

UPLC 同时测定甘草及甘草浸膏中的甘草苷和甘草酸

杨式华, 孔兰芬, 董胜强, 邹悦, 李伟, 侯英*
(云南同创检测技术股份有限公司, 昆明 650106)

[摘要] **目的:** 建立快速测定甘草及甘草浸膏中甘草酸和甘草苷含量的超高效液相色谱(UPLC)方法。**方法:** 采用超高效液相色谱仪(UPLC), 在 BEH Shield RP₁₈(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) 色谱柱上梯度洗脱分离, 流动相乙腈(A), 1.0% 乙酸水(B), 流速 0.5 mL·min⁻¹, 甘草苷检测波长 276 nm, 甘草酸检测波长 254 nm, 柱温 30 °C。**结果:** 甘草苷的浓度在 0.01 ~ 1.0 g·L⁻¹ 与峰面积线性关系良好, 平均回收率为 98.98%, 方法精密度 RSD 2.55% (n = 6), 甘草酸在 0.03 ~ 1.2 g·L⁻¹ 与峰面积线性关系良好, 平均回收率为 99.03%, 方法精密度 RSD 1.73% (n = 6)。**结论:** 甘草苷和甘草酸在 7 min 内获得良好分离, 结果准确可靠, 该方法可用于甘草及其浸膏中甘草酸和甘草苷的快速测定。

[关键词] 甘草苷; 甘草酸; 甘草, 甘草浸膏; 超高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0157-04

[doi] 10.11653/syjf2013170157

Determination of Liquiritin and Glycyrrhizic Acid in Radix Glycyrrhizae and Extractum Glycyrrhizae by UPLC

YANG Shi-hua, KONG Lan-fen, DONG Sheng-qiang, ZOU Yue, LI Wei, HOU Ying*
(Yunnan COMTESTOR Co. Ltd., Kunming 650106, China)

[Abstract] **Objective:** A fast ultra performance liquid chromatographic (UPLC) method for determination of liquiritin and glycyrrhizic acid in Radix Glycyrrhizae and Extractum Glycyrrhizae was established. **Method:** UPLC was used. The operating conditions were BEH Shield RP₁₈ column (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) and gradient elution with acetonitrile (A) -1.0% acetic acid-H₂O (B) as mobile phase. The flow rate was 0.5 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 276 nm for liquiritin and 254 nm for glycyrrhizic acid. The column temperature was maintained at 30 °C. **Result:** The content of liquiritin was linear related to its peak area in the range of 0.01-1.0 g·L⁻¹, and the average recovery of the method was 98.98%; the RSD of precision test was 2.55%. The content of glycyrrhizic acid was linear related to its peak area in the range of 0.03-1.2 g·L⁻¹, and the average recovery of the method was 99.03%; the RSD of precision test was 1.73%. **Conclusion:** The method can be used for determining the content of liquiritin and glycyrrhizic acid in Radix Glycyrrhizae and Extractum Glycyrrhizae at the same time. The separation of liquiritin and glycyrrhizic acid only needs about 7 min with accuracy and good reliability.

[Key words] liquiritin; glycyrrhizic acid; Radix Glycyrrhizae; Extractum Glycyrrhizae; ultra performance liquid chromatography (UPLC)

甘草系豆科甘草属多年生草本植物甘草、胀果

甘草或光果甘草干燥根及根茎加工制品, 为传统中药材。甘草浸膏作为许多制剂的常用配料, 具有镇咳祛痰、清热解毒等功效^[1-3]。甘草及其浸膏中的活性成分主要是皂苷类和黄酮类, 代表物质分别为甘草酸(皂苷类)和甘草苷(黄酮类)。《中国药典》2010年版^[4]中收录的甘草含量测定方法采用高效

[收稿日期] 20120418(004)

[第一作者] 杨式华, 高工, 从事分析检测研究, Tel: 0871-8396749, E-mail: tch_511@126.com

[通讯作者] * 侯英, 硕士, 高工, 从事生命科学研究, Tel: 0871-8396749, E-mail: houyin@reascend.com.cn

液相色谱法,同时测定甘草苷和甘草酸检测时间需 36 min。目前文献报道甘草^[5-6]或甘草浸膏^[7-8]中甘草苷和甘草酸的测定多采用高效液相色谱法,该方法存在分析时间长、溶液用量大等不足。本文采用超高效液相色谱(UPLC)同时测定甘草苷和甘草酸含量,为甘草及甘草浸膏中甘草苷和甘草酸含量的快速测定提供指导。

