

HPLC法同时测定附子理中丸(浓缩丸)中甘草苷和甘草酸的含量

方东伟*,彭佳庆(鄂州市食品药品检验检测中心,湖北鄂州 436000)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)36-5147-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.36.28

摘要 目的:建立同时测定附子理中丸(浓缩丸)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WondaSil C₁₈,流动相为乙腈-0.05%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35 ℃,进样量为10 μL。结果:甘草苷和甘草酸检测质量浓度线性范围分别为9.68~96.8 μg/mL($r=0.999\ 1$)、14.08~140.8 μg/mL($r=0.999\ 2$);定量限分别为0.2、0.3 μg/mL,检测限分别为0.1、0.01 μg/mL;精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率分别为98.9%~101.2%(RSD=0.62%, $n=9$)、98.6%~101.5%(RSD=1.06%, $n=9$)。结论:该方法操作简便、结果准确,可用于附子理中丸(浓缩丸)中甘草苷和甘草酸含量的同时测定。

关键词 附子理中丸(浓缩丸);高效液相色谱法;甘草苷;甘草酸;含量测定

Simultaneous Determination of Liquiritin and Glycyrrhizic Acid in Fuzi Lizhong Pills (Condensed Pills) by HPLC

FANG Dongwei, PENG Jiaqing (Ezhou Center for Food and Drug Control, Hubei Ezhou 436000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for simultaneous determination of liquiritin and glycyrrhizic acid in Fuzi lizhong pills (condensed pills). METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on WondaSil C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.05% phosphate solution (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 237 nm, and column temperature was 35 ℃. The sample size was 10 μL. RESULTS: The linear range of liquiritin and glycyrrhizic acid were 9.68-96.8 μg/mL ($r=0.999\ 1$) and 14.08-140.8 μg/mL ($r=0.999\ 2$). The limits of quantitation were 0.2, 0.3 μg/mL, and the limits of detection were 0.1, 0.01 μg/mL. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2.0%. The average recoveries were 98.9%-101.2% (RSD=0.62%, $n=9$), 98.6%-101.5% (RSD=1.06%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple and accurate, and can be used for simultaneous determination of liquiritin and glycyrrhizic acid in Fuzi lizhong pills (condensed pills).

KEYWORDS Fuzi lizhong pills (condensed pills); HPLC; Liquiritin; Glycyrrhizic acid; Content determination

附子理中丸(浓缩丸)是由附子(制)、党参、白术(炒)、干姜、甘草五味中药制成的浓缩丸剂,具有温中健脾的功效,可用于脾胃虚寒、脘腹冷痛、呕吐泄泻、手足不温等的治疗^[1-4]。该制剂收载于我国《卫生部颁药品标准·中药成方制剂》(第7册)^[5],该标准中无含量测定

项,且目前尚未有同时测定附子理中丸(浓缩丸)中甘草苷和甘草酸含量的报道。鉴于此,笔者参考相关文献^[6-9],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。

- [12] 罗建光,孔令义.巴西甘薯叶黄酮类成分的研究[J].中国中药杂志,2005,30(7):516-518.
- [13] Fuchino H, Satoh T, Tanaka N. Chemical evaluation of betula species in Japan. III. constituents of *Betula maximowicziana*[J]. *Chem Pharm Bull*, 1996, 44(9): 1748-1753.
- [14] Jutiviboonsuk A, Zhang H, Tan GT, et al. Bioactive constituents from roots of *Bursera tonkinensis*[J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(23): 2745-2751.
- [15] Wang LY, Unehara N, Kitanaka S. Lignans from the roots of *Wikstroemia indica* and their DPPH radical scaveng-

- ing and nitric oxide inhibitory activities[J]. *Chem Pharm Bull*, 2005, 53(10): 1348-1351.
- [16] 李行任,罗杨合,何隽,等.葶苈皮酚性成分及其抗氧化活性研究[J].天然产物研究与开发,2013,25(12): 1615-1620.
- [17] 李兴玉,龙春林,王跃虎,等.中华山蓼化学成分研究[J].天然产物研究与开发,2008,20(5):816-820.
- [18] 于丽红,赵伟,黄肖霄,等.毛樱桃叶化学成分分离与鉴定[J].沈阳药科大学学报,2015,32(4):256-260.

