

HPLC 法测定乐肝清炎胶囊中栀子苷、甘草素的含量

张科卫, 吴皓*, 崔小兵, 王媚, 宋坤
(南京中医药大学, 江苏南京 210029)

[摘要] 目的: 研究以 HPLC 法同时测定乐肝清炎胶囊中栀子苷、甘草素含量的方法。方法: 采用 Kromasil C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以甲醇-0.5% 冰乙酸为流动相, 梯度洗脱, 体积流量: 1.0 mL·min⁻¹, λ₁ = 238 nm(检栀子苷), λ₂ = 276 nm(检甘草素), 柱温 30 °C。结果: 栀子苷在(54.1~162.4) μg·mL⁻¹ 与峰面积呈良好的线性关系, r = 0.999 8, 甘草素在(5.2~15.5) μg·mL⁻¹ 与峰面积呈良好的线性关系, r = 0.999 9。平均加样回收率(n = 9): 栀子苷为 99.66%; 甘草素为 99.90%。结论: 本法操作简便, 结果可靠, 重现性好, 可作为该产品质量控制的方法。

[关键词] 高效液相色谱法; 乐肝清炎胶囊; 双波长; 栀子苷; 甘草素; 含量测定

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)10-0008-03

Determination of Geniposide and Liquiritigenin in Legar-Qingyan Capsules by HPLC

ZHANG Ke-wei, WU Hao*, CUI Xiao-bing, WANG Mei, SONG Shen
(Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for determination of geniposide and liquiritigenin in Legar-Qingyan Capsules. **Methods:** A Kromasil C₁₈ Column(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used. The mobile phase was methanol-0.5% glacial acetic acid, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, λ₁ = 238 nm(for the geniposide), λ₂ = 276 nm(for the liquiritigenin), the column temperature was 30 °C. **Results:** The linear range for geniposide was within (54.1~162.4) μg·mL⁻¹, r = 0.999 8, recovery was 99.66% (n = 9). The linear range for liquiritigenin was within (5.2~15.5) μg·mL⁻¹, r = 0.999 9, recovery was 99.90% (n = 9). **Conclusion:** This method has good reproducibility. It can be used for quality control in production of Legar-Qingyan Capsules.

[Key words] HPLC; Legar-Qingyan Capsules; dual wavelength; geniposide; liquiritigenin; content determination

乐肝清炎胶囊由栀子、甘草等药材组成,用于治疗湿热发黄、热重于湿之阳黄症。本文采用 HPLC 法同时检测其中的栀子苷和甘草素的含量,操作简便,方法可靠,重现性好,可作为本产品质量控制的方法。

1 仪器、试剂与药品

Waters515 型高效液相色谱仪, 2487 型双波长紫外检测器, 717 自动进样器, Millennium 32 色谱管理系统; Sartorius BP211D 型电子天平; KQ-500DE 型医用数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 甲醇为色谱纯, 冰乙酸为分析纯, 水为亚沸蒸馏水(自制); 栀子苷(110749-200309) 由中国药品生物制品检定所提供, 甘草素对照品由本实验室分离纯化制得, 经 UV IR MS NMR 等结构测定, HPLC 检测为单一成分, 纯度达到 99% 以上; 乐肝清炎胶囊(由南京中医药大学中医药研究院提供, 批号 070510, 070516, 070518)。

2 实验方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Kromasil C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.5% 冰乙酸, 梯度洗脱, 程序见表 1; 体积流量: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: λ₁ = 238 nm(检栀子苷), λ₂ = 276 nm(检甘草素), 柱温: 30 °C。理论塔板数以栀子苷计不低于 4 000。此条件下经栀子、甘草空白对照试验, 证明其它药材不干扰栀子、甘草的测定, 并且栀子苷、甘草素与其它组分的分离度均大于 1.5, 色谱图见图 1。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别取干燥至恒重的栀子苷、甘草素对照品适量, 精密称定, 加 50% 的甲醇溶解, 分别配成含栀子苷 902 μg·mL⁻¹、甘草素 86 μg·mL⁻¹ 的对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 取装量差异项下的乐肝清炎胶囊约 0.1 g, 研细, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加入 50% 的甲醇 80 mL, 超声处理(功率 200 W, 频率 40 KHz) 30 min, 放冷, 加 50% 的甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液即得。同法制备缺栀子、甘草的阴性样品溶液。

