照品溶液的制备 取绿原酸、苦杏仁苷、苯甲酸、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、甘草酸铵和汉黄芩素对照品适量,精密称定,加甲醇制成分别含绿原酸12.68 μg·mL⁻¹、苦杏仁苷18.25 μg·mL⁻¹、苯甲酸225.72 μg·mL⁻¹、黄芩苷199.33 μg·mL⁻¹、汉黄芩苷101.85 μg·mL⁻¹、黄芩素12.79 μg·mL⁻¹、甘草酸铵22.42 μg·mL⁻¹、汉黄芩素11.10 μg·mL⁻¹的混合对照品溶液,用0.45 μm微孔滤膜滤过,即得混合对照品溶液。

2.1.2.2 对照药材溶液的制备 取枇杷叶、苦杏仁、黄芩、甘草对照药材各2 g,加水25 mL加热回流1 h,滤过,精密量取滤液5 mL置50 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液作为对照药材溶液。

2.1.2.3 供试品溶液的制备 精密量取桔贝合剂5 mL,置50 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.1.3 参照峰(S)的选择 精密吸取混合对照品溶液和供试品溶液注入液相色谱仪分析,得混合对照品色谱图和供试品色谱图。见图1。结果表明,黄芩苷峰的保留时间居中适宜,峰型良好且峰面积较大。考虑到桔贝合剂处方中黄芩药味的指标性成分黄芩苷贯穿整个制备工艺过程,有利于桔贝合剂的质量控制,故选用黄芩苷作为参照峰(S)。

2.1.4 仪器精密度试验 取样品(批号:20030018),按“2.1.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件连续进样6次,记录色谱图。以黄芩苷为参照峰,计算图谱中各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果各共有峰相对保留时间RSD范围在0.08%~0.24%,表明仪器精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 取样品(批号:20030018),按“2.1.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件分别在0,2,4,8,12,16 h进样,记录色谱图。以黄芩苷为参照峰,计算图谱中各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果各共有峰相对保留时间RSD在0.15%~0.50%,各共有峰相对峰面积RSD在0.36%~0.72%,表明供试品在16 h内稳定性良好。

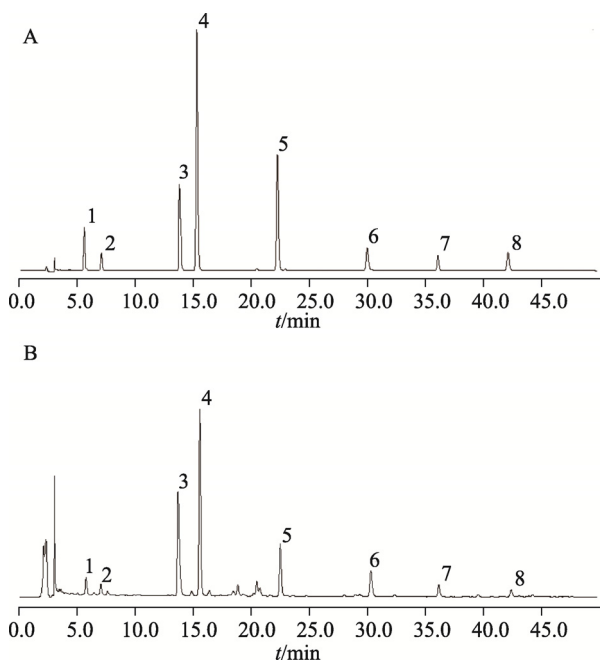


图1 混合对照品溶液(A)和供试品溶液(B)HPLC 色谱图
1-绿原酸; 2-苦杏仁苷; 3-苯甲酸; 4-黄芩苷; 5-汉黄芩苷; 6-黄芩素; 7-甘草酸铵; 8-汉黄芩素。

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference solution (A) and sample solution (B)
1-chlorogenic acid; 2-amygdalin; 3-benzoic acid; 4-baicalin; 5-wogonoside; 6-baicalin; 7-ammonium glycyrrhizinate; 8-wogonin.

