

HPLC法同时测定腰痛宁胶囊中甘草酸和甘草次酸的含量

何燕宁^{1,2*}, 赵引利^{1,2}, 杨冬丽^{2,3}, 张东阁^{2,3}, 王春民^{2,3#}(1.承德医学院中药研究所, 河北承德 067000; 2.颈复康药业集团有限公司, 河北承德 067000; 3.河北省中药新辅料工程技术研究中心, 河北承德 067000)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)30-4279-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.30.37

摘要 目的:建立同时测定腰痛宁胶囊中甘草酸和甘草次酸含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent TC-C₁₈,流动相为甲醇-0.2 mol/L 乙酸铵溶液(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为250 nm,柱温为25 ℃,进样量为10 μl。结果:甘草酸铵和甘草次酸检测质量浓度线性范围分别为0.007 1~0.178 0 mg/ml、0.354 8~8.720 0 μg/ml(*r*均为0.999 8);精密度、稳定性、重复性试验的RSD≤1.74%;加样回收率分别为95.49%~100.62%、96.80%~102.26%,RSD分别为1.98%、1.78%(*n*=9)。结论:该方法操作简单、重复性好,测定结果准确、可靠,可用于同时测定腰痛宁胶囊中甘草酸和甘草次酸的含量。

关键词 腰痛宁胶囊;甘草酸;甘草次酸;高效液相色谱法

Simultaneous Determination of Glycyrrhizic Acid and Glycyrrhetic Acid in Yaotongning Capsule by HPLC

HE Yan-ning^{1,2}, ZHAO Yin-li^{1,2}, YANG Dong-li^{2,3}, ZHANG Dong-ge^{2,3}, WANG Chun-min^{2,3}(1.Institute of Traditional Chinese Medicine, Chengde Medical University, Hebei Chengde 067000, China; 2.Jingfukang Pharmaceutical Group Co., Ltd., Hebei Chengde 067000, China; 3.The New Excipients of Traditional Chinese Medicine Engineering Research Center of Hebei Province, Hebei Chengde 067000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneously determination of glycyrrhizic acid and glycyrrhetic acid in Yaotongning capsule. METHODS: HPLC was performed on the column of Agilent TC-C₁₈ with mobile phase of methanol-0.2 mol/L ammonium acetate (gradient elution) at a flow rate of 1.0 ml/min; detection wavelength was 250 nm and column temperature was 25 ℃ and injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range was 0.007 1-0.178 0 mg/ml(*r*=0.999 8) for glycyrrhizin acid and 0.354 8-8.720 0 μg/ml of glycyrrhetic acid(*r*=0.999 8); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were no more than 1.74%, average recoveries were 95.49%-100.62% (RSD=1.98%, *n*=9) and 96.80%-102.26% (RSD=1.83%, *n*=9), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, reproducible, accurate and reliable, and can be used for the simultaneous determination of glycyrrhizic acid and glycyrrhetic acid in Yaotongning capsule.

KEYWORDS Yaotongning capsule; Glycyrrhizic acid; Glycyrrhetic acid; HPLC

(*n*=6)、92.0% (*n*=4), 克霉唑含量分别为96.5% (*n*=6)、101.1% (*n*=4), 醋酸地塞米松含量分别为102.1% (*n*=6)、102.7% (*n*=4)。

3 讨论

3.1 方法的耐用性

分别选择不同色谱柱、不同柱温,对氯霉素、克霉唑和醋酸地塞米松的分离度等进行考察。结果表明,不同柱温(30、35 ℃)、不同色谱柱[Thermo Hypersil BDS C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Ecosil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Shimadzu VP-ODS C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)]对氯霉素、克霉唑和醋酸地塞米松的分离度影响均不大,测定结果均符合要求,表明本方法的耐用性较好。

3.2 溶剂的选择

本品是复方制剂,处方组分复杂,且含有大量亲水性和亲脂性基质,在供试品溶液制备过程中依据主药和辅料的理化特性选择溶剂。笔者曾尝试过采用30%、50%、70%甲醇溶液

