

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.06.011

高效液相色谱-蒸发光散射法测定杏贝止咳颗粒中 贝母素甲和贝母素乙含量

杨智慧¹,程 诚¹,高晓燕²

(1. 江苏省连云港市食品药品检验检测中心,江苏 连云港 222006; 2. 江苏康缘药业股份有限公司,江苏 连云港 222001)

摘要:目的 建立测定杏贝止咳颗粒中贝母素甲和贝母素乙含量的高效液相色谱-蒸发光散射(HPLC-ELSD)法。方法 色谱柱为Phenomenex C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为70%乙腈溶液(含0.08%二乙胺),流速为0.8 L/min,ELSD漂移管温度为85℃,载气(氮气)流速为2.1 L/min,雾化器温度为70℃,进样量为10 μL。结果 贝母素甲和贝母素乙进样量分别在0.133~2.655 μg和0.125~2.547 μg范围内与峰面积线性关系良好,精密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于2%,加样回收率分别为99.22%~100.66%,96.08%~99.86%,RSD分别为0.48%和1.08%(n=9)。结论 该方法操作简便、准确,精密度、稳定性、重复性好,可用于杏贝止咳颗粒中贝母素甲和贝母素乙的含量测定。

关键词:杏贝止咳颗粒;贝母素甲;贝母素乙;含量测定;高效液相色谱-蒸发光散射法

中图分类号:R932;R284.2;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)06-0031-03

Content Determination of Peimine and Peiminine in Xingbei Zhike Granules by HPLC-ELSD

YANG Zhihui¹, CHENG Cheng¹, GAO Xiaoyan²

(1. Lianyungang Food and Drug Inspection Center, Lianyungang, Jiangsu, China 222006; 2. Jiangsu Kangyuan Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang, Jiangsu, China 222001)

Abstract: Objective To establish an HPLC-ELSD method for the content determination of peimine and peiminine in Xingbei Zhike Granules. **Methods** The chromatographic column was Phenomenex C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 70% acetonitrile solution(containing 0.08% diethylamine), the flow rate was 0.8 L/min, the temperature of ELSD drift tube was 85℃, the flow rate of carrier gas(nitrogen) was 2.1 L/min, the temperature of atomizer was 70℃, and the sample size was 10 μL. **Results** The peimine and peiminine showed good liner relationship in the ranges of 0.133-2.655 μg and 0.125-2.547 μg, the RSDs of precision, stability and repeatability were less than 2%. The average recovery rates were 99.22%-100.66%, 96.08%-99.86%, RSDs were 0.48% and 1.08% (n=9). **Conclusion** The method is simple and accurate, it has good precision, stability and repeatability, which can be used for the content determination of peimine and peiminine in Xingbei Zhike Granules.

Key words: Xingbei Zhike Granules; peimine; peiminine; content determination; HPLC-ELSD

第一作者:杨智慧,女,大学本科,副主任药师,研究方向为药品检验,(电话)0518-85836780。

装置纯化测量;最后是正确输入被测样品的折光率和吸收率。粒径的测试中,方法及仪器不同,测试结果差异较大,重复性不好。本研究中采用同样条件,测试结果有较好的重复性和准确性,为提高原料药和药物制剂生产质量提供了现实指导意义。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:132-134.
- [2] 吴 芸,孙小路. 激光散射法测定阿维A原料药粒度[J]. 中国药房,2013,24(17):1606-1608.
- [3] 邓怡平,赵修华,祖元刚,等. 布洛芬纳米微粉的制备、表征及体外透皮性研究[J]. 中国药房,2017,28(1):99-102.
- [4] 张美荣,王唯红. 左旋多巴原料药粒度分析方法的研究[J]. 齐鲁药事,2010,29(8):474-476.
- [5] 钟潇骁,曹 雯,杨必勇. 布地奈德鼻喷雾剂粒度分布的测

