

HPLC 测定甘草酸单铵盐有关物质及其在甘草中的含量

赵博, 张慧*, 陈莹, 乔佳

(辽宁中医药大学, 辽宁 大连 116600)

[摘要] 目的: 建立测定甘草酸单铵盐原料药的有关物质及其在不同产地甘草中含量的方法。方法: 采用 HPLC, Ecosil-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以磷酸盐缓冲液(pH 7.0)-乙腈(80:20)为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 250 nm。结果: 甘草酸单铵盐与有关物质及各降解成分完全分离, 检测限为 1.52 ng, 定量限为 4.23 ng; 甘草酸单铵盐含量在 0.025 6~0.409 9 g·L⁻¹ 进样量与峰面积呈良好线性关系($r=0.999\ 9$), 精密度良好(RSD 0.60%), 平均回收率 99.51% ($n=9$)。结论: 该方法简便、准确、专属性好、灵敏度高, 可用于甘草酸单铵盐原料的有关物质检查及其在不同产地甘草中的含量测定。

[关键词] 甘草酸单铵盐; 甘草; 高效液相色谱; 有关物质; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)07-0073-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014070073

Determination Related Substances and Content in *Glycyrrhizia uralensis* of Ammonium Glycyrrhizinate by HPLC

ZHAO Bo, ZHANG Hui*, CHEN Ying, QIAO Jia

(Liaoning University of Chinese Traditional Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method to determine related substances and content in *Glycyrrhizia uralensis* of ammonium glycyrrhizinate. **Method:** HPLC was adopted for the determination. The separation was performed on Ecosil-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), column temperature at 30 °C with mobile phase consisted of phosphate buffer solution (pH = 7.0) - acetonitrile (80:20). The flow rate was set at 1.0 mL·min⁻¹ with its detection at 250 nm. **Result:** Related substances and degraded substances were completely separated from ammonium glycyrrhizinate, the least detective range was 1.52 ng, the least quantification range of 4.23 ng. The content was a good linear relationship within the range of 0.025 6-0.409 9 g·L⁻¹ ($r=0.999\ 9$). The precision in a day is good (RSD 0.60%). The average recovery was 99.51% ($n=9$). **Conclusion:** The method is simple, accurate, specific and sensitiveness for the determination of ammonium glycyrrhizinate related substances and its content.

[Key words] ammonium glycyrrhizinate; *Glycyrrhizia uralensis*; HPLC; related substances; content

甘草酸为中药甘草中的主要活性成分, 具有两

种构型, 分别为 18β-甘草酸和 18α-甘草酸, 具有保肝解毒、抗炎、抗病毒、抗肿瘤及免疫调节等作用。甘草酸难溶于水, 粗提取物含量较低, 通常用酸性乙醇为提取溶剂, 经多次重结晶处理, 得到纯度高水溶性甘草酸单铵盐原料, 其为 18β-甘草酸, 临床以此为原料制成口服或注射用制剂, 用于治疗各种急慢性肝炎、支气管炎和消化道溃疡等^[1-3]。目前, 国家药品标准收载的甘草酸单铵盐无有关物质检查项, 难以控制原料质量; 《中国药典》2010 年版一部

[收稿日期] 20130817(002)

[基金项目] 辽宁省科技厅博士启动基金项目(20101069)

[第一作者] 赵博, 硕士研究生, 从事中药质量标准及创新药物研发, Tel: 13614288304, E-mail: 657988610@qq.com

[通讯作者] * 张慧, 博士/博士后, 硕士生导师, 从事中药质量标准及创新药物研发, Tel: 0411-87586003, E-mail: syyycs@163.com

采用高效液相 (HPLC) 梯度洗脱方法, 测定甘草药材中甘草酸单铵盐的含量, 该方法操作繁琐, 基线不稳定^[4-6]。为了更有效控制甘草酸单铵盐原料及甘草药材的质量, 本文采用 HPLC 在同一色谱条件下测定原料有关物质和甘草药材含量。

1 仪器与试药

LC-10ATVP 型高效液相色谱仪 (日本岛津), CBM-10A 紫外可见检测器, LC solution 色谱数据工作站; CP225D 型电子分析天平 (德国 Sartorius 公司); KQ5200DB 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 乙腈为色谱纯, 氢氧化钠、磷酸二氢钾、磷酸均为分析纯, 水为纯净水。