和纯甲醇作为溶剂提取样品,发现甲醇浓度低时容易造成色谱柱堵塞,柱压升高,而纯甲醇大大延长了色谱柱的使用寿命。

综上所述,该方法简便快速、结果准确、重复性好,适用于复方地克软膏及相关制剂的质量控制。

参考文献

- [1] 吴晓燕,瞿发林,陈颖,等.HPLC法测定茵克软膏中醋酸地塞米松的含量[J].天津药学,2014,26(5):14.
- [2] 严玲.RP-HPLC法测定复方维A酸软膏中醋酸地塞米松的含量[J].中国药房,2007,18(7):540.
- [3] 柳杰,陈艳伟,辛翠群,等.HPLC法同时测定复方克霉唑乳膏中2种成分的含量[J].实用药物与临床,2012,15(7):419.
- [4] 李如标,王梅娟.高效液相色谱法测定复方醋酸地塞米松搽剂中2组分的含量[J].中国新药与临床杂志,2011,30(8):623.
- [5] 黄东萍,王立升.反相高效液相色谱法测定双唑泰栓中甲硝唑、克霉唑和醋酸氯己定的含量[J].药物分析杂志,2002,22(2):129.

(收稿日期:2015-03-12 修回日期:2015-09-16)

(编辑:周 箐)

* 硕士研究生。研究方向:中药药动学。E-mail:18932879618@189.cn

通信作者:主任中药师。研究方向:中药的新技术与新应用。E-mail:13603140779@139.com

腰痛宁胶囊是由制马钱子、麻黄、甘草等10味中药组成的复方制剂,具有消肿止痛、疏散寒邪、温经通络的功效,临床多用于寒湿瘀阻经络所致的腰椎间盘突出、坐骨神经痛的治疗^[1]。其中,使药甘草具有补脾益气、清热解毒、抗炎止痛的功效,其所含的甘草酸为主要活性成分之一^[2]。研究表明,甘草酸起药理作用的实际成分为其水解产物甘草次酸^[3],而甘草中甘草酸、甘草次酸含量会因其产地、品种的不同而差异较大^[4]。2010年版《中国药典》(一部)只对甘草药材中的甘草苷和甘草酸的含量作出了限定;腰痛宁胶囊质量标准只对甘草中的甘草酸含量作出了限定,均未对甘草中甘草次酸的含量进行检测。因此,本研究旨在建立一种可同时测定腰痛宁胶囊中甘草酸和甘草次酸含量的方法,以为全面提高腰痛宁胶囊的质量标准提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1260型高效液相色谱(HPLC)仪,包括G1314F紫外检测器(美国Agilent公司);KQ-700DE型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);AE240型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司)。

1.2 药品与试剂

腰痛宁胶囊(颈复康药业集团有限公司,批号:491044、491196、491197、491198,规格:0.3 g/粒);甘草酸铵对照品(批号:110731-201317,纯度:92.6%)、甘草次酸对照品(批号:110723-200612,纯度:98.5%)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Agilent TC-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A)-0.2 mol/L乙酸铵溶液(B,每100 ml含1 ml 36%乙酸),梯度洗脱(0~35 min,57%→90%A;35~40 min,90%A);流速:1.0 ml/min;检测波长:250 nm;柱温:25℃;进样量:10 μl。在上述色谱条件下,理论板数以甘草酸铵峰计不低于4 000,甘草酸铵、甘草次酸峰分离度均>1.5,各成分基线分离良好,详见图1。

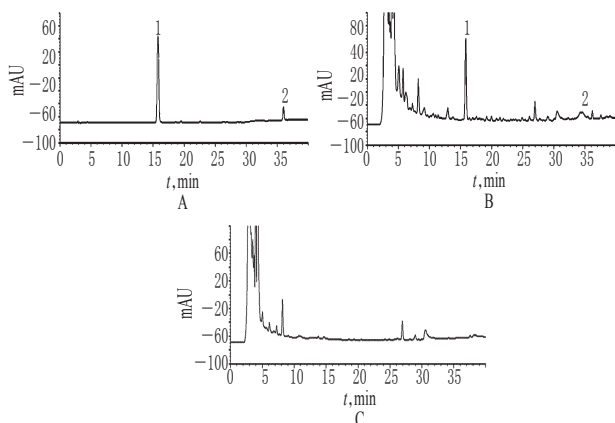


图1 高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.甘草酸铵;2.甘草次酸

Fig 1 HPLC chromatograms

A.reference substance;B.test sample;C.negative control;1.licorice ammonium; 2.glycyrrhetic acid

