

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.12.015

HPLC 法同时测定甘草酸二铵制剂中 18α 和 18β 甘草酸二铵含量*

张轶华, 田晓彤, 孙 婷, 高燕霞[△], 李 挥

(河北省药品医疗器械检验研究院, 河北 石家庄 050200)

摘要:目的 建立同时测定甘草酸二铵制剂中差向异构体 18α 甘草酸二铵和 18β 甘草酸二铵含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为水-60% 高氯酸溶液(48:0.5, V/V, 用氨水调 pH 至 8.0)-甲醇(48:52, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 248 nm, 柱温为 25 °C, 进样量为 20 μL。结果 18α 甘草酸二铵和 18β 甘草酸二铵的质量浓度均在 0.005~1.000 mg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r=0.999\ 7, 0.999\ 3, n=7$), 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 1.0%; 不同厂家、不同批号(剂型)3 批制剂样品中 18α 甘草酸二铵和 18β 甘草酸二铵的平均回收率分别为 99.57% 和 99.70%, 99.80% 和 99.66%, 99.48% 和 99.55%, RSD 分别为 0.81% 和 0.95%, 0.47% 和 0.71%, 0.49% 和 0.90%; 不同制剂中 18α 甘草酸二铵和 18β 甘草酸二铵的含量均不同。结论 所建立的方法专属性强, 准确度高, 可为控制甘草酸二铵制剂中的差向异构体提供参考, 也为甘草酸二铵差向异构体的进一步研究奠定了基础。

关键词: 高效液相色谱法; 甘草酸二铵; 差向异构体; 18α 甘草酸二铵; 18β 甘草酸二铵; 含量测定

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)12-0056-04

Simultaneous Determination of 18α -Glycyrrhizic Acid and 18β -Glycyrrhizic Acid in Diammonium Glycyrrhizate Preparation by HPLC

ZHANG Yihua, TIAN Xiaotong, SUN Ting, GAO Yanxia, LI Hui

(Hebei Institute for Drug and Medical Device Control, Shijiazhuang, Hebei, China 050200)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography(HPLC) method for simultaneous determination of epimer (18α -glycyrrhizic acid and 18β -glycyrrhizic acid) in Diammonium Glycyrrhizate Preparation. **Methods** The chromatographic column was Diamonsil C₁₈ column(200 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was water-60% perchloric acid solution(48:0.5, V/V, pH was adjusted to 8.0 with ammonium hydroxide)-methanol(48:52, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 248 nm, the column temperature was 25 °C, and the injection volume was 20 μL. **Results** The linear range of 18α -glycyrrhizic acid and 18β -glycyrrhizic acid was 0.005-1.000 mg/mL($r=0.999\ 7, 0.999\ 3, n=7$). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 1.0%. The average recoveries of 18α -glycyrrhizic acid and 18β -glycyrrhizic acid in the samples with different lot numbers(dosage forms) from different manufacturers were 99.57%, 99.70%, 99.80%, 99.66%, 99.48%, 99.55% with RSDs of 0.81%, 0.95%, 0.47%, 0.71%, 0.49%, 0.90%, respectively. The contents of 18α -glycyrrhizic acid and 18β -glycyrrhizic acid in different preparations were different. **Conclusion** The established method has strong specificity and high accuracy, which can provide a reference for the control of epimers in diammonium glycyrrhizate preparations and provide a basis for the further study of diammonium glycyrrhizate epimers.

Key words: HPLC; diammonium glycyrrhizate; epimer; 18α -glycyrrhizic acid; 18β -glycyrrhizic acid; content determination

甘草酸二铵是从甘草中分离、筛选的主要活性成分甘草酸的二铵盐, 具有非特异性抗炎、抗过敏、稳定溶酶体膜及免疫调节作用, 其抗病毒作用尤为突出。甘草酸二铵有 2 个 18 位差向异构体, 虽然二者的分子结构仅 18 位手性碳原子构型不同, 但其在理化性质、药理学、药动学、不良反应等方面均存在差异, 且分离测定存在一定困难。现同时测定 2 个差向异构体的方法有薄层色谱(TLC)法和气相色谱(GC)法, 其中 TLC 法灵敏度太低, 而 GC 法需要复杂的衍生化。现行标准中未对差向异构体进行分析^[1], 虽有高效液相色谱(HPLC)法测