- 定及一致性分析[J]. 中国药房,2017,28(18):2560-2563.
- [6] 金 粟,李士远,张秀荣,等. 甘草次酸酯化乳的质量评价指标探讨[J]. 中国药房,2017,28(6):800-803.
- [7] 李 洁,李婷婷. 激光散射法测定磺胺嘧啶银原料粒度分布[J]. 中国药事,2015,29(1):40-44.
- [8] 邓银来,徐 静,吴晓明. 激光散射法测定替格瑞洛原料药的粒度分布[J]. 中国药物评价,2017,34(3):171-174.
- [9] 陈文斐,倪健新. 左氧氟沙星/PLGA亚微粒的制备、表征和体外释药考察[J]. 中国药师,2013,16(4):550-552.
- [10] 徐 俊,闫启东,金银秀. 阿托伐他汀钙纳米粒的制备与质量评价[J]. 中国医院药学杂志,2016,36(12):975-980.
- [11] 杨正红. 如何判断和选择激光粒度分析仪[J]. 现代科学仪器,2000(1):58-59.
- [12] 李 芳. MS3000激光粒度分析仪介绍[J]. 华南地质与矿产,2016,32(1):85.

(收稿日期:2018-07-10)

杏贝止咳颗粒由麻黄、前胡、浙贝母、桔梗、苦杏仁、百部、甘草等12种中药组方,有清宣肺气、止咳化痰功效,临床主要用于外感咳嗽的治疗^[1]。现行质量标准为原国家食品药品监督管理局标准,该标准在定性鉴别之外,仅对苦杏仁中的苦杏仁苷进行了含量控制^[1]。方中浙贝母有清热化痰、润肺止咳功效,贝母素甲和贝母素乙为其主要活性成分^[2-3]。本研究采用高效液相色谱-蒸发光散射(HPLC-ELSD)法测定两成分含量,为完善该药品质量标准提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪,包括 1260 Infinity 蒸发光散射检测器(美国 Agilent 公司);BP211D 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司);Milli-Q Integral 3 型超纯水机(美国 Millipore 公司);SK250HP 型超声波清洗仪(上海利导超声仪器有限公司)。

1.2 试药

贝母素甲对照品(批号为 110750-201612,纯度为 96.2%),贝母素乙对照品(批号为 110751-201712,纯度为 97.7%),均购自中国食品药品检定研究院;杏贝止咳颗粒(江苏康缘药业股份有限公司,批号分别为 170721,170906,171108,规格为每袋 4 g);甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

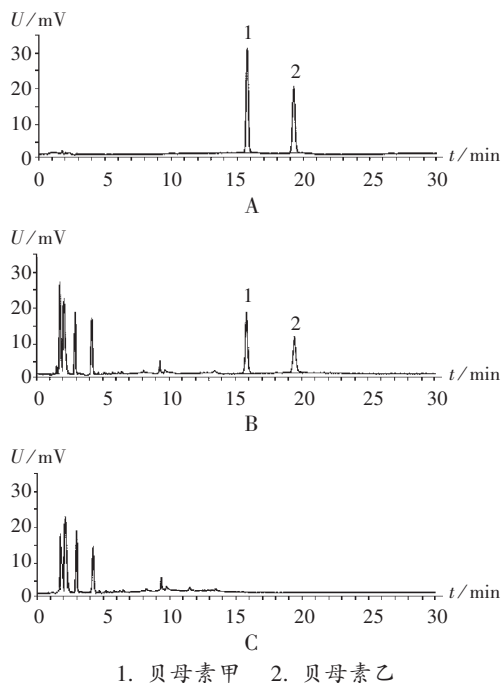
色谱柱:Phenomenex C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:70% 乙腈溶液(含 0.08% 二乙胺);流速:0.8 mL/min;ELSD 漂移管温度:85℃;载气(氮气)流速:2.1 L/min;雾化器温度:70℃;进样量:10 μL^[4-5]。

2.2 溶液制备

称取贝母素甲、贝母素乙对照品各适量,精密称定,加甲醇制成贝母素甲和贝母素乙质量浓度分别为 1.328 g/L 和 1.247 g/L 的混合对照品贮备液,精密量取 5 mL,置 50 mL 容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得混合对照品溶液。取样品适量,称取 4.003 2 g,精密称定,置圆底烧瓶中,精密加浓氨溶液 5 mL,浸润 2 h,加氯仿-乙酸乙酯-甲醇(1:7:2, V/V/V)混合溶液 70 mL,置 80℃ 水浴上加热回流 2 h,放冷,滤过;残渣以混合溶液溶解,滤过,合并滤液,置 100 mL 容量瓶中,加混合溶液定容。精密量取续滤液 50 mL,置蒸发皿中蒸干,残渣用甲醇溶解并定容至 5 mL,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按杏贝止咳颗粒处方和工艺制备缺贝母的阴性样品,同法制成阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:取上述溶液各适量,按拟订色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图 1。结果阴性对照品溶液色谱在与贝母素甲和贝母素乙对照品溶液色谱相同保留时间处无干扰峰,说明本试验专属性良好。



