

应用 HPLC 法对肺宁合剂多成分含量测定研究

张登山 邹静 陈慧 彭懿 刘志辉

【摘要】 目的 建立高效液相色谱法同时对肺宁合剂中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、苦杏仁苷、甘草苷、甘草酸、白花前胡甲素 6 种指标成分的含量测定。**方法** 采用 Heder C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为 0.1% 磷酸水溶液-乙腈梯度洗脱, 检测波长 210 nm, 柱温: 30℃, 流速: 1 mL/min。**结果** 盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、苦杏仁苷、甘草苷、甘草酸、白花前胡甲素的质量浓度在相应范围内呈良好的线性关系, 线性范围分别为: 16.20 ~ 518.2, 9.741 ~ 311.7, 37.27 ~ 1193.0, 14.25 ~ 455.9, 30.99 ~ 991.7, 1.225 ~ 39.18 μg/mL, 加样回收率分别为 103.05%、95.29%、104.11%、99.78%、96.28%、105.42%。**结论** 所建立的 HPLC 方法专属性强, 重复性好, 可用于肺宁合剂的质量控制。

【关键词】 肺宁合剂; 盐酸麻黄碱; 盐酸伪麻黄碱; 苦杏仁苷; 甘草苷; 甘草酸; 白花前胡甲素

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.11.001

Study on the determination of multicomponent compounds in *Feining* mixture by HPLC ZHANG Dengshan, ZOU Jing, CHEN Hui, et al. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

Corresponding author: LIU Zhihui, E-mail: liuzh1008@126.com

【Abstract】 Objective To establish a HPLC method for simultaneous determination of ephedrine hydrochloride, pseudoephedrine hydrochloride, amygdalin, liquiritin, glycyrrhizic acid, praeruptorin A of *Feining* mixture by HPLC. **Methods** Heder C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) chromatographic column was used, the mobile phase was 0.1% phosphoric acid solution-acetonitrile with gradient elution at a flow rate of 1 mL/min. The detection wavelength was 210 nm, column temperature was 30℃. **Results** The calibration curves of ephedrine hydrochloride, pseudoephedrine hydrochloride, amygdalin, liquiritin, glycyrrhizic acid, praeruptorin A were linear in the ranges of 16.20 ~ 518.2, 9.741 ~ 311.7, 37.27 ~ 1193, 14.25 ~ 455.9, 30.99 ~ 991.7, 1.225 ~ 39.18 μg/mL, respectively. The average recoveries were 103.05%, 95.29%, 104.11%, 99.78%, 96.28%, 105.42%, respectively. **Conclusion** The established HPLC method has good specificity and reproducibility, and can be used for the quality control of *Feining* mixture.

【Key words】 *Feining* mixture; Ephedrine hydrochloride; Pseudoephedrine hydrochloride; Amygdalin; Liquiritin; Glycyrrhizic acid; Praeruptorin A

肺宁合剂是江苏省中医院医疗机构制剂, 是临

床使用多年的有效制剂, 由麻黄、苦杏仁、甘草、前胡、桔梗、瓜蒌皮、枇杷叶七味药组成, 为中药复方制剂, 具有止咳、平喘、化痰的功效^[1]。由于早期医院中药制剂质量标准较低, 仅有少量的定性鉴别、pH、相对密度等。而中药制剂定性定量控制的方法研究很多, 如制剂中多成分的薄层定性研究, 尤其是指纹图谱、特征图谱的研究与应用, 多成分的含

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目二期

作者简介: 210029 南京中医药大学附属医院药学部 (张登山、刘志辉); 南京中医药大学药学院 (邹静、陈慧、彭懿)

作者简介: 张登山 (1982-), 本科, 主管药师。研究方向: 中药制剂开发及中药质量标准研究。E-mail: zds127127@163.com

通信作者: 刘志辉 (1962-), 本科, 主任药师。研究方向: 中药制剂开发及中药质量标准研究。E-mail: liuzh1008@126.com

量测定方法的研究与制定,提高了中药制剂质量控制的水平。为提高肺宁合剂医疗机构制剂质量标准,确保制剂质量,本研究应用高效液相法进行了肺宁合剂多成分含量测定方法研究,以建立其多成分含量测定的方法与标准^[2]。

