

HPLC同时测定甘蒲祛斑凝胶中甘草素、 异甘草素、甘草查尔酮A的含量

左婷¹, 翁立冬¹, 刘莉¹, 张璐¹, 乡世健¹, 洪军辉¹, 刘强¹, 朱红霞^{2*}

(1. 南方医科大学中医药学院, 广州 510515; 2. 南方医科大学中西医结合医院, 广州 510315)

[摘要] 目的:建立同时测定甘蒲祛斑凝胶中甘草素、异甘草素、甘草查尔酮A含量的方法。方法:采用高效液相色谱法, Agilent HC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相0.05%磷酸水(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~4 min, 80% A; 4~18 min, 80%~65% A; 18~22 min, 65%~62% A; 22~25 min, 62% A, 25~30 min, 62%~55% A; 30~35 min, 55% A, 35~45 min, 55%~50% A; 45~50 min, 50%~55% A; 50~60 min, 55%~80% A), 柱温30℃, 流速0.8 mL·min⁻¹, 检测波长276, 368 nm。结果:甘草素、异甘草素、甘草查尔酮A的线性范围分别为0.050 4~0.403 2 ($r=1$), 0.039 4~0.315 2 ($r=1$), 1.638~8.192 μg ($r=0.999 9$); 甘草素平均回收率为98.81%, RSD 1.7%; 异甘草素平均回收率为99.16%, RSD 1.2%; 甘草查尔酮A平均回收率为97.68%, RSD 1.0%。结论:该方法简便、灵敏度高、专属性强, 可用于甘蒲祛斑凝胶中3种指标性成分的含量测定。

[关键词] 甘蒲祛斑凝胶; 甘草素; 异甘草素; 甘草查尔酮A

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)08-0073-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015080073

Simultaneous Determination of Liquiritigenin, Isoliquiritigenin and Licochalcone A in Ganpuquban Gel by HPLC ZUO Ting¹, WENG Li-dong¹, LIU Li¹, ZHANG Lu¹, XIANG Shi-jian¹, HONG Jun-hui¹, LIU Qiang¹, ZHU Hong-xia^{2*} (1. College of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Combining Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510315, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for simultaneous determination of liquiritigenin, isoliquiritigenin and licochalcone A in Ganpuquban gel. **Method:** HPLC was applied on an Agilent HC-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column by a gradient elution using (A) 0.05% phosphoric acid and (B) acetonitrile as the mobile phase (0-4 min, 80% A; 4-18 min, 80%-65% A; 18-22 min, 65%-62% A; 22-25 min, 62% A, 25-30 min, 62%-55% A; 30-35 min, 55% A, 35-45 min, 55%-50% A; 45-50 min, 50%-55% A; 50-60 min, 55%-80% A). Detection wavelengths were set at 276, 368 nm. The flow rate was 0.8 mL·min⁻¹, the column temperature was maintained at 30℃. **Result:** The linear ranges of liquiritigenin, isoliquiritigenin and licochalcone A were 0.050 4-0.403 2 μg ($r=1$), 0.039 4-0.315 2 μg ($r=1$), 1.638-8.192 μg ($r=0.999 9$). The average recoveries were 98.81% with RSD 1.7%, 99.16% with RSD 1.2% and 97.68% with RSD 1.0%, respectively.

Conclusion: The established method is easy, accurate with high specificity, which can be used to determine the three components in Ganpuquban gel.

[Key words] Ganpuquban gel; liquiritigenin; isoliquiritigenin; licochalcone A

甘蒲祛斑凝胶是南方医科大学中医药学院的自主研发剂, 处方由甘草黄酮、桑叶提取物、蒲公英提取

[收稿日期] 20140815(001)

[基金项目] 广州市白云区科技计划重点项目(2011-KQ-23); 广东省科技计划重点项目(2011A030100006); 广东省高校中药化妆品工程中心建设项目(GCZX-A1007); 广州市白云区科技计划项目(2012-KZ-28)

