

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.01.019

反相高效液相色谱法同时测定夜宁糖浆中 3 种活性成分含量

朱晓俊, 卞艳芳[△], 陈磊, 乐佳敏, 胡冬梅

(中国人民解放军海军军医大学第一附属医院·上海长海医院, 上海 200438)

摘要:目的 建立同时测定夜宁糖浆中甘草苷、特女贞苷和甘草酸 3 种活性成分含量的反相高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.1% 磷酸溶液-乙腈(梯度洗脱), 检测波长为 229 nm, 进样量为 20 μL, 柱温为 28 ℃, 定量检测采用标准曲线法。结果 甘草苷、特女贞苷和甘草酸的质量浓度在 1.0~50.0 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好, 平均加样回收率分别为 99.37%, 98.93%, 99.67%, RSD 分别为 0.70%, 1.40%, 2.54% (n=6); 精密度和重复性均良好 (n=6), 供试品溶液在 24 h 内稳定。结论 该方法简便、准确、快速, 可用于夜宁糖浆中成药的质量控制。

关键词:反相高效液相色谱法; 夜宁糖浆; 活性成分; 甘草苷; 特女贞; 甘草酸; 含量

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)01-0062-03

RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Three Active Ingredients in Yening Syrup

ZHU Xiaojun, BIAN Yanfang, CHEN Lei, LE Jiamin, HU Dongmei

(The First Affiliated Hospital of Navy Medical University · Shanghai Changhai Hospital, Shanghai, China 200438)

Abstract: Objective To establish an RP-HPLC method for the simultaneous determination of three active ingredients of liquiritin, nuezhenide and glycyrrhizic acid in Yening Syrup. **Methods** The chromatographic column was Agilent Eclipse XDB-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.1% phosphoric acid acetonitrile solution-acetonitrile with gradient elution, the detection wavelength was 229 nm the injection volume was 20 μL and the column temperature was 28 ℃. Standard curve method was selected for quantitative detection. **Results** In the concentration range 1.0~50.0 μg/mL, the liquiritin, nuezhenide and glycyrrhizic acid showed good linear relationships with the peak area. The average recoveries of liquiritin, nuezhenide and glycyrrhizic acid were 99.37%, 98.93% and 99.67%, respectively. The RSDs were 0.70%, 1.40%, and 2.54% (n=6), the precision and repeatability were good (n=6). The test solution was stable within 24 h. **Conclusion** This method is simple, accurate and quick, which can be used for the quality control of Yening Syrup.

Key words: RP-HPLC; Yening Syrup; active ingredients; liquiritin; nuezhenide; glycyrrhizic acid; content

夜宁糖浆是由女贞子、甘草、灵芝、大枣、合欢皮、首乌藤、浮小麦 7 味中药材经煎煮、浓缩等工序制成的中成药^[1-5], 具有养血安神功效, 主要用于治疗心血不足所致失眠、多梦、头晕、四肢乏力等症, 尤其适用于神经衰弱者^[6-10]。方中女贞子主要成分为特女贞苷, 具有滋补肝肾等功效; 甘草主要成分为甘草苷和甘草酸, 具有抗抑郁、保护神经等功效^[11-14]。2015 年版《中国药典(一部)》中仅有其性状、鉴别和检查项目, 缺少含量测定项^[15]。

本研究中建立了同时测定夜宁糖浆中甘草苷、特女贞苷和甘草酸 3 种活性成分含量的反相高效液相色谱法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

2695 型高效液相色谱仪、2998 型检测器(美国沃特世公司); XS 205DU 型电子天平(瑞士梅特勒公司); AS2060B 型超声波清洗器(天津奥特赛恩斯公司); Mil-

