

• 质量分析研究 •

RRLC 测定肚痛健胃整肠丸中甘草苷、橙皮苷和甘草酸的含量

张 伟¹, 谢思敏¹, 吴孟华², 顾利红¹ (1. 广州市药品检验所, 广东 广州 510160; 2. 广东省医药集团有限公司, 广东 广州 510080)

摘要: **目的** 建立快速高分离度液相色谱(RRLC)同时测定肚痛健胃整肠丸中甘草苷、橙皮苷和甘草酸含量的方法。**方法** 采用 BDS HYPERSIL C₁₈(4.6 mm × 100 mm, 2.4 μm) 色谱柱; 流动相为乙腈-0.2 %磷酸, 梯度洗脱; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长为 0~9 min, 276 nm; 9~14 min, 250 nm; 柱温为 25 ℃; 进样体积为 4.0 μL, 检测器响应时间 1 s。**结果** 样品中甘草苷、橙皮苷和甘草酸在进样量分别为 0.0112~0.2800 μg、0.0435~1.0875 μg、0.0630~1.5750 μg 范围内有良好的线性关系($r=0.9999$)。平均回收率分别为 99.1 %, 99.66 %, 99.26 %($n=6$); RSD 分别为 0.79 %, 1.61 %, 0.99 %。**结论** 本方法可在较短的时间内快速得到准确的结果, 有效控制肚痛健胃整肠丸的产品质量。

关键词: 快速高分离度液相色谱; 肚痛健胃整肠丸; 甘草苷; 橙皮苷; 甘草酸; 含量测定

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)02-0177-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.02.019

RRLC Determination of Liquiritin, Hesperidin and Glycyrrhizic Acid in Dutong Jianwei Zhengchang Pills

ZHANG Wei¹, XIE Simin¹, WU Menghua², GU Lihong¹ (1. Guangzhou Municipal Institute for Drug Control, Guangzhou 510160 Guangdong, China; 2. Guangdong Pharmaceuticals Holding Co., Ltd., Guangzhou 510080 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To establish a rapid resolution liquid chromatography(RRLC) method for the determination of liquiritin, hesperidin and glycyrrhizic acid in Dutong Jianwei Zhengchang Pills. **Methods** The separation was performed on BDS HYPERSIL C₁₈(4.6 mm × 100 mm, 2.4 μm) column. The mobile phase consisted of acetonitrile-0.2 % phosphoric acid with gradient elution at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 276 nm during 0 ~ 9 min and 250 nm during 9 ~ 14 min. The column temperature was kept at 25 ℃, injection volume was 4.0 μL, and the response time was 1 s. **Results** Liquiritin, hesperidin and glycyrrhizic acid were completely separated. The linear ranges of liquiritin, hesperidin and glycyrrhizic acid were 0.0112 ~ 0.28 μg, 0.0435 ~ 1.0875 μg and 0.0630 ~ 1.575 μg, respectively. The average recoveries ($n=6$) of liquiritin, hesperidin and glycyrrhizic acid were 99.1 % (RSD=0.79 %) 99.66 % (RSD=1.61 %) and 99.26 % (RSD=0.99 %) respectively. **Conclusion** The developed RRLC method is simple, rapid, precise and accurate. It can be used for quality control of Dutong Jianwei Zhengchang Pills.

Keywords: Rapid resolution liquid chromatography(RRLC) Dutong Jianwei Zhengchang Pills; Liquiritin; Hesperidin; Glycyrrhizic acid; Assay

肚痛健胃整肠丸是由黄柏、桂皮、丁香、陈皮、甘草、木馏油、薄荷脑组成, 临床上用于治疗消化不良, 水土不服和食物不洁所致的肠胃不适, 腹胀肚痛, 泄泻等, 该药具有保护胃黏膜及调节肠道菌

群的功能^[1]。本品现执行进口药品注册标准, 其含量测定项下以气相色谱法测定木馏油中的主要活性成分愈创木酚, 用薄层色谱扫描法测定黄柏中主要活性成分盐酸小檗碱的含量。而方中主药陈皮有理气

