

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.03.04

桑仁清肺口服液的质量标准提升研究

杜西翠^{1,2}, 郭艳钦¹, 刘格格¹, 张趁¹, 徐丹^{1,2}, 李云波^{1,2}, 李莹洁³, 朱秋艳⁴

(1. 河北锦坤动物药业有限公司, 河北 辛集 052360; 2. 河北省兽用中药制剂技术创新中心, 河北 辛集 052360;

3. 河北省兽药监察所, 石家庄 050051; 4. 乐亭县农业农村局, 河北 唐山 063600)

[收稿日期] 2022-06-21 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2023) 03-0024-06 [中图分类号] S859.79

[摘要] 为了解决桑仁清肺口服液甘草鉴别斑点不清晰无法判定结果的问题, 完善质量标准, 采用 HPLC 法测定桑仁清肺口服液中的甘草酸含量, 色谱条件为: Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 乙腈-0.1% 磷酸 (33:67) 为流动相; 检测波长为 250 nm。研究表明, 甘草酸在 19.09 μg/mL ~ 305.50 μg/mL 范围内具有良好的线性关系, 其回归方程为 $y = 7.17956x - 12.98810$, $R^2 = 0.99932$, 平均回收率为 102.92%, RSD 为 0.86%。本方法简单准确重复性好, 能更好地控制桑仁清肺口服液的质量, 可作为桑仁清肺口服液的质量标准。

[关键词] 桑仁清肺口服液; HPLC; 甘草酸; 质量标准

Research on the Promotion of Sangrenqingfei Oral Liquid Quality Standard

DU Xi-cui^{1,2}, GUO Yan-qin¹, LIU Ge-ge¹, ZHANG Chen¹, XU Dan^{1,2},LI Yun-bo^{1,2}, LI Ying-jie³, ZHU Qiu-yan⁴

(1. Hebei Jinkun Animal Medicine Co., Ltd., Xinji Hebei 052360, China; 2. Hebei Veterinary Medicine Preparation Technology Innovation Center,

Xinji Hebei 052360, China; 3. Institute of veterinary drug control of Hebei Province, Shijiazhuang 050051, China;

4. Bureau of Agriculture and Rural Affairs of the Laoting County, Tangshan, Hebei 063600, China)

Abstract: In order to solve the problem that the spots were not clear and the result could not be determined, the content of glycyrrhizic acid in Sangrenqingfei Oral Liquid was determined by HPLC. Stationary phase were performed on Agilent Zorbax SB-C18 column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) and the mobile phase was acetonitrile and 0.1% phosphoric acid (33:67), the detection wavelength was 250 nm. The results showed that glycyrrhizic acid had a good linear relationship when the garden in range of 19.09 to 305.50 μg. Its regression equation was $y = 7.17956X - 12.98810$ and $R^2 = 0.99932$. The average recovery was 102.92% and RSD was 0.86%. This method was simple, accurate and reproducible, which could better control the quality of the Sangrenqingfei Oral Liquid, and could be used as the quality standard of Sangrenqingfei Oral Liquid.

Key words: Sangrenqingfei oral liquid; HPLC; glycyrrhizic acid; quality standard

甘草为豆科多年生草本植物甘草、胀果甘草或光果甘草的干燥根和根茎^[1],是一种补益中草药,其味甘性平,药性缓和,具有益气补中,清热解毒,祛痰止咳,缓急止痛,调和药性的功效^[2-3]。甘草的主要化学成分以三萜皂苷类和黄酮类为主,尚有香豆素、生物碱、氨基酸、挥发性成分和多糖等,其中甘草酸是甘草中三萜类最重要的活性成分之一^[4-5]。

