

中图分类号: R932; R284.1; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)19-0091-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.19.019



高效液相色谱法同时测定益肺止咳颗粒中7种成分含量*

刘永昌¹, 王雪梅², 李喜香^{2Δ}, 高丽霞¹

(1. 甘肃中医药大学药学院, 甘肃 兰州 730000; 2. 甘肃省中医院, 甘肃 兰州 730050)

摘要:目的 建立同时测定益肺止咳颗粒中7种成分含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Waters Fun Fire C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.15% 磷酸溶液(梯度洗脱), 检测波长分别为 210 nm(0~36 min, 盐酸麻黄碱、苦杏仁苷), 326 nm(37~41 min, 芥子碱硫酸盐), 260 nm(42~53 min, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸、甘草苷), 283 nm(54~71 min, 橙皮苷), 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 25 °C, 进样量为 10 μL。结果 盐酸麻黄碱、苦杏仁苷、芥子碱硫酸盐、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸、甘草苷、橙皮苷的质量浓度分别在 2.37~47.4 μg/mL、6.61~132.2 μg/mL、2.74~54.8 μg/mL、1.58~31.6 μg/mL、0.657~13.14 μg/mL、1.87~37.4 μg/mL、7.87~157.4 μg/mL 范围内与峰面积积分值线性关系良好($r \geq 0.9996$, $n = 5$); 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均低于 3% ($n = 6$); 平均加样回收率分别为 99.77%, 99.05%, 100.37%, 99.64%, 98.79%, 100.10%, 99.36%, RSD 分别为 1.29%, 1.36%, 2.09%, 1.64%, 2.10%, 1.45%, 2.09% ($n = 9$)。结论 该方法操作简便、重复性和稳定性均良好, 可用于益肺止咳颗粒中多种成分的含量测定。

关键词: 益肺止咳颗粒; 高效液相色谱法; 含量测定

Simultaneous Determination of Seven Components in Yifei Zhisou Granules by HPLC

LIU Yongchang¹, WANG Xuemei², LI Xixiang², GAO Lixia¹

(1. College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou, Gansu, China 730000; 2. Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou, Gansu, China 730050)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of seven components in Yifei Zhisou Granules. **Methods** The chromatographic column was Waters Fun Fire C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.15% phosphoric acid solution (gradient elution), the detection wavelengths were 210 nm (0-36 min, ephedrine hydrochloride, and amygdalin), 326 nm (37-41 min, glucosine thiocyanate), 260 nm (42-53 min, isoflavone glucoside, ferulic acid, and glycyrrhizin), and 283 nm (54-71 min, hesperidin), the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 25 °C, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear ranges of ephedrine hydrochloride, amygdalin, glucosine thiocyanate, isoflavone glucoside, ferulic acid, glycyrrhizin and hesperidin were 2.37-47.4 μg/mL, 6.61-132.2 μg/mL, 2.74-54.8 μg/mL, 1.58-31.6 μg/mL, 0.657-13.14 μg/mL, 1.87-37.4 μg/mL, and 7.87-157.4 μg/mL ($r \geq 0.9996$, $n = 5$), respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were lower than 3% ($n = 6$). The average recoveries of the above seven components were 99.77%, 99.05%, 100.37%, 99.64%, 98.79%, 100.10%, and 99.36% with RSDs of 1.29%, 1.36%, 2.09%, 1.64%, 2.10%, 1.45%, and 2.09% ($n = 9$), respectively. **Conclusion** This method is simple, reproducible, and stable, which can be used for the content determination of various components in Yifei Zhisou Granules.

Key words: Yifei Zhisou Granules; HPLC; content determination

益肺止咳颗粒由麻黄、杏仁、半夏、茯苓、甘草、陈皮、当归等15味中药材组方,具有宣肺和喘、祛痰止咳等功效,用于治疗新咳久嗽、气喘痰多、慢性支气管炎等症。但目前益肺止咳颗粒尚未建立质量标准,故本研究中根据不同药味的药理学作用和有效部位,结合君臣佐使的组方原则,选择君药麻黄中的有效成分盐酸麻黄碱、苦杏仁中的有效成分苦杏仁苷,臣药当归中的有效成分阿魏酸、黄芪中的有效成分毛蕊异黄酮葡萄糖苷,以及在处方中起止咳化痰、祛痰止咳功效的陈皮、莱菔子、甘草中的有效成分橙皮苷、芥子碱硫酸盐、甘草苷作为检测指标,

建立同时测定这7种成分含量的高效液相色谱(HPLC)法,以完善其质量控制标准。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters2487型高效液相色谱仪(美国Waters公司); XSE205型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度为十万分之一);MS07-MS30型数控超声波清洗器(深圳市德瑞超声波设备有限公司,功率为500 W,频率为40 kHz)。