定甘草酸差向异构体的报道, 但这些方法^[2-5]耐用性较差。本研究中建立了同时测定甘草酸二铵制剂中 18α 甘草酸二铵和 18β 甘草酸二铵含量的 HPLC 法, 为深入研究这 2 个差向异构体的区别提供了定性、定量依据。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Ultimate 3000 型高效液相色谱仪, 包括四元低压梯度泵、全自动进样器、柱温箱和紫外检测器(美国 Dionex 公司); XPR26/A 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。

*基金项目: 河北省科学技术研究与发展计划项目[10276430]。

第一作者: 张轶华, 女, 硕士, 主任药师, 研究方向为药品质量标准与药物分析, (电子信箱)zhangyihua0915@163.com。

[△]通信作者: 高燕霞, 女, 硕士, 主任药师, 研究方向为药品质量标准, (电子信箱)49567976@qq.com。

1.2 试药

18 α 甘草酸二铵对照品(a厂,批号为120703,含量为99.0%);18 β 甘草酸二铵对照品(a厂,批号为130106,含量为99.5%);甘草酸二铵胶囊(a厂,批号分别为100411,100412,100413);注射用甘草酸二铵(b厂、批号为100131,c厂、批号分别为091103,100603,d厂、批号为110501,e厂、批号分别为1008213-2,0909215-2,0810203-1);甘草酸二铵注射液(a厂、批号分别为1003271,1004031,1004241,f厂、批号为10060715,g厂、批号分别为0908021,1006131,h厂、批号为120111,i厂、批号为310060801,j厂、批号分别为08120601,10091801,10091802,k厂、批号为089131101,l厂、批号为090301);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为双蒸水。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱:Diamonsil C₁₈ 柱(200 mm×4.6 mm,5 μ m);流动相:水-60% 高氯酸溶液(48:0.5,V/V,用氨水调pH至8.0)-甲醇(48:52,V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:248 nm;柱温:25 $^{\circ}$ C;进样量:20 μ L。

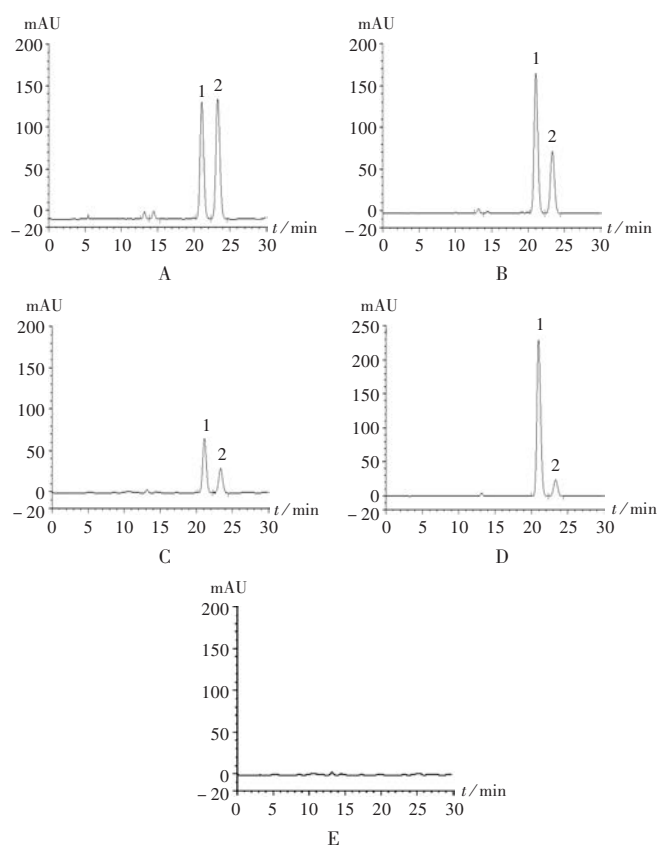
2.2 溶液制备

称取18 α 甘草酸二铵和18 β 甘草酸二铵对照品各25 mg,精密称定,置同一25 mL容量瓶中,加甲醇-水(50:50,V/V)溶解并定容,摇匀,即得混合对照品溶液。取胶囊剂型样品10粒,另2种剂型样品各5瓶,内容物混匀,精密称取(量取)约相当于甘草酸二铵25 mg,置50 mL容量瓶中,用甲醇-水(50:50,V/V)溶解并定容,摇匀,即得供试品溶液。取3种剂型样品的辅料,以甲醇-水(50:50,V/V)溶解制成阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性试验:精密吸取2.2项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置有吸收峰,阴性对照无干扰。理论板数以18 α 甘草酸二铵、18 β 甘草酸二铵峰计均大于1500。分离度均大于1.5,基线分离良好。详见图1。