收稿日期: 2012-10-24

作者简介: 张伟, 男, 主管药师, 研究方向: 中药质量分析研究。Email: zyffzw@hotmail.com。通讯作者: 吴孟华, 女, 博士, 研究方向: 生药学和本草学。Email: wuzyc@qq.com。

健脾、燥湿化痰的功效,橙皮苷为其主要活性成分;甘草调和诸药,甘草酸及甘草苷为其主要活性成分。为了有效控制本品的质量,缩短检验的时间,建立参考文献^[2-7]方法快速高分离度液相色谱法,同时测定方中甘草苷、橙皮苷、甘草酸等皂苷、黄酮类多种活性成分。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1200 快速高分离度液相色谱仪(RRLC),包括在线脱气机、SL型二元泵、SL型自动进样器、SL型柱恒温箱以及SL型二极管阵列检测器,美国Agilent公司;Milipore纯水器。

1.2 试药 乙腈为色谱纯,德国Merck公司;甲醇、乙醇均为分析纯,广州化学试剂厂;磷酸为分析纯;水为超纯水;橙皮苷对照品(批号:110721-201014),甘草苷对照品(批号:111610-200604),甘草酸铵对照品(批号:110731-200615),中国药品生物制品检定所;肚痛健胃整肠丸,香港李万山药厂有限公司,批号:W20302、W20202、W20502。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为BDS HYPERSIL C₁₈柱(4.6 mm×100 mm, 2.4 μm);以乙腈-0.2%磷酸为流动相,梯度洗脱(0~3.2 min, 21:79; 3.2~14 min, 21:79→50:50);流速为1.0 mL·min⁻¹;检测波长:0~9 min, 276 nm; 9~14 min, 250 nm;柱温为25℃;进样体积为4.0 μL;检测器响应时间1 s。

2.2 测定溶液的制备

2.2.1 对照品储备液的制备 精密称取甘草苷对照品

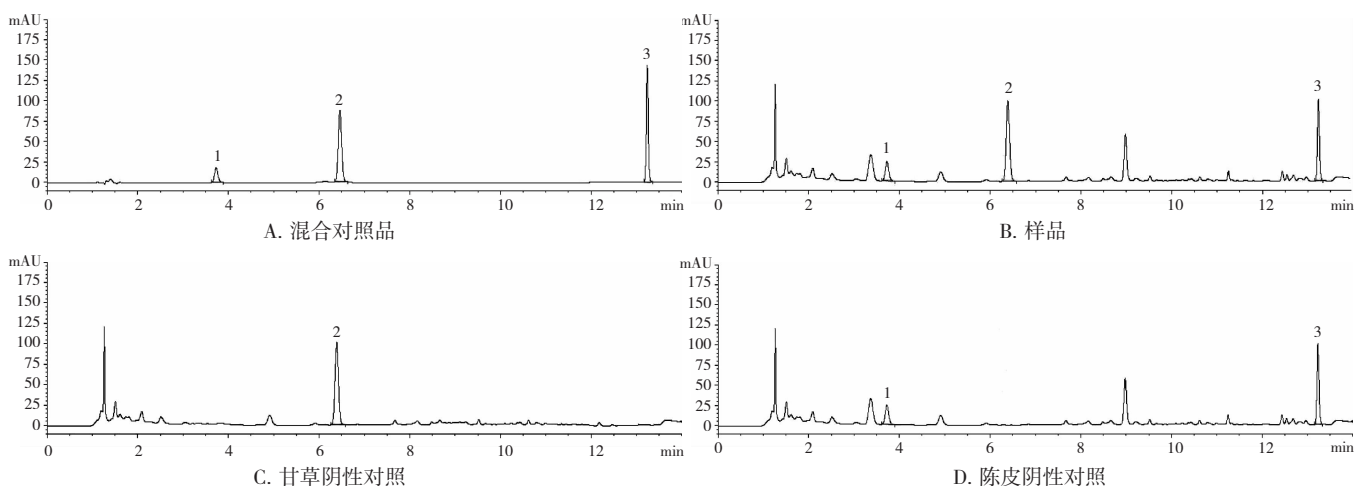
2.8 mg、橙皮苷对照品 10.0 mg 和甘草酸铵对照品 16.0 mg,置于20 mL量瓶中,加甲醇适量,超声使甘草苷、橙皮苷和甘草酸铵溶解,并稀释至刻度,摇匀,作为对照品储备液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取肚痛健胃整肠丸适量,研细,精密称取0.55 g,加入30~60℃的石油醚30 mL,超声提取15 min,静置5 min,倾去上清液,药渣挥干,精密加入70%乙醇溶液25 mL,称定质量,置水浴上加热回流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,用0.22 μm的滤膜滤过,即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 取阴性对照样品(除甘草、陈皮外,其余按处方投料,依照工艺方法制备)0.55 g,按照2.2.2项下方法制成阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验及专属性考察 取上述对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液,按照2.1项下的色谱条件注入快速高分离度液相色谱仪,记录色谱图,见图1。从图中可以看出阴性对照无干扰,待测峰与其他峰分离良好,甘草苷、橙皮苷及甘草酸的理论板数均不低于10000。

