

HPLC 同时测定皖贝止咳滴丸中 3 种有效成分的含量

李勇¹, 李成网^{2*}, 张洁²

(1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230031; 2. 安徽省医学科学研究所, 合肥 230061)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 同时测定皖贝止咳滴丸中贝母素甲、贝母素乙及异贝母素甲含量的方法。方法: 采用 CAPCELL PAK C₁₈ 色谱柱, 柱温 35 °C, 流动相乙腈-0.1% 三乙胺溶液 (70:30), 流速 1.0 mL·min⁻¹; ELSD 参数为漂移管温度 95 °C, 载气流速 2.2 mL·min⁻¹。结果: 贝母素甲、贝母素乙及异贝母素甲分别在 34.33 ~ 343.3, 30.17 ~ 301.7, 82.11 ~ 821.1 mg·L⁻¹ 线性关系良好; 贝母素甲的平均加样回收率为 97.55%, RSD 1.3%, 贝母素乙的平均加样回收率为 97.99%, RSD 1.8%, 异贝母素甲的平均加样回收率为 98.42%, RSD 1.4%。结论: 该法简便、准确、可靠, 可作为皖贝止咳滴丸质量控制的方法。

[关键词] 皖贝止咳滴丸; 贝母素甲; 贝母素乙; 异贝母素甲; 高效液相色谱-蒸发光散射检测法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)02-0063-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016020063

Simultaneous Determination of Three Active Ingredients in Wanbei Zhike Pill by HPLC

LI Yong¹, LI Cheng-wang^{2*}, ZHANG Jie²

(1. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China;

2. Anhui Academy of Medical Sciences, Hefei 230061, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for the simultaneous determination of peimine, peiminine and iso-peimine in Wanbei Zhike pill by HPLC. **Method:** The analysis was carried out on a CAPCELL PAK C₁₈ column, with column temperature of 35 °C; the mobile phase was acetonitrile-0.1% triethylamine solution (70:30) with a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹; ELSD parameters: the drift tube temperature was set at 95 °C and the nitrogen flow rate was 2.2 mL·min⁻¹. **Result:** Peimine, peiminine and iso-peimine had good linear relationship respectively at the range of 34.33-343.3, 30.17-301.7, 82.11-821.1 mg·L⁻¹; the average recovery rate for peimine, peiminine and iso-peimine was 97.55%, 97.99% and 98.42% with RSD of 1.3%, 1.8% and 1.4% respectively. **Conclusion:** The method is simple, accurate, reliable, and can be used as a method for quality control in Wanbei Zhike pill.

[Key words] Wanbei Zhike pill; peimine; peiminine; iso-peimine; HPLC-ELSD

皖贝止咳滴丸是由皖贝母提取物制成的中药制剂, 皖贝母提取物是由安徽贝母 *Fritillaria anhuiensis* 经提取精制的有效部位。安徽贝母为百合科贝母属新种, 商品名为皖贝母, 原野生于安徽皖西大别山区, 是安徽省独有的名贵药材品种, 当地中医历来有作为川贝母使用的习惯, 1982 年在植物分类研究的

基础上进一步进行了栽培、生药、药化、药理、临床等多学科的综合研究, 作为 I 类新药 (中药材) 1990 年批准试生产。皖贝母主要有效成分为皖贝母总生物碱, 具有清热、化痰、止咳的功效, 主要用于痰热咳嗽与急、慢性支气管炎^[1-2]。皖贝止咳滴丸是市售产品皖贝止咳胶囊 (批准文号: 国药准字

[收稿日期] 20150507(002)

[第一作者] 李勇, 在读硕士, 从事新药研究与开发, Tel:0551-62828461, E-mail:306717653@qq.com

[通讯作者] * 李成网, 硕士生导师, 研究员, 从事新药研究与开发, Tel:0551-62828461, E-mail:lcw100com@yahoo.com.cn

