

# RP-HPLC 法测定甘草中甘草苷和异甘草苷的含量

付玉杰, 祖元刚\*, 赵春建, 李春英\*

(东北林业大学森林植物生态学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040)

甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch、胀果甘草 *G. inflata* Bat 或光果甘草 *G. labra* L. 的干燥根及根茎, 具有清热解毒、止咳祛痰、补脾和胃、调和诸药的功效, 历代本草皆视其为重要药物<sup>[1]</sup>。甘草苷和异甘草苷是甘草中的两个重要黄酮类化合物, 药效显著<sup>[2]</sup>, 具有抗溃疡、抗艾滋病病毒等作用<sup>[3,4]</sup>。甘草苷或异甘草苷的含量测定方法已有文献报道<sup>[5-7]</sup>, 但两种活性成分同时用 HPLC 方法的测定未见报道。本实验以 RP-HPLC 同时测定甘草中的甘草苷和异甘草苷的含量。结果表明, 甘草苷和异甘草苷在同一色谱条件下均得到较好分离, 并可进行含量测定。

## 1 仪器与材料

日本 Jasco 高效液相色谱仪, 1580 泵, 1575 型紫外检测器, Version 6.1 色谱工作站。甲醇, 色谱纯(山东禹王实业有限公司禹城化工厂); 冰醋酸, 分析纯(哈尔滨市新春化学试剂厂); 甘草苷(98%)、异甘草苷(98%) 对照品(美国 Acros Organics 公司); 甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch 分别采自黑龙江省肇东市爱民乡、内蒙古敖汉旗下洼镇、新疆石河子市沙湾县金沟河乡, 由东北林业大学森林植物生态学教育部重点实验室聂绍荃教授鉴定。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 C<sub>18</sub> ODS 不锈钢色谱柱(25 mm × 4.6 mm, 5 μm, HPLC Technology Ltd 日本); 检测波长: λ = 254 nm; 流动相: 甲醇-0.3% HOAc (1 : 2); 柱温: 室温; 流速: 1.0 mL/min; 进样量为 10 μL。

在该色谱条件下, 甘草苷的保留时间为 11.400 min, 异甘草苷的保留时间为 47.283 min, 甘草苷、异甘草苷对照品及甘草生药样品色谱图见图 1。

### 2.2 分析样品制备方法的选择

2.2.1 超声法: 将甘草生药烘干粉碎(过 60 目筛)

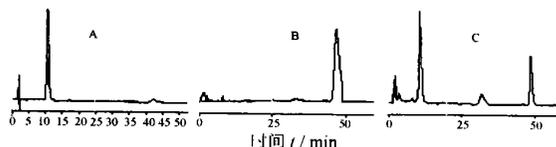


图 1 甘草苷对照品(A)、异甘草苷对照品(B)和甘草样品(C)的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of licoritin (A), isoliquiritin (B), and *G. uralensis* sample (C)

成末, 称取 0.5 g, 加 20 倍量无水甲醇, 超声提取 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 min, 离心、分离提取液, 定容至 25 mL。准确吸取供试品溶液 10 μL 进样, RP-HPLC 分析, 测定甘草苷和异甘草苷浓度, 计算提取率。

2.2.2 索氏提取法: 将甘草生药烘干粉碎(过 60 目筛)成末, 称取 1.5 g, 加 10 倍量无水甲醇, 索氏提取 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480, 540 min, 将提取液定容至 100 mL。准确吸取供试品溶液 10 μL 进样, RP-HPLC 分析, 测定甘草苷和异甘草苷浓度, 计算提取率。

2.2.3 回流提取法: 将甘草生药烘干粉碎成末, 称取 180 g, 加 10 倍量无水甲醇, 回流提取 30, 60, 90, 120, 150, 180 min。准确吸取供试品溶液 10 μL 进样, RP-HPLC 分析, 测定甘草苷和异甘草苷浓度, 计算提取率。

结果表明, 超声提取、索氏提取、回流提取对甘草苷和异甘草苷的提取率分别在 50, 420, 120 min 时达到最大值, 分析结果见表 1。

表 1 可见, 对于甘草苷来说, 超声提取比索氏提取和回流提取的提取率高; 对于异甘草苷来说, 索氏提取比超声提取和回流提取的提取率高, 但索氏提取与超声提取的测定结果无显著性差异。超声提取操作简便易行, 时间短, 故样品制备方法确定为无水甲醇超声提取 50 min。

\* 收稿日期: 2003-08-29

基金项目: 科技部中德政府间合作项目(CHN 03/028); 哈尔滨市科技攻关计划项目(2003AA 3CS112)

作者简介: 付玉杰(1967—), 女, 黑龙江哈尔滨市人, 副教授, 1992 年毕业于东北师范大学化学系有机合成专业, 获理学硕士学位, 后在哈尔滨医药股份有限公司技术中心从事新药研发工作, 2002 年毕业于东北林业大学植物学专业, 获理学博士学位, 现为德国海德堡大学药学院博士后, 现主要从事植物天然活性成分的筛选和植物药的研发工作, 发表学术论文 20 余篇。

Tel: (0451) 82190535

\* 通讯作者 Tel: (0451) 82191517 Fax: (0451) 82102082 E-mail: zygorl@public.hr.hl.cn

表 1 不同提取方法甘草苷和异甘草苷的测定结果 (n= 3)

Table 1 Analysis of liquiritin and isoliquiritin by different extraction methods (n= 3)

提取方法	提取时间/min	甘草苷提取率/%	异甘草苷提取率/%
超声提取	50	2.28	1.32
索氏提取	420	2.14	1.36
回流提取	120	2.02	1.08

表 2 不同产地甘草中甘草苷和异甘草苷的含量测定 (n= 3)