1.2 试剂

半夏(批号为200503),茯苓(批号为200321),麻黄

* 基金项目:2022年中央转移支付医疗服务与保障能力提升(中医药事业传承与发展部分)——中医药人才培养重点学科建设项目[甘财社[2022]48号]。

第一作者:刘永昌,男,硕士,研究方向为中药炮制与制剂,(电子信箱)2445979967@qq.com。

Δ通信作者:李喜香,女,硕士,主任中药师,研究方向为中药制剂,(电子信箱)lixixiang929@163.com。

(批号为211105), 莱菔子(批号为210803), 黄芪(批号为200321), 甘草(批号为211121), 地骨皮(批号为210726), 桑白皮(批号为200218), 陈皮(批号为200427), 当归(批号为210316), 苦杏仁(批号为210522), 北沙参(批号为200321), 川贝(批号为210917), 前胡(批号为210507), 紫苏子(批号为210511), 均购自甘肃康乐药业有限责任公司, 并由甘肃省中医院药理学李喜香主任中药师鉴定为正品, 符合2020年版《中国药典(一部)》相关规定; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品(批号为J19HB174062, 纯度为98%), 甘草苷对照品(批号为Z07J12X136344, 纯度为94.5%), 盐酸麻黄碱对照品(批号为A21070585, 纯度为98%), 阿魏酸对照品(批号为L03A9D57744, 纯度为99%), 芥子碱硫氰酸盐对照品(批号为O27GB165515, 纯度为98%), 橙皮苷对照品(批号为K09S11L123847, 纯度为98%), 苦杏仁苷对照品(批号为Z28A6L2815, 纯度为98%), 均购自上海源叶生物科技有限公司; 甲醇、乙腈均为色谱纯, 水为娃哈哈纯净水, 磷酸为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Waters Fun Fire C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A) - 0.15% 磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0~5 min时5%A, 5~15 min时5%A → 8%A, 15~30 min时8%A, 30~40 min时8%A → 17%A, 40~65 min时17%A → 20%A, 65~66 min时20%A → 5%A, 66~71 min时5%A); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 210 nm(0~36 min, 盐酸麻黄碱、苦杏仁苷), 326 nm(37~41 min, 芥子碱硫氰酸盐), 260 nm(42~53 min, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸、甘草苷), 283 nm(54~71 min, 橙皮苷); 柱温: 25 °C; 进样量: 10 μL。

2.2 样品制备

按处方量称取黄芪、半夏、茯苓、甘草、地骨皮、桑白皮、陈皮、当归8味药材, 加10倍量水提取2次, 每次96 min, 得水提取液; 按处方量称取苦杏仁、莱菔子、北沙参、川贝、前胡、麻黄、紫苏子7味药材, 加11倍量66%乙醇, 提取95 min, 得乙醇提取液。将水提取液常压浓缩为清膏; 乙醇提取液减压浓缩, 回收乙醇至无醇味, 合并水提取液清膏和乙醇提取液清膏, 浓缩至相对密度为1.15~1.20的稠膏, 加入2倍量的可溶性淀粉, 制软材, 60 °C干燥2 h, 过1号筛和5号筛, 整粒, 即得益肺止咳颗粒。按此工艺制备3批样品, 批号分别为20220809, 20220810, 20220811。

2.3 溶液制备

混合对照品溶液: 取7种成分对照品各适量, 精密称定, 加甲醇制成每1 mL分别含盐酸麻黄碱2.37 mg、

苦杏仁苷1.322 mg、芥子碱硫氰酸盐0.548 mg、毛蕊异黄酮葡萄糖苷0.316 mg、阿魏酸1.314 mg、甘草苷0.374 mg、橙皮苷1.574 mg的对照品贮备液; 精密吸取对照品贮备液适量, 用甲醇定容至5 mL, 即得上述成分质量浓度分别为47.40, 132.20, 54.80, 31.60, 13.14, 37.40, 157.40 μg/mL的混合对照品溶液。

供试品溶液: 取2.2项下样品颗粒适量, 研细, 取2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入25 mL甲醇, 称定质量, 超声(功率为500 W, 频率为40 kHz)处理30 min, 放冷, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

阴性对照品溶液: 按样品制备工艺制得缺黄芪、麻黄、甘草、苦杏仁、当归、莱菔子、陈皮的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制备, 即得。