桑仁清肺口服液是由桑白皮、苦杏仁、黄芩、甘草等中药材经提取制成的中药口服液,收载于《兽药质量标准》2017 年版(中药卷),每 1 mL 相当于原生药 1 g,具有清肺,止咳,平喘的功效,主治肺热咳嗽^[6]。在临床上多用于家禽传染性支气管炎、感冒、支原体等引起的病禽流鼻涕、甩鼻、喷嚏、呼噜、气喘、支气管堵塞等证。但是经过日常的检测发现目前质量标准中甘草的薄层鉴别存在一些问题不能很好的判定结果,本试验首先按桑仁清肺口服液质量标准对甘草进行薄层鉴别验证其存在的问题,同时对桑仁清肺口服液中甘草酸含量进行测定,这对于控制产品质量和完善标准具有很重要的意义。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 中药及复方样品 桑白皮、苦杏仁、黄芩、甘草等中药均购于安国药材市场,由化验室进行鉴定、检测,入库保存;阳性样品按处方比例和工艺自制;阴性样品除去需检验的药材按处方比例自制。

1.1.2 对照品与试剂 甘草酸铵对照品(批号 CHB-G-009)购自成都克洛玛生物科技有限公司;乙腈、磷酸为色谱纯;水为超纯水;其余试剂均为分析纯。

1.1.3 仪器设备 高效液相色谱仪:Agilent-1260II(配备紫外检测器);Good Look-2000 型薄层色谱成像系统:上海科哲生化科技有限公司;AUW220D 型十万分之一电子分析天平:岛津国际贸易有限公司,感量 0.00001 g;KH-500E 型数控超声波清洗器:昆山禾创超声仪器有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 甘草薄层鉴别 取本品 50 mL,置水浴上蒸干,残渣加 85% 乙醇 40 mL,超声处理,滤过,滤液

水浴上蒸干,残渣加 75% 乙醇 5 mL,超声处理,滤过,滤液作为供试品溶液。另取甘草酸铵对照品,加 50% 乙醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法试验,吸取上述两种溶液各 5 μ L,分别点于同一硅胶 GF254 薄层板上,以乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水(15:1:1:2)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光等(254 nm)下检视。

1.2.2 甘草酸含量测定

1.2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C18(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m);流动相为乙腈-0.1% 磷酸(33:67);流速为 1 mL/min;进样量为 10 μ L;柱温为 20 $^{\circ}$ C;检测波长为 250 nm。

1.2.2.2 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 76 μ g 的溶液,即得。

1.2.2.3 供试品溶液的制备 精密量取阳性样品 10 mL,置 50 mL 容量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,滤过,即得。

1.2.2.4 阴性对照溶液的制备 取不含甘草药材的阴性样品,按“1.2.2.3”项下方法,制备相应的阴性对照溶液。

1.2.2.5 专属性 取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液在 1.2.2.1 色谱条件进样分析。

1.2.2.6 线性关系 精密称取甘草酸铵对照品 6.11 mg,置 20 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,制成 305.50 μ g/mL 的浓溶液,精密吸取浓溶液分别制成 19.09 μ g/mL、38.19 μ g/mL、76.38 μ g/mL、152.75 μ g/mL 的稀释液。照 1.2.2.1 项下色谱条件分别进样,记录峰面积,以峰面积对甘草酸铵的浓度进行线性回归。

1.2.2.7 精密度 使用自动进样器吸取甘草酸铵对照品溶液(76.38 μ g/mL)10 μ L,按 1.2.2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,记录峰面积,计算甘草酸铵峰面积的 RSD 值。

1.2.2.8 稳定性 吸取供试品溶液,按 1.2.2.1 项下色谱条件分别于 0、2、4、8、12、24 h 进行测定,记录峰面积,计算甘草酸铵峰面积的 RSD 值。

1.2.2.9 重复性 从同一瓶样品中,每次精密量

取 10 mL,共 6 份,按 1.2.2.3 项下供试品溶液制备方法处理,按 1.2.2.1 项下色谱条件分别进行测定,计算甘草酸铵含量的 *RSD* 值。

1.2.2.10 回收率试验 取已知含量的样品,精密量取 1 mL,平行 6 份,精密加入甘草酸铵对照品溶液 1 mL,按 1.2.2.3 项下供试品溶液制备方法处理,按 1.2.2.1 项下色谱条件分别进行测定,计算平均回收率及 *RSD* 值。

