

桔贝合剂质量标准提升研究[△]

洪挺^{1*},周志强¹,肖小武¹,陈丹丹²,杨毅生^{1#}(1.江西省药品检验检测研究院/国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室/江西省药品与医疗器械质量工程技术研究中心,南昌 330029;2.江西中医药大学药学院,南昌 330004)

中图分类号 R917;R283.6 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)21-2603-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.21.08



摘要 目的 提升桔贝合剂的质量标准。方法 采用三硝基苯酚与氢氰酸的化学反应鉴别苦杏仁水;采用薄层色谱(TLC)法定性鉴别桔贝合剂中桔梗、浙贝母、黄芩、枇杷叶、甘草;采用高效液相色谱(HPLC)法同时测定该制剂中苦杏仁苷、黄芩苷、汉黄芩苷、甘草酸铵4种成分的含量。结果 三硝基苯酚试纸显砖红色。5味药材的TLC斑点清晰,阴性对照无干扰。苦杏仁苷、黄芩苷、汉黄芩苷和甘草酸铵的进样量线性范围分别为0.066 8~1.335 5 μg ($R^2=0.999 4$)、0.189 8~3.796 9 μg ($R^2=0.999 9$)、0.062 6~1.251 3 μg ($R^2=0.999 9$)、0.041 8~0.835 5 μg ($R^2=0.999 8$);精密性、重复性、稳定性试验的RSD均小于2%;平均加样回收率分别为98.2%、99.5%、98.3%、99.6%,RSD分别为0.7%、1.6%、1.5%、1.1% ($n=6$)。15批样品的含量存在差异,A公司样品的含量普遍低于B、C公司。结论 所建质量标准可较好地反映桔贝合剂的内在质量。
关键词 桔贝合剂;质量标准;化学反应;薄层色谱法;高效液相色谱法

Study on the improvement of quality standard for Jubei mixture

HONG Ting¹, ZHOU Zhiqiang¹, XIAO Xiaowu¹, CHEN Dandan², YANG Yisheng¹(1. Jiangxi Provincial Institute for Drug Control/NMPA Key Laboratory for Quality Evaluation of Chinese Patent Medicine/Jiangxi Provincial Engineering Research Center for Drug and Medical Device Quality, Nanchang 330029, China; 2. College of Pharmacy, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To improve the quality standard for Jubei mixture. **METHODS** The chemical reaction of trinitrophenol and hydrocyanic acid was used to identify *Armeniacae Amarum* solution. *Platycodon grandiflorus*, *Fritillaria thunbergii*, *Scutellaria baicalensis*, the leaves of *Eriobotrya japonica* and *Glycyrrhiza uralensis* in Jubei mixture were identified by thin-layer chromatography (TLC). High-performance liquid chromatography was used to simultaneously determine the contents of four active components, such as amygdalin, baicalin, wogonoside and monoammonium glycyrrhizinate in Jubei mixture. **RESULTS** Trinitrophenol test paper showed brick red. TLC spots of five medicinal materials were clear, without interference from negative control. The linear ranges of amygdalin, baicalin, wogonoside and monoammonium glycyrrhizinate were 0.066 8-1.335 5 μg ($R^2=0.9994$), 0.189 8-3.796 9 μg ($R^2=0.999 9$), 0.062 6-1.251 3 μg ($R^2=0.999 9$), 0.041 8-0.835 5 μg ($R^2=0.999 8$), respectively. RSDs of precision, repeatability and stability tests were all lower than 2%. The average recoveries were 98.2%, 99.5%, 98.3%, 99.6%, and RSDs were 0.7%, 1.6%, 1.5%, 1.1% ($n=6$). The contents of 15 batches of samples were different, and the content of sample from company A was generally lower than those from companies B and C. **CONCLUSIONS** The standard established can reflect the inherent quality of Jubei mixture well.