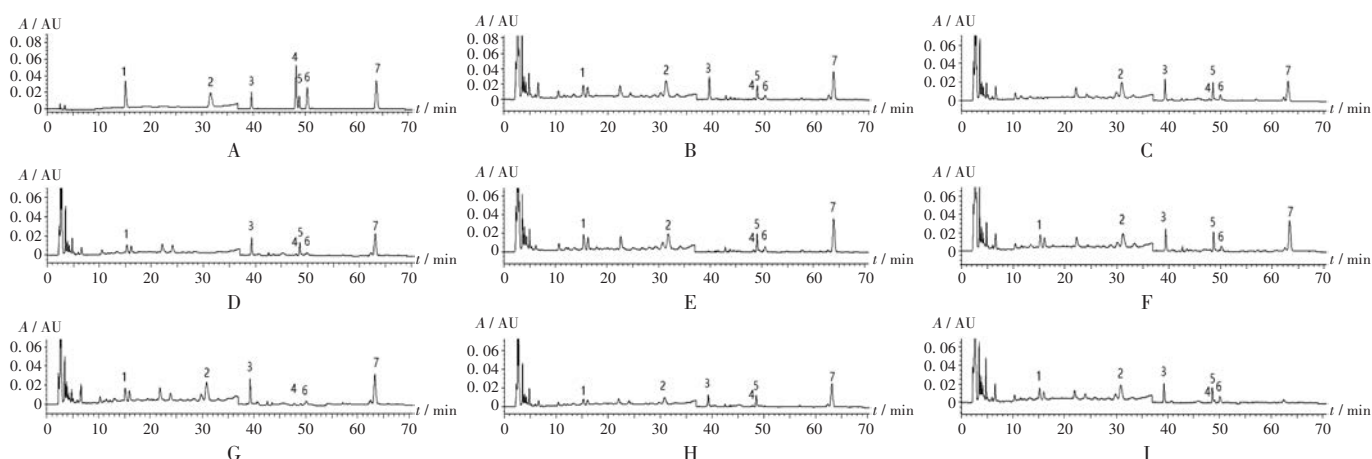
2.4 方法学考察

专属性试验: 取2.3项下3种溶液各10 μL, 按2.1项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果供试品溶液色谱中, 在与混合对照品溶液色谱相同保留时间处有相应峰, 各成分均能达到基线分离(分离度 > 1.5), 且阴性对照无干扰, 表明方法专属性良好。色谱图见图1。

线性关系考察与检测限、定量限确定: 精密吸取2.3项下对照品贮备液适量, 用甲醇定容至5 mL, 制成每1 mL分别含盐酸麻黄碱2.37, 4.74, 7.11, 9.48, 47.4 μg, 苦杏仁苷6.61, 13.22, 19.83, 26.44, 132.2 μg, 芥子碱硫氰酸盐2.74, 5.48, 8.22, 10.96, 54.8 μg, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷1.58, 3.16, 4.74, 6.32, 31.6 μg, 阿魏酸0.657, 1.314, 1.971, 2.628, 13.14 μg, 甘草苷1.87, 3.74, 5.61, 7.48, 37.4 μg, 橙皮苷7.87, 15.74, 23.16, 31.48, 157.4 μg的对照品溶液, 分别精密吸取10 μL, 按2.1项下色谱条件进样测定。以各成分的质量浓度(X , μg/mL)为横坐标、峰面积积分值(Y)为纵坐标进行线性回归^[1], 得各待测成分的回归方程。分别以信噪比(S/N)为10:1和3:1时混合对照品溶液的质量浓度为定量限和检测限。结果见表1。

精密度试验: 取2.3项下混合对照品溶液适量, 按2.1项下色谱条件进样测定6次, 记录峰面积。结果盐酸麻黄碱、苦杏仁苷、芥子碱硫氰酸盐、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸、甘草苷、橙皮苷峰面积的RSD分别为2.62%, 1.25%, 1.72%, 0.48%, 2.74%, 0.71%, 0.57% ($n=6$); 取线性关系考察项下各成分最高、中间、最低3个质量浓度的对照品溶液适量, 按2.1项下色谱条件连续进样测定3 d, 结果各质量浓度对照品溶液日间精密度的RSD均小于3% ($n=3$), 表明仪器精密度良好。

重复性试验: 取同一批(批号为20220809)样品6份, 按2.3项下方法制备供试品溶液, 按2.1项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算含量。结果盐酸麻黄碱、



1. 盐酸麻黄碱 2. 苦杏仁苷 3. 芥子碱硫氰酸盐 4. 阿魏酸 5. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 6. 甘草苷 7. 橙皮苷
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C - I. 阴性对照品溶液(分别缺麻黄、苦杏仁、莱菔子、当归、黄芪、甘草、陈皮)

