

## 高效液相色谱法测定加味道遥丸中甘草酸

钱鑫<sup>1</sup>, 徐飞<sup>2\*</sup>

1. 佛山市药品检验所, 广东 佛山 528000
2. 宁夏回族自治区疾病预防控制中心, 宁夏 银川 750004

**摘要:** 目的 采用高效液相色谱法测定加味道遥丸中甘草酸的方法。方法 色谱条件: Kromasil C<sub>18</sub> 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.017 mol/L 磷酸 (36:64); 体积流量: 1 mL/min; 柱温: 30 °C; 检测波长: 250 nm。结果 甘草酸在 0.084~0.500 μg 线性关系良好,  $r=0.999\ 9$ , 回收率为 98.5%, RSD 为 0.80% ( $n=6$ )。结论 本法准确可靠, 重现性好, 可用于测定加味道遥丸中甘草酸。

**关键词:** 加味道遥丸; 甘草酸; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2013)02-0194-03

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2013.02.023

## Determination of glycyrrhizic acid in Jiawei Xiaoyao Pills by HPLC

QIAN Xin<sup>1</sup>, XU Fei<sup>2</sup>

1. Foshan Institute for Drug Control, Foshan 528000, China
2. Ningxia Centers for Diseases Prevention Control, Yinchuan 750004, China

**Abstract: Objective** To establish an HPLC method for the determination of glycyrrhizic acid in Jiawei Xiaoyao Pills. **Methods** The chromatographic separation was performed on Kromasil C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.017 mol/L phosphoric acid (36:64), the flow rate was 1 mL/min at 30 °C, and the detection wavelength was 250 nm. **Results** The linearity for glycyrrhizic acid was in a range of 0.084—0.500 μg ( $r = 0.999\ 9$ ), and the average recovery and RSD were 98.5% and 0.80%, respectively ( $n = 6$ ). **Conclusion** The method is accurate, reliable, and reproducible, and could be used as a quality control method for the determination of glycyrrhizic acid in Jiawei Xiaoyao Pills.

**Key words:** Jiawei Xiaoyao Pills; glycyrrhizic acid; HPLC

加味道遥丸是由柴胡、当归、白芍、白术(麸炒)、茯苓、甘草、牡丹皮、栀子(姜炙)、薄荷 9 味中药组成, 具有舒肝清热、健脾养血等的功效, 用于肝郁血虚、肝脾不和、两胁胀痛、头晕目眩、倦怠食少、月经不调、脐腹胀痛<sup>[1]</sup>。甘草酸为该成药重要药味甘草中有效成分之一, 研究证实甘草酸具有一定的抗病毒活性<sup>[2]</sup>。国内的学者已经建立了高效液相色谱法和高效毛细管电泳色谱法测定加味道遥丸中丹皮酚、芍药苷和栀子苷的方法<sup>[3-5]</sup>。本实验采用高效液相色谱法, 通过方法学考察和 3 批样品的测定, 建立了加味道遥丸中甘草酸的测定方法。经实验证明, 该方法简便准确、重复性好, 结果可

靠, 可以用作加味道遥丸中甘草酸测定的方法。

### 1 仪器与试剂

U—3000 高效液相色谱仪, 包括 LPG—3400SD 四元泵, SR—3000 在线脱气机, VWD—3100 紫外检测器, CM-CHM-1 数据处理工作站(美国 Dionex 公司); AB265—S 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。

甘草酸铵对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110731-201116, 质量分数 93.1%, 供含量测定用); 加味道遥丸(北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂, 批号 1086224、1086225、1086226); 乙腈、甲醇均为色谱纯(广州艾欣科学仪器有限公司);