线性关系与检测限考察:用流动相稀释混合对照品溶液,制成质量浓度分别为1.0,0.5,0.3,0.1,0.05,0.01,0.005 mg/mL的系列混合对照品溶液,按2.1项下色谱条件各进样20 μ L,记录色谱图。分别以18 α 甘草酸二铵和18 β 甘草酸二铵峰面积(Y)为纵坐标、进样质量浓度(X ,mg/mL)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y_1 = 37.826X_1 + 0.737$ ($r = 0.9997$, $n = 7$), $Y_2 = 49.436X_2 + 0.248$ ($r = 0.9993$, $n = 7$)。结果表明,18 α 甘草酸二铵和18 β 甘草酸二铵的质量浓度均在0.005~



1. 18 α 甘草酸二铵 2. 18 β 甘草酸二铵
A. 混合对照品溶液 B-D. 供试品溶液(批号分别为100411, 100131,1003271) E. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

1. 18 α - glycyrrhizic acid 2. 18 β - glycyrrhizic acid

A. Mixed reference solution

B-D. Test solution(the batch numbers are 100411,100131,1003271)

E. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

1.0 mg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。以信噪比($S/N = 3$)计算18 α 甘草酸二铵和18 β 甘草酸二铵的检测限,结果分别为0.056 mg/mL和0.082 mg/mL。

精密度试验:分别取混合对照品溶液,按2.1项下色谱条件连续进样6次,测定峰面积。结果18 α 甘草酸二铵和18 β 甘草酸二铵峰面积的RSD分别为0.42%和0.60% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取不同剂型样品(批号分别为100411,0909215-2,10091801),分别按2.2项下方法制备供试品溶液,分别于室温放置0,4,8,12,24 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果3批样品中的RSD分别为0.56%和0.63%,0.49%和0.59%,0.62%和0.69% ($n = 5$),表明供试品溶液室温下放置24 h内基本稳定。

重复性试验:取不同剂型(批号分别为100411,0909215-2,10091801)适量,分别按2.2项下方法制备

供试品溶液,平行6份,按2.1项下色谱条件进样测定。结果3批样品中,18 α 甘草酸二铵和18 β 甘草酸二铵含量平均值分别为67.33%和33.72%,66.32%和32.98%,67.25%和32.25%,RSD分别为0.26%和0.43%,0.25%和0.48%,0.61%和0.38%($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:分别取已知18 α 甘草酸二铵和18 β 甘草酸二铵含量的不同剂型样品(批号分别为100411,100131,1003271)各9份,分别加入低、中、高质量浓度的混合对照品溶液,按2.2项下方法制备供试品溶液,并按2.1项下色谱条件进样测定,计算2种甘草酸异构体含量,并计算加样回收率。结果见表1至表3。

表1 甘草酸二铵胶囊加样回收试验结果($n=9$)

Tab.1 Results of the recovery test of Diammonium Glycyrrhizinate Capsules($n=9$)

样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
8.00	4.06	6.42	3.28	14.31	7.28	98.29	98.17				
8.22	4.16	6.45	3.25	14.60	7.38	98.91	99.08				
8.05	4.04	6.41	3.27	14.41	7.27	99.22	98.78				
8.21	4.13	8.02	4.26	16.22	8.38	99.88	99.77				
8.25	4.12	8.10	4.23	16.30	8.39	99.38	100.95	99.57	99.70	0.81	0.95
8.27	4.14	8.11	4.22	16.39	8.40	100.12	100.95				
8.32	4.16	9.54	4.92	17.80	9.09	99.37	100.20				
8.01	4.08	9.52	4.88	17.64	8.93	101.16	99.39				
8.15	4.07	9.48	4.85	17.61	8.92	99.79	100.00				

注:A为18 β 甘草酸二铵,B为18 β 甘草酸二铵。表2至表4同。

Note: A is 18 α -glycyrrhizic acid, B is 18 β -glycyrrhizic acid, as well as Tab. 2, Tab. 3 and Tab. 4.