2.1.6 重复性试验 取同一批样品(批号: 20030018), 按“2.1.2.3”项下方法平行制备供试品溶液 6 份, 按“2.1.1”项下色谱条件进样并记录色谱图。以黄芩苷为参照峰, 计算图谱中各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果各共有峰相对保留时间 RSD 为 0.16%~0.44%, 各共有峰相对峰面积 RSD 为 0.57%~0.92%, 表明该方法重复性良好。

2.1.7 特征图谱生成 取 13 批桔贝合剂样品, 按“2.1.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样并记录色谱图。使用“中药色谱指纹图谱相似度评价软件”2012A 版进行共有峰匹配, 选择重复性好、分离度较高, 可归属到处方药味的 8 个色谱峰作为共有峰, 生成 13 批样品的 HPLC 特征图谱, 见图 2。以保留时间适中、峰面积较大、分离度较好的 4 号峰(黄芩苷)为参照, 计算共有峰的相对保留时间。

2.1.8 共有峰相对保留时间规定值的确定 以黄芩苷为参照峰, 计算 8 个共有峰的相对保留时间。以 13 批桔贝合剂的 HPLC 特征图谱中 8 个共有峰的相对保留时间平均值为规定值, 分别为 0.37(峰 1)、0.45(峰 2)、0.88(峰 3)、1.00(峰 4)、1.44(峰 5)、1.95(峰 6)、2.32(峰 7)、2.72(峰 8), 偏差均应在±2%以内。

2.1.9 共有峰指认及归属 通过与对照药材溶液进行比较, 可判定 1 号色谱峰来自枇杷叶, 2 号色谱峰来自苦杏仁, 4 号、5 号、6 号、8 号色谱峰来自黄芩, 7 号色谱峰来自甘草。再进行对照品定位及紫外光谱比较, 确定峰 1 为绿原酸, 峰 2 为苦杏仁苷, 峰 3 为苯甲酸, 峰 4 为黄芩苷, 峰 5 为汉黄芩苷, 峰 6 为黄芩素, 峰 7 为甘草酸铵, 峰 8 为汉黄芩素。见图 1。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Waters T3 C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-1%乙酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~22 min, 10%→40%A; 22~28 min, 40%→60%A; 28~35 min, 60%A); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 30 ℃; ELSD 检测: 漂移管温度 110 ℃, 气

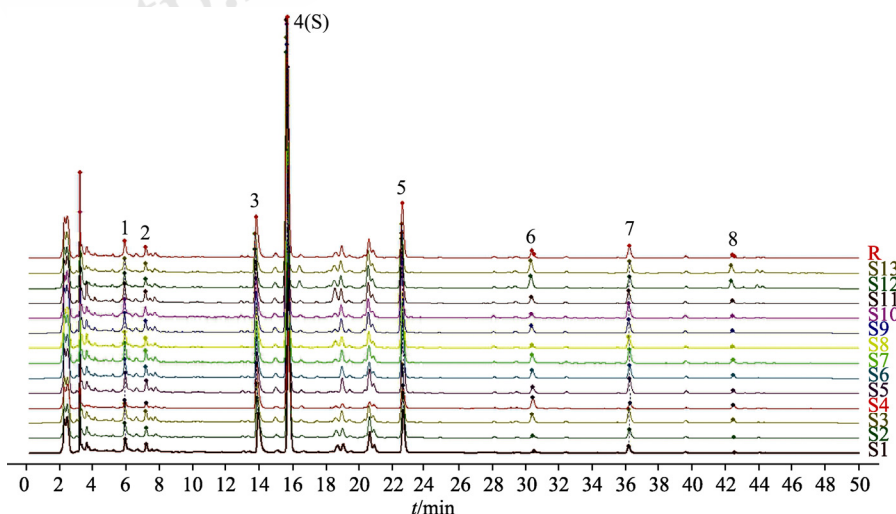


图2 HPLC 特征图谱

Fig. 2 HPLC characteristic chromatogram

体流量 $3.1 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。分别精密吸取对照品溶液 10, 20 μL , 供试品溶液 10 μL , 注入液相色谱仪测定, 用外标两点法对数方程分别计算苦杏仁苷、甘草苷、贝母素甲、贝母素乙、桔梗皂苷 D 和麦冬皂苷 D 的含量, 分离度均 >1.5 , 理论板数按苦杏仁苷色谱峰计应 ≥ 5000 。