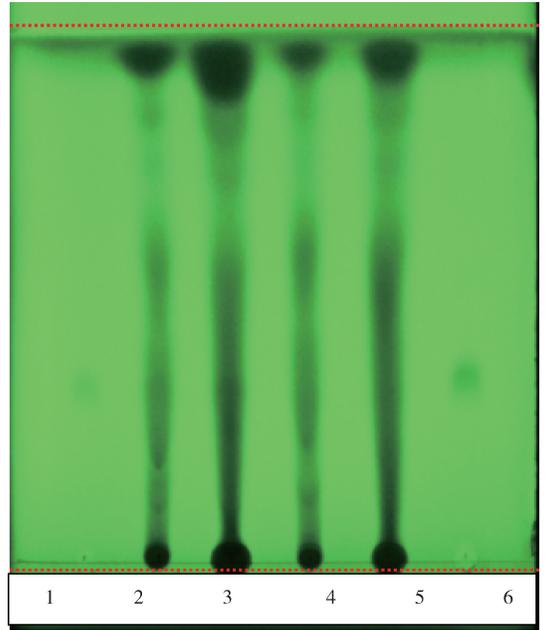
2 结果与分析

2.1 甘草薄层鉴别

供试品色谱中,样品拖尾成一条线在与对照品色谱相应的位置上未显示相同颜色的荧光斑点,与缺甘草的阴性样品无明显区别(图 1)。

2.2 甘草酸含量测定

2.2.1 专属性 供试品色谱图在与甘草酸铵对照品色谱图主峰相应的保留时间处有峰,且阴性对照色谱图在与甘草酸铵对照品色谱图主峰相应的保留时间处无峰,即阴性无干扰(图 2-4)。



1、6,甘草酸铵对照品;2、3,供试品;4、5,阴性样品
1 and 6, Ammonium glycyrrhizinate reference substances;
2 and 3, Samples; 4 and 5, Negative samples

