

HPLC 法对杏桔合剂中桔梗皂苷 D 的含量测定研究

芮海波¹ 赵学龙¹ 王文晓² 张国花²

(1 南京市中医院药剂科,南京,210001; 2 南京中医药大学,南京,210014)

摘要 目的:建立杏桔合剂中桔梗皂苷 D 的含量测定方法,为杏桔合剂的质量控制提供量化参考。方法:采用 HPLC 方法测定桔梗皂苷 D 的含量。结果:桔梗皂苷 D 在 0.5 ~ 8 μg 范围内线性关系良好,回归方程: $y = 238632x + 10382$, $r = 0.9997$,加样回收率 93.64%, $RSD = 1.54\%$ 。结论:应用 HPLC 测定杏桔合剂中桔梗皂苷 D 含量的方法可行,可以作为其质量控制的参考依据。

关键词 杏桔合剂;桔梗皂苷 D;含量;HPLC

HPLC Method for Determination of Platycodin D in Apricot Orange Mixture

Rui Haibo¹, Zhao Xuelong², Wang Wenxiao², Zhang Guohua²

(1 Chinese Hospital of Nanjing, Nanjing 210001, China; 2 Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210014, China)

Abstract Objective: To establish content determination method of platycodin D in apricot orange mixture so as to provide quantitative information for quality control of apricot orange mixture. **Methods:** HPLC was used to determine contents of platycodin D. **Results:** Platycodin D in the range 0.5 ~ 8 μg had good linear relationship, and the regression equation was: $y = 238632x + 10382$, $r = 0.9997$, recovery was 93.64%, $RSD = 1.54\%$. **Conclusion:** The method of HPLC to determine Platycodin D in apricot orange mixture is feasible, and it can be used as a reference for its quality control.

Key Words Apricot orange mixture; Platycodin D; Content; HPLC

中图分类号:R284.1;R-331 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.06.027

杏桔合剂为江苏省南京市中医院较早大量生产的浓缩剂之一,并收载于“南京市医院制剂规范”中。该方为南京市中医院所独有,经过历届医家临床使用和实践证明疗效确切。其处方由杏仁、陈皮、桔梗和甘草组成,功效为宣肺化痰。临床上广泛用于咳嗽、咽痛、咯痰不爽等。其中桔梗在宣肺化痰过程中起到很关键的作用,桔梗的主要活性成分为桔梗皂苷,桔梗皂苷 D 是桔梗皂苷中的主要皂苷。通过确定桔梗皂苷 D 的含量,为杏桔合剂质量标准的制定提供^[1-10]。

1 材料与方法

1.1 仪器 Waters 高效液相色谱仪(Waters 515 泵,Waters 2996 检测器,Waters 717 进样器);Hedera-ODS-3 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm);YP601N 型电子天平($d = 0.1 \text{ g}$);BP211D 型电子天平(精确度为十万分之一);HH-S 恒温水浴锅(江苏金坛国胜实验仪器厂);KH-500B 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司);Anke-TGL-16C 型离心机(上海安亭科学仪器厂);移液管;滴管;量筒;容量瓶等。

1.2 受试药物 桔梗皂苷 D 对照品(批号:111851-

201102,中国食品药品检定研究院);陈皮(批号 121216,产地江苏);甘草(批号 130226,产地内蒙古);苦杏仁(批号 121223,产地江苏);桔梗(批号 130301,产地江苏)。

1.3 试剂 磷酸(色谱纯,南京化学试剂厂);甲醇(色谱纯,江苏汉邦科技有限公司);乙腈(色谱纯,湖北杜克化学科技有限公司);无水乙醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);正丁醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);氯仿(分析纯,上海凌风化学试剂有限公司);水为重蒸馏水(自制)。

2 方法

2.1 色谱条件 流动相:甲醇-乙腈-0.2% 磷酸水溶液(3:25:72),检测波长:204 nm,柱温:25 $^{\circ}\text{C}$,流速:1 mL/min^[11-13]。

2.2 桔梗皂苷 D 对照品溶液的制备 精密称取桔梗皂苷 D 对照品 5.03 mg,置 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成每 1 mL 含桔梗皂苷 D 0.503 mg/mL 的对照品溶液^[11-13]。

