

引用本文:任静,杜晖.高效液相色谱双波长法同时测定复方枇杷喷托维林颗粒中三种成分[J].安徽医药,2022,26(1):26-29.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.01.006.



◇ 药物分析 ◇

高效液相色谱双波长法同时测定复方枇杷喷托维林颗粒中三种成分

任静¹,杜晖²

作者单位:¹中国人民解放军第四军医大学第二附属医院(空军军医大学第二附属医院)药剂科, 陕西 西安710038;²西安市食品药品检验所,陕西 西安710054

通信作者:杜晖,男,副主任药师,研究方向为药品标准提高和药品物质基础研究,Email:duhui0504@126.com

基金项目:陕西省创新人才推进计划(2018KJXX-089);国家药典委员会药品标准提高项目(2019H087)

摘要: 目的 建立高效液相色谱(HPLC)双波长法同时分离测定复方枇杷喷托维林颗粒中的枸橼酸喷托维林、甘草酸和甘草次酸,为药物质量标准的提高提供理论依据。方法 本研究于2019年6月至2020年5月在西安市食品药品检验所化学实验室进行。采用热电C18色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),甲醇-1%三乙胺水溶液(磷酸调节pH为3.0)二元梯度洗脱,流速1.0 mL/min,进样量10 μL,检测波长215 nm和250 nm。结果 三种组分分别在10.24~511.97 μg/mL、4.89~244.74 μg/mL和0.50~25.12 μg/mL浓度范围内线性关系良好,枸橼酸喷托维林、甘草酸和甘草次酸的平均回收率分别为102.27%、99.94%和98.02%,相应的RSD为2.31%~2.42%。结论 本法简便、准确,灵敏度高,可用于复方枇杷喷托维林颗粒的质量控制。

关键词: 色谱法,高压液相; 主成分分析; 镇咳药; 复方枇杷喷托维林颗粒; 甘草酸; 甘草次酸

Simultaneous determination of three components in compound loquat and pentoryverine granules by double - wavelength high performance liquid chromatography

REN Jing¹, DU Hui²

Author Affiliations:¹Department of Pharmacy, The Second Affiliated Hospital of The Fourth Military Medical University (Air Force Medical University) of PLA, Xi'an, Shaanxi 710038, China;²Xi'an Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi 710054, China

Abstract: **Objective** To develop a double - wavelength high performance liquid chromatography (HPLC) method for simultaneous separation and determination of pentoryverine citrate, glycyrrhizic acid and glycyrrhetinic acid in compound loquat and pentoryverine granules, in order to provide a theoretical basis for the improvement of the drug standard. **Methods** The study was conducted in the chemical laboratory of Xi'an Institute for Food and Drug Control from June 2019 to May 2020. HPLC separations were carried out on a Thermo C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with a binary gradient elution of methanol - 1% triethylamine (pH adjusted to 3.0 by phosphoric acid) at a flow rate of 1.0 mL/min. The injection volume was 10 μL and the detection wavelengths were 215 nm and 250 nm. **Results** Good linear relationships between the peak area and concentration were found in the ranges of 10.24 - 511.97 μg/mL, 4.89 - 244.74 μg/mL and 0.50 - 25.12 μg/mL for three components, respectively. The average recoveries of pentoryverine citrate, glycyrrhizic acid and glycyrrhetinic acid were 102.27%, 99.94% and 98.02%, respectively, with the RSDs ranging from 2.31% to 2.42%. **Conclusion** The method is simple, accurate and sensitive. It can be used for the quality control of the compound loquat and pentoryverine granules.

Key words: Chromatography, high pressure liquid; Principal component analysis; Antitussive agents; Compound loquat and Pentoryverine granules; Glycyrrhizic acid; Glycyrrhetinic acid

复方枇杷喷托维林颗粒是由枇杷叶流浸膏、甘草流浸膏和枸橼酸喷托维林等按一定比例制成,可用于上呼吸道感染、支气管炎等引起的干咳或咳嗽少痰。枸橼酸喷托维林是制剂中的化学药组分,它是一种非成瘾性中枢镇咳药,实验中多采用HPLC法测定其含量^[1]。甘草酸是甘草流浸膏中最主要的活性成分,包括其二铵盐、苷类具有抗炎^[2-4]、抗病

毒^[5-7]、抗动脉粥样硬化^[8-9]及抑制肝损伤^[10-14]等药理作用;而甘草次酸是甘草酸在体内的代谢产物,具有肝脏保护^[15-16]和抗氧化作用^[17]。有报道表明甘草酸及其代谢产物是中药制剂发挥镇咳功效的“使药”成分之一^[18],所以两者的含量与制剂的药理活性紧密相关。该药品现行标准中采用紫外分光光度法测定制剂中枸橼酸喷托维林的含量,方法需要