Table 2 Determination of liquiritin and isoliquiritin in *G. uralensis* from different habitats (n= 3)

产地	甘草苷含量/%	异甘草苷含量/%
黑龙江	2.28	1.32
内蒙古	2.05	1.08
新疆	1.45	0.77

2.3 标准工作曲线的制备: 分别精密称取甘草苷和异甘草苷对照品各 1.00 mg 置于 1 mL Doff 管中, 用无水甲醇稀释至刻度摇匀, 使之成为浓度 1 mg/mL 的对照品储备液。分别精密吸取甘草苷和异甘草苷 1 mg/mL 对照品储备液 20, 40, 80, 160, 320  $\mu$ L 置于 1 mL Doff 管中, 以无水甲醇稀释至 1 mL, 摇匀, 配制成浓度为 20, 40, 80, 160, 320  $\mu$ g/mL 的对照品溶液。以选定的色谱条件测定峰面积, 进行 RP-HPLC 分析。实验表明甘草苷和异甘草苷的浓度(X)与峰面积(Y)呈线性关系, 以 Y 为纵坐标, X 为横坐标, 绘制标准曲线。甘草苷的回归方程为:  $Y = (X - 71930) \times 10^{-6} / 7, r^2 = 0.9851$ ; 异甘草苷的回归方程为:  $Y = (X - 66499) \times 10^{-6} / 7, r^2 = 0.9983$ 。结果表明: 甘草苷和异甘草苷均在 20~ 320  $\mu$ g/mL 线性关系良好。

2.4 稳定性试验: 取同一份供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 8, 24, 32, 48 h 进样测定, 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定, 甘草苷峰面积的 RSD 为 1.51%, 异甘草苷峰面积 RSD 为 2.04%。

2.5 精密度试验: 取同一批次的甘草生药的提取液, 按选定的色谱条件测定, 结果甘草苷 RSD 为 1.13%; 异甘草苷 RSD 为 1.98% (n= 3)。

2.6 重现性试验: 取同一批次的甘草生药, 按超声提取 50 min 制备样品, 按选定的色谱条件测定, 结果甘草苷 RSD 为 0.89%; 异甘草苷 RSD 为 1.60% (n= 3)。

2.7 回收率试验: 精密称取已知含量的甘草生药样品 3 份, 加入一定量的甘草苷和异甘草苷对照品, 按超声提取 50 min 方法制成供试液后, 按选定的色谱条件测定甘草苷和异甘草苷的含量, 计算回收率。甘草苷的平均回收率为 99.60%, RSD 为 1.20% (n= 3), 异甘草苷的平均回收率为 98.67%, RSD 为 2.10% (n= 3)。

2.8 样品测定: 精密称取 3 个产地的甘草生药样品, 按超声提取 50 min 制备供试品, 并按选定的色谱条件, 每个样品测定 3 次, 取平均值, 计算出甘草苷和异甘草苷的含量, 结果见表 2。

### 3 讨论

3.1 本实验对不同产地的甘草生药进行了考察, 结果表明, 不同产地的甘草中甘草苷和异甘草苷的含量差别很大, 其中黑龙江产的甘草苷和异甘草苷的含量最高。这可能是因为甘草生药受生长环境、生长时间及加工条件等因素的影响。

3.2 本实验对不同的样品制备方法(索氏提取、回流提取、超声提取)进行了考察, 对甘草苷来说, 超声提取比索氏提取和回流提取的提取率高; 对异甘草苷来说, 索氏提取比超声提取和回流提取的提取率高, 但索氏提取与超声提取的测定结果无显著性差异。同时超声提取时间短, 操作简便易行, 故样品制备方法确定超声提取, 提取时间以 50 min 为宜。

3.3 为了考察流动相对色谱行为的影响, 曾选用不同比例的甲醇-0.3% HOAc 为流动相。由于甘草生药提取液中与甘草苷和异甘草苷相近保留时间的物质较多, 为了达到基线分离的目的, 必须延长保留时间, 减小流动相中甲醇的量。最后选用甲醇-0.3% HOAc (1:2) 为流动相, 甘草苷和异甘草苷均得到较好分离, 两成分互不干扰而且甘草中的其他成分对甘草苷和异甘草苷的测定基本不形成干扰。

3.4 本实验所建立的 RP-HPLC 测定甘草中甘草苷和异甘草苷的定量方法, 为甘草的质量控制提供了科学、有效的检测手段。

### References

- [1] Fu K Z. *From Wildness to Domestic Plant of Chinese Licorice* (甘草野生变家植) [M]. Harbin: Northeast Forestry University Publishing House, 1989.
- [2] Chai T C Y. Chemical constituent of *Glycyrrhiza* [J]. *Metabolization* (代谢), 1973, 10(5): 619.
- [3] Zhang J, Yao J, Ding L, et al. Advancement of research on the utilization of *Glycyrrhiza* [J]. *Grassland Turf* (草原与草坪), 2000, 89(2): 12-17.
- [4] Liu Q, Liu Y L. Study survey of flavonoids in *Glycyrrhiza* [J]. *J Chin Pharm* (中国药学杂志), 1989, 24: 705.
- [5] Gao S L, Wang X M. Extraction and determination of triterpene and flavonoid constituents isolated from *Glycyrrhiza* [J]. *J Anhui Univ-Nat Sci Edition* (安徽大学学报·自然科学版), 2000, 24(4): 70-74.
- [6] Wang X Q. Determination of isoliquiritin in *Glycyrrhiza* by TLC densitometry [J]. *Northeast Pharm J* (西北药学杂志), 1990, 5(1): 25-27.
- [7] Li M. Study survey of *Glycyrrhiza* [J]. *J Gansu Coll Tradit Chin Med* (甘肃中医学院学报), 2000, (17): 359-363.