

# HPLC同时测定健脾舒胃凝胶中甘草苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、甘草酸铵5种成分含量

牛晓静<sup>1</sup>, 鲁静<sup>1</sup>, 段晓颖<sup>1\*</sup>, 李芬<sup>2</sup>

(1. 河南中医学院第一附属医院, 郑州 450000; 2. 河南中医学院, 郑州 450000)

**[摘要]** 目的:建立 HPLC 同时测定健脾舒胃凝胶中甘草苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、甘草酸铵 5 种成分含量控制方法。方法:采用 Agilent ZORBAX Eclipse SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.05% 磷酸水梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 237 nm(甘草苷、甘草酸铵), 283 nm(柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷)。结果:根据回归方程, 甘草苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、甘草酸铵分别在 0.128 3~0.641 6, 1.105 2~5.526, 0.225 2~1.126 0, 1.092~5.460, 0.314 9~1.574 4 μg 进样量与峰面积之间线性关系良好; 5 个成分的平均回收率分别为 101.47%, 99.22%, 100.02%, 101.64%, 97.99% (RSD < 3%)。结论:该方法简便、准确可靠, 重复性好, 专属性好, 分离效果好, 适用于健脾舒胃凝胶的质量控制。

**[关键词]** 甘草苷; 柚皮苷; 橙皮苷; 新橙皮苷; 甘草酸铵; 高效液相色谱法

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)02-0077-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015020077

**Determination of Liquiriti, Naringin, Hesperidin, Neohesperidin and Glycyrrhizic Acid Ammonium Salt in Jianpi Shuwei Gel by HPLC** NIU Xiao-jing<sup>1</sup>, LU Jing<sup>1</sup>, DUAN Xiao-ying<sup>1\*</sup>, LI Fen<sup>2</sup> (1. The First Affiliated Hospital of Henan Institute of Traditional Chinese, Zhengzhou 450000, China; 2. Henan Institute of Traditional Chinese, Zhengzhou 450000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop a method for determining liquiriti, naringin, hesperidin, neohesperidin and glycyrrhizic acid ammonium salt in Jianpi Shuwei gel. **Method:** The mobile phase consisted of acetonitrile-0.05% phosphoric acid with gradient elution at the flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was 237 nm (liquiriti, glycyrrhizic acid ammonium salt), 283 nm (naringin, hesperidin, neohesperidin). **Result:** The liquiriti, naringin, hesperidin, neohesperidin and glycyrrhizic acid ammonium salt all had good linear relationship in the ranges of 0.128 3-0.641 6, 1.105 2-5.526, 0.225 2-1.126 0, 1.092-5.460, 0.314 9-1.574 4 μg. The average recoveries were 101.47%, 99.22%, 100.02%, 101.64% and 98.11% (RSD < 3%), respectively. **Conclusion:** The method is simple, accurate, reproducible and nice to the separation, can be used for the quality evaluation of Jianpi Shuwei gel.

**[Key words]** liquiriti; naringin; hesperidin; neohesperidin; glycyrrhizic acid ammonium salt; HPLC

健脾舒胃凝胶是由白术、炙甘草、枳实、茯苓、半夏、生姜、麦芽、砂仁等 10 味中药组成, 临床用于治疗胃胀、胃酸、消化性溃疡等。方中君药炙甘草有吸附胃酸、降低胃蛋白酶活性和保护胃黏膜的作用, 主要含皂苷类和黄酮类成分, 其中甘草苷和甘草酸铵为其有效成分; 臣药枳实能抑制胃肠平滑肌收缩、缓解胃肠积滞作用, 其黄酮类成分柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷为其有效成分。为了有效控制该制剂质量,

本实验采用 HPLC 法同时测定甘草苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷和甘草酸铵 5 种成分的含量, 能够较全面控制皂苷、黄酮类活性成分, 为全面控制健脾舒胃凝胶质量提供依据。