2.2.2 溶液的制备

2.2.2.1 对照品储备液和对照品溶液 精密称取苦杏仁苷、甘草苷、贝母素甲、贝母素乙、桔梗皂苷 D 和麦冬皂苷 D 对照品适量, 分别加甲醇制成浓度为 1.10, 0.558, 0.520, 0.580, 0.415, 0.468 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。再分别精密量取储备液 1 mL, 置于同一 25 mL 量瓶中, 加甲醇制成苦杏仁苷、甘草苷、贝母素甲、贝母素乙、桔梗皂苷 D 和麦冬皂苷 D 浓度分别为 44.0, 22.3, 20.8, 23.2, 16.6, 18.7 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.2.2.2 供试品溶液的制备 精密量取桔贝合剂 20 mL 置烧瓶中, 加浓氨试液调节 pH 值至 11, 加三氯甲烷 40 mL, 置 80°C 水浴中加热回流 1 h, 放冷, 分取三氯甲烷液, 水相用三氯甲烷提取 2 次, 每次 20 mL, 合并三氯甲烷液, 蒸干, 残渣加甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜($0.45 \mu\text{m}$)滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2.2.3 阴性对照溶液 按照桔贝合剂的处方比例, 分别制备缺苦杏仁、甘草、浙贝母、桔梗、

麦冬的阴性样品, 按“2.2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液。

2.2.3 专属性试验 分别取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图。结果表明供试品溶液中苦杏仁苷、甘草苷、贝母素甲、贝母素乙、桔梗皂苷 D 和麦冬皂苷 D 的色谱峰与对照品溶液中的保留时间一致, 阴性对照溶液中在苦杏仁苷、甘草苷、贝母素甲、贝母素乙、桔梗皂苷 D 和麦冬皂苷 D 对照品的相同保留时间处无干扰峰, 表明处方中其他药味对测定结果无影响, 方法的专属性良好。见图 3。

2.2.4 线性关系考察 分别精密吸取“2.2.2.1”项下苦杏仁苷、甘草苷、贝母素甲、贝母素乙、桔梗皂苷 D 和麦冬皂苷 D 对照品储备液各 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 4 mL, 分别置 25 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 制成系列质量浓度的混合对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件依法测定。以质量浓度对数值($\lg C, X, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)对峰面积对数值($\lg A, Y$)进行线性回归, 分别绘制标准曲线和回归方程, 结果表明 6 种成分在线性范围内线性良好, 结果见表 1。

2.2.5 仪器精密度试验 取“2.2.2.1”项下混合对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件, 进样 6 次, 测定峰面积, 以峰面积考察各成分精密度, 苦杏仁苷、甘草苷、贝母素甲、贝母素乙、桔梗