收稿日期: 2012-10-24

作者简介: 钱鑫, 女, 中药学学士学位, 药师。Tel: (0757) 83338463 E-mail: diny\_1985@126.com

\*通信作者 徐飞, 男, 分析化学硕士, 研究方向为天然产物化学。Tel: (0951)4077400 E-mail: lengyue0524@163.com

磷酸等其他试剂均为分析纯；水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

Kromasil C<sub>18</sub> 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) (瑞典 Akzo Nobel 公司, 柱号 E32479); 流动相: 乙腈 - 0.017 mol/L 磷酸 (36:64); 体积流量: 1 mL/min; 柱温: 30 °C; 检测波长: 250 nm。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 对照品溶液的制备** 取甘草酸铵对照品 18.34 mg, 用甲醇 - 0.017 mol/L 磷酸溶液 (13:7) 溶解至 10 mL, 再取 1 mL, 以甲醇 - 0.017 mol/L 磷酸溶液 (13:7) 溶解至 100 mL, 即得 (含甘草酸 16.7 μg/mL)。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 取本品 40 丸, 除去包

衣, 研细, 取约 2.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 - 0.017 mol/L 磷酸溶液 (13:7) 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 (功率 250 W, 频率 33 kHz) 30 min, 取出, 放冷, 再称定质量, 用甲醇 - 0.017 mol/L 磷酸溶液 (13:7) 补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

**2.2.3 阴性对照溶液的制备** 取阴性样品 (除甘草外, 其余按本品处方比例称取适量, 依照制备工艺制备成阴性模拟制剂) 约 2.0 g, 精密称定, 照“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液, 即得。

### 2.3 专属性试验

取甘草酸铵对照品、加味逍遥丸供试品和甘草阴性对照品溶液按照上述色谱条件进样, 进样量 5 μL, 色谱图见图 1。

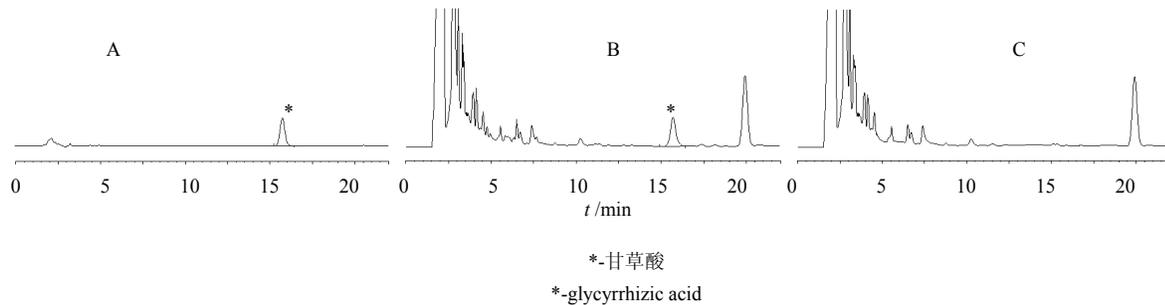


图 1 甘草酸铵对照品 (A)、加味逍遥丸 (B) 和阴性对照 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of ammonium glycyrrhetate reference substance (A), Jiawei Xiaoyao Pills (B), and negative sample (C)

### 2.4 线性关系考察

分别吸取 16.7 μg/mL 甘草酸铵对照品溶液 5、10、15、20、25、30 μL 进样, 平行 3 次, 取均值。结果表明, 甘草酸在 0.084~0.500 μg 时, 进样质量的对数值与峰面积的对数值呈良好的线性关系, 回归方程为  $Y=14.141X+0.0167$ ,  $r=0.9999$ 。

### 2.5 精密度试验

精密吸取 16.7 μg/mL 甘草酸铵对照品溶液, 重复进样 6 次, 每次进样 5 μL, 测定甘草酸峰面积, 计算得甘草酸峰面积的 RSD 值为 1.20%。

### 2.6 重现性试验

取同一批加味逍遥丸 (批号 1086224) 粉末 5 份, 制备供试品溶液, 每次进样 5 μL, 测定甘草酸峰面积, 计算得样品中甘草酸质量分数的均值为 1.378 mg/g, RSD 值为 1.14%。

