

· 中药工业 ·

基于差向异构体分离的桃仁配方颗粒中 苦杏仁苷含量测定[△]

霍文杰, 丁青, 刘晓霞, 孙冬梅*, 黄敏烨, 王利伟

广东一方制药有限公司, 广东 佛山 528244

[摘要] 目的: 采用超高效液相色谱串联二极管阵列检测器法(UPLC-DAD)对桃仁配方颗粒中苦杏仁苷的 2 种差向异构体(*D* 型与 *L* 型)分离后进行测定。方法: 以 Waters ACQUITY UPLC HSS T3(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)为色谱柱, 以乙腈为流动相 A, 以 0.1% 磷酸溶液为流动相 B, 梯度洗脱, 流速为 0.4 mL·min⁻¹; 检测波长为 210 nm; 进样体积为 1 μL; 柱温为 20 ℃。结果: *D*-苦杏仁苷与 *L*-苦杏仁苷能有效分离, *D*-苦杏仁苷在质量浓度为 4.08 ~ 407.92 μg·mL⁻¹, 线性回归方程为 $Y=0.0378X-0.0123$, $r=0.9998$; 准确度为 96.09% ~ 104.51%。结论: 本方法能准确测定桃仁配方颗粒中 *D*-苦杏仁苷的含量。

[关键词] 桃仁配方颗粒; 异构体; *D*-苦杏仁苷; 含量测定

[中图分类号] R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2020)07-2090-04

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20191105002

Determination of Amygdalin in Taoren Formula Granules Based on Differential Isomer Separation

HUO Wen-jie, DING Qing, LIU Xiao-xia, SUN Dong-mei*, HUANG Min-ye, WANG Li-wei

Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd., Foshan 528244, China

[Abstract] **Objective:** To determine two epimers (*D* and *L*) of amygdalin in Taoren formula granules by UPLC-DAD. **Methods:** Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) was used as chromatographic column, acetonitrile as mobile phase A, 0.1% phosphoric acid solution as mobile phase B, gradient elution, flow rate was 0.4 mL·min⁻¹, detection wavelength was 210 nm, injection volume was 1 μL, column temperature was 20 ℃. **Results:** *D*-amygdalin and *L*-amygdalin could be separated effectively. The linear regression equation was $Y=0.0378X-0.0123$, $r=0.9998$, in the range of concentration of amygdalin from 4.08-407.92 μg·mL⁻¹, and the accuracy was 96.09%-104.51%. **Conclusion:** The method can accurately determine the content of *D*-amygdalin in Taoren formula granules.

[Keywords] Taoren formula granules; isomer; *D*-amygdalin; determination of content

桃仁味苦, 性甘、平, 具有活血祛瘀、润肠通便、止咳平喘等功效, 临床上用于治疗经闭痛经、癥瘕痞块、肺癰肠痈、跌扑损伤、肠燥便秘、咳嗽气喘等症^[1]。桃仁中主要有效成分为脂肪油与苦杏仁苷, 其中苦杏仁苷具有抗动脉粥样硬化、抗溃疡和止咳平喘等药理作用。桃仁配方颗粒是蔷薇科植物山桃 *Prunus davidiana* (Carr.) Franch. 或桃 *P. persica* (L.) Batsch 的干燥成熟种子经炮制并按标准汤剂的主要质量指标, 经现代工艺提取、浓缩、干燥等工序制成的配方颗粒。

《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)2015 年版桃仁中已收载采用 HPLC 测定桃仁药材中苦杏仁苷含量;《广东省中药配方颗粒标准(第一册)》桃仁配方颗粒项下也收载了苦杏仁苷含量测定方法, 两者苦杏仁苷含量测定方法一致。此分析方法中所分离的苦杏仁苷色谱峰实际包含了 *D*-苦杏仁苷与 *L*-苦杏仁苷, 当采用不同的色谱柱进行分析时, 苦杏仁苷色谱峰会产生双峰现象, 根据相关文献报道^[2-3], 在高温煎煮条件下, 苦杏仁苷易产生异构化, 具体表现为 *D*-苦杏仁苷随着水温的上升异

[△] [基金项目] 广东省科技计划项目(2018B030323004); 2017 佛山市重大科技项目(2016AG100912)

* [通信作者] 孙冬梅, 主任中药师, 研究方向: 中药新药研究及中药质量评价; E-mail: 1083289014@qq.com

构化产生 *L*-苦杏仁苷。自然界中不存在 *L*-苦杏仁苷,但是在中药汤剂、中药配方颗粒中均存在 *L*-苦杏仁苷。不同手性化合物,药物活性、毒性差异较大。根据文献报道^[4], *L*-苦杏仁苷没有抗肿瘤作用,因此有必要对这2种手性化合物进行分开测定,以明确桃仁配方颗粒物质基础。本研究测定桃仁配方颗粒中 *D*-苦杏仁苷含量更具有针对性,进一步完善桃仁配方颗粒的质量控制。