图1 高效液相色谱图

1. Ephedrine hydrochloride 2. Amygdalin 3. Glucosine thiocyanate 4. Ferulic acid 5. Piroisoflavone glucoside 6. Glycyrrhizin 7. Hesperidin
A. Mixed reference solution B. Test solution C - I. Negative reference solution (lacking Ephedra Herba, Armeniaca Semen Amarum, Raphani Semen, Angelicae Sinensis Radix, Astragali Radix, Glycyrrhizae Radix et Rhizoma, Pericarpium Citri Reticulatae, respectively)

Fig. 1 HPLC chromatograms

表1 7种成分的线性关系考察与检测限、定量限确定结果(n=5)

Tab. 1 Results of the linear relation test, LOD and LQD of seven components (n=5)

成分	回归方程	r	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	检测限 ($\mu\text{g/mL}$)	定量限 ($\mu\text{g/mL}$)
盐酸麻黄碱	$Y = 1779.861.266X - 10.056.472$	0.9999	2.37~47.4	4.74	15.80
苦杏仁苷	$Y = 469.459X - 17.537$	0.9997	6.61~132.2	13.22	44.07
芥子碱硫氰酸盐	$Y = 4.603.357.37X - 103.256.352$	0.9998	2.74~54.8	5.48	18.27
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	$Y = 1.811.860X - 16.191.128$	0.9996	1.58~31.6	3.16	10.53
阿魏酸	$Y = 474.236X + 1.201.6$	0.9997	0.657~13.14	1.31	4.38
甘草苷	$Y = 425.242.352.9X - 451.592$	0.9997	1.87~37.4	3.74	12.46
橙皮苷	$Y = 380.254X - 12.312$	0.9997	7.87~157.4	15.74	52.47

苦杏仁苷、芥子碱硫氰酸盐、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸、甘草苷、橙皮苷含量的RSD分别为1.16%, 0.54%, 1.41%, 0.76%, 1.13%, 2.18%, 0.60% (n=6), 表明方法重复性良好。

稳定性试验:取同一批(批号为20220809)样品适量,按2.3项下方法制备供试品溶液,分别于0,4,8,12,16,24 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果盐酸麻黄碱、苦杏仁苷、芥子碱硫氰酸盐、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸、甘草苷、橙皮苷峰面积的RSD分别为1.25%, 0.16%, 1.34%, 1.79%, 1.09%, 1.12%, 0.12% (n=6), 表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

加样回收试验:取已知各成分含量的样品9份,每份各2 g,精密称定,按80%, 100%, 120%分别加入适量混合对照品溶液,各3份,按2.3项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,计算回收率。结果见表2。

2.5 样品含量测定

取3批(批号分别为20220809, 20220810, 20220811)样品各适量,每批各3份,按2.3项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果见表3。

3 讨论

3.1 指标成分选择

现代药理学研究表明,盐酸麻黄碱具有抗炎、平喘、松弛支气管平滑肌^[2-3]等作用,苦杏仁苷具有镇咳平喘、抑制呼吸中枢^[4-5]等作用,芥子碱硫氰酸盐具有舒张平滑肌、平喘作用^[6-7],橙皮苷具有抗炎、抗过敏、抗氧化^[8]等作用,毛蕊异黄酮葡萄糖苷具有抗菌、调节免疫力^[9-10]等作用,阿魏酸具有抗菌消炎^[11]、抗病毒等作用,甘草苷具有抗氧化、抗炎^[12-13]等作用。故选取这7种成分为含量测定的指标成分。

3.2 色谱条件选择

在检测波长的选择上,本研究中首先在190~400 nm波长范围内对7种成分进行全波长扫描,确定其最大吸收波长,结合各成分的紫外吸收情况,最终选择切换波长的方式,以降低杂质对色谱峰的干扰,发现盐酸麻黄碱、苦杏仁苷在切换波长时会出现峰形变差的情况,在210 nm波长处同时检测时,两者峰形较好,基线平稳;毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸、甘草苷因出峰时间接近,在切换波长时出现峰形变差且阿魏酸未出峰的情况,于260 nm波长处同时检测时,3种成分吸收良好,峰形最佳。故最终选择盐酸麻黄碱、苦杏仁苷于210 nm波长处同时检测,毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸、甘草苷

表2 加样回收试验结果(n=9)
Tab.2 Results of the recovery test(n=9)

