

色谱法和分光光度法测定

甘草酸含量的比较

茹仁萍 吕 坚 吴锡铭 (杭州市第六医院临床药理室, 杭州 310014)

天然药物甘草酸(Glycyrrhizic acid, GA)的定量方法多年来研究报道很多, 计有UV法^[1], GC法^[2], HPLC法^[3], TLC法^[4]等, 但因这些方法测定结果差异较大, 为此, 我们参照有关文献, 对UV、GC、HPLC法进行了比较测定, 现介绍如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 LC-9A高效液相色谱仪, SPD-6AV紫外检测器, C-R4A数据处理机(日本岛津); 1001型气相色谱仪和751-G紫外分光光度计(上海分析仪器厂)。

1.2 试剂 GA样品, 连云港东风药厂; 去氢胆酸, 上海黄河药厂; 重氮甲烷-乙醚, 自制; 其它试剂均为分析纯。

1.3 对照用标准品 GA对照品, 用市售甘草酸经冰醋酸、酒精重结晶多次后, 以高效液相色谱法制备成色谱纯标准品^[5], 并经高效液相色谱检查为单一峰^{[6][7]}, 烟酰胺对照品, 用分析纯烟酰胺用苯反复精制, 高效液相检查为单一峰。二对照品纯度均>99.5%。

2 方法与结果

2.1 HPLC法

2.1.1 色谱条件 柱Shim-Paok GC-ODS(0.15

m×6.0 mm I. D.), 流动相: 甲醇-水-醋酸(76:20:4), 流速: 1.2 ml/min, 柱温30℃, 测定波长252 nm。

2.1.2 标准曲线制备 取GA对照品用流动相溶解, 准确取20 μl注入HPLC分析, 结果表明GA在0.1~0.5 mg/ml范围内与色谱峰呈良好线性关系, 曲线方程为:

$$A = 46.68 + 216522.75C \text{ (mg/ml)}$$

$$r = 0.9990 \quad (1)$$

2.1.3 回收率 精密称取GA样品, 用流动相溶解成0.2 mg/ml溶液, 取20 μl注入HPLC分析, 按方程(1)式计算含量, 平均回收率99.93%(n=6), RSD=±0.62%。

2.1.4 样品测定 精密称取GA样品, 用流动相溶解成0.2 mg/ml溶液按标准曲线制备项下方法操作, 代入方程(1)式, 结果见附表。

2.2 GC法

2.2.1 色谱条件 氢火焰离子化检测器, 3 m×3 mm I. D. 螺旋形硅烷化玻璃柱, 内填3%SE30涂布于60~80目Chromosorb W AW PMCS, 载气为氮气(99.99%), 流速N₂ 30 ml/min, H₂ 40 ml/min, 空气30 ml/min, 柱温300℃, 进样器和检测器温度为320℃。

2.2.2 测定液的制备 取样品约 10 mg 加入 1 mol/L H_2SO_4 溶液 10 ml。在油浴 120°C 加热回流 2 h, 冷却后用氯仿萃取, 分离氯仿层准确加入内标去氢胆酸, 溶解后浓缩至 2 ml, 加重氮甲烷—乙醚液至明显黄色, 室温放置 30 min, 氮气吹干, 准确加氯仿 500 μ l 溶解, 即为测定液。

2.2.3 标准曲线 精密称取 GA 对照品按测定液制备同样步骤操作, 配制成标准液。取标准液 2 μ l, 注入 GC 分析。结果表明 GA 在 0.3~1.5 mg/ml 范围内, 浓度(C)与峰高(A)之间呈线性相关, 得曲线方程:

$$A = 0.1125 + 1.2901 C \text{ (mg/ml)} \\ r = 0.9970 \quad (2)$$

2.2.4 回收率 精密称取 GA 样品, 按测定液制备方法制备, 准确取测定液 2 μ l, 注入 GC 分析, 按方程(2)式计算含量, 平均回收率为 99.92% ($n = 6$), $RSD \pm 1.18\%$ 。