1 材料

1.1 仪器

Vanquish 型超高效液相色谱仪(赛默飞世尔科技有限公司); Waters ACQUITY UPLC HSS T3 型色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm); ME204E 型万分之一天平、XP26 型百万分之一天平(梅特勒-托利多公司); Milli-Q Direct 型超纯水系统(默克股份有限公司)。

1.2 试药

D-苦杏仁苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110820-201607,纯度:90.7%);乙腈、甲醇(默克股份有限公司,色谱纯);磷酸(天津市科密欧化学试剂有限公司,色谱纯);其余试剂均为分析纯;水为实验室超纯水系统(默克股份有限公司,Milli-Q Direct)。

10批桃仁配方颗粒(广东一方制药有限公司,批号:TRKL01~TRKL10)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

以 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) 为色谱柱,以乙腈为流动相 A,以 0.1% 磷酸溶液为流动相 B,梯度洗脱(0~6 min, 5%~10% A, 6~11 min, 10%~18% A, 11~20 min, 18%~40% A);流速为 0.4 mL·min⁻¹;检测波长为 210 nm;进样体积为 1 μL;柱温为 20 ℃。

2.2 对照品溶液

精密称取 *D*-苦杏仁苷对照品 2.644 mg,置 20 mL 量瓶中,加 70% 甲醇制成 119.91 μg·mL⁻¹ 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备

分别对桃仁配方颗粒含量测定方法的提取溶剂、

提取方式及提取时间进行考察,确定含量测定供试品制备方法。

2.3.1 提取溶剂考察 取桃仁配方颗粒适量,研细,取约 0.1 g,精密称定,平行 7 组,每组 2 份,置具塞锥形瓶中,分别精密加入水、甲醇、70% 甲醇、50% 甲醇、乙醇、70% 乙醇、80% 乙醇 50 mL,称定质量,超声处理(功率:250 W,频率:40 kHz) 30 min,放冷,再称定质量,分别用水、甲醇、70% 甲醇、50% 甲醇、乙醇、70% 乙醇、80% 乙醇补足减失质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。结果表明,上述 7 种提取溶剂测得的苦杏仁苷质量分数分别为 73.9、75.8、75.5、75.6、72.5、75.5、75.0 mg·g⁻¹,70% 乙醇、50% 甲醇、70% 甲醇、甲醇提取效率相当,考虑《中国药典》2015 年版一部桃仁药材含量测定提取溶剂为 70% 甲醇,因此确定桃仁配方颗粒苦杏仁苷含量测定提取溶剂为 70% 甲醇。

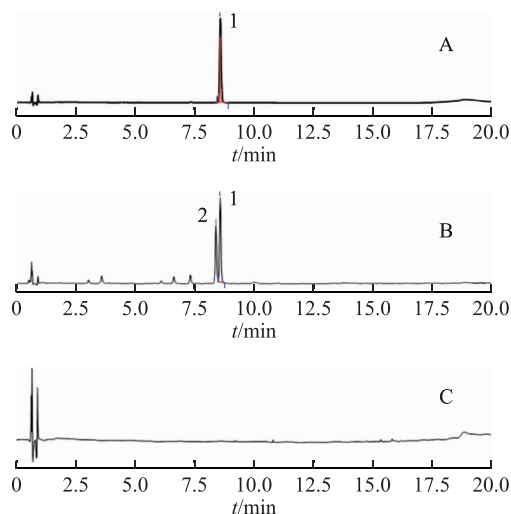
2.3.2 提取方式考察 取桃仁配方颗粒适量,研细,取约 0.1 g,精密称定,平行 2 组,每组 2 份,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 50 mL,称定质量,分别超声处理(功率:250 W,频率:40 kHz) 30 min,加热回流 30 min,放冷,再称定质量,用 70% 甲醇补足减失质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。结果表明,2 种提取方式测得的苦杏仁苷质量分数分别为 74.6、70.8 mg·g⁻¹,超声提取比回流提取效率略高,因此桃仁配方颗粒苦杏仁苷含量测定采用超声提取方式。

