

中药炮制辅料甘草汁的质量标准研究

钮正睿¹,毛淑杰¹,顾雪竹¹,刘洪宇²,李先端^{1*}

(1. 中国中医科学院中药研究所,北京 100700;
2. 国家食品药品监督管理局保健食品审评中心,北京 100070)

[摘要] 目的:制定炮制辅料甘草汁的质量标准,以保证甘草汁和甘草汁所炮制饮片的质量稳定。方法:采用 TLC 鉴别、常规检测和 HPLC 测定法进行研究。结果:建立了以甘草酸铵和甘草苷作为对照品的 TLC 鉴别方法,对甘草汁中灰分、可溶性固形物进行了检测,测定了药汁中甘草酸和甘草苷含量。结论:对炮制辅料中的药汁之一——甘草汁进行了较为系统的质量研究,初步制定其质量标准,方法简便可靠,可以用于甘草汁的质量评价。

[关键词] 炮制辅料甘草汁;质量标准;薄层色谱;甘草酸;甘草苷;高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)21-0100-05

Study on the Quality Standard of Licorice Juice as A Processing Excipient

NIU Zheng-rui¹, MAO Shu-jie¹, GU Xue-zhu¹, LIU Hong-yu², LI Xian-duan^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100700, China;
2. Center for Health Food Evaluation, State Food and Drug Administration, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the quality standard of licorice juice as a processing excipient. **Method:** TLC identification, routine testing and determination by HPLC of ten batches of licorice juice were performed. **Result:** The identification method of licorice juice was established with both ammonium glycyrrhizate and liquiritin as reference substances for the first time. The content data of ash and soluble solid was obtained. The concentration data of glycyrrhizic acid and liquiritin was obtained. **Conclusion:** For the first time the research on quality standard of licorice juice was conducted systematically and the established standard can be used to control the quality of licorice juice as a processing excipient.

[Key words] licorice juice as a processing excipient; quality standard; TLC; glycyrrhizic acid; liquiritin; HPLC

饮片炮制后使用是中药的一大特色,然而目前药汁的质量控制尚没有系统的国家标准或地方标准。甘草汁系甘草药材水煎煮所得的煎液,用于炮制饮片(吴茱萸、远志、半夏等)所用。目前甘草汁制备方法多样,在加入水量、煎煮时间和煎煮次数等

环节文献报道不尽相同^[1-11],制成品亦缺乏质量标准。因此,笔者对甘草汁的制备工艺进行了研究制定,并在此基础上对制成品进行了质量标准的探索性研究。

1 仪器与试剂

Waters 液相色谱系统(Waters 600 泵、2487 双通道紫外检测器、Shimazu CTO-2A 柱温箱、millennium 32 液相色谱工作站),XCT-101G 型马弗炉(天津市自动化仪表八厂),BP 211D 1/10 万电子天平(德国 Satorious 公司),Analytical Plus 1/万电子天平(美国 Ohaus 公司)。

甘草酸铵对照品(中国药品生物制品检定所,批

[收稿日期] 20110622(014)
[基金项目] 中国中医科学院创新团队项目(ZZ2006096)
[第一作者] 钮正睿,助理研究员,理学博士,从事中药炮制研究,Tel: 010-84036552, E-mail: liuhy@bjmu.edu.cn
[通讯作者] *李先端,研究员,从事中药质量控制研究,Tel: 010-84036552, E-mail: maoshujie@163.com

号 110731-200614), 甘草苷对照品(购自中国药品生物制品检定所, 批号 111610-200604), 色谱纯甲醇(天津四友精细化学品有限公司), 色谱纯乙腈(美国 Fisher), 水为纯水, 其余试剂均为分析纯。

甘草汁的制备工艺: 取甘草药材, 干切成 1~2 cm 碎段, 加入 12 倍量水, 煎煮 1 h, 药渣再加水 12 倍量煎煮 1 h 2 次所得煎煮液合并即得。制备甘草汁所用药材见表 1, 经中国中医科学院中药研究所冯学锋研究员鉴定为乌拉尔甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎, 标本保存在中国中医科学院中药研究所中药炮制研究中心。

表 1 10 批甘草汁的可溶性固形物、总灰分和酸不溶性灰分测定 $g \cdot L^{-1}$

No.	产地	可溶性固形物 ($n=3$)	总灰分 ($n=2$)	酸不溶性灰分 ($n=2$)
1	内蒙	19	1.42	-
2	内蒙	22	1.63	0.04
3	甘肃	18	1.16	0.03
4	内蒙	16	0.93	0.02
5	甘肃	14	1.52	-
6	内蒙	21	0.66	-
7	内蒙	22	0.92	0.09
8	内蒙	24	0.99	-
9	甘肃	19	1.22	0.08
10	内蒙	17	1.26	-
范围		14~24	0.66~1.63	0~0.09
均值		19	1.17	0.03