2.3 供试品溶液的制备 按处方量的三分之一称取各药材,按照正交实验得出的最佳工艺提取 3 份,将提取液浓缩至 333 mL,分别加入适量的防腐剂苯

甲酸钠和对羟基苯甲酸乙酯,放置 4 h,抽滤。参照 2010 版《中华人民共和国药典》方法,取滤液 20 mL,用水饱和的正丁醇振摇提取 3 次,每次 20 mL,合并正丁醇液,用氨试液 50 mL 洗涤,弃去氨液,再用正丁醇饱和的水 50 mL 洗涤,弃去水液,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇 3 mL 使溶解,加硅胶 0.5 g 拌匀,置水浴上蒸干,加于硅胶柱[100~120 目,10 g,内径为 2 cm,用三氯甲烷-甲醇(9:1)混合溶液湿法装柱]上,以三氯甲烷-甲醇(9:1)混合溶液 50 mL 洗脱,弃去洗脱液,再用三氯甲烷-甲醇-水(60:20:3)混合溶液 100 mL 洗脱,弃去洗脱液,继用三氯甲烷-甲醇-水(60:29:6)混合溶液 100 mL 洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加甲醇溶解,转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,即得^[14-17]。

2.4 阴性样品溶液的制备 取方中缺桔梗的其他药材,按制剂工艺做成阴性样品,精密称取阴性样品 20 mL,按供试品溶液的方法制成阴性样品溶液。

2.5 线性范围的考察 取上述配制好的桔梗皂苷 D 对照品分别进样 1、2、4、8、16 L,以进样量(g)为横坐标,峰面积为纵坐标,求得线性方程为 $y = 238632x + 10382$, $R^2 = 0.9997$ 。因此桔梗皂苷 D 在 0.5~8 g 范围内线性关系良好^[18]。(见图 1)

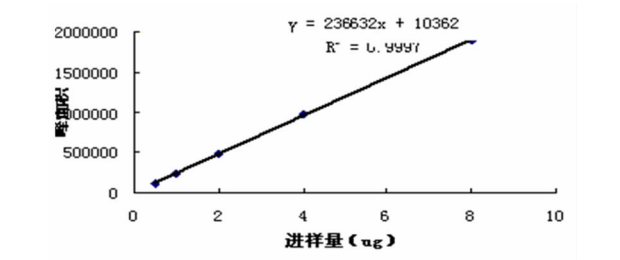


图 1 标准曲线图

2.6 专属性试验 精密吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液各 4 L,按上述色谱条件分别进行检测,色谱图如下。结果阴性样品溶液色谱中,在与对照品和样品中桔梗皂苷 D 相同的出峰位置无色谱峰,表明处方中其他成分对测定无干扰^[19]。(见图 2、3、4)

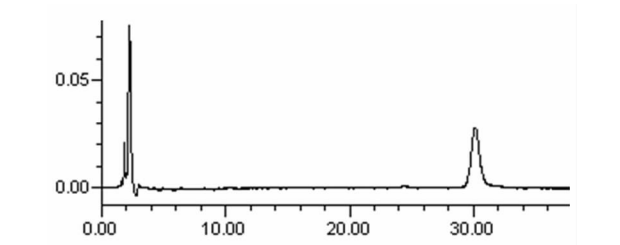


图 2 桔梗皂苷 D 对照品

2.7 精密度试验 取 2.2 项下桔梗皂苷 D 对照品溶液,在上述色谱条件下连续进样 6 次,每次 4 L,记

录峰面积,求得 RSD 为 0.88%^[20]。(见表 1)

