

藿香正气水中甘草浸膏的含量测定 高效液相色谱法

参考——中国药典（2025年版）

一、背景

藿香正气水作为经典中成药制剂，由藿香、甘草、白术等多味中药组方而成，具有解表化湿、理气和中的功效，广泛用于治疗外感风寒、内伤湿滞或夏伤暑湿所致的胃肠型感冒、呕吐泄泻等症。其中，甘草浸膏作为方剂中的关键辅料及活性成分载体，富含甘草酸、甘草苷等三萜皂苷类成分，不仅发挥调和诸药、缓急止痛的作用，还兼具抗炎、抗氧化、调节免疫等药理活性，对制剂整体疗效及安全性具有重要影响。

然而，甘草浸膏的质量受原料来源、提取工艺及复方配伍复杂性等因素制约，其活性成分含量易出现波动，直接影响藿香正气水的批次间一致性与临床效果稳定性。藿香正气水中甘草浸膏特征性成分（如甘草酸）的精准测定，对提升该制剂的质量可控性、保障临床疗效均一性、推动中药复方标准化及现代化生产具有重要意义。

藿香正气水为《中国药典（2025年版）》收录的中成药品种，与2020年版相比，《中国药典（2025年版）》中新增了甘草浸膏的含量测定。

二、原理

藿香正气水试样经甲醇超声波辅助提取后，采用反相色谱等度洗脱条件，使用紫外-可见光检测器检测，以保留时间定性，外标法定量。

三、实验过程

1 试剂与材料

- 1.1 水：符合 GB/T 6682 的一级水；
- 1.2 甲醇：色谱纯；
- 1.3 乙腈：色谱纯；
- 1.4 乙醇：色谱纯；
- 1.5 磷酸：色谱纯；
- 1.6 0.1%磷酸水溶液：准确量取 1 mL 磷酸（1.5）至 1000 mL 容量瓶，加水（1.1）溶解并定容至刻度，混匀；
- 1.7 50%乙醇溶液：分别量取 50 mL 乙醇（1.4）和 50 mL 水（1.1），混匀；
- 1.8 甘草酸铵标准品：CAS 号为 53956-04-0，纯度为 99.5%；

1.9 藿香正气水试样, 市售。

2 仪器与设备

2.1 高效液相色谱仪: K2025 P2 二元高压输液泵、K2025 AS 自动进样器、K2025 C0 柱温箱、K2025 UVD 紫外-可见光检测器、Wookinglab 色谱工作站;

2.2 分析天平: 精确到 0.0001 g;

2.3 涡旋混合器;

2.4 超声波清洗机;

2.5 量筒: 10 mL、100 mL;

2.6 移液器: 100 μ L、1000 μ L;

2.7 容量瓶: 10 mL、1000 mL, 棕色带刻度;

2.8 具塞锥形瓶: 50 mL;

2.9 一次性针头注射器;

2.10 微孔滤膜: 0.22 μ m, 有机相。

3 测定步骤

3.1 标准储备液的配制

准确称取甘草酸铵标准品 (1.8) 10 mg, 置于 10 mL 容量瓶中, 用 50%乙醇溶液 (1.7) 溶解并定容至刻度, 混匀, 此时甘草酸铵标准储备液的浓度为 1.0 mg/mL, 即得甘草酸浓度为 0.98 mg/mL 的标准储备液 (甘草酸重量=甘草酸铵重量/1.0207), 于-18 $^{\circ}$ C 下, 贮存于密闭的棕色玻璃瓶中。

3.2 系列标准工作液的配制

将甘草酸标准储备液 (3.1) 用 50%乙醇溶液 (1.7) 逐级稀释, 配制成浓度依次为 0.98 μ g/mL、4.90 μ g/mL、9.80 μ g/mL、19.59 μ g/mL、48.99 μ g/mL、97.97 μ g/mL 和 195.94 μ g/mL 的甘草酸系列标准工作液。