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取甘草次酸对照品适量,置于25 ml量瓶中,用甲醇溶解并定容,得质量浓度为0.887 0 mg/ml的甘草次酸对照品溶液。精密称取甘草酸铵对照品适量,同时精密吸取上述甘草次酸对照品溶液0.5 ml,置于25 ml量瓶中,用甲醇溶解并定容,摇匀,制成质量浓度分别为0.355 9 mg/ml、17.740 0 μg/ml的甘草酸铵、甘草次酸混合对照品溶液(折合成甘草酸每1 ml含0.348 7 mg)。

2.2.2 供试品溶液 精密称取样品内容物2 g,研细,滤纸包好后置于索氏提取器中,加乙醚60 ml,50℃水浴回流提取1.5 h,弃去乙醚提取液,提取物置于150 ml圆底烧瓶中,加95%甲醇50 ml,摇匀,置于85℃水浴锅上回流提取1.5 h,放至室温,滤过,将滤渣及滤纸放回圆底烧瓶,再加入95%甲醇50 ml,置于85℃水浴锅上回流提取1.5 h,放至室温,滤过,用95%甲醇20 ml洗瓶,5 ml洗滤纸,合并2次滤液及洗液,蒸干,残渣用甲醇溶解,置于25 ml量瓶中,超声(功率:420 W,频率:40 kHz)处理1 min,用甲醇定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液 按腰痛宁胶囊的处方及制备工艺制备各缺甘草的阴性样品,取适量按“2.2.2”项下方法操作,即得阴性对照溶液。

2.3 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释后制备成甘草酸铵质量浓度分别为0.007 1、0.017 8、0.035 6、0.071 2、0.106 8、0.142 4、0.178 0 mg/ml,甘草次酸质量浓度分别为0.354 8、0.887 0、1.774 0、3.548 0、5.232 0、6.976 0、8.720 0 μg/ml的系列混合对照品溶液,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以峰面积(y)为纵坐标、质量浓度(x, μg/ml)为横坐标进行线性回归,得甘草酸铵、甘草次酸回归方程分别为 $y=8\ 337.574\ 6x-7.191\ 5$ ($r=0.999\ 8$)、 $y=16\ 469.480\ 4x+10.474\ 9$ ($r=0.999\ 8$)。结果表明,甘草酸铵、甘草次酸检测质量浓度线性范围分别为0.007 1~0.178 0 mg/ml、0.354 8~8.720 0 μg/ml。

2.4 精密度的试验

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液10 μl,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次测定,记录峰面积。结果,甘草酸铵、甘草次酸峰面积的RSD分别为1.30%、1.06% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取同一供试品溶液(批号:491044)适量,于室温下放置0、2、4、8、16、24 h时进样测定,记录峰面积。结果,甘草酸铵、甘草次酸峰面积的RSD分别为0.78%、1.18% ($n=6$),表明供试品溶液在24 h内基本稳定。

2.6 重复性试验

精密称取同一批样品(批号:491044)适量,共6份,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。结果,甘草酸铵、甘草次酸峰面积的RSD分别为1.74%、0.95% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

取样品(批号:491044)适量,共9份,分别加入适量对照品,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并计算加样回收率,结果见表1。

2.8 样品含量测定

取后3批样品各适量,分别按“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并计算含量,结果见表2。

表1 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery test(n=9)

待测成分	称样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
甘草酸铵	1.000	1.090	0.546	1.623	97.62	96.98	1.98
	1.000	1.091	0.546	1.613	95.60		
	1.000	1.091	0.546	1.615	95.97		
	1.000	1.090	1.109	2.147	95.49		
	1.000	1.090	1.109	2.147	97.66		
	1.000	1.090	1.109	2.145	95.94		
	1.000	1.091	1.622	2.680	97.97		
	1.000	1.091	1.622	2.723	100.62		
	1.000	1.090	1.622	2.723	100.06		
	1.000	33.400	17.000	50.300	99.47		
甘草次酸	1.000	33.400	17.000	50.700	101.60	99.28	1.78
	1.000	33.400	17.000	50.800	102.26		
	1.000	33.300	34.100	66.800	98.31		
	1.000	33.300	34.100	67.000	98.95		
	1.000	33.300	34.100	66.700	97.94		
	1.000	33.400	50.300	82.100	96.80		
	1.000	33.400	50.300	82.800	98.24		
	1.000	33.400	50.300	83.700	99.98		

表2 样品含量测定结果(n=3)

Tab 2 Results of contents determination of samples(n=3)