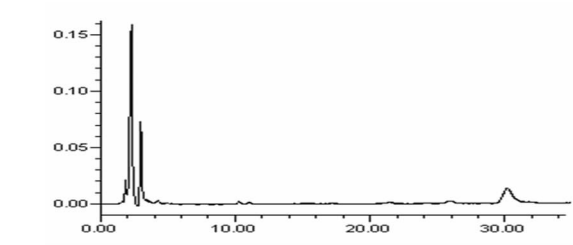


图 3 供试品溶液

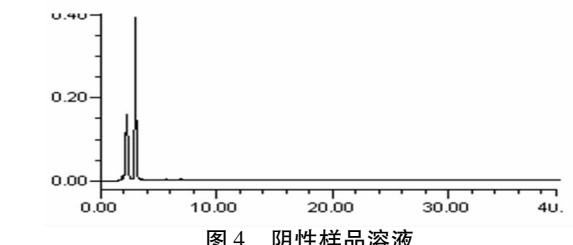


图 4 阴性样品溶液

表 1 精密度试验测定结果

序号	峰面积	<i>RSD</i> (%)
1	609061	0. 88
2	600887	
3	601317	
4	609573	
5	610338	
6	607584	

由上表可知,仪器和方法的精密度良好,符合测定要求。

2.8 重复性实验 从同一份供试品中量取 6 份,按 2.3 项下制备供试品溶液,按照色谱条件分别依法测定,每份重复测定两次,每次进样 10 L,记录峰面积,求得 RSD 为 1.85%^[21]。(见表 2)

表 2 重复性实验测定结果

序号	平均峰面积	苦杏仁苷的含量 (mg/mL)	苦杏仁苷平均含量 (mg/mL)	<i>RSD</i> (%)
cf-1	467738.5	6.281	6.232	1.852
cf-2	480479.5	6.439		
cf-3	461281.5	6.120		
cf-4	463299.0	6.225		
cf-5	462679.5	6.218		
cf-6	454223.0	6.111		

上述结果表明,苦杏仁苷在该测定条件下,重复性良好。

2.9 稳定性实验 取同一份供试品,按 2.3 项下制备供试品溶液,分别于 0、2、4、6、8、12 h 依法测定 6 次,进样 10 L,记录峰面积,求得 RSD 为 1.81%^[22]。(见表 3)

结果表明,供试品溶液中的苦杏仁苷在 12 h 内稳定,符合测定要求。

2.10 加样回收实验 精密量取 6 份已知桔梗皂苷 D 含量的样品溶液 10 mL,分别加入 1.263 mg/mL 的桔梗皂苷 D 对照品溶液 1 mL,按 2.3 项下制备供试品溶液,依法测定,重复两次,每次进样 10 L,记录桔梗皂苷 D 峰面积,计算得桔梗皂苷 D 回收率在 90% ~ 110% 之间 (n = 6),平均回收率为 93.64%,RSD 为 1.47%^[23-24]。(见表 4)

表 3 稳定性实验测定结果

时间间隔(h)	峰面积	RSD(%)
0	464121	1.81
2	458614	
4	469407	
6	460864	
8	445720	
12	466346	

表 4 加样回收实验测定结果

原液含量 (mg)	加标量 (mg)	测定总量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1.000	1.263	2.189	93.64	93.64	1.47
1.000	1.263	2.211	95.42		
1.000	1.263	2.204	94.89		
1.000	1.263	2.188	93.59		
1.000	1.263	2.232	97.08		
1.000	1.263	2.190	93.77		

2.11 含量测定 分别从提取的 3 批杏桔合剂中各取 2 份,共 6 份,按 2.3 项下制得供试品溶液,在 2.1 项下进行测定,每次进样 10 L,记录峰面积,带入回归方程计算样品中桔梗皂苷 D 的含量。(见表 5)

表 5 含量测定结果

试验编号	峰面积	含量(mg/mL)
A1	481784	0.0983
A2	506321	0.1036
B1	501109	0.1021
B2	494391	0.1006
C1	497586	0.1014
C2	490721	0.0998

3 结果

实验结果表明,本实验所采用的测定方法测定桔梗皂苷 D,重现性良好,回收率较高,且在该色谱条件下,桔梗皂苷 D 进样精密度良好,故该法结论可靠,可作为杏桔合剂中桔梗皂苷 D 含量测定的方法。

4 讨论

查阅大量文献,发现桔梗皂苷 D 的含量测定方法基本上全采用高效液相色谱法,且多为反相色谱法,因此选用其中分离效果较好的 HederasODS-3 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×200 mm,5 μm)。