KEYWORDS Jubei mixture; quality standard; chemical reaction; thin-layer chromatography; high-performance liquid chromatography

桔贝合剂处方来源于重庆市中医研究所(原重庆市第一中医院),原名为桔贝糖浆,后改为合剂。该方由桔梗、浙贝母、苦杏仁、麦冬、黄芩、枇杷叶、甘草等7味药组

成,方中桔梗、浙贝母共为君药,苦杏仁、黄芩共为臣药,甘草调和药性为佐药,麦冬、枇杷叶共为使药,诸药合而为方,共奏润肺止咳之功效,常用于治疗肺热咳嗽、痰稠色黄、咳痰不爽等症。

[△]基金项目 国家药品标准制订研究课题(No.2021Z026);江西省药品监督管理局科研项目(No.2019JS18)

*第一作者 副主任药师,硕士。研究方向:中药活性成分和质量控制。电话:0791-88158716。E-mail:174635475@qq.com

#通信作者 主任药师。研究方向:中药活性成分和质量控制。电话:0791-88158128。E-mail:1020115850@qq.com

桔贝合剂现行质量标准为国家药品标准中药成方制剂第二册(WS₃-B-0369-90),但该标准只收录了性状和检查项^[1],无法有效控制该制剂质量。已发表的关于桔贝合剂质量标准的研究较少,仅有浙贝母和枇杷叶

的薄层色谱(TLC)鉴别、贝母素甲与贝母素乙的含量测定,以及甘草苷等5种成分的含量测定^[2-5],且所得浙贝母与枇杷叶的TLC斑点均较弱,提取方式及展开剂均需优化。基于此,本研究采用化学鉴别法鉴别苦杏仁水,采用TLC法对方中桔梗、浙贝母、黄芩、枇杷叶、甘草进行定性鉴别,采用高效液相色谱(HPLC)法同时测定方中苦杏仁苷、黄芩苷、汉黄芩苷、甘草酸铵的含量^[6-8],旨在更客观、全面地反映桔贝合剂的内在质量,为其临床应用的安全性和有效性提供参考依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有1260 Infinity II型HPLC仪(美国Agilent公司)、BSA124S-CW型电子天平(德国Sartorius公司)、TE212-L型十万分之一电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]、KQ-500E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)、Milli-Q Direct 16型超纯水仪(美国Millipore公司)等。

1.2 主要药品与试剂

15批桔贝合剂分别购自A公司(批号190203、190207、190208、190209、190301,规格10 mL)、B公司(批号23190071、23190251、23190441、23210231、23210241,规格10 mL)、C公司(批号18090051、19040013、19040024、19090030、20010001,规格100 mL)。桔梗对照药材(批号121028-201612)、浙贝母对照药材(批号120972-200404)、黄芩对照药材(批号120955-201810)、枇杷叶对照药材(批号121261-201804)、甘草对照药材(批号121303-201704)、苦杏仁苷对照品(批号110820-201607,纯度90.7%)、黄芩苷对照品(批号110715-201821,纯度95.3%)、汉黄芩苷对照品(批号112002-201702,纯度98.8%)、甘草酸铵对照品(批号110731-201619,纯度93.0%)均购自中国食品药品检定研究院。桔梗、浙贝母、苦杏仁、麦冬、黄芩、枇杷叶、甘草药材均为市售品,均经江西省药品检验检测研究院杨毅生主任中药师鉴定为真品。甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 苦杏仁水的化学反应

取3批桔贝合剂(批号分别为190301、23210241、19090030)各10 mL,分别置于试管中,再在试管中悬挂一条三硝基苯酚试纸(使用前用10%碳酸钠溶液湿润),密塞,置80 °C热水浴10 min。再取缺苦杏仁水的其他药材,按桔贝合剂的处方工艺制成阴性样品,再按上述方法操作。结果显示,3批样品中的三硝基苯酚试纸均呈现砖红色,阴性样品中的试纸未变色,详见图1。

2.2 TLC鉴别

2.2.1 桔梗的TLC鉴别 取桔贝合剂10 mL,用水饱和的正丁醇溶液振摇提取2次,每次20 mL,合并正丁醇



1: 阴性对照; 2~4: 样品(批号分别为190301、23210241、19090030)

图1 苦杏仁水的化学反应结果

液,置水浴上蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。取桔梗对照药材0.5 g,置锥形瓶中,加甲醇10 mL,超声处理(功率500 W,频率40 kHz)15 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇2 mL使溶解,作为对照药材溶液。取缺桔梗的其他药材按桔贝合剂处方工艺制备阴性样品,再按本项下供试品溶液制备方法制成桔梗阴性对照溶液。参照2020年版《中国药典》(四部)通则0502“薄层色谱法”^[9]试验,吸取上述3种溶液2~5 μ L,分别点于同一自制硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-甲酸(16:8:1, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,在105 °C下加热至斑点显色清晰,日光下检视。结果显示,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点;阴性对照无干扰,详见图2。