注: - 为未检测到。

根据被炮制饮片的不同, 煎煮所得甘草汁需要用水调整到一定体积。以制吴茱萸为例, 《中国药典》(2010 年版) 一部规定 6 g 甘草煎汁炮制 100 g 吴茱萸^[12], 经过摸索甘草汁和吴茱萸的体积质量比应为 1:1^[13], 本文以 6 g 甘草煎煮最后得 100 mL 药汁进行质量标准研究。

2 甘草汁薄层色谱鉴别

薄层色谱方法 甘草汁 10 mL 加入水饱和正丁醇萃取 3 次, 每次 5 mL, 合并正丁醇萃取液, 用正丁醇饱和的蒸馏水洗涤 3 次, 正丁醇萃取液于 80 °C 水浴挥干, 残渣用甲醇 2 mL 溶解, 制得供试液。另取甘草对照药材 1 g, 按照《中国药典》(2010 年版) 一部“甘草”中“鉴别”项下制备对照药材的供试液^[12]。

取甘草酸铵与甘草苷对照品, 加甲醇制成浓度均为 $2 g \cdot L^{-1}$ 的对照品溶液。

按照《中国药典》(2010 年版) 一部(附录 VI B) 下薄层色谱法试验, 吸取上述供试液各 1~2 μL , 点于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上, 以氯仿-甲醇-水-甲酸(85:35:10:0.4) 下层为展开剂, 展开在 254 nm 下观察, 在与对照品和对照药材色谱相应的位置上, 显相同的两个暗斑。

3 甘草汁可溶性固形物测定

精密量取甘草汁 25 mL 于已干燥至恒重的蒸发皿中, 在水浴上挥干, 105 °C 干燥 3 h, 冷却 30 min 后称重(平行 3 次)。结果见表 1。

4 灰分测定

4.1 总灰分测定 分别精密量取一定体积的甘草汁(相当于甘草药材 3~5 g), 置于已灼灼至恒重的坩埚中, 90 °C 水浴挥干, 按照《中国药典》(2010 年版) 一部(附录 IX K) 下总灰分测定方法于马弗炉中灼灼至恒重, 计算总灰分含量。结果见表 1。

4.2 酸不溶性灰分测定 按照《中国药典》(2010 年版) 一部(附录 IX K.2) 下酸不溶性灰分测定方法操作, 计算酸不溶性灰分含量, 结果见表 1。

5 甘草酸含量测定

5.1 色谱条件 Phenomenex Gemini 5 μm C₁₈ 110R 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 柱温 30 °C, 流动相甲醇-0.2 mol \cdot L⁻¹ 醋酸铵-冰醋酸(67:33:1), 流速 1 mL \cdot min⁻¹, 紫外检测波长为 254 nm。

5.2 对照品溶液的配制 精密称取甘草酸铵对照品适量, 置于量瓶中, 加入流动相使溶解, 并稀释至刻度, 制成 215 mg \cdot L⁻¹ 的溶液, 相当于甘草酸 210 mg \cdot L⁻¹ (甘草酸铵 0.2 mg = 甘草酸 0.195 9 mg)。

5.3 甘草汁中甘草酸含量测定供试液的制备 将甘草汁稀释 10 倍后, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 续滤液作为供试品溶液, 进样 20 μL 。

5.4 方法学考察

5.4.1 线性关系考察 分别取甘草酸铵对照品溶液(215 mg \cdot L⁻¹) 10, 20, 40, 60, 80, 100 μL , 注入液相色谱仪, 以峰面积为横坐标, 进样量(μg) 为纵坐标, 所得回归方程为 $Y = 0.107 3 + 1.152 8 \times 10^{-6} X$ ($r = 0.999 9$)。甘草酸铵在 2.15~21.5 μg 呈良好的线性。

5.4.2 精密度试验 精密吸取同一份供试液, 进样 5 次, 甘草酸铵的峰面积平均值为 2 915 008 (RSD

1.98%) ,说明仪器精密度较好。

5.4.3 重复性试验 精密吸取甘草汁 6 份 ,按照 5.1.3 稀释后注入液相色谱仪测定 ,甘草酸铵的峰面积平均值为 2 885 298(RSD 2.59%) ,说明该方法重复性较好。