1 仪器及试剂

1.1 仪器

安捷伦 1100 高效液相色谱仪;G1322A 脱气机, G1311A 四元泵, G1316A 柱温箱, G1314A VWD 检测器, Agilent chemstation 工作站。十万分之一电子分析天平(BP-211D 型,德国 Sartorius);百分之一电子天平(浙江凯丰集团有限公司,型号:KF10002);水浴锅(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司,型号:LKTC-B1-T);DW 调温电热器(上海平环燃烧设备工程技术有限公司);超声清洗机(上海科导超声仪器有限公司,型号:SK6200H)。

1.2 试剂

肺宁合剂(批号:1703037,1609121,1703039;江苏省中医院);各阴性样品(实验室自制);对照品盐酸麻黄碱(批号:171241-201508)、盐酸伪麻黄碱(批号:1237-9601)、苦杏仁苷(批号:110820-201506)、甘草苷(批号:111610-201607)、白花前胡甲素(批号:111711-200602),以上对照品均购于中国食品药品检定研究院,甘草酸(批号:160418)购于成都普非德生物技术有限公司,所有对照品均为含量测定用。乙腈为色谱纯(天津市四友生物医学技术有限公司);水为超纯水;其它试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

精密量取肺宁合剂 4 mL,至 10 mL 的量瓶中,加甲醇至刻度,超声 15 分钟,冷却,补足甲醇至刻度,摇匀,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

2.2 混合对照品溶液的制备

分别精密称取盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、苦杏仁苷、甘草苷、甘草酸、白花前胡甲素对照品适量,加甲醇制成分别含上述对照品 518.2、311.7、1193.0、455.9、991.7、39.18 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液,备用。

2.3 阴性样品的制备

按制剂处方饮片剂量称取 4 份,分别除去麻黄、

甘草、苦杏仁和前胡,按照生产工艺分别制成阴性制剂,按“2.1”项下制备阴性样品溶液。

2.4 色谱条件及专属性试验^[3-7]

采用安捷伦 1100 高效液相色谱仪, Hadera C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相:0.1% 磷酸水溶液-乙腈,梯度洗脱(洗脱条件见表 1)。检测波长:210 nm,柱温:30℃,流速:1 mL/min,进样量:10 μL 。分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液、缺麻黄阴性供试品溶液、缺苦杏仁阴性供试品溶液、缺甘草阴性供试品溶液和缺前胡阴性供试品溶液,按上述色谱条件进行测定,结果见图 1。图中可见各指标成分的分离良好,阴性样品溶液对测定无干扰。

表 1 梯度洗脱程序表

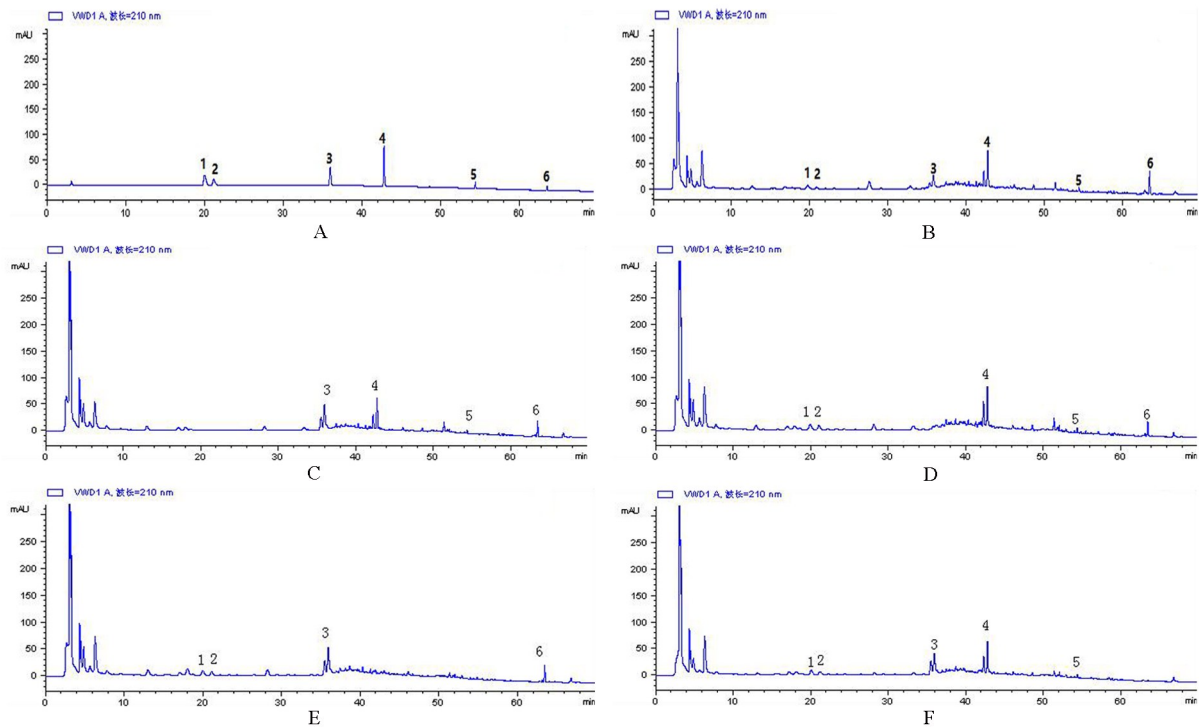
时间(min)	0.1% 磷酸水溶液(%)	乙腈(%)
0	95	5
10	95	5
30	90	10
35	80	20
40	75	25
45	70	30
55	40	60
60	20	80
70	20	80