3.3 供试品溶液的制备

取约 0.2 mL 市售藿香正气水试样 (1.9), 置于具塞锥形瓶中, 加入甲醇 (1.2) 25 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 45 min, 放冷, 再称定重量, 用甲醇 (1.2) 补足减失的重量, 摇匀; 静置, 取上清液用 0.22 μ m 有机相滤膜 (2.10) 过滤,

取续滤液, 即得供试品溶液, 待测。

同时做空白试验, 试样做2次平行, 操作步骤同上。

3.4 供试品加标溶液的制备

取约0.2 mL市售藿香正气水试样 (1.9), 置于具塞锥形瓶中, 先准确加入甘草酸标准储备液 (3.1) 0.2mL, 再加入甲醇 (1.2) 24.8 mL, 密塞, 称定重量, 后续操作步骤同3.3, 取续滤液, 即得供试品加标溶液, 待测。

3.5 色谱条件

- a) 色谱柱: C_{18} 色谱柱, 4.6×250 mm, 5 μ m 或者相当的色谱柱;
- b) 流动相: 乙腈 (1.3) -0.1%磷酸水溶液 (1.6) =34:66 (V/V);
- c) 流速: 1.0 mL/min;
- d) 进样量: 10 μ L;
- e) 洗针液: 90 %乙腈水溶液;
- f) 柱温: 35 $^{\circ}$ C;
- g) 检测器及检测波长: 检测器为紫外-可见光检测器, 检测波长为 253 nm。

4 结果

4.1 重复性测试

按照上述色谱条件 (3.5) 进行采集, 甘草酸标准溶液 (浓度为 19.59 μ g/mL) 的色谱图如图 1 所示, 积分结果如表 1 所示。

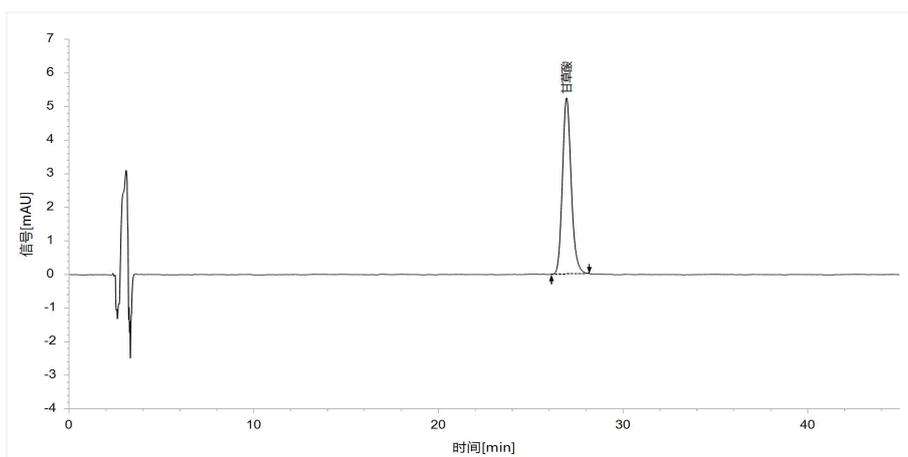


图 1 甘草酸标准溶液的色谱图

表 1 甘草酸标准溶液色谱图积分结果

目标物	保留时间	峰面积	峰高	理论塔板数	分离度	对称/拖尾因
-----	------	-----	----	-------	-----	--------

	(min)	(mAU. s)	(mAU)			子
甘草酸	26.950	174.321	5.251	16062	—	1.16

由表 1 中数据可知, 甘草酸峰的理论塔板数为 16062, 满足《中国药典 (2025 年版)》中规定的理论塔板数按甘草酸峰计算不低于 5000 的要求; 对称因子为 1.16, 具有良好的峰形。