经甲基橙显色氯仿提取,重现性较差^[19-20];有文献对其中枸橼酸喷托维林和甘草酸分别进行含量测定^[20-21],但因采用两种完全不同的色谱体系导致测定烦琐,也无甘草酸代谢产物甘草次酸的含量控制项目。因此,建立一种能够同时测定多种成分含量的方法尤为重要。本研究采用HPLC双波长法梯度洗脱快速测定复方枇杷喷托维林颗粒中枸橼酸喷托维林、甘草酸和甘草次酸三种成分的含量,为该制剂质量标准的完善和提高提供参考。本研究起止时间为2019年6月至2020年5月,符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 热电 Ultimate 3000 高效液相色谱仪(美国赛默飞世尔科技公司);Milli-Q Advantage 超纯水机(美国密理博公司);MS105 十万分之一天平(瑞士梅特勒公司)。

复方枇杷喷托维林颗粒(江西赣南海欣药业股份有限公司,批号 15121001、15121002、15012203);甘草酸铵(批号 110731~201720,含量 97.7%)、甘草次酸(批号 110723~201715,含量 99.6%)和枸橼酸喷托维林(批号 100432~201803,含量 99.8%)等对照品均来自中国食品药品检定研究院;色谱纯甲醇来自美国霍尼韦尔公司;实验用水由 Milli-Q 系统制备。

1.2 方法

1.2.1 溶液的制备

1.2.1.1 样品溶液的制备 取 10 袋颗粒混合,研细,称取适量(约 10.000 g),置 100 mL 量瓶中,加 50 mL 水振摇使溶解,再用甲醇定容,滤过,取续滤液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。

1.2.1.2 混合对照品溶液的制备 精密称取甘草次酸对照品 10.09 mg,置 20 mL 量瓶中,加甲醇适量,振摇使溶解,用甲醇稀释至刻度;精密称取枸橼酸喷托维林对照品 20.52 mg 和甘草酸铵对照品 10.02 mg,置 20 mL 量瓶中,加甲醇适量,振摇使溶解,精密加入甘草次酸对照品溶液 2 mL,用甲醇稀释至刻度,作为混合对照品储备溶液。分别精密量取 0.2 mL、0.4 mL、0.8 mL、2 mL、4 mL 和 10 mL,置 20 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,即为混合对照品溶液。

1.2.2 色谱条件 热电 Scientific™ Acclaim™ 120 Å C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相 A 为甲醇, B 为 1% 三乙胺水溶液(用磷酸调 pH 为 3.0),二元梯度洗脱(0~5 min, 60% A; 5~20 min, A 相线性上升至 90%; 20~25 min, 90% A; 25.1~30 min, 60% A);流速 1.0 mL/min;柱温 30 ℃;进样量 10 μL;DAD 检测(波长设置为 215 nm 和 250 nm)。

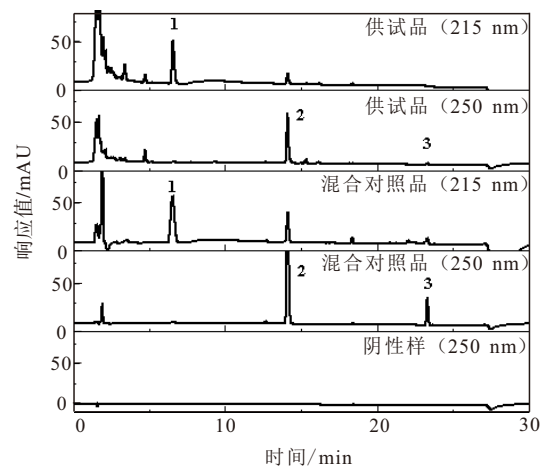
2 结果

2.1 线性关系考察 精密量取“1.2.1.2”项下配制的枸橼酸喷托维林、甘草酸和甘草次酸的混合对照品溶液,分别注入色谱仪,以主成分峰面积 Y(mAU·min)对浓度 X(μg/mL)进行线性回归,相关系数(r)均大于 0.999 9,见表 1。

表 1 三种组分的回归方程、相关系数和线性范围

成分	回归方程	r 值	范围/(mg/L)
枸橼酸喷托维林	$Y=0.0679X+0.0290$	0.9999	10.24~511.97
甘草酸	$Y=0.1028X+0.0094$	1.0000	4.89~244.74
甘草次酸	$Y=0.1795X-0.0031$	1.0000	0.50~25.12

