

高效液相色谱法测定 尿毒清冲剂中甘草酸含量¹

李国锋 陈志良 (第一军医大学南方医院药学部, 广州 510515)

张庆生 王宝琴 (中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

摘要 用反相HPLC法对尿毒清冲剂中甘草酸成分进行了定量研究。选择ODS柱 $7\mu\text{m}(4.6\times 150\text{ mm})$, 流动相为: 四丁基氢氧化铵溶液 $(3.2\rightarrow 1000)$ —甲醇—乙腈 $(60:30:12)$, 磷酸调 $\text{pH} 6.0$, 检测波长: 254 nm , 柱温: 40°C 。甘草酸铵在 $0.6\mu\text{g}$ — $1.8\mu\text{g}$ 范围内呈线性关系, $r = 0.9996$ 。样品经聚酰胺小柱进行精制, 测定得方法的加样回收率为 96.19% , RSD 为 2.24% 。该法可作为该制剂的质量标准之一。

关键词 大黄; 甘草; 甘草酸; 高效液相色谱法

尿毒清冲剂^[1,2,3]以古方大黄甘草汤(《金匱》治中焦水湿逆满, 食已即吐方)为基础, 共用16味中药组成复方, 以显著的临床疗效和填补中药复方防治早期CRF空白为其特色。本品已经卫生部批准上Ⅰ期临床。为进一步完善制剂的质量标准, 本文对方中甘草所含有效成分甘草酸的含量作了研究, 现报告如下。

1 仪器与试剂

岛津LC-6A液相色谱系统, SPD-6AV检测器。甘草酸铵对照品(中国药品生物制品检定所提供), 面积归一化法测得含量为 96.88% 。所用试剂均为分析纯。尿毒清冲剂为第一军医大学提供。

2 方法与结果

2.1 液相色谱条件 ODS柱 $7\mu\text{m}(4.6\text{ mm}\times 150\text{ mm})$, 流动相: 四丁基氢氧化铵溶液 $(3.2\rightarrow 1000)$

—甲醇—乙腈 $(60:30:12)$, 磷酸调 $\text{pH} 6.0$, 检测波长: 254 nm , 柱温: 40°C , 流速: 1.2 ml/min , 量程: 0.04 AUFS , 进样: $10\mu\text{l}$ 。此条件下甘草酸与制剂中其它组份达到基线分离。取除甘草的空白样品同法操作, 结果表明对样品的测定无干扰。

2.2 供试品溶液的制备 精密称取本品约 2 g , 加入蒸馏水 20 ml , 静置 30 min , 超声波提取 30 min , 提取液上聚酰胺小柱(4 g)进行预处理, 先分别用 80 ml 蒸馏水, 50 ml 50% 乙醇, 50 ml 乙醇洗脱, 弃去洗脱液, 再用乙醇—浓氨水 $(98:2)$ 液 100 ml 洗脱并收集洗脱液。洗脱液于水浴蒸干, 残留物精密加入 50% 乙醇 3 ml 使溶解, 微孔滤膜过滤, 滤液作为供试品溶液。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取甘草酸铵对照品约 10 mg , 置 10 ml 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释

¹ 国家新药基金资助项目

至刻度, 作为贮备液。精密吸取贮备液 1 ml 于 10 ml 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 作为对照品溶液。

2.4 线性关系的考察 精密吸取上述贮备液 1 ml 于 5 ml 量瓶中, 甲醇定容至刻度。精密吸取此液 3、5、6、7、9 μ l 按上述色谱条件测定峰面积, 以峰面积积分值为纵坐标, 甘草酸铵进样量 (μ g) 为横坐标绘制标准曲线, 结果回归方程为 $y = 190492x + 2799$, $r = 0.9996$, 表明甘草酸铵在 0.6 μ g~1.8 μ g 范围内具有良好的线性关系。

2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μ l, 重复进样 5 次, 甘草酸峰面积积分值的 RSD < 1.5%, 结果列于表 1。

表 1 精密度试验结果

实验次数	峰面积	RSD(%)
1	198653	1.2
2	196169	
3	193503	
4	198699	
5	194504	

2.6 重现性试验 取同批样品 5 份, 按上述条件测定, 结果列于表 2, 5 份样品含量测得值的 RSD < 3%。

表 2 重现性试验结果

取样次数	取样量(g)	样品含量(mg/g)	RSD(%)
1	2.0905	0.1818	2.16
2	2.0011	0.1770	
3	2.1301	0.1868	
4	2.1165	0.1859	
5	2.0426	0.1847	

2.7 回收率试验 采用加样回收法, 取已知含量的尿毒清冲剂, 分别加入不同量的对照品, 余同供试品制备法。按上述色谱条件测定, 结果列于表 3。说明本法具有良好的回收率。