1 材料

美国 Waters AcQuity UPLC H-Class 超高效液相色谱仪, PDA 检测器, Empower 2 色谱工作站, MS204S 型电子天平(瑞士, METTLER TOLEDO 公司, 感量 0.1 mg), D-7700 型超声波器, 频率 35 kHz(西德)。

乙腈(色谱纯, DIMA 公司生产)、乙酸(分析纯, 西陇化工股份有限公司)、超纯水(>18 MΩ), 甘草苷(liquiritin)、甘草酸单铵盐(glycyrrhizic acid)对照品(购自上海同田生物技术有限公司, 供含量测定用, 含量≥98%, 甘草苷批号为 09020422, 甘草酸单铵盐批号为 09081222)。针头过滤器(Φ13×0.22 μm, 天津市腾达过滤器厂)。

甘草样品(1#产自宁夏, 2#产自新疆)购自云南省药材公司, 经云南省药品检验所何广新主任药师鉴定; 甘草浸膏由西安沃森生物科技有限公司提供。

2 方法

2.1 色谱条件 Waters BEH Shield RP₁₈ 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm), 柱温 30℃, 流动相 A 为乙腈, B 为 1% 乙酸水溶液, 梯度洗脱程序见表 1。流速 0.5 mL·min⁻¹, 进样量 2 μL, 检测波长甘草苷 276 nm, 甘草酸 254 nm。

2.2 样品制备 对照品溶液的制备: 精密称取 8.8 mg 甘草苷和 7.6 mg 甘草酸单铵盐对照品置于

表 1 流动相梯度洗脱程序

流速 /mL·min ⁻¹	t /min	乙腈/%	1/ 醋酸水溶液/%
0.5	0.0	5	95
0.5	5	40	60
0.5	7	40	60

10 mL 棕色量瓶中, 用甲醇定溶至刻度, 摇匀。避光低温保存, 备用, 使用时配置一系列标准溶液, 回归方程见表 2。

表 2 回归方程、相关系数和检出限

化合物	回归方程	相关系数 /R ²	线性范围 /mg	检出限 /mg
甘草苷	$A = 2.44 \times 10^4 C + 3.10 \times 10^4$	0.999 9	0.01 ~ 1.00	0.001
甘草酸	$A = 1.08 \times 10^4 C - 9.02 \times 10^3$	0.999 9	0.01 ~ 1.00	0.002

供试品溶液的制备: 将市售甘草样品置于干燥箱中, 在 45℃ 烘 1 h, 取出磨细, 过 40 目筛备用。甘草浸膏(西安沃森生物科技有限公司)无需处理。准确称取甘草粉或甘草浸膏样品约 0.15 g 于锥形瓶中, 加入 20 mL 提取溶液(1.0% 的乙酸水溶液与乙醇按 1:1 的比例混合), 超声萃取 30 min, 萃取液静置 10 min, 抽取过滤, 滤液直接用超高效液相色谱分析。

3 结果

3.1 前处理条件优化 不同提取溶剂的提取效果对比见表 3, 结果显示, 乙醇-1% 乙酸水溶液(1:1)对甘草苷和甘草酸的提取效果较好, 考虑到甘草苷和甘草酸极性均较大, 且甘草酸带有一定的酸性, 最终选择了使用乙醇-1.0% 乙酸水溶液(1:1) 20 mL 作为样品的提取溶液, 超声提取 30 min。

表 3 不同提取溶液的提取效果

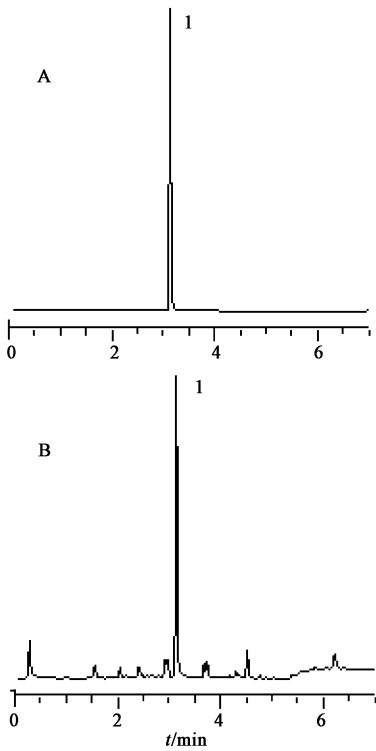
提取溶剂	甲醇	乙醇	甲醇: 1.0% 乙酸 /(1:1)	甲醇: 水 /(1:1)	乙醇: 水 /(1:1)	乙醇: 1.0% : 乙酸 /(1:1)
甘草苷	0.114	0.449	1.084	1.061	1.155	1.170
甘草酸	0.225	0.074	1.002	1.159	1.342	1.343