[第一作者] 左婷, 在读硕士, 从事中药药剂学研究, Tel:15521289550, E-mail: jclala7@qq.com

[通讯作者] *朱红霞, 本科, 主治医师, 从事儿科临床及用药研究, Tel:13189091970, E-mail: gzlq2002@163.com

物等组成,用于治疗雀斑、晒斑、黄褐斑及外伤、痤疮自愈后遗留下的色素沉着等。其中甘草黄酮是该凝胶中的主要功效成分。药理研究表明^[1-7],甘草黄酮外用能抑制酪氨酸酶的活性,清除氧自由基,具有抗炎、抗变态反应的作用,还能抑制毛细血管通透性,改善敏感肤质。因此,基于大量的甘草黄酮研究成果,研制甘蒲祛斑凝胶在一定程度上弥补了其外用成方制剂的不足。为了更好地控制甘蒲祛斑凝胶的质量,实验选择以甘草黄酮中甘草素、异甘草素、甘草查尔酮 A 作为该凝胶的 3 种指标性成分并建立了同时测定上述 3 种成分含量的方法。

1 材料

1.1 仪器 1260 系列高效液相色谱仪,包括 G1311B 泵, G4212B 紫外检测器, G1329B 自动进样器(美国 Agilent 公司); BP110S 型电子天平(德国 Sartorius 公司), CP225D 型电子天平(上海佑科仪器仪表有限公司)。

1.2 试剂 甘草素(批号 111062-091205)、异甘草素(批号 1380-080816)、甘草查尔酮 A(批号 1198-101018)对照品,均购于中药固体制剂制造技术国家工程研究中心,供含量测定用;乙腈为色谱纯(德国默克公司),水为双蒸馏水;乙醇、磷酸、甲醇均为分析纯。甘蒲祛斑凝胶(自制,批号 20140715, 20140716, 20140717)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent HC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 0.05% 磷酸水(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~4 min, 80% A; 4~18 min, 80%~65% A; 18~22 min, 65%~62% A; 22~25 min, 62% A, 25~30 min, 62%~55% A; 30~35 min, 55% A, 35~45 min, 55%~50% A; 45~50 min, 50%~55% A; 50~60 min, 55%~80% A), 柱温 30 °C, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 双波长检测(0~22 min, 276 nm; 22~60 min, 368 nm), 进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备

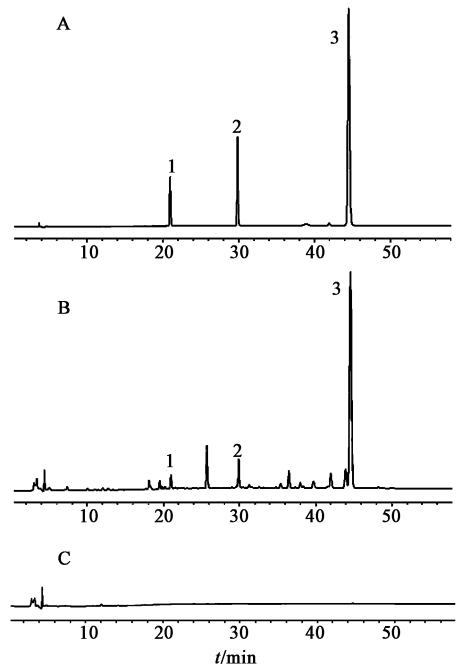
2.2.1 混合对照品溶液 精密称取甘草素、异甘草素、甘草查尔酮 A 对照品适量,加 70% 乙醇制成每 1 mL 含甘草素 5.04 μg, 异甘草素 3.94 μg, 甘草查尔酮 A 81.92 μg 的混合对照品溶液,保存于 4 °C 冰箱中,备用。

2.2.2 供试品溶液 取甘蒲祛斑凝胶 5.0 g, 精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL, 密塞,称定质量,超声处理(功率 100 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放置室温后称定质量,用甲醇补足减失的质量,

滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性样品溶液 按甘蒲祛斑凝胶的制备工艺,制备缺甘草的阴性供试品,按 2.2.2 项下方法制备,即得。

2.3 专属性试验 吸取空白对照溶液、混合对照品溶液、供试品溶液与阴性样品溶液各 10 μL, 注入高效液相色谱仪,记录色谱图,结果表明阴性样品无干扰。见图 1。



A. 混合对照品; B. 供试品; C. 阴性样品; 1. 甘草素; 2. 异甘草素; 3. 甘草查尔酮 A

图 1 甘蒲祛斑凝胶 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatogram of Ganpuquban gel

2.4 线性关系考察 取 2.2.1 项下的混合对照品溶液,精密吸取 1, 2, 4, 6, 8, 10 mL 加甲醇定容至 10 mL, 分别注入上述对照品溶液 10 μL, 按 2.1 项下方法测定甘草素、异甘草素、甘草查尔酮 A 的峰面积。以各成分的峰面积为纵坐标,进样量(μg)为横坐标,绘制标准曲线,得到回归方程。见表 1。