1. 贝母素甲 2. 贝母素乙
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液
图 1 高效液相色谱图

线性关系考察:取混合对照品贮备液 2.0, 1.0, 0.5, 0.2, 0.1 mL, 分别置 10 mL 容量瓶中,加甲醇定容,制得系列混合对照品溶液,按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测对照品进样量($X, \mu\text{g}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得贝母素甲和贝母素乙回归方程分别为 $Y_{\text{甲}} = 1.4685 X_{\text{甲}} + 5.9014, r = 0.9999 (n=5)$, $Y_{\text{乙}} = 1.4693 X_{\text{乙}} + 6.2257, r = 0.9997 (n=5)$ 。结果表明,贝母素甲和贝母素乙进样量分别在 0.133 ~ 2.655 μg 和 0.125 ~ 2.547 μg 范围内与峰面积线性关系良好。

检测限和定量限测定:分别精密量取混合对照品溶液适量,倍比稀释,按拟订色谱条件进样测定,以信噪比(S/N)为 10:1 和 3:1 分别计算定量限和检测限。结果贝母素甲和贝母素乙定量限分别为 0.132 8 μg 和 0.124 7 μg,检测限分别为 0.044 26 μg 和 0.062 35 μg。

精密度试验:取混合对照品溶液适量,按拟订色谱条件进样,连续测定 6 次,记录峰面积。结果贝母素甲和贝母素乙峰面积的 RSD 分别为 0.91% 和 1.09% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取供试品溶液(批号为 170721)适量,

分别于室温下放置 0, 1, 3, 5, 8, 12 h 时进样, 按拟订色谱条件测定, 记录峰面积。结果贝母素甲和贝母素乙峰面积的 *RSD* 分别为 1.23% 和 1.42% ($n=6$), 表明供试品溶液室温放置 12 h 内基本稳定。

重复性试验: 称取样品 (批号为 170721) 适量, 精密称定, 共 6 份, 同法制备供试品溶液, 按拟订色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算含量。结果贝母素甲和贝母素乙平均含量分别为每袋 0.892 4 mg 和 1.172 6 mg, *RSD* 分别为 1.12% 和 1.12% ($n=6$), 表明方法重复性良好。

加样回收试验: 称取已知含量的样品 (批号为 170721) 适量, 每份 2.0 g, 共 9 份, 按 80%, 100%, 120% 水平分别加入混合对照品贮备液, 同法制备供试品溶液, 按拟订色谱条件进样测定, 记录峰面积, 并计算加样回收率。结果见表 1。

表 1 加样回收试验结果 ($n=9$)

样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		<i>RSD</i> (%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0.446 6	0.624 0	0.332 0	0.311 8	0.776 9	0.923 6	99.49	96.08				
0.446 0	0.623 2	0.332 0	0.311 8	0.780 2	0.930 4	100.66	98.52				
0.447 1	0.624 8	0.332 0	0.311 8	0.776 5	0.932 1	99.22	98.56				
0.446 3	0.623 7	0.557 8	0.523 7	1.001 8	1.139 2	99.59	98.43				
0.446 6	0.624 1	0.557 8	0.523 7	1.006 9	1.139 6	100.45	98.43	99.84	98.59	0.48	1.08
0.446 1	0.623 4	0.557 8	0.523 7	1.004 4	1.141 6	100.09	98.95				
0.447 2	0.624 8	0.770 2	0.723 3	1.214 8	1.347 1	99.66	99.86				
0.446 9	0.624 5	0.770 2	0.723 3	1.213 9	1.345 2	99.58	99.64				
0.447 7	0.625 5	0.770 2	0.723 3	1.216 6	1.339 7	99.83	98.74				