2.2.2 浙贝母的TLC鉴别 取桔贝合剂20 mL,加浓氨试液5 mL,摇匀,用三氯甲烷振摇提取3次,每次25 mL,合并三氯甲烷层,蒸干,残渣加三氯甲烷1 mL使溶解,作为供试品溶液。取浙贝母对照药材1 g,加浓氨试液5 mL和三氯甲烷25 mL,超声处理(功率500 W,频率40 kHz)30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加三氯甲烷1 mL使溶解,作为对照药材溶液。取缺浙贝母的其他药材按桔贝合剂处方工艺制备阴性样品,再按本项下供试品溶液制备方法制成浙贝母阴性对照溶液。参照2020年版《中国药典》(四部)通则0502“薄层色谱法”^[9]试验,吸取上述3种溶液10~20 μ L,分别点于同一自制硅胶G薄层板上,用乙酸乙酯-甲醇-浓氨试液(17:2:1, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以稀碘化铋钾试液,在日光下检视。结果显示,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点;阴性对照无干扰,详见图3。

2.2.3 黄芩的TLC鉴别 取“2.2.1”项下的供试品溶液,作为黄芩TLC鉴别的供试品溶液。取黄芩对照药材0.5 g,加水50 mL,煎煮1.5 h,离心,取上清液浓缩至10 mL,即得对照药材溶液。取缺黄芩的其他药材按桔贝合剂处方工艺制备阴性样品,再按本项下供试品溶液制备方

法制成黄芩阴性对照溶液。参照2020年版《中国药典》(四部)通则0502“薄层色谱法”^[9]试验,吸取上述3种溶液2~5 μL,分别点于同一聚酰胺薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(10:7:3:2, V/V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以三氯化铁试液,在日光下检视。结果显示,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点;阴性对照无干扰,详见图4。

2.2.4 枇杷叶的TLC鉴别 取桔贝合剂20 mL,用乙醚振摇提取2次,每次20 mL,弃去乙醚液,水层用水饱和的正丁醇溶液振摇萃取2次,每次20 mL,合并正丁醇层,再用正丁醇饱和的氨试液洗涤2次,每次20 mL,再将正丁醇层蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。取枇杷叶对照药材1 g,加水50 mL,煎煮1 h,滤过,滤液浓缩至20 mL,同法制成对照药材溶液。取缺枇杷叶的其他药材按桔贝合剂处方工艺制备阴性样品,再按本项下供试品溶液制备方法制成枇杷叶阴性对照溶液。参照2020年版《中国药典》(四部)通则0502“薄层色谱法”^[9]试验,吸取上述3种溶液各5 μL,分别点于同一自制硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2, V/V/V)在10 °C以下放置的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以5%香草醛硫酸溶液,在105 °C下加热至斑点显色清晰,日光下检视。结果显示,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上显相同颜色的斑点;阴性对照无干扰,详见图5。

2.2.5 甘草的TLC鉴别 取桔贝合剂10 mL,用乙酸乙酯振摇提取3次,每次20 mL,乙酸乙酯层蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。取甘草对照药材1 g,加水50 mL,煎煮1 h,滤过,滤液浓缩至约10 mL,同法制成对照药材溶液。取缺甘草的其他药材按桔贝合剂处方工艺制备阴性样品,再按本项下供试品溶液制成甘草阴性对照溶液。参照2020年版《中国药典》(四部)通则0502“薄层色谱法”^[9]试验,吸取上述3种溶液各5 μL,分别点于同一自制硅胶G薄层板上,以乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水(15:1:1:1.5, V/V/V/V)为展开剂,展开,取

出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,在105 °C下加热至斑点显色清晰,日光下检视。结果显示,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上显相同颜色的斑点;阴性对照无干扰,详见图6A。再置紫外光灯(365 nm)下检视,结果显示,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点;阴性对照无干扰,详见图6B。