将甘草酸标准溶液 (浓度为 19.59 $\mu\text{g/mL}$) 连续进样 7 针, 叠加的色谱图如图 2 所示, 结果见表 2。

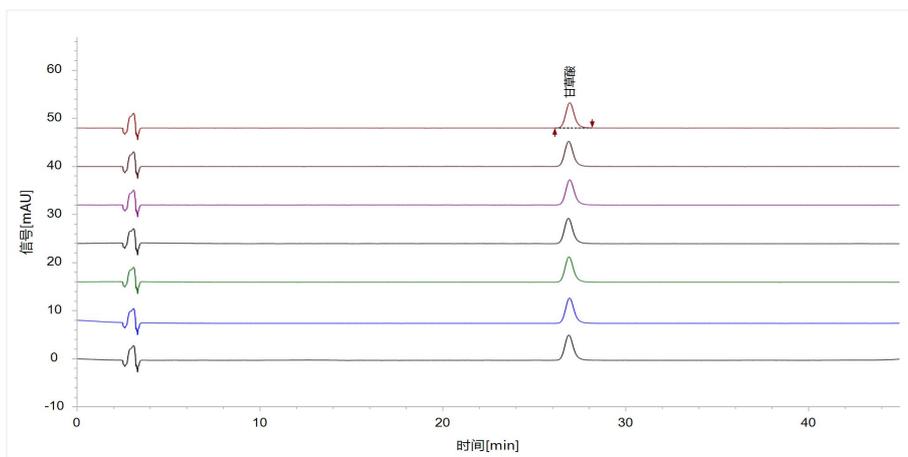


图 2 甘草酸标准溶液连续进样 7 针叠加的色谱图

表 2 甘草酸标准溶液连续进样 7 针重复性数据统计

目标物	项目	1	2	3	4	5	6	7	平均值	RSD%
甘草酸	保留时间 (min)	26.917	26.892	26.933	26.867	26.942	26.883	26.950	26.912	0.12
	峰面积 (mAU. s)	173.077	173.495	174.147	173.809	173.950	173.832	174.321	173.804	0.24

由表 2 中数据可知, 甘草酸标准溶液 (浓度为 19.59 $\mu\text{g/mL}$) 连续进样 7 针进行重复性测试, 甘草酸峰保留时间的 RSD 为 0.12 %, 峰面积的 RSD 为 0.24 %, 具有良好的定性定量重复性。