图 1 甘草薄层鉴别

Fig 1 The TLC identification of *Liquorice*

VWDIA, Wavelength=250 nm

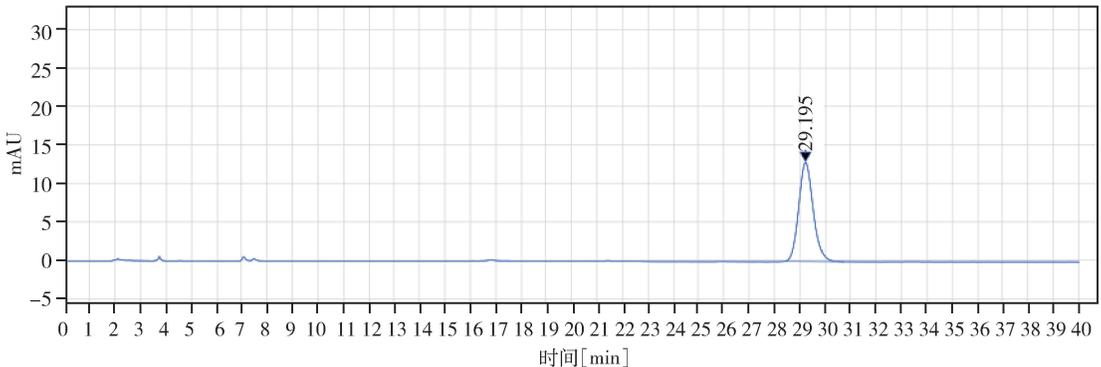


图 2 甘草酸铵对照品色谱图

Fig 2 The standard substance chromatogram of Ammonium glycyrrhizinate

VWDIA, Wavelength=250 nm

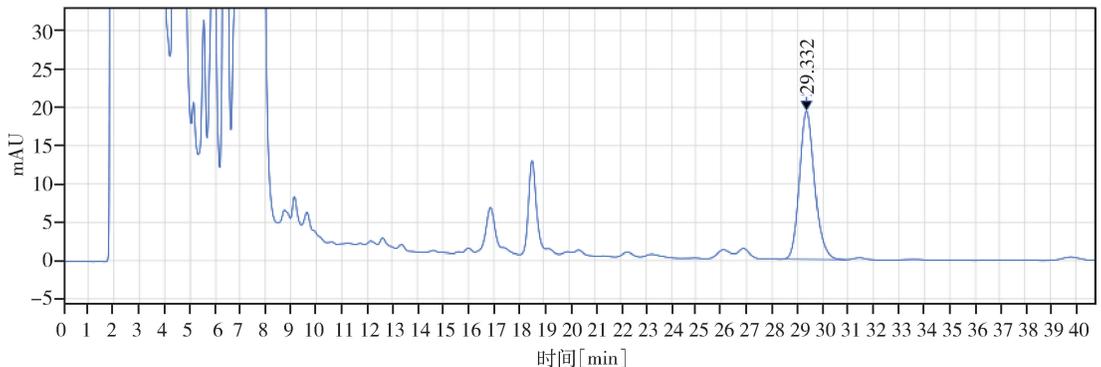


图 3 供试品色谱图

Fig 3 The chromatogram of samples

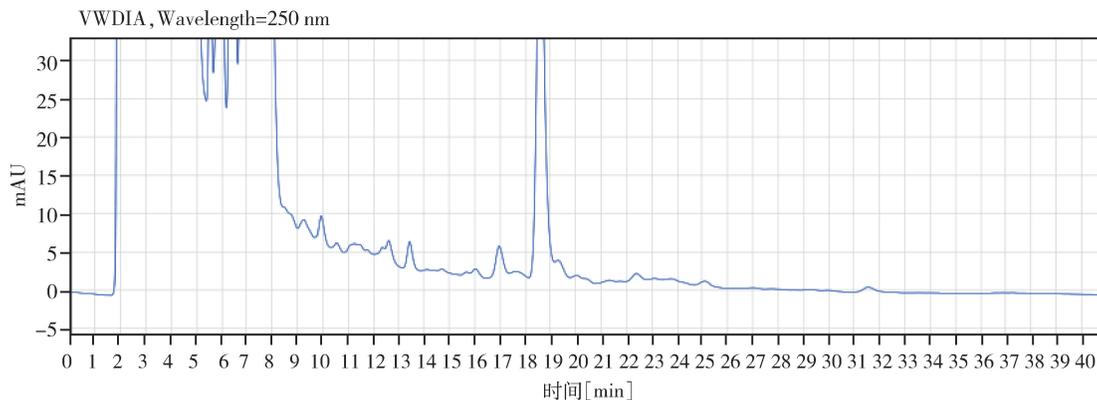


图 4 阴性样品色谱图

Fig 4 The chromatogram of negative samples

2.2.2 线性关系 以对照品含量为横坐标(x),峰面积为纵坐标(y),绘制标准曲线,进行线性回归,得甘草酸铵的回归方程分别为: $y = 7.17956x - 12.98810$ ($R^2 = 0.99932$),结果表明甘草酸铵在 $19.09 \mu\text{g/mL} \sim 305.50 \mu\text{g/mL}$ 范围内,线性关系良好(图 5)。

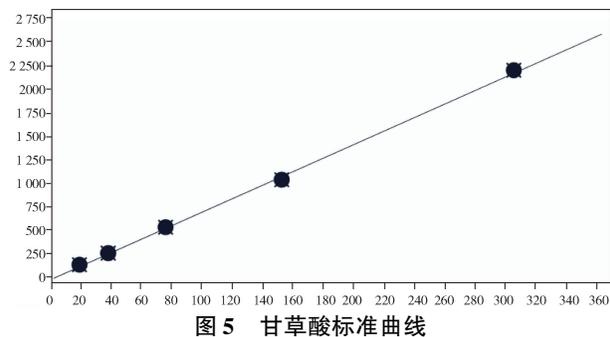


图 5 甘草酸标准曲线

Fig 5 The standard curve of glycyrrhizic acid

2.2.3 精密度 甘草酸铵对照品按 1.2.2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,根据峰面积计算的 RSD 值为 0.22% ,表明本方法精密度良好(表 1)。