2.3 苦杏仁苷、黄芩苷、汉黄芩苷和甘草酸铵的含量测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱为Agilent 5TC-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm);以甲醇(A)-0.1%磷酸溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~90 min, 25%A→77%A; 90~95 min, 77%A);检测波长按时间切换(0~20 min, 210 nm; 20~95 min, 252 nm);流速为1.0 mL/min;柱温为30 °C;进样量为10 μL。

2.3.2 溶液的制备 (1)混合对照品溶液:分别精密称取苦杏仁苷、黄芩苷、汉黄芩苷和甘草酸铵对照品适量,加甲醇制成每1 mL含上述成分分别为60、200、60、40 μg的混合对照品溶液。(2)供试品溶液:精密量取桔贝合剂2 mL,置50 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,即得。(3)阴性对照溶液:分别取缺苦杏仁、黄芩、甘草的其他药材,按桔贝合剂处方工艺分别制备缺苦杏仁、黄芩、甘草的阴性样品,再按本项下供试品溶液的制备方法制成缺苦杏仁、黄芩、甘草的阴性对照溶液。

2.3.3 系统适用性试验 分别精密吸取“2.3.2”项下的3种溶液,按“2.3.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。结果显示,色谱峰基线平稳,苦杏仁苷、黄芩苷、汉黄芩苷和甘草酸铵色谱峰与其余成分峰相互无干扰,相邻色谱峰之间的分离度均大于1.5,理论板数按黄芩苷峰计算不低于4 000。结果见图7。

2.3.4 线性关系考察 分别精密称取苦杏仁苷、汉黄芩苷、甘草酸铵对照品12.27、10.64、11.23 mg,分别置于50 mL量瓶中;精密称取黄芩苷对照品9.95 mg,置10 mL量瓶中;分别用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得4种对

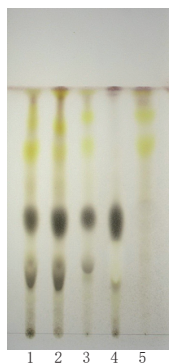


图2 桔梗的TLC鉴别图
1~3: 供试品(批号分别为190301、23210241、19090030); 4: 桔梗对照药材; 5: 阴性对照

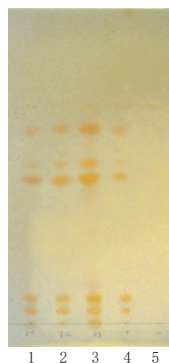


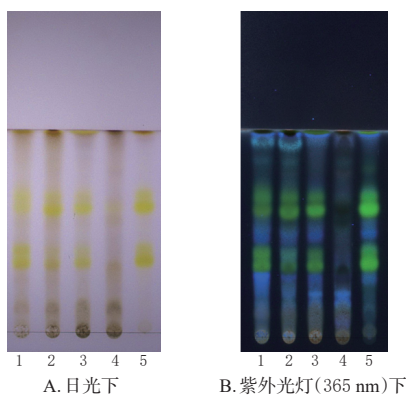
图3 浙贝母的TLC鉴别图
1~3: 供试品(批号分别为190301、23210241、19090030); 4: 浙贝母对照药材; 5: 阴性对照



