

中药研究

基于 HPLC 特征峰比值对射干及其伪品的质量控制研究

李 彬¹ 周国儿² 郑国平^{1*} 张红萍¹

1 舟山市食品药品检验检测研究院 浙江 舟山 316021

2 舟山市中医院 浙江 舟山 316000

摘要 目的:建立同时测定射干中射干苷和次野鸢尾黄素含量的方法,并研究射干及其伪品川射干、白射干 HPLC 图谱中射干苷与次野鸢尾黄素峰面积的比值,建立合理的比值范围。方法:采用高效液相色谱法,Ultimate XB-C18 柱(250mm×4.6mm,5 μm),流动相为乙腈-0.4%冰醋酸,梯度洗脱,检测波长为 266nm。结果:15 批射干样品中次野鸢尾黄素与射干苷峰面积比值范围在 0.26~0.65 之间,射干混伪品次野鸢尾黄素与射干苷峰面积比值范围在 0~0.06 之间,设定当该比值为 0.20 以上时能实现射干和混伪品区分,并且对射干中掺入一定量的混伪品也能很好区分。结论:该方法准确可靠、简便快速,重现性好,能很好控制射干质量。

关键词 射干 特征峰比值 HPLC 次野鸢尾黄素 射干苷

DOI:10.13633/j.cnki.zjtcn.2023.12.009

射干为鸢尾科植物射干 *Belamcanda chinensis* (L.) DC. 的干燥根茎,具有清热解毒,消痰利咽的功效,可用于治疗热毒痰火郁结,咽喉肿痛,痰涎壅盛,咳嗽气喘^[1,2]。目前文献报道^[3]射干的主要伪品有川射干,即同科植物鸢尾 *Iris tectorum* Maxim. 的根茎,《中国药典》2020 年版作为川射干收载;白射干,即同科植物白射干 *Iris dichotoma* Pall. 的根茎。本实验参考现有文献^[4-9]采用高效液相色谱法(HPLC)建立同时测定射干中射干苷和次野鸢尾黄素含量的方法,并基于射干、川射干和白射干 HPLC 图谱中的特征峰,研究次野鸢尾黄素与射干苷峰面积的比值,设定合理的比值范围,为快速、准确鉴别射干与其混伪品提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器:Agilent 1200 高效液相色谱系统(G1311A 四元泵、G1329A 自动进样器、VWD 检测器 Chemstation 化学工作站);USC-702 超声波清洗器;日本岛津 UV-2700 分光光度计;万分之一电子天平[Quintix224-1cn,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。

1.2 试药:射干苷对照品(批号:111632-200602)、芒果苷对照品(批号:111607-201704)、次野鸢尾黄素对照品(批号:111557-202104)均购于中国食品药品检定研究院;射干苷元对照品(批号:94750010)购于上海安普实验科技股份有限公司。乙腈为色谱纯,冰醋酸为分析纯,

水为重蒸水。15 批射干样品为浙江省药品风险考核评价抽样部分样品,经浙江省食品药品检验研究院郭增喜主任中药师鉴定均为鸢尾科射干属植物射干 *Belamcanda chinensis* (L.) DC. 的干燥根茎;川射干、白射干购于亳州药材市场,经鉴定为川射干和白射干。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备:分述如下。

2.1.1 混合对照品贮备溶液的制备:精密称取芒果苷、射干苷、次野鸢尾黄素、射干苷元对照品适量,置于同一 50mL 量瓶中,加甲醇至刻度,制成浓度分别为 337.5、358.6、179.8、198.1 μg/mL 的混合对照品贮备溶液。

2.1.2 混合对照品溶液的制备:精密量取混合对照品贮备液 5.0mL,置 100mL 量瓶中,加甲醇至刻度,制成浓度分别为 16.875、17.93、8.99、9.905 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备:取射干及其伪品川射干、白射干粉末(过三号筛)0.2g,精密称定。置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25mL,称定重量,超声提取(250W,50kHz)30min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

