

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.08.009

高效液相色谱-蒸发光散射法测定黄氏响声含片中 贝母素甲和贝母素乙含量

陆丹¹, 赵懿清¹, 高秋芳¹, 郭卫东², 邹济高²

(1. 江苏省无锡市第三人民医院, 江苏 无锡 214000; 2. 江苏省无锡济民可信山禾药业股份有限公司, 江苏 无锡 214000)

摘要:目的 建立测定黄氏响声含片中贝母素甲和贝母素乙含量的高效液相色谱-蒸发光散射法。方法 色谱柱为 Phenomenex Gemini-NX C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水(65:35, V/V, 含 0.35% 二乙胺), 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 30℃, 进样量为 20 μL, 蒸发光散射器漂移管温度为 70℃, 载气流速为 1.4 L/min。结果 贝母素甲和贝母素乙质量浓度线性范围分别为 25.32~202.56 μg/mL ($r=0.9998$) 和 25.19~201.48 μg/mL ($r=0.9999$), 定量限分别为 189.9 ng 和 251.9 ng, 检测限分别为 79.1 ng 和 75.6 ng, 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 3% ($n=6$), 平均回收率分别为 100.22% ($RSD=2.18\%$, $n=6$) 和 98.96% ($RSD=2.42\%$, $n=6$)。结论 该方法操作简便、准确, 精密度、稳定性、重复性均良好, 可用于测定黄氏响声含片中贝母素甲和贝母素乙的含量。

关键词: 高效液相色谱-蒸发光散射法; 黄氏响声含片; 贝母素甲; 贝母素乙; 含量测定

中图分类号: R917; R927.2

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)08-0024-03

Content Determination of Peimine and Peiminine in Huangshi Xiangsheng Buccal Tablets by HPLC-ELSD

LU Dan¹, ZHAO Yiqing¹, GAO Qiufang¹, GUO Weidong², ZOU Jigao²

(1. Wuxi No. 3 People's Hospital, Wuxi, Jiangsu, China 214000; 2. Wuxi Jimicare Shanhe Pharmaceutical Co., Ltd., Wuxi, Jiangsu, China 214000)

Abstract: Objective To establish an HPLC-ELSD method for the content determination of peimine and peiminine in Huangshi Xiangsheng Buccal Tablets. **Methods** The chromatographic column was Phenomenex Gemini-NX C₁₈ column(150 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-water(65:35, V/V, containing 0.35% diethylamine), the flow rate was 1.0 L/min, the column temperature was 30℃, the sample size was 20 μL, the temperature of the ELSD drift tube was 70℃, and the flow rate of carrier gas was 1.4 L/min. **Results** The peimine and peiminine showed good relationship in the ranges of 25.32~202.56 μg/mL ($r=0.9998$) and 25.19~201.48 μg/mL ($r=0.9999$), respectively. The quantitative limits of peimine and peiminine were 189.9 ng and 251.9 ng, respectively. The detection limits of peimine and peiminine were 79.1 ng and 75.6 ng. RSDs of precision, stability and repeatability tests were all less than 3% ($n=6$), and the average recovery rates of peimine and peiminine were 100.22% ($RSD=2.18\%$, $n=6$) and 98.96% ($RSD=2.42\%$, $n=6$), respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate, and has good precision, stability and repeatability, which can be used for the content determination of peimine and peiminine in Huangshi Xiangsheng Buccal Tablets.

Key words: HPLC-ELSD; Huangshi Xiangsheng Buccal Tablets; peimine; peiminine; content determination

黄氏响声含片为复方制剂,由薄荷、浙贝母、连翘、蝉蜕、胖大海、酒大黄、川芎、儿茶、桔梗、诃子肉、甘草、薄荷脑等药材组方,可疏风清热、化痰散结、利咽开音。方中浙贝母为君药,可解毒散结消痈^[1],其主要成分为贝母素甲(浙贝母碱)和贝母素乙(去氢浙贝母碱)^[2]。本研究中采用高效液相色谱-蒸发光散射(HPLC-ELSD)法测定黄氏响声含片中贝母素甲和贝母素乙的含量,为该制剂的质量控制奠定基础。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪,包括 OpenLab 工作站(美国 Agilent 公司);ALLTECH 3300 型蒸发光散射检测器(美国奥泰科技<中国>有限公司);BP211D 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司);KQ250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为 250 W)。