图4 黄芩的TLC鉴别图
1: 阴性对照; 2~4: 供试品(批号分别为190301、23210241、19090030); 5: 黄芩对照药材

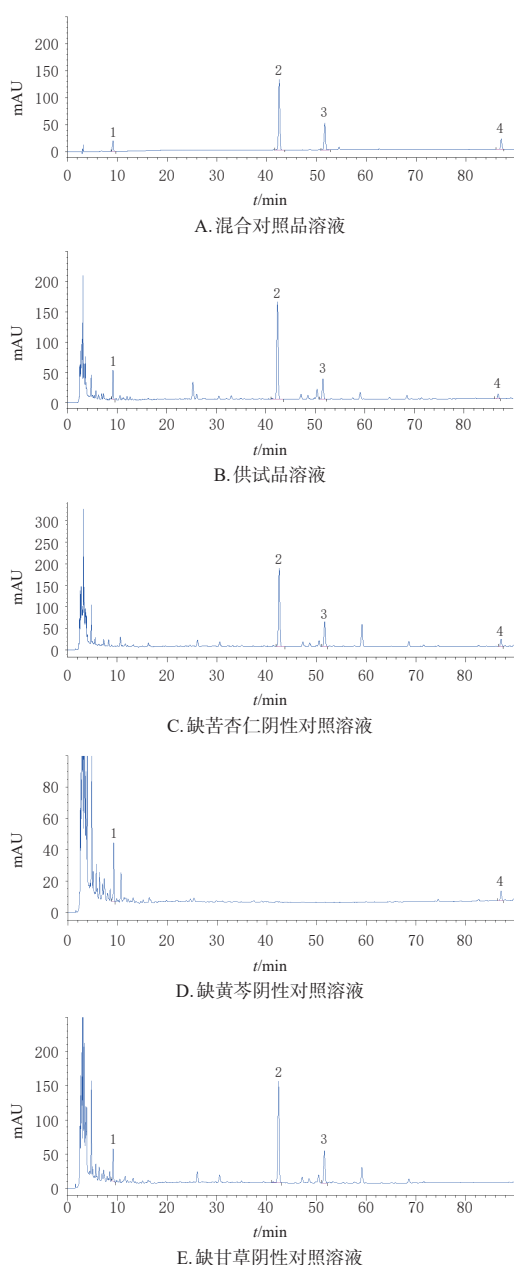


图5 枇杷叶的TLC鉴别图
1~3: 供试品(批号分别为190301、23210241、19090030); 4: 枇杷叶对照药材; 5: 阴性对照



1~3: 供试品(批号分别为190301、23210241、19090030); 4: 阴性对照; 5: 甘草对照药材

图6 甘草的TLC鉴别图



1: 苦杏仁苷; 2: 黄芩苷; 3: 汉黄芩苷; 4: 甘草酸铵

图7 桔贝合剂含量测定的HPLC图

照品母液。分别精密量取上述苦杏仁苷、汉黄芩苷对照品母液各 3 mL, 黄芩苷、甘草酸铵对照品母液各 2 mL, 置同一 100、50、25、10、5 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 即得不同浓度的系列混合对照品溶液。精密吸取上述系列混合对照品溶液各 10 μ L 注入 HPLC 仪, 按“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以对照品进样量(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标, 绘制标准曲线并进行线性关系考察, 结果见表 1。

表1 苦杏仁苷等4种成分的线性关系考察结果($n=5$)

待测成分	回归方程	R^2	线性范围/ μ g
苦杏仁苷	$Y=456.56X+6.6076$	0.9994	0.0668~1.3355
黄芩苷	$Y=1190.8X+32.702$	0.9999	0.1898~3.7969
汉黄芩苷	$Y=1403.2X+12.066$	0.9999	0.0626~1.2513
甘草酸铵	$Y=742.5X+5.581$	0.9998	0.0418~0.8355

2.3.5 精密密度试验 精密吸取“2.3.2(1)”项下混合对照品溶液 10 μ L, 按“2.3.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果显示, 苦杏仁苷、黄芩苷、汉黄芩苷和甘草酸铵峰面积的 RSD 分别为 0.4%、1.2%、0.9%、1.5% ($n=6$), 表明仪器精密密度较好。

2.3.6 重复性试验 取桔贝合剂(批号 19090030) 6 份, 分别按“2.3.2(2)”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.3.1”项下色谱条件进样分析, 记录峰面积, 以外标法计算样品含量。结果显示, 样品中苦杏仁苷、黄芩苷、汉黄芩苷和甘草酸铵的平均含量分别为 2.86、5.42、0.99、0.38 mg/mL, RSD 分别为 1.1%、0.3%、0.4%、0.4% ($n=6$), 表明方法重复性较好。

2.3.7 稳定性试验 取同一批桔贝合剂(批号 19090030) 制成的供试品溶液, 分别在制备后 1、3、5、7、10、17、24 h 按“2.3.1”项下色谱条件进样分析, 记录峰面积。结果显示, 苦杏仁苷、黄芩苷、汉黄芩苷和甘草酸铵峰面积的 RSD 分别为 1.4%、0.8%、0.7%、0.9% ($n=7$), 表明供试品溶液在制备后 24 h 内稳定性较好。

