

202, 265.

[3] 陆丽娜,董加花,左艳华,等. RP-HPLC法同时测定清肺化痰丸中4种成分[J]. 中成药, 2016, 38(9): 1956-1959.

[4] 李吉华. 化橘红中柚皮苷, 柚皮芸香苷, 野漆树苷和柚皮素的 HPLC 测定 [J]. 山东中医杂志, 2012, 31(4): 277-278.

[5] 陈志霞, 林 励, 孙冬梅. 化橘红黄酮类成分的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药, 2003, 34(7): 657-661.

[6] 王荣梅, 李启艳, 谢强胜. 市售化橘红质量评价[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(4): 669-672.

[7] 吴文玲, 陈佳佳, 刘守金, 等. HPLC 同时测定前胡中3种香豆素成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(9): 1121-1123.

[8] 赵万晴, 戚继红. 高效液相色谱法同时测定止咳片中白花前胡甲素和白花前胡乙素含量[J]. 中国药业, 2016, 25(21): 60-63.

[9] 周 卿, 杨建文, 郑天宇. RP-HPLC法同时测定宝咳宁颗粒中4种成分[J]. 中成药, 2014, 36(8): 1678-1681.

[10] 胡轶娟, 潘宏华, 浦锦宝, 等. 白花前胡 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国中医药科技, 2012, 19(5): 437-439.

[11] 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.

[12] 刘晓涵, 陈永刚, 林 励, 等. 化橘红中柚皮苷和野漆树苷含量同时测定方法的建立[J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(6): 640-642.

[13] 邹小娟, 谢和兵, 钱 芳, 等. HPLC 法测定苦杏仁中苦杏仁苷含量的方法研究[J]. 中国药事, 2009, 23(1): 33-36.

HPLC-ELSD 法同时测定川贝罗汉止咳颗粒中 7 种成分

李 敏¹, 聂建军², 魏简汇¹, 郑芝欣^{1*}

(1. 郑州大学附属医院/南阳市中心医院药学部, 河南 南阳 473000; 2. 南阳医学高等专科学校第一附属医院药剂科, 河南 南阳 473000)

摘要: **目的** 建立 HPLC-ELSD 法同时测定川贝罗汉止咳颗粒(川贝母、枇杷叶、桔梗等)中野鸦椿酸、委陵菜酸、山楂酸、科罗素酸、桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 D₃、桔梗皂苷 D 的含有量。**方法** 该药物 60% 甲醇提取液的分析采用 Ultimate XB C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 以乙腈-0.5% 醋酸铵为流动相, 梯度洗脱; 体积流量 0.6 mL/min; 柱温 30 ℃。**结果** 7 种成分在各自范围内线性关系良好 ($r > 0.999 0$), 平均加样回收率 96.99% ~ 99.78%, RSD 0.72% ~ 1.72%。**结论** 该方法准确简便, 专属性强, 重复性好, 可用于川贝罗汉止咳颗粒的质量控制。

关键词: 川贝罗汉止咳颗粒; 化学成分; HPLC-ELSD

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)11-2304-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.11.017

Simultaneous determination of seven constituents in Chuanbei Luohan Zhike Granules by HPLC-ELSD

LI Min¹, NIE Jian-jun², WEI Jian-hui¹, ZHENG Zhi-xin^{1*}

(1. Department of Pharmacy, Hospital Affiliated to Zhengzhou University & Nanyang Central Hospital, Nanyang 473000, China; 2. Department of Pharmacy, The First Hospital Affiliated to Nanyang Medical College, Nanyang 473000, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish an HPLC-ELSD method for the simultaneous content determination of euscaphic acid, tormentic acid, cratogeolic acid, corosolic acid, platycodin E, platycodin D₃ and platycodin D in Chuanbei Luohan Zhike Granules (*Fritillariae cirrhosae Bulbus*, *Eriobotryae Folium*, *Platycodonis Radix*, etc.).