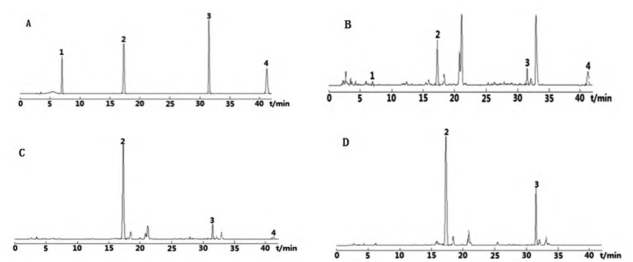
2.2 色谱条件:色谱柱:Ultimate XB-C18 柱(250mm×4.6mm,5 μm);流动相:以乙腈为流动相 A,0.4%冰醋酸为流动相 B,按表 1 进行梯度洗脱;检测波长:266nm;流速:1.0mL/min;柱温:28℃;进样量:10 μL。在上述色谱条件下芒果苷、射干苷、射干苷元、次野鸢尾黄素与相邻色谱峰的分度度均符合要求,理论板数按次野鸢尾黄素

* 通讯作者:郑国平,E-mail:zgp0580@126.com

峰计算不低于 8000。色谱图如图 1 所示。

表 1 色谱条件

时间(分钟)	流动相A(%)	流动相B(%)
0~10	20	80
10~20	20→25	80→75
20~25	25→40	75→60
40~45	40	60



注:A混合对照品;B射干样品;C川射干样品;D白射干样品。1芒果苷;2射干苷;3射干昔元;4次野鸢尾黄素。

图 1 HPLC 色谱图

2.3 线性关系考察:精密量取混合对照品溶液 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、10.0mL,分别置 10mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀。按上述色谱条件测定峰面积,以对照品浓度为横坐标(X)、峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,射干昔回归方程为: $Y=20.203X+10.602(r=0.9999)$,线性范围为:0.1793~3.586 μg ;次野鸢尾黄素回归方程为: $Y=13.931X-19.585(r=1.000)$,线性范围为:0.0899~1.798 μg 。

2.4 精密度试验:精密吸取供试液 10 μL ,进样 6 次,按上述色谱条件测定,同时记录射干昔与次野鸢尾黄素的平均峰面积,RSD 值分别为 0.6%和 0.8%($n=6$)。

2.5 稳定性试验:取“2.1.2”项下的对照品溶液,按上述色谱条件,在 24h 内每隔一定时间,精密量取样品供试品溶液 10 μL ,注入高效液相色谱仪,测定射干昔、次野鸢尾黄素的峰面积,结果,RSD 值分别为 0.74%、0.66%,表明供试品溶液在 24h 内稳定性良好。

2.6 重复性试验:精密称取同一批样品粉末 6 份,按“2.1.3”项下的方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下进行分析测定,计算样品中射干昔平均含量为 2.46%,RSD 值为 1.2%;计算样品中次野鸢尾黄素平均含量为 0.18%,RSD 值为 1.0%。表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验:精密称定已知射干昔含量(2.46%)、次野鸢尾黄素含量(0.18%)的同一批样品 6 份,每份约 0.20g,分别精密加入浓度 358.6 $\mu\text{g/mL}$ 射干昔、浓度 179.8 $\mu\text{g/mL}$ 次野鸢尾黄素混合对照品贮备溶液 5mL,按“2.1.3”项下方法制备,在上述色谱条件下进行分析测定,结果显示射干昔平均回收率为 98.77%,

RSD 值为 2.73%;次野鸢尾黄素平均回收率为 95.98%,RSD 值为 2.39%。结果见表 2。

表 2 样品射干昔、次野鸢尾黄素回收率试验结果($n=6$)