2.3.8 准确度试验 精密量取桔贝合剂(批号 19090030, 苦杏仁苷、黄芩苷、汉黄芩苷和甘草酸铵的含量分别为 2.86、5.42、0.99、0.38 mg/mL) 1 mL, 共 6 份, 分别置 50 mL 量瓶中, 精密加入混合对照品溶液(苦杏仁苷、黄芩苷、汉黄芩苷和甘草酸铵质量浓度分别为 0.25、0.55、0.10、0.04 mg/mL) 10 mL, 再加甲醇稀释至刻度, 摇匀。精密量取 10 μ L, 按“2.3.1”项下色谱条件进样分析, 记录峰面积, 计算加样回收率。结果显示, 苦杏仁苷、黄芩苷、汉黄芩苷和甘草酸铵的平均加样回收率分别为 98.2%、99.5%、98.3%、99.6%, RSD 分别为 0.7%、1.6%、1.5%、1.1% ($n=6$), 表明方法准确度较好。

2.3.9 耐用性试验 取桔贝合剂(批号 19090030) 适量, 按“2.3.2(2)”项下方法制备供试品溶液, 分别使用 Phenomenex C_{18} 柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m)、Agilent 5TC- C_{18} 柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m)、Supfex JX- C_{18} 柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), 按“2.3.1”项下色谱条件进样分

析,记录峰面积。结果显示,3种色谱柱条件下所得苦杏仁苷、黄芩苷、汉黄芩苷和甘草酸铵峰面积的RSD均不大于1.0%,表明方法耐用性较好。

2.3.10 样品含量测定 精密量取15批桔贝合剂各2 mL,置50 mL量瓶中,按“2.3.2(2)”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积,按外标法计算样品中苦杏仁苷、黄芩苷、汉黄芩苷和甘草酸铵的含量,平行测定2次,结果见表2。

表2 桔贝合剂中苦杏仁苷等4种待测成分的含量测定结果($n=2$, mg/mL)

公司	批号	苦杏仁苷	黄芩苷	汉黄芩苷	甘草酸铵
A公司	190203	未检出	1.40	0.42	0.14
	190207	未检出	1.43	0.41	0.18
	190208	未检出	1.45	0.42	0.18
	190209	未检出	1.47	0.43	0.19
	190301	未检出	0.51	0.20	0.05
B公司	23190071	0.03	4.99	1.06	0.62
	23190251	0.03	5.20	1.09	0.57
	23190441	0.03	6.18	1.45	0.56
	23210231	0.14	4.61	1.01	0.35
	23210241	0.14	4.39	0.96	0.34
C公司	18090051	2.77	5.16	1.01	0.24
	19040013	2.82	4.79	0.89	0.36
	19040024	2.63	5.05	1.06	0.29
	19090030	2.85	5.39	1.01	0.37
	20010001	2.74	4.54	0.85	0.38

3 讨论

3.1 苦杏仁水的化学反应

苦杏仁作为方中臣药,具有降气、止咳、平喘的作用。桔贝合剂的部颁标准【制法】项下要求“苦杏仁压去脂肪油后,加水蒸馏制取苦杏仁水”。经查阅文献,苦杏仁经水蒸馏后主要提取出来的成分是杏仁腴,而杏仁腴为苦杏仁苷酶解掉2分子糖后的产物,因其不稳定,会水解生成苯甲醛与氢氰酸,故最终苦杏仁水的蒸馏产物只有苯甲醛与氢氰酸^[10]。本课题组在前期试验中也验证了该结论。已知氢氰酸在碳酸钠作用下与三硝基苯酚反应会生成砖红色的异氰紫酸钠^[11],故通过该化学反应可以证明样品中含有苦杏仁水。若有企业未按照部颁标准的【制法】要求,将苦杏仁不提取杏仁水而直接与其他药材进行煎煮,这样所得的样品则不含氢氰酸,使三硝基苯酚试纸不显色。同样,因氢氰酸具有挥发性,桔贝合剂的储存应注意包材的密封性,否则很容易造成三硝基苯酚试纸不显色。本研究通过对3家生产企业15批样品进行检测,发现A公司近生产日期样品显色明显,但1年后该样品即不能显色,而B、C公司不同批号的样品均能显色,提示药企应重视样品包材的密封性。

3.2 TLC鉴别

桔贝合剂处方药味较多,化学成分丰富,若只用单个对照品作为对照,则无法显示处方中所有药材的整体信息,故本研究选择各对照药材对方中桔梗、浙贝母、黄芩、枇杷叶、甘草进行质量控制,结果显示供试品与对