METHODS The analysis of 60% methanol extract of this drug was performed on a 30 ℃ thermostatic Ultimate XB C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile - 0.5% ammonium

收稿日期: 2016-12-20

作者简介: 李 敏(1984—), 女, 硕士, 主管药师, 从事医院药学相关研究工作。Tel: 15225696388

* 通信作者: 郑芝欣(1972—), 男, 硕士, 主任药师, 从事医院药学相关研究工作。Tel: (0377) 63200550, E-mail: zhengzhixin1972@

acetate flowing at 0.6 mL/min in a gradient elution manner. **RESULTS** Seven constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r > 0.999 0$), whose average recoveries were 96.99% - 99.78% with the RSDs of 0.72% - 1.72%. **CONCLUSION** This accurate, simple, specific and reproducible method can be used for the quality control of Chuanbei Luohan Zhike Granules.

KEY WORDS: Chuanbei Luohan Zhike Granules; chemical constituents; HPLC-ELSD

川贝罗汉止咳颗粒可用于伤风咳嗽、支气管炎等病症的治疗,是由川贝母、枇杷叶、桔梗、薄荷脑、罗汉果5味药材加工而成的口服颗粒剂,目前《卫生部药品标准》中药成方制剂第8册仅对其性状、显微鉴别进行了控制,而未对方中药味作定量测定^[1]。枇杷叶^[2]清润肺气、化痰止咳,桔梗^[2]宣肺、祛痰、利咽,为方中主药,附以川贝母、罗汉果和薄荷脑,诸药合用,共奏清肺、止咳、祛痰之功,其中枇杷叶化学成分有三萜酸、黄酮、多酚、倍半萜、糖苷等,但药理作用主要集中在三萜酸的抗炎止咳、抗病毒、降血糖、抗氧化等^[3],以野鸦椿酸、委陵菜酸、山楂酸、科罗素酸、齐墩果酸、熊果酸等为主;桔梗主要药理活性成分为桔梗皂苷,主要有桔梗皂苷E、桔梗皂苷D₃、桔梗皂苷D。本实验采用HPLC-ELSD法^[4]对川贝罗汉止咳颗粒中野鸦椿酸、委陵菜酸、山楂酸、科罗素酸、桔梗皂苷E、桔梗皂苷D₃、桔梗皂苷D的含有量同时进行测定,以有效控制其内在质量。

1 仪器与试药

1.1 仪器 LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司),配置 PL-ELS2100 蒸发光散射检测器;BP-211D 电子天平(德国赛多利斯公司);KQ5200E 超声波清洗器(昆山市超声仪器有效公司)。

1.2 试药 川贝罗汉止咳颗粒购自广西麦克健丰制药有限公司,每袋装 10 g,批号 160401、160502、160503。乙腈为色谱纯;醋酸铵为分析纯;水为重蒸馏水。野鸦椿酸对照品(53155-25-2,含有量 97.0%)购自上海谷研实业有限公司;委陵菜酸(13850-16-3,含有量 98.0%,2~8℃保存)、山楂酸(4373-41-5,含有量 99.0%,密封,避光,2~8℃保存)对照品购自上海胜隆实业有限公司;科罗素酸对照品(4547-24-4,含有量 98.0%,2~8℃干燥处避光保存)购自宝鸡市辰光生物科技有限公司;桔梗皂苷 E 对照品(237068-41-6,含有量 99.0%)购自成都德思特生物技术有限公司;桔梗皂苷 D₃ 对照品(67884-03-1,含有量 98.0%)购自湖北巨胜科技有限公司;

桔梗皂苷 D 对照品(111851-201406,含有量 96.2%,冷冻保存)购自中国食品药品检定研究院。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 供试品溶液 取颗粒适量,研细,精密称取细粉约 1.0 g,置于 50 mL 量瓶中,加入 60% 甲醇 45 mL,超声 30 min,放冷,60% 甲醇补足至刻度,摇匀,过滤,取续滤液,即得。