3.2 分离条件选择 研究了 1.0% 乙酸水溶液和乙腈混合的梯度洗脱条件, 结果显示, 在表 2 的梯度洗脱程序条件下, 甘草苷和甘草酸获得了良好的分离, 图 1, 2 分别显示甘草苷和甘草酸在 276, 254 nm 下的分离色谱图。

3.3 线性关系和检测限 取混合标准溶液进行稀释, 配制一系列不同浓度的标准溶液 5 个, 甘草酸单

铵盐标品按甘草酸含量计算浓度, 在 UPLC 上测定并制作标准曲线, 回归方程列于表 3, 从表中可看出, 甘草苷和甘草酸具有良好的线性关系。采用信噪比 S/N = 3, 测得甘草苷和甘草酸的最低检出量分别为 0.001, 0.002 mg, 线性范围 0.01 ~ 1.00 mg。

3.4 重复性试验 按 2.2 前处理方法对相同的 6 份样品进行处理, 按 2.1 条件进样分析, 甘草苷的



A. 标准品色谱图;B. 样品色谱图;1. 甘草苷;2. 甘草酸
图1 甘草苷在 276 nm 下的色谱图

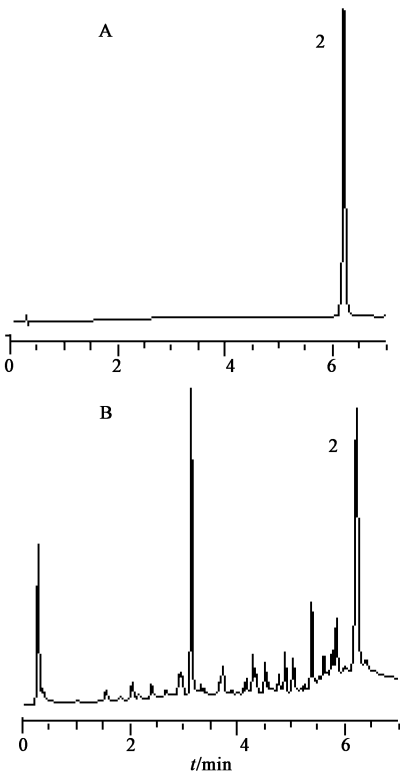


图2 甘草酸在 254 nm 下的色谱图

RSD 2.55%, 甘草酸的 RSD 1.73%, 表明方法具有良好的重复性。

3.5 加样回收率试验 按 2.2 样品处理方法, 分别

准确称取样品(甘草 1#)约 0.15 g 于锥形瓶中, 各 6 份, 称定质量。6 份样品分别加入一定量用提取液配制的对照品(甘草苷质量浓度为 $0.91 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 甘草酸浓度为 $0.85 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 称重并补足提取液; 按 2.1 方法进样分析, 测定并计算回收率(表 4), 表明方法具有较高的回收率。

表 4 甘草样品中甘草苷和甘草酸回收率试验

成分	称样量 /g	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
甘草苷	0.149	1.97	1.82	3.77	98.86	98.98	0.73
	0.151	1.99	1.82	3.80	99.02		
	0.155	2.05	1.82	3.85	99.21		
	0.153	2.02	1.82	3.81	98.64		
	0.150	1.98	1.82	3.80	100.18		
	0.154	2.03	1.82	3.82	97.98		
甘草酸	0.149	2.70	2.55	5.19	97.65	99.03	1.37
	0.151	2.73	2.55	5.22	97.58		
	0.155	2.81	2.55	5.39	101.18		
	0.153	2.77	2.55	5.31	99.68		
	0.150	2.72	2.55	5.23	98.82		
	0.154	2.79	2.55	5.32	99.24		

3.6 样品分析 对 2 份甘草和 10 份甘草浸膏样品中的甘草苷和甘草酸进行分析, 按 2.2 方法处理, 按 2.1 方法进样分析, 结果见表 5。甘草 1# 样品所含的甘草苷和甘草酸含量高于 2# 样品; 10 份甘草浸膏所含的甘草苷和甘草酸含量差异较大, 其中甘草浸膏 67# 中的甘草酸含量较高, 10# 样品中含量较低。

