

· 化学与分析 ·

“一测多评”法测定甘草中 6 种有效成分含量

刘香南¹, 李明珠¹, 尚晓娜¹, 宋平顺^{2*}, 赵建邦²

(1. 兰州大学药学院, 兰州 730000;

2. 甘肃省食品药品检验所, 甘肃省中药品质与安全评价工程技术研究中心, 兰州 730000)

[摘要] **目的:**采用“一测多评”法测定甘草中 6 种成分的含量。**方法:**采用 HPLC 测定甘草中 6 种成分的含量, 流动相乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~20 min, 90%~68% B; 20~45 min, 68%~30% B; 45~75 min, 30%~5% B), 检测波长(0 min, 275 nm; 32 min, 250 nm; 33.5 min, 300 nm; 34.5 min, 360 nm; 53 min, 280 nm; 55 min, 270 nm; 57.5 min, 265 nm)。以甘草酸为内标物, 测定与甘草苷、甘草素、异甘草素、甘草次酸、甘草查尔酮 A 的相对校正因子, 计算甘草中 6 种成分含量, 并比较“一测多评”法的计算值与外标法实测值的相似度。**结果:**“一测多评”法和外标法测得的甘草苷、甘草素、异甘草素、甘草查尔酮 A 及甘草次酸的含量相似度均为 0.999 9, “一测多评”法的计算值与外标法的实测值间无显著性差异。**结论:**建立的“一测多评”法适用于甘草中 6 种有效成分的含量测定, 相对校正因子可信。

[关键词] “一测多评”法; 高效液相色谱法; 甘草; 相对校正因子

[中图分类号] R284.1; R917 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0056-04

[doi] 10.11653/syjf2013240056

Determination of Six Active Ingredients in Gycyrrhizae Radix et Rhizoma by Quantitative Analysis of Multi-Components with a Single-Marker

LIU Xiang-nan¹, LI Ming-zhu¹, SHANG Xiao-na¹, SONG Ping-shun^{2*}, ZHAO Jian-bang²

(1. School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China;

2. Gansu Institute for Food and Drug Control, Gansu Engineering Technology Research Center for Quality and Safety Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish quantitative analysis of multi-components with a single-marker (QAMS) for determining contents of six ingredients from Gycyrrhizae Radix et Rhizoma. **Method:** Contents of six ingredients from Gycyrrhizae Radix et Rhizoma were determined by HPLC, mobile phase of acetonitrile (A) - 0.1% phosphoric acid solution (B) with a gradient elution program (0-20 min, 90%-68% B; 20-45 min, 68%-30% B; 45-75 min, 30%-5% B), detection wavelength (0 min, 275 nm; 32 min, 250 nm; 33.5 min, 300 nm; 34.5 min, 360 nm; 53 min, 280 nm; 55 min, 270 nm; 57.5 min, 265 nm). With glycyrrhizic acid as a internal standard, relative correlation factors (RCF) of liquiritin, liquiritiyenin, isoliquiritiyenin, glycyrrhetic acid and licochalcone A to glycyrrhizic acid were calculated, contents of these six ingredients were determined by the external standard method and QAMS, respectively. **Result:** These two methods did not show significant difference in assay results of contents of these six ingredients with similarity of 0.999 9. **Conclusion:** QAMS could be used for quality control of Gycyrrhizae Radix et Rhizoma.

[Key words] quantitative analysis of multi-components with a single-marker; HPLC; Gycyrrhizae Radix et Rhizoma; relative correlation factor

[收稿日期] 20130507(013)

[基金项目] “十一五”国家科技支撑计划项目(2009ZX09308-001); 甘肃省科技重大专项计划项目(1002KFDA048)

[第一作者] 刘香南, 在读硕士, 从事中药化学及质量标准研究, Tel: 13893302204, E-mail: liuxiangnan1988@163.com

[通讯作者] * 宋平顺, 主任药师, 从事中药化学及质量标准研究, Tel: 0931-4968943, E-mail: pingshunsong@163.com

“一测多评”是采用1个对照品来实现对多个成分的同时测定^[1],对于一些制备困难或价格昂贵的对照品具有实际应用价值^[2-4],如干姜中4种姜酚类成分的含量测定^[5],淫羊藿中朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C及淫羊藿苷的含量测定^[6],补骨脂中异补骨脂素、补骨脂甲素、补骨脂乙素的含量测定^[7]等。甘草含有黄酮类、三萜类、多糖等有效成分^[8],目前已有测定其所含2~5种化学成分含量的报道^[9-11]。本实验采用“一测多评”法,以甘草酸对照品为内标物,同时测定10批甘草药材中甘草苷、甘草素、异甘草素、甘草查尔酮A和甘草次酸5种成分的含量,并与外标法实测值进行比较,为甘草的含量测定提供一种可供选择的新方法。