2.2.4 稳定性 供试品溶液按 1.2.2.1 项下色谱条件分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样,根据峰面积计算的 RSD 值为 0.32% ,表明供试品溶液在 24 h 内稳定(表 2)。

2.2.5 重复性 6 份供试品溶液按 1.2.2.1 项下色谱条件进样,根据峰面积测得甘草酸铵的平均含量为 0.5639 mg/mL , RSD 值为 1.14% ,表明本方法重复性良好(表 3)。

2.2.6 回收率试验 按 1.2.2.1 项下色谱条件进样,根据峰面积测定甘草酸铵含量,计算平均回收率为 102.92% , RSD 值为 0.86% ,表明该方法准确可信(表 4)。

表 1 精密度试验结果

Tab 1 The test results of precision

编号 No.	1	2	3	4	5	6	平均值 Average value/mAU	$RSD/\%$
峰面积 Peak area/mAU	525.83	528.00	527.80	527.61	528.56	529.26	527.84	0.22

表 2 稳定性试验结果

Tab 2 The test results of stability

时间 Time/h	0	2	4	8	12	24	平均值 Average value/mAU	$RSD/\%$
峰面积 Peak area/mAU	837.43	835.89	838.97	840.11	840.09	843.76	839.38	0.32

表 3 重复性试验结果

Tab 3 The test results of repeatability

编号 No.	1	2	3	4	5	6	平均值 Average value/(mg/mL)	$RSD/\%$
含量 Content/(mg/mL)	0.5651	0.5675	0.5662	0.5674	0.5824	0.5670	0.5693	1.14

表 4 回收率试验结果

Tab 4 The test results of recovery rate

编号 No.	供试品取样量 Samples volume/mL	供试品含有量 Samples contain amount/mg	对照品加入量 Standard substance additional amount/mg	测得量 Actual amount/mg	回收率 Recovery rate /%	平均回收率 Average recovery rate /%	RSD/%
1	1	0.5683	0.3055	0.8785	101.54		
2	1	0.5683	0.3055	0.8828	102.95		
3	1	0.5683	0.3055	0.8866	104.19		
4	1	0.5683	0.3055	0.8839	103.31	102.92	0.86
5	1	0.5683	0.3055	0.8831	103.04		
6	1	0.5683	0.3055	0.8814	102.49		

3 讨论与结论

3.1 流动相的考察及比例调整 经查阅文献发现桑仁清肺口服液甘草酸铵含量测定方法的研究暂无报道,其他品种甘草酸含量测定方法色谱条件采用的流动相主要有甲醇-0.2 mol/L 醋酸铵溶液-冰醋酸、乙腈-0.05% 磷酸、乙腈-0.1% 磷酸^[7-13]。本研究预实验分别采用上述流动相测定桑仁清肺口服液中甘草酸含量,发现其无法与供试品溶液中其他组分实现有效分离。综合考虑专属性、峰型、分离度等因素最终确定以乙腈-0.1% 磷酸(33:67)为流动相进行测定。

3.2 供试品提取方法考察 中药复方产品中成分复杂,含量测定时干扰较多,笔者根据文献^[14-16]中常用的方法比较了直接定容、超声和回流三种提取方式,结果三种方法的专属性、峰型、分离度等均无明显差异,其中直接定容的含量最高且操作简单、节省时间,因此选择直接定容法作为供试品溶液的提取方法。

