

HPLC 测定异黑成熟颗粒中田蓟苷和甘草酸的含量

薛桂蓬^{1*}, 邢建国¹, 马建红¹, 刘桂花¹, 阿不都热依木·玉素甫²

(1. 新疆维吾尔自治区药物研究所, 乌鲁木齐 830004;
2. 新疆医科大学维吾尔医药系, 乌鲁木齐 830011)

[摘要] 目的: 建立测定异黑成熟颗粒中 2 种有效成分田蓟苷和甘草酸含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法, Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 乙腈-0.5% 甲酸 (27:73) 为流动相, 检测波长 324 nm, 柱温 35 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹。Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 甲醇-0.2 mol·L⁻¹ 酸铵-冰醋酸 (67:33:1) 为流动相, 检测波长 250 nm, 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹。结果: 田蓟苷和甘草酸分别在 1.14 ~ 114 μg ($r=0.9999$) 和 20.6 ~ 206 μg ($r=0.9997$) 线性关系良好; 平均回收率分别为 98.26% (RSD 2.29%), 99.39% (RSD 1.86%)。结论: 该方法简便可行, 重复性好, 可用于异黑成熟颗粒中田蓟苷和甘草酸含量测定。

[关键词] 异黑成熟颗粒; 田蓟苷; 甘草酸; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0104-04

[doi] 10.11653/syfj2013120104

[收稿日期] 20120629(007)

[基金项目] 新疆自治区科技攻关和重点计划项目(200733146-4)

[通讯作者] * 薛桂蓬, 助理研究员, 从事中药新型给药系统与中药新药研究, Tel: 13999160606, 0991-2318172, E-mail: 667889116_xue@163.com

性产生较大影响, 因此, 有必要进行有关物质检查。

在研究原料药有关物质测定方法时, 因供试品中大多数有关物质不很明确, 故采用高效液相色谱的高低自身对照法来进行。蒜氨酸原料药是在中试车间制备所得, 在中试生产过程中, 可能会产生一系列的有关物质, 从而影响到原料药的稳定性。本文通过摸索条件, 建立了反相高效液相色谱法测定蒜氨酸原料药中的有关物质, 方法专属性强、简便、快速, 结果准确可靠。

[参考文献]

[1] Li W H, Wang D X, Song G H, et al. The effect of combination therapy of alliin and fenofibrate on high fat diet-induced vascular endothelium dysfunction and liver damage in rats [J]. *Lipids in Health and Disease*, 2010, 9(1):131.

[2] Khodavandi A, Alizadeh F, Aala F, et al. *In vitro* investigation of antifungal activity of alliin alone and in combination with azoles against candida species [J]. *Mycopathologia*, 2010, 169(4):287.

[3] 黄洪勇, 崔利娜, 唐辉, 等. 蒜氨酸原料药的质量控制标准研究 [J]. *中国医院药学杂志*, 2008, 28(5):363.

[4] Yang L J, Fan L, Liu Z Q, et al. Effects of alliin on CYP2C19 and CYP3A4 activity in healthy volunteers with different CYP2C19 genotypes [J]. *Eur J Clin Pharm*, 2009, 65(6):601.

[5] 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.

[6] 黄洪勇, 崔利娜, 唐辉, 等. 蒜氨酸原料药的理化性质和稳定性研究 [J]. *时珍国医国药*, 2008, 19(4):879.

[7] Arnaut I, Christides J P, Mandon N, et al. High-performance ion-pair chromatography method for simultaneous analysis of alliin, deoxyalliin, alliin and dipeptide precursors in garlic products using multiple mass spectrometry and UV detection [J]. *J Chromatography A*, 2003, 991(1):69.

[8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 二部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010; 附录 VID.

[9] 国家食品药品监督管理局. 药品注册管理办法 [S]. 局令第 28 号. 2007-07-10.

[10] 国家食品药品监督管理局. 中药注册管理补充规定 [S]. 2008-01-07.