2.1.2 对照品溶液 精密称取各对照品适量,置于 7 个 20 mL 量瓶中,60% 甲醇定容,振摇均匀,即得对照品贮备液(野鸦椿酸 2.536 mg/mL、委陵菜酸 1.252 mg/mL、山楂酸 1.496 mg/mL、科罗素酸 2.474 mg/mL、桔梗皂苷 E 0.510 mg/mL、桔梗皂苷 D₃ 0.452 mg/mL、桔梗皂苷 D 0.498 mg/mL),分别量取 5.0、5.0、5.0、5.0、4.0、2.5、5.0 mL,置于同一 100 mL 量瓶中,60% 甲醇定容,振摇均匀,即得(每 1 mL 含野鸦椿酸 126.8 μg、委陵菜酸 62.6 μg、山楂酸 74.8 μg、科罗素酸 123.7 μg、桔梗皂苷 E 20.4 μg、桔梗皂苷 D₃ 11.3 μg、桔梗皂苷 D 24.9 μg)。

2.1.3 阴性对照溶液 按《卫生部药品标准》中药成方制剂第 8 册^[1]质量标准项下的处方比例,称取除枇杷叶外、桔梗外的药材各 1 份,严格按照生产工艺及供试品溶液制备方法,制得相应阴性对照溶液。

2.2 色谱条件 Ultimate XB C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);蒸发光散射检测器(漂移管温度 95℃,氮气体积流量 2.5 L/min);流动相乙腈(A)-0.5% 醋酸铵(B),梯度洗脱(0~10 min, 15% A; 10~29 min, 15% → 32% A; 29~43 min, 32% → 60% A; 43~50 min, 60% → 15% A);体积流量 0.6 mL/min;柱温 30℃。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 精密吸取“2.1.2”项下对照品贮备液 0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 mL,置于 6 个 20 mL 量瓶中,60% 甲醇定容,振摇均匀,即得系列质量浓度对照品溶液,在“2.2”项

色谱条件下测定。以峰面积积分值的对数为纵坐标 (Y)，质量浓度的对数为横坐标 (X) 进行线性回

归，结果见表1，可知各成分在各自范围内呈良好的线性关系。

表1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	r
野鸦椿酸	$\lg Y = 1.931 4 \lg X + 5.309 5$	12.68 ~ 253.60	0.999 3
委陵菜酸	$\lg Y = 1.401 3 \lg X + 4.648 2$	6.26 ~ 125.20	0.999 8
山楂酸	$\lg Y = 1.597 2 \lg X + 4.370 6$	7.48 ~ 149.60	0.999 9
科罗索酸	$\lg Y = 1.322 7 \lg X + 5.009 7$	12.37 ~ 247.40	0.999 2
桔梗皂苷 E	$\lg Y = 1.265 7 \lg X + 4.155 8$	2.55 ~ 51.00	0.999 7
桔梗皂苷 D ₃	$\lg Y = 1.052 8 \lg X + 4.336 7$	2.26 ~ 45.20	0.999 9
桔梗皂苷 D	$\lg Y = 1.163 9 \lg X + 4.609 4$	2.49 ~ 49.80	0.999 5