1.2 试剂

黄氏响声含片(无锡济民可信山禾药业股份有限公司,批号分别为 171112,171121,171124,171204,171206,171207,180201,180204,180301,180303,180401,180403,180405,规格为每片 0.6 g);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;乙腈、甲醇为色谱纯,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 Gemini-NX C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(65:35, V/V, 含 0.035% 二乙胺);流速:1.0 mL/min;柱温:30℃;进样量:20 μL;ELSD 参数:漂移管温度为 70℃,载气流速为 1.4 L/min。

第一作者:陆丹,男,硕士研究生,主管中药师,研究方向为中药质量标准控制,(电子信箱)ldempty@163.com。

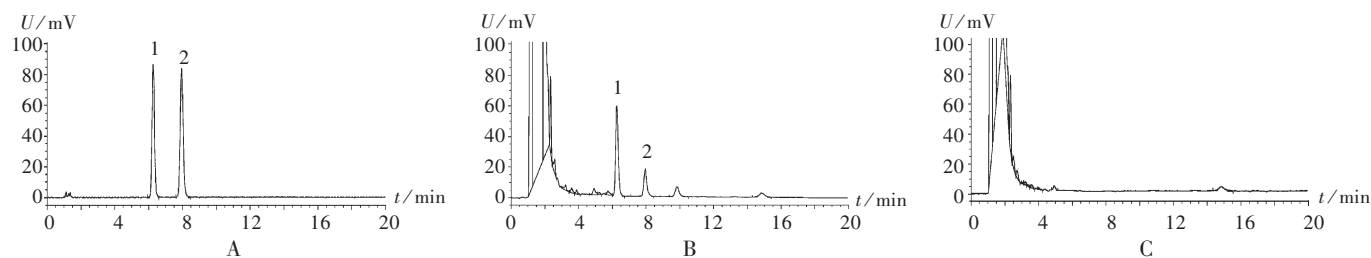
2.2 溶液制备

取贝母素甲和贝母素乙对照品各适量,精密称定,置容量瓶中,加流动相溶解并定容,制成贝母素甲和贝母素乙质量浓度分别为0.515 0 g/L和0.503 1 g/L的对照品贮备液,取适量,制得贝母素甲和贝母素乙质量浓度分别为0.506 4 g/L和0.503 7 g/L的混合对照品溶液。取样品适量,捣碎,研细,过4号筛,取约5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入浓氨水-乙醇(1:2, V/V) 10 mL,密塞,浸泡30 min,加乙醚-三氯甲烷-乙醇(50:16:5, V/V/V)混合溶液25 mL,超声处理30 min(控制水温低于30℃),滤过,滤渣用适量乙醚-三氯甲

烷-乙醇(50:16:5, V/V/V)洗涤3次,合并滤液和洗液,60℃水浴挥干,残渣用流动相2 mL溶解,经0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按处方和工艺制备缺浙贝母的阴性样品,按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性试验:取2.2项下3种溶液各适量,按拟订色谱条件进样测定,记录色谱图(图1)。结果理论板数按贝母素甲、贝母素乙峰计均不低于3 000,分离度均大于1.5,基线分离良好,保留时间分别为6.273 min和7.957 min,对称因子分别为0.82和0.84。



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:分别精密量取混合对照品溶液0.5, 1.0, 2.0, 2.5, 4.0 mL,置10 mL容量瓶中,加流动相定容,摇匀,制得系列对照品溶液,精密量取20 μL,按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度(μg/mL)的自然对数值(X)为横坐标、峰面积的自然对数值(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 $Y_{甲}=1.4647X_{甲}-0.1089(r=0.9998, n=5)$, $Y_{乙}=1.4536X_{乙}-0.0160(r=0.9999, n=5)$ 。结果表明,贝母素甲和贝母素乙质量浓度线性范围分别为25.32~202.56 μg/mL和25.19~201.48 μg/mL。

定量限与检测限考察:精密量取混合对照品溶液适量,倍比稀释,并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、检测限。结果贝母素甲和贝母素乙的定量限分别为189.9 ng和251.9 ng,检测限分别为79.1 ng和75.6 ng。

