

HPLC测定逍遥丸中甘草苷、异甘草素和甘草酸的含量

成英, 宋九华* (乐山师范学院化学与生命科学学院功能性分子设计中心, 四川 乐山 614004)

摘要: 目的 建立测定逍遥丸中甘草苷、异甘草素和甘草酸含量的方法。方法 色谱柱: Shim-packVP-ODS(150 mm×4.6 mm, 5.0 μm)。流动相: 甲醇-0.5%冰醋酸梯度洗脱; 流速 1 mL·min⁻¹; 检测波长 0~7 min 为 276 nm, 7~18 min 为 370 nm, 18 min 以后为 254 nm。结果 甘草苷的线性范围是 0.018 40~0.368 0 μg($r=0.999\ 8$, 平均回收率为 97.96%, RSD 为 0.60%); 异甘草素的线性范围是 0.015 2~0.304 0 μg($r=0.999\ 9$, 平均回收率为 97.17%, RSD 为 1.02%); 甘草酸的线性范围是 0.441 8~8.835 0 μg ($r=0.999\ 9$, 平均回收率为 97.52%, RSD 为 1.06%)。结论 所建立的方法简便可行、重复性好, 可用于逍遥丸的质量控制。

关键词: 高效液相色谱法; 逍遥丸; 甘草苷; 异甘草素; 甘草酸

中图分类号: R284.1; R917.101

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)02-0163-04

Determination of Liquiritin, Glycyrrhizic Acid and Isoliquiritigenin in Xiaoyao Wan by HPLC

CHENG Ying, SONG Jiuhua* (Center for Functional Molecular Design, College of Chemistry and Life Science, Leshan Normal University, Leshan 614004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an HPLC method for the liquiritin, glycyrrhizic acid and isoliquiritigenin in Xiaoyao Wan. **METHODS** The column Shim-pack VP-ODS(150 mm×4.6 mm, 5.0 μm) was used. The mobile phase consisted of methanol-0.5% acetic acid with a gradient elution, and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelengths were 276 nm in 0-7 min, 370 nm in 7-18 min, 254 nm after 18 min. **RESULTS** The linear range of liquiritin was 0.018 40–0.368 0 μg, $r=0.999\ 8$. The average recovery was 97.96%, RSD=0.60%. The linear range of glycyrrhizic acid was 0.015 20–0.304 0 μg, $r=0.999\ 9$. The average recovery was 97.17%, RSD=1.02%. The linear range of isoliquiritigenin was 0.441 8–8.835 0 μg, $r=0.999\ 9$. The average recovery was 97.52%, RSD=1.06%. **CONCLUSION** This method is simple, feasible, and the repeatability is good. It can be used for quality control of Xiaoyao Wan.

KEY WORDS: HPLC; Xiaoyao Wan; liquiritin; glycyrrhizic acid; isoliquiritigenin

逍遥丸(浓缩丸)由柴胡 100 g、当归 100 g、白芍 100 g、白术(炒)100 g、茯苓 100 g、薄荷 20 g、生姜 100 g、甘草(蜜炙)80 g 组成, 本品为亮黑色的浓缩丸; 气微, 味甜、辛、而后苦。具有舒肝清热、健脾养血的功能, 用于肝郁血虚、肝脾不和、两胁胀痛、头晕目眩、倦怠食少、月经不调、脐腹胀痛的治疗^[1]。

甘草是一种药用价值高的荒漠草原药用植物,

其主要有效成分为甘草酸和黄酮类化合物, 具有明显的抗肿瘤、抗溃疡、抗菌、降血脂和镇痛的作用, 并对爱滋病病毒有很强的抑制增殖作用^[2-8], 是甘草有效成分开发的热点。甘草黄酮的主要成分甘草苷, 是反映甘草黄酮内在质量的一个重要指标^[9]。经典的黄酮含量测定方法, 是以芦丁为对照品, 采用紫外分光光度法测定^[10-11], 但此方法用于甘草黄酮的测定尚有诸多不足之处。目前也

基金项目: 四川省教育厅支持项目(10zB024)

作者简介: 成英, 女, 博士, 副教授 Tel: 13308133386

E-mail: cying215@hotmail.com

*通信作者: 宋九华, 女, 高级实验师

Tel: 13628196037 E-mail: songjh@lsc.edu.cn

有学者利用高效液相色谱法对其进行含量测定^[4,9],但均未对甘草苷、异甘草素和甘草酸同时测定,故本研究以甘草苷、异甘草素和甘草酸为对照品,采用 HPLC 测定其含量,以期对甘草有效成分的综合开发利用和质量监控提供新的方法和思路。

1 仪器和试剂

LC-2010A 高效液相色谱仪(日本岛津);KQ3200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

