

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.11.06

高效液相色谱法测定山苓健胃颗粒中甘草酸的含量

唐 棣,金明露,葛 荣,贺 超

(四川省兽药监察所,成都 610041)

[收稿日期] 2019-08-06 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2019)11-0034-05 [中图分类号] S859.2

[摘要] 为测定山苓健胃颗粒中甘草酸的含量,采用 C18 柱(5 μm , 250 mm \times 4.6 mm),在室温下,以甲醇-0.2 mol/L 醋酸铵溶液-冰醋酸(65:35:1, V/V)为流动相,250 nm 为检测波长,流速 1.0 mL/min,建立了高效液相色谱测定方法。结果表明,甘草酸在 3.274~49.11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内,线性关系良好($r=0.9996$),平均回收率为 99.9%,RSD 为 1.30%。本方法准确、简便、快速,可用于控制山苓健胃颗粒中甘草酸的含量。

[关键词] 山苓健胃颗粒;高效液相色谱法;甘草酸

The Content of Glycyrrhizic Acid in Shanlingjianwei Granule Determined by HPLC

TANG Di, JIN Ming-lu, GE Rong, HE Chao

(Sichuan Institute of Veterinary Drug Control, Chengdu 610041, China)

Abstract: The content of glycyrrhizic in Shanlingjianwei granules was determined. Using C18 column(5 μm , 250 mm \times 4.6 mm) at room temperature, methanol-0.2 mol/L ammonium acetate solution-glacial acetic acid (65:35:1, V/V) was used as the mobile phase, the detection wavelength was 250 nm, the flow rate of 1.0 mL/min, a HPLC method for determination was established. The results showed that glycyrrhizic acid had a good linear relationship in the range of 3.274 ~ 49.11 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $r=0.9996$, the average recovery rate was 99.9% and RSD 1.30%. This method is accurate, simple and fast, and can be used to control the content of glycyrrhizic acid in Shanlingjianwei granules.

Key words: Shanlingjianwei granule; high performance liquid chromatography(HPLC); glycyrrhizic acid

山苓健胃颗粒是运用中兽医传统理论研制的中兽药三类新药,处方由山楂、茯苓、甘草等药材组成,采用提取精制的方法制成中药颗粒剂,具有开胃消滞、健脾除湿之效,用于防治仔猪积滞,脾运失

常的脾胃病。经反复试验研究并查找文献资料,证实处方中甘草除具有益气和中功效外,还具有对脾虚症的治疗作用,其原理是通过使肠上皮细胞的增值凋亡、黏膜的保护修复达到治愈脾虚状态下的

胃肠黏膜组织出现的病理性损伤^[1]。本试验拟建立山萼健胃颗粒中甘草的含量测定方法以控制山萼健胃颗粒的质量,为了更准确的反映甘草调和补脾益气 and 胃的主要药理活性成分,研究建立了采用反相高效液相法测定山萼健胃颗粒中甘草酸含量的方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器 安捷伦 1100 型高效液相色谱仪,岛津 LC20 高效液相色谱仪;色谱柱 AgilentXDB - C18 (5 μm , 250 mm \times 4.6 mm), Kromasil 100 - 5 - C18 (5 μm , 250 mm \times 4.6 mm);电子天平(型号 BP211D)购自德国塞托里斯公司。

1.2 试药与试剂 甘草酸铵对照品(批号为 110731 - 201619,标示含量为 93.0%)来源于中国食品药品检定研究院;山萼健胃颗粒样品(每 1 g 相当于原生药 3.461 g)三批,批号分别为 20140609、20140610、20140611,来源于 XX 动物保健科技有限公司;甲醇(色谱纯, Thermo fisher 公司,批号:201505026);冰醋酸,天津市科密欧化学试剂有限公司生产;水为纯化水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 流动相:甲醇 - 0.2 mol/L 醋酸钠溶液 - 冰醋酸(65:35:1);流速:1.0 mL/min;检测波长 250 nm;柱温:室温;进样量:20 μL 。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取甘草酸铵对照品适量,精密称定,加流动相制成每 1 mL 含甘草酸铵 16 μg (相当于甘草酸 15.67 μg)的溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品研细的粉末 0.70 g,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加流动相约 45 mL,超声处理(功率 300 W,频率 40 kHz)30 min,放冷,加流动相至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按处方及制法制备不含甘草的阴性制剂,取阴性制剂,按供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。