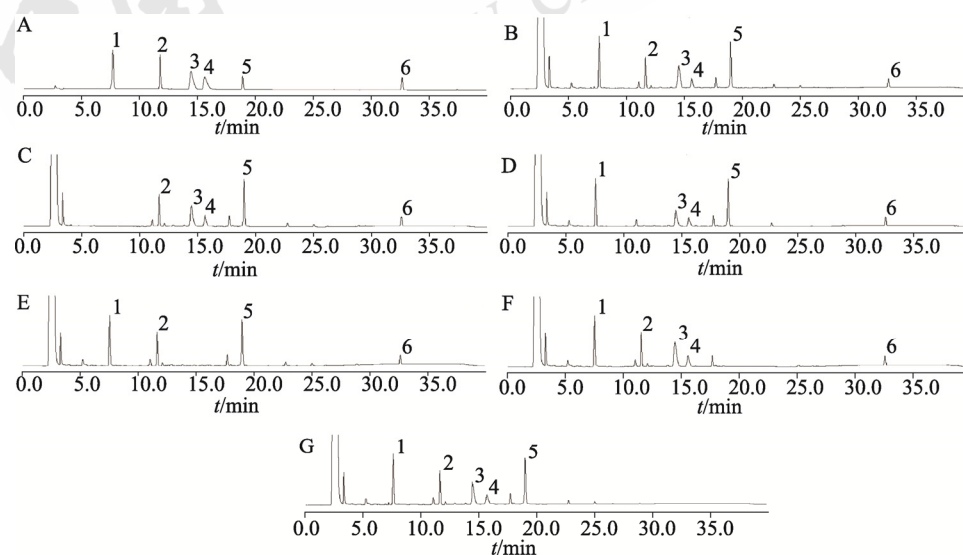


图 3 HPLC-ELSD 色谱图

A—混合对照品; B—桔贝合剂; C—缺苦杏仁阴性样品; D—缺甘草阴性样品; E—缺浙贝母阴性样品; F—缺桔梗阴性样品; G—缺麦冬阴性样品; 1—苦杏仁苷; 2—甘草苷; 3—贝母素甲; 4—贝母素乙; 5—桔梗皂苷 D; 6—麦冬皂苷 D。

Fig. 3 HPLC-ELSD chromatograms

A—mixture reference substances; B—Jubei mixture; C—negative sample without *Armeniacae Semen Amarum*; D—negative sample without *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; E—negative sample without *Fritillariae Thunbergii Bulbus*; F—negative sample without *Platycodonis Radix*; G—negative sample without *Ophiopogonis Radix*; 1—amygdalin; 2—liquiritin; 3—peimine; 4—peiminine; 5—platycodin D; 6—ophiopogonin D.

表 1 桔贝合剂中 6 种化学成分的线性回归方程

Tab.1 Linear regression equations of six compositions in Jubei mixture

成分	回归方程	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	<i>r</i>
苦杏仁苷	$Y=1.386\ 4X+3.374\ 8$	4.40~176	0.999 6
甘草苷	$Y=1.351\ 5X+3.689\ 7$	2.23~89.2	0.999 7
贝母素甲	$Y=1.571\ 6X+3.609\ 7$	2.08~83.2	0.999 3
贝母素乙	$Y=1.624\ 3X+3.350\ 2$	2.32~92.8	0.999 0
桔梗皂苷 D	$Y=1.485\ 6X+3.301\ 3$	1.66~66.4	0.999 3
麦冬皂苷 D	$Y=1.462\ 4X+3.286\ 2$	1.87~74.8	0.999 2

皂苷 D 和麦冬皂苷 D 峰面积的 RSD 分别为 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.6%, 0.3% 和 0.6%, 结果表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 取桔贝合剂(批号: 20030018), 按“2.2.2.2”项下方法, 平行制备供试品溶液 6 份, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 并分别计算含量, 结果苦杏仁苷、甘草苷、贝母素甲、贝母素乙、桔梗皂苷 D 和麦冬皂苷 D 的含量平均值($n=6$)分别为 243, 48, 55, 30, 117, 32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, RSD 分别为 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.6% 和 0.8%, 表明该方法的重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 取桔贝合剂(批号: 20030018), 按“2.2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件分别在 0, 2, 4, 8, 12, 16 h 进样, 测定峰面积, 苦杏仁苷、甘草苷、贝母素甲、贝母素乙、桔梗皂苷 D 和麦冬皂苷 D 峰面积的 RSD 分别为 0.4%, 0.5%, 0.5%, 0.6%, 0.5% 和 0.7%, 表明供试品溶液中各成分在 16 h 内基本稳定。

2.2.8 加样回收率试验 取已知含量的桔贝合剂(批号: 20030018), 精密量取 10 mL, 共量取 6 份, 分别置锥形瓶中, 并精密加入苦杏仁苷、甘草苷、贝母素甲、贝母素乙、桔梗皂苷 D 和麦冬皂苷 D 对照品储备液, 分别为 2.0, 1.0, 1.0, 0.5, 3.0, 1.0 mL, 按“2.2.2.2”项下方法制备加样回收供试液, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 分别计算加回收率, 苦杏仁苷、甘草苷、贝母素甲、贝母素乙、桔梗皂苷 D 和麦冬皂苷 D 的平均回收率分别为 99.1%, 98.6%, 100.9%, 97.7%, 98.9% 和 98.0%, RSD 分别为 0.4%, 1.0%, 1.1%, 1.2%, 0.7%, 1.3%, 结果表明方法的回收率良好, 结果见表 2。

2.2.9 样品测定 分别取 13 批次桔贝合剂样品, 按“2.2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 用外标两点法分别计算样品中苦杏仁苷、甘草苷、贝母素甲、贝母素乙、桔梗皂苷 D 和麦冬皂苷 D 的含量, 结果见表 3。