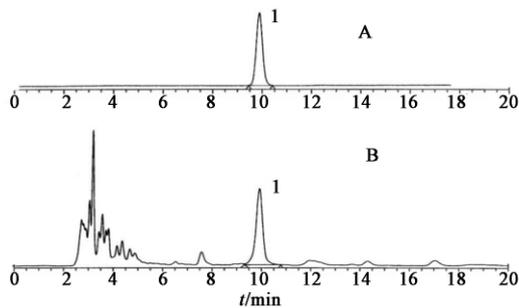
5.4.4 稳定性试验 取供试液分别在 0 2 4 6 8 , 10 h 测定 ,测得甘草汁中甘草酸铵峰面积平均值为 2 881 489(RSD 1.44%) ,说明供试液至少在 10 h 内稳定。

5.4.5 加样回收率试验 精密吸取甘草药汁(样品编号 1) 1 mL ,置于 10 mL 量瓶中 ,精密加入甘草酸铵对照品(加入量见表 2) ,稀释至刻度 ,摇匀 ,0.45 μm 滤膜过滤 ,续滤液作为供试品溶液 ,进样 20 μL。结果见表 2。甘草酸铵的平均回收率为 99.82% , RSD 0.53% 。

表 2 甘草汁中甘草酸铵加样回收率试验

加入量 /mg	样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1.69	1.712 8	3.403 9	100.07		
1.68	1.712 8	3.402 5	100.58		
1.70	1.712 8	3.401 5	99.34	99.82	0.53
1.72	1.712 8	3.435 6	100.16		
1.71	1.712 8	3.412 5	99.40		
1.70	1.712 8	3.401 8	99.35		

5.5 含量测定 甘草酸含量测定结果见图 1 ,表 3。



A. 对照品; B. 甘草汁供试液; 1. 甘草酸铵
图 1 甘草汁中甘草酸含量测定 HPLC 图谱

6 甘草苷含量测定

6.1 色谱条件 色谱柱: phenomenex Gemini 5 μm C₁₈ 110R(4.6 mm × 250 mm 5 μm); 柱温 30 ℃; 流动相乙腈-5% 冰醋酸(1:4) ,流速 1 mL·min⁻¹; 紫外检测波长 276 nm。

6.2 对照品溶液的配制 精密称取甘草苷对照品

表 3 10 批甘草汁的甘草酸和甘草苷含量测定(n = 2) g·L⁻¹

No.	甘草酸	甘草苷
1(内蒙)	1.677 7	0.579 8
2(内蒙)	1.718 6	0.559 9
3(甘肃)	0.661 7	0.355 0
4(内蒙)	0.464 0	0.287 0
5(甘肃)	3.025 5	0.187 0
6(内蒙)	0.502 7	0.458 4
7(内蒙)	1.591 9	1.193 6
8(内蒙)	1.863 1	1.707 2
9(甘肃)	0.714 8	0.458 3
10(内蒙)	1.401 9	0.279 6
范围	0.464 0 ~ 3.025 5	0.187 0 ~ 1.707 2
均值	1.362 2	0.606 6

适量 ,置于量瓶中 ,加入甲醇溶解并稀释至刻度 ,制成 266 mg·L⁻¹ 的溶液; 精密量取一定体积的对照品溶液置于另一量瓶中并稀释至刻度 ,制成浓度为 53.2 mg·L⁻¹ 的溶液。

6.3 甘草汁中甘草苷含量测定供试液的制备 将甘草汁稀释 10 倍后 ,用 0.45 μm 滤膜过滤 ,续滤液作为供试品溶液 ,进样 10 μL。

6.4 方法学考察

6.4.1 线性关系考察 分别取甘草苷对照品溶液(53.2 mg·L⁻¹) 5 ,10 ,15 ,20 μL 和浓度为 266 mg·L⁻¹ 的对照品溶液 5 ,10 μL ,注入液相色谱仪 ,以峰面积为横坐标 ,进样量(μg) 为纵坐标。回归方程为 $Y = -0.024 6 + 5.763 4 \times 10^{-7} X$ ($r = 0.999 9$) ,甘草苷在 0.266 ~ 2.66 μg 呈良好的线性。

6.4.2 精密度试验 精密吸取同一份供试液 ,进样 5 次 ,甘草苷的峰面积平均值为 1 003 065 (RSD 1.34%) ,说明仪器精密度较好。

6.4.3 重复性试验 精密吸取甘草汁 6 份 ,按照 5.2.3 稀释后注入液相色谱仪测定 ,甘草苷的峰面积平均值为 997 049 (RSD 2.90%) ,说明该方法重复性较好。

