

# 高效液相色谱切换波长法同时测定辛夷鼻炎丸中4种成分的含量<sup>Δ</sup>

黄莉莉\*, 罗 轶#, 吴桂凡, 谢培德, 张 涛(广西壮族自治区食品药品检验所, 南宁 530021)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)05-0625-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.05.12

**摘要** 目的:建立同时测定辛夷鼻炎丸中升麻素苷、甘草苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、甘草酸铵含量的方法。方法:采用高效液相色谱切换波长法对A、B、C 3家企业共52批次辛夷鼻炎丸样品进行含量测定。色谱柱为Kromasil C<sub>18</sub>,流动相为乙腈-0.1%磷酸,流速为1.0 mL/min,检测波长为220 nm(升麻素苷、甘草苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷)和250 nm(甘草酸铵),柱温为30 ℃,进样量为10 μL。结果:升麻素苷、甘草苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、甘草酸铵检测质量浓度线性范围分别为6.138~122.77 μg/mL( $r=0.999\ 9$ )、2.502~50.03 μg/mL( $r=0.999\ 9$ )、5.988~119.75 μg/mL( $r=0.999\ 9$ )、12.788~255.76 μg/mL( $r=0.999\ 9$ );精密性、稳定性和重复性试验的RSD均<2.0%( $n=6$ );加样回收率分别为100.32%(RSD=0.58%, $n=6$ )、100.24%(RSD=0.56%, $n=6$ )、101.28%(RSD=0.91%, $n=6$ )、101.48%(RSD=0.79%, $n=6$ )。A企业的4种成分含量测定总值普遍高于B、C企业,其中甘草苷的差异尤为显著;B企业的升麻素苷含量高于A、C企业,而5-*O*-甲基维斯阿米醇苷却低于A、C企业;B企业甘草苷的含量均是离群值。结论:该方法操作简便、重复性好,可为辛夷鼻炎丸的质量控制提供参考。

**关键词** 辛夷鼻炎丸;升麻素苷;甘草苷;5-*O*-甲基维斯阿米醇苷;甘草酸铵;高效液相色谱法;切换波长法

**Simultaneous Determination of 4 Components in Xinyi Biyan Pills by HPLC-switching Wavelength Method**  
HUANG Lili, LUO Yi, WU Guifan, XIE Peide, ZHANG Tao (Guangxi Zhuang Autonomous Region Institute for Food and Drug Control, Nanning 530021, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the method for simultaneous determination of *pim-O*-glucosylcimifugin, liquiritin, 5-*O*-methylvisammioside and amonium glycyrrhizinate in Xinyi biyan pills. METHODS: HPLC-switching wavelength method was used for content determination of 52 batches of Xinyi biyan pills sample from enterprises A, B, C. The determination was performed on Kromasil C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelengths were set at 220 nm (*pim-O*-glucosylcimifugin, liquiritin, 5-*O*-methylvisammioside) and 250 nm (amonium glycyrrhizinate). The column temperature was 30 ℃, and sample size was 10 μL. RESULTS: The linear ranges of *prim-O*-glucosylcimifugin, liquiritin, 5-*O*-methylvisammioside and amonium glycyrrhizinate were 6.138-122.77 μg/mL ( $r=0.999\ 9$ ), 2.502-50.03 μg/mL ( $r=0.999\ 9$ ), 5.988-119.75 μg/mL ( $r=0.999\ 9$ ) and 12.788-255.76 μg/mL ( $r=0.999\ 9$ ), respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2.0% ( $n=6$ ). The recovery rate were 100.32% (RSD=0.58%, $n=6$ ), 100.24% (RSD=0.56%, $n=6$ ), 101.28% (RSD=0.91%, $n=6$ ) and 101.48% (RSD=0.79%, $n=6$ ), respectively. Total contents of 4 components in enterprise A were generally higher than enterprises B, C, among which the difference of liquiritin was significant; the content of *prim-O*-glucosylcimifugin in enterprise B was higher than enterprises A, C, while the content of 5-*O*-methylvisammioside was lower than enterprises A, C. The content of liquiritin in enterprise B was outlier. CONCLUSIONS: This method is simple, reproducible and can provide reference for quality control of Xinyi biyan pills.

