

HPLC 法测定铁笛丸中甘草酸的含量

孟蕾¹, 曹杰², 张海鸣², 沈圣民², 杜树山^{2*}

(1. 中药资源保护与利用北京市重点实验室 北京师范大学教育部资源药物工程研究中心, 北京 100875;

2. 北京师范大学校医院, 北京 100875)

[摘要] 目的: 建立铁笛丸中甘草酸的高效液相含量测定方法。方法: 采用高效液相色谱法, Diamonsil C₁₈(4.6 mm ×250 mm, 5 μm); 流动相甲醇-[0.2 mol·L⁻¹醋酸铵-冰醋酸(33:1)](64:36); 流速 1 mL·min⁻¹; 柱温 30 °C; 检测波长 250 nm。结果: 线性范围为 0.15 ~0.75 μg, 精密度试验 RSD 2.07%, 回收率 99.50%, RSD 2.15% (n=6)。结论: 该方法快速、简便、准确、重复性较好, 结果可靠, 可为铁笛丸的质量评价提供有效手段。

[关键词] 铁笛丸; 甘草酸; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)04-0035-02

铁笛丸由同仁堂天然药物有限公司生产, 由诃子肉、浙贝母、茯苓、桔梗、麦冬、玄参、瓜蒌皮、青果、凤凰衣、甘草等 10 味药组成, 具有润肺利咽, 生津止渴的功效, 用于肺热津伤咽干口燥, 声音嘶哑, 咽喉疼痛。甘草为本品方中的主药, 故以甘草酸为指标进行含量测定, 控制成品的质量。甘草酸的含量测定《中国药典》2005 年版一部^[1], 操作更为简便, 方法可靠, 重复性好, 故本标准采用高效液相色谱法测定甘草酸的含量。

1 材料

1.1 仪器 Waters1515 高效液相色谱仪, Waters2487 紫外可见检测器, Mellennium³² 色谱工作站。KQ-250 型超声波清洗器, Mettler Toledo AG135 十万分之一电子分析天平。

1.2 试剂 甲醇为色谱纯, 水为纯净水, 磷酸等其他试剂均为分析纯。甘草酸铵为中国药品生物制品检定所提供(批号 110731-200511 供含量测定用)。铁笛丸(同仁堂股份公司, 批号 6013846, 6013847, 6013848)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: DiamonsilTM C₁₈ 分析柱

(4.6 mm ×250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-[0.2 mol·L⁻¹醋酸铵-冰醋酸(33:1)](64:36), 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 250 nm, 柱温 30 °C, 进样体积 10 μL。理论板数按甘草酸峰计算不低于 2 000。

2.2 供试品溶液的制备 按样品与硅藻土 6:4 比例, 取 2.10 g 样品和 1.40 g 硅藻土粉碎并均匀混合成中粉, 精密称定, 置 250 mL 的具塞锥形瓶中, 精密加入 40% 甲醇 100 mL, 称定质量, 超声(功率 250 W, 频率 40 KHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 40% 甲醇补足重量, 摇匀, 静置, 离心, 取上清液滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取甘草酸铵对照品 1.25 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加流动相溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得(每 1 mL 含甘草酸铵 50 μg, 折合甘草酸 48.975 μg)。

2.4 阴性供试品溶液的制备 按成品制剂方法制得缺甘草的阴性样品制剂。取阴性样品制剂, 研细, 按供试品溶液的制备方法制得阴性供试品溶液。

2.5 系统适用性试验 按前法分别测定样品溶液、对照品溶液、阴性溶液, 见图 1。结果表明, 甘草酸对照品与铁笛丸中甘草酸的保留时间基本一致, 阴性供试品溶液在相应位置处无相应的峰出现, 同时与其他组分分离完全, 分离度为 2.04, 理论板数以甘草酸峰计算应不低于 2 000。

2.6 线性关系的考察 精密称取甘草酸铵对照品 1.25 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。再分别精密自动吸取此溶液 3, 5, 8, 10, 13, 15 μL, 注入液相色谱仪, 按上述色谱条

[收稿日期] 2009-09-17

[基金项目] 北京市新医药学科群重点支持项目(xk100270569); 国家科技支撑计划课题(2007BAI48B10)