第一作者: 朱晓俊, 男, 药师, 研究方向为医院药学, (电子信箱) ruixin568978@163.com。

[△]通信作者: 卞艳芳, 大学本科, 主管药师, 研究方向为医院药学, (电话) 021-31166666。

- [12] 孔广英, 钮忠华. 小儿牛黄清心散中朱砂含量的测定及可溶性砷盐检查[J]. 中国药事, 1999, 13(6): 405-406.
- [13] 孙桂明, 孙世成, 宋爱华. 对《中国药典》一部含朱砂、雄黄成分制剂有关问题的商榷[J]. 中国药品标准, 2007, 8(3): 8-10.
- [14] 贾庆欣, 李文君, 张进, 等. 原子吸收分光光度法测定安宫牛黄丸中雄黄和朱砂的含量[J]. 中国卫生标准管理, 2018, 9(21): 101-103.
- [15] 周燕红. 小儿至宝丸中朱砂和雄黄的含量测定[J]. 中国药师, 2015, 18(12): 2193-2195.
- [16] 王宁生, 汤毅珊, 潘华新, 等. 微波消解-原子荧光法测定生物

- 样品中的汞、砷[J]. 中药新药与临床药理, 2002, 13(4): 244-247.
- [17] 刘洪旭, 吴文, 王丹红, 等. 含朱砂中成药中甲基汞和乙基汞含量的 HPLC-ICP-MS 法检测[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(4): 873-874.
- [18] 李丽敏, 夏晶, 王欣美, 等. HPLC-ICP-MS 法研究 5 种含雄黄中成药的可溶性砷及其形态[J]. 中成药, 2012, 34(11): 2118-2123.
- [19] 丁敬华, 王娜, 姜泓, 等. 柱前衍生化高效液相色谱法测定朱砂中可溶性汞的含量[J]. 化学研究, 2010, 21(2): 80-82.

(收稿日期: 2019-06-04; 修回日期: 2019-07-06)

li-Q Element 型超纯水仪(美国密理博公司)。

1.2 试药

甘草苷对照品(批号为 111610-201607),特女贞苷对照品(批号为 111926-201605),甘草酸对照品(批号为 110731-201720),均购于中国食品药品检定研究院;夜宁糖浆(武汉康乐药业股份有限公司,批号分别为 20181213,20190104,20190324,规格为每瓶 240 mL);甲醇、乙腈为色谱纯,均购于美国天地公司;试验用水为超纯水;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流速:1.0 mL/min;检测波长:229 nm;柱温:28 ℃;进样量:20 μL;流动相:0.1% 磷酸溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱,洗脱程序见表 1。在此色谱条件下的色谱图见图 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)	时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0→5	87	13	28	3	97
12	45	55	29→35	87	13

2.2 溶液制备

取甘草苷对照品、特女贞苷对照品、甘草酸对照品适量,精密称定,加 95% 甲醇制成每 1 mL 溶液中含甘草苷、特女贞苷和甘草酸均为 0.5 mg 的混合溶液,即得对照品贮备溶液。精密量取对照品贮备溶液适量,制成含甘草苷、特女贞苷和甘草酸质量浓度依次为 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0 μg/mL 的溶液,加 95% 甲醇定容至刻度,摇匀,即得对照品溶液。取样品(批号为 20181213),摇匀,精密量取 5 mL,置 50 mL 容量瓶中,加 95% 甲醇约 30 mL,超声 10 min 使溶解,取出,放冷,加 95% 甲醇定容至刻度,用 0.45 μm 滤膜滤过,弃去初滤液,取续滤液作为供试品溶液。

2.3 方法学考察

线性关系考察:取 2.2 项下对照品贮备溶液适量,

精密量取,制成含甘草苷、特女贞苷和甘草酸质量浓度分别为 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0 μg/mL 的对照品溶液,加 95% 甲醇定容至刻度,摇匀,分别注入液相色谱仪,测定峰面积,分别以甘草苷、特女贞苷和甘草酸质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表 2。

表 2 回归方程及线性范围($n=6$)