2.3 线性关系的考察 准确吸取对照品溶液 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.8 mL 置 10 mL 量瓶中, 加 50% 的甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制得混合对照品溶液系列(s₁, s₂, s₃, s₄, s₅), 取 10 μL 进样, 按色谱条件测定峰面积积分值。按对照品浓度为横坐标, 峰面积积分

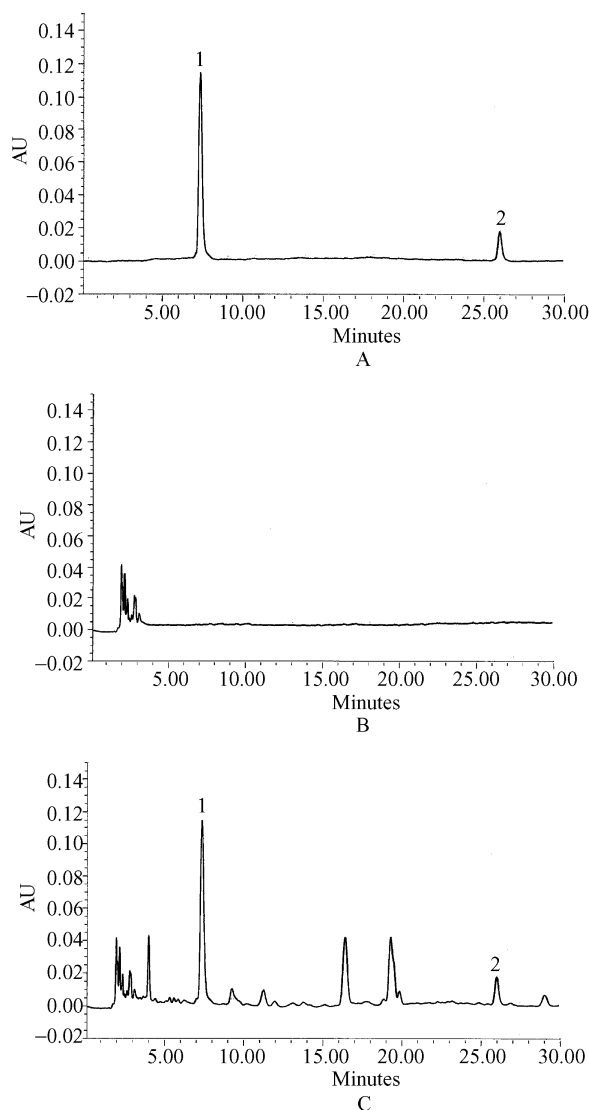


图 1 对照品溶液(A)、阴性样品溶液(B)、样品溶液(C)的 HPLC 色谱图
1 栀子苷; 2 甘草素

值为纵坐标, 得线性回归方程。栀子苷的方程为 $Y = 1.53 \times 10^4 X + 1.01 \times 10^3$, $r = 0.9998$; 甘草素的方程为 $Y = 2.94 \times 10^4 X + 1.08 \times 10^3$, $r = 0.9999$ 。表明栀子苷在(54.1~162.4) μg·mL⁻¹, 甘草素在(5.2~15.5) μg·mL⁻¹ 与峰面积呈良好的线性关系。

表 1 洗脱程序

时间(min)	甲醇(%)	0.5% 冰醋酸(%)
0 → 11	30	70
11 → 19	30 → 45	70 → 55
19 → 30	45	55
30 → 38	45 → 70	55 → 30
38 → 43	70	30
43 → 47	70 → 30	30 → 70
47 → 60	30	70

2.4 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 s3, 连续进样 6 次, 测定峰面积。结果栀子苷、甘草素峰面积积分值的 RSD 分别为 1.88%, 1.72%。

2.5 重复性试验 取同一批样品按供试品溶液的制备方法平行制备 6 份, 依法测定, 计算, 结果栀子苷、甘草素质量分数的 RSD 分别为 1.28%, 1.54%。