2.3.3 提取时间考察 取桃仁配方颗粒适量,研细,取约 0.1 g,精密称定,平行 3 组,每组 2 份,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 50 mL,称定质量,分别超声处理(功率:250 W,频率:40 kHz) 15、30、45 min,放冷,再称定质量,用 70% 甲醇补足减失质量,摇匀,滤过,取续滤液。实验结果显示,3 种提取时间测得的苦杏仁苷质量分数分别为 74.9、74.9、74.8 mg·g⁻¹,可发现超声时间对苦杏仁苷含量影响较小,为了确保充分提取,选取超声时间为 30 min。

2.3.4 供试品溶液制备 取桃仁配方颗粒适量,研细,取约 0.1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 50 mL,称定质量,超声处理(功率:250 W,频率:40 kHz) 30 min,放冷,再称定质量,用 70% 甲醇补足减失质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 方法学验证

2.4.1 专属性考察 精密吸取桃仁配方颗粒供试品溶液、*D*-苦杏仁苷对照品溶液与空白溶剂各 1 μL , 注入液相色谱仪, 进样测定, 结果见图 1。结果表明, 空白溶剂色谱中在与苦杏仁苷相应的保留时间没有色谱峰, 表明提取溶剂对苦杏仁苷的测定无干扰, 专属性良好。



注: A. *D*-苦杏仁苷对照品溶液; B. 供试品溶液; C. 空白溶剂;
1. *D*-苦杏仁苷; 2. *L*-苦杏仁苷。

图1 对照品、供试品、空白溶剂色谱图

2.4.2 峰纯度考察 精密吸取桃仁配方颗粒项下供试品溶液、*D*-苦杏仁苷对照品溶液各 1 μL , 注入液相色谱仪, 按照 2.1 项下色谱条件以二极管阵列检测器(PDA)在 190~400 nm 进行扫描检测, 计算峰纯度。结果表明, 供试品溶液中苦杏仁苷未检测到杂质峰, 峰纯度匹配值为 999, 说明在该色谱条件下, 苦杏仁苷峰纯度符合要求。并且样品中苦杏仁苷色谱峰光谱指数与 *D*-苦杏仁苷对照品光谱指数吸收曲线一致, 在 210 nm 处有最大吸收, 表明该方法能准确检测 *D*-苦杏仁苷色谱峰, 无干扰。

2.4.3 线性关系考察 精密称取 *D*-苦杏仁苷对照品 8.995 mg, 置 20 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇溶解, 并稀释至刻度, 制成 407.92 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

精密吸取对照品溶液 4、3、3、2、1 mL, 分别置 5、5、10、25、100 mL 的量瓶中, 加 70% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得, 制成 *D*-苦杏仁苷质量浓度分别为 326.34、244.75、122.38、32.63、4.08 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。分别精密吸取上述 6 个不同质量浓度的对照品溶液 1 μL 进样, 记录色谱峰面积。以峰面积

为纵坐标(*Y*), 对照品质量浓度为横坐标(*X*), 苦杏仁苷的回归方程为 $Y=0.0378X-0.0123$, $r=0.9998$, 表明苦杏仁苷在质量浓度为 4.08~407.92 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 进样浓度与峰面积线性关系良好。

2.4.4 精密度试验 精密吸取 2.2 项下 *D*-苦杏仁苷对照品溶液, 按照 2.1 项下色谱条件重复进样 6 次, 进样体积为 1 μL 。计算峰面积 RSD。结果表明, 6 次连续进样峰面积 RSD 为 0.16%, 表明仪器精密度良好。

2.4.5 重复性试验 取同一批次桃仁配方颗粒适量, 按 2.3.4 项下供试品制备方法制备 6 份供试品溶液, 进样测定含量。结果表明, 6 份供试品中苦杏仁苷的平均质量分数为 73.64 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 为 0.57%, 表明该方法重复性良好。

2.4.6 加样回收率试验 对照品储备液的制备: 取 *D*-苦杏仁苷对照品适量, 精密称定, 加 70% 甲醇制成 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。

分别按对照品加入量与待测成分含量之比分别为 1.5:1、1:1、0.5:1 设计高、中、低 3 组实验, 每组平行 3 份。取具塞锥形瓶 3 组, 每组平行 3 份, 分别精密加入 *D*-苦杏仁苷对照品储备液 1.8、3.7、5.5 mL, 置具塞锥形瓶中, 置氮吹仪下挥干溶剂, 再分别称取桃仁配方颗粒 0.05 g, 精密称定, 按苦杏仁苷含量测定方法制备 9 份供试品溶液, 进样测定, 根据重复性考察结果中苦杏仁苷质量分数为 73.64 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 计算准确度, 见表 1。结果表明, 桃仁配方颗粒中苦杏仁苷含量测定分析方法回收率为 96.09%~104.51%, 符合《中国药典》2015 年版 9101 药品质量标准分析方法验证指导原则要求。