2.2 专属性及样品含量测定 分别吸取混合对照品、批号为 15012203 的供试品和阴性样品溶液 10 μL,注入色谱仪,记录色谱图如图 1 所示,枸橼酸喷托维林、甘草酸和甘草次酸的保留时间分别为 6.5 min、14.1 min 和 23.3 min,三种成分与杂质之间分离良好。



注:1—枸橼酸喷托维林;2—甘草酸;3—甘草次酸。

图 1 HPLC 色谱图

按“1.2.2”项色谱条件测定三批复方枇杷喷托维林颗粒中三种组分的含量,如表 2 所示,枸橼酸喷托维林和甘草酸的含量与处方量和文献值基本一致^[20-21]。其中甘草酸含量较之甘草流浸膏中甘草酸限值略低^[22],可能是颗粒长时间存放或运输途中发生了变化。

2.3 精密度考察 将批号为 15012203 的样品溶液连续进样 6 次,发现枸橼酸喷托维林、甘草酸和甘草

表 2 样品测定结果

批号	枸橼酸喷托维林/(mg/g)	甘草酸/(mg/g)	甘草次酸/(μg/g)
15121001	1.92	0.72	9.14
15121002	1.92	0.74	9.15
15012203	1.93	0.83	9.22

表3 三种组分的回收率

组分	称样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
枸橼酸喷托维林	5.0023	9.65	5.07	14.93, 14.89, 14.69	104.05, 103.27, 99.32	102.27	2.31
	5.1056	9.85	10.15	19.96, 20.00, 20.12	99.57, 99.96, 101.14		
	4.9012	9.46	15.22	25.12, 25.33, 25.58	102.90, 104.28, 105.92		
甘草酸	5.0023	4.15	2.02	6.10, 6.25, 6.15	96.44, 103.87, 98.92	99.94	2.33
	5.1056	4.24	4.05	8.19, 8.29, 8.33	97.59, 100.06, 101.05		
	4.9012	4.07	6.07	10.12, 10.30, 10.09	99.70, 102.67, 99.21		
甘草次酸	5.0023	0.05	0.02	0.07, 0.07, 0.07	92.89, 98.17, 96.75	98.02	2.42
	5.1056	0.05	0.05	0.09, 0.09, 0.09	100.06, 98.82, 100.97		
	4.9012	0.05	0.07	0.11, 0.11, 0.11	99.68, 97.57, 97.29		

次酸峰面积的 RSD 值分别为 0.60%、0.59% 和 0.38%, 证明仪器精密密度能满足实验要求。

平行处理 6 份批号为 15012203 的样品, 按 2.2 项色谱条件测定样品中枸橼酸喷托维林、甘草酸和甘草次酸的含量, RSD 值分别为 0.68%、0.25% 和 0.79%, 方法重复性良好。

为了考察不同人员和仪器对精密度的影响, 重新配制混合对照品溶液并处理 6 份批号为 15012203 的样品, 测得样品中枸橼酸喷托维林、甘草酸和甘草次酸的平均含量分别为 1.88 mg/g, 0.80 mg/g 和 9.18 μ g/g, 对应的 RSD 分别为 1.25%、0.52% 和 0.91%。结果显示, 枸橼酸喷托维林、甘草酸和甘草次酸的 F 值分别为 3.21、4.02 和 1.32, 均小于置信度为 95% 时的 $F_{(5,5)}$ 值 (5.05), 说明两组精密密度结果差异无统计学意义。

2.4 稳定性考察 将上述溶液保存在 4 $^{\circ}$ C 环境中, 并在 6 h、12 h、24 h 和 48 h 后进样分析, 三种组分含量的 RSD 值分别为 1.51%、0.89% 和 2.02%, 说明样品溶液在 2 d 内保持稳定。

2.5 回收率考察 精密称取甘草次酸对照品 4.52 mg, 置 100 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 作为甘草次酸溶液。精密称取枸橼酸喷托维林对照品 101.70 mg 和甘草酸铵对照品 41.45 mg, 置同一 10 mL 量瓶中, 用上述溶液溶解并稀释至刻度。精密称取批号为 15012203 的样品约 5.00 g, 置 100 mL 量瓶中, 平行 9 份, 分别精密加入上述混合对照品溶液 0.50 mL、1.00 mL 和 1.50 mL, 每组平行 3 份, 按“1.2.1.1”项下方法对样品进行处理, 计算平均回收率, 枸橼酸喷托维林、甘草酸和甘草次酸的平均回收率分别为 102.27%、99.94% 和 98.02%, 相应的 RSD 为 2.31%、2.33% 和 2.42%, 结果如表 3 所示。