2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 进样 10 μ L, 测定栀子苷、甘草素的峰面积, 结果 RSD 分别为 1.12%, 1.56%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.7 回收率试验 精密称取栀子苷、甘草素对照品适量, 置于同一 10 mL 量瓶中, 加 50% 的甲醇溶解并稀释定容至刻度, 配制成含栀子苷 8.98 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、甘草素 896 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 作为标准加样储备液。精密称取含栀子苷 91.695 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、甘草素 8.954 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 的乐肝清炎胶囊共 9 份, 每份约 0.05 g, 分别精密加入上述标准加样储备液 0.4, 0.5, 0.6 mL, 每个平行 3 份, 按供试品溶液制备方法制成加样回收样品液。取 10 μ L 进样测定, 计算。结果栀子苷、栀子苷的平均加样回收率 ($n = 9$) 分别为 99.66% 和 99.90%, RSD 分别为 1.06% 和 1.40%。见表 2~3。

2.8 样品含量测定 取不同批号的乐肝清炎胶囊供试品溶液, 分别精密吸取混合对照品溶液与供试品溶液各 10 μ L, 注入液相色谱仪, 测定, 每个批号平行 3 份, 每份进样 2 次, 以外标一点法计算含量。见表 4。

表 2 栀子苷加样回收率试验结果 ($n = 9$)

取样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得总量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.0515	4.722	3.592	8.279	99.02		
0.0509	4.667	3.592	8.235	99.33		
0.0496	4.548	3.592	8.196	101.56		
0.0498	4.566	4.490	9.026	99.33		
0.0490	4.493	4.490	9.032	101.09	99.66	1.06
0.0506	4.640	4.490	9.132	100.04		
0.0508	4.658	5.388	10.002	99.18		
0.0497	4.557	5.388	9.898	99.13		
0.0502	4.603	5.388	9.896	98.24		

表 3 甘草素加样回收率试验结果 ($n = 9$)

取样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得总量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.0515	0.461	0.358	0.815	98.88		
0.0509	0.456	0.358	0.813	99.72		
0.0496	0.444	0.358	0.809	101.96		
0.0498	0.446	0.448	0.896	100.45		
0.0490	0.439	0.448	0.892	101.12	99.90	1.40
0.0506	0.453	0.448	0.896	98.88		
0.0508	0.455	0.538	1.001	101.49		
0.0497	0.445	0.538	0.973	98.14		
0.0502	0.449	0.538	0.979	98.51		

3 讨论

本实验比较了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-冰乙酸、乙腈-冰乙酸系统及梯度洗脱条件下对样品中栀子苷、甘草素分离度的影响, 结果发现采用甲醇-0.5% 冰乙酸梯度洗脱时栀子苷、甘草素能得到良好的分离。

长期的医疗实践表明, 栀子、甘草均具有护肝作用; 现代药理研究也证实: 栀子中的栀子苷等环烯醚萜类化合物是具有保肝利胆作用的有效成分^[1], 甘草中的甘草素等黄酮类物质对乙醇及四氯化碳所致的小鼠肝损伤有保护作用^[2,3]。本试验主要针对含栀子、甘草的复方制剂乐肝清炎胶囊中的栀子苷和甘草素的含量进行研究, 探索了采用反相 HPLC 法同时测定其中栀子苷和甘草素的含量, 方法简便、快捷、可行, 可以作为该产品质量控制的方法。

表 4 乐肝清炎胶囊中栀子苷和甘草素的测定 ($n = 3$)

批号	栀子苷 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	甘草素 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
070510	91.695	8.954
070516	88.689	9.339
070518	95.622	10.668

[参考文献]

- [1] 傅春升, 姜红祥, 张学顺. 栀子的化学成分与药理作用[J]. 国外医药·植物药分册, 2004, 19(4): 152-156.
- [2] 王根生, 韩哲武. 甘草类黄酮对乙醇所致小鼠肝损伤的影响[J]. 中国药理学通报, 1993, 9(4): 271-273.
- [3] 王根生, 韩哲武. 甘草类黄酮对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的影响[J]. 药学学报, 1993, 28(8): 572-576.