精密度试验:取混合对照品溶液适量,按拟订色谱条件连续进样测定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1.51%和0.85%(n=6),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取供试品(批号为180403)溶液适量,分别于室温下放置0,1,2,4,8,12 h,按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积。结果贝母素甲和贝母素乙峰面积的RSD分别为2.28%和1.77%(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180403)适量,精密称定,同法制备供试品溶液,再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36.619 μg/g和15.677 μg/g, RSD分别为2.47%和2.24%(n=6),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量样品(批号为180403)6份,每份约2.5 g,精密称定,分别加入一定质量浓度的对照品溶液,同法制备供试品溶液,再按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表1。

表1 加样回收试验结果(n=6)

样品含量(μg)		加入量(μg)		测得量(μg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
91.61	39.22	91.67	39.24	185.08	77.83	101.96	98.39				
91.53	39.19	91.67	39.24	183.56	79.84	100.39	103.59				
91.57	39.20	91.67	39.24	181.98	77.71	98.63	98.14	100.22	98.96	2.18	2.42
91.60	39.22	91.67	39.24	180.21	77.98	96.66	98.78				
91.55	39.19	91.67	39.24	184.57	77.09	101.47	96.59				
91.56	39.20	91.67	39.24	185.25	77.75	102.20	98.24				

注:A为贝母素甲,B为贝母素乙。

2.4 样品含量测定

取13批样品各适量,同法制备供试品溶液,再按拟订色谱条件进样测定,平行测定3次,记录峰面积,并计算样品含量。结果见表2。可见,各批次间贝母素甲和贝母素乙的含量存在一定差异,平均含量分别为0.030 7 mg/g和0.013 6 mg/g, RSD分别为10.02%和9.01%,平均总含量为0.044 4 mg/g, RSD为8.57%;以平均含量的80%制订含量下限,样品中贝母素甲、贝母素乙及总含量应分别不低于0.024 6 mg/g,0.010 9 mg/g,0.035 5 mg/g,各批样品均符合要求。

表2 样品含量测定结果($n=3$)

批号	贝母素甲		贝母素乙		总含量 (mg/g)
	含量(mg/g)	RSD(%)	含量(mg/g)	RSD(%)	
171112	0.029 8	1.68	0.013 8	1.26	0.043 6
171121	0.026 7	1.13	0.012 1	0.97	0.038 8
171124	0.028 1	1.87	0.013 1	1.08	0.041 2
171204	0.026 5	0.95	0.012 7	1.20	0.039 2
171206	0.029 4	1.83	0.015 4	1.24	0.044 8
171207	0.028 5	0.98	0.015 1	0.95	0.043 6
180201	0.031 8	1.81	0.013 0	1.53	0.044 8
180204	0.031 1	1.17	0.012 8	1.22	0.043 9
180301	0.030 0	0.99	0.012 7	1.06	0.042 7
180303	0.034 4	1.32	0.014 3	0.90	0.048 7
180401	0.034 4	1.21	0.014 4	0.89	0.048 8
180403	0.036 6	1.89	0.015 7	1.86	0.052 3
180405	0.032 1	1.24	0.012 2	1.94	0.044 3

3 讨论

3.1 分析条件选择及优化

贝母类生物碱为异甾类生物碱,文献报道的测定方法有薄层扫描法、HPLC法、柱前衍生化 HPLC法、柱前衍生化气相色谱法^[3]、近红外光谱法^[4]、化学发光分析法等^[5]。由于贝母素甲无紫外吸收,贝母素乙仅有末端吸收,不宜用紫外检测器检测,同时考虑到灵敏度及操作的简便性,因此采用 HPLC-ELSD 法分析,效果较佳。

为了降低灵敏度损失,同时使流动相充分挥发,选择不分流模式。在此基础上考察漂移管温度及载气流速,最终确定漂移管温度 70℃,载气流速 1.4 L/min。

2015年版《中国药典(一部)》浙贝母药材和复方黄氏响声丸项下均采用 HPLC-ELSD 法测定贝母素甲和贝母素乙的含量,试验中考察了流动相乙腈-水的比例(70:30,65:35)及二乙胺的加入量(0.030%,0.035%,0.050%)对结果的影响。结果显示,流动相为乙腈-水(65:35, V/V,含 0.035%二乙胺)时,待测成分分离良好^[1]。

