

高效液相色谱法同时测定甘草中甘草酸和甘草苷的含量

崔淑芬^{1,2}, 张信青², 许柏球², 王小如^{1,3}

(1 厦门大学化学化工学院现代分析科学教育部重点实验室, 福建 厦门 361005;

2 深圳职业技术学院应用生物技术系, 广东 深圳 518055;

3 国家海洋局第一海洋研究所青岛现代分析技术及中药标准化重点实验室, 山东 青岛 266061)

摘要:目的 测定甘草中甘草酸和甘草苷的含量。方法 采用反相高效液相色谱法, DENALIC18 色谱柱 (VYDAC 238DE5415 120A, 5 μ m, 4.6 mm \times 150 mm), 梯度洗脱, 流动相 A: H₂O 流动相 B: 1.5% HAcmOH, 流速 1.0 ml \cdot min⁻¹, 检测波长在 32.2 min 从 330 nm 换为 252 nm, 从 35 min 换为 330 nm, 柱温 40 $^{\circ}$ C。结果 甘草苷的浓度在 10~50 μ g \cdot ml⁻¹ 之间与峰面积线性关系良好, 平均回收率为 99.97%, 方法精密度 RSD=0.12% (n=5), 甘草酸的浓度在 50~90 μ g \cdot ml⁻¹ 之间与峰面积线性关系良好, 平均回收率为 100.25%, 方法精密度 RSD=0.13% (n=5)。结论 该方法可用于甘草中甘草酸和甘草苷的同时含量测定。

关键词: 甘草; 甘草酸; 甘草苷; 高效液相色谱; 含量测定

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2006)03-0307-02

Determination of Glycyrrhizin and Licuridin in Licorice (*Glycyrrhiza*) by HPLC Method

CUI Shu-fen^{1,2}, ZHANG Xin-qing², XU Bai-qiu², WANG Xiao-ru^{1,3}

(1 The Key Laboratory of Analytical Science, Ministry of Education, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005 China 2 Department of Biological Applied Engineering, Shenzhen Polytechnic, Shenzhen, Guangdong 518055 China 3 Qingdao Key Lab of Analytical Technology Development and Standardization of Chinese Medicines, First Institute Oceanography of State Oceanic Administration, Qingdao, Shandong 266061, China)

Abstract Objective To determine the content of glycyrrhizin and licuridin in licorice (*Glycyrrhiza*). **Methods** RP HPLC method was established. The analytical column was DENALIC18 (VYDAC 238DE5415 120A, 5 μ m, 4.6 mm \times 150 mm), and gradient elution with A: H₂O B: 1.5% HAcmOH as mobile phase. The flow rate was 1.0 ml \cdot min⁻¹. The detection wavelength was from 330 nm to 252 nm at the 32.2 min, and then returned to 252 nm at the 35 min. The column temperature was 40 $^{\circ}$ C. **Results** The content of licuridin was good linear related to its peak area in range of 10~50 μ g \cdot ml⁻¹, and the average recovery of the method was 99.97%, the RSD of precision test was 0.12% (n=5). The content of glycyrrhizin was good linear related to its peak area in range of 50~90 μ g \cdot ml⁻¹, and the average recovery of the method was 100.25%, the RSD of precision test was 0.13% (n=5). **Conclusion** The method can be used for determining the content of glycyrrhizin and licuridin in licorice at the same time.

Key words Licorice; Glycyrrhizin; Licuridin; HPLC; Content assay

甘草系豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 胀果甘草 *Glycyrrhiza inflata* Ba. 或光果甘草 *Glycyrrhiza glabra* L. 的干燥根及根茎加工而成。始载于《神农本草经》, 素有“国老”之称, 是一味重要药材。甘草中的活性成分主要是皂苷类和黄酮类, 皂苷类的代表物质是甘草酸, 黄酮类的代表物质是甘草苷。应用高效液相法对于甘草中甘草苷和甘草酸的含量测定的报道很多^[1-3], 2000年版《中国药典》甘草含量测定项为 HPLC 法测定甘草酸的含量^[4], 2005年版《中国药典》增订了甘草苷的 HPLC 含量测定^[5]。但两种活性成分同时定量测定的研究尚未见报道。作者采用 DAD 检测器, 梯度洗脱, 检测波长变换等方法, 成功地得到了甘草酸和甘草苷的同时含量测定, 结果准确, 方法稳定。

1 仪器与试剂

Agilent 100 高效液相色谱仪, DAD 检测器, HP-A. 09. 01 化

学工作站 (美国 Agilent 公司); METTCEr AE100S 型电子天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司); Grant X14 超声振荡仪 (Grant instruments (Cambridge) Ltd); 低速大容量多管离心机 (上海安亭科学仪器厂); 滤膜 (美国 Millipore Corporation 孔径 0.45 μ m)。

