

HPLC 同时测定半夏糖浆中琥珀酸、橙皮苷、甘草苷 3 种成分的含量

黄华, 胡卫南(衢州市食品药品检验研究院, 浙江 衢州 324002)

摘要: 目的 建立 HPLC 同时测定半夏糖浆中琥珀酸、橙皮苷、甘草苷 3 种成分的含量。方法 采用 C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×150 mm, 5 μm), 以乙腈-0.2%磷酸溶液(18 : 82)为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 207 nm, 柱温为常温。结果 3 种待测成分分离度良好, 阴性无干扰; 3 个成分线性范围分别为 4.727~118.17 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 9), 2.474~61.857 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 6), 2.469~61.725 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 9); 琥珀酸、橙皮苷、甘草苷平均回收率(*n*=9)分别为 100.8%, 99.3%, 100.2%, RSD 分别为 1.3%, 1.2%, 1.8%, 3 批中琥珀酸、橙皮苷、甘草苷含量范围分别为 0.072 2~0.079 4、0.029 9~0.034 8, 0.022 8~0.029 0 mg·mL⁻¹。结论 该方法操作简单, 缩短了分析时间, 重复性好, 可为半夏糖浆质量控制提供参考。

关键词: HPLC; 半夏糖浆; 琥珀酸; 橙皮苷; 甘草苷

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)08-0967-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.08.014

引用本文:黄华, 胡卫南. HPLC 同时测定半夏糖浆中琥珀酸、橙皮苷、甘草苷 3 种成分的含量[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(8): 967-970.

Simultaneous Determination of Succinic Acid, Hesperidin and Liquiritin in Banxia Syrup by HPLC

HUANG Hua, HU Weinan(*Quzhou Institute for Food and Drug Control, Quzhou 324002, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE The high performance liquid chromatography(HPLC) method was established to simultaneously determine the level of succinic acid, hesperidin and liquiritin in Banxia syrup. **METHODS** The C₁₈ chromatographic column (4.6 mm×150 mm, 5 μm) was adopted, acetonitrile-0.2% phosphoric acid solution(18 : 82) was applied as mobile phase with flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ under the wavelength of 207 nm. The column temperature was room temperature. **RESULTS** The compositions were separated perfectly without interference from negative controls. The liner range of Succinic acid, Hesperidin and liquiritin were 4.727~118.17 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 9), 2.474~61.857 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 6) and 2.469~61.725 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 9), respectively. The average recovery rates of analytes(*n*=9) were 100.8%, 99.3% and 100.2% with their RSD value of 1.3%, 1.2% and 1.8%. The range level of succinic acid, hesperidin and liquiritin in Banxia syrup were 0.072 2~0.079 4 mg·mL⁻¹, 0.029 9~0.034 8 mg·mL⁻¹ and 0.022 8~0.029 0 mg·mL⁻¹. **CONCLUSION** It simplifies the composition analysis, reduces experiment time and ensures the repeatability, which may be used as an effective method for the quality control of Banxia syrup.

KEYWORDS: HPLC; Banxia syrup; succinic acid; hesperidin; liquiritin

半夏糖浆由生半夏、麻黄、紫苑、桔梗、枇杷叶、制远志、陈皮、甘草和薄荷油 9 味中药组成, 具有止咳化痰的功效, 用于咳嗽痰多, 支气管炎。半夏糖浆为《卫生部药品标准中药成方制剂》第八册收录的中药制剂, 但质量标准中仅有理化反应鉴别, 专属性不强, 无含量测定项目, 难以进行有效的质量控制^[1]。半夏为半夏糖浆君药, 主要成分为琥珀酸, 具燥湿化痰, 降逆止呕, 消痞散结功效; 陈皮主要成分为橙皮苷, 具理气健脾, 燥湿化痰功效; 甘草主要成分甘草苷, 具补脾益气, 清热解毒, 祛痰止咳, 缓急止痛功效。