3.3 供试品提取溶剂考察 在甘草酸铵含量测定的检测方法中,甘草酸铵对照品及供试品的提取溶剂多采用流动相、70% 甲醇、70% 乙醇进行溶解和提取^[17-18],因此分别用这三种溶剂进行了试验,筛选最适合的提取溶剂。结果三种提取溶剂的专属性、峰型、分离度等均无明显差异,其中流动相提取的含量最高,因此选择流动相作为供试品的提取溶剂。

3.4 柱温考察 在柱温的选择上,分别考察了 20 ℃、30 ℃、40 ℃、50 ℃ 时的色谱图,结果柱温为 40 ℃、50 ℃ 时峰型不好,分离度差,不能满足检测要

求;柱温为 20 ℃、30 ℃ 时峰型、分离度、专属性均无明显差别,但柱温为 20 ℃ 时较柱温为 30 ℃ 时的甘草酸铵含量略高,因此色谱柱的温度最终选择 20 ℃。

3.5 结论 本试验采用 HPLC 法测定桑仁清肺口服液中的甘草酸含量,甘草酸在 19.09 μg/mL ~ 305.50 μg/mL 范围内具有良好的线性关系,其回归方程为 $y = 7.17956x - 12.98810$, $R^2 = 0.99932$, 平均回收率为 102.92%, RSD 为 0.86%。本方法简单、准确、重复性好,能更好地控制桑仁清肺口服液的质量,可作为桑仁清肺口服液的质量标准并为其质量标准的提升提供理论依据。

参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典[S]. Chinese Veterinary Pharmacopoeia Commission. Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China[S].
- [2] 钟秀会,刘占民. 兽医中药学[M]. 北京:中国科学文化出版社,2006. Zhong X H, Liu Z M. Veterinary Traditional Chinese Medicine [M]. Beijing: China Science and Culture Press,2006.
- [3] 罗子宸,张雯,杨瑞,等. 甘草“调和诸药”生物药剂学机制的研究进展[J]. 中草药,2021,52(1):267-277. Luo Z C, Zhang W, Yang R, et al. Research progress on biopharmaceutical mechanism of *Glycyrrhiza uralensis* “moderating property of herbs” [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2021,52(1):267-277. (in Chinese)
- [4] 孙琛. 甘草的化学成分研究进展[J]. 科技资讯,2020,02:64-65. Sun C. Research progress on chemical constituents of liquorice