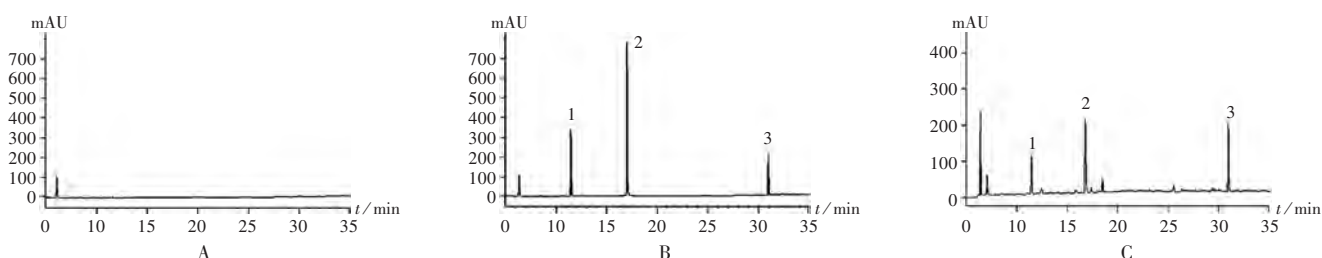
成分	回归方程	线性范围(μg/mL)	r
甘草苷	$Y = 13.768X + 2.722$	1.0 ~ 50.0	0.999 5
特女贞苷	$Y = 6.005X + 0.892$	1.0 ~ 50.0	0.999 4
甘草酸	$Y = 17.124X + 11.537$	1.0 ~ 50.0	0.999 2

精密度试验:取 2.2 项下对照品贮备溶液适量,精密量取,加 95% 甲醇制成含甘草苷、特女贞苷和甘草酸质量浓度为 5.0 μg/mL 的混合对照品溶液,注入液相色谱仪,重复进样 6 次,按拟订色谱条件测定峰面积。结果甘草苷、特女贞苷和甘草酸峰面积的 RSD 分别为 1.28%, 0.68%, 0.92% ($n=6$),表明仪器精密程度良好。

重复性试验:取同一批(批号为 20181213)样品,摇匀,依法平行制备 6 份供试品溶液,分别注入液相色谱仪,测定甘草苷、特女贞苷和甘草酸的峰面积,计算含量。结果甘草苷、特女贞苷和甘草酸含量的 RSD 分别为 3.24%, 2.21%, 3.32% ($n=6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取重复性试验项下供试品溶液任意 1 份,室温放置,分别于 0, 3, 6, 9, 12, 24 h 时进样测定甘草苷、特女贞苷和甘草酸的峰面积并计算含量。结果甘草苷、特女贞苷和甘草酸含量的 RSD 分别为 1.82%, 1.41%, 1.34% ($n=6$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

加样回收试验:取已知甘草苷、特女贞苷和甘草酸含量的样品(批号为 1807012),摇匀,精密量取 5 mL,共 6 份,分别置 50 mL 容量瓶中,加入适量 2.2 项下对照品贮备溶液,依法制备供试品溶液并进行测定,计算加样回收率。结果见表 3。



1. 甘草苷 2. 特女贞苷 3. 甘草酸
A. 空白溶剂溶液 B. 对照品溶液 C. 供试品溶液

图 1 高效液相色谱图

表3 加样回收试验结果($n=6$)

样品含量(mg)			加入量(mg)			测得量(mg)			回收率(%)			$\bar{X}$ (%)			RSD(%)		
A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0.550	1.904	1.098	1.0	1.0	1.0	1.541	2.886	2.054	99.10	98.20	95.60						
0.550	1.904	1.098	1.0	1.0	1.0	1.556	2.915	2.121	100.60	101.10	102.30						
0.550	1.904	1.098	1.0	1.0	1.0	1.535	2.899	2.117	98.50	99.50	101.90	99.37	98.93	99.67	0.70	1.40	2.54
0.550	1.904	1.098	1.0	1.0	1.0	1.541	2.876	2.098	99.10	97.20	100.00						
0.550	1.904	1.098	1.0	1.0	1.0	1.544	2.885	2.101	99.40	98.10	100.30						
0.550	1.904	1.098	1.0	1.0	1.0	1.545	2.899	2.077	99.50	99.50	97.90						

注:A为甘草苷,B为特女贞苷,C为甘草酸。

2.4 样品含量测定

随机选取样品6批次,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件测定峰面积,标准曲线法计算样品中甘草苷、特女贞苷和甘草酸的含量。结果见表4。

表4 样品含量检测结果(mg)

批号	甘草苷	特女贞苷	甘草酸
1807012	0.550	1.904	1.098
1809003	0.604	2.113	1.107
1811016	0.527	1.887	1.006
1811025	0.538	1.896	0.986
1812017	0.581	1.992	0.995
1901023	0.575	1.979	1.112