本研究参照中国药典 2015 年版一部中半夏、陈皮、甘草标准项下的含量测定方法建立 HPLC 同时测定其中 3 种药材中琥珀酸、橙皮苷、甘草苷的含量, 这对于半夏糖浆的质量控制具有重要意义^[2]。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪[真空脱气机(G1322A), 四元泵(G1311A), 自动进样器(G1329A), 柱温箱(G1316A), 二极管阵列检测器(DAD)(G1315D), Agilent 色谱工作站]; AE240 电子天平(Mettler); SK5200HP 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司); UV2450 型紫外分光光度

基金项目: 浙江省食品药品监管系统科技计划项目(2014009); 浙江省衢州市重点实验室项目(衢市科发高[2015]8 号); 衢州市科技项目(20101115)

作者简介: 黄华, 女, 副主任药师 Tel: (0570)8358053 E-mail: 43719437@qq.com

计(日本岛津)。

对照品琥珀酸(批号: 110896-200001; 含量: 90.0%)、橙皮苷(批号: 110721-201818; 含量: 96.2%)、甘草苷(批号: 111610-201607; 含量: 93.1%)均来自中国药品生物制品检定所; 磷酸为分析纯; 乙腈为色谱纯; 水为纯化水; 其他试剂均为分析纯; 半夏糖浆(桂林中族中药股份有限公司, 批号: 170201, 170207, 170302)。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 取琥珀酸、橙皮苷、甘草苷对照品适量, 精密称定, 置棕色量瓶中, 加甲醇溶液制成每 1 mL 分别含琥珀酸 20 μg 、橙皮苷 10 μg 、甘草苷 10 μg 的溶液, 即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密量取本品 2 mL 置 10 mL 量瓶中, 加入甲醇适量, 摇匀, 放冷至室温, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 即得。

2.1.3 阴性样品溶液的制备 按处方制备缺半夏、陈皮、甘草的阴性样品, 按“2.1.2”项下方法制备阴性样品溶液。

2.2 色谱条件

采用 Waters Sunfire- C_{18} (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm); 以乙腈-0.2%磷酸溶液(18:82)为流动相; 检测波长为 207 nm; 流速 1.0 mL \cdot min $^{-1}$; 进样量 10 μL ; 柱温为常温。在上述色谱条件下, 各待测组分分离度均 >1.5 , 理论塔板数均 $>5\ 000$, 混合对照品溶液、样品溶液及各阴性样品溶液色谱图见图 1。

2.3 方法学验证

2.3.1 线性关系 精密称取琥珀酸、橙皮苷、甘草苷对照品适量, 分别用甲醇溶解制成 0.131 3, 0.064 3, 0.066 3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液, 精密吸取混合对照品溶液 1.00, 2.00, 3.00, 5.00, 10.00, 25.00 mL, 分别置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 即得系列混合对照品溶液。精密量取上述不同浓度的混合对照品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进行测定。以峰面积 Y 为纵坐标, 溶液浓度 X 为横坐标进行线性回归, 琥珀酸线性方程 $y=4.28x-1.386$ ($r=0.999\ 9$), 线性范围 4.727~118.17 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 橙皮苷线性方程 $y=29.20x+0.030$ ($r=0.999\ 6$), 线性范围 2.474~61.857 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 甘草苷线性方程 $y=24.14x+1.385$ ($r=0.999\ 9$), 线性范围 2.469~61.725 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.3.2 精密度试验 取“2.1.1”项下混合对照品溶液, 按“2.2”项下色谱条件连续进样 6 次, 测得琥珀酸、橙皮苷、甘草苷峰面积的 RSD($n=6$)分别为 0.47%, 0.36%, 0.55%。

2.3.3 稳定性试验 取同一批供试品溶液(批号: 170201), 室温放置, 分别于 0, 2, 4, 6, 12, 24 h 进行测定, 测得琥珀酸、橙皮苷、甘草苷峰面积的 RSD($n=6$)分别为 0.71%, 0.67%, 0.41%, 表明供试品溶液在常温下 24 h 内稳定。