注: A 为贝母素甲, B 为贝母素乙。

2.4 样品含量测定

取样品各适量, 同法制备供试品溶液, 按拟订色谱条件进样测定, 记录峰面积, 以外标两点法计算含量。结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果 (mg/袋, $n=6$)

批号	贝母素甲	贝母素乙
170721	0.892 4	1.172 6
170906	0.911 0	1.171 5
171108	0.899 2	1.210 6

3 讨论

本试验中采用紫外-可见分光光度仪对对照品溶液进行全波长扫描, 贝母素甲和贝母素乙均无强发色基团, 紫外吸收很弱且为末端吸收, 基线不稳, 背景干扰严重。而 ELSD 适用于无紫外吸收化合物的定量定性分析, 基线平稳, 灵敏度较高。本试验中通过对不同比例的甲醇-水、乙腈-水及乙腈-水 (含 0.08% 二乙胺) 等流动相进行比较, 结果显示, 采用乙腈-水 (含 0.08%

二乙胺) 作为流动相时, 基线噪音小, 分离效果良好, 各色谱峰无拖尾现象, 且分析时间较短, 保留时间适中。本试验中在参考文献[6-8]的基础上, 对漂移管温度和载气流速进行优化, 考察了漂移管温度为 70~100 ℃、载气流速为 1.5~2.2 L/min 时待测成分的响应值, 结果显示, 漂移管温度为 85 ℃、载气流速为 2.1 L/min 时, 响应值最高, 色谱峰峰形和分离度均良好, 且不受杂质干扰。

本试验中对提取溶剂、提取方法和提取时间进行了优化筛选, 分别以氯仿、乙酸乙酯、乙酸乙酯-甲醇 (4:1, V/V)、氯仿-甲醇 (4:1, V/V) 及氯仿-乙酸乙酯-甲醇 (2:7:1, V/V/V) 为提取溶剂进行试验, 结果显示, 氯仿-甲醇 (4:1, V/V) 和氯仿-乙酸乙酯-甲醇 (2:7:1, V/V/V) 2 种提取溶剂提取效果较好, 考虑乙酸乙酯的毒性低于氯仿, 故选用后者; 比较了超声、加热回流提取 2 种方法的提取效果^[7], 结果显示, 加热回流提取时 2 种待测成分含量较高; 比较了提取 1, 1.5, 2, 2.5, 3 h 时的提取效果, 结果显示, 提取 2 h 后待测成分含量无明显变化, 故选择加热回流提取 2 h; 选用了 50, 60, 70, 80, 90 mL 的氯仿-乙酸乙酯-甲醇 (2:7:1, V/V/V) 混合溶液进行加热回流提取, 结果显示, 溶液量 70 mL 以上待测成分含量无明显变化, 故选择 70 mL 混合溶液。

综上所述, 本研究中建立的方法操作简便、准确, 精密度、稳定性、重复性好, 可用于杏贝止咳颗粒贝母素甲和贝母素乙的含量测定。

参考文献:

- [1] 张晓红. 杏贝止咳颗粒辅佐治疗小儿急性支气管炎疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2010, 19(17): 214.
- [2] 张勇慧, 阮汉利, 吴继洲. 贝母的药理作用研究概况[J]. 医药导报, 2003, 22(11): 797-799.
- [3] 王云飞, 顾政一, 何承辉. 贝母属植物化学成分与药理活性研究进展[J]. 西北药学杂志, 2015, 20(4): 436-440.
- [4] 岳莉. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定脑络通胶囊中黄芪甲苷含量[J]. 中国药业, 2014, 23(8): 33-35.
- [5] 马双成, 张树藩, 鲁静, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定鹤蟾片中贝母素甲和贝母素乙的含量[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(1): 118-120.
- [6] 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, 2015: 292, 640, 691.
- [7] 何敏, 郭田, 杜昕, 等. 高效液相色谱法测定浙贝母配方颗粒中贝母素甲和贝母素乙的含量[J]. 医药导报, 2018, 37(4): 477-479.
- [8] 唐云, 刘汉清. HPLC-ELSD 法测定散结镇痛片中贝母素甲、贝母素乙[J]. 中成药, 2012, 34(7): 1295-1298.

(收稿日期: 2018-07-26)