[责任编辑 顾雪竹]

Content Determination of Tiliandin and Glycyrrhizic Acid in Abnormal Savda Munziq Granules by HPLC

XUE Gui-peng^{1*}, XING Jian-guo¹, MA Jian-hong¹, LIU Gui-hua¹, YUSUP Abdiryim²

(1. Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China;

2. Faculty of Traditional Urumqi Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the method for the content determination of tiliandin and glycyrrhizic acid in Abnormal Savda Munziq granules. **Method:** HPLC was adopted to determine the content of tiliandin and glycyrrhizic acid. The column for Tiliandin is Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase was consisted of acetonitrile-0.5% formic acid (27:73) with the detection wavelength at 324 nm. The column temperature was set at 35 °C and the flow rate was set at 1.0 mL · min⁻¹. The column for glycyrrhizic acid was Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase was consisted of methanol-0.2 mol · L⁻¹ ammonium acetate-glacial acetic acid (67:33:1) with the detection wavelength at 250 nm. The column temperature was kept at 30 °C and the flow rate was set at 1.0 mL · min⁻¹. **Result:** There was good linearity between the peak area and concentration within the range of 1.14-114 μg ($r = 0.9999$) for tiliandin and 20.6-206 μg ($r = 0.9997$) for glycyrrhizic acid respectively. **Conclusion:** The method is simple, accurate and specific for quality control of Abnormal Savda Munziq granules.

[Key words] Abnormal Savda Munziq granules; tiliandin; glycyrrhizic acid; HPLC

异黑成熟颗粒是按照维医理论组方的传统维药复方制剂,处方来源于古代著名维吾尔医学专家穆哈默德·艾克拜尔·艾尔扎尼编撰的经典名著《米扎尼提比也》(医学之规律)^[1]。该制剂以薰衣草、小茴香、破布木果、大枣、牛舌草、香青兰、甘草、铁线蕨、地锦草、刺糖 10 味药为原料,经科学方法精制而成,用于异常黑胆质体液的成熟、干寒气质的调节,异常黑胆质证所导致的各类肿瘤患者的辅助治疗。田蓯苣是香青兰中主要有效成分,甘草酸为甘草中主要有效成分^[2]。本文建立了异黑成熟颗粒中 2 种有效成分田蓯苣和甘草酸含量测定方法,为其质量标准的制定提供参考。

1 材料

SPD-10AVP 型高效液相色谱仪(日本岛津制造所),包括 LC-10ATVP 二元高压泵,SPD-10AVP 紫外检测器,CTO-10ASVP 柱温箱,SCL-10AVP 系统控制器,BS110S 型电子天平(Sartorius),Millipore simplicity-185 超纯水器(美国密理博公司),KQ-100DE 型数控超声波发生器(昆山市超声仪器有限公司)。异黑成熟颗粒中试产品(新疆奇康哈博维药有限公司生产,批号 081119,081120,081121)。香青兰、甘草阴性样品(制备工艺同异黑成熟颗粒)。甘草酸单铵盐对照品(批号 110731-200614)

购自中国药品生物制品检定所;田蓯苣对照品(批号 20070408)由新疆药物研究所自制。甲醇、乙腈为美国 Fisher 公司色谱纯,其他试剂为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 取干燥至恒重的田蓯苣对照品适量,精密称定,加 70% 乙醇制成每 1 mL 含 114 μg 的溶液,作为田蓯苣对照品溶液;取甘草酸单铵盐对照品适量,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加甲醇-0.2 mol · L⁻¹ 醋酸铵-冰醋酸(67:33:1)制成每 1 mL 含甘草酸单铵盐 206 μg(折合甘草酸为 0.201 8 mg)的溶液,作为甘草酸单铵盐对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

2.2.1 田蓯苣含量测定用供试品溶液的制备^[3-4]

取本品 5 袋(批号为 081120),将内容物研细过四号筛,取 1 g,精密称定,置 25 mL 量瓶中,加适量 70% 乙醇,超声处理 15 min,放冷,用 70% 乙醇稀释至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。

2.2.2 甘草酸含量测定用供试品溶液的制备^[5-6]

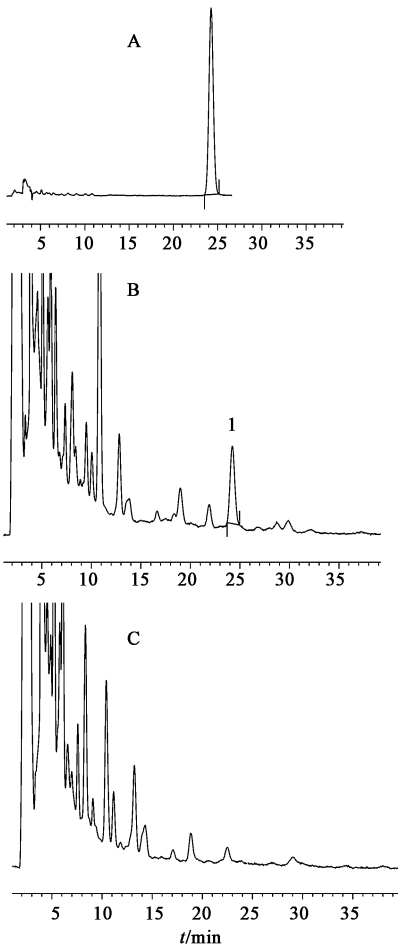
取本品 5 袋(批号为 081120),将内容物研细过四号筛,取 1 g,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加适量流动相,超声处理 15 min,放冷,用流动相稀释至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.3 阴性对照溶液的制备