2.3 系统适用性和专属性试验 精密量取上述对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液各 20 μL ,注

入液相色谱仪,按 2.1 项色谱条件测定,结果理论塔板数以甘草酸峰计算为 9298,在供试品色谱图中甘草酸峰与相邻峰分离良好,分离度为 2.92,阴性对照色谱在与对照品色谱相同保留时间处无干扰峰(图 1)。结果表明,系统适用性满足检测要求;处方中其他成分对甘草酸定量检测无干扰,专属性能满足检测要求。

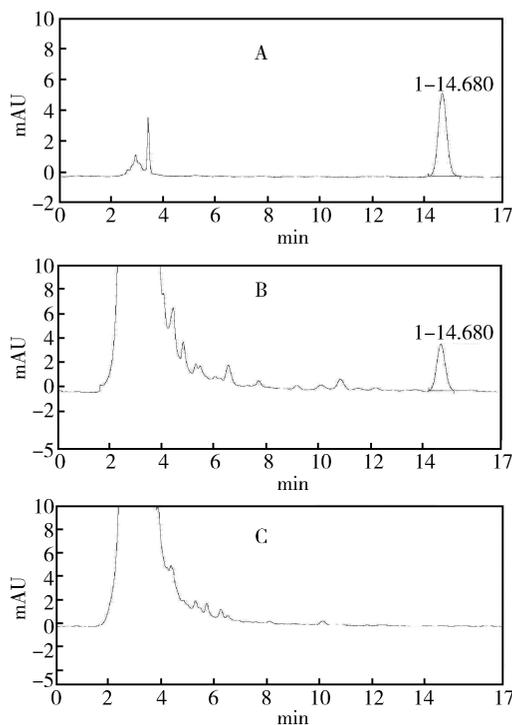


图 1 专属性试验色谱图(A、B、C 分别为甘草酸对照品、山萼健胃颗粒样品、缺甘草阴性样品)

Fig 1 HPLC chromatograms of specific test

(A: glycyrrhizic acid B: the sample

C: licorice negative control)

2.4 线性关系考察 取甘草酸铵对照品贮备液(相当于甘草酸浓度 0.3274 mg/mL),精密量取 1、1.3、5、1.3 mL,分别置 100、50、100、100、10、20 mL 量瓶中,分别加流动相至刻度,摇匀,制备的对照品溶液浓度分别为 3.274、6.548、9.822、16.37、32.74、49.11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。按上述色谱条件,分别进样 20 μL ,测定峰面积。以峰面积为纵坐标(Y),以进样浓度为横坐标(X),进行线性回归,得回归方程 $Y = 8.3005 X - 6.5611$, $r = 0.9996$ ($n = 6$),甘草酸在 3.274 ~ 49.11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好。

2.5 准确度 采用加标回收的方法,在已知含量的山苓健胃颗粒中,加入一定质量的甘草酸铵对照品,按供试品溶液制备方法制备,使其制备后在供试品中的量为其限度值的 80%、100% 和 120%,共制备 9 份。再按 2.1 项色谱条件测定峰面积,计算甘草酸的量,用实测值与供试品中含量之差,除以

加入对照品量,计算甘草酸回收率,即得。回收率 $R(100\%) = (\text{实测量} - \text{供试品中含有量}) / \text{添加量} \times 100\%$,测定结果表明,甘草酸的回收率在 98.2% ~ 102.6% 之间,平均回收率为 99.9%,RSD 为 1.30%,结果见表 1。

表 1 加样回收率试验

Tab 1 Recoveries of glycyrrhizic acid in preparation

编号	取样量/g	含量/mg	加入量/mg	峰面积	测得量/mg	回收率/%	平均/%	RSD/%
1	0.3061	0.2480	0.2208	71.578	0.4654	98.5%		
2	0.3092	0.2505	0.2208	71.868	0.4673	98.2%		
3	0.2998	0.2429	0.2208	72.203	0.4695	102.6%		
4	0.3081	0.2496	0.276	80.607	0.5242	99.5%		
5	0.3024	0.2450	0.276	80.196	0.5215	100.2%	99.9	1.30
6	0.3082	0.2497	0.276	80.689	0.5247	99.6%		
7	0.3011	0.2439	0.3312	88.739	0.5770	100.6%		
8	0.2997	0.2428	0.3312	88.544	0.5758	100.5%		
9	0.3065	0.2483	0.3312	88.98	0.5786	99.7%		

