

杏仁止咳合剂 HPLC 指纹图谱及 7 种成分的含量测定

宋兴发, 周军, 郭守城* (连云港市第一人民医院药学部, 江苏 连云港 222002)

摘要: 目的 建立杏仁止咳合剂 HPLC 指纹图谱, 同时测定 7 种成分含量。方法 采用 HPLC-DAD 法, Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(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; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 210 nm(苦杏仁苷、细叶远志皂苷)、251 nm(甘草酸铵)、237 nm(甘草苷)、284 nm(橙皮苷、柚皮苷、新橙皮苷); 柱温 30 ℃; 进样量 10 μL。利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统进行相似度评价, 采用 SPSS 22.0 统计软件对含量测定结果进行聚类分析。结果 15 批样品指纹图谱有 20 个共有峰, 相似度>0.90。苦杏仁苷、细叶远志皂苷、甘草苷、柚皮苷、橙皮苷、甘草酸铵、新橙皮苷检测质量浓度线性范围分别为 31.97~1 278 μg·mL⁻¹, 26.40~1 056 μg·mL⁻¹, 40.38~1 615 μg·mL⁻¹, 2.252~90.10 μg·mL⁻¹, 7.698~307.9 μg·mL⁻¹, 3.742~149.7 μg·mL⁻¹, 3.032~121.3 μg·mL⁻¹ ($r \geq 0.999$); 定量限≤1.901 μg·mL⁻¹; 精密度、稳定性(48 h)、重复性试验的 RSD<2.0% ($n=6$ 或 $n=7$); 平均加样回收率分别为 99.1%, 96.2%, 101.1%, 96.9%, 97.4%, 98.1%, 99.2% ($n=9$); 15 批样品聚为 3 类。结论 本法简便、准确、重复性好, 可以用于杏仁止咳合剂的鉴定与质量评价, 可作为杏仁止咳合剂质量控制的重要科学依据。

关键词 杏仁止咳合剂; 指纹图谱; 含量测定

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2020)01-0050-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.01.010

引用本文: 宋兴发, 周军, 郭守城. 杏仁止咳合剂 HPLC 指纹图谱及 7 种成分的含量测定[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(1): 50-56.

Study on HPLC Fingerprints and Content Determination of 7 Components in Xingren Zhike Mixture

SONG Xingfa, ZHOU Jun, GUO Shoucheng* (*The First People's Hospital of Lianyungang, Lianyungang 222002, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the HPLC fingerprint of Xingren Zhike mixture and determine the contents of 7 chemical compositions. **METHODS** HPLC-DAD analysis was performed on Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) with the column temperature of 30 ℃ and the injection volume was 10 μL. The mobile phase was acetonitrile(A)-0.1% phosphoric acid solution(B) with gradient elution at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 210 nm for amygdalin and tenuifolin; 237 nm for liquiritin; 251 nm for ammonium glycyrrhizate; 284 nm for hesperidin, naringin and neohesperidin. The similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of TCM was used to calculate the similarity and the cluster analysis was conducted for the results of content determination by SPSS 22.0 statistical software. **RESULTS** There were 20 common peaks in the HPLC fingerprints of 15 batches of samples with the similarities >0.90. The linear ranges were 31.97~1 278 μg·mL⁻¹ for amygdalin, 26.40~1 056 μg·mL⁻¹ for tenuifolin, 40.38~1 615 μg·mL⁻¹ for liquiritin, 2.252~90.10 μg·mL⁻¹ for naringin, 7.698~307.9 μg·mL⁻¹ for hesperidin, 3.742~149.7 μg·mL⁻¹ for ammonium glycyrrhizate, 3.032~121.3 μg·mL⁻¹ for neohesperidin. The limits of quantitation were ≤1.901 μg·mL⁻¹, with $r \geq 0.999$. RSDs of precision, reproducibility and stability tests (48 h) were ≤2.0% ($n=6$ or $n=7$). Average recoveries were 99.1%, 96.2%, 101.1%, 96.9%, 97.4%, 98.1%, 99.2% ($n=9$), respectively. The samples of 15 batches of Xingren Zhike mixture could be divided into 3 categories. **CONCLUSION** The method is simple and accurate with good repeatability, which can be used for the identification and evaluation of Xingren Zhike mixture, and provides important scientific basis for the quality control of Xingren Zhike mixture.