1 材料

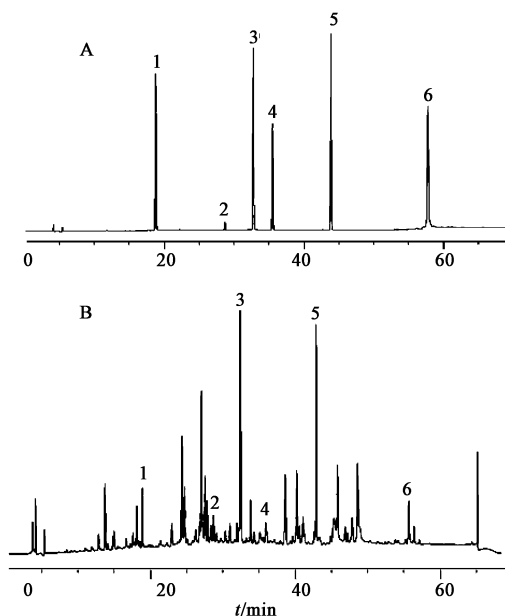
2487型高效液相色谱仪(美国Waters公司),1100系列高效液相系统(美国Agilent公司),AL-204型电子分析天平、AE240型1/10万电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。10批甘草药材(甘肃中药材公司,经甘肃省食品药品检验所宋平顺主任药师鉴定为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.的根或根茎),甘草苷、甘草酸铵、甘草次酸对照品(均购自中国食品药品检定研究院,批号分别为111610-201005,110731-200615,110723-200612),甘草素、异甘草素、甘草查尔酮A对照品(均由天津马克生物技术有限公司提供,批号依次为FB-31001,FB-31002,LG025,纯度均>98.5%),乙腈为色谱纯,水为重蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent XDB-C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~20 min, 90%~68% B; 20~45 min, 68%~30% B; 45~75 min, 30%~5% B),流速1.0 mL·min⁻¹,柱温室温,进样10 μL,检测波长(0 min, 275 nm; 32 min, 250 nm; 33.5 min, 300 nm; 34.5 min, 360 nm; 53 min, 280 nm; 55 min, 270 nm; 57.5 min, 265 nm),见图1。

2.2 对照品溶液的制备 依次精密称取甘草苷、甘草素、甘草酸铵、异甘草素、甘草查尔酮A和甘草次酸2.52, 3.10, 4.90, 3.83, 2.99, 4.23 mg,置于25 mL量瓶中,加70%乙醇定容至刻度,即得混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取甘草药材粉碎(过三号筛)约0.1 g,精密加入70%乙醇25 mL,称定质量,超声处理40 min,放冷,密塞,称定质量,用



A. 对照品; B. 供试品; 1. 甘草苷; 2. 甘草素; 3. 甘草酸铵; 4. 异甘草素; 5. 甘草查尔酮A; 6. 甘草次酸

图1 甘草样品 HPLC

70%乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,经0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 精密量取同一供试品溶液,按2.1项下色谱条件连续进样5次,结果甘草苷、甘草素、甘草酸铵、异甘草素、甘草查尔酮A和甘草次酸相对峰面积的RSD均<3.0%,表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 精密量取同一供试品溶液5份,按2.1项下色谱条件测定,结果甘草苷、甘草素、甘草酸铵、异甘草素、甘草查尔酮A和甘草次酸相对峰面积的RSD在0.31%~2.7%。

2.4.3 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别在0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 h进样,按2.1项下色谱条件测定,结果甘草苷、甘草素、甘草酸铵、异甘草素、甘草查尔酮A和甘草次酸峰面积的RSD在0.85%~3.4%,表明供试品溶液在18 h内基本稳定。

2.4.4 加样回收率试验 精密称取已知含量的同批样品0.1 g(甘草苷、甘草素、甘草酸铵、异甘草素、甘草查尔酮A、甘草次酸质量分数分别为0.162 9%, 0.036 1%, 3.302 1%, 0.049 8%, 0.763 3%, 0.067 3%),共5份,按6种成分的含量精密加入各对照品,按2.3项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件测定,计算各成分的平均回收率分别为99.78%, 100.66%, 101.84%, 98.64%, 100.64%, 102.44%, RSD分别为1.76%, 1.67%, 1.03%, 1.88%,

1.96% ,2.17% 。

2.5 相对校正因子 以甘草酸为内标,按公式 $f_{k/m} = f_k/f_m = W_k \times A_m / (W_m \times A_k)$, 式中 A_k 为内标物峰面积, W_k 为内标物质量, A_m 为其他组分 m 的峰面积, W_m 为其他组分的质量。分别计算甘草苷、甘草素、异甘草素、甘草查尔酮 A 及甘草次酸对甘草酸的校正因子,分别记为 $f_{苷/酸}^{250nm}$, $f_{素/酸}^{300nm}$, $f_{异/酸}^{280nm}$, $f_{查/酸}^{270nm}$, $f_{次/酸}^{265nm}$, 结果见表 1。