4.2 仪器灵敏度测试

按照上述色谱条件 (3.5) 进行采集, 灵敏度测试的色谱图如图 3 所示, 计算结果见表 3。

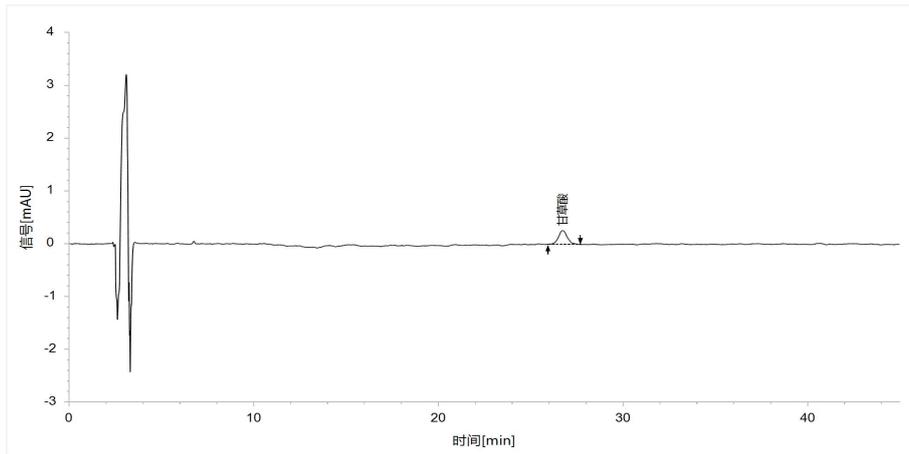


图 3 仪器灵敏度的色谱图

表 3 仪器灵敏度测试数据

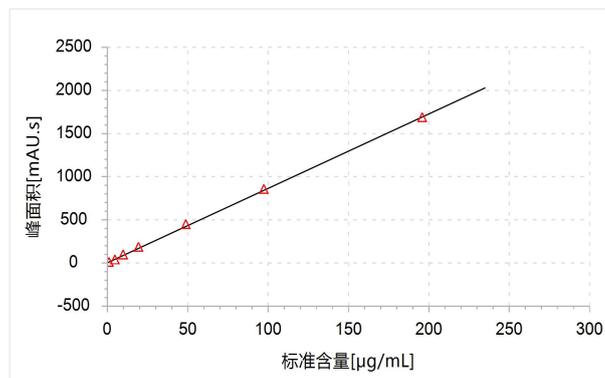
目标物	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	峰高 (mAU)	噪声 (mAU)	S/N	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
甘草酸	0.98	0.272	0.012	22.7	0.130	0.432

由表 3 中数据可知,甘草酸的仪器检出限为 $0.130 \mu\text{g/mL}$,仪器定量限为 $0.432 \mu\text{g/mL}$ 。

4.3 含量测定

4.3.1 校准曲线绘制

按照色谱条件 (3.5), 将甘草酸系列标准工作液 (3.2) 上机测定, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制校准曲线, 线性方程和确定系数如图 4 所示。



方程式	$y=8.62504*x+3.33400$
相关系数(R)	0.9999
确定系数(R ²)	0.9998

图 4 甘草酸的校准曲线

由图 4 可知, 甘草酸在 $0.98 \mu\text{g/mL} \sim 195.94 \mu\text{g/mL}$ 浓度范围内呈现良好的线性关系, 确定系数 $R^2 > 0.999$ 。

甘草酸系列标准工作液叠加的色谱图如图 5 所示。

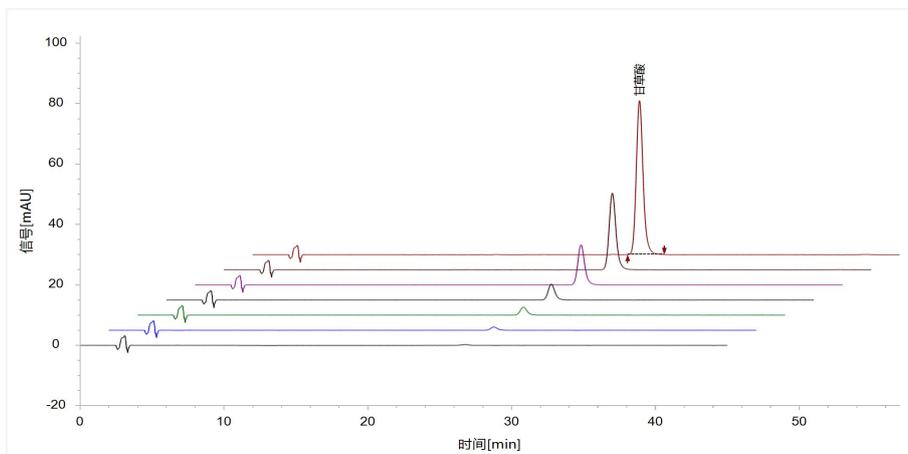


图 5 甘草酸系列标准工作液叠加的色谱图

4.3.2 试样含量测定

按照色谱条件（3.5），对空白溶液、供试品溶液（3.3）和供试品加标溶液（3.4）进行采集，依据公式（1）计算试样中甘草酸的含量。

$$\omega = \frac{C_1 \times V_1}{V_2 \times 1000} \quad \text{----公式（1）}$$

式中： ω ----为试样中甘草酸的含量，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

C_1 ----为通过校准曲线得到的供试品溶液中甘草酸的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

