

HPLC法同时测定五味沙棘颗粒中甘草苷和甘草酸的含量^Δ

耿 婕^{1*}, 那顺朝克图¹, 丛丽华², 樊精辉², 赵春雨¹, 薛培凤^{1#} (1. 内蒙古医科大学药学院, 呼和浩特 010110; 2. 内蒙古宇航人药业有限责任公司, 呼和浩特 011517)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)27-3836-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.27.25

摘要 目的: 建立同时测定五味沙棘颗粒中甘草苷和甘草酸含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为 Thermo scientific ODS-2 Hypersil, 流动相为乙腈-0.5% 磷酸溶液 (梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 237 nm, 柱温为 25 ℃, 进样量为 20 μL。结果: 甘草苷和甘草酸检测进样量线性范围分别为 48~480 μg ($r=0.999\ 9$)、90~900 μg ($r=0.999\ 9$); 定量限分别为 0.55、2.10 μg/mL, 检测限分别为 0.16、0.62 μg/mL; 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD < 2.0%; 加样回收率分别为 95.08%~97.58% (RSD = 0.93%, $n=6$)、95.86%~99.89% (RSD = 1.67%, $n=6$)。结论: 该方法简单准确、重复性好, 适用于五味沙棘颗粒中甘草苷和甘草酸含量的同时测定。

关键词 高效液相色谱法; 五味沙棘颗粒; 甘草苷; 甘草酸; 含量测定

Simultaneous Determination of Liquiritin and Glycyrrhizic Acid in Wuwei Shaji Granules by HPLC

GENG Jie¹, Nashunchaoketu¹, CONG Lihua², FAN Jinghui², ZHAO Chunyu¹, XUE Peifeng¹ (1. School of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China; 2. Inner Mongolia Yuhangren Pharmaceutical Co., Ltd., Hohhot 011517, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of liquiritin and glycyrrhizic acid in Wuwei shaji granules. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Thermo scientific ODS-2 Hypersil column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.5% phosphoric acid (gradient elution) with flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 237 nm, and column temperature was 25 ℃. The sample size was 20 μL. RESULTS: The linear ranges of liquiritin and glycyrrhizic acid were 48-480 μg ($r=0.999\ 9$) and 90-900 μg ($r=0.999\ 9$), respectively. The limits of quantitation were 0.55, 2.10 μg/mL, and the limits of detection were 0.16, 0.62 μg/mL. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2.0%. The recoveries were 95.08%-97.58% (RSD = 0.93%, $n=6$) and 95.86%-99.89% (RSD = 1.67%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, and can be used for the content determination of liquiritin and glycyrrhizic acid in Wuwei shaji granules.

KEYWORDS HPLC; Wuwei shaji granules; Liquiritin; Glycyrrhizic acid; Content determination

五味沙棘颗粒源于蒙医清肺祛痰之主方五味沙棘散, 由五味沙棘散剂型改变而成, 由沙棘膏、木香、白葡萄干、甘草、栀子等五味中药材组成^[1-2], 具有清热祛痰、止咳定喘之功效, 常用于肺热久咳、胸中满闷、胸胁作痛、慢性支气管炎见上述证候者。现代药理研究表明, 该制剂可显著改善慢性支气管炎模型小鼠的炎症病变, 增强小鼠免疫功能^[3], 改善慢性阻塞性肺疾病模型小鼠的肺部病变^[4]。本课题组在前期研究的基础上建立了测定五味沙棘颗粒中异鼠李素及栀子苷含量的方法^[5-6], 但是目前尚未有测定该制剂中甘草主要成分(甘草苷和甘草酸)的方法。鉴于此, 本课题组参考 2015 年版《中国药典》(一部)^[7]及文献[8-9], 采用高效液相色谱法

(HPLC)建立了同时测定该制剂中甘草苷和甘草酸含量的方法, 以期完善该制剂的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

e2695 型 HPLC 仪, 包括四元梯度泵、在线脱气机、柱温箱、自动进样器、二极管阵列检测器以及 Empower 色谱工作站 (美国 Waters 公司); KQ-250DA 型数控超声清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); IKA RV10 型旋转蒸发仪 (德国 IKA 公司); AB135-S 型及 AL204 型万分之一电子分析天平 (瑞典 Mettler-Toledo 公司); Milli-Q Advntage A10 型超纯水仪 (美国 Millipore 公司)。

1.2 药品与试剂

五味沙棘颗粒 (内蒙古宇航人药业有限责任公司, 批号: 20110102、20110201、20110401、20110701、20130201、20131101, 规格: 6 g/袋); 甘草苷对照品 (批号: 120522, 纯度: ≥98%)、甘草酸对照品 (批号: 120512, 纯度: ≥98%) 均购自成都植化纯生物技术有限公司; 乙腈为色谱纯, 甲醇和磷酸为分析纯, 水为纯化水。