3 讨论

3.1 检测波长选择

采用紫外-可见分光光度法,扫描范围190~400nm,对甘草苷、特女贞苷和甘草酸3种待测物单标溶液(质量浓度为20 $\mu\text{g/mL}$)进行光谱扫描。结果甘草苷、特女贞苷和甘草酸最大吸收波长分别在236,230,237 nm附近。故选择229 nm作为检测波长,3种待测物响应良好,定量结果准确。

3.2 流动相选择

试验配制了甘草苷、特女贞苷和甘草酸的混合溶液(3种待测物质量浓度均为5 $\mu\text{g/mL}$),按拟订色谱条件,分别采用0.1%磷酸溶液-乙腈、0.1%磷酸溶液-甲醇作为洗脱体系,考察3种待测物的分离效果和分析时间。采用甲醇体系时,基线噪音大,且甘草酸洗脱时间较长,检测效果偏低;采用乙腈体系时,基线平稳,甘草酸洗脱时间短,检测效率高,且各物质的分离效果良好。故选择乙腈洗脱体系。

3.3 小结

本研究中建立了同时测定夜宁糖浆中甘草苷、特女贞苷和甘草酸3种活性成分含量的反相高效液相色谱法,精密度高,重复性好,线性范围广,检测准确度高,可用于控制夜宁糖浆的质量。

参考文献:

- [1] 李鹏杰,邓毅,曼琼,等.甘草解毒现代研究进展[J].中国中医药信息杂志,2019,26(3):137-140.
- [2] 张杰,李宏钰,徐丽丽,等.甘草根和根茎的化学成分研究[J].中国药业,2017,26(12):15-54.
- [3] 李文斌,魏胜利,罗琳,等.甘草种质主要形态性状和化学成分遗传多样性分析[J].中草药,2019,50(2):517-525.
- [4] 张辉.女贞子提取物对高强度耐力训练力竭后大鼠肝组织自由基代谢的影响[J].中国老年学杂志,2018,38(6):1479-1481.
- [5] 奚亚亚,刁家威,张学兰,等.女贞子中4种成分在大鼠血浆中的药动学行为[J].中成药,2018,40(8):59-64.
- [6] 纪鑫,刘晓谦,李春,等.基于UPLC技术的女贞子中主要成分炮制变化规律研究及酒女贞子特色质量标准的探讨[J].中国中药杂志,2018,43(24):4862-4868.
- [7] 张炯怡,王勇,宋晓宁,等.HPLC法同时测定贵州不同产地女贞子中红景天苷、女贞苷、特女贞苷的含量[J].贵州医药,2017,41(10):1038-1040.
- [8] 李志浩,朱雪松,郑芳,等.高效液相色谱法测定夜宁糖浆中四羟基二苯乙烯苷的含量[J].中国医院药学杂志,2011,31(2):170-171.
- [9] 赵斌.HPLC法测定夜宁糖浆中大黄素的含量[J].长春中医药大学学报,2010,26(5):661-662.
- [10] 吕小兰,麦曦,刘超,等.反相高效液相色谱法测定夜宁糖浆中大黄素的含量[J].实用临床医学,2008,9(9):15-20.
- [11] 冯发进,陆宽,冯乾乾,等.高效液相色谱法同时测定陈香露白露片中3种黄酮成分的含量[J].中国医院药学杂志,2019,39(2):116-119.
- [12] 赵准,季玉林,吴建明,等.高效液相色谱法测定逍遥散片中甘草苷含量[J].中国药业,2019,28(3):31-33.
- [13] 王敏,龚慕辛,刘正跃,等.芍药甘草滴丸的制备及其芍药苷、甘草苷和甘草酸的HPLC含量测定[J].世界中医药,2019,14(2):315-319.
- [14] 张鑫,任莹,王云霞,等.高效液相色谱波长切换法同时测定银花感冒颗粒中绿原酸、甘草苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷的含量[J].安徽医药,2018,22(7):1252-1255.
- [15] 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,2015:679-680.

(收稿日期:2019-05-21;修回日期:2019-07-04)