表 2 加样回收试验结果($n=6$)

Tab. 2 Results of recovery test($n=6$)

组分	样品含量/ μg	加入量/ μg	测得总量/ μg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
苦杏仁苷	2 430	2 200	4 612	99.26	99.1	0.4
	2 430	2 200	4 620	99.59		
	2 430	2 200	4 593	98.48		
	2 430	2 200	4 610	99.18		
	2 430	2 200	4 613	99.30		
	2 430	2 200	4 603	98.89		
甘草苷	480	558	1 033	98.96	98.6	1.0
	480	558	1 038	100.00		
	480	558	1 028	97.92		
	480	558	1 033	98.96		
	480	558	1 026	97.50		
	480	558	1 030	98.33		
贝母素甲	550	520	1 083	102.36	100.9	1.1
	550	520	1 068	99.64		
	550	520	1 070	100.00		
	550	520	1 073	100.55		
	550	520	1 076	101.09		
	550	520	1 080	101.82		
贝母素乙	300	290	582	97.33	97.7	1.2
	300	290	580	96.67		
	300	290	589	99.67		
	300	290	584	98.00		
	300	290	582	97.33		
	300	290	581	97.00		
桔梗皂苷 D	1 170	1 245	2 413	99.83	98.9	0.7
	1 170	1 245	2 401	98.80		
	1 170	1 245	2 410	99.57		
	1 170	1 245	2 393	98.12		
	1 170	1 245	2 404	99.06		
	1 170	1 245	2 390	97.86		
麦冬皂苷 D	320	468	782	98.13	98.0	1.3
	320	468	788	100.00		
	320	468	778	96.88		
	320	468	779	97.19		
	320	468	780	97.50		
	320	468	782	98.13		

表 3 样品含量测定结果

Tab. 3 Determination results of sample $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

批号	苦杏仁苷	甘草苷	贝母素甲	贝母素乙	桔梗皂苷	麦冬皂苷 D
323210161	135	40	12	41	106	12
323210181	151	43	17	48	103	16
323210201	139	40	13	33	105	11
323200081	140	41	13	36	107	13
323200071	139	42	13	39	103	12
200313	121	35	14	8	93	22
210116	125	36	13	7	86	20
210203	116	35	13	7	89	22
210306	126	37	14	7	89	23
210506	120	35	13	6	90	21
20030018	243	48	55	30	117	32
20070014	231	45	50	26	125	28
20090005	245	46	53	27	122	29

3 讨论

3.1 特征图谱色谱条件的选择

参照相关文献[6-9],本研究分别考察了甲醇-水、甲醇-0.1%磷酸溶液、乙腈-水和乙腈-0.1%磷酸溶液 4 种流动相体系。结果表明,以乙腈-0.1%磷酸溶液系统为流动相,采用梯度洗脱的方法,对 8 种共有峰的分离效果好,理论板数高,且相对保留时间适宜。采用二极管阵列检测器在 200~400 nm 内,对供试品溶液进行光谱扫描,发现在 250 nm 波长下色谱峰较多,且吸收值高,分离度较好,因此,选择 250 nm 作为特征图谱的检测波长,见图 1。

3.2 含量测定色谱条件的选择

本研究分别测定了桔贝合剂中的苦杏仁苷、甘草苷、贝母素甲、贝母素乙、桔梗皂苷 D 和麦冬皂苷 D。参照相关文献[10-15],由于待测的 6 种成分中苷类成分较多,紫外吸收差异较大,苦杏仁苷和甘草苷的紫外吸收较大,贝母素甲、贝母素乙、桔梗皂苷 D 和麦冬皂苷 D 紫外吸收均较小或无紫外吸收,故采用 ELSD 检测。试验比较了乙腈-水、乙腈-1%乙酸溶液、甲醇-水和甲醇-1%乙酸溶液等 4 种不同的流动相,结果发现以乙腈-1%乙酸溶液为流动相,分离效果较好。试验采用梯度洗脱,通过优化流动相的时间-比例曲线,使得待测的 6 种成分保留时间适宜,见图 3。