3 讨论

检测波长的选择: 枸橼酸喷托维林的最大吸收波长为 200 nm, 而甘草酸和甘草次酸的最大吸收为 250 nm。甲醇的紫外吸收波长为 205 nm, 在此范围

内测定基线不平稳, 干扰较明显; 但波长大于 215 nm, 喷托维林的紫外吸收又明显减弱。综合考虑, 我们设置为双波长 215 nm 和 250 nm 同时检测。

提取溶剂的选择: 比较了相同的超声时间下, 甲醇、甲醇-水 (50:50) 和水等三种溶剂的提取率和样品出峰情况。试验发现, 甲醇的提取率最低, 而颗粒在水中的溶解性最好; 但溶剂与流动相极性差别较大导致目标物的色谱峰延展严重。故我们在水提取物中加入相同比例的甲醇, 从而满足我们的分析要求。

流动相的选择: 本组尝试采用乙腈-水 (60:40) 和甲醇-水 (70:30) 等度洗脱, 发现甘草酸和甘草次酸的出峰时间较晚, 且色谱峰有拖尾现象, 故在水相中加入 1% 的三乙胺用以改善峰形。我们发现喷托维林和甘草酸的色谱峰在乙腈体系中较之甲醇宽, 塔板数略低; 另外药典中对喷托维林的测定亦采用甲醇-水体系^[23]。但是提高甲醇比例, 枸橼酸喷托维林又与相邻杂质峰无法基线分离。最后我们降低初始状态下有机相比比例, 采用甲醇-1% 三乙胺水溶液 (用磷酸调 pH 为 3.0) 梯度洗脱, 分离度和重现性较好。

现行标准中采用甲基橙分光光度法测定喷托维林的含量, 且缺乏甘草酸和甘草次酸等成分的测定项目, 所以标准的专属性和全面性存在较大缺陷。本研究采用 HPLC 双波长法梯度洗脱同时对颗粒中三种组分进行分离测定, 简化了文献中 2 个色谱体系才能完成的检验任务, 大大缩短了分析时间, 为该制剂质量标准的完善和提高提供了参考。

参考文献

- [1] 童龙标. 高效液相色谱法测定枸橼酸喷托维林片含量[J]. 医药导报, 2011, 30(3): 375-376.
- [2] 陈钢, 许海燕, 骆朋. 甘草酸二钾在牙膏中的抑菌作用[J]. 口腔护理用品工业, 2018, 28(3): 9-12.
- [3] 郑晓霞, 谢晓芳. 甘草酸二钾的抗炎作用研究及其在牙膏中的应用[J]. 口腔护理用品工业, 2017, 27(5): 18-21.
- [4] 安春耀, 李昌玲, 刘德山. 甘草酸干预炎症信号通路新进展[J]. 云南中医中药杂志, 2017, 38(9): 73-76.