KEYWORDS: Xingren Zhike mixture; fingerprints; content determination

杏仁止咳合剂的制法为取蔗糖 200 g, 加水加热使溶化放冷, 加入苯甲酸钠 3 g, 依次加入远志流浸膏、桔梗流浸膏、甘草流浸膏、百部流浸膏、陈皮流浸膏、杏仁水, 混匀, 加水至 1 000 mL, 加滑石粉适量, 搅匀, 静置使沉淀, 滤取上清液,

灌装, 即得。杏仁止咳合剂具有化痰止咳的功效, 用于痰浊阻肺, 咳嗽痰多; 急、慢性支气管炎见上述证候者^[1]。方中远志安神益智、祛痰, 用于心肾不交引起的失眠多梦、咳痰不爽等症^[1], 细叶远志皂苷常被作为控制远志质量的指标性成分^[2-3];

作者简介: 宋兴发, 男, 副主任药师 Tel: (0518)85605265 E-mail: em0697@163.com
(0518)85605265 E-mail: b_ajun@126.com

*通信作者: 郭守城, 男, 副主任中药师 Tel:

陈皮理气健脾、燥湿化痰，用于脘腹胀满、食少吐泻、咳嗽痰多^[1]，柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷为其主要活性成分，作为陈皮质量控制的指标性成分^[4-5]；甘草补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛、调和诸药，甘草苷、异甘草苷、甘草素和甘草酸是甘草的重要活性成分^[6-7]。杏仁止咳合剂现收载于中国药典 2015 年版一部，标准仅对甘草中甘草酸做了含量测定，难以全面评价其质量，未见对其他指标成分含量测定的方法报道。本实验利用高效液相色谱指纹图谱技术构建了杏仁止咳合剂的指纹图谱，同时测定了苦杏仁苷、细叶远志皂苷、甘草苷、柚皮苷、橙皮苷、甘草酸铵、新橙皮苷 7 种成分的含量，并结合聚类分析对其含量测定结果进行综合分析，多角度、多技术、更加全面地控制杏仁止咳合剂的质量。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1290 高效液相色谱仪：包括 1290 Infinity 二元泵、1290 Infinity LC HTC/HTS 进样器、1290 Infinity 柱温箱、1290 Infinity 二极管阵列检测器(美国 Agilent 公司)；Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)；BP211D 型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司)；JL-720DT 超声波清洗器(上海吉理超声仪器有限公司)；FP240 型鼓风干燥箱(德国 Binder 公司)；Academic 超纯水系统(美国 Milli-Q)。

1.2 药品与试剂

对照品：苦杏仁苷(批号：110820-201607；纯度：90.7%)、甘草苷(批号：111610-201607；纯度：93.1%)、甘草酸铵(批号：110731-201720；纯度：97.7%)、细叶远志皂苷(批号：111849-201705；纯度：91.6%)、柚皮苷(批号：110722-201815；纯度：91.7%)、橙皮苷(批号：110721-201818；纯度：96.2%)、新橙皮苷(批号：111857-201703；纯度：99.2%)均购自中国食品药品检定研究院，对照品在参与结果计算时已按实际纯度进行折算；甲醇、乙腈均为色谱纯，其他试剂均为分析纯，水为超纯水；15 批样品取自不同生产企业，见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相：乙腈(A)-0.1%

磷酸溶液(B)，梯度洗脱(0~7 min, 2%A；7~15 min, 2%→10%A；15~20 min, 10%→20%A；20~35 min, 20%→30%A；35~40 min, 30%A；40~50 min, 30%→40%A；50~65 min, 40%→60%A；65~85 min, 60%→20%A；85~95 min, 20%→98%A)；流速：1.0 mL·min⁻¹；检测波长：0~40 min 210 nm(苦杏仁苷、细叶远志皂苷)、40~49 min 237 nm(甘草苷)、49~60 min 284 nm(橙皮苷、柚皮苷、新橙皮苷)、60~70 min 251 nm(甘草酸铵)；柱温：30 ℃；进样量：10 μL。

表 1 15 批杏仁止咳合剂样品信息

Tab. 1 Sample information for the 15 batches of Xingren Zhike mixture

编号	生产企业	批号
S1	广西医科大学制药厂	180145
S2	广西百琪药业有限公司	1810211
S3	广西百琪药业有限公司	1805232
S4	太极集团浙江东方制药有限公司	1806154
S5	太极集团浙江东方制药有限公司	1807051
S6	广州白云山潘高寿药业股份有限公司	1805412
S7	广州白云山潘高寿药业股份有限公司	1807324
S8	广州白云山潘高寿药业股份有限公司	1809214
S9	广州白云山潘高寿药业股份有限公司	1804071
S10	通药制药集团股份有限公司	180514
S11	陕西步长制药有限公司	180621
S12	广西禅方药业股份有限公司	1805121
S13	三门峡广宇生物制药有限公司	1712101
S14	三门峡广宇生物制药有限公司	1801247
S15	三门峡广宇生物制药有限公司	1811234