2.5 线性关系考察

分别精密吸取“2.2”项下的混合对照品溶液,依次稀释得相应浓度的对照品溶液。分别精密吸取相应浓度的对照品溶液 10 μL ,按“2.4”项下色谱条件进样,测定,记录盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、杏仁苷、甘草苷、甘草酸和白花前胡甲素的峰面积。以进样浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,进行回归分析,得各对照品的线性方程及相关系数,见表 2。结果表明,指标成分在线性范围内成良好的线性关系。

2.6 精密度试验

分别精密吸取“2.2”项下的混合对照品溶液 10 μL 共 6 份,按“2.4”项下色谱条件进样,测定,记录盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、苦杏仁苷、甘草苷、甘草酸、白花前胡甲素的峰面积,计算 RSD。结果各待测成分峰面积的 RSD 分别为 0.87%、1.17%、0.34%、0.65%、0.32%、0.75%。结果表明仪器的精密度良好。



注:1. 麻黄碱;2. 伪麻黄碱;3. 苦杏仁苷;4. 甘草苷;5. 甘草酸;6. 白花前胡甲素;A. 混合对照品溶液;B. 供试品溶液;C. 麻黄阴性溶液;D. 伪麻黄阴性溶液;E. 甘草阴性溶液;F. 前胡阴性溶液

图 1 肺宁合剂 HPLC 图

表 2 肺宁合剂中 6 种有效成分的线性方程、相关系数及线性范围

成分	线性方程	相关系数 r	线性范围/ μg
麻黄碱	$y = 15866x - 29433$	0.9999	16.20 ~ 518.2
伪麻黄碱	$y = 13961x - 16429$	0.9998	9.741 ~ 311.7
苦杏仁苷	$y = 7634.9x - 42166$	0.9998	37.27 ~ 1193
甘草苷	$y = 28079x + 20486$	1.0000	14.25 ~ 455.9
甘草酸	$y = 1361.2x - 10457$	0.9999	30.99 ~ 991.7
白花前胡甲素	$y = 32124x - 7732.3$	0.9997	1.225 ~ 39.18

2.7 重复性试验

取批号为 1703037 的肺宁合剂样品 6 份,依法制备供试品溶液,按“2.4”项下色谱条件进样 10 μL ,测定,记录供试品溶液中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、苦杏仁苷、甘草苷、甘草酸、白花前胡甲素的峰面积,计算各待测成分峰面积的 RSD 分别为 0.69%、0.35%、0.29%、3.44%、0.78%、0.76%。结果表明该方法的重复性良好。

2.8 稳定性试验

取批号为 1703037 的肺宁合剂,按“2.1”项下方法制备供试品溶液,分别依法于 0、2、4、6、8、10、12、24 小时进样测定,记录供试品溶液中盐酸麻黄

碱、盐酸伪麻黄碱、苦杏仁苷、甘草苷、甘草酸、白花前胡甲素的峰面积,计算各待测成分峰面积的 RSD 分别为 0.54%、0.37%、0.53%、0.35%、0.38%、0.49%。结果表明 24 小时内供试品溶液中各成分的稳定性良好。

2.9 加样回收试验

精密量取已知含量的肺宁合剂(批号 1703037) 4 mL 至 25 mL 量瓶中,精密加入约相当于含量 100% 的各对照品溶液,共 6 份,按“2.1”项下方法制备供试品溶液,依法测定并计算得盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、苦杏仁苷、甘草苷、甘草酸、白花前胡甲素的平均加样回收率分别为 103.05%、95.29%、104.11%、99.78%、96.28%、105.42%, RSD 分别为 1.63%、4.64%、0.61%、1.15%、1.35%、2.32%。结果表明该方法的准确度良好,见表 3。