表 1 甘草中 5 种有效成分对甘草酸的相对校正因子

进样体积/ μL	$f_{苷/酸}^{250nm}$	$f_{素/酸}^{300nm}$	$f_{异/酸}^{280nm}$	$f_{查/酸}^{270nm}$	$f_{次/酸}^{265nm}$
1	2.193 2	5.191 9	9.108 1	4.509 2	0.332 4
5	2.214 1	5.122 9	9.107 8	4.607 1	0.319 0
7	2.215 4	5.323 6	9.144 9	4.639 6	0.329 3
10	2.146 2	5.137 9	9.150 7	4.674 5	0.334 5
15	2.225 4	5.461 4	9.549 9	4.735 4	0.325 5
平均值	2.185 3	5.240 7	9.094 7	4.584 7	0.326 6
RSD/%	2.27	2.48	2.81	2.34	2.05

2.6 耐用性和系统适用性考察

2.6.1 色谱柱及高效液相色谱仪考察 取 2.2 项下混合对照溶液,分别进样 5 次,每次 10 μL ,考察 2 种高效液相色谱仪和 3 种色谱柱 Kromasil- C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), Agilent XDB- C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), Dikma- C_{18} 柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 结果见表 2。

2.6.2 色谱峰专属性 待测组分色谱峰的定位,一般根据相对保留时间差进行定性,内标峰的保留时间已知,根据相对保留时间差,再根据色谱峰的峰形,即可正确判断出目标峰的准确峰位置,甘草酸保留时间记为 $Rt_{酸}$,甘草苷、甘草素、异甘草素、甘草查尔酮 A 及甘草次酸的相对保留时间分别为 $Rt_{酸}-Rt_{苷}$, $Rt_{酸}-Rt_{素}$, $Rt_{酸}-Rt_{异}$, $Rt_{酸}-Rt_A$, $Rt_{酸}-Rt_{次}$, 结果见表 3。

2.7 样品测定 精密称取 10 批甘草药材粉末(过三号筛)各约 0.1 g,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,采用“一测多评”法及外标法测定,结果见表 4。

表 2 不同仪器和色谱柱测得甘草中 5 种有效成分的相对校正因子

高效液相色谱仪	柱子	$f_{苷/酸}^{250nm}$	$f_{素/酸}^{300nm}$	$f_{异/酸}^{280nm}$	$f_{查/酸}^{270nm}$	$f_{次/酸}^{265nm}$
Agilent 1100	Agilent	2.134 5	5.240 1	9.085 2	4.501 3	0.328 8
Waters 2695-2998	Kromasil	2.190 1	5.301 7	9.009 1	4.598 6	0.327 3
	Agilent	2.146 2	5.137 9	9.150 7	4.674 5	0.324 5
	DiKMA	2.230 9	5.266 1	9.123 1	4.530 9	0.315 7
平均值		2.175 4	5.236 4	9.092 0	4.576 3	0.324 0
RSD/%		2.02	1.34	0.67	1.68	1.81

表 3 甘草中各组分的保留时间

高效液相色谱仪	柱子	$Rt_{酸}$	$Rt_{酸}-Rt_{苷}$	$Rt_{酸}-Rt_{素}$	$Rt_{酸}-Rt_{异}$	$Rt_{酸}-Rt_A$	$Rt_{酸}-Rt_{次}$
Agilent 1100	Agilent	32.342	13.903	3.923	-2.598	-10.969	-25.095
Waters 2695	Kromasil	33.593	13.891	4.102	-2.691	-10.593	-25.219
	Anglient	32.861	13.993	4.039	-2.748	-11.121	-25.240
	DiKMA	35.029	13.593	3.891	-2.701	-11.097	-25.307