成分	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	\bar{X} (%)	RSD(%)	成分	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	\bar{X} (%)	RSD(%)
盐酸麻黄碱	0.4103	0.3282	0.7349	98.90	99.77	1.29	阿魏酸	0.3304	0.3303	0.6651	101.33	98.79	2.10
	0.4101	0.3282	0.7358	99.24				0.3303	0.3964	0.7225	98.94		
	0.4105	0.3282	0.7313	97.75				0.3303	0.3964	0.7196	98.21		
	0.4103	0.4103	0.8235	100.71				0.3302	0.3964	0.7173	97.65		
	0.4105	0.4103	0.8279	101.73				0.1883	0.1506	0.3341	96.81		
	0.4103	0.4103	0.8266	101.46				0.1881	0.1506	0.3359	98.14		
	0.4103	0.4924	0.9007	99.59				0.1883	0.1506	0.3332	96.22		
	0.4103	0.4924	0.8993	99.31				0.1882	0.1883	0.3789	101.27		
	0.4102	0.4924	0.8989	99.25				0.1884	0.1883	0.3775	100.42		
	苦杏仁苷	3.8328	3.0662	6.8010				96.80	99.05	1.36	甘草苷		
3.8326		3.0662	6.8290	97.72	0.1883	0.2260	0.4136	99.69					
3.8328		3.0662	6.8560	98.60	0.1881	0.2260	0.4058	96.33					
3.8325		3.8328	7.6631	99.94	0.1883	0.2260	0.4113	98.67					
3.8328		3.8328	7.6689	100.09	0.6206	0.4965	1.1120	98.97					
3.8327		3.8328	7.6297	99.07	0.6204	0.4965	1.1103	98.67					
3.8325		4.5994	8.4177	99.69	0.6203	0.4965	1.1151	99.66					
3.8328		4.5994	8.4889	101.23	0.6205	0.6206	1.2463	100.84					
3.8328		4.5994	8.3546	98.31	0.6206	0.6206	1.2521	101.76					
芥子碱硫酸盐		0.3024	0.2419	0.5487	101.82	100.37	2.09	橙皮苷				0.6205	0.6206
	0.3022	0.2419	0.5401	98.35	0.6204				0.7447	1.3622	99.61		
	0.3024	0.2419	0.5452	100.37	0.6206				0.7447	1.3531	98.36		
	0.3024	0.3024	0.6155	103.54	0.6206				0.7447	1.3676	100.31		
	0.3026	0.3024	0.6091	101.36	5.9698				4.7758	10.7305	99.68		
	0.3025	0.3024	0.6131	102.71	5.9697				4.7758	10.6259	97.50		
	0.3022	0.3629	0.6613	98.95	5.9698				4.7758	10.5989	96.93		
	0.3024	0.3629	0.6569	97.69	5.9696				5.9698	11.7981	97.63		
	0.3024	0.3629	0.6601	98.57	5.9697				5.9698	11.8357	98.26		
	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	0.3303	0.2642	0.5911	98.71				99.64	1.64	5.9698	5.9698	11.8936
0.3301		0.2642	0.5903	98.49	5.9698	7.1638	13.3209	102.61					
0.3301		0.2642	0.5938	99.81	5.9697	7.1638	13.3154	102.54					
0.3303		0.3303	0.6673	102.03	5.9698	7.1638	13.1258	99.89					
0.3302		0.3303	0.6659	101.63									

表3 样品中各成分含量测定结果(mg/g, n=3)

Tab.3 Results of content determination of each component in samples (mg/g, n=3)

批号	盐酸麻黄碱	苦杏仁苷	芥子碱硫酸盐	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	阿魏酸	甘草苷	橙皮苷
20220809	0.2051	1.9164	0.1512	0.1615	0.0942	0.3103	2.9849
20220810	0.2052	1.9045	0.1523	0.1502	0.0940	0.3097	2.9821
20220811	0.2046	1.9137	0.1531	0.1623	0.0943	0.3115	2.9912

于260 nm波长处同时检测,芥子碱硫酸盐于326 nm波长处检测,橙皮苷于283 nm波长处检测。在同一信号的不同时间段设置不同检测波长,不仅能同时检测

肺止咳颗粒中的7种成分,还可缩短分析时间。在流动相的选择上,考察了乙腈-0.1%磷酸溶液和乙腈-0.15%磷酸溶液,最终确定以后者作为流动相,梯度洗脱,此时各成分分离效果最好,无拖尾。

3.3 提取方法选择

在供试品溶液制备方法上,本研究中首先考察了超声、加热回流提取2种不同的处理方法^[14],结果提取含量相当,故选择简单易操作的超声提取方法^[15];提取溶剂考察了甲醇和70%甲醇,结果以70%甲醇提取时,色谱峰峰形较差;提取时间考察了15,30,45 min^[16],最终确定为甲醇超声处理30 min,此时各成分峰形最佳,