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取苦杏仁苷、细叶远志皂苷、甘草苷、柚皮苷、橙皮苷、甘草酸铵、新橙皮苷对照品各适量，用 70%甲醇溶液超声处理 30 min(功率：250 W；频率：40 kHz)溶解后配制成每 1 mL 含苦杏仁苷 1 278 μg、细叶远志皂苷 1 056 μg、甘草苷 1 615 μg、柚皮苷 90.10 μg、橙皮苷 307.9 μg、甘草酸铵 149.7 μg 和新橙皮苷 121.3 μg 的混合对照品储备液，精密量取混合对照品储备液 5 mL，置 20 mL 量瓶中，用 70%甲醇稀释至刻度，室温避光保存，备用。

2.2.2 供试品溶液 精密量取本品均匀混合液 5 mL，置于 25 mL 棕色量瓶中，加入 15 mL 70%甲醇溶液，室温超声处理(功率：250 W；频率：40 kHz)30 min 后取出，放冷，用 70%甲醇溶液稀

释至刻度,摇匀,滤过,即得,室温避光保存。

2.2.3 阴性供试品溶液的制备 按照杏仁止咳合剂处方制备缺少远志流浸膏、甘草流浸膏、陈皮流浸膏、杏仁水的阴性样品,依照“2.2.2”项下方法进行处理,即得。

2.3 HPLC 指纹图谱的建立及方法学验证

2.3.1 仪器精密度试验 取同一供试品溶液(S1),按“2.1”项下色谱条件,连续进样 5 针,记录色谱图,以甘草苷为参比峰,结果各共有峰相对峰面积和相对保留时间的 RSD 分别为 0.81%和 0.21%,均<5%,表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取同一供试品溶液(S1),按“2.1”项下色谱条件,分别在 0, 5, 10, 15, 20, 30, 48 h 进样,记录色谱图,以甘草苷为参比峰,结果各共有峰相对峰面积和相对保留时间的 RSD 分别为 1.21%和 0.51%,均<5%,表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.3.3 重复性试验 取样品均匀混合液(S1),按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液 6 份,按“2.1”项下色谱条件分析,记录色谱图,以甘草苷为参比峰,结果各共有峰相对峰面积和相对保留时间的 RSD 分别为 0.86%和 0.31%,均<5%,表明方法重复性良好。

2.3.4 指纹图谱的建立及相似度分析 取样品(S1~S15),依照“2.2.2”项下方法分别制备 15 批供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件,对 15 批样品进样检测分析,记录色谱数据,将 15 批样品色谱数据的 CDF 文件导入《中药色谱指纹图谱相似

度评价系统》(2012 年 A 版)软件进行 HPLC 图谱分析,得 HPLC 指纹图谱,见图 1。1~15 号样品与对照图谱的相似度分别为 0.941, 0.955, 0.952, 0.962, 0.971, 0.931, 0.934, 0.925, 0.909, 0.917, 0.961, 0.959, 0.984, 0.991, 0.977, 相似度均>0.9,质量稳定,符合指纹图谱相关要求。

2.3.5 共有峰指认 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 年 A 版)对 15 批样品的 HPLC 图谱进行比较分析。结果 15 批样品共有 20 个共有峰,在 20 个共有峰中,通过与混合对照品图谱保留时间和紫外光谱图对照,指认出 5 号峰为苦杏仁苷,7 号峰为细叶远志皂苷,9 号峰为甘草苷,11 号峰为柚皮苷,12 号峰为橙皮苷,13 号峰为新橙皮苷,15 号为甘草酸铵。9 号峰的面积适中,分离完全,稳定性较好,设为参照峰(S),计算其他共有峰对 9 号峰的相对保留时间和相对峰面积及其 RSD,结果见表 2。

2.4 多指标成分的含量测定

2.4.1 系统适用性试验 分别精密吸取供试品溶液、混合对照品溶液和阴性供试品溶液各 10 μ L,按“2.1”项下色谱条件进样,7 种成分之间的分离度均>1.5,理论板数按苦杏仁苷、细叶远志皂苷、甘草苷、柚皮苷、橙皮苷、甘草酸铵、新橙皮苷峰计均>9 000,拖尾因子均<1.21,阴性样品溶液色谱图中在与样品中苦杏仁苷、细叶远志皂苷、甘草苷、柚皮苷、橙皮苷、甘草酸铵、新橙皮苷保留时间相应位置上未见色谱峰,说明其他成分对测定无干扰,专属性较好。色谱图见图 2。