^Δ 基金项目: 国家科技支撑计划项目 (No.2011BAI07B02); 内蒙古自治区“草原英才”项目 (No.内组通字[2014]27 号)

* 硕士。研究方向: 中蒙药药效物质基础及质量控制。电话: 0471-6653178。E-mail: gebi_888@163.com

通信作者: 教授, 博士。研究方向: 中蒙药药效物质基础及质量控制。电话: 0471-6653146。E-mail: xpfdc@vip.sina.com

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Thermo scientific ODS-2 Hypersil(250 mm×4.6 mm,5μm);流动相:乙腈(A)-0.5%磷酸溶液(B),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.0 mL/min;检测波长:237 nm;柱温:25 ℃;进样量:20 μL。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedure

时间,min	A,%	B,%
0	13	87
8	13	87
35	50	50
36	95	5
42	95	5
45	13	87

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 取甘草苷和甘草酸对照品适量,精密称定,加90%甲醇溶液制成每1 mL含甘草苷0.12 mg、甘草酸0.28 mg的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品1.3 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,加90%甲醇溶液100 mL,密塞,超声(功率:250 W,频率:40 kHz,下同)处理15 min,经0.45 μm微孔滤膜滤过,分别用90%甲醇溶液洗涤药渣及滤器3次,每次10 mL,合并滤液及洗液,蒸干,残渣加90%甲醇溶液使溶解,转移至25 mL量瓶中,并加90%甲醇溶液定容,摇匀,即得。

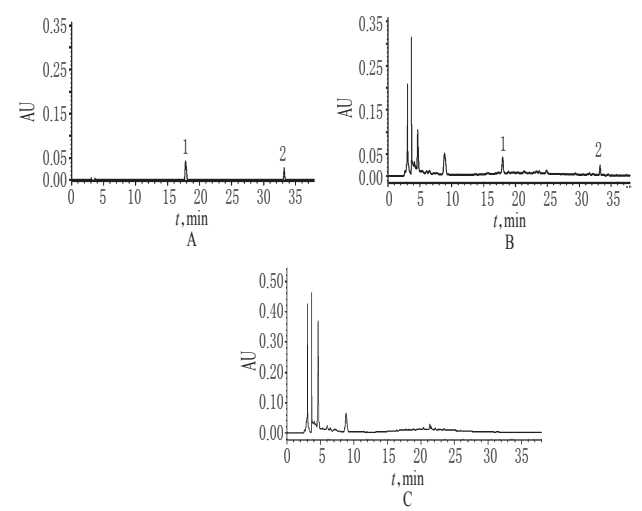
2.2.3 阴性对照溶液 按样品的处方比例和制备工艺制备缺甘草的阴性样品,再按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液。

2.3 系统适用性与专属性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。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;理论板数以甘草苷峰计为6 400,保留时间为17.9 min;供试品色谱图在与对照品相应的保留时间处有相同的色谱峰,阴性对照溶液在此处无色谱峰,表明其他成分对测定无干扰,专属性良好。

2.4 线性关系考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,加90%甲醇溶液稀释成甘草苷和甘草酸质量浓度分别为0.024、0.045 mg/mL的混合对照品溶液,精密吸取上述溶液各2、4、8、12、16、20 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面



A.混合对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.甘草苷;2.甘草酸
A.mixed control;B.test sample;C.negative control;1.Liquiritin;2.glycyrrhizic acid

图1 高效液相色谱图
Fig 1 HPLC chromatograms

积。以甘草苷和甘草酸进样量(x,μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得甘草苷回归方程为y=2.0×10⁶x+903.66(r=0.999 9),甘草酸回归方程为y=5.2×10⁵x+1 175.3(r=0.999 9)。结果表明,甘草苷和甘草酸检测进样量线性范围分别为48~480、90~900 μg。

2.5 定量限(LOQ)与检测限(LOD)考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得LOQ;当信噪比为3:1时,得LOD。结果,甘草苷和甘草酸的LOQ分别为0.55、2.10 μg/mL;LOD分别为0.16、0.62 μg/mL。

2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,甘草苷和甘草酸峰面积的RSD分别为0.39%、0.18%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:20110701)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,甘草苷和甘草酸峰面积的RSD分别为0.25%、0.25%(n=6),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取样品(批号:20110701)适量,共6份,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,记录峰面积并计算含量。结果,甘草苷和

甘草酸含量的平均值分别为0.244 2、0.409 3 mg/g, RSD分别为1.01%、0.93%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取样品(批号:20110701)适量,共6份,精密称定,分别加入一定质量的甘草苷和甘草酸对照品,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,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果($n=6$)
Tab 2 Results of recovery tests($n=6$)