4 总结

桔贝合剂现行标准中的检验项目较少,生产企业无法有效地控制产品质量,监管部门也无法评价其质量情况。本研究以黄芩苷为参照峰,建立了桔贝合剂的 HPLC 特征图谱,确认了 8 个共有峰并归属了枇杷叶、苦杏仁、黄芩和甘草 4 个药味,通过与对照品比对指认了全部 8 种成分(包括辅料苯甲酸钠),能够较好地反映制剂的整体情况。本研究采用 HPLC-ELSD 建立了同时测定桔贝合剂中苦杏仁苷、甘草苷、贝母素甲、贝母素乙、桔梗皂苷 D 和麦冬皂苷 D 6 种成分含量的方法,通过阴性对照溶液比对,这 6 种成分分别来自苦杏仁、甘草、浙贝母、桔梗和麦冬,专属性较强,能够较好地反映桔贝合剂的质量。本研究采用 2 种实验方法,为桔贝合剂建立了较为全面的质量评价方法,涵盖了处方中全部药味,可以更加全面地考察其质量,为桔贝合剂在生产和监管中的质量控制提供参考。

REFERENCES

- [1] 卫生部药典委员会. 卫生部颁药品标准: 中药成方制剂: 第二册[S]. 1998: 199.
- [2] WANG H N, YANG H. Determination of baicalin in Jubei oral liquid by HPLC[J]. China Pharm(中国药房), 2007, 18(27): 2132-2133.
- [3] SHEN L R, PEI L, CAO W W, et al. Determination of peimine and peiminine in Jubei mixture by HPLC-ELSD[J]. Cent South Pharm(中南药学), 2017, 15(12): 1765-1767.
- [4] SHEN L R, ZHANG A B, PEI L, et al. Determination of 5 main components in Jubei mixture[J]. Cent South Pharm(中南药学), 2019, 17(6): 868-871.
- [5] XU X L, YAO L J, CHEN X H. Investigation of quality standard for Jubei mixture[J]. China Pharm(中国药业), 2009, 18(6): 29-30.
- [6] YANG M, WU J B, ZHOU J, et al. Study on the development of characteristic pattern of Armeniacae Semen Amarum formula granules and identification of similar varieties[J]. Pharm Clin Chin Mater Med(中药与临床), 2019, 10(3/4): 11-13.
- [7] WANG Y, HUANG F Y, JIN W F, et al. HPLC fingerprints of licorice pieces and content determination of main components[J]. Cent South Pharm(中南药学), 2021, 19(10): 2149-2153.
- [8] GU S J, LI H, ZHOU Y L, et al. HPLC specific chromatogram of Eriobotryae Folium and determination of main components[J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2019, 21(11): 1519-1523, 1531.
- [9] HE Y, HU X X. HPLC Characteristic chromatogram and content determination of six components for Yinhuang capsules[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2020, 37(11): 1314-1319.
- [10] XIN J P, WANG H L, WANG M, et al. Quality standards improvement of medicinal materials and cut crude drugs of bitter almond[J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2020, 22(7): 1016-1021.
- [11] CHEN J, ZHANG Q, YANG R, et al. Determination and multivariate statistical analysis of chemical components in Glycyrrhizae Radix et Rhizoma with different growth years[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2020, 40(7): 1185-1196.
- [12] PENG W, WANG L S. Simultaneous determination of aygdalin, aucubin, harpagide, peimisine, peimine and peiminine in Keling capsules by HPLC-ELSD[J]. China Pharm(中国药师), 2017, 20(8): 1486-1488.
- [13] YUE H, CHEN F R, WANG M L, et al. Simultaneous determination of the content of 5 platycosides in Platycodon Radix[J]. China Meas Test(中国测试), 2016, 42(1): 49-52.
- [14] YOU Y, TIAN D N, GUO J P. Determination of platycodin D by HPLC with different detectors[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2020, 38(7): 100-104.
- [15] JIA C, YE Z L, JIANG X J, et al. Quantitative determination of ophiopogonin D and ophiopogonin D' from *Ophiopogon japonicus* by ELSD-HPLC[J]. Chin Med J Res Pract(现代中药研究与实践), 2012, 26(3): 79-81.

收稿日期: 2022-04-26

(本文责编: 沈倩)