V_1 ----为试样的定容体积，单位为毫升（mL）；

V_2 ----为吸取的试样体积，单位为毫升（mL）；

1000----为单位换算系数。

试样中甘草酸的含量结果取 2 次测定的平均值，计算结果保留 3 位有效数字。

空白溶液、供试品溶液和供试品加标溶液的色谱图如图 6~图 8 所示。

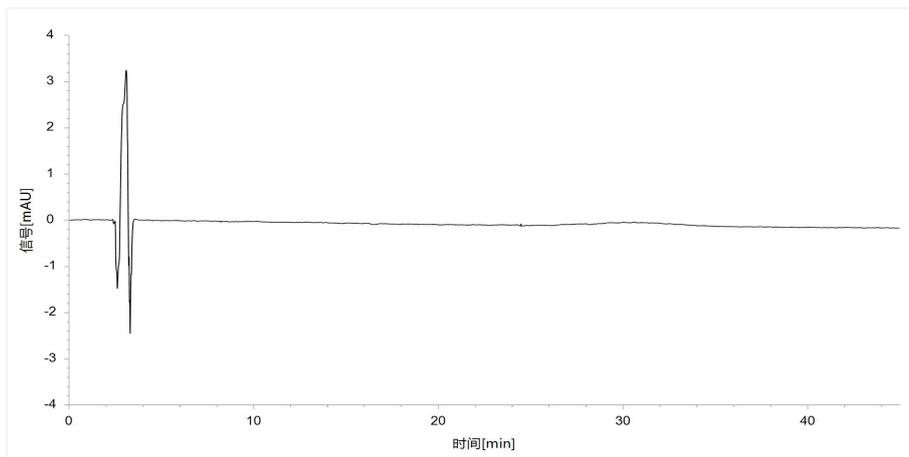


图 6 空白溶液的色谱图

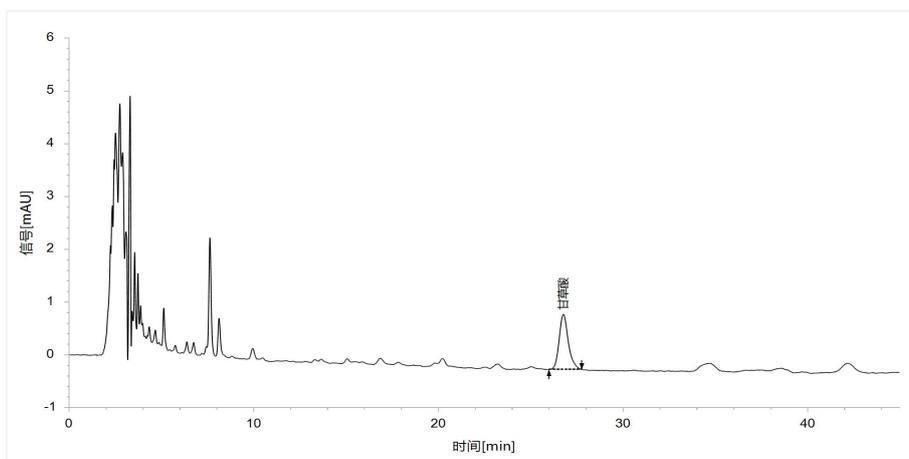


图 7 供试品溶液的色谱图

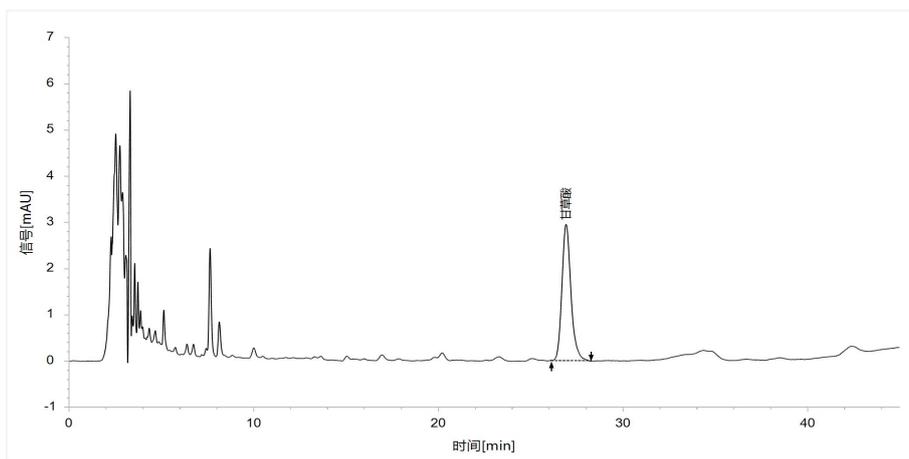


图 8 供试品加标溶液的色谱图

依据公式 (1) 进行计算, 市售藿香正气水试样中甘草酸的含量为 0.481 mg/mL, 满足《中国药典 (2025 年版)》中规定的藿香正气水每 1 mL 含甘草浸膏以甘草酸计, 不得少于 0.48 mg 的要求; 加标回收实验中, 甘草酸的加标回收率为 98.4 %。

5 结论

本文使用悟空 K2025 高效液相色谱仪测定藿香正气水中甘草浸膏的含量。本实验以乙腈和 0.1 %磷酸水溶液为流动相, 采用反相色谱法, 实验结果表明: 甘草酸峰的理论塔板数为 16062, 满足《中国药典(2025 年版)》中规定的理论塔板数按甘草酸峰计算不低于 5000 的要求; 对称因子为 1.16, 具有良好的峰形; 甘草酸标准溶液连续进样 7 针进行重复性测试, 保留时间的 RSD 为 0.12 %, 峰面积的 RSD 为 0.24 %, 具有良好的定性定量重复性; 灵敏度测试中, 甘草酸的仪器检出限为 0.130 $\mu\text{g/mL}$, 仪器定量限为 0.432 $\mu\text{g/mL}$; 甘草酸在 