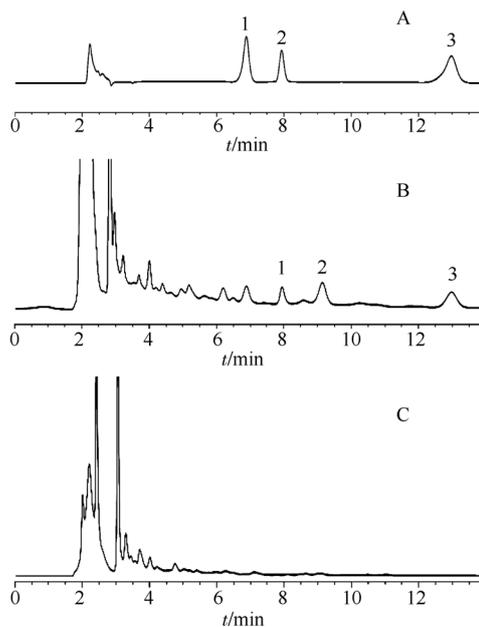


图 1 高效液相色谱图

A-混合对照品; B-样品; C-阴性样品; 1-甘草苷; 2-琥珀酸; 3-橙皮苷。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-mixed reference substances; B-sample; C-negative sample; 1-liquiritin; 2-succinic acid; 3-hesperidin.

2.3.4 重复性试验 取半夏糖浆样品(批号: 170201), 按“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, “2.2”项下色谱条件进行测定, 得琥珀酸、橙皮苷、甘草苷的平均含量($n=6$)分别为 79.43, 34.80, 22.83 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, RSD 分别为 0.79%, 0.92%, 0.33%。

2.3.5 加样回收率 精密量取已知含量样品(批号: 170201)1 mL 共 9 份, 平均分为 3 组, 按高、中、低浓度(50%, 100%, 150%)分别加入一定量的琥珀酸、橙皮苷、甘草苷对照品, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 进样 10 μL 进行测定, 结果见表 1。

2.3.6 检测限和定量限 取同一批供试品溶液(批

号: 170201), 用甲醇逐步稀释后, 取 10 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 计算信噪比 $S/N \approx 3$, 琥珀酸、橙皮苷、甘草苷检出限分别为 0.006, 0.003, 0.003 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 计算信噪比 $S/N \approx 10$, 琥珀酸、橙皮苷、甘草苷定量限分别为 0.02, 0.01, 0.01 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($n=3$)。

2.3.7 耐用性试验 分别调节柱温(30 ± 5) $^{\circ}\text{C}$ 、流动相中有机相比例($18\% \pm 5\%$)、流速(1.0 ± 0.1) $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 并使用同一规格($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$)的不同品牌(Waters、岛津、大连依利特、安捷伦)的色谱柱, 测定同一批供试品(批号: 170201)含量, 结果表明, 在色谱柱温度为 (30 ± 5) $^{\circ}\text{C}$, 流速为 (1.0 ± 0.1) $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 内, 流速、色谱柱对测定结果无显著影响。流动相中有机相比例 $\geq 18\% \pm 3\%$ 时, 对照图谱中甘草苷、橙皮苷拖尾因子 > 1.05 ; 有机相比例 $18\% \pm 2\%$ 时, 图谱中待测峰分离较好, 含量变化基本满足要求, 流动相比例变化应控制在 $\pm 2\%$ 内。

表 1 半夏糖浆中 3 个成分的回收率 ($n=9$)

Tab. 1 Results of recovery test for the three components in Banxia syrup ($n=9$)