2.4 线性关系考察 精密吸取甘草苷、橙皮苷和甘草酸铵对照品储备液25, 10, 5, 2, 1 mL,分别置于50 mL量瓶中,加入70%乙醇稀释至刻度,按照2.1项下色谱条件,注入快速高分离度液相色谱仪中,测定峰面积,记录色谱图,并以进样量(X , μg)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,得甘草苷、橙皮苷和甘草酸的回归方程,分别为 $Y = 1012.5X - 1.035$, $r = 0.9999$; $Y = 1037.5X - 2.4077$, $r = 0.9999$; $Y = 544.65X$



1.甘草苷; 2.橙皮苷; 3.甘草酸

图1 肚痛健胃整肠丸中甘草苷、橙皮苷、甘草酸的色谱图

Figure 1 RRLC results for liquiritin, hesperidin and glycyrrhizic acid in *DutongjianweiZhengchang* Pills

-0.8807, $r = 0.9999$ 。结果表明, 甘草苷进样量在 0.0112 ~ 0.2800 μg , 橙皮苷进样量在 0.0435 ~ 1.0875 μg , 甘草酸进样量在 0.0630 ~ 1.5750 μg 范围内均有良好的线性关系。

2.5 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 4 μL , 注入快速高分离度液相色谱仪中, 连续进样 6 次, 测定峰面积, 甘草苷 RSD 为 0.3 %、橙皮苷 RSD 为 0.6 %、甘草酸 RSD 为 0.9 %, 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 取同一批样品适量(批号: W20302), 按照 2.2.2 项下方法制成供试品溶液, 精密吸取供试品溶液 4 μL , 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样测定, 结果甘草苷、橙皮苷、甘草酸峰面积的 RSD 分别为 0.5 %, 0.7 %, 0.6 %, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取同一批样品(批号: W20302), 按照 2.2.2 项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 进样测定, 结果测得甘草苷的平均含量($n=6$)为 1.52 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 橙皮苷的平均含量($n=6$)为 6.21 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 甘草酸的平均含量($n=6$)为 6.88 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$; RSD 分别为 1.01 %, 0.73 %, 0.89 %。表明该方法重复性较好。

2.8 加样回收率试验 取同一批样品 6 份(批号: W20302), 每份约 0.27 g, 置回流瓶中, 分别精密加入 0.4236 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 甘草苷对照品溶液 1 mL, 1.6779 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 橙皮苷对照品溶液 1 mL, 1.8568 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 甘草酸对照品溶液 1 mL, 按照 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件进样测定, 计算回收率。结果表明该方法回收率良好, 见表 1。