6.4.4 稳定性试验 取供试液分别在 0 2 4 6 8 , 10 h 测定 ,测得甘草汁中甘草苷峰面积平均值为 998 946 (RSD 1.22%) ,说明供试液至少在 10 h 内稳定。

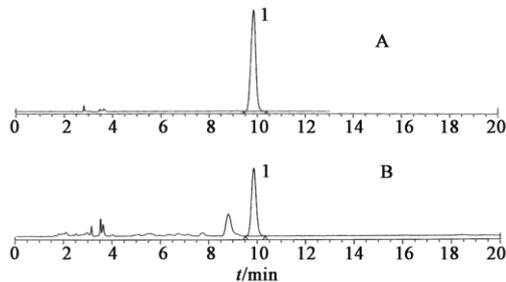
6.4.5 加样回收率试验 精密吸取甘草药汁(样品编号 1) 1 mL ,置于 10 mL 量瓶中 ,精密加入甘草苷对

照品 稀释至刻度 摇匀 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 续滤液作为供试品溶液, 进样 $10 \mu\text{L}$ 。甘草苷的平均回收率为 98.25% , $\text{RSD } 1.41\%$, 结果见表 4。

表 4 甘草汁中甘草苷加样回收率试验

样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.58	0.579 8	1.147 8	97.93	98.25	1.41
0.57	0.579 8	1.148 5	99.77		
0.56	0.579 8	1.139 5	99.95		
0.58	0.579 8	1.139 9	96.57		
0.59	0.579 8	1.152 2	97.02		
0.57	0.579 8	1.139 9	98.26		

6.5 含量测定结果 甘草苷含量测定的 HPLC 图谱见图 2, 含量测定结果见表 3。



A. 对照品; B. 甘草汁供试液; 1. 甘草苷

图 2 甘草汁中甘草苷含量测定 HPLC

7 讨论

7.1 产地和基源 市场调研发现目前甘草药材主要产地为甘肃、内蒙, 故本文从主产地收集多份药材用于质量评价, 所得数据能够反映目前市面上药材的情况; 收集的药材经过鉴定均为乌拉尔甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 的干燥根及根茎, 说明市场上主流的药材原植物为乌拉尔甘草。

7.2 薄层色谱鉴别 甘草汁是水煎液, 其中高极性成分(色素等)会对 TLC 鉴别造成干扰, 故使用正丁醇萃取制备供试液。查阅文献发现甘草药材或者制剂中甘草的鉴别通常使用对照药材或单一对照品, 本文建立的方法能同时观察甘草酸铵和甘草苷对照品的斑点《中国药典》(2010 年版)一部规定喷 10% 硫酸乙醇溶液显色后在 365 nm 下观察甘草酸铵荧光斑点, 本研究发现, 按照此法斑点不明显, 且甘草酸铵 R_f 值较小, 易被杂质干扰; 本文建立的方法甘草酸铵的荧光淬灭斑点清晰, 且不需显色直接观察, 不需制备碱性硅胶板, 较为方便。

本文比较了不同的展开剂系统(①正丁醇-醋酸-水, ②氯仿-甲醇-水, ③氯仿-乙酸乙酯-甲酸, ④乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水, ⑤氯仿-甲醇-水-甲酸, 结果展开剂⑤的分离效果最佳, 经过调整摸索, 最终将比例确定为氯仿-甲醇-水-甲酸(85:35:10:0.4)下层。

7.3 含量测定 甘草酸和甘草苷含量测定结果标明, 10 批产品的含量差别较大, 其中甘草酸的含量范围在 $0.464 0 \sim 3.025 5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 最高值约为最低值的近 7 倍; 而甘草苷的含量在 $0.187 0 \sim 1.707 2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 最高值约为最低值的近 10 倍。由此可见, 必须对药汁制备进行严格的质量控制, 其中包括药材的质量和药汁制备工艺的稳定性, 才能保证药汁炮制后饮片质量的稳定性。

7.4 质量标准 综合研究结果, 考虑到药材之间的差异, 建议炮制辅料甘草汁中可溶性固形物含量不低于下限的 90% , 即不低于 $13 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 总灰分和酸不溶性灰分不高于上限的 105% , 即总灰分不高于 $1.7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 酸不溶性灰分不高于 $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 甘草酸和甘草苷的含量不低于均值的 80% , 即甘草酸含量不低于 $1.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 甘草苷含量不低于 $0.49 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