甘草酸单铵盐原料药 (西安清乐生物科技有限公司, 批号 20130312, 20130410, 20130509); 甘草酸单铵对照品 (18 β -甘草酸, 中国食品药品检定研究院, 批号 110731-201116); 甘草酸二铵对照品 (18 α -甘草酸, 中国食品药品检定研究院, 批号 101050-201101); 甘草购自各地药材公司或药店, 经辽宁中医药大学中药鉴定教研室翟延君教授鉴定为甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *Glycyrrhiza inflata* Bat. 或光果甘草 *Glycyrrhiza glabra* L. 的干燥根及根茎。

2 方法和结果^[7-9]

2.1 有关物质测定

2.1.1 色谱条件和系统适应性 Ecosil-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m), 流动相磷酸盐缓冲液 (pH 7.0)-乙腈 (80:20), 流速 1.0 mL \cdot min⁻¹, 检测波长 250 nm, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 进样体积 10 μ L, 按甘草酸单铵盐峰计算理论板数不低于 5 000, 甘草酸单铵盐与各杂质峰间的分离度均 > 1.5。见图 1。

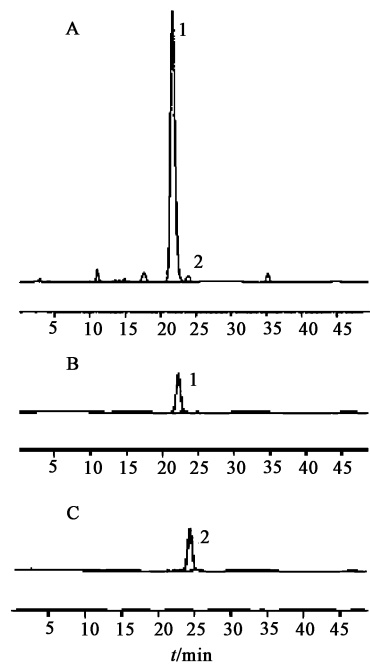
2.1.2 溶液制备 供试品溶液制备: 取甘草酸单铵盐原料药约 0.1 g, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀。

对照溶液制备: 精密吸取供试品溶液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀。

甘草酸二铵杂质对照品溶液制备: 精密称定甘草酸二铵对照品 10 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度。

2.1.3 空白试验 以流动相溶液为空白实验对照, 取该溶液进样 10 μ L, 按上述色谱条件下测定, 记录色谱图。结果表明, 此溶液无干扰峰。

2.1.4 破坏试验 高温破坏试验: 取甘草酸单铵盐原料药 (批号 20130312) 10 mg, 精密称定, 置干燥坩埚中, 于 105 $^{\circ}$ C 加热破坏至微褐色, 流动相分次溶解



A. 供试品; B. 甘草酸单铵对照品; C. 甘草酸二铵杂质;
1. 甘草酸单铵盐 (18 β -甘草酸); 2. 甘草酸二铵杂质 (18 α -甘草酸)

图 1 甘草酸单铵盐原料药 HPLC

转移至 10 mL 量瓶中, 并稀释至刻度, 摇匀, 按上述色谱条件依法测定, 记录色谱图 (图 2)。由图可见, 供试品与其降解产物能很好地分离。

强酸破坏试验: 取甘草酸单铵盐原料药 10 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加 0.1 mol \cdot L⁻¹ 盐酸 5 mL, 水浴加热 30 min, 取出放冷, 再用 0.1 mol \cdot L⁻¹ 氢氧化钠溶液调 pH 至中性, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 按上述色谱条件依法测定, 记录色谱图 (图 2)。由图可见, 供试品与其降解产物能很好地分离。

强碱破坏试验: 取甘草酸单铵盐原料药 10 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加 0.1 mol \cdot L⁻¹ 氢氧化钠溶液 5 mL, 水浴加热 30 min, 取出放冷, 再用 0.1 mol \cdot L⁻¹ 盐酸调 pH 至中性, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 按上述色谱条件依法测定, 记录色谱图 (图 2)。由图可见, 大约在 24 min 降解出甘草酸二铵杂质, 供试品与其降解产物能很好地分离。

光照破坏试验: 取甘草酸单铵盐原料药 10 mg, 精密称定, 置培养皿中, 于 4500 Lx 强光照射 24 h 后, 置 10 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 按上述色谱条件依法测定, 记录色谱图 (图 2)。由图可见, 供试品与其降解产物能很好地分离。

氧化破坏试验: 取甘草酸单铵盐原料药 10 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 滴加 0.1 mol \cdot L⁻¹ 过氧

化氢溶液 5 mL,水浴加热 30 min,取出放冷,用流动相稀释至刻度,摇匀,按上述色谱条件依法测定,记录色谱图(图 2)。由图可见,供试品与其降解产物能很好地分离。