甘草苷对照品(上海融禾医药科技有限公司,批号:081026,纯度:99.9%);异甘草素对照品(上海融禾医药科技有限公司,批号:080921,纯度:99.9%);甘草酸单铵盐对照品(上海融禾医药科技有限公司,1 mg 甘草酸单铵盐折合甘草酸为0.979 5 mg,批号:090317,纯度:99.9%)。

逍遥丸(浓缩丸)(九芝堂股份有限公司,批号:20091100);逍遥丸(浓缩丸)(兰州佛慈制药股份有限公司,批号:2008103);逍遥丸(马鞍山神鹿科瑞有限公司,批号:20090428)。

色谱甲醇,水为三蒸水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Shim-pack VP-ODS(150 mm×4.6 mm, 5.0 μm);流动相:甲醇-0.5%冰醋酸梯度洗脱;梯度程序及检测波长变化见表 1;流速:1 mL·min⁻¹;柱温:30 ℃;进样量:10 μL。在此色谱条件下,样品中甘草苷、异甘草素、甘草酸出峰时间(*t_R*)分别为 5.61, 13.31, 32.15 min,并与其它峰均能达到基线分离,阴性无干扰,色谱图见图 1。

表 1 流动相梯度程序及检测波长

Tab 1 Mobile phase gradient procedures and detected wavelength

时间/min	甲醇/%	0.5%冰醋酸/%	检测波长/nm
0.00	40	60	276
7			370
8.00	40	60	
8.01	65	35	
17	65	35	
17.01	70	30	
18			254
40.00	70	30	

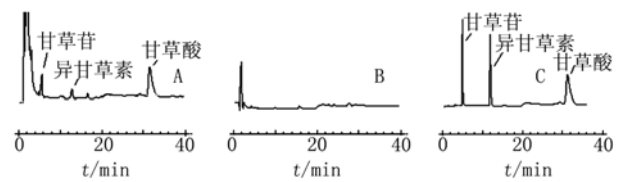


图 1 高效液相色谱图

A-逍遥丸; B-缺甘草的阴性样品; C-混合对照品

Fig 1 HPLC chromatograms

A-Xiaoyao Wan; B-negative sample; C-control sample

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取甘草苷、异甘草素和甘草酸单铵盐对照品适量,用甲醇溶解成0.184 0 mg·mL⁻¹的甘草苷溶液,0.152 mg·mL⁻¹的异甘草素溶液,1.804 0 mg·mL⁻¹的甘草酸单铵盐溶液(折合成甘草酸浓度为1.767 0 mg·mL⁻¹)。将 3 种溶液按一定的比例混合得对照品混合溶液(甘草苷 0.036 8 mg·mL⁻¹,异甘草素 0.030 4 mg·mL⁻¹,甘草酸 0.883 5 mg·mL⁻¹),供分析进样和加标回收用。

2.3 供试品溶液的制备

分别取不同批号的逍遥丸适量,研细,过筛。精密称取每种批号的供试品粉末约 1.0 g,置具塞锥形瓶中,精密加入 25 mL 甲醇,称定重量,30℃超声处理 40 min,取出,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,滤过,即得。

2.4 阴性样品的制备

根据文献[1]的逍遥丸处方,制备缺甘草的阴性样品,按“2.3”项下方法制备,即得阴性样品溶液。

2.5 线性关系的考察

精密移取甘草苷、异甘草素和甘草酸单铵盐对照品混合溶液 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 10.0 mL 分别加入到 10 mL 的量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀得对照品系列工作液。分别吸取 10 μL 进样,测定峰面积。以峰面积 Y 为纵坐标,对照品的质量 X(μg) 为横坐标,绘制标准曲线,计算得回归方程:甘草苷为Y=2 394 155X-2 931, r=0.999 8;异甘草素为Y=5 398 996X+5 247, r=0.999 9;甘草酸为Y=870 230X-7 138, r=0.999 9,表明甘草苷在0.018 40~0.368 0 μg,异甘草素在0.015 2~0.304 0 μg,甘草酸在0.441 8~8.835 0 μg内,均呈良好的线形关系。

2.6 仪器精密度试验

精密吸取同一对照品混合溶液 10 μL,连续进样 9 次,测定峰面积,计算得甘草苷,甘草酸和

异甘草素的峰面积 RSD 分别为 0.78%, 0.96%, 0.88%(n=9)。

2.7 重复性试验

精密称取同一批号样品, 按供试品溶液制备方法平行制备 5 份, 依次测定, 计算甘草苷, 甘草酸和异甘草素含量, RSD 值分别为 1.56%, 1.17%, 0.92%(n=5)。

2.8 稳定性试验

取同一供试品溶液, 分别于0, 2, 6, 8, 10,

12 h 进样 10 μ L 测定, 计算甘草苷, 甘草酸和异甘草素的峰面积的RSD为 1.01%, 0.99%, 1.20%, 表明样品溶液在 12 h 内稳定。