表 1 线性关系考察

Table 1 Linear relation test

成分	回归方程	r	线性范围/μg
甘草素	$Y = 2\,218.7X + 0.52$	1	0.050 4 ~ 0.403 2
异甘草素	$Y = 4\,520.8X + 1.83$	1	0.039 4 ~ 0.315 2
甘草查尔酮 A	$Y = 2\,083.7X - 116.58$	0.999 9	1.638 ~ 8.192

2.5 精密度试验 精密吸取同一供试品(批号 20140715)溶液,连续进样 6 次,测定甘草素、异甘草

素、甘草查尔酮 A 的峰面积。结果供试品溶液中上述 3 种成分峰面积的 RSD 均为 0.2%, 表明仪器的精密度良好。

2.6 稳定性试验 取甘蒲祛斑凝胶(批号 20140715), 精密称取 5.0 g, 置 50 mL 量瓶内, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 精密吸取 10 μ L 注入高效液相色谱仪, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 测定, 记录峰面积, 甘草素、异甘草素、甘草查尔酮 A 含量的 RSD 分别为 0.3%, 0.5%, 0.3%, 表明样品在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取甘蒲祛斑凝胶(批号 20140715), 精密称取 5.0 g, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 平行 6 份, 分别进样测定。结果显示该凝胶中, 甘草素、异甘草素、甘草查尔酮 A 的平均含量分别为 0.197 1, 0.183 3, 5.203 2 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 分别为 0.8%, 0.6%, 0.5%, 表明该方法的重复性良好。

2.8 加样回收试验 取甘蒲祛斑凝胶(含甘草素、异甘草素、甘草查尔酮 A 分别为 0.186 8, 0.179 9, 5.281 7 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) 2.5 g, 共 6 份, 精密称定, 分别精密加入对照品溶液适量, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下含量测定方法测定, 计算加样回收率。结果见表 2。

表 2 甘蒲祛斑凝胶中 3 种成分加样回收率试验

Table 2 Recovery test of three components in Ganpuquban gel

成分	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	平均回 收率/%	RSD /%
甘草素	0.481 6	0.478 8	0.934 0	98.81	1.7
	0.485 9	0.478 8	0.980 4		
	0.467 1	0.478 8	0.944 2		
	0.473 0	0.478 8	0.939 4		
	0.473 8	0.478 8	0.937 4		
	0.468 0	0.478 8	0.918 8		
异甘草素	0.463 8	0.453 1	0.900 5	99.16	1.2
	0.468 0	0.453 1	0.915 2		
	0.449 9	0.453 1	0.892 8		
	0.455 5	0.453 1	0.911 5		
	0.456 3	0.453 1	0.914 9		
	0.450 7	0.453 1	0.882 3		
甘草查尔酮 A	13.62	13.52	26.50	97.68	1.0
	13.74	13.52	26.84		
	13.21	13.52	25.94		
	13.37	13.52	26.65		
	13.40	13.52	26.20		
	13.23	13.52	25.80		

2.9 样品测定 取 3 批甘蒲祛斑凝胶(批号 20140715, 20140716, 20140717), 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按照 2.1 项下方法测定甘草素、异甘草素、甘草查尔酮 A 的含量。结果见表 3。

表 3 甘蒲祛斑凝胶样品中 3 种成分含量测定 (n=3)

Table 3 Content determination of three components in Ganpuquban gel (n=3)

批号	甘草素	异甘草素	甘草查尔酮 A
20140715	0.182 6	0.175 5	5.200
20140716	0.189 1	0.183 6	5.214
20140717	0.198 3	0.189 5	5.209

3 讨论

3.1 提取条件的选择^[8-10] 由于甘蒲祛斑凝胶的基质有一定的黏附性, 在制备供试品时方法尤为重要, 实验分别用蒸馏水、70% 乙醇、甲醇对甘蒲祛斑凝胶中的待测成分进行提取, 结果以甲醇超声提取为优。

3.2 色谱条件的选择

3.2.1 流动相的选择^[11-15] 实验分别采用乙腈-0.05% 磷酸水溶液, 乙腈-0.04% 甲酸水溶液, 乙腈-0.1% 甲酸水溶液, 甲醇-0.1% 甲酸水溶液等流动相系统对甘蒲祛斑凝胶供试品溶液中的待测指标成分进行了考察。实验结果表明, 采用乙腈-0.05% 磷酸水溶液流动相系统时, 所得色谱中杂峰较少, 分离度较好, 阴性无干扰。因此, 确定流动相系统为乙腈-0.05% 磷酸水溶液。