2.1.5 检测线及定量限 精密量取甘草酸单铵对照品溶液,加流动相逐级稀释,进样,记录峰面积,在信号比 S/N 约为 3 时测得最低检测线为 1.52 ng,在信号比 S/N 约为 10 时测得最低定量线为 4.23 ng。

2.1.6 有关物质测定 按上述色谱条件,精密取对照溶液 10 μL 注入液相色谱仪,调节灵敏度,使主峰高约满量程的 25%;再精密取供试品溶液与甘草酸二铵杂质对照品溶液各 10 μL ,分别注入液相色谱仪,记录色谱图至主成分峰保留时间的 2 倍;参考《英国药典》2012 年版甘草酸单铵盐的杂质限度要求^[10],按外标法计算,供试品溶液的色谱图中如有与甘草酸二铵杂质保留时间一致的色谱峰,甘草酸二铵杂质不得 > 10%;其他单杂不得大于对照溶液主峰面积的 2 倍(2%),除甘草酸二铵杂质外总杂质不得大于对照溶液主峰面积的 7 倍(7%)。测得 3 批供试品有关物质甘草酸二铵杂质含量分别为 1.02%,1.14%,0.95%;其他单杂均未过 2%,除甘草酸二铵杂质外总杂质含量分别为 5.03%,5.35%,4.78%。

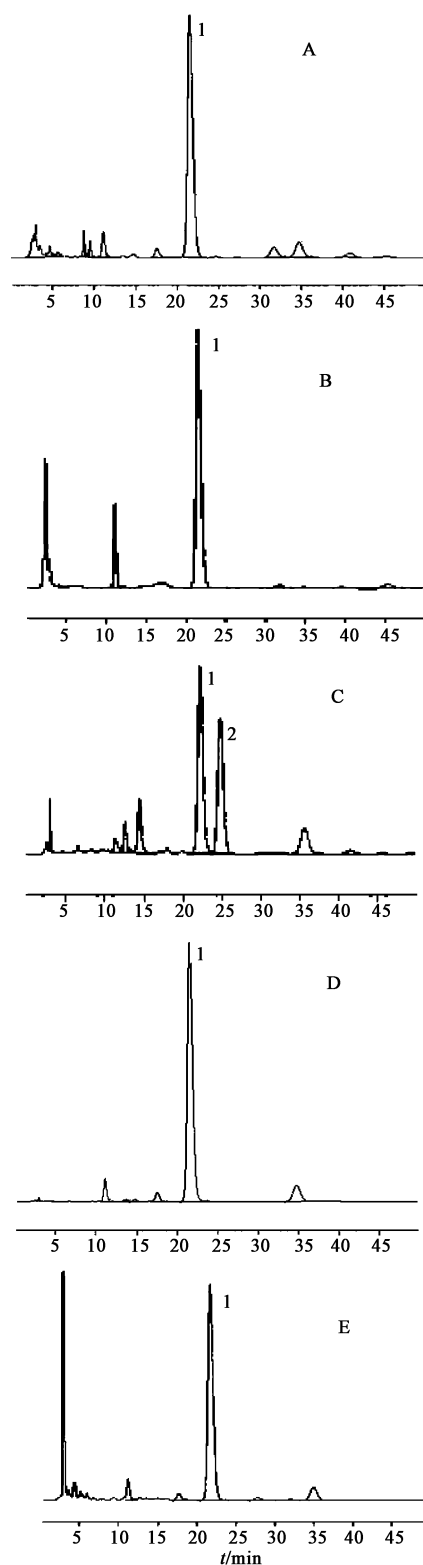
2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件和系统适应性 同 2.1.1 项。

2.2.2 溶液制备 取甘草粉末(过三号筛)约 0.2 g,精密称定,置具赛锥形瓶中,精密加入 70%乙醇 100 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用 70%乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,作为供试品溶液。另取甘草酸单铵对照品,精密称定,加 70%乙醇制成 0.2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液,作为对照品溶液。

2.2.3 线性关系考察 精密称取甘草酸单铵对照品 5 mg,置 10 mL 量瓶中,加流动相溶解并定容至刻度,配成浓度为 0.512 4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的贮备液。精密称吸取对照品贮备液 0.25,0.5,1.0,2.0,4.0 mL 分别置于 5 mL 量瓶中,加 70%乙醇定容至刻度,摇匀,共得 5 个不同浓度的对照品溶液,各进样 10 μL ,测定各峰面积。以甘草酸单铵的质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,得到回归方程 $Y = 5\ 042\ 372X - 6\ 539.2$ ($r = 0.999\ 9$)。结果表明,甘草酸单铵在 0.025 6 ~ 0.409 9 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 线性关系良好。