成分	样品含量/mg	加入量/mg	测得值/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
琥珀酸	0.079 4	0.017 4	0.096 9	100.5	100.8	1.3
	0.079 4	0.029 8	0.109 6	101.4		
	0.079 4	0.029 3	0.108 6	99.7		
	0.079 4	0.057 3	0.138 1	102.5		
	0.079 4	0.056 5	0.135 4	99.1		
	0.079 4	0.056 9	0.137 4	101.9		
	0.079 4	0.085 5	0.165 1	100.2		
	0.079 4	0.085 1	0.166 5	102.3		
	0.079 4	0.081 9	0.160 7	99.3		
橙皮苷	0.034 8	0.040 6	0.074 9	98.9	99.3	1.2
	0.034 8	0.039 2	0.073 7	99.2		
	0.034 8	0.041 9	0.075 9	97.9		
	0.034 8	0.081 3	0.115 4	99.2		
	0.034 8	0.090 1	0.125 4	100.6		
	0.034 8	0.083 2	0.116 2	97.8		
	0.034 8	0.121 6	0.157 9	101.2		
	0.034 8	0.123 4	0.158 5	100.3		
	0.034 8	0.120 3	0.153 7	98.9		
甘草苷	0.022 8	0.013 4	0.036 0	98.5	100.2	1.8
	0.022 8	0.013 8	0.036 2	97.3		
	0.022 8	0.014 0	0.036 7	99.2		
	0.022 8	0.026 4	0.050 0	103.0		
	0.022 8	0.025 9	0.049 1	101.5		
	0.022 8	0.026 8	0.050 1	101.9		
	0.022 8	0.039 3	0.062 4	100.8		
	0.022 8	0.041 1	0.063 8	99.7		
	0.022 8	0.042 3	0.065 0	99.8		

2.4 样品测定

取 3 批样品, 每批样品取 3 份, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进行分析, 外标法计算各组分含量, 结果见表 2。

表 2 半夏糖浆中 3 个成分的测定

Tab. 2 Determination of three components in Banxia syrup $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$

批号	琥珀酸	橙皮苷	甘草苷
170201	0.079 4	0.034 8	0.022 8
170302	0.072 2	0.029 9	0.029 0
170207	0.075 3	0.034 0	0.028 2

2.5 市售样品含量测定情况

从浙江省 11 个地市各抽取样品约 5 批, 共计 5 个厂家 46 个批次, 考察其含量, 结果见图 2。

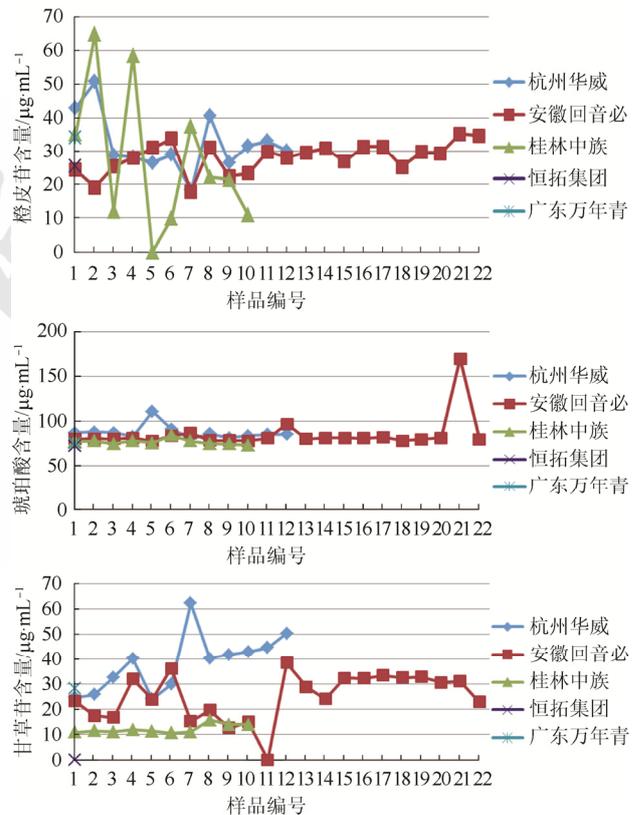


图 2 市售半夏糖浆中橙皮苷、琥珀酸和甘草苷的含量

Fig. 2 Contents of hesperidin, succinic acid and glycyrrhizin in commercial Banxia syrup

3 讨论

在万方医学网中, 以半夏糖浆、含量测定为搜索摘要的关键词, 检索到论文 11 篇^[2-12], 其中对麻黄碱的含量控制 7 篇, 对乙酸和琥珀酸的含量控制 1 篇, 对薄荷油的质量控制 1 篇, 对陈皮和甘草的质量控制 2 篇, 未见对半夏、陈皮、甘