对照品甘草酸单胺盐和甘草苷由厦门大学傅博强博士制备。色谱纯甲醇 (德国默克公司); 水为超纯水, 自制; 乙酸为分析纯。

甘草由中国亿利资源集团公司提供。经中国医学科学院药用植物研究所林寿全教授鉴定为正品甘草。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

2.1.1 甘草苷对照品溶液的制备 精密称取甘草苷对照品 10.0 mg 置 1 ml 容量瓶中, 加 50% 甲醇制成每毫升含 10.0 mg 的溶液, 即得。

2.1.2 甘草酸单胺盐对照品溶液的制备 精密称取甘草酸对照品 10.0 mg 置毫升容量瓶中, 加 50% 甲醇制成每毫升含 10.0 mg 的溶液, 即得。

2.2 样品供试液的制备 精密称取已过 60 目筛烘干至恒重的甘草粉末 0.1 g 置具塞三角瓶中, 用 50% 甲醇 10 ml 浸提 10 h 置超声仪中提取 30 min, 提取液离心 5 min (离心机转速 3 500 r/

收稿日期: 2005-10-08 修订日期: 2006-01-10

基金项目: 国家自然科学基金 2003 重点项目 (No. 20235020)

作者简介: 崔淑芬 (1969), 女 (汉族), 辽宁抚顺人, 现任深圳职业技术学院应用生物技术系副教授, 博士学位, 主要从事中草药及海洋药物研究工作。

min), 取上清液水浴蒸干, 用 50% 甲醇定容至 1 ml 过 0.45 μm 的微孔滤膜, 即得甘草样品供试液。

2.3 测定方法的建立 取甘草样品供试液 10 μl 进样, 色谱条件为: 二极管阵列检测器 (DAD), DENALI C18 反相色谱柱 (YDAC 238DE5415 120A, 5 μm, 4.6 mm × 150 mm), 流速 1 ml · min⁻¹, 柱温 40 °C, 流动相 A: H₂O, B: 1.5% HAc/MeOH。梯度洗脱: B相 0~23.5 min (保持 26.5%), 23.5~23.6 min (26.5%~69%), 23.6~40 min (保持 69%)。

检测波长在 32.2 min 从 330 nm 换为 252 nm, 35 min 换为 330 nm。理论塔板数按甘草酸单胺盐峰计算不低于 2000。图 1 是对照品的 HPLC 色谱图, 图 2 是样品的色谱图。

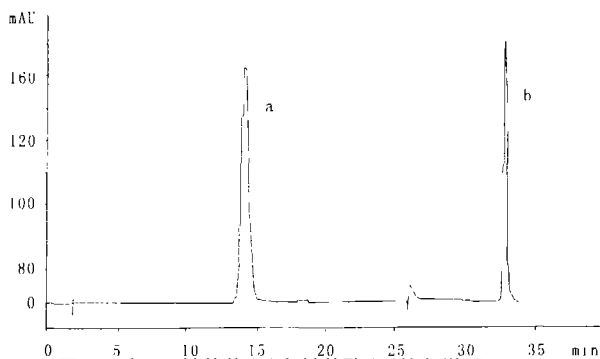


图 1 对照品甘草苷 (a) 和甘草酸 (b) 的色谱图

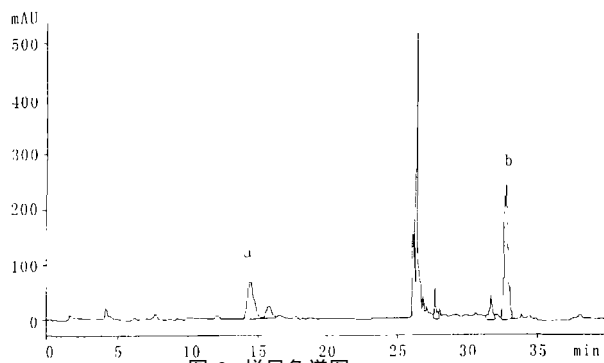


图 2 样品色谱图

2.4 线性关系的考察 精密吸取甘草苷对照品溶液 100.80, 60.40, 20 μl 置 5 个 0.5 ml 离心管中, 依次精密添加甘草酸对照品溶液 100, 120, 140, 160, 180 μl 摇匀即得 1~5 号混合对照品溶液。