2.2.4 精密度试验 精密量吸取同一供试品溶液



A. 高温破坏;B. 强酸破坏;C. 强碱破坏;D. 光照破坏;E. 氧化破坏;
1. 甘草酸单铵盐(18 β -甘草酸);2. 甘草酸二铵杂质(18 α -甘草酸)

图 2 甘草酸单铵盐原料药专属性考察的 HPLC

(内蒙古呼和浩特)10 μL ,连续进样 6 次,测定甘草酸单铵盐峰面积,结果甘草酸单铵盐的 RSD

0.60%, 表明仪器精密度良好。

2.2.5 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液(内蒙古呼和浩特), 室温放置, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样 6 次, 测定甘草酸单铵盐面积值, 其 RSD 1.56%, 表明供试品溶液在室温条件下 12 h 内稳定。

2.2.6 重复性试验 取同一供试品粉末(内蒙古呼和浩特), 按上述供试品溶液的制备方法制备 6 份供试品溶液, 分别进行测定, 测得甘草酸单铵盐平均含量为 $42.23 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 1.76% ($n=6$), 表明本方法重复性良好。

2.2.7 回收率试验 取重复性试验项下的甘草样品粉末 9 份, 每份约 0.1 g, 精密称定, 按高、中、低 3 种浓度分别加入甘草酸单铵对照品溶液, 按 2.2.2 项下供试品溶液的制备方法制备供试品溶液, 分别进行测定, 计算回收率。见表 1。

表 1 甘草中甘草酸单铵加样回收率 ($n=9$)

取样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.110 8	4.684 6	3.380 4	8.048 9	99.80		
0.103 8	4.388 7	3.386 3	7.871 4	100.24		
0.098 6	4.168 8	3.390 3	7.391 3	97.78		
0.089 7	3.792 5	4.229 2	8.034 5	100.16		
0.100 7	4.257 6	4.230 8	8.474 8	99.84	99.51	0.95
0.099 2	4.194 2	4.231 6	8.355 0	99.16		
0.110 2	4.659 3	5.102 3	9.775 3	100.14		
0.093 6	3.957 4	5.089 2	9.028 5	99.80		
0.090 8	3.839 0	5.097 2	8.753 9	97.96		

2.2.8 样品测定 取 10 个不同产地的甘草药材, 按照供试品溶液制备方法制备 10 份供试品溶液, 测定峰面积, 按外标一点法计算含量。不同产地甘草药材中甘草酸单铵盐含量测定结果见表 2。

3 讨论

3.1 检测波长的选择 取甘草酸单铵对照品加 70% 乙醇制成每 1 mL 含 20 μg 的溶液, 在 200~400 nm 扫描。结果显示, 对照品在 250 nm 下有最大吸收, 为此本品的含量测定的检测波长确定为 250 nm。

3.2 流动相的选择 曾参考文献^[10-13] 采用冰醋酸-乙腈-水、甲醇-0.2 mol·L⁻¹ 醋酸铵缓冲溶液、甲醇-水-冰醋酸、磷酸盐缓冲液(pH 7.0)-乙腈的不同比例为流动相, 测定甘草酸单铵盐的有关物质和含量。

表 2 不用产地甘草药材中甘草酸单铵盐质量分数 ($n=3$)

No.	产地	来源	质量分数/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD/%
1	新疆阿瓦提	胀果甘草	51.95	1.45
2	新疆石河子	光果甘草	31.64	0.98
3	新疆巴楚	光果甘草	28.92	1.73
4	内蒙古呼和浩特	甘草	42.28	2.46
5	宁夏盐池	甘草	40.42	1.68
6	宁夏银川	甘草	40.64	0.72
7	安徽黄山	甘草	23.55	1.35
8	河北安国	甘草	33.39	2.38
9	甘肃兰州	甘草	26.34	1.81
10	云南昆明	甘草	27.43	1.54

结果显示, 采用磷酸盐缓冲液(pH 7.0)-乙腈(80:20)为流动相时, 甘草酸单铵盐与相邻色谱峰分离良好, 且阴性空白无干扰。

3.3 样品的含量分析 对 10 个不同产地甘草中的甘草酸单铵盐的含量测定结果显示, 不同产地药材的含量有一定差异性, 其中产于新疆胀果甘草和内蒙古甘草的药材含量较高, 此结果将对临床用药提供参考。