测定成分	称样量(g)	样品中含量(mg)	对照品加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
射干昔	0.1988	4.89	1.793	6.583	94.40	96.50	1.40
	0.1996	4.91	1.793	6.622	95.50		
	0.2004	4.93	1.793	6.674	97.30		
	0.2010	4.94	1.793	6.670	96.50		
	0.1998	4.92	1.793	6.672	97.70		
	0.2006	4.93	1.793	6.678	97.50		
次野鸢尾黄素	0.1988	0.358	0.899	1.242	98.30	97.20	0.80
	0.1996	0.359	0.899	1.238	97.80		
	0.2004	0.361	0.899	1.234	97.10		
	0.2010	0.362	0.899	1.235	97.10		
	0.1998	0.360	0.899	1.228	96.60		
	0.2006	0.361	0.899	1.226	96.20		

2.8 样品含量测定:分述如下。

2.8.1 射干样品测定:15 批射干样品,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,用“2.2”项下色谱条件进行测定,以外标法计算射干昔和次野鸢尾黄素的含量。15 批样品射干昔和次野鸢尾黄素的含量测定及次野鸢尾黄素与射干昔峰面积比值结果见表 3,HPLC 图谱见图 1。

表 3 15 批样品中射干昔和次野鸢尾黄素含量测定结果

样品名称	编号	称样量(g)	射干昔含量(%)	平均含量(%)	次野鸢尾黄素含量(%)	平均含量(%)	次野鸢尾黄素与射干昔面积比值
射干	1	0.1990	2.46	2.78	0.182	0.194	0.374
	2	0.1986	2.90		0.208		0.649
	3	0.2005	2.28		0.177		0.261
	4	0.2012	2.50		0.199		0.436
	5	0.2002	2.66		0.204		0.344
	6	0.1995	3.14		0.217		0.283
	7	0.1988	3.02		0.193		0.440
	8	0.2005	2.58		0.175		0.350
	9	0.2012	2.96		0.210		0.288
	10	0.1982	2.88		0.185		0.301
	11	0.1994	3.06		0.208		0.382
	12	0.2008	2.77		0.184		0.554
	13	0.2004	3.10		0.222		0.652
	14	0.1995	3.08		0.205		0.525
	15	0.1989	2.31		0.144		0.386

2.8.2 射干伪品的测定:取收集到的川射干和白射干

样品各 3 批,按“2.1.2”项下方法分别制备供试品溶液,用“2.2”项色谱条件下进行测定,两种伪品次野鸢尾黄素和射干苷的含量及两者的峰面积比值分别见表 4、表 5,HPLC 图谱见图 1。

表 4 川射干中射干苷和次野鸢尾黄素含量测定结果

样品名称	编号	称样量(g)	射干苷含量(%)	平均含量(%)	次野鸢尾黄素含量(%)	平均含量(%)	次野鸢尾黄素与射干苷面积比值
川射干	1	0.2064	4.28		0.068		0.034
	2	0.2012	4.76	4.37	0.065	0.052	0.055
	3	0.1996	4.06		0.022		0.028

表 5 白射干中射干苷和次野鸢尾黄素含量测定结果

样品名称	编号	称样量(g)	射干苷含量(%)	平均含量(%)	次野鸢尾黄素含量(%)	平均含量(%)	次野鸢尾黄素与射干苷面积比值
白射干	1	0.2002	3.66		0		0
	2	0.2018	3.24	3.57	0	0	0
	3	0.2008	3.80		0		0

3 结果与讨论

3.1 射干及其混伪品射干苷和次野鸢尾黄素测定:射干、川射干和白射干同为鸢尾科的植物,在成分上较为相似,射干为《中国药典》2020 年版一部收录的品种,现行标准仅以次野鸢尾黄素作为定量控制指标。本研究采用 HPLC 法建立射干苷和次野鸢尾黄素含量测定方法,可同时测定射干及其混伪品中两种成分的含量。测定结果显示,射干苷和次野鸢尾黄素在不同品种之间的含量存在明显区别。射干中的射干苷含量要低于川射干和白射干,而射干中的次野鸢尾黄素含量明显高于川射干,白射干未检出次野鸢尾黄素。建立的含量测定方法可为更好地控制射干药材质量提供依据。