## 1 仪器与试剂

e2695 型高效液相色谱(包括检测器 Waters2998 PDA, Empower 色谱工作站, 美国沃特世公司), CP225D 型和 BSA224s-CW 型分析天平(德

**[收稿日期]** 20140707(008)

**[第一作者]** 牛晓静, 药师, 硕士, 从事中药新药、质量控制研究, Tel:0371-66633639, E-mail: niuxiaojing314@163.com

**[通讯作者]** \* 段晓颖, 主任药师、硕士生导师, 硕士, 从事中药新技术新剂型研究, E-mail: dxy137@sina.com

国赛多利斯集团)。

甘草苷(批号 111610-201106)、橙皮苷(批号 110721-201115)、新橙皮苷(批号 111857-201102)、柚皮苷(批号 110722-200309)、甘草酸铵(110731-201116)对照品均由中国食品药品检定研究院提供。甲醇、乙腈、磷酸均为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为高纯水。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Agilent ZORBAX Eclipse SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-0.05% 磷酸(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<sup>-1</sup>, 柱温 35 °C, 检测波长 237 nm(甘草苷、甘草酸铵), 283 nm(柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷), 进样量 10 μL。理论板数按甘草苷峰计算不低于 5 000。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 对照品溶液的制备** 精密称取甘草苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、甘草酸铵对照品适量, 加甲醇溶解稀释, 分别制成含甘草苷(32.08 mg·L<sup>-1</sup>, 0.320 8 g·L<sup>-1</sup>), 柚皮苷(0.276 3, 1.135 g·L<sup>-1</sup>), 橙皮苷(56.3 mg·L<sup>-1</sup>, 0.563 g·L<sup>-1</sup>), 新橙皮苷(0.273, 0.941 g·L<sup>-1</sup>), 甘草酸铵(78.72 mg·L<sup>-1</sup>, 0.393 6 g·L<sup>-1</sup>)的对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 取供试品 5 g, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 精密加入甲醇 20 mL, 密塞, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 取出, 放冷, 加甲醇补足至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 进样前用微孔滤膜(0.45 μm) 过滤, 即可。

**2.2.3 阴性对照供试品溶液的制备** 处方中分别去除枳壳、甘草, 将余药按健脾舒胃凝胶制备工艺制备, 按 2.2.2 项下方法分别制备阴性对照溶液。

**2.3 标准曲线的绘制** 分别精密吸取上述对照品溶液 4, 8, 12, 16, 20 μL, 按上述色谱条件测定。以进样量为横坐标(X), 峰面积积分为纵坐标(Y), 得回归方程。甘草苷  $Y = 62\ 430X - 16\ 259$  ( $r = 0.999\ 6$ ), 柚皮苷  $Y = 472\ 157X + 139\ 711$  ( $r = 0.999\ 9$ ), 橙皮苷  $Y = 76\ 950X + 19\ 584$  ( $r = 0.999\ 2$ ), 新橙皮苷  $Y = 535\ 405X + 211\ 207$  ( $r = 0.999\ 9$ ), 甘草酸铵  $Y = 42\ 507X - 12\ 457$  ( $r = 0.999\ 7$ )。结果甘草苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、甘草酸铵分别在 0.128 3 ~ 0.641 6, 1.105 2 ~ 5.526, 0.225 2 ~ 1.126 0, 1.092 ~ 5.460, 0.314 9 ~ 1.574 4 μg 线性关系均良好。

**2.4 精密度试验** 分别精密吸取甘草苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、甘草酸铵对照品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 按照上述色谱条件, 重复进样 6 次, 测定峰面积, 计算 RSD 分别为 1.8%, 1.3%, 0.7%, 1.5%, 1.6%。结果表明仪器精密度良好。

**2.5 重复性试验** 取同一批样品(批号 131230) 适量, 按 2.2.2 项下方法制备 6 份供试品溶液, 按上述色谱条件测定。结果平均质量分数分别为甘草苷 0.104 mg·g<sup>-1</sup> (RSD 2.1%); 柚皮苷 2.84 mg·g<sup>-1</sup> (RSD 0.4%), 橙皮苷 0.376 mg·g<sup>-1</sup> (RSD 0.9%), 新橙皮苷 1.84 mg·g<sup>-1</sup> (RSD 1.1%), 甘草酸铵平均含量 0.260 mg·g<sup>-1</sup> (RSD 0.2%)。表明方法重复性良好。