Z20030104) 进行剂型改进所得, 相较于原剂型服用更方便, 用量更小, 生物利用度更高、药效更快。

目前在皖贝母及其制剂的含量测定方面大多是测定贝母素甲与贝母素乙的含量, 张洁等^[3]对皖贝止咳胶囊标准中收载的贝母素甲(薄层扫描法)的含量测定方法加以改进与补充, 采用高效液相色谱法测定贝母素甲与贝母素乙的含量; 刘汉珍等^[4]对皖贝母原部颁标准加以补充, 建立同时测定贝母素甲与贝母素乙含量的高效液相色谱法; 而同时测定贝母素甲、贝母素乙和异贝母素甲的含量并未见报道, 所以为了控制皖贝止咳滴丸的质量, 采用高效液相色谱法同时测定了该制剂中贝母素甲、贝母素乙和异贝母素甲的含量, 并进行了方法学考察, 为皖贝止咳滴丸的质量控制提供依据。

1 材料

1.1 仪器 1100 系列高效液相色谱仪(包括四元泵, 在线脱气机, 柱温箱, Chimstationsystem 工作站, Alltech 2000ELSD 检测器, 美国安捷伦), XP56 型 1/100 万电子天平(Mettler Toledo), BP210S 型 1/1 万电子天平(德国赛多利斯), HHS 型电热恒温水浴锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂)。

1.2 试药 贝母素甲, 贝母素乙对照品(批号 750-8904, 110751-200303, 中国食品药品检定研究院); 异贝母素甲对照品(自制, 纯度 > 98%), 皖贝止咳滴丸及阴性制剂(自制, 批号 20150309, 20150313, 20150317, 规格 50 mg/丸, 每丸含皖贝母总生物碱 10 mg), 甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 CAPCELL PAK C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 三乙胺溶液(70:30), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 进样量 10 μL, 漂移管温度 95 °C, 载气流速 2.2 mL·min⁻¹。

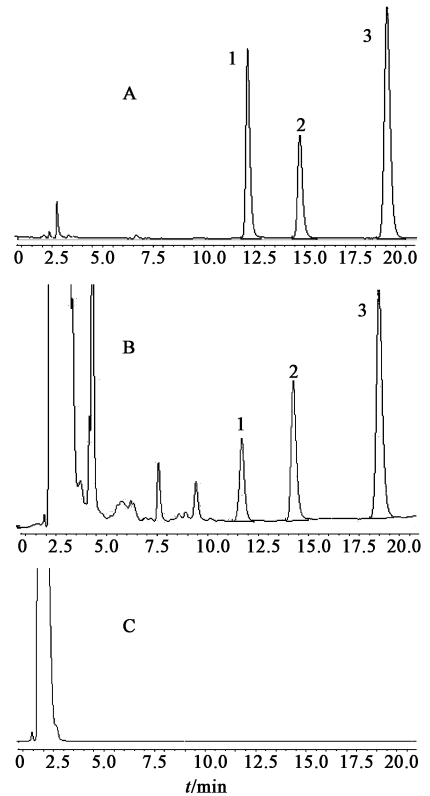
2.2 对照品溶液的制备 精密称取贝母素甲 8.583 mg, 贝母素乙 7.543 mg, 异贝母素甲 20.528 mg 置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取皖贝止咳滴丸适量, 研细, 取 0.1 g, 精密称定, 置具塞烧瓶中, 加浓氨试液 5 mL, 浸湿 1 h, 精密加入三氯甲烷-甲醇(4:1) 混合溶液 50 mL, 称定质量, 混匀, 置 80 °C 水浴中加热回流 1 h, 放冷, 再称定质量, 补足减失的质量, 取下层

液滤过, 精密吸取续滤液 20 mL, 置蒸发皿中蒸干, 残渣加甲醇溶解并转移至 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 阴性样品溶液的制备 取处方组成中除皖贝母提取物外的其余成分制成的阴性样品, 按 2.3 项下的方法处理制得阴性供试品溶液。

2.5 系统适应性试验 分别取经 0.45 μm 滤膜过滤的混合对照品溶液、供试品溶液和阴性供试品溶液各 10 μL 注入液相色谱仪, 按 2.1 项下色谱条件测定。对照品溶液与供试品溶液在相同保留时间上分离度良好, 且阴性无干扰。见图 1。



A. 对照品; B. 样品; C. 阴性; 1. 贝母素甲; 2. 贝母素乙; 3. 异贝母素甲

图 1 皖贝止咳滴丸 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Wanbei Zhike pill