表 5 样品中甘草苷、甘草酸的测定 %

No.	甘草苷	甘草酸	No.	甘草苷	甘草酸
甘草 1#	1.32	1.81	甘草浸膏 11#	0.64	0.58
甘草 2#	1.17	1.38	甘草浸膏 12#	0.61	0.38
甘草浸膏 6#	2.06	2.39	甘草浸膏 13#	3.07	3.54
甘草浸膏 8#	3.20	3.57	甘草浸膏 61#	1.43	1.43
甘草浸膏 9#	1.71	1.93	甘草浸膏 67#	2.35	7.28
甘草浸膏 10#	0.51	0.32	甘草流浸膏 1#	1.74	3.17

4 讨论

本研究应用超高效液相色谱建立了甘草及甘草浸膏中的甘草苷和甘草酸的同时测定方法, 在 7 min 内甘草苷和甘草酸获得了良好的分离, 较 HPLC 方法^[5-7,10]大大缩短了分析时间, 该方法具有简单、准确、快速、溶剂消耗少等特点, 适用于甘草和甘草浸膏样品中有效成分的快速检测, 同时为中药中活性成分含量的快速测定提供参考。

清肝利胆口服液中对羟基苯乙酮含量的测定

李小妹¹, 梁咏¹, 康志英¹, 王德秀¹, 蔡春玲¹, 麻印莲², 于定荣^{2*}

(1. 广州市香雪制药股份有限公司, 广州 510663;

2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立对羟基苯乙酮含量测定的方法, 为清肝利胆口服液的质量控制提供依据。方法: 采用高效液相色谱法测定对羟基苯乙酮的含量, Kromasil 100-5 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.1% 磷酸溶液(25:75), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 275 nm, 进样量 10 μL, 柱温 35 °C。结果: 对羟基苯乙酮在 0.213 ~ 5.335 μg 线性关系良好($r=0.9999$), 平均加样回收率 101.86% (RSD 0.38%)。3 批样品中对羟基苯乙酮含量分别为 0.22, 0.19, 0.18 mg/支。结论: 方法专属性强、简便、准确、稳定, 可用于清肝利胆口服液的质量控制。

[关键词] 清肝利胆口服液; 对羟基苯乙酮; 高效液相色谱法; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0160-03

[doi] 10.11653/syfy2013170160

Determination of Hydroxyacetophenone in Qingganlidan Oral Solution

LI Xiao-mei¹, LIANG Yong¹, KANG Zhi-ying¹, WANG De-xiu¹, CAI Chun-ling¹, MA Yin-lian², YU Ding-rong^{2*}

(1. Guangzhou Xiangxue Pharmaceutical Co. Ltd., Guangzhou 510663, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determination of hydroxyacetophenone in Qingganlidan Oral Solution and provide the basis of the quality control. **Method:** HPLC was used to determine the content of hydroxyacetophenone. A Kromasil 100-5 C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column was used. The mobile phase

[收稿日期] 20120929(005)

[第一作者] 李小妹, 中药执业药师, 中级职称, 从事制剂及质量标准研究, Tel: 020-85801066, E-mail: xiaomei0735@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 于定荣, 博士, 助理研究员, 从事中药制剂与炮制研究, Tel: 13436821953, E-mail: yudingrong 0826@sina.com

[参考文献]

- [1] 陈奇, 连晓媛, 陈兰英, 等. 炙甘草汤一些问题的考证及药理学研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 1999, 5(2): 54.
- [2] 刘丽萍, 任翠爱, 赵宏艳. 甘草酸的免疫调节作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(6): 272.
- [3] 李成义, 马艳茹, 李越峰, 等. 西北地区商品甘草 HPLC 指纹图谱 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 129.
- [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: 80.
- [5] 崔淑芬, 张信青, 许柏球, 等. 高效液相色谱法同时测定甘草中甘草酸和甘草苷的含量 [J]. 时珍国医

- 国药, 2006, 17(3): 307.
- [6] 张文娟, 房敏峰, 赵新锋, 等. 固相萃取——高效液相色谱法测定甘草中甘草苷和甘草酸含量 [J]. 药物研究, 2008, 17(17): 5.
- [7] 王丽琼. 反相高效液相色谱法测定甘草浸膏中甘草酸和甘草苷含量 [J]. 药物鉴定, 2009, 18(17): 16.
- [8] 张芳向, 林朝霞. HPLC 法测定温肺止咳软胶囊中甘草酸、6-姜酚、和厚朴酚及厚朴酚 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7): 83.
- [9] 吴君金, 卢林, 马强, 等. UPLC 研究不同配伍对白虎汤中甘草酸含量的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 21.
- [10] 中华人民共和国药典编委会. 烟草化学与分析 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.

[责任编辑 顾雪竹]