2.3.2 专属性考察 精密吸取阴性对照、对照品、供试品溶液适量，在“2.2”项色谱条件下测定，发现阴性无干扰，色谱图见图1。

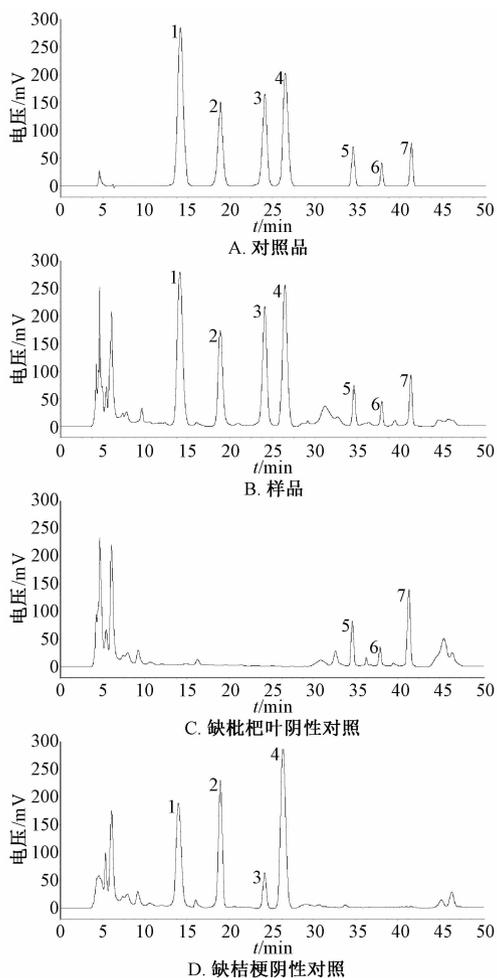
2.3.3 重复性试验 取颗粒(批号160401)6份，按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液，在“2.2”项色谱条件下测定，测得野鸦椿酸、委陵菜酸、山楂酸、科罗索酸、桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 D₃、桔梗皂苷 D 含有量 RSD 分别为 1.29%、0.44%、1.31%、1.07%、0.71%、1.82%、1.66%，表明该方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 取同一供试品(批号160401)溶液，室温下于0、2、4、8、12、24 h 测定，测得野鸦椿酸、委陵菜酸、山楂酸、科罗索酸、桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 D₃、桔梗皂苷 D 峰面积 RSD 分别为 0.83%、0.91%、1.01%、0.93%、1.10%、1.13%、0.99%，表明溶液在24 h 内稳定性良好。

2.3.5 精密度试验 对照品溶液在“2.2”项色谱条件下测定6次，测得野鸦椿酸、委陵菜酸、山楂酸、科罗索酸、桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 D₃、桔梗皂苷 D 峰面积 RSD 分别为 0.85%、0.93%、0.98%、1.29%、1.04%、1.16%、1.08%，表明仪器精密度良好。

2.3.6 加样回收率试验 取含有量已知的颗粒(批号160401)适量，研细，精密称取细粉0.5 g，共6份，置于50 mL量瓶中，精密加入对照品溶液25 mL、60%甲醇20 mL，超声30 min，放冷，60%甲醇补足至刻度，摇匀，过滤，在“2.2”项色谱条件下测定。结果，野鸦椿酸、委陵菜酸、山楂酸、科罗索酸、桔梗皂苷 E、桔梗皂苷 D₃、桔梗皂苷 D 平均加样回收率分别为 98.51%、97.76%、99.20%、97.58%、99.78%、98.40%、96.99%，RSD 分别为 0.96%、1.44%、1.54%、1.61%、0.99%、1.72%、0.72%。

2.4 样品含有量测定 按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液，精密吸取对照品溶液5、10 μL ，



1. 野鸦椿酸 2. 委陵菜酸 3. 山楂酸 4. 科罗索酸 5. 桔梗皂苷 E 6. 桔梗皂苷 D₃ 7. 桔梗皂苷 D

1. euscaphic acid 2. tormentic acid 3. cratogenic acid 4. corosolic acid 5. platycodin E 6. platycodin D₃ 7. platycodin D

图1 各成分 HPLC-ELSD 色谱图

Fig. 1 HPLC-ELSD chromatograms of various constituents

供试品溶液 10 μL, 在“2.2”项色谱条件下测定, 外标两点法计算含有量, 结果见表2。

表2 各成分含有量测定结果 (mg/g)

Tab. 2 Results of content determination of various constituents (mg/g)

批号	野鸦椿酸	委陵菜酸	山楂酸	科罗素酸	桔梗皂苷 E	桔梗皂苷 D ₃	桔梗皂苷 D
160401	6.412	3.037	3.843	6.175	1.053	0.527	1.281
160502	5.716	2.713	3.229	5.239	0.861	0.611	1.079
160503	7.108	3.542	4.347	7.062	1.216	0.485	1.516
平均值	6.412	3.097	3.806	6.159	1.043	0.541	1.292