对桔梗皂苷 D 的含量测定是在 190 ~ 400 nm 波长范围内进行扫描,结果显示桔梗皂苷 D 在 204 nm 波长处有最大吸收且灵敏度最高,故选定其检测波长为 204 nm。

本品的主要成分桔梗皂苷 D 的含量检测符合 2010 版《中华人民共和国药典》规定,通过确定其含量测定方法,增加了杏桔合剂质量标准中的量化指标,从而更好的保证合剂的质量可靠性。

参考文献

[1]《全国中草药汇编》编写组. 全国中药汇编(上)[M]. 北京:人民卫生出版社,1988:1865.

[2]丁东宁,谭延华,刘俊儒,等. 镇原苦杏仁化学成分的研究[J]. 西北药学杂志,1990,5(3):21-23.

[3]邢国秀,李楠,杨美燕,等. 天然苦杏仁等的研究进展[J]. 中成药,2003,12(12):1007-1009.

[4]杨春,卢健鸣,梁霞,等. 杏仁的营养价值与开发利用[J]. 山西食品工业,1999,2(2):23-32.

[5]付文卫,窦德强,裴月湖. 桔梗的化学成分和生物活性研究进展[J]. 沈阳药科大学学报,2006,23(3):184-191.

[6]吴文君,单提昆,何嘉凝,等. 桔梗皂苷化学结构及药理研究进展. 吉林医药学院学报,2012,33(3):176-177.

[7]孙远志,何树东. 桔梗对呼吸系统疾病临床应用概况[J]. 内蒙古中医药,2006,12(6):58-59.

[8]张岩,刘颖,陶韵文,等. 传统中药材桔梗的研究进展[J]. 黑龙江医药,2013,37(7):638-639.

[9]杨壮,田景奎,张琳. 比色法测定桔梗中桔梗总皂苷的含量[J]. 中国现代应用药学杂志,2008,25(1):58-60.

[10]郭文杰,许旭东,魏建和,等. 桔梗中三萜皂苷类化学研究进展[J]. 中国药学杂志,2008,43(11):801-803.

[11]Amagaya S,Sugishita E,Ogihara Y,et al. Comparative studies of the stereoisomers of glycyrrhetinic acid on anti inflammatory activities [J]. J Pharmacobiodyn,1984,7(12):923.

[12]Matsui S,Matsumoto H,Sonoda Y,et al. Glycyrrhizin and related compounds down-regulate production of inflammatory chemokines IL-8 and eotaxin 1 in a human lung fibroblast cell line[J]. Int Immunopharmacol,2004,4(13):1633.

[13]Zhang W,Lu C,Liu Z,et al. Therapeutic effect of combined triptolide and glycyrrhizin treatment on rats with collagen induced arthritis [J]. PlantaMed,2007,73(4):336.

[14]吴碧元,孙军,蒋红芳. 桔梗提取工艺的研究[J]. 中药材,2002,25(6):430-432.

[15]上海药物研究所. 中草药有效成分的提取和分离[M]. 上海:上海人民出版社,1972:284.

[16]郭丽,肖永庆,张村,等. 桔梗药材中桔梗皂苷 D 的定性定量方法研究[J]. 北京中医药大学学报,2007,30(3):200-204.

[17]潘鹏翔. 川杏合剂薄层色谱鉴别研究[J]. 亚太传统医药,2012,8(6):46-47.

[18]李洪燕,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):1479-1480.

林),过腰菜根、包袱根(山东),苦菜根(河北),鸡肉参(云南),绿花根(贵州),篮花根(湖南)掘菜根(河北张家口)^[17]。

12)《中药正别名集》(2006):【别名】:茅苳、符蒳、房图、利如、白药、梗草、苦梗、大药、包袱花、铃铛花、山铃铛花、甜桔梗、北桔梗、四叶菜、沙油菜、土人参、和尚头花根、道拉基。【商品名】桔梗、白桔梗、苦桔梗、南桔梗、玉桔梗、粉桔梗、秋桔梗、芽桔梗。【炮制品名】净桔梗、炒桔梗、炙桔梗、桔梗炭^[18]。