**KEYWORDS** Xinyi biyan pills; *Pim-O*-glucosylcimifugin; Liquiritin; 5-*O*-methylvisammioside; Amonium glycyrrhizinate; HPLC; Switching wavelength method

辛夷鼻炎丸由辛夷、薄荷、紫苏叶、甘草、广藿香、苍耳子、鹅不食草、板蓝根、山白芷、防风、鱼腥草、菊花、三

Δ 基金项目:广西壮族自治区科学技术厅重大专项计划项目(No.桂科重1598005-10)

\* 主管中药师,硕士。研究方向:中药民族药质量标准、成分分析。电话:0771-5828498。E-mail:Lilith28@163.com

# 通信作者:研究员。研究方向:中药民族药质量标准、成分分析、中药材中农药残留、有害金属元素分析。电话:0771-5828498。E-mail:luoyi2001102@yahoo.com

又苦等13味药材组成,2015年版《中国药典》(一部)<sup>[1]</sup>中对该制剂功能与主治描述为祛风宣窍、清热解毒。用于风热上攻、热毒蕴肺所致的鼻塞、鼻涕清涕或浊涕、发热、头痛,慢性鼻炎、过敏性鼻炎、神经性头痛见上述证候者。其中,防风具有祛风解表、胜湿止痛之功效,对于流感引起的头痛有效,在方中配合君药达到祛风的疗效;甘草具有祛痰止咳、缓急止痛、调和诸药<sup>[2]</sup>之功效。升麻素苷及5-*O*-甲基维斯阿米醇苷为该方中防风的有

效成分,甘草酸及甘草苷为该方中甘草的活性成分。而近年来经调查发现,不同产区的甘草质量参差不齐,甘草酸和甘草苷的含量高低差异较大<sup>[3]</sup>。由于我国对甘草需求量大,更有不法分子销售国外低价甘草的情况,主要表现在所含甘草苷含量不合格<sup>[4]</sup>。原标准及文献报道仅有防风中升麻素苷及5-*O*-甲基维斯阿米醇苷<sup>[5-6]</sup>的含量测定,未见对甘草质量进行控制的报道。笔者在本文中建立了采用高效液相色谱切换波长法<sup>[7]</sup>同时测定辛夷鼻炎丸中升麻素苷、甘草苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、甘草酸铵的含量的方法。

## 1 材料

### 1.1 仪器

2960 高效液相色谱仪,包括二极管阵列检测器、自动进样器及 Empower 色谱工作站(美国 Waters 公司); Milli-Q 纯水仪(德国 Merck Millipore 公司); ABS-6G 双量程十万分之一电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司)。

### 1.2 药品与试剂

辛夷鼻炎丸(企业 A,规格:0.75 g/10 丸,38 批次,编号 A1~A38;企业 B,规格:3 g/袋,10 批次,编号 B1~B10;企业 C,规格:0.75 g/10 丸,4 批次,编号 C1~C4); 升麻素苷对照品(批号:111522-201511,纯度:94.8%)、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷对照品(批号:111523-201509,纯度:95.8%)、甘草苷对照品(批号:111610-201106,纯度:93.7%)、甘草酸铵对照品(批号:110731-201418,纯度:93.1%)均由中国食品药品检定研究院提供;乙腈为色谱纯;其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil C<sub>18</sub>(250 mm×4.5 mm,5 μm); 流动相:乙腈为 A 相,0.1% 磷酸为 B 相,梯度洗脱(0~25 min,5%~15% A;25~36 min,15%~21% A;36~80 min,21%~50% A);流速:1.0 mL/min;检测波长:220 nm,60 min 时变换波长为 250 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μL。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称量升麻素苷 12.95 mg、甘草苷 10.68 mg、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷 12.50 mg、甘草酸铵 14.02 mg,分别置于 5、10、5、5 mL 的棕色量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,得到各对照品的贮备液。分别精密吸取甘草酸铵贮备液 2.0 mL 及其他 3 种对照品贮备液 1.0 mL,置于同一 10 mL 量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,制成每 1 mL 含升麻素苷 245.53 μg、甘草苷 100.07 μg、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷 239.50 μg、甘草酸铵 511.52 μg 的混合对照品溶液(甘草酸质量=甘草酸铵质量/1.021)。