按处方比例及制备工

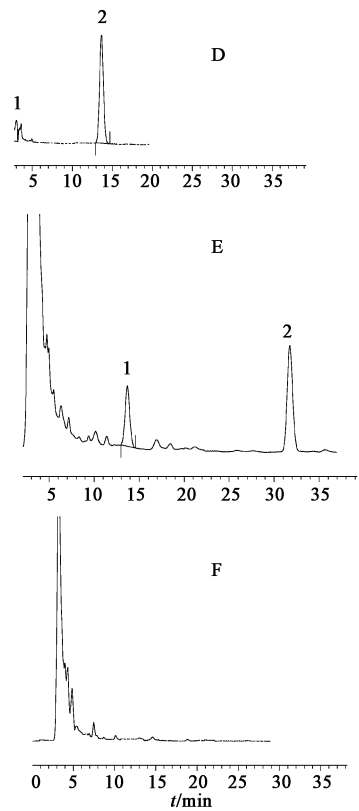
艺,分别制备不含香青兰、甘草的阴性对照品,并依 2.2 项供试品溶液制备方法分别制成阴性对照溶液。

2.4 色谱条件 田蓯苣以 Diamonsil C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱,乙腈-0.5% 甲酸(27:73)为流动相,检测波长 324 nm,柱温 35 °C,流速 1.0 mL·min⁻¹。甘草酸以 Diamonsil C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱,甲醇-0.2 mol·L⁻¹ 醋酸铵-冰醋酸(67:33:1)为流动相,检测波长 250 nm,柱温 30 °C,流速 1.0 mL·min⁻¹。对照品、供试品及阴性见图 1,2。



A. 对照品;B. 供试品;C. 香青兰阴性;1. 田蓯苣
图 1 田蓯苣 HPLC

2.5 线性关系考察 分别精密吸取田蓯苣对照品溶液(0.114 mg·L⁻¹)1.0,2.0,3.0,4.0 mL 分别置 10 mL 量瓶中,再精密吸取贮备液 1 mL 两份分别置 25,100 mL 量瓶中,加 70% 乙醇稀释至刻度,摇匀,分别制成每 1 mL 含 11.4,22.8,34.2,45.6,4.56,1.14 μg 的对照品系列溶液;分别精密吸取甘草酸对照品溶液(0.2018 mg·L⁻¹)1.0,2.0,3.0,4.0,



D. 甘草酸对照品;E. 供试品;F. 甘草阴性;2. 甘草酸单铵
图 2 甘草酸 HPLC

5.0 mL,分别置 10 mL 量瓶中,加甲醇-0.2 mol·L⁻¹ 醋酸铵-冰醋酸(67:33:1)稀释至刻度,摇匀,分别制成每 1 mL 含 20.6,41.2,61.8,82.4,103 μg 的对照品系列溶液。分别精密吸取上述溶液 10 μL,注入液相色谱仪,以 2.4 色谱条件测定,进行线性回归,得田蓯苣和甘草酸回归方程分别为 $A = 27\ 373C + 48.91$ ($r = 0.999\ 9$), $A = 11\ 595C - 40\ 596$ ($r = 0.999\ 7$), 线性范围分别为 1.14 ~ 114,20.6 ~ 206 μg。

2.6 精密度试验 分别取同一供试品溶液,按上述色谱条件连续进样 6 次,结果田蓯苣和甘草酸峰面积的 RSD 分别为 1.25%,0.96%。

2.7 重复性试验 取同一批号异黑成熟颗粒(批号 081120),按 2.2 项下方法制备 6 份供试品溶液,测定,计算含量。结果田蓯苣和甘草酸含量的 RSD 分别为 1.33%,1.86%,表明重复性良好。

2.8 回收率试验 采用加样回收法。取异黑成熟颗粒(批号 081120)5 袋研细,精密称取 10 份,每份 0.5 g,置 25 mL 量瓶中,第 1 份作为空白,其余分 3 组,每组 3 份,精密加入田蓯苣对照品,使成高、中、低 3 浓度,依法制备供试品溶液,测定;另取异黑成熟颗粒(批号 081120)5 袋研细,精密称取 10 份,每份 0.5 g,置 50 mL 量瓶中,第 1 份作为空白,其余分