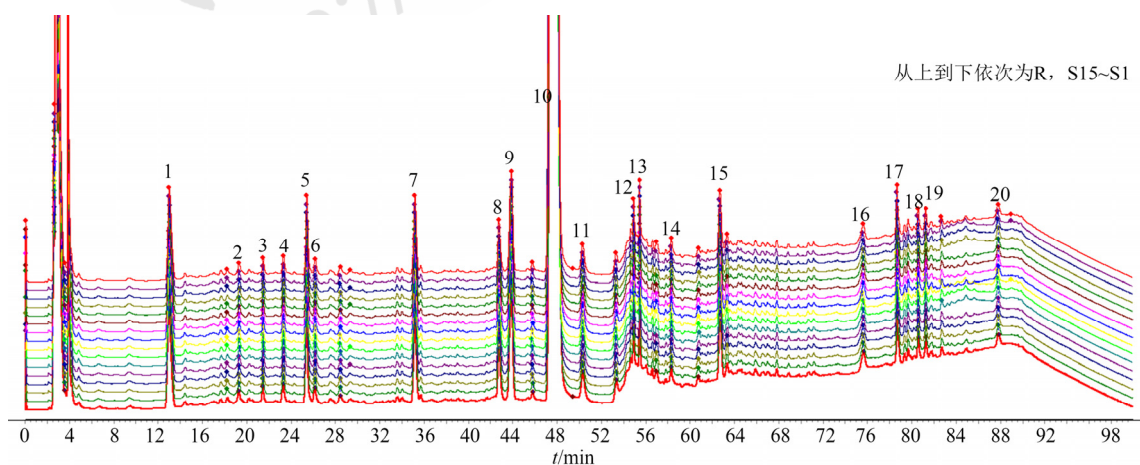


图 1 15 批样品 HPLC 叠加指纹图谱和共有峰图谱

Fig. 1 HPLC superposed fingerprints and common peak of 15 batches of samples

表2 15批样品 HPLC 图谱共有峰的相对保留时间和相对峰面积的统计

Tab. 2 Statistics of relative retention time and relative peak area of common peaks in HPLC chromatograms of 15 batches of samples

峰号	平均相对保留时间	RSD/%	平均相对峰面积	RSD/%
1	0.296 2	0.25	0.970 5	0.69
2	0.439 8	0.31	0.109 0	0.98
3	0.489 3	0.54	0.082 4	3.05
4	0.531 0	0.19	0.970 5	0.60
5	0.579 0	0.24	0.546 0	1.13
6	0.596 2	0.51	0.124 5	0.94
7	0.801 4	0.33	0.570 3	0.69
8	0.974 0	0.41	0.421 0	0.82
9(S)	1.000 0	0.00	1.000 0	0.00
10	1.086 6	0.18	28.318	0.73
11	1.146 3	0.32	0.357 8	0.99
12	1.251 0	0.31	0.130 7	1.93
13	1.263 4	0.43	0.191 2	1.75
14	1.328 3	0.51	0.124 2	1.45
15	1.428 7	0.69	0.428 3	0.74
16	1.723 4	0.36	0.225 7	2.06
17	1.793 0	0.45	0.263 5	1.85
18	1.836 3	0.26	0.111 0	2.25
19	1.852 0	0.25	0.089 0	2.51
20	2.000 6	0.29	0.110 4	1.92