**2.6 稳定性试验** 取对照品溶液, 按上述色谱条件分别于 0, 2, 6, 10, 12 h 测定 5 种成分峰面积。结果甘草苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、甘草酸铵 RSD 分别为 1.8%, 2.0%, 1.7%, 1.1%, 2.1%。结果表明甘草苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、甘草酸铵对照品溶液均在 12 h 内稳定。

**2.7 加样回收率试验** 取同一样品(批号 131230) 6 份, 每份精密称取 2.0 g, 分别精密加入甘草苷对照品溶液(0.320 8 g·L<sup>-1</sup>) 1 mL、柚皮苷对照品溶液(1.135 g·L<sup>-1</sup>) 4 mL、橙皮苷对照品溶液(0.563 g·L<sup>-1</sup>) 1 mL、新橙皮苷对照品溶液(0.941 g·L<sup>-1</sup>) 3 mL、甘草酸铵对照品溶液(0.3936 g·L<sup>-1</sup>) 1 mL, 按 2.2.2 项下方法制得供试品溶液, 进样测定, 计算加样回收率。结果平均回收率甘草苷 101.47% (RSD 1.3%), 柚皮苷 99.22% (RSD 1.8%), 橙皮苷 100.02% (RSD 1.4%); 新橙皮苷 101.64% (RSD 1.6%), 甘草酸铵 97.99% (RSD 2.0%)。见表 1。

**2.8 样品含量测定** 分别取 3 个批次的样品, 按 2.2.2 项下方法制得供试品溶液, 进样测定, 按外标法计算含量。结果, 3 批样品中的甘草苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、甘草酸铵平均含量分别为 0.098, 2.78, 0.364, 2.00, 0.254 mg·g<sup>-1</sup>。

**2.9 专属性试验** 分别吸取缺枳壳阴性对照溶液、缺甘草阴性对照溶液、对照品溶液与供试品溶液进样 10 μL, 记录色谱图, 见图 1。结果缺枳壳阴性对照在 283 nm 下检测无干扰, 缺甘草阴性对照在 237 nm 下检测无干扰。

## 3 讨论

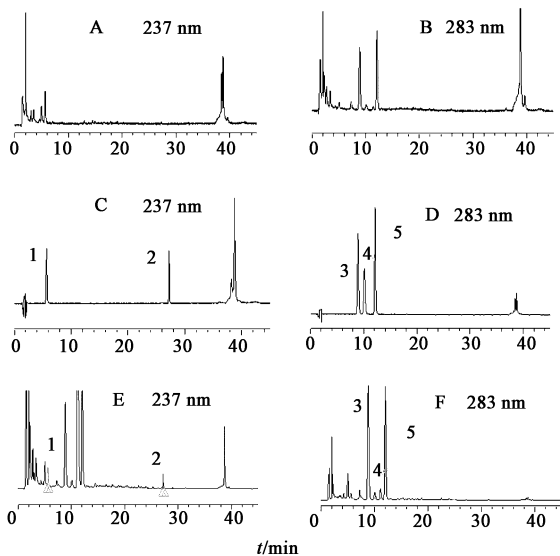
消化性溃疡属中医“胃脘痛”范畴, 中医认为, 消化性溃疡的病机是由于忧思恼怒, 七情刺激, 脾气郁结, 运化失常, 饮食失节或偏嗜损伤脾胃, 以及长

表 1 健脾舒胃凝胶 5 种成分加样回收率试验 (n=6)