2.6 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液(贝母素甲 0.343 3 g·L⁻¹, 贝母素乙 0.301 7 g·L⁻¹, 异贝母素甲 0.821 1 g·L⁻¹) 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mL 置于 10 mL 量瓶中, 分别加甲醇稀释并定容至刻度, 摇匀, 过滤, 即得。取以上溶液各 10 μL 注入液相色谱仪。以峰面积的常用对数为纵坐标, 以对照品质量浓度的常用对数为横坐标进行线性回归, 得回归方程分别为 $Y = 1.814 4X - 0.768 9$ ($r = 0.999 2$), $Y = 1.703 8X - 0.600 9$ ($r = 0.999 2$), $Y =$

1.655 0X - 0.752 3 ($r = 0.999 1$)。结果表明贝母素甲, 贝母素乙, 异贝母素甲分别在 34.33 ~ 343.3, 30.17 ~ 301.7, 82.11 ~ 821.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 呈良好的线性关系。

2.7 精密度试验 精密吸取供试品溶液(批号 20150309) 10 μL 注入液相色谱仪, 连续进样 6 次, 记录峰面积, 测得贝母素甲、贝母素乙及异贝母素甲日内精密度的 RSD 分别为 1.1%, 0.9%, 0.8%。结果表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验 精密吸取供试品溶液(批号 20150309) 10 μL 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 注入液相色谱仪, 记录峰面积, 测得贝母素甲、贝母素乙及异贝母素甲的 RSD 分别为 1.2%, 1.2%, 0.9%。结果表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

2.9 重复性试验 取同一批号供试品(批号 20150309) 6 份, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液。测得贝母素甲的平均质量分数分别为 1.151 4, 1.713 1, 3.623 4 $\text{mg}/\text{丸}$, RSD 分别为 1.0%, 1.4%, 1.4%。结果表明重复性良好。

2.10 加样回收试验 精密称取同一批已知含量的样品(批号 20150309) 9 份, 每份约 0.05 g, 分别加入适量的贝母素甲、贝母素乙及异贝母素甲对照品, 按照 2.3 项下方法制备供试品溶液, 计算回收率, 见表 1 ~ 3。结果表明本法准确可靠。

表 1 皖贝止咳滴丸中贝母素甲回收率测定

Table 1 Results of recovery tests of peimine

称样量 /g	样品 中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.053 3	1.227	0.964	2.172	97.96		
0.057 3	1.312	0.964	2.276	99.26		
0.055 9	1.287	0.964	2.229	97.66		
0.050 8	1.170	1.298	2.446	98.30		
0.058 2	1.340	1.298	2.591	96.39	97.55	1.3
0.052 4	1.207	1.298	2.486	98.58		
0.058 1	1.338	1.473	2.755	96.23		
0.052 9	1.218	1.473	2.666	98.31		
0.057 7	1.329	1.473	2.732	95.29		

2.11 样品测定 取皖贝止咳滴丸 3 批, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 分别在上述色谱条件下进行测定, 代入线性回归方程计算供试品中贝母素甲、贝母素乙及异贝母素甲的含量, 结果见表 4。

表 2 皖贝止咳滴丸中贝母素乙回收率测定

Table 2 Results of recovery tests of peiminine

称样量 /g	样品 中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.053 3	1.826	1.484	3.281	98.00		
0.057 3	1.963	1.484	3.357	93.95		
0.055 9	1.915	1.484	3.393	99.55		
0.050 8	1.741	1.850	3.551	97.85		
0.058 2	1.994	1.850	3.831	99.30	97.99	1.8
0.052 4	1.795	1.850	3.643	99.87		
0.058 1	1.991	2.272	4.221	98.16		
0.052 9	1.813	2.272	4.047	98.36		
0.057 7	1.977	2.272	4.178	96.87		

表 3 皖贝止咳滴丸中异贝母素甲回收率测定

Table 3 Results of recovery tests of iso-peimine

称样量 /g	样品 中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.053 3	3.863	3.127	6.940	98.43		
0.057 3	4.152	3.127	7.249	99.02		
0.055 9	4.051	3.127	7.178	99.99		
0.050 8	3.681	3.963	7.579	98.35		
0.058 2	4.218	3.963	8.059	96.92	98.42	1.4
0.052 4	3.797	3.963	7.746	99.63		
0.058 1	4.210	4.836	8.912	97.21		
0.052 9	3.834	4.836	8.668	99.96		
0.057 7	4.181	4.836	8.837	96.27		