3.2.2 检测波长的选择^[16-17] 对甘草素、异甘草素、甘草查尔酮 A 对照品分别进行 DAD 全波长扫描, 结果表明, 甘草素的吸收最大吸收波长在 275 nm, 在 368 nm 附近没有吸收, 而异甘草素和甘草查尔酮 A 则是在 368 nm 处有最大吸收, 在 275 nm 附近吸收很小。因此确定检测波长为 0 ~ 22 min, 276 nm; 22 ~ 60 min, 368 nm。

3.2.3 柱温的选择 柱温对色谱峰也有一定的影响, 实验考察了柱温分别为 20, 25, 30, 35 $^{\circ}\text{C}$ 时系统对供试品指标性成分分离效果的影响, 结果表明 30 $^{\circ}\text{C}$ 时, 基线稳定, 出峰时间适宜, 色谱分离度较好, 因此选择柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

3.3 小结 实验以甘蒲祛斑凝胶中甘草素、异甘草素、甘草查尔酮 A 的含量为指标, 通过高效液相色谱法建立了同时测定以上 3 种成分的含量测定方法, 经系统适应性试验和方法学考察, 证明该方法简便、重复性好、专属性高, 可用于甘蒲祛斑凝胶的质

量控制。

[参考文献]

- [1] 赵明春,贾绍华. 甘草黄酮的研究进展[C]. 天津: 2010年中国药学会暨第十届中国药师周大会论文集, 2010:1-4.
- [2] 叶怀义,龚赋岚,尚明,等. 甘草黄酮抗衰老作用的研究[J]. 哈尔滨商业大学学报:自然科学版, 2004, 20(1):93-94,97.
- [3] 赵雅欣,高文远,张连学,等. 甘草在化妆品中的应用[J]. 香料香精化妆品, 2010(4):45-48.
- [4] 刘洋,金玉姬,吴湘军,等. 甘草黄酮的研究现状及进展[J]. 吉林医药学院学报, 2014(2):135-139.
- [5] 季宇彬,姜薇,范玉玲,等. 甘草黄酮的研究进展[J]. 中草药, 2004, 35(9):1081-1082.
- [6] 韩雅慧,陶宁萍. 甘草黄酮提取及其抗氧化能力测定方法研究进展[J]. 山西农业科学, 2010, 38(11):89-93.
- [7] 马晶波,冯树芳,李锋,等. 甘草黄酮 B1 黑色素瘤细胞代谢的影响[J]. 复旦学报:医学版, 2003, 30(4):353-355.
- [8] 朱如彩,周作的. 复方苦参凝胶的质量标准研究[J]. 中医药导报, 2006, 12(6):85-87.
- [9] 刘月环,杜守颖,陆洋,等. 宣痹凝胶贴膏剂中龙胆苦苷、柚皮苷、原苏木素 B 含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9):72-74.
- [10] 杨珺,王世岭,郭晓华,等. HPLC 测定复方苦参凝胶剂中苦参碱与辣椒碱的含量[J]. 中国药师, 2005, 8(8):633-635.
- [11] 崔永明. 甘草黄酮的分离鉴定、药效及其指纹图谱研究[D]. 武汉:华中科技大学, 2008.
- [12] 卓越,王新春,甘永祥,等. 高效液相色谱法测定甘草中4种黄酮类化合物[J]. 中成药, 2010, 32(4):697-698.
- [13] Li H, Chen B T, Li L, et al. Simultaneous determination of six compounds in licorice and related Chinese Herbal preparations [J]. Chromatographia, 2009, 69:229-235.
- [14] 花汝凤,姚江雄,黎志坚,等. HPLC 同时测定夏桑菊颗粒中迷迭香酸与异迷迭香酸苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(24):75-77.
- [15] 谢娟平,孙文基. 梯度洗脱法同时快速分离测定不同品种不同部位淫羊藿中7种异戊烯基黄酮类成分的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(5):820-825.
- [16] 林冬杰. HPLC 双波长测定中药退黄外洗液中梔子苷、甘草苷、柚皮苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(8):74-76.
- [17] 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):175-178.

[责任编辑 顾雪竹]