3 讨论

3.1 检测方法选择 枇杷叶所含三萜酸(野鸦椿酸、委陵菜酸、山楂酸、科罗素酸等)结构中无共轭体系, 紫外吸收不明显, 只在末端 210 nm 左右存在吸收峰, 紫外检测器定量测定时干扰大。同时, 桔梗所含皂苷无共轭结构, 在紫外光谱区只有末端吸收, 紫外检测灵敏度降低。因此, 本实验采用蒸发光散射检测器进行测定。

3.2 流动相选择 本实验比较了甲醇-水^[5]、乙腈-水^[6-9]流动相, 发现后者洗脱时各成分分离效果明显优于前者。在此基础上, 又考察了乙腈-0.1% 甲酸^[10]、乙腈-0.5% 醋酸铵流动相, 最终确定最佳流动相为乙腈-0.5% 醋酸铵, 此时基线平稳, 所测各成分峰形基本对称, 分离效果良好。

3.3 提取溶剂及提取时间选择 根据川贝罗汉止咳颗粒生产工艺特点, 选择较简便的超声提取法来处理样品, 再对不同提取溶剂(甲醇^[11-12]、60% 甲醇、20% 甲醇)进行考察, 发现 60% 甲醇处理样品时, 所测各成分提取率最高。在此基础上, 又考察了不同超声提取时间(20、30、40 min)对各成分提取率的影响, 最终选择样品最佳处理方式 60% 甲醇超声提取 30 min。

4 结论

HPLC-ELSD 法能同时测定川贝罗汉止咳颗粒中 7 种成分的含有量, 样品处理方法简便, 各组分能得到较好的分离, 专属性强, 溶液稳定性好, 对该制剂相应指标的质量控制及临床用药安全有着积极意义。

参考文献:

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 卫生部颁药品标准(中药成方制剂): 第 8 册[S]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 17.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 19-20.

[3] 李 婷, 林文津, 徐榕青, 等. 枇杷叶的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2010, 29(5): 11-14, 20.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版四部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 19-20.

[5] 白淑芳, 刘占云, 宋 菲, 等. HPLC 法测定肠舒片中蔷薇酸和委陵菜酸[J]. 中成药, 2012, 34(2): 282-285.

[6] 叶 静, 汤须崇, 黄雅燕, 等. HPLC-ELSD 法测定桔梗中 3 种桔梗皂苷的含量[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2010, 31(5): 640-642.

[7] 王 菲, 路 丹, 柳 杨, 等. 反相高效液相色谱法测定桔梗中 3 种三萜皂苷类化合物的含量[J]. 中南药学, 2011, 9(5): 329-331.

[8] 黄 樱, 史春蕾, 于红艳, 等. HPLC-ELSD 法测定桔梗饮片中 8 种桔梗皂苷的含量[J]. 扬州大学学报: 自然科学版, 2008, 11(4): 41-44.

[9] 李红燕, 张 蕊, 冯晓川. HPLC-ELSD 法测定复方枇杷止咳颗粒中桔梗皂苷 D、熊果酸、齐墩果酸和贝母素甲[J]. 中成药, 2013, 35(7): 1479-1484.

[10] 黄 娇, 姜登军. 不同海拔高度桔梗药材中 3 种桔梗皂苷含量的测定[J]. 北方药学, 2015, 12(5): 606-609.

[11] 蔡雪萍, 李振华, 华俊磊, 等. 一测多评法测定枇杷叶有效部位中 6 种三萜酸成分的量[J]. 中草药, 2013, 44(21): 3057-3062.

[12] 华俊磊, 蔡雪萍, 鞠建明, 等. HPLC-ELSD 测定枇杷叶总三萜酸固体分散体片中 6 种三萜酸含量[J]. 中国药杂志, 2014, 49(17): 1550-1553.