2.2.2 供试品溶液 取 A3 样品,研细,取 1 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 20 mL,称定质量,超声(功率:320 W,频率:40 kHz)处理 30 min,放冷,再称定质量,用 50% 甲醇补足减失的质量,用 0.45 μm 滤膜滤过,作为供试品溶液。

2.2.3 阴性样品溶液 自制缺陷防风阴性样品及缺甘草阴性样品,研细,取 1 g,按照“2.2.2”项下方法制备,分别作为缺陷防风和缺甘草阴性样品溶液。

### 2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图 1。

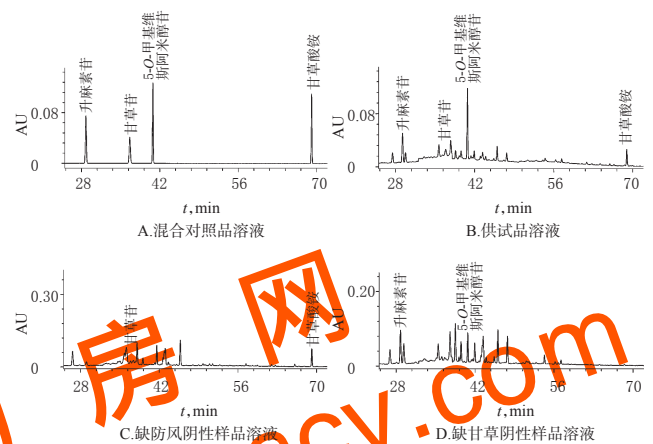


图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

由图 1 可知,在该色谱条件下,各成分均能达到基线分离,分离度>1.5;理论板数以 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷峰计为 12 000。结果表明,其他成分对主成分测定无干扰。

### 2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液 0.125、0.2、0.5、1.0、2.0、2.5 mL,分别置于 5 mL 量瓶中,加入 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀。分别精密吸取 10 μL 注入液相色谱仪,以待测成分质量浓度为横坐标( $x$ , μg/mL)、峰面积为纵坐标( $y$ )绘制标准曲线,线性关系考察结果见表 1。

表 1 线性关系考察结果( $n=6$ )

Tab 1 Results of linear relationship investigation ( $n=6$ )

待测成分	回归方程	$r$	线性范围, μg/mL
升麻素苷	$y=1\ 895.1x-12\ 857$	0.999 9	6.138~122.770
甘草苷	$y=2\ 662.4x-6\ 429.1$	0.999 9	2.502~50.030
5- <i>O</i> -甲基维斯阿米醇苷	$y=2\ 200.9x-14\ 825$	0.999 9	5.988~119.750
甘草酸铵	$y=978.46x-12\ 690$	0.999 9	12.788~255.760

### 2.5 检测限与定量限考察

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 0.25、0.5、1 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,

摇匀,进样分析。当信噪比为3:1时,得检测限;当信噪比为10:1时,得定量限。结果,升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、甘草苷、甘草酸铵的检测限分别为0.200、0.200、0.150、0.125  $\mu\text{g/mL}$ ,定量限分别为0.500、0.505、0.350、0.271  $\mu\text{g/mL}$ 。

## 2.6 精密度试验

精密吸取供试品溶液10  $\mu\text{L}$ ,连续进样6次,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,升麻素苷、甘草苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、甘草酸铵峰面积的RSD分别为1.08%、1.17%、0.57%、1.00% ( $n=6$ )。表明仪器精密度良好。

## 2.7 重复性试验

取A3样品约1.0 g,共6份,精密称定,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液并测定及计算含量。结果,升麻素苷、甘草苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、甘草酸铵的平均含量依次为0.61、0.14、0.81、0.61 mg/g, RSD分别为1.01%、1.07%、1.27%、1.27% ( $n=6$ ),表明本方法重复性良好。

## 2.8 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液(A3),于室温放置0、2、4、6、12、24 h进样测定。结果,升麻素苷、甘草苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、甘草酸铵峰面积的RSD分别为1.37%、1.21%、0.95%、1.15% ( $n=6$ ),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

## 2.9 加样回收率试验

取已知含量的供试品粉末(A3)6份,每份约0.5 g,精密称定,准确加入适量对照品溶液,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果,升麻素苷、甘草苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、甘草酸铵的平均加样回收率分别为100.32% (RSD=0.58%,  $n=6$ )、100.24% (RSD=0.56%,  $n=6$ )、101.28% (RSD=0.91%,  $n=6$ )、101.48% (RSD=0.79%,  $n=6$ )。