- [5] 陈秀秀,周红霞,元文宝,等. 甘草酸联合利巴韦林体内抗甲型H1N1流感病毒作用[J]. 药学报,2015,50(8):966-972.
- [6] 廖卫波,申宝德,沈成英,等. 绿原酸与甘草酸联合应用体外抗呼吸合胞病毒作用研究[J]. 解放军药学报,2017,33(1):12-16.
- [7] 王永洪,兰婉莹,陈恬. 甘草酸体外抗人巨细胞病毒 AD169 的作用[J]. 中成药,2016,38(10):2121-2127.
- [8] 黄金花,马俐,杜芬,等. 甘草酸对动脉粥样硬化斑块的消退作用[J]. 中国医院药学杂志,2015,35(7):571-575.
- [9] 格桑曲珍,马俐,谢光辉,等. 甘草酸对载脂蛋白E基因敲除小鼠脂质代谢及动脉粥样硬化斑块的影响[J]. 中国动脉硬化杂志,2015,23(2):116-120.
- [10] 谭慧珍,刘恩,司徒树标. 丁二磺酸腺苷蛋氨酸联合复方甘草酸苷治疗酒精性肝硬化的疗效研究[J]. 安徽医药,2018,22(4):769-772.
- [11] 颜殷红,雷晓毅,傅鹭华. 甘草酸二铵肠溶胶囊联合双歧杆菌四联活菌对NAFLD患者炎症指标和肝损伤的影响[J]. 中国现代应用药学,2018,35(11):1713-1718.
- [12] 仲金秋,曹玉珠,徐宏江,等. 甘草酸二铵改善Con A致小鼠肝损伤的作用研究[J]. 天然产物研究与开发,2018,30(12):2088-2096.
- [13] 孙晓可,杨飒,霍小位,等. 甘草酸对酒精性肝损伤大鼠脏器的保护作用:18 α -与18 β -甘草酸配比的影响[J]. 现代食品科技,2018,34(7):21-27.
- [14] 张建集,白格兰,边缓缓,等. 口服复方甘草酸苷片联合静脉注射川芎嗪对酒精性肝病病人T淋巴细胞的影响[J]. 安徽医药,2020,24(7):1453-1456.
- [15] 朱世超,郑学敏,张玥,等. 甘草次酸衍生物抗肝纤维化的实验研究[J]. 中草药,2017,48(17):3554-3559.
- [16] 梁劲康,吴志玲,吴广辉,等. 甘草次酸的抗肝癌作用机制及其作为肝靶向配体的研究进展[J]. 中国药房,2017,28(22):3150-3154.
- [17] 张丽宏,傅云,廖建,等. 甘草次酸对UVB诱导HaCaT细胞光老化的保护作用及相关细胞因子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(23):129-133.
- [18] 张宁. 基于中药质量标志物的杏仁止咳颗粒质量标准提升研究[D]. 南京:南京中医药大学,2019:123.
- [19] 李霞,柳小秦,王红英,等. 复方枸橼酸喷托维林颗粒中枸橼酸喷托维林的含量测定[J]. 西北药学杂志,2015,30(2):145-146.
- [20] 王发,周志云,刘雪峰,等. 高效液相色谱法测定复方枇杷喷托维林颗粒中枸橼酸喷托维林的含量[J]. 安徽医药,2017,21(5):828-830.
- [21] 王发,刘雪峰,王嫦鹤,等. 复方枇杷喷托维林颗粒中甘草酸质量标准的建立[J]. 中国药师,2017,20(8):1461-1463.
- [22] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:399.
- [23] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:二部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:732.

(收稿日期:2020-09-29,修回日期:2020-11-17)

引用本文:高杨,张升宁,李来邦,等.花生四烯酸12-脂氧化酶-12-氢基二十碳四烯酸-GPR31轴在肝脏再灌注肝缺血损伤中的作用[J].安徽医药,2022,26(1):29-34.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.01.007.

◇临床医学◇



花生四烯酸12-脂氧化酶-12-氢基二十碳四烯酸-GPR31轴在肝脏再灌注肝缺血损伤中的作用

高杨,张升宁,李来邦,冉江华

作者单位:昆明市第一人民医院肝胆胰血管外科,云南 昆明 650051

通信作者:冉江华,男,主任医师,研究方向为肝胆胰血管外科,Email:rjh2u@163.com

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81660112)

摘要: **目的** 探究花生四烯酸12-脂氧化酶(ALOX12)-12-氢基二十碳四烯酸(HETE)-GPR31轴在肝脏再灌注肝缺血损伤中的作用机制。**方法** 采用8周龄雄性B6.Cg-Tg(MX1-cre)Cgn/J小鼠为研究对象,采用随机数字表法分为三组:空白对照组($n=12$)、实验对照组($n=12$)和实验组($n=12$)。实验组小鼠进行基于胚胎干细胞的基因打靶技术制备基因敲除手术;进行肝血流阻断。肝血流阻断45 min后发送移走血管夹,以恢复血液供应。实验对照组进行肝血流阻断。空白对照组同样进行开腹但并不进行肝血流阻断。采用蛋白质印迹法(Western blotting)检测ALOX12-12-HETE-GPR31轴中基因表达水平。采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法分别检测肝脏血清中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)三项炎症因子水平和12-HETE含量。采用原位细胞凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡情况。采用日立7180全自动生化分析仪检测小鼠肝脏血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、AST/ALT。**结果** 肝脏再灌注肝缺血损伤小鼠的ALOX12-12-HETE-GPR31轴中基因转录水平均高于空白对照组($P<0.05$),且随着再灌注时间的延长而逐渐增大($P<0.05$)。空白对照组和实验组小鼠,在肝血流阻断并再灌注后,随着再灌注时间延长ALOX12-12-HETE-GPR31轴中基因转录水平间差异无统计学意义($P>0.05$)。实验对照组小鼠肝脏中IL-1 β [(20.53 $\pm$ 1.32)ng/L比(10.61 $\pm$ 0.83)ng/L]、IL-6[(322.1 $\pm$ 11.41)ng/L比(107.34 $\pm$ 9.02)ng/L]、TNF- α 水平[(31.78 $\pm$ 2.42)ng/L比(11.41 $\pm$ 0.98)ng/L]、12-HETE含量、肝脏组织细胞凋亡率、ALT[(47.94 $\pm$ 1.48)U/L