0.98 $\mu\text{g/mL}$ ~195.94 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内呈现良好的线性关系, 确定系数 $R^2 > 0.999$; 市售藿香正气水试样中甘草酸的含量为 0.481 mg/mL, 满足《中国药典(2025 年版)》中规定的藿香正气水每 1 mL 含甘草浸膏以甘草酸计, 不得少于 0.48 mg 的要求; 加标回收实验中, 甘草酸的加标回收率为 98.4 %。因此, 悟空 K2025 高效液相色谱仪可以满足《中国药典(2025 年版)》中对甘草浸膏含量测定的需求。

附 1: 仪器配置清单

序号	单元
K2025 二元高压梯度系统	
A)	<i>Pump Unit</i> 泵单元
1	62 MPa 二元高压输液泵 (内置溶剂托盘)
2	流动相瓶 (肖特瓶, 1 L)
3	脱气机
4	四通道溶剂选择阀
5	自动在线清洗系统
B)	<i>Sample Injector</i> 进样器
1	自动进样器
2	样品瓶 (2 mL, 含瓶盖)
3	脱气组件
4	100 μ L 定量环
C)	<i>Column Oven</i> 柱温箱
1	色谱柱恒温箱 (室温以下 10 $^{\circ}$ C 至 85 $^{\circ}$ C)
2	色谱柱: JinGuBang C ₁₈ , 4.6 \times 250 mm, 5 μ m
D)	<i>Detector</i> 检测器
1	紫外-可见光检测器
E)	<i>Workstation</i> 工作站
1	Wookinglab 色谱工作站 (00.03.59.00)

附 2: 悟空 Wooking K2025 高效液相色谱仪 (可靠、精准、友好、合规)



报告人: 杜秋玲

联系方式: 18513121622