表1 桃仁配方颗粒苦杏仁苷加样回收率试验($n=9$)

称样量/ mg	已知量/ mg	对照品加 入量/mg	测得量/ mg	回收率/ %	RSD/ %
0.050 35	3.708	1.820	5.610	104.51	3.39
0.050 20	3.697	1.820	5.592	104.13	
0.050 34	3.707	1.820	5.589	103.37	
0.050 67	3.732	3.741	7.553	102.15	
0.050 20	3.697	3.741	7.510	101.92	
0.050 03	3.684	3.741	7.500	101.98	
0.050 29	3.704	5.506	8.994	96.09	
0.049 99	3.681	5.506	8.996	96.52	
0.050 03	3.684	5.506	9.008	96.68	

2.5 样品测定

对 10 批桃仁配方颗粒按 2.1 ~ 2.3 项下规定, 进行样品测定, 苦杏仁苷含量测定结果见表 2。

表 2 10 批桃仁配方颗粒中苦杏仁苷含量

mg·g ⁻¹		
序号	批号	苦杏仁苷质量分数
1	TRKL01	73.34
2	TRKL02	72.50
3	TRKL03	80.24
4	TRKL04	74.38
5	TRKL05	61.38
6	TRKL06	69.30
7	TRKL07	70.63
8	TRKL08	131.76
9	TRKL09	87.31
10	TRKL10	94.65

3 讨论

3.1 苦杏仁苷差向异构体的分离优化

在现有文献报道中桃仁配方颗粒苦杏仁苷含量测定方法多采用 HPLC, 以甲醇-水为洗脱系统, 该条件无法将苦杏仁苷中 2 种同分异构体进行分离^[4]。根据文献报道, 苦杏仁苷在酸性条件下不易产生差向异构, *D*-苦杏仁苷难以转化成 *L*-苦杏仁苷, 而在碱性条件下, *D*-苦杏仁苷稳定性差, 容易产生差向异构, 产生自然界不存在的 *L*-苦杏仁苷^[5,6]; 参考文献 [6] 中报道, 单独的 *D*-苦杏仁苷以水为溶剂加热回流时并不会产生 *L*-苦杏仁苷, 由此可见 *L*-苦杏仁苷是桃仁中 *D*-苦杏仁苷在高温水环境下, 桃仁中物质相互作用的结果。

本研究中发现, 桃仁配方颗粒中苦杏仁苷 2 种同分异构体在柱温为 20 ℃ 时可以达到较好的分离。

并对比乙腈-0.1% 磷酸溶液与乙腈-0.5% 冰乙酸溶液 2 种流动相系统对苦杏仁苷 2 种同分异构体的分离效果, 结果表明, 以乙腈-0.1% 磷酸溶液为流动相系统时, 苦杏仁苷 2 种差向异构体能够进行有效分离。

3.2 讨论

在本研究中同时采用超高效液相色谱串联二极管阵列检测器法 (UPLC-DAD) 对桃仁药材中苦杏仁苷含量进行测定。结果表明, 桃仁药材液相色谱中含有 *L*-苦杏仁苷色谱峰, 但是该成分含量较低, 按《中国药典》2015 年版桃仁项下苦杏仁苷含量测定方法测定时, 测量误差较小。但在桃仁配方颗粒中, *L*-苦杏仁苷与 *D*-苦杏仁苷峰面积约为 1:1, 表明 *L*-苦杏仁苷在桃仁配方颗粒中大量存在, 若采用原料药材的含量测定方法则测定误差较大。并且 *L*-苦杏仁苷的临床药理药效的研究尚未明确, 因此 2 种差向异构体合并测定确有不合理之处。该方法测定桃仁配方颗粒中 *D*-苦杏仁苷含量具有针对性, 可更好地控制桃仁配方颗粒质量。

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, 2015: 277.
- [2] 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.
- [3] 汤庆发, 谢颖, 陈飞龙, 等. 苦杏仁中苦杏仁苷的存在形式及其影响因素 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(8): 107-109.
- [4] 韦志英, 杨志丽, 陆海琳, 等. HPLC 法测定桃仁配方颗粒中苦杏仁苷的含量 [J]. 广西中医学院学报, 2010, 13(4): 49-50.
- [5] 宋帅, 汤庆发, 谢颖, 等. 杏仁不同配伍条件下苦杏仁苷形态和定量分析 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2015, 17(1): 142-145.
- [6] 吴军, 屠鹏飞, 赵玉英. 补阳还五汤中苦杏仁苷的存在形式及其产生机制 [J]. 中草药, 2002, 33(2): 7-10.

(收稿日期: 2019-11-05 编辑: 王笑辉)