2.9 样品测定 取肚痛健胃整肠丸适量, 按照 2.2.2 项下方法制成供试品溶液, 依上述色谱条件进样测定, 记录色谱图, 用标准曲线法以峰面积计算样品中各测定成分的含量, 结果见表 2。

3 讨论

试验中分别测定了甘草苷、橙皮苷、甘草酸的紫外吸收光谱图, 甘草酸的最大吸收波长为 250 nm, 甘草苷、橙皮苷的最大吸收波长分别为 276 nm 和 283 nm, 试验发现在 276 nm 单一波长下, 甘草酸色谱峰的吸收值较低, 为了保证色谱峰的吸收强度, 选择可变波长检测器在 276 nm 处测定甘草苷、橙皮苷, 250 nm 处测定甘草酸, 结果表明, 各组分的分离度良好, 其浓度和峰面积的响应较好。

分别用甲醇、乙醇、70 % 甲醇、70 % 乙醇、50 % 甲醇、50 % 乙醇进行试验, 发现 70 % 乙醇提取的最完全, 故采用 70 % 乙醇作为提取溶剂。同时,

表 1 肚痛健胃整肠丸中甘草苷、橙皮苷和甘草酸加样回收率试验结果($n=6$)

Table 1 Results of recovery test of liquiritin, hesperidin and glycyrrhizic acid in *DutongJianweiZhengchang* Pills

	样品量 /mg	加入量 /mg	测得值 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD/%
甘草苷	0.4337	0.4236	0.8520	98.75	99.1	0.79
	0.4209	0.4236	0.8390	98.70		
	0.4306	0.4236	0.8543	100.02		
	0.4522	0.4236	0.8730	99.34		
	0.4381	0.4236	0.8531	97.97		
	0.4419	0.4236	0.8649	99.86		
橙皮苷	1.7717	1.6779	3.4654	100.94	99.66	1.61
	1.7195	1.6779	3.4201	101.35		
	1.7593	1.6779	3.3911	97.25		
	1.8475	1.6779	3.4999	98.48		
	1.7897	1.6779	3.4557	99.29		
	1.8052	1.6779	3.4943	100.67		
甘草酸	1.9629	1.8568	3.8232	100.19	99.26	0.99
	1.9051	1.8568	3.7155	97.50		
	1.9491	1.8568	3.7988	99.62		
	2.0468	1.8568	3.8845	98.97		
	1.9828	1.8568	3.8253	99.23		
	2.0000	1.8568	3.8577	100.05		

表 2 样品含量测定结果($n=3$)

Table 2 Determination results of samples

批号	甘草苷 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD / %	橙皮苷 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD / %	甘草酸 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD / %
W20302	1.52	0.87	6.21	0.64	6.88	0.63
W20202	1.46	0.91	6.25	0.82	6.73	0.96
W20502	1.57	0.75	6.16	0.87	6.94	1.06

对超声和加热回流两种提取方法及提取时间进行了试验, 结果表明加热回流提取 30 min 为最有效的提取方法。

试验中尝试了不同的流动相, 结果表明乙腈-0.2 % 磷酸能使各组分色谱峰保持良好的峰形和重复性, 且柱效均大于 10000, 同时采用 2.4 μm 内径颗粒的色谱柱及梯度洗脱, 可使各组分在较短时间内出峰, 减少了溶剂的损耗, 有效提高了药品检验的时效性。

参考文献:

[1] 兰鸿, 杜士明. 肚痛健胃整肠丸保护胃黏膜作用与调节肠道菌群功能研究[J]. 医药导报, 2010, 29(5): 591-594.
[2] 许栋明, 程可建. RP-HPLC 同时测定温胆汤中甘草苷、柚皮苷、橙皮苷和甘草酸[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(1): 45-47.
[3] 蔡梅超. HPLC 测定胃舒尔安颗粒中橙皮苷和柚皮苷的含量[J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(6): 213-214.