草中主要成分同时控制的报道。半夏为半夏糖浆君药, 陈皮、甘草具祛痰止咳功效, 同时测定半夏、陈皮、甘草 3 种药材中琥珀酸、橙皮苷、甘草苷的含量, 对于控制半夏糖浆的质量控制具有重要意义。

半夏糖浆为 2018 年浙江省质量评价品种, 笔者共研究了本省临床使用量大的 5 个厂家产品, 共 46 批次, 建立了 HPLC 测定盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱含量, HPLC 同时测定甘草苷、琥珀酸、橙皮苷含量, GC 测定薄荷脑含量方法共 3 个。通过 46 批次的甘草苷、琥珀酸、橙皮苷含量检测结果来看, 不同生产企业间各成分含量差异大, 同一生产企业不同批次间含量差异有大有小, 需加强企业工艺控制管理, 开展部分参数的生产工艺验证工作。

半夏、陈皮、甘草均为中国药典 2015 年版一部收载品种, 半夏为酸碱滴定法测定琥珀酸含量; 陈皮以甲醇-醋酸-水(35:4:61)为流动相、283 nm 为测定波长的 HPLC 测定橙皮苷含量; 甘草以乙腈和 0.05%磷酸溶液为梯度洗脱流动相、237 nm 为测定波长的 HPLC 测定甘草苷含量^[13]。参照上述药材含量测定方法, 优化流动相比比例和 pH, 以及检测波长, 最终以乙腈-0.2%磷酸溶液(18:82)为流动相, 检测波长为 207 nm 的检测条件最优, 待测峰与相邻峰可达较好分离度, 峰形基本对称, 3 个待测峰峰高差合理。

本研究采用 HPLC 建立了同时测定半夏糖浆

中 3 种中药成分含量定量方法, 所建立方法操作简便、快速准确, 重复性好, 可为半夏糖浆的全面质量评价提供参考。

REFERENCES

- [1] 卫生部药品标准. 中药成方制剂. 第八册[S]. 1994: 186
- [2] REN H Z. The HPLC simultaneous detection of four organic acid in Banxia Syrup [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2017, 40(2): 384-386.
- [3] HE D, YANG X M, FU Y, et al. Simultaneous determination of acetic acid and succinic acid in Banxia Syrup by RP-HPLC [J]. J China Pharm(中国药房), 2016, 27(30): 4264-4266.
- [4] FU J, ZHU Y Y, NIE S M. Determination of pseudoephedrine in pinellia Syrup by HPLC [J]. China Pharm(中国药业), 2015, (22): 114-115.
- [5] ZHANG X J. Research of the content determination of Banxia Syrup [J]. Mod Hosp Feb(现代医院), 2012, 12(2): 69-72.
- [6] 肖光清, 黄文平, 黄琴, 等. 半夏止咳糖浆质量标准研究[J]. 江西中医药, 2014(9): 61-63.
- [7] LI N, YANG Y F. Determination of menthol in Banxia Syrup by GC [J]. China Pharm(中国药业), 2010, 19(18): 49-50.
- [8] CHENG J H, RUAN Z G. Determination of ephedrine in Banxia Syrups by HPLC [J]. Res Pract Chin Med(现代中药研究与实践), 2010, 24(1): 59-60.
- [9] 徐艳丽, 郎轶咏. HPLC 测定半夏止咳糖浆中盐酸麻黄碱含量[J]. 中成药, 2009, 31(10): 附 8-附 9.
- [10] 周锐, 王辉. 半夏糖浆质量标准的研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(6): 1542-1543.
- [11] 陈燕, 路苇, 叶华. 半夏糖浆澄清工艺研究[J]. 中药材, 2004, 27(5): 377-379.
- [12] JIANF S Y, TIAN S J, LIU Q. RP-HPLC and IE-HPLC analysis of ephedrine and pseudoephedrine in Banxialu Syrups [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2003, 23(5): 341-344.
- [13] 中国药典. 一部[S]. 2015: 附录 86, 119, 191.

收稿日期: 2019-09-06

(本文责编: 蔡珊珊)