13)《中药辞海》(1996):【别名】道拉基(延边),苦菜根(河北),包袱根、铃当花(山东),大药、包袱花(江苏),苦桔梗、桔梗草(安徽),梗草(江西),甜桔梗(浙江),紫花丁(湖南)^[19]。

可以看出:桔梗别名多数文献记载为苦桔梗,只有《实用中药材新编》(2010)中习用名为甜桔梗;《中药辞海》(1996)记载甜桔梗为浙江地方用名,有待进一步考证其地方用药习惯。

综上所述,桔梗与甜桔梗不是一物,自古就有辨析,苦桔梗为真正的桔梗。甜桔梗实指同科沙参属茅苳,它们的原植物是同科不同属的植物,无论在气味、功效、药材性状、化学成分上均不同,因此,建议在《北京市中药饮片调剂规程》(2011 年版)桔梗项下处方常用名中去除甜桔梗,以免混淆。

参考文献

[1]北京市卫生局,北京市中医管理局.北京市中药饮片调剂规程[S].北京,2011.

[2]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,2010:259.

[3]金世元.中药材传统鉴别经验(2012)(精装版)[M].北京:中国

中医药出版社,2010:80.

[4]张明心.实用中药材新编[M].上海:第二军医大学出版社,2010:210-212.

[5]崔树德.中药大全[M].哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1997:722.

[6]国家药典委员会.中药材及原植物彩色图鉴(下册)[M].北京:人民卫生出版社,2010:884-885.

[7]南京中医药大学.中药大辞典[M].上海:上海科学技术出版社,2014:1874.

[8]屠鹏飞,徐国钧,徐珞珊,等.沙参和茅苳的本草考证[J].中国中药杂志,1991,16(4):201.

[9]冉先德.中华药海[M].北京:东方出版社,2010:1361.

[10]胡同瑜.实用中药品种鉴别[M].北京:人民军医出版社,2012:378.

[11]张利.茅苳、南沙参与苦桔梗的鉴别[J].中药通报,1985,10(2):16.

[12]国家中医药管理局.中华本草(7卷)[M].上海:上海科学技术出版社,1999:624-625.

[13]冉先德.冉氏释名本草[M].长沙:湖南科学技术出版社,2008:1326.

[14]肖培根.新编中药志[M].北京:化学工业出版社,2007:766.

[15]谢宗万,郝近大.常用中药名与别名手册[M].北京:人民卫生出版社,2008:323.

[16]谢宗万.中药材正名词典[M].北京:北京科学技术出版社,2004:83.

[17]程超寰.本草释名考订[M].北京:中国中医药出版社,2013:345.

[18]韩维恒.中药正别名集[M].长沙:湖南科学技术出版社,2006:146.

[19]中国药科大学.中药辞海(2卷)[M].北京:中国医药科学技术出版社,1996:1973.

(2014-10-31 收稿 责任编辑:洪志强)

(上接第 912 页)

[19]彭善贵,文永盛. HPLC-ELSD 法测定桔梗冬花片中桔梗皂苷 D 的含量[J].中国药师,2012,15(1):134-135.

[20]丁大勇,高菲,姚琳,等. HPLC-ELSD 法测定桑菊感冒片中桔梗皂 D 的含量[J].中国中医药信息杂志,2012,19(3):54-55.

[21]李喜凤,杜云锋,谢新年,等.不同产地桔梗药材 HPLC 指纹图谱及桔梗皂苷 D 含量测定研究[J].中成药,2010,32(4):529-530.

[22]曲建启,潘西芬,李以菊.高效液相法测定婴儿止咳合剂中桔梗皂苷 D 的含量[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(23):130-131.

[23]笔雪艳,刘晓凤,张清波,等.桔梗药材及饮片的质量标准研究[J].中医药信息,2011,28(6):69-70.

[24]李俏阳.用 HPLC 法测定桔梗流浸膏中桔梗皂苷 D 含量的效果分析[J].求医问药,2013,11(8):268-269.

(2014-06-16 收稿 责任编辑:张文婷)