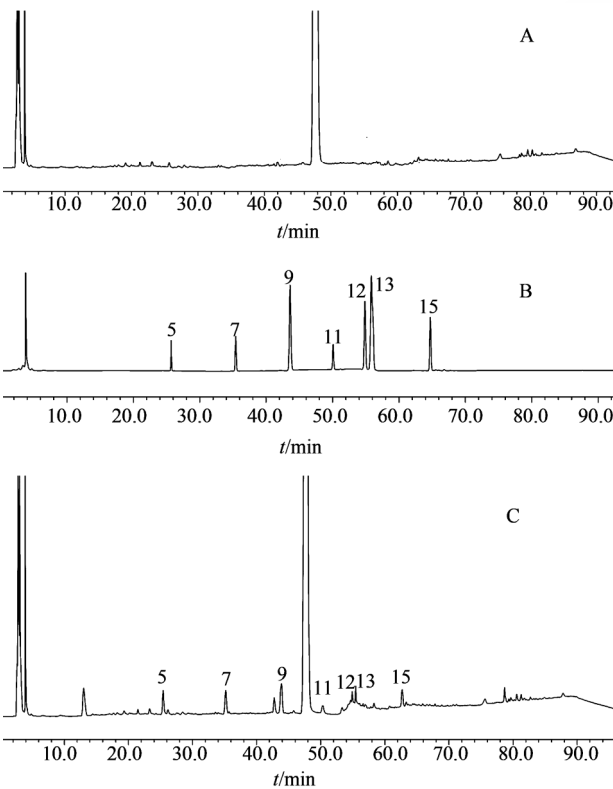


图2 高效液相色谱图

A-供试品溶液; B-对照品溶液; C-空白样品溶液; 5-苦杏仁苷; 7-细叶远志皂苷; 9-甘草苷; 11-柚皮苷; 12-橙皮苷; 13-新橙皮苷; 15-甘草酸铵。

Fig. 2 HPLC chromatograms

A-sample solution; B-standard solution; C-blank; 5-amygdalin; 7-tenuifolin; 9-liquiritin; 11-naringin; 12-hesperidin naringin; 13-neohesperidin; 15-ammonium glycyrrhizate.

2.4.2 线性关系考察 分别精密吸取“2.2.1”项下混合对照品储备液 0.5, 2, 7, 10, 12 mL, 置于 20 mL 量瓶中, 加 70%甲醇溶液稀释至刻度, 摇匀, 得系列混合对照品溶液, 精密量取上述系列混合对照品溶液和混合对照品储备液各 10 μ L, 按“2.1”项下色谱条件测定, 记录色谱图。以质量浓度为横坐标(x , $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 峰面积为纵坐标(y)进行线性回归, 绘制各组标准曲线, 计算回归方程和相关系数。结果表明, 苦杏仁苷、细叶远志皂苷、甘草苷、柚皮苷、橙皮苷、甘草酸铵、新橙皮苷在试验范围内呈良好的线性关系。精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液, 用 70%甲醇倍比稀释, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 取峰面积信噪比 10:1($S/N=10$)时的混合对照品溶液浓度为定量限(LOQ), 结果见表 3。

表3 7种有效成分的线性关系考察和定量限

Tab. 3 Results of linear equations of 7 components and LOQ

成分	线性方程	r	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	定量限(LOQ)/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
苦杏仁苷	$Y=0.0312X+1.23$	0.999 4	31.97~1 278	1.624
细叶远志皂苷	$Y=0.0521X+3.12$	0.999 2	26.40~1 056	1.534
甘草苷	$Y=0.0254X+4.21$	0.999 6	40.38~1 615	1.901
柚皮苷	$Y=0.0401X+1.02$	0.999 1	2.252~90.10	1.234
橙皮苷	$Y=0.0196X-1.24$	0.999 3	7.698~307.9	1.405
甘草酸铵	$Y=0.0412X-0.96$	0.999 4	3.742~149.7	1.364
新橙皮苷	$Y=0.0364X+1.24$	0.999 2	3.032~121.3	1.712

2.4.3 仪器精密度试验 精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 10 μ L, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录峰面积。结果苦杏仁苷、细叶远志皂苷、甘草苷、柚皮苷、橙皮苷、甘草酸铵、新橙皮苷峰面积的 RSD 分别为 0.36%, 0.42%, 0.69%, 0.52%, 0.91%, 0.54%, 0.84%($n=6$), 表明仪器精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 取同一供试品溶液(S1), 分别于制备后 0, 6, 10, 15, 20, 35, 48 h 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果苦杏仁苷、细叶远志皂苷、甘草苷、柚皮苷、橙皮苷、甘草酸铵、新橙皮苷的 RSD 分别为 0.36%, 0.64%, 0.77%, 0.91%, 1.00%, 0.65%, 0.76%($n=7$), 表明供试品溶液 48 h 内稳定性良好。

2.4.5 重复性试验 取同一批样品均匀混合液(S1), 精密量取 5 mL, 共 6 份, 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

样测定,记录色谱图,并计算 7 种成分的含量及其 RSD 值。结果苦杏仁苷、细叶远志皂苷、甘草苷、柚皮苷、橙皮苷、甘草酸铵、新橙皮苷的平均含量分别为 1.584, 1.321, 2.011, 0.114, 0.384, 0.188, 0.147 mg·mL⁻¹, RSD 分别为 0.68%, 0.84%, 1.01%, 0.86%, 0.57%, 0.74%, 1.00%(n=6), 表明方法重复性良好。