2.8 样品测定 分别精密吸取上述对照品溶液与供试品溶液 10 μ l 按选定的色谱条件测定。本文共测 4 批样品, 每批取样量 3 份, 结果见表 4。

3 讨论

3.1 在对尿毒清冲剂中的有效成分作定量测定研究时, 根据君、臣、佐、使的原则, 首先应选择大

表 3 回收率测定结果

取样相当甘草酸铵的量(mg)	添加甘草酸铵的量(mg)	测出甘草酸铵的总量(mg)	回收率(%)
0.1800	0.1818	0.3511	95.93
0.1838	0.1414	0.3178	94.77
0.1981	0.1616	0.3535	96.16
0.2181	0.2020	0.1197	99.80
0.1815	0.1616	0.3339	94.31
平均回收率(%)			96.19
RSD(%)			2.24

表 4 样品测定结果

批号	取样份数(n)	甘草酸含量(mg/g)	RSD(%)
940722	5	0.1833	2.46
940719	3	0.1923	2.78
940728	3	0.1787	1.85
940805	3	0.1839	2.54

黄中的有效成分, 选择葱醒时方中的何首乌对测定有干扰。我们曾对大黄中的番泻甙进行了定量研究。参考有关方法^[4], 测定结果表明在番泻甙相同的位置样品无吸收峰出现, 故本文选择甘草中有效成分甘草酸作了定量研究。

3.2 甘草及甘草的复方制剂的含量测定方法, 文献报道较多^[5, 6, 7, 8], 但本方有十六味中药组成, 同甘草酸性质类似的成份较多。我们虽尝试了各种典型的 HPLC 法条件并对有关流动相的配比进行了调整, 也均未达到分离的效果。故正文采用了离子对色谱法, 并将适当比例的甲醇与乙腈混合溶剂作为流动相组份之一, 从而建立了一种灵敏、专属可靠的 HPLC 法测定本制剂中甘草酸含量的方法。本法对含有甘草的其它复方制剂, 只要对流动相的配比稍作调整, 是一种值得借鉴的方法。

3.3 由于甘草在方中所占比例较低, 因此采用过聚酰胺小柱^[9, 10]的方法进行浓缩处理。用蒸馏水, 50% 乙醇, 乙醇洗脱的目的是弃去各种杂质。洗脱液浓缩后经 HPLC 测定提示无甘草酸峰的出现。用 2% 氨性乙醇可将吸附于聚酰胺上的甘草酸定量地洗脱下来。我们比较了氨性乙醇的洗脱情况, 按每份 20 ml 收集并浓缩, 行 HPLC 测定, 结果表明, 甘草酸主要集中在 2~3 份中, 为能保证充分地甘草酸洗脱下来, 故本文用 100 ml 氨性乙醇

洗脱。

3.4 样品以水为溶剂行不同时间的超声提取,表明30 min 以内提取完全。

参 考 文 献

- 1 Deng Hongzhu, Shi Xinghua, Chen Zhiliang, et al. Effects of chinese patent medicine Niaoduqing on adenine induced chronic renal failure in rats. J Med Coll PLA. 1993; 8(4):400
- 2 潘振邦、刘俊、黄兰君. 中药尿毒清治疗急、慢性肾功能衰竭的临床疗效观察. 中国危重病急救医学, 1993; 5(6):373
- 3 梁萌、王智、余毅, 等. 尿毒清治疗慢性肾功能不全30例临床分析. 福建医药杂志, 1993; 15(6):45
- 4 王宝梁, 陈德昌, 鲁静, 等. 中成药质量标准与

标准物质研究. 北京:中国医药科技出版社, 1994:137

- 5 肖云祥, 胡志厚, 冯韧韧, 等. 高效液相色谱法测定甘草及人丹中甘草酸的含量. 中成药, 1990; 12(7):12
- 6 黄新生, 桑史宝. HPLC 法测定钩藤片中甘草酸的含量. 中国中药杂志, 1992; 17(10):609
- 7 李军. 甘草酸原料及其制剂中甘草酸含量测定. 中成药, 1992; 14(10):16
- 8 李俊, 刘良初, 毛丽珍. HPLC 法同时测定逍遥丸中的芍药甙和甘草酸. 中成药, 1994; 16(8):15
- 9 程宇慧, 廖工铁, 侯世祥. 四逆汤滴丸质量控制方法的研究. 中成药, 1990; 12(1):8
- 10 陆蘊如, 邵爱新. 用香草醛—硫酸比色法测定饮片甘草及密炙甘草中甘草酸的含量. 药物分析杂志, 1981; 1(1):84

收稿日期: 1995—03—24

Determination of Glycyrrhizic Acid in Niaoduqing by HPLC

Li Guo-feng*, Zhang Qing-shen**, Shi Xin-hua*, Wang Bao-qin**

(*Nan Fang Hospital, First Military Medical University, Guang Zhnu

510515; **National Institute for Drug Control, Beijing 100050)

Abstract: This paper describes the determination of glycyrrhizic acid in Niaoduqing. It was separated on phenox RP18 column with a mobile phase of tetrabutylammoniumhydroxide solution (3.2→1000)-methyl alcohol-acetonitrile (60:30:12) and detected at wavelength 254 nm. This method has a good linearity in the range from 0.6 to 0.8 ug. The recovery is 99.1% (RSD = 2.24%, n = 5).

Key words: Niaoduqing, Glycyrrhizic acid, HPLC

(on page 33)