Table 1 Recoveries of the five chemical components for quantitative analysis (n=6)

| 成分   | 样品中量 /mg | 加入量 /mg | 测得量 /mg  | 回收率 /% | RSD /% |
|------|----------|---------|----------|--------|--------|
| 甘草苷  | 0.208 0  | 0.320 8 | 0.533 5  | 101.47 | 1.3    |
| 柚皮苷  | 5.680 5  | 4.540 0 | 10.185 0 | 99.22  | 1.8    |
| 橙皮苷  | 0.752 0  | 0.563 0 | 1.315 1  | 100.02 | 1.4    |
| 新橙皮苷 | 3.680 3  | 2.823 0 | 6.549 7  | 101.64 | 1.6    |
| 甘草酸铵 | 0.520 0  | 0.393 6 | 0.905 7  | 97.99  | 2.0    |

注:称样量均为 2.000 2 g。



A, B. 缺枳壳、甘草阴性对照溶液; C, D. 对照品; 1. 甘草苷; 2. 甘草酸铵; 3. 柚皮苷; 4. 橙皮苷; 5. 新橙皮苷; E, F. 供试品溶液

图 1 健脾舒胃凝胶中甘草苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、甘草酸铵高效液相色谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of liquiritin, naringin, hesperidin, neohesperidin and glycyrrhizic acid ammonium salt in Jianpi Shuwei gel

期体力或脑力劳动过度伤脾耗气,运化迟滞,气血失畅,胃膜不生。脾胃为后天之本,气血生化之源。脾胃虚弱时导致消化性溃疡发生的根本所在。中医认为脾主运化,升则健,胃主受纳,降则和。肝随脾升,胆随胃降,诸脏和谐,纳化有常,升降协调,疏泄调达,脾胃功能才能正常发挥,胃气和降,食管黏膜破损得以修复。临床实践证明,健脾和胃降逆法治疗

消化性溃疡有良好疗效,可明显改善临床症状。

本文对色谱条件进行了选择,由于柚皮苷和橙皮苷结构非常相近,都属于黄酮类成分,关于柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的含量测定也有大量文献报道,在试验过程中笔者曾参考文献<sup>[1-4]</sup>,分别采用不同浓度的磷酸水-乙腈色谱系统,试验结果发现两个色谱峰经常重叠在一起,柚皮苷和橙皮苷根本不能分离,后经过调整流动相采用乙腈-0.05%磷酸水梯度洗脱,能显著的改善峰形及其分离效果,枳壳中的 3 个黄酮类成分均能得到很好的分离,检测灵敏度高,分离度好。同时也证明了枳壳中柚皮苷、新橙皮苷含量较多,而橙皮苷含量相对较低,结果与文献报道一致<sup>[5]</sup>。

实验过程中发现甘草苷和甘草酸铵的最大吸收波长分别为 277, 237 nm,而甘草苷在 237 nm 吸收与 277 nm 吸收相差无几、且分离效果好、峰形好,因此,同时兼顾两者故选择 237 nm 作为甘草成分的检测波长。

实验通过同时测定该制剂中甘草苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷和甘草酸铵 5 种成分,实现了多成分、多靶点综合控制该制剂的质量。该方法操作简单、重复性好、能够很好的控制该制剂质量。

[参考文献]

[1] 张伟,谢思敏,吴孟华,等. RRLC 测定止痛健胃整肠丸中甘草苷、橙皮苷和甘草酸的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2013, 24(2): 177-180.

[2] 王其华,徐云辉,濮存海,等. HPLC 法测定枳术颗粒中枳实的 5 种黄酮类物质[J]. 药学与临床研究, 2013, 21(3): 232-234.

[3] 王元清,严建业,师白梅,等. 不同批次枳壳中柚皮苷、新橙皮苷、总黄酮、挥发油的含量比较及质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 146-150.

[4] 张宏武,封宇飞,邹忠梅. 高效液相色谱法同时测定枳壳饮片 4 种黄酮类化合物的含量[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(18): 1600-1603.

[5] 黄爱华,曹骋,曾元儿,等. HPLC 法测定不同规格酸橙枳实中新橙皮苷和柚皮苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(9): 1448-1450.

[责任编辑 顾雪竹]