2.4.6 加样回收率试验 取已知含量的样品(S1)均匀混合液,精密量取 2.5 mL,共 9 份,分成 3 组,分别置于 25 mL 棕色量瓶中,分别精密加入“2.2.1”项下混合对照品储备溶液 4.5, 3, 2 mL,按“2.2.2”项下方法制备,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,计算各成分加样回收率及其 RSD 值。结果苦杏仁苷、细叶远志皂苷、甘草苷、柚皮苷、橙皮苷、甘草酸铵、新橙皮苷的平均加样回收率分别为 99.1%, 96.2%, 101.1%, 96.9%, 97.4%, 98.1%, 99.2%, RSD 分别为 1.16%, 0.92%, 1.21%, 0.89%, 0.96 %, 1.01%, 0.85%(n=9)。

2.4.7 样品含量测定 分别精密吸取“2.2.2”项下供试品溶液 10 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录苦杏仁苷、细叶远志皂苷、甘草苷、柚皮苷、橙皮苷、甘草酸铵、新橙皮苷的峰面积,代入“2.4.2”项下回归方程计算杏仁止咳合剂中上述 7 种成分含量。结果见表 4。

表 4 样品测定结果(n=3)

Tab. 4 Determination results of the samples(n=3)

编号	mg·mL ⁻¹						
	苦杏仁苷	细叶远志皂苷	甘草苷	柚皮苷	橙皮苷	甘草酸铵	新橙皮苷
S1	1.581	1.322	2.015	0.112	0.386	0.185	0.150
S2	1.093	1.582	2.323	0.095	0.309	0.196	0.162
S3	1.956	1.184	2.731	0.142	0.402	0.243	0.136
S4	1.966	2.291	3.251	0.201	0.614	0.356	0.207
S5	2.325	1.932	3.021	0.182	0.745	0.284	0.385
S6	0.901	1.001	1.987	0.194	0.164	0.131	0.118
S7	1.045	0.713	1.456	1.002	0.236	0.196	0.099
S8	1.241	1.114	1.054	0.042	0.109	0.158	0.123
S9	0.525	0.474	0.587	0.089	0.181	0.107	0.064
S10	1.168	0.815	1.441	0.102	0.092	0.098	0.105
S11	2.042	2.026	3.045	0.126	0.378	0.161	0.201
S12	1.129	1.741	2.913	0.169	0.452	0.224	0.174
S13	2.546	3.014	2.962	0.265	0.741	0.451	0.224
S14	3.354	2.625	3.214	0.174	0.829	0.365	0.336
S15	2.632	2.365	4.054	0.159	1.037	0.263	0.288

2.5 聚类分析

系统聚类分析(cluster analysis, CA)是将数据分类到不同的类或者簇这样的一个过程,所以同一个簇中的对象有很大的相似性,而不同簇间的对象有很大的相异性^[8-11]。利用 SPSS 22.0 软件,采用离差平方和法(Ward 法),以欧式距离平方(squared euclidean distance)为样品测度,对 15 批样品 7 种成分含量测定结果进行聚类分析。分析发现,15 批样品类间距离为 5 时被分成了 3 大类: S7, S10, S8, S1, S6, S9 为第 I 类, S2, S12, S3 为第 II 类, S4, S11, S5, S13, S14, S15 为第 III 类。聚类分析树状图见图 3。

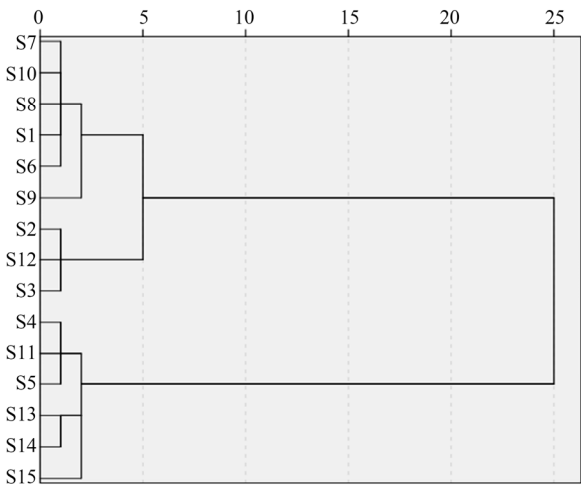


图 3 15 批样品聚类分析树状图

Fig. 3 Cluster analysis dendrogram for 15 batches of samples

3 讨论

3.1 色谱条件和提取方式的优化

本研究考察流动相时,选用了乙腈-甲酸(0.1%, 0.05%)溶液、甲醇-甲酸(0.1%, 0.05%)溶液、乙腈-磷酸(0.1%, 0.05%)溶液、甲醇-磷酸(0.1%, 0.05%)溶液进行梯度洗脱。结果表明,乙腈-0.1%磷酸盐水溶液为流动相得到 HPLC 色谱图基线较平稳,色谱峰数量多、分离度好。笔者使用 3D 通道在 190~400 nm 条件下进行各对照品溶液全波长扫描,结果苦杏仁苷和细叶远志皂苷的最大吸收为 210 nm,甘草酸铵最大吸收为 251 nm,甘草苷最大吸收为 237 nm,橙皮苷、柚皮苷、新橙皮苷最大吸收为 284 nm。因此采用不同时段切换不同检测波长: 0~40 min 检测波长为 210 nm, 40~49 min 检测波长为 237 nm, 49~60 min 检测波