## 2.10 含量测定

取52批次辛夷鼻炎丸样品适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量,结果见表2。

# 3 讨论

## 3.1 流动相的选择

甘草酸铵对照品为铵盐,当流动相为酸性时,甘草酸铵在色谱中脱离铵离子即变为甘草酸,故选择磷酸水溶液、醋酸水溶液以及甲酸水溶液等进行考察。本文采用220 nm切换250 nm作为检测波长,而磷酸在这两个波长下均无吸收,故选择其作为水相;在有机相方面,虽然甲醇价格便宜且毒性比乙腈小,但考虑到乙腈洗脱能

表2 3家企业52批次样品4种成分含量测定结果( $n=3, \text{mg/g}$ )

Tab 2 Results of content determination of 4 components in 52 batches of samples from 3 enterprises ( $n=3, \text{mg/g}$ )

企业	批次	升麻素苷	甘草苷	5- <i>O</i> -甲基维斯阿米醇苷	甘草酸铵
A	A1	0.54	0.23	1.01	0.81
	A2	0.63	0.22	0.96	0.80
	A3	0.61	0.14	0.81	0.61
	A4	0.87	0.33	0.91	0.82
	A5	0.86	0.30	1.29	0.91
	A6	0.76	0.21	0.72	0.63
	A7	0.69	0.32	1.02	0.83
	A8	0.69	0.21	0.67	0.55
	A9	0.91	0.27	0.93	0.89
	A10	0.54	0.28	1.11	0.96
	A11	0.59	0.41	1.19	0.74
	A12	0.52	0.20	0.92	0.68
	A13	0.68	0.23	0.86	0.85
	A14	0.59	0.34	0.98	0.88
	A15	0.54	0.13	0.83	0.60
	A16	0.55	0.36	0.96	0.90
	A17	0.58	0.28	1.01	0.80
	A18	0.58	0.40	0.72	0.96
A19	0.59	0.25	0.75	1.15	
A20	0.51	0.12	0.82	1.14	
A21	0.58	0.22	0.84	1.16	
A22	0.56	0.16	0.78	0.78	
A23	0.64	0.19	0.98	0.83	
A24	0.56	0.33	0.86	1.04	
A25	0.96	0.31	1.09	0.77	
A26	0.62	0.30	1.08	0.85	
A27	0.74	0.36	0.83	1.00	
A28	0.59	0.13	0.78	0.68	
A29	0.82	0.27	0.99	0.92	
A30	0.80	0.32	1.19	1.00	
A31	0.67	0.35	0.68	0.99	
A32	0.81	0.37	1.33	1.02	
A33	0.68	0.29	0.93	1.10	
A34	0.69	0.17	0.79	0.83	
A35	0.72	0.27	0.98	0.98	
A36	0.74	0.31	1.05	1.06	
A37	0.74	0.38	1.07	1.28	
A38	0.64	0.45	0.55	1.23	
B	B1	0.85	0.08	0.51	0.48
	B2	0.84	0.08	0.58	0.79
	B3	0.85	0.09	0.58	0.84
	B4	0.93	0.07	0.57	0.62
	B5	0.80	0.04	0.44	0.54
	B6	0.99	0.07	0.68	0.74
	B7	1.04	0.09	0.72	0.89
	B8	1.06	0.09	0.72	0.90
	B9	0.78	0.09	0.66	0.70
	B10	0.98	0.07	0.62	0.65
C	C1	0.75	0.15	0.72	0.73
	C2	0.72	0.15	0.64	0.79
	C3	0.67	0.24	0.71	0.64
	C4	0.66	0.20	0.69	0.65

力强,且在低波长处无吸收,几乎不与样品发生反应。为了提高灵敏度,最终采用流动相为乙腈-0.1%磷酸<sup>[8]</sup>系统,且经试验,以该系统梯度洗脱,分离效果好,峰形对称。

### 3.2 检测波长的选择

采用二极管阵列检测器对辛夷鼻炎丸中所有成分进行检测,在220 nm波长处升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、甘草苷均有较好吸收,而甘草酸<sup>[9]</sup>在220 nm波长处几乎没有吸收,在250 nm波长处有最大吸收,且甘草酸出峰时间较晚,故在60 min变换波长为250 nm<sup>[10]</sup>,以达到同时测定4个成分的目的。变换波长法<sup>[11]</sup>已经成为同时测定不同类别成分的主流方法,应用广泛,值得推广。