(收稿日期:2017-07-12 修回日期:2017-08-30)

(编辑:张静)

* 副主任药师。研究方向:药物分析。电话:0711-3863027。
E-mail:fdw-001@163.com

1 材料

1.1 仪器

LC-20AT型HPLC仪,包括SIL-20A自动进样器、SPD-M20A检测器、LC-Solution工作站(日本Shimadzu公司);LC-350A型超声波处理器(济宁市鲁超仪器有限公司);BS21S型、BS210S型电子分析天平(德国Sartorius公司);Milli-Q Advantage A10型超纯水仪(美国Millipore公司)

1.2 药品与试剂

附子理中丸(浓缩丸)(河南宛西制药股份有限公司,批号:140601;兰州佛慈溪制药股份有限公司,批号:14M39;兰州太宝制药有限公司,批号:81150110;芜湖张恒春药业有限公司,批号:1505111;马鞍山天福康药业有限公司,批号:201410022;陕西天洋制药有限公司,批号:20140304;规格:每8丸相当于原生药3g);甘草苷对照品(批号:111610-201005,纯度:94.9%)、甘草酸铵对照品(批号:110731-201116,纯度:93.1%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:WondaSil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.05%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~8 min, 19% A; 8~35 min, 19%→50% A; 35~36 min, 50%→100% A; 36~40 min, 100%→19% A);流速:1.0 mL/min;检测波长:237 nm;柱温:35℃;进样量:10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取甘草苷对照品4.84 mg,甘草酸铵对照品7.18 mg(甘草酸质量=甘草酸铵的质量/1.0207,即约为7.03 mg),置于同一50 mL量瓶中,用70%乙醇溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

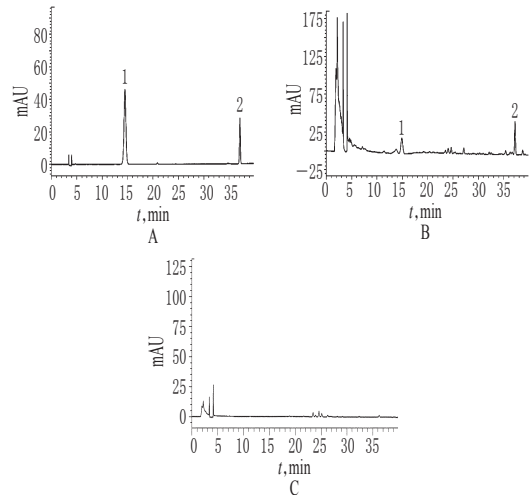
2.2.2 供试品溶液 精密称取样品粉末0.5 g,置于25 mL量瓶中,加70%乙醇溶液适量,超声(功率:250 W,频率:33 kHz,下同)处理30 min,冷却至室温,加70%乙醇溶液定容,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按样品的制备工艺和处方比例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≥5 000,保留时间为14.7 min。结果表明,其他

成分对测定无干扰。



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.glycyrrhizin; 2.glycyrrhizic acid

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液1、2、3、4、6、8 mL,分别置于10 mL量瓶中,加70%乙醇溶液定容,摇匀,即得系列混合对照品溶液。取上述系列混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以甘草苷和甘草酸质量浓度($x, \mu\text{g/mL}$)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 $y=16\,475x-73\,589$ ($r=0.999\,1$)、甘草酸回归方程为 $y=3\,107.9x-19\,221$ ($r=0.999\,2$)。结果表明,甘草苷和甘草酸检测质量浓度线性范围分别为9.68~96.8、14.08~140.8 μg/mL。

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0.2、0.3 μg/mL,LOD分别为0.1、0.01 μg/mL。

2.6 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,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0.85%、1.06%($n=6$),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:140601)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、12 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0.21%、0.22%($n=5$),表明供试品溶液在室温下放置12 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取样品(批号:140601)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,甘草苷和甘草酸含量的平均值分别为2.65、6.80 mg/g, RSD分别为0.94%、0.39% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取样品(批号:140601)适量,共9份,每份约0.2 g,分别置于10 mL量瓶中,各加入低、中、高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1。