3.2 样品前处理方法优化^[1,6-15]

以待测成分含量为指标,优化样品前处理方法。考虑峰面积的适宜性,供试品的取样量选择 5 g,保持取样量不变,考察浓氨水-乙醇(1:2, V/V)混合液的用量为 2,3,5,10,15,20 mL 时的浸泡效果。结果显示,当用量为 20 mL 时色谱峰基线不稳,10 mL 和 15 mL 的浸泡效果均较佳,考虑到经济性,混合液用量选择 10 mL。分别用超声和加热回流方式提取供试品溶液,结果两者提取效果基本一致,超声提取更简便,故选择超声提取。比较乙醚-氯仿-乙醇(50:16:5, V/V/V)、三氯甲烷-甲醇(4:1, V/V)和流动相为超声溶剂时的提取效果,结果显示,用流动相处理的样品很黏稠,糖类物质被提取出而影响测定,采用乙醚-氯仿-乙醇(50:16:5, V/V/V)作为超声溶剂,提取效果最佳,可满足测定要

求。考察超声提取溶剂量分别为 15,25,50 mL 时的提取效果,结果表明,加入混合提取液 25 mL 即可将贝母素甲、贝母素乙提取完全。设置超声时间为 15,30,45 min,考察提取效果,结果超声处理 30 min 即可将贝母素甲、贝母素乙提取完全。比较乙腈、水、甲醇、流动相 4 种复溶溶剂,结果显示,贝母素甲、贝母素乙在水中的溶解性较差,水复溶样品未见出峰,用流动相溶解样品处理效果最佳,可满足测定要求。

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、重复性均良好,可用于测定黄氏响声含片中贝母素甲和贝母素乙的含量。

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,2015:292,1469-1470.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海人民出版社,1977:1920.
- [3] 苏建,王宝荣,林瑞超. 十几种贝母及其制剂中贝母素甲、乙及西贝碱的检验方法和品质的研究与进展[J]. 中国药事,2013,27(1):88-92.
- [4] 赵耀东,杜伟锋,王胜波,等. 基于近红外光谱的浙贝母中贝母素甲和贝母素乙含量快速检测方法的建立[J]. 中华中医药学刊,2013,31(4):756-758.
- [5] 韩鸿萍,郑红,马天一,等. 分子印迹——化学发光传感器测定贝母属类样品中的贝母素乙[J]. 化学试剂,2016,38(11):1081-1085.
- [6] 金玉琴,曾国武,王龙虎,等. 不同浸泡时间对浙贝母有效成分提取的影响[J]. 中国药业,2012,21(20):24-25.
- [7] 范蕾,王伟影. 可同时测定蛇胆川贝液中贝母素甲与贝母素乙含量的方法[J]. 中国药业,2012,21(2):41-42.
- [8] 张秀丽,郑凯. 安嗽化痰丸质量标准研究[J]. 中国药业,2015,24(12):64-66.
- [9] 叶耀辉,应亚宾,陈丽华,等. 不同年限野生和移栽彭泽贝母中 3 个生物碱含量的比较[J]. 中药材,2015,38(6):1161-1163.
- [10] 杜伟锋,贾永强,张焱新,等. HPLC-ELSD 法同时测定浙贝母饮片硫熏前后 3 种有效成分的含量[J]. 药物分析杂志,2015,35(4):675-678.
- [11] 李勇,李成网,张洁. HPLC 同时测定皖贝止咳滴丸中 3 种有效成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(2):63-66.
- [12] 陈健. HPLC 测定清热止咳颗粒中的贝母素甲和贝母素乙[J]. 华西药理学杂志,2016,31(3):305-306.
- [13] 闵会,吴健,楼芳芳,等. HPLC 测定浙贝母花中的贝母素甲和贝母素乙[J]. 华西药理学杂志,2016,31(3):307-309.
- [14] 沈立茹,裴璐,曹薇薇,等. HPLC-ELSD 法测定桔贝合剂中贝母素甲与贝母素乙的含量[J]. 中南药学,2017,12(15):1765-1767.
- [15] 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.

(收稿日期:2018-08-15)