表 4 皖贝止咳滴丸样品含量测定

Table 4 Assay results of Wanbei Zhike pill

批号	贝母素甲	贝母素乙	异贝母素甲
20150309	1.1430	1.6929	3.6019
20150313	1.1200	1.6549	3.5671
20150317	1.1495	1.7004	3.5654

3 讨论

皖贝母提取物是由安徽贝母经提取精制的有效部位, 主要是由皖贝母总生物碱、生物碱苷、萜类化合物^[5]等组成, 而皖贝母总生物碱中以贝母素甲、贝母素乙、贝母辛及异贝母素甲^[6] 4 种成分含量最高, 本试验欲同时测定这 4 个活性成分的含量, 分别采用流动相乙腈-0.1% 三乙胺溶液(70:30), 乙腈-0.1% 三乙胺溶液(60:40), 乙腈-0.1% 三乙胺溶液(80:20), 贝母辛均未达到满意分离效果, 故未能对

制剂中4种成分同时测定。本试验选用乙腈-0.1%三乙胺溶液(70:30)作为流动相,结果表明贝母素甲、贝母素乙及异贝母素甲均能与其他成分基线分离,峰形较好,且保留时间都在20 min内。

分别采用甲醇、三氯甲烷、三氯甲烷-甲醇(4:1)提取样品,结果显示三氯甲烷-甲醇(4:1)提取率最高^[7],故本试验选用三氯甲烷-甲醇(4:1)作为提取溶剂。

由于贝母素甲、贝母素乙及异贝母素甲是皖贝止咳滴丸中的主要活性成分,作为含量测定指标,专属性较强,但是贝母素甲、贝母素乙及异贝母素甲紫外吸收较弱,故选用蒸发光散射检测器^[8-11]。本实验采用HPLC-ELSD测定皖贝止咳滴丸中贝母素甲、贝母素乙和异贝母素甲的含量,结果表明本法简便、准确、可靠,可作为皖贝止咳滴丸质量控制的方法。

[参考文献]

[1] 章鸣玉,韩传环,周晓琳,等.安徽贝母提取物祛痰作用的研究[J].安徽医学,1994,15(5):58-59.
[2] 韩传环,周晓琳.皖贝精的药效学研究[J].中药药理与临床,1995,(6):38-39.

[3] 张洁,李成网. HPLC-ELSD法测定皖贝止咳胶囊中贝母素甲和贝母素乙的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(5):3-5.
[4] 刘汉珍,戴云志. HPLC法同时测定皖贝母两种生物碱成分含量[J]. 中国林副特产,2006(6):18-20.
[5] 康露,周剑侠,沈征武. 安徽贝母中的新二萜成分(英文)[J]. 药学学报,2007,42(1):58-60.
[6] 吴宗好,李清华. 皖贝母与浙贝母、川贝母有效成分生物碱的对比分析[J]. 中草药,1993,24(7):351-353.
[7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:274.
[8] 曹邦静,苏娟,叶霁,等. 蒸发光散射检测器在中药分析中的应用[J]. 药学实践杂志,2015,33(1):13-16.
[9] 徐杨璐,李守拙. 中药有效成分的含量测定方法概述[J]. 承德医学院学报,2015,32(1):62-64.
[10] 张新新,梁晋如,苏琪,等. HPLC-ELSD法同时测定盾叶薯蓣根茎中5个皂苷的含量[J]. 药物分析杂志,2013,33(7):1235-1238.
[11] 卢凤来,蒋海英,陈月圆,等. HPLC-ELSD法测定山银花中绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙[J]. 中成药,2013,35(8):1821-1823.

[责任编辑 顾雪竹]

《中国实验方剂学杂志》声明

本刊近期发现有某些网站使用类似本刊网站的域名,冒用本刊名义,骗取审稿费及版面费。

现本刊郑重声明:①<http://www.syfjxzz.com> 为本刊唯一域名,其他域名均非本刊。

②本刊不会以任何名义收取任何审稿费。

③投稿成功后,为确保稿件安全请与责任编辑电话联系。

对于假冒本刊名义、侵犯本刊权利的不正当行为,本刊将通过法律程序进行维权。