批号	甘草酸, mg/粒	甘草次酸, μg/粒
491196	0.327 3	7.380
491197	0.332 6	8.800
491198	0.326 0	7.700

3 讨论

3.1 提取条件的选择

前期在提取方法的选择过程中笔者考察了氯仿加盐酸回流提取法^[5]、超声提取法^[6]及2010年版《中国药典》(一部)腰痛宁胶囊供试品溶液制备法^[1]。前两种方法对甘草次酸的提取率高,但对甘草酸的提取率不高,后一种方法与前两种方法刚好相反;进而又考察了甲醇、乙醇和氯仿回流提取法及超声提取法、索氏提取法的提取率。综合分析,以95%甲醇回流提取对甘草酸和甘草次酸的提取率相对较高。

3.2 检测波长的选择

2010年版《中国药典》(一部)腰痛宁胶囊中甘草酸的测定选用的波长为250 nm,且相关文献中对甘草酸和甘草次酸的测定也采用250 nm^[7-8],而紫外光谱扫描也表明两者在250 nm波长处均有较大吸收。因此,本试验检测波长设定为250 nm。

3.3 色谱柱的选择

2010年版《中国药典》(一部)及相关文献中甘草酸和甘草次酸的含量测定大多采用C₁₈色谱柱^[9-10]。因此,本试验过程中比较了Agilent TC-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、CAPCELL PAK C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),Kromasil 100Å C₁₈(250 mm×

4.6 mm, 5 μm)。通过比较本研究最终采用Agilent TC-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),该色谱柱能较好地腰痛宁胶囊中的甘草酸与甘草次酸2种成分分离,且峰形较好。

3.4 流动相系统的选择

笔者对比了甲醇-水、乙腈-水等流动相系统,又基于2010年版《中国药典》(一部)腰痛宁胶囊甘草酸的含量测定所用流动相,即甲醇-0.2 mol/L乙酸铵溶液(每100 ml含1 ml 36%乙酸),考察了该流动相等度洗脱、多种梯度洗脱方式,最后确定了本文中的流动相系统(梯度洗脱)。该流动相系统既缩短了单样本测定周期,又不会影响待测物峰形,可快速而高效地同时测定腰痛宁胶囊中甘草酸和甘草次酸的含量。

综上所述,该方法操作简单、重复性好,测定结果准确、可靠,可用于同时测定腰痛宁胶囊中甘草酸和甘草次酸的含量。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:1 191.
- [2] Park HY, Park SH, Yoon HK, et al. Anti-allergic activity of 18beta-glycyrrhetic acid-3-O-beta-D-glucuronide[J]. *Arch Pharm Res*, 2004, 27(1):57.
- [3] Jung GD, Yang JY, Song ES, et al. Stimulation of melanogenesis by glycyrrhizin in B16 melanoma cells[J]. *Exp Mol Med*, 2001, 33(3):131.
- [4] 张友波,徐崑,杨秀伟,等.RP-HPLC法同时测定不同产地甘草中9个主要成分的含量[J]. *药物分析杂志*, 2013, 33(2):214.
- [5] 刘迎春,宋学军,王国清,等.RP-HPLC法测定玄参甘桔颗粒中甘草次酸含量[J]. *沈阳药科大学学报*, 2006, 23(6):377.
- [6] 彭朝霞,张远杰,熊然英.HPLC法测定陈香露白露片中甘草次酸的含量[J]. *中国现代医药*, 2007, 9(9):18.
- [7] 孙浩洋,李清,陈威,等.甘草次酸差向异构体单独和联合给药后在大鼠体内的药理学研究[J]. *药学报*, 2012, 47(1):94.
- [8] 宋丽军,谭晓梅,罗佳波.HPLC法同时测定甘草中甘草苷、甘草酸、甘草次酸含量[J]. *中药材*, 2009, 32(3):378.
- [9] 宋杏花,吴刘胜,邓艳,等.神怡颗粒质量标准中关于甘草酸与甘草次酸含量的测定研究[J]. *求医问药*, 2012, 10(11):23.
- [10] 李丽,师永清.HPLC法测定加味霍香正气丸中甘草酸的含量[J]. *中国药房*, 2007, 18(33):2 605.

(收稿日期:2014-11-27 修回日期:2015-05-26)

(编辑:张 静)

《中国药房》杂志——RCCSE中国核心学术期刊,欢迎投稿、订阅