2.6 精密度 取供试品(批号为 20140609)溶液,精密量取 20 μL ,按 2.1 项色谱条件重复进样 6 次,测得甘草酸峰面积 RSD 为 1.30%,结果见表 2。

表 2 精密度试验

Tab 2 Precision test

序号	峰面积	平均峰面积	RSD/%
1	89.798		
2	89.933		
3	90.410	89.43	1.30
4	90.495		
5	88.030		
6	87.916		

2.7 耐用性 取同一批山苓健胃颗粒(批号为 20140609)样品,按 2.2 项下方法制成供试品溶液,保持流动相比比例和流速不变,在岛津 LC20 高效液相色谱仪和 Agilent1100 色谱仪上分别使用 Kromasil 100-5-C18 (5 μm , 250 mm \times 4.6 mm) 和 Agilent XDB-C18 (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm) 色谱柱,于 20、30、40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行测试,考察方法的耐用性,结果表明该方法能够耐受不同液相色谱仪、色谱柱、柱温等因素的小范围变化,测得山苓健胃颗粒中甘草酸的含量无明显差异,耐用性良好,结果见表 3。

表 3 耐用性试验

Tab 3 serviceability test

色谱柱	岛津 LC20 高效液相色谱仪			安捷伦 1100 型高效液相色谱仪		
	Kromasil 100-5-C18			Agilent XDB-C18 柱		
柱温/ $^{\circ}\text{C}$	20	30	40	20	30	40
含量/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	0.815	0.809	0.811	0.821	0.804	0.815

2.8 稳定性试验 取供试品(批号为 20140609)的样品,按 2.2 项下方法制成供试品溶液,立即测定,再在 2、4、6、8、10 h 进行测定,结果 RSD 为 0.45%,表明测定值在 10 h 内基本稳定,结果见表 4。

表 4 稳定性试验

Tab 4 Stability test

时间/h	峰面积	平均峰面积	RSD/%
0	89.249		
2	88.911		
4	88.298		
6	88.172	88.616	0.45
8	88.594		
10	88.471		

2.9 样品含量测定 取 3 批山苓健胃颗粒(批号分别为 20140609、20140610、20140611)分别按 2.2 项下方法制备供试品溶液,精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 20 μ L,上机测定峰面积,通过外标法计算甘草酸的含量,结果见表 5。

表 5 样品含量测定结果(mg/g)

Tab 5 Content determination results (unit:mg/g)

批号	含量 1	含量 2	平均值
20140609	0.8101	0.8122	0.811
20140610	0.8008	0.8078	0.804
20140611	0.8049	0.8075	0.806

3 讨论与结论

3.1 含量测定成分的选择 山苓健胃颗粒处方源于民间验方,由山楂、茯苓、甘草等药材组成,采用提取精制的方法制成中药颗粒剂,具有开胃消滞,健脾除湿之效,用于防治仔猪积滞,脾运失常的脾胃病。因其处方中的山药、茯苓等未能建立高效的液相检验方法,因此,选择甘草作为山苓健胃颗粒的含量测定指标。甘草中含有多种黄酮类化合物、三萜类化合物及香豆素、生物碱、氨基酸、雌性激素、有机酸等多种成分^[2-3]。其中三萜类化合物甘草酸是主要活性成分,其含量为 5% ~ 11% 左右^[4]。多项研究表明甘草的主要活性成分三萜类

(甘草酸类)能促进胃肠运动并保护肝脏,甘草酸可明显阻止四氯化碳、术后内毒素、脂多糖等物质诱导的肝细胞损伤,并能抑制实验性肝纤维和早期肝硬化的发生。脾虚状态下,甘草酸能作用肠上皮细胞增值凋亡、促进黏膜起保护作用^[1]。因此,山苓健胃颗粒中含量测定的成分选择甘草酸。采用 HPLC 测定山苓健胃颗粒中甘草酸的含量,操作简便,甘草酸在 3.274 ~ 49.11 μ g/mL 范围内线性关系良好,检测方法的准确度、精密性、日内稳定性和耐用性均能达到要求。