表2 注射用甘草酸二铵加样回收试验结果($n=9$)

Tab.2 Results of the recovery test of Diammonium Glycyrrhizinate for Injection($n=9$)

样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
8.56	3.88	6.82	3.27	15.31	7.09	98.97	98.17				
8.51	3.92	6.86	3.29	15.35	7.20	99.71	99.70				
8.58	3.95	6.88	3.30	15.41	7.27	99.27	100.61				
8.51	3.89	8.52	3.93	17.02	7.81	99.88	99.75				
8.49	3.90	8.55	3.95	17.09	7.83	100.58	99.49	99.80	99.66	0.47	0.71
8.52	3.96	8.51	3.92	17.04	7.89	100.12	100.26				
8.48	3.97	10.25	4.88	18.71	8.83	99.80	99.59				
8.53	3.93	10.22	4.85	18.74	8.79	99.90	100.21				
8.55	3.89	10.27	4.86	18.82	8.71	100.00	99.18				

2.4 样品含量测定

结果见表4。

表3 甘草酸二铵注射液加样回收试验结果($n=9$)

Tab.3 Results of the recovery test of Diammonium Glycyrrhizinate Injection($n=9$)

样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
10.91	1.55	8.77	1.25	19.66	2.79	99.77	99.20				
10.88	1.58	8.75	1.22	19.52	2.78	98.74	98.36				
10.93	1.53	8.70	1.27	19.56	2.81	99.20	100.79				
10.98	1.56	10.92	1.57	21.88	3.11	99.82	98.73				
10.92	1.51	10.95	1.55	21.75	3.07	98.90	100.65	99.48	99.55	0.49	0.90
10.96	1.55	10.92	1.54	21.79	3.08	99.18	99.35				
10.89	1.57	13.06	1.84	23.92	3.40	99.77	99.46				
10.95	1.49	13.05	1.82	24.02	3.29	100.15	98.90				
10.94	1.53	13.02	1.86	23.93	3.40	99.77	100.54				

表4 样品含量测定结果(%)

Tab.4 Content determination of 18 α -glycyrrhizic acid and 18 β -glycyrrhizic acid in the samples(%)

批号	A	B	批号	A	B
100411	66.29	33.08	1004241	87.93	12.06
100412	66.23	32.92	10060715	0	100.00
100413	66.43	32.06	090821	66.28	32.27
100131	68.53	30.87	1006131	68.71	31.02
091103	68.11	29.45	120111	72.39	26.38
100603	68.84	28.85	310060801	70.36	28.22
110501	67.12	32.88	08120601	76.52	23.92
1008213-2	66.01	33.99	10091801	67.25	32.25
0909215-2	66.32	32.98	10091802	65.39	34.73
0810203-1	66.29	31.84	089131101	71.86	28.02
1003271	87.53	12.50	090301	65.92	33.55
1004031	89.37	10.38			

3 讨论

3.1 流动相选择

预试验中,流动相考察了1%冰醋酸-甲醇,3%冰醋酸-甲醇-四氢呋喃,3%冰醋酸-乙腈-四氢呋喃和3%冰醋酸-乙腈-四氢呋喃(用氨水调pH至8.0),结果18 α 甘草酸二铵和18 β 甘草酸二铵均不能达到完全分离。在流动相为水-60%高氯酸溶液(48:0.5, V/V,用氨水调pH至8.0)-甲醇(48:52, V/V)时,18 α 甘草酸二铵和18 β 甘草酸二铵完全分离,检测出的杂质峰最多,且杂质分离效果最好。

3.2 18 α 甘草酸二铵和18 β 甘草酸的组成比例

除f企业注射液剂型中仅有18 β 甘草酸二铵外,其余厂家不同剂型样品均为18 α 甘草酸二铵和18 β 甘草酸二铵共存,比例为2:1~7:1不等。甘草酸二铵提取自中药甘草,2种18位差向异构体的比例不易控制,且由于现行标准中未对差向异构体的比例进行要求,故各