[通讯作者] * 杜树山, Tel: (010) 62208032; E-mail: dushushan@ires.cn

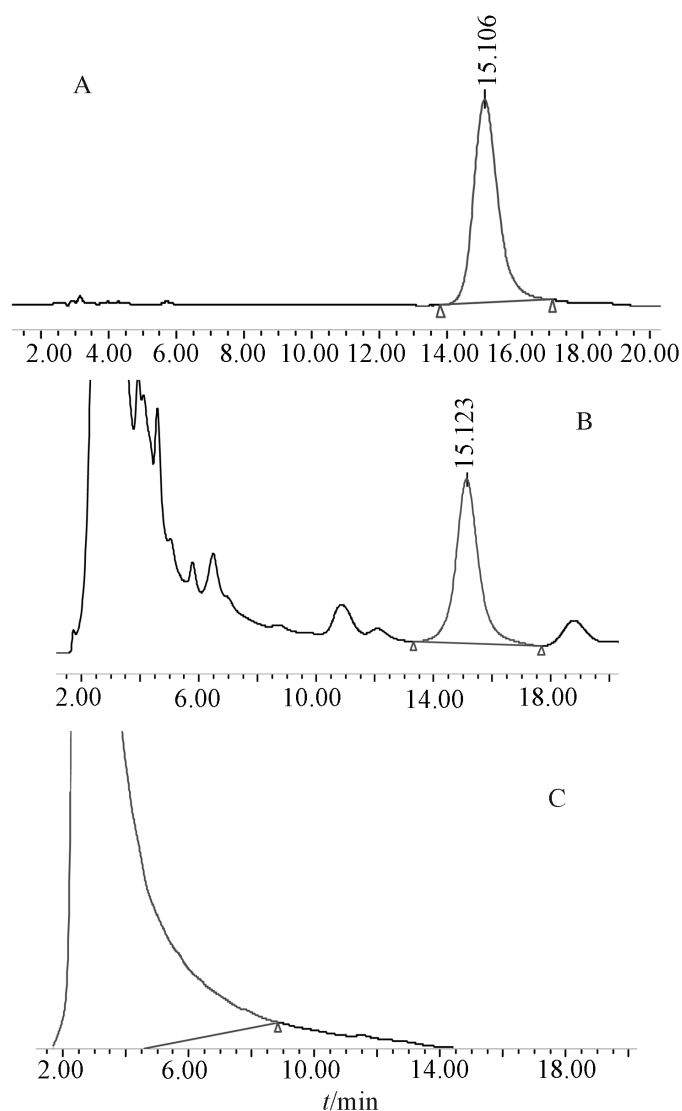


图 1 HPLC 图谱

A. 甘草酸铵对照品; B. 供试品; C. 阴性样品

件测定色谱峰面积, 以对照品的进样量 X (μg) 对峰面积的积分值 Y 进行线性回归, 结果表明, 甘草酸进样量在 $0.15 \sim 0.75 \mu\text{g}$ 范围内线性关系良好, 其线性回归方程为: $Y = 839\,457X - 20\,273$, $r = 0.999\,6$ 。

2.7 精密度试验考察 取同一供试品溶液(批号: 6013846), 同法连续测定 5 次, 测定对照品对应的色谱峰峰面积, RSD 2.07%。

2.8 稳定性试验考察 取同一供试品溶液(批号: 6013846), 按 0, 2, 4, 6, 8 h 时间间隔, 分别测定峰面积, 试验结果表明, 供试品溶液制备后 8 h 内测定, 色谱峰面积无明显变化, RSD 3.00%。

2.9 重复性试验 取 6 份样品(批号: 6013846), 平行操作, 测定甘草酸的质量分数, 计算其 RSD 为 0.46% ($n = 6$), 表明在方法重复性良好。

2.10 加样回收试验 取本品已知准确含量的样品(批号 6013846, 含量 7.41 mg/丸) 取 6 份, 各 1.75 g , 精密称定, 置 250 mL 的具塞锥形瓶中, 精密加入甘草酸铵对照品 (2.45 mg), 精密加入 40% 甲醇 100 mL , 称定质量, 超声(功率 250 W , 频率 40 KHz) 30 min , 放冷, 再称定质量, 用 40% 甲醇补足质量, 摇匀, 静置, 离心, 取上清液滤过, 取续滤液, 即得。在上述条件下进行含量测定, 测定结果见表 1。

试验结果表明, 用本文所述试验方法测定供试品中甘草酸的含量, 加样回收率均符合要求。

2.11 样品含量测定 按本文色谱条件, 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液 $10 \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪, 并在上述色谱条件下测定 3 批样品的每片中甘草酸的质量分数分别为 $7.41, 7.36, 7.52 \text{ mg/丸}$ 。

表 1 加样回收率试验

取样量 /g	样品中含 量 /mg	对照品加 入量 /mg	实测总 量 /mg	回收率 /%	均值 /%	RSD /%
1.003 4	2.478 4	2.45	4.815	95.37	99.5	2.15
1.051 1	2.592 6	2.45	5.070	100.97		
1.054 9	2.605 6	2.45	5.075	100.79		
1.042 4	2.574 8	2.45	5.031	100.25		
1.041 9	2.573 5	2.45	5.036	100.51		
1.001 3	2.473 2	2.45	4.897	98.93		

3 讨论

本实验考察了超声处理不同时间的样品的含量, 结果表明超声提取 30 min 可提取完全。考察了加入不同体积提取溶剂的样品的含量, 结果表明溶剂量为 100 mL 可提取完全。取甘草酸铵对照品溶液适量, 经紫外光谱扫描, 其最大吸收波长为 250 nm , 因而选择检测波长为 250 nm 。

根据文献报道^[2-5], 选用甲醇-[$0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵 冰醋酸(33 1)] ($64 \text{ } 36$) 为流动相对本品进行试验, 色谱柱为 Diamonsil C_{18} ($4.6 \times 250 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$), 所得色谱图的分离度好, 保留时间较合适, 故本试验选用的流动相为甲醇-[$0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵 冰醋酸(33 1)] ($64 \text{ } 36$), 并将该条件的色谱图记录下来, 以被测组分甘草酸峰计算理论塔板数, 并计算甘草酸与相邻峰的分离度, 根据试验结果, 考虑到仪器、色谱柱、流动相的配制和温度等系统因素的影响, 规定理论板数按甘草酸铵峰计算, 应不低于 $2\,000$ 。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 59.
- [2] 白丽, 陈晓辉, 徐新盛, 等. HPLC 测定萆薢分清丸中甘草酸的含量[J]. 中成药, 2005, 27(8): 981.
- [3] 余卫兵, 齐晓丹. 高效液相色谱法测定活血溶栓丸中甘草酸的含量[J]. 中国药师, 2009, 12(1): 92.
- [4] 董洪明, 范燕, 李翠. HPLC 法测定痰克净滴丸中甘草酸的含量[J]. 首都医药, 2008, 15(20): 49.
- [5] 任晓明. HPLC 法测定小儿咳喘灵口服液中甘草酸的含量[J]. 中国药师, 2008, 11(11): 1394.