待测成分	取样量,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,%
甘草苷	0.665 9	0.162 6	0.1200	0.278 3	96.42	96.01	0.93
	0.665 9	0.162 6	0.120 0	0.277 2	95.50		
	0.666 4	0.162 7	0.120 0	0.277 8	95.92		
	0.666 3	0.162 7	0.120 0	0.276 8	95.08		
	0.666 6	0.162 8	0.120 0	0.279 9	97.58		
	0.666 4	0.162 7	0.120 0	0.277 4	95.58		
甘草酸	0.665 9	0.272 6	0.280 0	0.547 2	98.07	97.38	1.67
	0.665 9	0.272 6	0.280 0	0.541 0	95.86		
	0.666 4	0.272 8	0.280 0	0.548 0	98.29		
	0.666 3	0.272 7	0.280 0	0.541 9	96.14		
	0.666 6	0.272 8	0.280 0	0.552 5	99.89		
	0.666 4	0.272 8	0.280 0	0.541 7	96.04		

2.10 样品含量测定

取5批样品各适量,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,记录峰面积并计算甘草苷和甘草酸的含量,结果见表3。

表3 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 3 Results of content determination of samples($n=3$)

样品批号	甘草苷		甘草酸	
	平均含量,mg/g	RSD,%	平均含量,mg/g	RSD,%
20110102	0.180 3	2.1	0.351 3	1.1
20110201	0.178 8		0.345 4	
20110401	0.247 0		0.413 4	
20110701	0.244 2		0.409 3	
20130201	0.268 1		0.516 7	
20131101	0.306 9		0.521 1	

3 讨论

3.1 提取工艺的确定

3.1.1 提取方法的选择 本试验分别考察了超声提取和回流提取两种方法,结果超声和回流两种提取方法对样品的提取率差异不大,综合考虑超声提取法简单易行,因此选择超声为本试验的提取方法。

3.1.2 提取溶剂的选择 本试验对提取溶剂甲醇和乙醇进行了考察,结果发现两种溶剂提取甘草苷时提取率无明显差异,而甲醇提取甘草酸时提取率比乙醇高,故

选择甲醇为提取溶剂。

3.1.3 提取工艺的确定 本试验以甲醇浓度(%)、甲醇体积(mL)和提取时间(min)为考察因素,应用 $L_9(3^4)$ 正交表确定了最优提取方法为90%甲醇溶液100 mL,超声提取15 min。

3.2 流动相的选择

本试验考察了乙腈-水、乙腈-1.0%磷酸溶液、乙腈-0.5%磷酸溶液和甲醇-0.5%磷酸溶液4种不同的流动相,其中甲醇-0.5%磷酸溶液和乙腈-水为流动相时,色谱分离度较差;乙腈-1.0%磷酸溶液为流动相时杂质峰较多;乙腈-0.5%磷酸溶液为流动相时,色谱分离度较好且无杂质峰干扰,故选择乙腈-0.5%磷酸溶液为本试验的流动相。

综上所述,本方法简单准确、重复性好,适用于五味沙棘颗粒中甘草苷和甘草酸含量的同时测定。

参考文献

[1] 白青云.中国百科全书·蒙医学[M].上海:上海科技出版社,1992:267.

[2] 苏日娜.五味沙棘散研究进展[J].北方药学,2012,9(5):103-104.

[3] 包桂兰,于丽君,翟景波,等.五味沙棘散对慢性支气管炎模型抗炎和免疫作用的研究[J].中药药理与临床,2012,28(5):58-59.

[4] 布林白拉,斯琴塔娜,奥登塔娜,等.蒙药沙棘五味散对慢性阻塞性肺病模型的作用[J].亚太传统医药,2016,12(24):11-12.

[5] 耿婕,薛培凤,赵子龙,等.高效液相色谱法测定五味沙棘颗粒中异鼠李素含量[J].中国药业,2013,22(21):27-28.

[6] 薛培凤,朝克图,耿婕,等.HPLC法测定五味沙棘颗粒中栀子苷的含量[C]//中华中医药学会.中华中医药学会第七次中药分析学术交流会会议论文集.北京:中华中医药学会,2014:246-249.

[7] 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,2015:86,535,616-617.

[8] 刘敏,周桂华,卢全德.高效液相色谱法测定五味沙棘散中栀子苷的含量[J].中国医院药学杂志,2008,28(20):1803-1804.

[9] 拉喜那木吉拉,巴根那.HPLC测定蒙药五味沙棘散中栀子苷含量[J].中国现代中药,2007,9(6):18-20.

(收稿日期:2017-01-12 修回日期:2017-06-23)

(编辑:刘 柳)