表1 加样回收率试验结果($n=9$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=9$)

待测成分	取样量, g	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
甘草苷	0.199 0	526.4	367.6	893.0	99.7	99.9	0.62
	0.198 0	522.7	367.6	889.8	99.9		
	0.198 8	524.8	367.6	892.8	100.1		
	0.197 8	522.2	459.5	982.4	100.2		
	0.198 3	523.5	459.5	988.5	101.2		
	0.197 6	521.7	459.5	980.1	99.8		
	0.199 2	525.9	551.4	1 075.3	99.6		
	0.200 2	528.5	551.4	1 073.8	98.9		
	0.199 2	525.9	551.4	1 075.3	99.6		
	甘草酸	0.199 0	1 345.2	524.4	1 870.8		
0.198 0	1 338.5	524.4	1 864.6	100.3			
0.198 8	1 343.9	524.4	1 868.3	99.4			
0.197 8	1 337.1	655.5	1 986.6	99.1			
0.198 3	1 340.5	655.5	1 988.1	98.8			
0.197 6	1 335.8	655.5	1 986.3	99.2			
0.199 2	1 346.6	786.6	2 122.4	98.6			
0.200 2	1 353.4	786.6	2 130.2	101.3			
0.199 2	1 346.6	786.6	2 145.2	101.5			

2.10 样品含量测定

取6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,记录峰面积并计算样品含量,结果见表2。

3 讨论

3.1 流动相的选择

笔者曾考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.05%磷酸溶液为流动相时的色谱情况,结果以甲醇-水、乙腈-水为流动相进行梯度洗脱时,甘草苷、甘草酸峰与干扰峰不能有效分离,而采用乙腈-0.05%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱时,洗脱时间适宜,各峰分离较好。因此,本试验

表2 样品含量测定结果($n=3, \text{mg/g}$)

Tab 2 Results of content determination of samples ($n=3, \text{mg/g}$)

样品批号	甘草苷	甘草酸
140601	2.64	6.76
14M39	1.79	5.69
81150110	0.83	2.83
1505111	0.35	1.83
201410022	1.91	6.72
20140304	1.87	5.98

选择乙腈-0.05%磷酸溶液为流动相。

3.2 超声提取时间的选择

笔者考察了超声处理时间(10、20、30、40 min)对样品提取率的影响。结果,随着超声处理时间的延长,样品的提取率增加,但是超声处理30 min和40 min时的样品提取率基本一致,为节约试验时间,本试验选择超声处理时间为30 min。

综上所述,本方法操作简便、结果准确,可用于附子理中丸(浓缩丸)中甘草苷和甘草酸含量的同时测定。

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, 2015:1013-1014.
- [2] 谢亚晶, 席珊珊. HPLC法测定附子理中丸(水蜜丸)含量[J]. 黑龙江科技信息, 2016, 14(5):8.
- [3] 姜秀晶, 贾诚, 李锦. 附子理中丸中甘草酸含量的HPLC测定[J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25(2):66-68.
- [4] 钟碧华, 陆帅. HPLC法测定附子理中丸中乌头碱的含量[J]. 海峡药学, 2014, 26(11):115-117.
- [5] 卫生部药典委员会. 卫生部颁药品标准: WS₃-B-1350-93 [S]. 1992.
- [6] 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.
- [7] 傅勇, 李旭, 虞金宝. HPLC法测定红花逍遥片中芍药苷及甘草苷含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24):152-154.
- [8] 张俊燕. HPLC法测定固本咳喘片中甘草酸和补骨脂素的含量[J]. 药学与临床研究, 2012, 20(4):379-380.
- [9] 曾英彤, 黄志军, 李泽华. HPLC法测定复方甘草片中甘草酸的含量[J]. 中国药师, 2009, 12(11):1584-1585.

(收稿日期:2017-06-08 修回日期:2017-07-28)

(编辑:刘柳)