2.10 含量测定

取 3 个批次的肺宁合剂,照“2.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.4”项下色谱条件进样检测,测定 3 个批次中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、苦杏仁苷、甘草苷、甘草酸、白花前胡甲素的含量,结果见表 4。

表 3 肺宁合剂各成分加样回收率试验结果表

成分	已知量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
盐酸麻黄碱	2.433	2.455	4.937	102.00	103.05	1.63
	2.433	2.455	4.972	103.43		
	2.433	2.455	4.906	100.73		
	2.433	2.455	4.988	104.09		
	2.433	2.455	4.949	102.50		
	2.433	2.455	5.023	105.52		
盐酸伪麻黄碱	2.045	2.057	4.017	95.83	95.29	4.64
	2.045	2.057	4.170	103.28		
	2.045	2.057	4.016	95.80		
	2.045	2.057	3.975	93.80		
	2.045	2.057	3.950	92.59		
	2.045	2.057	3.905	90.41		
苦杏仁苷	10.98	10.95	22.36	104.00	104.11	0.61
	10.98	10.95	22.31	103.53		
	10.98	10.95	22.33	103.72		
	10.98	10.95	22.37	104.01		
	10.98	10.95	22.37	104.06		
	10.98	10.95	22.51	105.33		
甘草苷	2.394	2.219	4.562	97.70	99.78	1.15
	2.394	2.219	4.607	99.76		
	2.394	2.219	4.617	100.17		
	2.394	2.219	4.602	99.50		
	2.394	2.219	4.633	100.93		
	2.394	2.219	4.626	100.60		
甘草酸	4.166	4.147	8.154	96.15	96.28	1.35
	4.166	4.147	8.083	94.44		
	4.166	4.147	8.188	96.97		
	4.166	4.147	8.128	95.54		
	4.166	4.147	8.159	96.27		
	4.166	4.147	8.242	98.28		
白花前胡甲素	0.2027	0.2076	0.4227	105.97	105.42	2.32
	0.2027	0.2076	0.4247	106.94		
	0.2027	0.2076	0.4262	107.66		
	0.2027	0.2076	0.4118	100.72		
	0.2027	0.2076	0.4217	105.49		
	0.2027	0.2076	0.4222	105.73		

表 4 样品含量测定结果 (n=3,mg/mL)

批号	麻黄碱	伪麻黄碱	苦杏仁苷	甘草苷	甘草酸	白花前胡甲素
1703037	0.6081	0.5113	2.744	0.5985	1.042	0.0507
1609121	0.6003	0.5050	2.714	0.5231	0.9629	0.0479
1703039	0.6196	0.4770	2.965	0.6013	0.9836	0.0473

3 讨论

3.1 测定目标成分的选择

肺宁合剂由麻黄、苦杏仁、甘草、前胡等 7 味中药组成,具有宣肺化痰、疏风止咳的作用。本制剂

中,君药为麻黄、苦杏仁和甘草,配以臣药前胡。现代药理研究表明,麻黄发挥平喘和发汗作用的有效成分为生物碱类成分——盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱^[8]。麻黄碱通过促进去甲肾上腺素和肾上腺素释放,间接发挥肾上腺素作用;直接兴奋 α 受体,使末梢血管收缩而缓解支气管黏膜肿胀,直接兴奋

β 受体,使支气管平滑肌松弛;麻黄碱和伪麻黄碱均有增加心输出量和升高血压的作用。苦杏仁具有降气止咳平喘、润肠通便的作用,主要含有的化学成分为苦杏仁苷,文献报道,苦杏仁苷具有镇咳祛痰、降血糖、降血脂等药理作用^[9]。甘草具有镇咳平喘、抗炎等作用,主要成分为三萜类和黄酮类化合物,其中甘草酸和甘草苷分别是三萜类和黄酮类化合物重要的单体活性成分,具有很强的药理活性,比如抗炎作用、抗病毒、神经保护作用等^[10]。前胡主治痰热喘满、咯痰黄稠等风热咳嗽痰多症状,以角型二氢吡喃香豆素类成分为主要的药效活性成分。白花前胡甲素作为香豆素类的主要有效成分,具有舒张肠管平滑肌和钙拮抗作用^[11-12]。因此,本研究中选用肺宁合剂中比较有代表性的活性成分作为指标成分,进行样品的含量测定。