### 2.7 稳定性试验

取加味逍遥丸样品 (批号 1086224) 粉末, 精

密称定 2.0 g, 制备供试品溶液, 在 0、2、4、6、8、12 h 进样 5 μL, 测定甘草酸峰面积, 计算得甘草酸峰面积的 RSD 值为 1.25%。

### 2.8 回收率试验

取批号 1086224 的加味逍遥丸 (含甘草酸 1.378 mg/g) 粉末 6 份, 每份取约 1.0 g, 精密称定, 分别精密加入 1.670 mg/mL 甘草酸铵对照品溶液 1 mL, 制备供试品溶液, 每次进样 5 μL, 测定峰面积, 计算得平均回收率为 98.5%, RSD 值为 0.80%。

### 2.9 样品测定

对批号 1086224、1086225、1086226 3 批加味逍遥丸样品制备供试品溶液, 进行测定, 以外标工作曲线法计算甘草酸的质量分数。结果 3 批样品中甘草酸的质量分数分别为 1.378、1.347、1.367 mg/g, RSD 值分别为 0.80%、1.10%、0.95% ( $n=3$ )。由实验结果可知, 同一厂家不同批号的加味逍遥丸中甘草酸的含量相差不大。

### 3 讨论

#### 3.1 提取条件的选择

比较了水、甲醇和不同比例甲醇 - 0.017 mol/L 磷酸溶液作为提取溶剂的效果, 结果以甲醇 - 0.017 mol/L 磷酸溶液 (13:7) 的提取效率最佳, 水提取效率最低, 故选择甲醇 - 0.017 mol/L 磷酸溶液 (13:7) 作为提取溶剂。

以甲醇 - 0.017 mol/L 磷酸溶液 (13:7) 为溶剂, 分别采用超声、回流和索氏提取 3 种方法提取, 结果发现索氏提取所得的供试品溶液中甘草酸质量分数较低, 因此选择超声提取作为提取方法, 提取 30 min 后, 药材残渣中已无甘草酸。

#### 3.2 流动相的选择

实验考察了不同比例的乙腈 - 0.017 mol/L 磷酸的效果, 结果表明, 以乙腈 - 0.017 mol/L 磷酸 (36:64) 作为流动相, 分离度良好。

#### 3.3 对照品的选择<sup>[6]</sup>

甘草酸对照品由于不易结晶, 故很难得到, 而甘草酸铵对照品易结晶, 在提取, 精制等方面比较容易, 经处理后有较高纯度。因此, 本实验采用甘草酸铵对照品折算得到甘草酸进行计算。另外, 在

本法乙腈 - 0.017 mol/L 磷酸 (36:64) 流动相条件下, 甘草酸铵与甘草酸出峰的保留时间一致, 不影响测定结果, 因此采用甘草酸铵对照品进行测定。

综上所述, 本实验可以准确、便捷地测定加味逍遥丸中甘草酸, 重现性和回收率均良好, 结果可靠, 可以用作加味逍遥丸中活性成分甘草酸测定的方法。

#### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010: 667.
- [2] 段伟奇, 姬胜利. 甘草酸抗病毒活性的研究进展 [J]. 中草药, 2007, 38(4): 附 1-附 3.
- [3] 李珂, 贾宝秀, 刘彩虹, 等. 高效液相色谱法测定加味逍遥丸中丹皮酚的含量 [J]. 医药导报, 2010, 29(10): 1354-1355.
- [4] 任红心. RP-HPLC 法测定加味逍遥丸中栀子苷的含量 [J]. 中医研究, 2012, 25(5): 71-73.
- [5] 陈玉杰. 高效毛细管电泳法测定加味逍遥丸中芍药苷、栀子苷的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 146-149.
- [6] 孙文基, 谢世昌. 天然药物成分定量分析 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2003: 205.