精密吸取各浓度混合对照品溶液 10 μl 注入液相色谱仪, 按照“2.3”项下方法测定各浓度对照品峰面积, 得到甘草苷回归方程 $Y = 1.0343592X + 10.8054$, $r^2 = 0.9999$ 。结果表明甘草苷进样量在 10~50 μg 范围内线性关系良好; 甘草酸回归方程 $Y = 762.8798X - 14.0115$, $r^2 = 0.9999$ 。结果表明甘草酸进样量在 50~90 μg 范围内线性关系良好。

2.5 精密度实验 精密吸取 3 号混合对照品溶液 10 μl 注入高效液相色谱仪, 连续进样 5 次, 结果甘草苷平均峰面积 $RSD = 0.12\%$; 甘草酸单胺盐平均峰面积为 $RSD = 0.13\%$ 。结果表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性实验 取甘草供试液每隔 4 h 进样 1 次, 测定结果甘草苷峰面积 $RSD = 0.74\%$; 甘草酸单胺盐峰面积 $RSD = 0.45\%$ 。结果表明样品 24 h 内测定稳定。

2.7 重现性实验 取甘草样品五份, 按“2.2”项下供试品液的制

备方法, 制备样品, 按“2.3”项下方法测定, 测定结果甘草苷含量平均为 18.984 mg · ml⁻¹, $RSD = 0.58\%$; 甘草酸含量平均为 55.314 mg · ml⁻¹, $RSD = 0.49\%$ 。表明此方法重现性良好。

2.8 加样回收实验 取甘草样品五份, 各 0.05 g 精密称定, 分别精密加入甘草苷和甘草酸单胺盐的对照品溶液 (10 mg · ml⁻¹) 各 100 μl 再各精密加 50% 甲醇 9.90 ml 按“2.2”项下供试品液的制备方法制备样品, 测定, 结果见表 1 测得甘草苷的平均回收率为 99.97%, $RSD = 0.88\%$; 甘草酸的平均回收率为 100.25%, $RSD = 1.32\%$ 。结果表明方法准确可靠。

2.9 样品含量测定 取 10 批梁外滩地产乙级甘草药材, 按照 2.2 项下方法制备, 按 2.3 项下方法测定。结果见表 1 表明甘草药材的质量较稳定。

表 1 样品含量测定结果 mg · ml⁻¹

批号	甘草苷含量	甘草酸含量
040701	18.99	55.28
040702	18.85	55.20
040703	18.97	55.27
040704	19.23	55.45
040705	19.43	55.70
040706	18.78	55.19
040707	19.03	55.36
040708	18.42	55.05
040709	19.20	55.50
040710	19.02	55.31
RSD (%)	1.45	0.33

n = 10

3 讨论

3.1 预实验表明, 用 50% 的甲醇提取, 其提取效率要优于 100% 的甲醇; 当供试品的溶剂有机相浓度过高的时候, HPLC 色谱图前面出的峰有前伸现象; 样品冷浸后提取效率明显优于不经冷浸的; 样品在超声提取 30 min 后提取效率基本不变。故选择样品用 50% MeOH 提取、定容, 冷浸 10 h 超声提取 30 min。

3.2 在优选 HPLC 分析条件时发现, 甘草苷峰在酸性较高的情况下无法达到基线分离, 与后面的小峰重叠; 而甘草酸单胺盐峰必须在酸性较高的情况下才达到基线分离, 曾尝试不同的酸浓度、流速、以及梯度。最后将 1.5% 的乙酸加在 MeOH 中, 应用梯度洗脱的方式使二者同时达到分离, 效果良好。

3.3 黄酮类成分在 252 nm 和 330 nm 都有较高的吸收, 而皂苷类成分只在 252 nm 有较强的吸收, 当选择 252 nm 的时候, 由于有机相比例迅速升高引起的其他皂苷类成分对甘草酸干扰严重, 基线漂移, 所以, 选择变换检测波长的方式, 使二者的测定准确、无干扰。

3.4 在对照品色谱图上可以发现 22 min 左右有一个凸起, 这是由于梯度陡度较高, 有机相变化较大, 流动相混合所产生的气泡, 但并不影响主要物质的定量。

参考文献:

[1] 王征, 夏宇欣. HPLC 测定脑乐静中甘草酸铵的含量 [J]. 基层中药杂志, 2001, 15(2): 11.
 [2] 吕归宝, 刘军. HPLC 法测定甘草及其制剂中甘草酸的含量 [J]. 药物分析杂志, 1998, 8(3): 137.
 [3] 赵晓莉, 崔小兵, 吴皓, 等. HPLC 双波长法测定复方甘草合剂中甘草苷、甘草素及异甘草素的含量 [J]. 中成药, 2002, 24(3): 175.
 [4] 国家药典委员会. 中国药典, I 部 [S]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 66.
 [5] 国家药典委员会. 中国药典, I 部 [S]. 北京: 化学工业出版社, 2005.