3.2 样品中次野鸢尾黄素与射干苷峰面积比值研究:通过射干、川射干和白射干中次野鸢尾黄素与射干苷的测定发现,次野鸢尾黄素与射干苷的峰面积比值对区分射干及其伪品有较大意义。15 批射干中次野鸢尾黄素与射干苷峰面积比值在 0.26~0.65 之间;川射干和白射干中该比值在 0.034~0.060 之间。通过该比值的测定能有效区分射干与其混伪品。此外,本实验还研究了射干样品中混入一定量的川射干后该比值的变化。实验用射干与川射干 1:1;1:2;1:5 混合,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,用“2.2”项下色谱条件下进行测定。结果次野鸢尾黄素与射干苷峰面积比值分别 0.21,0.18,0.09。因此,设定该比值为 0.20 时能较好控制人

为在射干样品中掺入川射干,建议在射干质量标准中增加次野鸢尾黄素与射干苷峰面积比值项。

3.3 供试品溶液的制备:根据待测组分化学性质,本研究采用乙醇、70%乙醇、甲醇、70%甲醇等不同提取溶媒对射干进行提取,结果甲醇提取所制备的供试品溶液干扰成分少,各主成分峰分离较理想,且被测各成分含量最高;随后对超声提取和加热回流提取进行比较,结果显示超声提取和加热回流提取被测定成分的含量基本一致,而且超声提取的供试液色谱图杂质干扰小;此外,对超声提取时间考察结果表明,超声提取 30min 即可提取完全。因此,选择甲醇超声提取 30min 作为供试品溶液制备方法。

3.4 流动相选择:射干样品中成分较多,且结构与极性较接近。现行标准射干含量测定的流动相为甲醇-0.2%磷酸溶液(53:47),此条件下样品中射干苷与其他成分不能很好分离,且射干苷的峰形较差。本实验考查了水-乙腈、磷酸水溶液-乙腈、冰醋酸溶液-乙腈不同配比,发现冰醋酸溶液-乙腈的分离效果及峰形较好。随后考查了不同浓度的冰醋酸溶液、流速和柱温对分离效果的影响,最终确定色谱条件:流动相为 0.4%冰醋酸溶液-乙腈梯度洗脱,流速为 1.0mL/min,柱温为 28℃。

4 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:297.
- [2] 许丽洁. 射干麻黄汤加减联合西药治疗小儿哮喘 40 例[J]. 浙江中医杂志,2017,52(1):59.
- [3] 张水龙,叶基荣. 射干及其几种常见伪品的鉴别[J]. 海峡药学,2003,15(3):45-47.
- [4] 尹程程,赵大庆,杨重晖,等. 射干水溶性成分的含量测定与化学模式识别研究[J]. 时珍国医国药,2021,32(1):47-52.
- [5] 姜鸿,王光函,辛旭阳,等. UPLC 法测定射干药材中 10 个异黄酮类成分的含量[J]. 中国药房,2019,30(23):3216-3220.
- [6] 陈帅,袁崇均,罗森,等. 超高效液相色谱法同时测定川射干中 7 个异黄酮成分的含量[J]. 天然产物研究与开发,2018,30(2):256-260,217.
- [7] 尤献民,邹桂欣,邸子真,等. RP-HPLC 同时测定射干 9 种活性成分含量[J]. 中国中医药信息杂志,2017,24(1):82-86.
- [8] 张婧涵,张晓瑞,李国信,等. 线性回归色谱峰定位法在射干中药材多组分同时测定中的应用[J]. 药物分析杂志,2014,34(7):1149-1154.
- [9] 王柳卜,贾宪生,胡成刚,等. RP-HPLC 法测定射干中射干苷及次野鸢尾黄素的含量[J]. 中国民族医药杂志,2012,7(7):44-45.

收稿日期 2023-05-03