【参考文献】

- [1] 天津市食品药品监督管理局. 天津市中药饮片炮制规范[S]. 天津: 天津科学技术出版社, 2005: IV.
- [2] 山东省卫生厅. 山东省中药炮制规范[S]. 济南: 山东科学技术出版社, 1990: 6.
- [3] 四川省卫生厅. 四川省中药饮片炮制规范[S]. 成都: 四川人民卫生出版社, 1984: 7.
- [4] 河南省卫生厅. 河南省中药材炮制规范[S]. 第 2 版. 郑州: 河南科学技术出版社, 1983: 8.
- [5] 河北省卫生局. 河北省中药材炮制规范[S]. 石家庄: 河北科学技术出版社, 1979: 5.
- [6] 福建省卫生厅. 福建省中药饮片炮制规范[S]. 福州: 福建科学技术出版社, 1988: 12.
- [7] 上海市卫生局. 上海市中药饮片炮制规范[S]. 上海: 上海科学技术出版社, 1980: 9.
- [8] 湖南省卫生厅. 湖南省中药炮制规范[S]. 长沙: 湖南科技出版社, 1983: 136.
- [9] 浙江省卫生厅. 浙江省中药炮制规范[S]. 杭州: 浙江科技出版社, 1985: 228.
- [10] 江西省卫生厅药政管理局. 江西省中药炮制规范[S]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991: 256.

火焰原子吸收光谱法测定鸡内金中的金属元素

胡烜红¹, 胡久宏², 周炳¹, 胡久梅^{1*}

(1. 西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610031; 2. 汶川县林业医院, 四川 汶川 623000)

[摘要] 目的: 利用原子吸收光谱法测定鸡内金中金属元素含量。方法: 使用 HNO₃-HClO₄ 体系消解样品, 采用火焰原子吸收光谱法对鸡内金中的 Mg, Fe, Mn, Zn, Cu 5 种金属元素进行测定。结果: 鸡内金样品中含有较丰富的 Mg, Fe, Mn, Zn, Cu。5 种金属元素回收率在 95.27% ~ 104.47%, RSD < 3.53%。结论: 建立了鸡内金药材中金属元素的分析方法, 该方法操作简便, 精密度好, 结果准确可靠。

[关键词] 鸡内金; 金属元素; 火焰原子吸收光谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)21-0104-03

Determination of Metal Elements in Galli Gigeriae Endothelium Corneum by Flame Atomic Absorption Spectrometry

HU Xuan-hong¹, HU Jiu-hong², ZHOU Bing¹, HU Jiu-mei^{1*}

(1. School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China;

2. Forest Hospital, Wenchuan 623000, China)

[Abstract] **Objective:** To determine metal elements in Galli Gigeriae Endothelium Corneum by FAAS. **Method:** The samples were digested with mixed acid of nitric acid-perchlorate. Mg, Cu, Zn, Fe and Mn in Galli Gigeriae Endothelium Corneum were determined by flame atomic absorption spectroscopy. **Result:** Galli Gigeriae Endothelium Corneum was rich in Mg, Fe, Mn, Zn and Cu; recovery rate was 95.27% -104.47% and the relative standard deviation was 3.53% for each element. **Conclusion:** The detection method of metal elements of the Galli Gigeriae Endothelium Corneum is established. The method is rapid, accurate and reliable.

[Key words] Galli Gigeriae Endothelium Corneum; metal elements; flame atomic absorption spectrometry (FAAS)

鸡内金为雉科动物家鸡 *Gallus gallus domesticus* Brisson 的干燥砂囊内壁, 具有健胃消食、涩精止遗、

通淋化石等作用^[1]。随着对中药成分的深入研究, 无机成分尤其是微量元素以及其他金属元素研究日益受到人们重视。微量元素具有多种多样的生理效应, 是构成生命体内许多重要酶的组分, 参与体内许多重要的生理过程, 与许多疾病的发生密切相关^[2-3]。目前对鸡内金氨基酸和蛋白质成分的研究较多, 而对微量元素以及其他金属元素研究分析报道较少^[4-6]。本文采用火焰原子吸收光谱法测定鸡

[收稿日期] 20110610(003)

[第一作者] 胡烜红, 在读硕士, 从事药物生物技术研究, Tel: 13540281071, E-mail: 176139020@qq.com

[通讯作者] * 胡久梅, 副研究员, 硕士生导师, 从事药物生物技术研究, E-mail: biojy@home.swjtu.edu.cn

[11] 中华人民共和国卫生部药政管理局. 全国中药炮制规范[S]. 北京: 人民卫生出版社, 1988: 154.

[12] 中国药典. 一部[S]. 2010: 160, 80.

[13] 钮正睿, 李先端, 顾雪竹, 等. 炮制辅料甘草汁的制

备工艺研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(16): 2051.

[责任编辑 蔡仲德]