3.2 检测波长的选择

对供试品溶液和混合对照品溶液中的待测成分在波长 190~400 nm 波长下进行紫外扫描。结果表明,盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱和苦杏仁苷的最大吸收波长均为 210 nm,其中盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱只在 210 nm 处才有紫外吸收,甘草苷、甘草酸、白花前胡甲素在 210 nm 波长处也有较强吸收。综合以上因素考虑,本试验选定 210 nm 作为检测波长。

3.3 流动相的选择

本研究考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-乙腈-水系统,结果发现乙腈-水系统干扰较小且各指标成分分离效果较好,分析时间短,因此选择乙腈-水系统。为了改善峰形,需将流动相调整为弱酸性,提高分离度。本研究考察了 0.05%、0.1%、0.2% 的磷酸水溶液,结果发现,在 0.1% 磷酸水溶液的条件下,可以达到较好改善峰形的效果,因此,本研究选择乙腈-0.1% 磷酸水作为流动相系统。由于梯度洗脱系统在达到乙腈-水=20:80 的比例时,流动相黏度达到最大,流动性较差,压力升高,基线在 35 分钟时有向上浮动的趋势,但不影响指标成分的峰形和分离度。

3.4 耐用性的考察

为考察色谱条件的耐用性,采用不同的柱温(25℃、30℃、35℃)、流速(0.9 mL/min、1.0 mL/min、1.1 mL/min)、3 种高效液相仪 waters 2695-2998、Agilent 1100、Agilent 1260,以及不同品牌的同类型色谱柱 Heder C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm)、依利特

C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm)、Agilent C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm)。结果发现,测定条件小的变动对指标成分的峰形和分离度的影响较小,此色谱条件可靠,适用于日常含量测定。

4 小结与展望

肺宁合剂是中药复方用药制剂,作为复杂样品体系的质量控制定性鉴别很难全面控制制剂质量。本研究从多成分测定的角度出发,通过建立肺宁合剂中 6 个成分的含量测定方法,较全面地控制制剂质量,为肺宁制剂质量评价的提升提供一定的参考依据。

同时考虑到中药制剂多成分、多功效的特性,多个有效成分或指标性成分也难以全面地控制制剂质量。笔者在研究过程中发现,色谱图中除了测定的指标成分,还存在多个分离度好的未知色谱峰,因而可以建立肺宁合剂指纹图谱,进一步全面、系统地控制制剂质量。

参 考 文 献

- [1] 戴国友,谢和兵,刘志辉,等.肺宁合剂提取工艺中甘草和麻黄的配伍规律研究[J].药物研究,2008,17(22):21-23.
- [2] 赵倩,冯伟红,张启伟,等.“一测多评”法用于栀子金花丸多成分含量测定的可行性研究[J].中国中药杂志,2014,39(10):1826-1833.
- [3] 葛斌,罗燕梅,许爱霞,等.HPLC 测定麻黄药材中麻黄碱与伪麻黄碱的含量[J].中国药理学杂志,2008,43(3):173-175.
- [4] 杨书斌,刘青,孙立立,等.HPLC 测定苦杏仁饮片中苦杏仁苷的含量[J].中成药,2006,28(10):1452-1454.
- [5] 陈云华,赵晓霞,王文全,等.HP 高效液相色谱法同时测定甘草中甘草酸、甘草苷、异甘草素的含量[J].中国中医药信息杂志,2009,8(16):52-54.
- [6] 陈健.HPLC 法测定含化上清片中白花前胡甲素和白花前胡乙素的含量[J].西北药学杂志,2015,30(3):251-252.
- [7] 任荣,李正翔.多指标综合评价不同产地前胡药材质量[J].天津中医药,2014,31(10):627-630.
- [8] 李佳莲,方磊,张永清,等.麻黄的化学成分和药理活性的研究进展[J].中国现代中药,2012,14(7):21-27.
- [9] 王均秀,吴鹏,张学兰,等.苦杏仁炮制的现代研究进展[J].山东中医杂志,2016,35(9):840-842.
- [10] 张玉龙,王梦月,杨静玉,等.炙甘草化学成分及药理作用研究进展[J].上海中医药大学学报,2015,29(3):99-102.
- [11] 鞠康,赵利敏.前胡化学成分及其药理作用研究进展[J].内蒙古中医药,2017,36(3):142-143.
- [12] 薛俊超.白花前胡化学成分及相关药理作用的研究进展[J].海峡药学,2012,24(2):34-38.

(收稿日期:2017-04-12)

(本文编辑:禹佳)