长为 284 nm、60~70 min 检测波长为 251 nm。研究过程中, 笔者比较了不同体积分数甲醇溶液(100%, 70%, 30%)和乙醇溶液(100%, 70%, 30%)提取的效果, 结果以 70%甲醇溶液提取时, 效果最好, 各待测成分提取率较高。同时, 笔者比较了超声提取和加热回流提取 2 种提取方法的差异, 结果两者的提取率无显著差异, 但超声提取时间短、操作简便, 故采用超声提取法。

3.2 实验结果分析

本研究通过建立 15 批不同厂家杏仁止咳合剂 HPLC 指纹图谱, 确立了 20 个共有峰, 以 9 号峰(甘草苷)为参照峰, 共有峰相对保留时间 RSD 为 0.18%~0.69%, 共有峰保留时间相对稳定, 可用来反映杏仁止咳合剂的整体特征性; 共有峰相对峰面积 0.60%~3.05%, 共有峰峰面积存在一定差别, 说明不同厂家杏仁止咳合剂化学组分相似, 但成分含量存在一定差异; S4, S5, S11, S13, S14, S15 相似度最高, S2, S3, S12 相似度居中, S1, S6, S7, S8, S9, S10 相似度最低, 相似度分析结果为>0.90, 说明所建立的指纹图谱稳定可靠。对 15 批杏仁止咳合剂样品 7 种成分的含量测定结果聚类分析显示, S7, S10, S8, S1, S6, S9 聚为一类, S2, S12, S3 聚为一类, S4, S11, S5, S13, S14, S15 聚为一类, 与相似度结果相吻合。指纹图谱共有峰中 10 号峰信号较强, 保留时间为 47.6 min, 其紫外光谱图在 230 nm 有较强吸收, 与苯甲酸对照品保留时间和紫外光谱图吸收一致, 初步判定 10 号峰为杏仁止咳合剂处方中防腐剂苯甲酸钠, 由于其峰面积太大, 故选择峰面积适中的 9 号峰(甘草苷)作为参照峰。

3.3 各成分含量分析

构建指纹图谱的同时, 指认了 7 种特征性成分, 并对其进行含量测定。结果显示, 苦杏仁苷含量为 0.525~3.354 mg·mL⁻¹, 细叶远志皂苷含量为 0.474~3.014 mg·mL⁻¹, 甘草苷含量为 0.587~4.054 mg·mL⁻¹, 柚皮苷含量为 0.042~1.002 mg·mL⁻¹, 橙皮苷含量为 0.092~1.037 mg·mL⁻¹, 甘草酸铵含量为 0.098~0.451 mg·mL⁻¹, 新橙皮苷含量为 0.064~0.385 mg·mL⁻¹。通过 SPSS 22.0 统计软件对 15 批样品含量测定结果进行主成分分析^[12-13], 根据主成分特征值和贡献率, 提取了 2 个特征值>1 主成分因子(A1, A2), 其累计贡献率达 87.135%。其中, A1 特征值为 5.053, 贡献率为 72.185%;

A2 特征值为 1.046, 贡献率为 14.850%。样品主成分分析结果见表 5。根据各主成分 Y(Y1, Y2)得分, 以各主成分相应的方差贡献率占累加方差贡献率的百分比为权重, 对 2 个主成分进行线性组合, 可反映原样本信息的综合主成分得分, 用 Y 值表示(即 $Y=0.828 \times Y1+0.172 \times Y2$), Y 值越大说明杏仁止咳合剂中各待测成分综合含量越高^[8]。综合主成分评价结果见表 6。由表 6 可知, 综合得分由高到低依次为 S14, S13, S15, S5, S4, S11, S12, S3, S2, S1, S7, S6, S8, S10, S9。主成分分析发现, 相同成分含量在不同生产厂家间差异较大, 相同生产厂家不同批次间成分含量存在差异, 存在这种现象的原因可能是不同厂家杏仁止咳合剂的制备工艺不一致, 也可能不同批次间原材料质量、产地、采收及加工等存在差异。建议增订相关指标成分的含量测定项。