照药材具有相同的色谱行为,阴性对照均无干扰。本课题组对方中的麦冬、苦杏仁也进行了TLC鉴别研究,但阴性对照一直有干扰,其鉴别方法尚需进一步摸索。

3.3 含量测定

桔贝合剂的君药桔梗与浙贝母所含主要成分分别为桔梗皂苷与贝母素类生物碱,因其无紫外吸收,须使用蒸发光散射检测器(ELSD),本课题组也建立了其含量测定方法,但因该方法已有文献报道^[4,12],故本文不再赘述。苦杏仁苷为臣药苦杏仁的主要功效成分^[13],黄芩苷与汉黄芩苷均为臣药黄芩的主要功效成分^[14];甘草的主要功效成分为甘草酸铵与甘草苷^[15],但研究发现桔贝合剂中甘草酸铵含量较高、甘草苷含量较低,故本研究建立了同时测定桔贝合剂中苦杏仁苷、黄芩苷、汉黄芩苷和甘草酸铵含量的HPLC法。另外,本课题组也设计了采用ELSD同时测定桔梗皂苷D、贝母素甲、贝母素乙、苦杏仁苷、黄芩苷、汉黄芩苷、甘草酸铵的方法,但因样品中黄芩苷含量较其他成分高出太多,致使ELSD色谱图中黄芩苷色谱峰过大,其余色谱峰过小,故不适合同时测定这7种成分。因此,本课题组采用二极管阵列检测器(DAD),并在不同时间点切换检测波长,以避开黄芩苷类成分在272 nm波长处的最大吸收,而采用其波谷252 nm作为检测波长;通过DAD扫描确定苦杏仁苷的最大吸收波长为210 nm、甘草酸铵的最大吸收波长为252 nm,最终确定本研究的检测条件为:0~20 min时,检测波长为210 nm;20~95 min时,检测波长为252 nm。本研究还对柱温(25、30、40 °C)进行了考察,发现在固定色谱柱、pH及流动相等其他条件不变的情况下,30 °C的柱温可使色谱峰的分度度更好、保留时间更为合适,且能改善拖尾现象。

在供试品溶液的制备中,本课题组分别考察了不同提取方法(稀释振摇与超声处理)、不同提取溶剂(甲醇、50%甲醇、70%甲醇)的提取效果。结果发现,以甲醇作为溶剂,采用稀释振摇的方法,样品提取较为完全,且该方法更简单。针对流动相,本课题组分别考察了甲醇-水、甲醇-0.1%磷酸溶液、甲醇-0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液梯度洗脱的效果,发现苦杏仁苷、黄芩苷、汉黄芩苷和甘草酸铵通过甲醇-0.1%磷酸溶液梯度洗脱后的峰形最佳、分离度最好。本含量测定结果显示,A公司所生产样品中的苦杏仁苷、黄芩苷、汉黄芩苷、甘草酸铵含量普遍较B、C公司样品低很多,特别是苦杏仁苷未检出,可见各公司因生产工艺参数控制差异较大或使用药材质量差异较大,导致现行标准可控性差。

4 结语

本研究建立的苦杏仁水化学反应方法准确可靠,可证明企业是否按部颁标准工艺提取苦杏仁水;建立的桔梗、浙贝母、黄芩、枇杷叶、甘草的TLC鉴别法专属性强,对方中君臣佐使药味均进行了定性控制;建立的同

时测定苦杏仁苷、黄芩苷、汉黄芩苷和甘草酸铵含量的HPLC法操作简便、耐用性好,对苦杏仁、黄芩、甘草3味药材进行了定量控制。本研究方法对桔贝合剂基本实现了全方控制,所建立的质量标准可以较好地反映该制剂的内在质量,可为其临床用药的安全性和有效性提供保障。

参考文献

- [1] 卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准: 中药成方制剂: 第二册[S]. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 199.
- [2] 徐小利, 姚丽佳, 陈晓虎. 桔贝合剂质量标准研究[J]. 中国药业, 2009, 18(6): 29-30.
- [3] 王海宁, 杨翰. HPLC法测定桔贝合剂中黄芩苷的含量[J]. 中国药房, 2007, 18(27): 2132-2133.
- [4] 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, 15(12): 1765-1767.
- [5] 沈立茹, 张爱兵, 裴璐, 等. 桔贝合剂中5种成分的含量测定[J]. 中南药学, 2019, 17(6): 868-871.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2020年版. 北京: 中国医药科技出版社, 88-89, 289, 304, 314, 999-1000, 1342-1343.