表 4 甘草中各有效成分的“一测多评”法与外标法结果比较

样品	甘草酸	甘草苷		甘草素		异甘草素		甘草查尔酮 A		甘草次酸	
		一测多评	外标法	一测多评	外标法	一测多评	外标法	一测多评	外标法	一测多评	外标法
1	3.197 3	0.182 6	0.186 0	0.034 6	0.035 3	0.049 6	0.049 4	0.769 8	0.755 7	0.147 9	0.151 9
2	3.205 2	1.191 2	1.213 0	0.009 9	0.010 1	0.008 5	0.008 4	0.002 6	0.002 5	0.255 5	0.262 5
3	2.788 7	1.805 8	1.838 8	0.023 5	0.023 9	0.005 2	0.005 1	0.000 7	0.000 7	0.063 6	0.065 3
4	5.034 4	1.668 8	1.699 2	0.032 4	0.033 1	0.024 4	0.024 3	0.028 2	0.027 6	0.088 2	0.090 6
5	1.984 3	1.179 0	1.200 6	0.022 3	0.022 7	0.004 4	0.004 3	0.005 1	0.005 0	0.072 7	0.074 7
6	0.265 3	2.407 8	2.451 8	0.050 6	0.051 6	0.040 7	0.040 4	0.004 0	0.003 9	0.074 2	0.076 2
7	2.641 5	0.336 7	0.342 8	0.040 6	0.041 4	0.290 4	0.288 7	0.000 7	0.000 7	0.178 9	0.183 8
8	2.112 8	0.399 1	0.406 3	0.137 9	0.140 7	0.018 5	0.018 4	0.001 8	0.001 8	0.700 6	0.719 8
9	1.700 7	0.754 3	0.768 0	0.068 1	0.069 5	0.020 3	0.020 2	0.006 1	0.006 0	0.170 2	0.174 9
10	1.639 6	0.821 7	0.836 7	0.008 7	0.008 9	0.006 1	0.006 1	0.002 5	0.002 4	0.086 2	0.088 5

两组数据贴近程度的评价方法主要有相关系数法、夹角余弦值法、模糊分布法及模糊欧氏距离法^[12-13]。分别选用夹角余弦值法和相关系数法对表4中数据进行处理,比较常规外标法和“一测多评”法测得结果的差异性,验证“一测多评”法应用于多指标成分质量评价的准确性。

夹角余弦法计算公式:

$$\cos\theta = \frac{\sum_{i=1}^n X_i Y_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^n X_i^2 \sum_{i=1}^n Y_i^2}}$$

相关系数的计算公式:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2 \sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2}}$$

采用夹角余弦值、相关系数计算“一测多评”法和外标法测得的甘草苷、甘草素、异甘草素、甘草查尔酮A及甘草次酸的含量相似度均为0.9999,表明2种不同方法测得的其他5种成分的含量无显著性差异。

3 讨论

甘草酸为甘草中主要有效成分,且其对照品容易得到,故被选为内标物,利用“一测多评”法测量甘草中其余5种有效成分;在建立甘草酸与其余5种有效成分间的相对校正因子时,考察了不同色谱柱、不同液相色谱体系的影响,结果表明“一测多评”法与外标法得到的含量值之间无显著差异,说明建立的校正因子具有较好的可信度,“一测多评”法可以在对照品缺省的情况下实现定量分析和质量控制。

[参考文献]

[1] 王智民,高慧敏,付雪涛,等.“一测多评”法中药质量评价模式方法学研究[J].中国中药志,2006,31

(23):1925.

- [2] U. S. Pharmacopial Convention. The United States Pharmacopoeia. Vol I [S]. Washington: U. S. Pharmacopial Convention,2008:1071.
- [3] Japanese Pharmacopoeial Convention. Japanese Pharmacopoeia. Vol I [S]. Tokyo, Japanese Pharmacopoeia Convention, 2006:24.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:285.
- [5] 孟江,卢国勇,程轩轩,等.一测多评法同时测定干姜中4种姜酚类成分的含量[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(7):77.
- [6] 于霄,宋静,熊志立,等.一测多评法测定淫羊藿中朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C及淫羊藿苷的含量[J].中国中药杂志,2010,35(24):3310.
- [7] 丁黎艳,周璐,王丽娜,等.一测多评法测定补骨脂中不同类型成分的含量[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(5):153.
- [8] 田庆来,官月平,张波,等.甘草有效成分的药理作用研究进展[J].天然产物研究与开发,2006,18(2):343.
- [9] 杨春花,蔡恩博,郑友兰,等.HPLC分析甘草中甘草酸和甘草苷含量[J].资源开发与市场,2010,26(8):673.
- [10] 陈云华,赵晓霞,王文全,等.高效液相色谱法同时测定甘草中甘草酸、甘草苷、异甘草素的含量[J].中国中医药信息杂志,2009,16(8):52.
- [11] 尚晓娜,宋平顺,赵建邦,等.毛细管电泳-多波长测定甘草中6种有效成分的含量[J].中国医院药学杂志,2012,32(23):1866.
- [12] 杨忠民,李忠民,赵日利,等.指纹图谱相似度新算法的研究[J].中国测试技术,2008,34(3):141.
- [13] 卫俊霞,相里斌,高晓惠,等.基于K-均值聚类与夹角余弦法的多光谱分类算法[J].光谱学与光谱分析,2011,31(5):1357.

[责任编辑 仝燕]