3组,每组3份,精密加入甘草酸单铵盐对照品,使成高、中、低3浓度,依法制备供试品溶液,测定。结果田蓟苷和甘草酸平均回收率分别为98.26%(RSD 2.29%),99.39%(RSD 1.86%),见表1,2。

表1 田蓟苷加样回收率试验

No.	加样量 /μg	实测量 /mg	称样量 /g	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
1	45.6	119.33	0.5007	97.62	98.67	2.29
2	45.6	121.34	0.5004	102.12		
3	45.6	118.59	0.4998	96.27		
4	91.2	161.55	0.4997	95.57	96.98	
5	91.2	164.22	0.5002	98.11		
6	91.2	163.43	0.5001	97.26		
7	136.8	205.12	0.5006	96.96	99.17	
8	136.8	210.62	0.5005	99.30		
9	136.8	213.25	0.5002	101.25		

表2 甘草酸加样回收率试验

No.	加样量 /mg	实测量 /mg	称样量 /g	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
1	0.822	1.7878	0.5002	97.83	97.96	1.86
2	0.822	1.7716	0.5001	96.36		
3	0.822	1.7995	0.4993	99.70		
4	1.233	2.1845	0.4996	97.72	99.02	
5	1.233	2.2120	0.5004	99.59		
6	1.233	2.2109	0.5003	99.76		
7	1.644	2.6925	0.5008	102.59	101.17	
8	1.644	2.6331	0.5010	100.23		
9	1.644	2.6396	0.5005	100.69		

2.9 供试品含量测定 取异黑成熟颗粒(批号081119,081120,081121),按2.2项下供试品处理方法处理,测定田蓟苷和甘草酸的含量,见表3。

表3 3批中试样品中田蓟苷和甘草酸的含量

批号	田蓟苷		甘草酸	
	含量/(mg/袋)	RSD/%	含量/(mg/袋)	RSD/%
081119	1.07	1.27	13.82	1.67
081120	1.09	1.73	13.90	1.38
081121	1.04	1.46	14.17	1.36

3 讨论

甘草中甘草酸的含量测定^[7],根据文献,改变

流动相中有机相的比例可以改善分离效果,逐步调节流动相的比例分别为(65:35),(63:37),(60:40),由试验结果可知,当比例调节至(60:40)时,分析时间1h,甘草酸单铵盐31min出峰,峰形不好,分离效果差,仍未回归基线,综合考虑后,选择分析时间合理,甘草酸色谱分离度、拖尾因子、理论板数符合要求的色谱系统,即甲醇-0.2 mol·L⁻¹醋酸铵-冰醋酸(67:33:1),流速1.0 mL·min⁻¹,柱温30℃。

处方中香青兰为维吾尔药材,主要含有黄酮类,挥发油、萜类、氨基酸、微量元素等成分,其所含的黄酮类化合物是香青兰的主要成分之一,田蓟苷是分离得到的黄酮类单体化合物,因此,通过查阅文献结合本所对香青兰药材的系统研究^[8],选用乙腈-0.5%甲酸(27:73)为流动相,检测波长324 nm,流速1.0 mL·min⁻¹,柱温35℃。经预试表明,供试品溶液在该色谱条件下田蓟苷分离效果较好。考虑到田蓟苷出峰时间较长,分析时间也较长,乙腈用量较大,成本较高,因此调节流动相的比例为(31:69),(30:70),(29:71),(28:72)分离效果均不好,故确定流动相为乙腈-0.5%甲酸(27:73)。

[参考文献]

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 药品标准维吾尔药分册[S]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999:181.
- [2] 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.
- [3] 买买提·努尔艾合提,吐尔洪·艾买尔,罗光明. 高效液相色谱法测定维吾尔药材香青兰中田蓟苷和洋芹素的含量[J]. 中国民族医药杂志,2009,11(11):61.
- [4] 古海锋,陈若芸,孙玉华. 香青兰化学成分的研究[J]. 中国中药杂志,2004,29(3):232.
- [5] 素建兰,沈峰. HPLC法测定甘草中甘草酸的含量[J]. 陕西中医,2010,31(2):226.
- [6] 夏莲,陈卫卫. HPLC测定清胰利胆颗粒中绿原酸[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(10):101.
- [7] 范彩玲,张海燕,周映霞,等. 甘草中甘草酸提取方法比较[J]. 河南科学,2010,28(12):226,1543.
- [8] 闵庆璐,王巍,鞠成国,等. HPLC测定丹黄祛瘀片中苦参碱和氧化苦参碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(1):60.

[责任编辑 顾雪竹]