2.9 回收率试验

精密称取已知含量样品(批号: 2008103)约0.5 g, 6 份, 分别精密加入甘草苷、异甘草素和甘草酸混合对照品溶液 1 mL, 按“2.3”项下方法制得供试品溶液。分别吸取上述供试品溶液各 10 μ L 测定回收率, 结果见表 2。

表 2 加样回收率试验(n=6)

Tab 2 Results of recovery test (n=6)

	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	0.503 1	0.467 9	0.110 4	0.569 7	98.51	97.96	0.60
	0.505 5	0.470 1	0.110 4	0.573 2	98.74		
	0.506 4	0.471 0	0.220 8	0.675 8	97.69		
	0.505 9	0.470 5	0.220 8	0.673 3	97.40		
	0.507 2	0.471 7	0.331 2	0.787 7	98.11		
	0.507 0	0.471 5	0.331 2	0.781 3	97.33		
异甘草素	0.503 3	0.108 2	0.030 4	0.136 5	98.48	97.17	1.02
	0.503 0	0.108 1	0.030 4	0.135 2	97.62		
	0.502 4	0.108 0	0.060 8	0.161 9	95.91		
	0.502 7	0.108 1	0.060 8	0.162 3	96.09		
	0.502 1	0.107 9	0.091 2	0.193 8	97.34		
	0.501 7	0.107 8	0.091 2	0.194 2	97.59		
甘草酸	0.504 3	0.616 3	0.294 5	0.881 5	96.78	97.52	1.06
	0.504 9	0.617 0	0.294 5	0.884 8	97.07		
	0.505 7	0.618 0	0.589 0	1.187 6	98.39		
	0.505 4	0.617 6	0.589 0	1.196 9	99.20		
	0.506 2	0.618 6	0.883 5	1.454 1	96.80		
	0.506 7	0.619 2	0.883 5	1.455 3	96.85		

2.10 样品测定

分别精密称取 3 种批号的药品各 5 份, 每

份约 1.0 g, 按“2.3”项下方法制备溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行 HPLC 分析, 结果见表3。

表 3 逍遥丸颗粒中甘草苷、异甘草素和甘草酸平均含量测定结果(n=5)

Tab 3 The average content of liquiritin, glycyrrhizic acid and isoliquiritigenin in Xiaoyao Wan(n=5)

批号	甘草苷/mg·g ⁻¹	RSD/%	异甘草素/mg·g ⁻¹	RSD/%	甘草酸/mg·g ⁻¹	RSD/%
20091100	0.956	0.67	0.240	0.85	1.251	1.11
2008103	0.931	1.02	0.215	0.92	1.222	1.20
20090428	1.031	0.90	0.255	1.30	1.312	1.07

3 讨论

本实验采用 HPLC 法测定逍遥丸中 3 种有效成分的含量, 在文献[4, 9]报道的基础上, 采用梯度洗脱和变波长测定法, 3 种成分与杂质峰均能达到基线分离, 结果满意, 并且本实验方法简便、快速、重复性好、精密度高, 回收率和线性关系数据良好, 故可以作为逍遥丸的质量控制指标。

REFERENCES

[1] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版. 一部) [S]. 2010: Z11-64.
[2] XING G X, LI N, WANG T, et al. Advances in studies on flavonoids of licorice [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2003, 28(7): 593-597.
[3] CONG J X, GAO L J, LIN B C, et al. Progress in studies of flavonoid compounds of licorice [J]. Fine Chem(精细化工),

- 2004, 21(10): 121-124.
- [4] TONG D J, LIU H. Research on determination of liquiritin and glycyrrhizic acid by HPLC [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2008, 19(10): 2361-2362.
- [5] LU H Y, LIU Y, ZHANG H C, et al. Detection of total flavonoid content and glycyrrhizic acid content in licorice hairy roots [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27(1): 43-46.
- [6] MOURBOUL A, ANWAR M, RENA K. Advance in study on the preparation techniques and pharmacological actions of isoliquiritigenin [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2009, 26(4): 277-280.
- [7] ZHANG P, GUO Y D, MA Y H, et al. Determination of liquiritigenin and glycyrrhizic acid in Xuanmaiganjie granule by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 26(4): 335-337.
- [8] LIU Y, WU C W, ZHAO W J, et al. Determination of glycyrrhizic acid in compatibility of *Glycyrrhiza uralensis* with *Sargassum fusiforme* by HPLC [J]. Her Med(医药导报), 2011, 30(4): 498-500.
- [9] WU W P, YAN H T, SUN W J. HPLC determination of liquiritin in licorice [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2004, 24(4): 425-427.
- [10] LU Y F, GONG X. Pharmacological effect of flavonoid and refinement of it from ginkgo leaves [J]. J Qufu Normal Univ (曲阜师范大学学报), 1999, 25(3): 95-96.
- [11] FENG S L. Extraction and content determination of licorice flavonoids [J]. J Lanzhou Med Coll(兰州医学院学报), 1998, 24(4): 20-22.

收稿日期: 2011-03-01