2.2.5 样品测定 精密称取 GA 样品, 按标准曲线项下操作, 代入方程(2)式, 结果见附表。

2.3 UV 法

2.3.1 波长选择 分别取对照品及样品适量, 加水溶解成 0.04 mg/ml, 绘制吸光度扫描曲线, 两者的 λ_{max} 均为 252 nm, 在 2 h 内, 曲线稳定不变。

2.3.2 标准曲线 GA 对照品在 252 nm 处, 测定吸光度, 结果表明, GA 在 0.016~0.064 mg/ml 范围内, 吸光度(A)与浓度(C)之间呈线性相关, 曲线方程为:

$$A = -0.0609 + 13.5547 C \text{ (mg/ml)} \\ r = 1.0003 \quad (3)$$

2.3.3 回收率 精密称取 GA 样品, 加水溶解成 0.04 mg/ml 溶液, 测定吸光度, 按方程(3)式计算含量, 平均回收率 100.21% ($n = 6$), $RSD = \pm 1.99\%$ 。

2.3.4 样品测定

2.3.4.1 对照品比较法(UV_1) 精密称取 GA 样品, 按回收率项下操作, 代入方程(3)式, 结果见附表。

附表 HPLC、GC 及 UV 法对比试验结果

样品编号	HPLC 法 (%)	GC 法 (%)	UV 法 (%)	
			UV_1	UV_2
1	93.28	94.23	98.80	95.80
2	93.27	96.76	98.60	98.60
3	93.26	95.79	98.42	96.70
4	93.66	95.20	98.67	97.00
5	93.50	96.60	99.00	98.16
$\bar{x} \pm s$	93.41 ± 0.17	95.68 ± 1.04	98.70 ± 0.22	97.25 ± 1.13
RSD(%)	0.18	1.09	0.22	1.16

2.3.4.2 烟酰胺对照品比较法(UV_2)^[1] 精密称取 GA 样品, 按回收率项下操作, 测定吸光度(A_r), 另取烟酰胺对照品精密称定, 加水溶解并稀释至 0.02 mg/ml, 在 261 $\pm$ 1 nm 波长处测定吸收度(A_s), 按下式计算, 结果见附表。

$$GA(\%) = \frac{2A_r}{A_s \times 1.105} \\ \times \frac{\text{对照品(mg)}}{\text{供试品(mg)}} \times 100\%$$

* GA 与烟酰胺的吸光比 0.536/0.485 = 1.105

3 讨论

由附表可见, HPLC 法精密度高、准确度高 ($RSD = 0.18\%$), 是目前常用的含量测定方法, 基本反应了样品的真实含量。而 GC 法、 UV_2 法误差较大 ($RSD > 1.00\%$), 前者操作复杂且是间接测定 GA, 致使结果误差较大, 后者对照品烟酰胺(根据日本药局方外医药品成分规格而选用)的吸收峰与样品不在同一波长处且吸收度受 pH 影响较大^[1], 可能是使结果误差较大的原因。 UV 法含量偏高(与 HPLC 法对比 $P < 0.01$)其原因是甘草酸同系物等杂质, 这些杂质可能在相同波长处有吸收, 使结果偏高。

参 考 文 献

- 1 日本药局方外医药品成分规格. 日本1989:423
- 2 食品添加剂的分析方法. 日本1988:627—632
- 3 Sakiya Y, Akada Y, Kawano S, et al. Rapid estimation of glycyrrhizic acid and glycyrrhetic acid in plasma by HPLC. Chem Pharm Bull, 1979, 27(5):1125
- 4 Yoshio Takino *Planta medica*, 1979, 36(1):74
- 5 曾路, 等. 甘草中三种皂甙成分的高效液相色谱法分离和含量测定. 药学学报, 1991, 26:53
- 6 曾路, 等. 粗毛甘草化学成分研究. 植物学报, 1991, 33:124
- 7 Zeng L, et al. Determination of nine flavonoids and coumarins in licorice roots by high performance liquid chromatography. J Chromatogr, 1990, 513:247
- 8 熊谷 朗他. 甘草の生化学, 现代东洋医学, 1981, 2(1):38

收稿日期: 1994—10—18