- [J]. Science & Technology Information, 2020, 02: 64 - 65. (in Chinese)
- [5] 栾海云, 李淑翠, 许勇. HPLC 法测定不同产地甘草中甘草酸的含量[J]. 滨州医学院学报, 2008, 31(04): 270 - 271.
- Luan H Y, Li S C, Xu Y. Determination of the Contents of Glycyrrhizic Acid in Licorice (Glycyrrhiza) from Different Regions by HPLC [J]. Journal of Binzhou Medical University, 2008, 31(04): 270 - 271. (in Chinese)
- [6] 中国兽药典委员会. 兽药质量标准[S]. Chinese Veterinary Pharmacopoeia Commission. Veterinary Drugs of Quality Standards[S].
- [7] 包桂花, 玉华, 包同力嘎. HPLC 法测定蒙药清咽六味散中甘草酸的含量加 TLC 鉴别[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(02): 402 - 404.
- Bao G H, Yu H, Bao T L G. HPLC Method Measures the Content and TLC Identification of Glycyrrhizic Acid in Mongolian Medicine Qing Yan Liuwei San [J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2013, 31(02): 402 - 404. (in Chinese)
- [8] 陈华, 于波涛, 金伟华, 等. 咽炎灵颗粒中药材的薄层色谱鉴别和甘草酸铵的测定[J]. 华西药学杂志, 2016, 31(01): 79 - 81.
- Chen H, Yu B T, Jin W H, et al. Identification of Chinese crude by TLC and determination of ammonium glycyrrhetate in Yanyanling granules [J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 2016, 31(01): 79 - 81. (in Chinese)
- [9] 苟琰, 耿昭, 刘紫红. 镇咳宁胶囊的 TLC 鉴别及甘草酸和盐酸麻黄碱的测定[J]. 华西药学杂志, 2015, 30(06): 726 - 729.
- Gou Y, Geng Z, Liu F H. TLC identification of Zhenkeng capsules and determination of glycyrrhizic acid and ephedrine hydrochloride [J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015, 30(06): 726 - 729. (in Chinese)
- [10] 李军, 杨奇, 刘立轩, 等. 甘草颗粒中甘草酸含量 HPLC 测定方法的建立[J]. 动物医学进展, 2020, 41(12): 74 - 79.
- Li J, Yang Q, Liu L X, et al. Establishment of HPLC Method for Detecting Glycyrrhizic Acid Content in Glycyrrhiza Granules [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2020, 41(12): 74 - 79. (in Chinese)
- [11] 何书平. HPLC 法测定甘草中甘草苷、甘草酸铵含量[J]. 中医中药, 2020, (06): 123.
- He S P. Determination of the Contents of Liquiritin and Ammonium Glycyrrhizinate in Glycyrrhiza by HPLC method [J]. Traditional Chinese medicine, 2020, (06): 123. (in Chinese)
- [12] 邱天宝, 刘素梅, 方忠意, 等. HPLC 法测定麻杏石甘散中甘草酸的含量[J]. 中兽医医药杂志, 2013, (03): 26 - 28.
- Qiu T B, Liu S M, Fang ZY, et al. Determination of glycyrrhizic acid in Ma Xing Shi Gan Powder by HPLC [J]. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine, 2013, (03): 26 - 28. (in Chinese)
- [13] 许世富. 高效液相色谱法测定清肺颗粒中甘草酸的含量[J]. 现代农业科技, 2020, (7): 222 - 225.
- XU S F. Determination of Glycyrrhizic Acid Content in Qingfei Granule by HPLC [J]. Modern Agricultural Sciences and Technology, 2020, (7): 222 - 225. (in Chinese)
- [14] 刘国洪, 钟宇富. 月乃汤中甘草的鉴别及甘草酸含量测定[J]. 食品工业, 2014, 35(02): 243 - 245.
- Liu G H, Zhong Y F. Identification and Determination of Glycyrrhizic Acid in Yue - nai - tang Decoction [J]. The Food Industry, 2014, 35(02): 243 - 245. (in Chinese)
- [15] 张浩. HPLC 法测定甘草中甘草苷和甘草酸含量[J]. 临床医药文献电子杂志, 2020, 7(48): 10 - 21.
- Zhang H. Determination of the Contents of Liquiritin and Glycyrrhizic Acid in Liquorice using HPLC method [J]. Electronic Journal of Clinical Medical Literature, 2020, 7(48): 10 - 21. (in Chinese)
- [16] 靳雪飞, 何云娇, 张杰, 等. HPLC 法同时测定甘草中 3 种成分[J]. 中成药, 2020, 42(10): 2786 - 2788.
- Jin X F, He Y J, Zhang J, et al. Simultaneous Determination of Three Components in Glycyrrhiza by HPLC [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2020, 42(10): 2786 - 2788. (in Chinese)
- [17] 宁雪, 杨振泳, 王凤文, 等. HPLC 同时测定甘草及其炮制品种 7 种成分的含量[J]. 中药材, 2020, 43, (9): 2146 - 2150.
- Ning X, Yang Z Y, Wang F W, et al. Simultaneous Determination of Seven Components in Glycyrrhiza and its Processed Varieties by HPLC [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2020, 43, (9): 2146 - 2150. (in Chinese)
- [18] 王艳楠, 孔德娟. 高效液相色谱法测定蒙药沙棘散中甘草酸含量[J]. 中国民族医药杂志, 2020, 26(11): 40 - 42.
- Wang Y N, Kong D J. Determination of glycyrrhizic acid in Hippophae Rhamnoides powder by HPLC [J]. Journal of Medicine and Pharmacology of Chinese Minorities, 2020, 26(11): 40 - 42. (in Chinese)