表 5 15 批样品主成分分析结果

Tab. 5 Results of principal component analysis of 15 batches of samples

变量	主成分	
	1	2
苦杏仁苷	0.933	-0.007
细叶远志皂苷	0.946	-0.048
甘草苷	0.903	-0.046
柚皮苷	-0.106	0.986
橙皮苷	0.952	0.050
甘草酸铵	0.864	0.249
甘草次酸	0.899	-0.072
特征值	2.344	2.260
贡献率/%	72.185	72.185
累计贡献率/%	14.950	87.135

表 6 15 批样品主成分因子得分、综合得分及排序

Tab. 6 Factor scores, comprehensive scores and sorting of principal components of 15 batches of samples

样品序号	Y1	Y2	Y	排序
S1	-0.77	-0.53	-0.73	10
S2	-0.77	-0.43	-0.71	9
S3	-0.17	-0.18	-0.17	8
S4	1.7	0.22	1.44	5
S5	2.3	-0.11	1.88	4
S6	-2.01	-0.2	-1.7	12
S7	-2.22	3.43	-1.25	11
S8	-2.07	-0.76	-1.85	13
S9	-3.37	-0.56	-2.88	15
S10	-2.46	-0.64	-2.15	14
S11	0.42	-0.57	0.25	6
S12	-0.07	-0.17	-0.08	7
S13	2.89	0.68	2.51	2
S14	3.53	0.03	2.93	1
S15	3.06	-0.21	2.5	3

综上,本研究建立的杏仁止咳合剂指纹图谱稳定可靠,能较好地对杏仁止咳合剂质量进行综合评价,建立的 HPLC 同时测定杏仁止咳合剂中 7 种成分含量的方法简单有效、结果准确、精密度好,可用于杏仁止咳合剂中苦杏仁苷、细叶远志皂苷、甘草苷、柚皮苷、橙皮苷、甘草酸铵、新橙皮苷含量的同时测定。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2015: 157, 191, 932-933.
- [2] GU Y Y. Determine of the bitter polygala senegenin in the content by HPLC [J]. Asia-Pacific Tradit Med(亚太传统医药), 2016, 12(7): 21-23.
- [3] LIU K, LIU L G. Determination of tenuifolin in Radix Polygalae by HPLC-CAD [J]. Northwest Pharm J(西北药学杂志), 2016, 31(1): 34-36.
- [4] SU D. Simoltaneous determination of there constituents in Shuganpingwei pills by HPLC [J]. Tianjin Pharm(天津药学), 2018, 30(4): 12-15.
- [5] WEI Y, LI W D, YANG W L. Content determination of the main active components in *Citrus chachiensis* with different storage time by HPLC [J]. Chin Pharm(中国药房), 2016, 27(15): 2131-2134.
- [6] 任明, 许真真. HPLC-UV 切换波长法同时测定复方甘草合剂中甘草苷、异甘草苷、甘草素和甘草酸[J]. 山东医药, 2016, 56(11): 35-37.
- [7] 耿婕, 那顺朝克图, 丛丽华, 等. HPLC 法同时测定五味沙棘颗粒中甘草苷和甘草酸的含量[J]. 中国药房, 2017, 28(27): 3836-3838.
- [8] JIA L L, WEI L, ZHAO J, et al. Content determination of 7 constituents in *Wikstroemia indica* and its principal component and cluster analysis [J]. Chin Pharm(中国药房), 2017, 28(33): 4706-4710.
- [9] CHEN J Q, WANG B Y, ZHAO J H, et al. Establishment of HPLC fingerprint for Populi Flos [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(4): 510-513.
- [10] WANG L D, XU B X, LI Y R, et al. Fingerprint of Xinan capsules by principal component analysis and cluster analysis [J]. China Pharm(中国药师), 2017, 20(1): 35-37, 45.
- [11] ZHOU Y, XUE L B, YI S M. Study on conformity test and cluster analysis of *Stachyuri medulla* and its adulterants by near infrared spectroscopy [J]. China Pharm(中国药师), 2017, 34(5): 697-699.
- [12] SHI Y, WEI F, MA S C. Discussion on application of principal component analysis in analysis of traditional Chinese medicines and natural drugs [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2018, 43(14): 3031-3035.
- [13] GAO W, CHEN M S, WEI G H, et al. HPLC fingerprint, cluster analysis and principal component analysis of *Callicarpae longissimae* [J]. China Pharm(中国药房), 2018, 29(16): 2215-2219.

收稿日期: 2019-01-09

(本文责编: 曹粤锋)