- [4] 丁桂兰, 薛亚光, 邢春来, 等. HPLC 法测定橘红丸中柚皮苷、橙皮苷的含量[J]. 中成药, 2004, 26(9): 707.
- [5] 张洪坤, 李焕丹, 李康, 等. 高效液相色谱法同时测定藿香正气水中甘草苷、橙皮苷、水合氧化前胡素和白当归素的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(15): 1233-1235.
- [6] 刘永利, 袁浩, 李冬梅, 等. 双波长-高效液相色谱法同时测定镇咳宁糖浆中盐酸麻黄碱、甘草苷、甘草酸的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(1): 26-29.
- [7] 宋丽军, 谭晓梅, 罗佳波. HPLC 法同时测定甘草中甘草苷、甘草酸、甘草次酸含量[J]. 中药材, 2009, 32(3): 378-379.

(编辑: 宋威)

茯苓等 10 种药食同源药材中重金属镍含量测定及评价

金 波, 马 辰(中国医学科学院北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

摘要: 目的 建立药食同源药材中镍的石墨炉原子吸收法, 评价茯苓等 10 种药材中镍的污染状况。方法 前处理采用微波消解和湿法消解两种方式, 优化石墨炉升温程序, 测定市售药食同源药材中镍的含量。结果 镍的检出限为 0.75 ng/mL, 精密度 RSD 为 0.90 %, 微波消解法的回收率在 92.7 %~100.9 %之间, 湿法消解的回收率在 90.5 %~99.4 %之间。以 3 mg/kg 为限量值, 药食同源茯苓等 10 种药材中镍超标 23.5 %, 药材中镍的每日摄入量是 WHO 准则规定的耐受摄入量的 11.5 %。结论 所建方法快速准确, 适合于药材中镍的检测。市售药食同源茯苓等 10 种药材中镍含量偏高, 需引起重视。

关键词: 重金属; 镍; 药食同源药材; 石墨炉原子吸收法

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2013)02-0180-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.02.020

Determination and Contamination Assessment of Heavy Metal Nickel in Medicinal and Edible Chinese Medicinal Materials

JIN Bo, MA Chen (Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective A method for the determination of nickel in medicinal and edible Chinese medicinal materials (MECMMs) by Graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) was developed, and the contamination of nickel was assessed. **Methods** Microwave digestion and wet digestion procedure were both applied as pretreatment process, and the heating procedure of graphite furnace was optimized to establish an assay method for MECMMs from the market. **Results** The limit of detection was 0.75 ng/mL and the RSD of precision was 0.90 %. The recoveries employing microwave digestion procedure and wet digestion procedure were in the range of 92.7 %~100.9 % and 90.5 %~99.4 %, respectively. The 23.5 % of samples exceeded 3 mg/kg limit. The daily intake of nickel in MECMMs, was 11.5 % of the tolerance limit recommended by WHO guidelines. **Conclusion** The method is proved to be rapid, accurate and suitable for the analysis of nickel in medicinal materials. Attention should be paid to the high nickel contamination in medicinal and edible Chinese medicinal materials from the market.

Keywords: Heavy metal; Nickel; Medicinal and edible Chinese medicinal materials; Graphite furnace atomic absorption spectrometry

镍(Ni)是对生物体有明显毒害作用的重金属元素之一, 毒性表现在基因毒性^[1]、致癌性^[2]、神经毒性^[3]

等方面, 镍化合物(nickel compounds)已被国际癌症机构(IARC)列为一级致癌物^[2]。随着老龄化社会的到

收稿日期: 2012-09-07

作者简介: 金波, 女, 实习研究员, 研究方向: 药物分析。Email: jinbows@imm.ac.cn。通讯作者: 马辰, 研究员, 研究方向: 药物分析。Email: mach@imm.ac.cn。

基金项目: 科技部创新方法工作专项(2009IM031600); 科技部科技基础性工作专项(2007FY130100)。