- [7] 徐境荣, 于钦川, 赖莉, 等. 基于多指标成分含量测定探索黄芩药材质量综合评价模式[J]. 药学学报, 2021, 56(11): 3141-3152.
- [8] 曾杉, 史紫娟, 陈伟彦, 等. 当归六黄汤UPLC指纹图谱的建立及4种成分的含量测定[J]. 广东药科大学学报, 2022, 38(2): 13-18.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2020年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 59.
- [10] 段帅, 吴晓彤, 李博. 苦杏仁苷的结构及其降解过程的研究进展[J]. 食品科技, 2020, 45(9): 233-237.
- [11] 陈文芳. 苦杏仁鉴别方法的改进[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(2): 285-286.
- [12] 洪挺, 章瑛, 周志强, 等. HPLC-ELSD测定桔贝合剂中桔梗皂苷D含量[J]. 药品评价, 2022, 19(7): 394-398.
- [13] 赵玉升, 胡杰, 吴佳姝, 等. 苦杏仁炮制方法及药理作用研究进展[J]. 中医药导报, 2021, 27(3): 175-180.
- [14] 房城, 于兴博, 郑秀茜, 等. 黄芩的化学成分及药理作用研究进展[J]. 化学工程师, 2021, 35(3): 52-54.
- [15] 李娜, 张晨, 钟赣生, 等. 不同品种甘草化学成分、药理作用的研究进展及质量标志物(Q-Marker)预测分析[J]. 中草药, 2021, 52(24): 7680-7692.

(收稿日期: 2022-04-05 修回日期: 2022-10-02)

(编辑: 胡晓霖)

(上接第2602页)

- [15] HE X Y, XIANG N X, ZHANG J J, et al. Encapsulation of teniposide into albumin nanoparticles with greatly lowered toxicity and enhanced antitumor activity[J]. Int J Pharm, 2015, 487(1/2): 250-259.
- [16] YI X L, LIAN X H, DONG J X, et al. Co-delivery of pirarubicin and paclitaxel by human serum albumin nanoparticles to enhance antitumor effect and reduce systemic toxicity in breast cancers[J]. Mol Pharm, 2015, 12(11): 4085-4098.
- [17] SMOLEN J S, STEINER G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis[J]. Nat Rev Drug Discov, 2003, 2(6): 473-488.
- [18] WANG Q, SUN X. Recent advances in nanomedicines for the treatment of rheumatoid arthritis[J]. Biomater Sci, 2017, 5(8): 1407-1420.
- [19] PENG X, WANG J, SONG H, et al. Optimized preparation of celastrol-loaded polymeric nanomicelles using rotatable central composite design and response surface methodology[J]. J Biomed Nanotechnol, 2012, 8(3): 491-499.
- [20] ZHANG J, LI C Y, XU M J, et al. Oral bioavailability and gender-related pharmacokinetics of celastrol following ad-

ministration of pure celastrol and its related tablets in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2012, 144(1): 195-200.

- [21] FU Q, SUN J, ZHANG W P, et al. Nanoparticle albumin-bound (NAB) technology is a promising method for anti-cancer drug delivery[J]. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2009, 4(3): 262-272.
- [22] KRATZ F. Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles[J]. J Control Release, 2008, 132(3): 171-183.
- [23] HUANG Y L, ZHOU D, HANG T J, et al. Preparation, characterization, and assessment of the antiglioma effects of liposomal celastrol[J]. Anticancer Drugs, 2012, 23(5): 515-524.
- [24] 刘鹏, 陈莹. HPLC-超滤法测定雷公藤红素与家兔、大鼠、人血浆的蛋白结合率[J]. 中国药房, 2015, 26(1): 62-65.
- [25] REN H W, HE Y W, LIANG J M, et al. Role of liposome size, surface charge, and PEGylation on rheumatoid arthritis targeting therapy[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2019, 11(22): 20304-20315.

(收稿日期: 2022-05-22 修回日期: 2022-09-22)

(编辑: 林 静)