### 3.3 含量测定结果分析

A、B、C 3家企业的样品含量数据经分析比较后发现,A企业的4种成分含量普遍高于B企业及C企业,其中甘草苷含量的差异尤为显著。A企业为该方的原研企业,数据可靠度高。另外,B企业的升麻素苷含量均高于A企业及C企业,而同为防风中另一成分5-*O*-甲基维斯阿米醇苷含量却低于A企业及C企业,该数值的差异有待进一步深入研究。通过Grubbs法则计算,去除离群值,得到4种成分的平均值,发现企业B的10个被测定批次中甘草苷的含量均是离群值,远远低于原研企业中甘草苷的含量,提示B企业甘草投料有待进一步调查及研究。本方法的建立可为控制辛夷鼻炎丸中甘草及防风的投料质量<sup>[12]</sup>提供参考作用。

中成药多为多种药材配伍并根据相应工艺生产而制成的制剂,单一指标成分的控制已经不能完全满足中成药的质量控制要求,而不同产区的药材质量差异较大,例如甘草<sup>[13]</sup>,因此有必要对成方制剂进行多成分的质量控制。目前报道的测定辛夷鼻炎丸中升麻素苷及5-*O*-甲基维斯阿米醇苷的方法较多,但未曾见同时测定辛夷鼻炎丸中升麻素苷、甘草苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、甘草酸铵含量的报道。笔者所建立的高效液相色谱切换波长法可同时测定辛夷鼻炎丸中升麻素苷、甘草苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、甘草酸铵的含量,该方法操作简便、重复性好,可为辛夷鼻炎丸的质量控制提供参考。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:985-987.
- [2] 赵祎镭,师清芝,唐星.甘草中甘草酸和甘草苷的提取纯化工艺研究[J].中国药房,2009,20(6):426-429.
- [3] 黄明进,王文全,魏胜利.我国甘草药用植物资源调查及质量评价研究[J].中国中药杂志,2010,35(8):947-952.
- [4] 车晓彦,邓晓鸿,余晓琴,等. HPLC测定辛夷鼻炎丸中升麻素苷和5-*O*-甲基维斯阿米醇苷的总含量[J].中成药,2010,32(11):1917-1919.
- [5] 刘双利,姜程曦,赵岩,等.防风化学成分及其药理作用研究进展[J].中草药,2017,48(10):2146-2152.
- [6] 马丽杰,杨滨,冯学锋,等.野生与栽培防风中升麻苷和5-*O*-甲基维斯阿米醇苷的含量测定及指纹图谱分析[J].中国中药杂志,2010,35(13):1731-1734.
- [7] 周萃,杨燕云,张振秋,等.波长切换HPLC法同时测定甘草及其炮制品中7个物质的含量[J].药物分析杂志,2011,36(11):2067-2069.
- [8] 谢培山.中药色谱指纹图谱[M].北京:人民卫生出版社,2005:13-17.
- [9] 杜蓉,张孟佑. HPLC法测定加味逍遥丸中芍药苷与甘草苷的含量[J].中国药房,2015,26(18):2571-2572.
- [10] 成英,宋九华. HPLC测定逍遥丸中甘草苷、异甘草素和甘草酸的含量[J].中国现代应用药学,2012,29(2):163-166.
- [11] 杨金桦,殷敏敏,张健,等. HPLC波长切换法测定青阳参中7个C21甾体皂苷的含量[J].中国药科大学学报,2014,45(2):200-204.
- [12] 罗轶,唐秀玲,黄莉莉,等.辛夷鼻炎丸质量分析概述[J].大众科技,2016,18(4):81-84.
- [13] MONTERO L, IBÁÑEZ E, RUSSO M, et al. Metabolite profiling of licorice (*glycyrrhiza glabra*) from different locations using comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled to diode array and tandem mass spectrometry detection[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2016. DOI: 10.1016/j.aca.2016.01.040.

(收稿日期:2017-06-14 修回日期:2018-01-03)

(编辑:余庆华)

《中国药房》杂志——中文核心期刊,欢迎投稿、订阅