3.2 样品前处理方法的选择 甘草酸一般以钾盐或钙盐的形式存在于甘草中,具有显著的生物活性。其提取分离方法主要有稀氨水提取法,氨性醇提取法,酸水提取法,微波提取法等方法^[5-6]。参考 2015 年版《中华人民共和国兽药典》^[7]二部甘草颗粒含量测定项下前处理方法,本试验采用酸性甲醇作为溶剂,超声处理 30 min,结果证明该方法能够较为完全地提取出山苓健胃颗粒中的甘草酸,并且阴性对照无干扰。

3.3 色谱方法的选择 色谱方法中流动相各组分经反复试验筛选,最后采用了甲醇 - 0.2 mol/L 醋酸铵溶液 - 冰醋酸(65:35:1)的比例,处方中各有效成分峰的分度度最好,理论板数符合液相色谱分析要求,流速为 1.0 mL/min 条件下,方法稳定,重现性好。

高效液相法测定山苓健胃颗粒中甘草酸的含量,方法简便,准确,灵敏度高,回收率好,可有效控制该制剂中甘草的含量。

参考文献:

- [1] 杨柏灿. 至甘至纯—甘草新论[M]. 上海:上海科学出版社, 2015:10
Yangbaican. To Gan Zhi Chun - Licorice New Theory [M]. Shanghai: Shanghai Science Press, 2015:10
- [2] 程晓霞. 甘草及其制剂中甘草酸的定量方法研究概况[J]. 时珍国医国药, 2000, 11(4): 380-381.
Research overview of quantitative methods for glycyrrhizin in licorice root and its preparations [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2000, 11(4): 380-381.

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.11.07

玉屏风散与超微粉中毛蕊异黄酮 葡萄糖苷体外溶出率的研究

马霞^{1,3}, 周延州¹, 郭振环¹, 赵丽¹, 刘永录^{1*}, 王林², 张国祖³

(1. 河南牧业经济学院, 郑州 450046; 2. 河南省康星生物科技有限公司, 河南焦作 454950;

3. 河南省康星药业股份有限公司, 郑州 451464)

[收稿日期] 2019-07-06 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 11-0038-05 [中图分类号] S859.3

[摘要] 建立了玉屏风超微粉中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的高效液相色谱检测方法, 采用浆法测定了玉屏风超微粉和玉屏风散剂在人工胃液中的溶出率, 绘制累积溶出率曲线。结果表明, 玉屏风超微粉和散剂散剂的累积溶出率在 5 min 时迅速达到 73% 以上。超微粉和散剂的最快溶出时间段分别为 0~2 h 和 0~6 h, 最后都在 16 h 达到溶出平衡, 最高累积溶出率分别为 80.36% 和 77.51%。玉屏风超微粉中毛蕊异黄酮葡萄糖苷溶出速度快, 达峰时间短, 峰浓度高于散剂。

[关键词] 玉屏风超微粉; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 含量; 检测方法; 溶出率

基金项目: 河南牧业经济学院“中兽药生药学”重点培育学科项目 (HUAHF4100003); 河南牧业经济学院科研创新团队项目 (2018KYTD18)

作者简介: 马霞, 博士, 副教授, 从事中兽药制剂及药理学方向研究。

通讯作者: 刘永录。E-mail: yonglu2005@163.com

[3] 中国药科大学. 中药辞海(第一卷)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1993:1365.

China Pharmaceutical University. Traditional Chinese medicine (Volume I)[M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 1993:1365.

[4] 孙文基. 天然药物成分提取分离与制备[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1999:183.

Sun W J. Separation and preparation of natural drug ingredients [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 1999:183.

[5] 王珊, 黄怡, 曹蕾, 等. 甘草中甘草酸的提取及测定方法简述[J]. 化工科技, 2010, 18(1):76-80.

Wang shan, Huang yi, Cao lei. Extraction and Determination of Glycyrrhizic Acid in Glycyrrhiza uralensis [J]. Science & Tech-

nology In Chemical Industry, 2010, 18(1):76-80.

[6] 徐树云, 王海宁. HPLC 测定甘草提取物中甘草酸的含量[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(24):10297-10300.

Xu shu yun, Wang hai ning. Determination of glycyrrhizic acid in liquorice extract by HPLC [J]. Journal of Anhui Agri Sci, 2008, 36(24):10297-10300.

[7] 中国兽药典委员会. 《中华人民共和国兽药典》2015 年版二部[S].

China Veterinary Pharmacopoeia Committee. People's Republic of China Veterinary Pharmacopoeia volume II 2015 edition[S].

(编辑: 侯向辉)