3.4 样品的有关物质分析 甘草酸单铵盐原料药在高温、强光、氧化、酸、碱破坏条件下均发生一定降解, 但在碱性条件下, 大约在 24 min 出现含量较高的杂质峰, 该杂质峰为甘草酸二铵, 两者互为异构体, 说明其为甘草酸单铵盐的主要降解产物, 为此在有关物质检查中将其单独进行了定量, 以控制原料药的质量。其杂质限度参考《英国药典》2012 版甘草酸单铵盐的杂质限度要求^[10], 甘草酸二铵杂质不得 >10%, 其他单杂不得 >2%, 除甘草酸二铵杂质外总杂质不得 >7%。结果显示 3 批样品均符合标准。

[参考文献]

[1] 史桂兰, 胡志浩. 甘草酸药理作用及临床应用研究进展[J]. 天津药学, 2001, 13(1): 10.
 [2] 王金秋, 周维纯, 宋金表, 等. 甘草酸单铵盐的精制工艺研究[J]. 林产化通讯, 2001, 35(1): 8.
 [3] 刘丽萍, 任翠爱, 赵宏艳. 甘草酸的免疫调节作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(6): 272.
 [4] 国家药典委员会. 化药地标升国标第 12 册. 甘草酸单铵盐 A: 148.
 [5] 国家药典委员会. 化药地标升国标第 13 册. 甘草酸单铵盐 S: 214.

HPLC 同时测定降脂灵片中 8 个指标性成分的含量

蔡珊珊, 米宝丽, 张振秋*, 高晓旭, 郑艳超, 张杰
(辽宁中医药大学, 辽宁大连 116600)

[摘要] **目的:** 建立以高效液相色谱法同时测定降脂灵片中橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酸、黄决明素、决明素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量测定方法。**方法:** 采用 Phenomexsil-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 284 nm, 柱温 30 °C。**结果:** 在本色谱条件下, 橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酸、黄决明素、决明素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的进样量分别在 0.10 ~ 0.50, 0.066 ~ 0.33, 0.037 ~ 0.19, 0.019 ~ 0.093, 0.028 ~ 0.14, 0.24 ~ 1.2, 0.11 ~ 0.55, 0.17 ~ 0.87 μg 与色谱峰面积呈良好的线性关系; 加样回收率 ($n = 6$) 均在 97.0% ~ 102.9%, RSD 均 < 2.0%。**结论:** 该法快速、准确, 重复性好, 可以满足降脂灵片的含量测定要求。

[关键词] 高效液相色谱; 降脂灵片; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)07-0077-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfix.2014070077

Determination of the Content of Eight Ingredients in Jiangzhiling Tables by HPLC

CAI Shan-shan, MI Bao-li, ZHANG Zhen-qiu*, GAO Xiao-xu, ZHENG Yan-chao, ZHANG Jie
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for determination of aurantioobtusin, aloe-emodin, rhein, chrysoobtusin, obtusin, emodin, chrysophanol, physcion in Jiangzhiling tables. **Method:** The separation was performed on a Phenomexsil-C₁₈ ODS (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with the gradient elution of acetonitrile-water of 0.1% phosphoric acid at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength at 284 nm and the column temperature was set at 30 °C. **Result:** Aurantioobtusin, aloe-emodin, rhein, chrysoobtusin,

[收稿日期] 20130705(014)

[基金项目] 国家中医药行业科研专项(20110700703)

[第一作者] 蔡珊珊, 在读硕士研究生, 从事中药制剂分析研究, Tel: 0411-87586058, E-mail: caishanshan2011@sina.com

[通讯作者] * 张振秋, 博士, 教授, 从事中药制剂分析研究, Tel: 0411-87586058; E-mail: zhangzhenqiu@sina.com

- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 80.
- [7] 孙熠, 耿婷, 单鸣秋, 等. HPLC 测定荆芥内酯的含量和有关物质[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 52.
- [8] 黄洪勇, 催利娜, 唐辉, 等. RP-HPLC 测定蒜氨酸原料药中的有关物质[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(12): 101.
- [9] 李军, 岳易恒, 张丽萍, 等. HPLC 测定不同产地山药中腺苷含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(24): 55.
- [10] British Pharmacopoeia Commission. British Pharmacopoeia [S]. The Stationery Office, 2012BP: 1772.
- [11] 韩慧琴, 曾春萍, 谢颖, 等. 逍遥丸(水丸)质量标准[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(14): 116.
- [12] 张伟明, 李健和, 黎银波, 等. 甘草酸二铵注射液的研制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(6): 35.
- [13] 刘金城, 杭清, 张定善. 高效液相色谱法对甘利欣注射液中 18α-甘草酸和 18β-甘草酸的含量测定[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(11): 2512.

[责任编辑 蔡仲德]