

# HPLC 法同时测定甘草及甘草头中 4 种成分含量\*

郭明晔, 张燕玲, 李 洋, 史新元\*\*

(北京中医药大学中药学院 北京 100102)

**摘要:**目的:建立 HPLC 法同时测定甘草饮片及甘草头中甘草苷、异甘草苷、甘草素和甘草酸的含量。方法:采用 Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 0.1%磷酸水-乙腈梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长为 276 nm(0~18 min)、360 nm(18~24 min)、276 nm(24~30 min)、250 nm(30~65 min), 柱温 30℃。结果:在该色谱条件下, 甘草苷、异甘草苷、甘草素、甘草酸的进样量分别在 0.108 5~1.085、0.016 8~0.168、0.004 94~0.049 4、0.407~4.07 μg 范围内线性关系良好。加样回收率均在 96.61%~100.89%, RSD 值均小于 0.81%。5 个不同批次的甘草饮片中 4 种成分的含量分别为 0.513%、0.072 9%、0.048 4%、1.945%; 2 个批次甘草头中 4 种成分含量分别为 0.456%、0.063 6%、0.036 2%、1.630%。结论:4 种成分的反应与浓度之间呈良好的线性关系;甘草头中 4 种成分的含量与甘草饮片基本相当, 可作为活性成分提取的原料加以利用。

**关键词:**甘草 甘草头 HPLC 法 甘草苷 异甘草苷 甘草素 甘草酸

doi: 10.11842/wst.2014.02.026 中图分类号:R284.1 文献标识码:A

甘草是我国 2 000 多种草药中用量最大的一味药材<sup>[1]</sup>, 其药用部位为根及根茎。甘草中主要有效成分为皂苷类和黄酮类化合物<sup>[2]</sup>。2010 版《中国药典》(一部)中规定甘草的含量测定指标为黄酮类成分甘草苷和皂苷类成分甘草酸。除此之外, 异甘草苷、甘草素也是甘草中重要的黄酮类化合物, 具有抗溃疡等作用<sup>[3]</sup>。甘草头异名疙瘩草, 为甘草根茎上端的芦头部分, 目前对其质量研究及开发利用相对较少。

甘肃为我国西北地区乌拉尔甘草的主要产区之一<sup>[4]</sup>。甘肃瓜州县位于河西走廊最西端, 日照充足, 光热丰富, 土质良好, 灌溉条件优越<sup>[5]</sup>, 是最适宜种植甘草的区域之一<sup>[6]</sup>, 本文选择产地瓜州的乌拉尔甘草为研究对象。有研究工作者对甘草中不同成分的测定进行了研究, 赵晓莉等<sup>[7]</sup>采用 HPLC 双波

长法测定了复方甘草合剂中甘草苷、甘草素及异甘草素的含量; 周翠等<sup>[3]</sup>采用波长切换法测定了甘草及其炮制品中 7 种物质的含量; 李伟等<sup>[8]</sup>采用 HPLC-DAD 梯度波长检测法同时分析甘草中 7 种成分含量。本文建立 HPLC 法同时测定甘草苷、异甘草苷、甘草素和甘草酸 4 个成分的含量, 对乌拉尔甘草的饮片及甘草头中几种主要成分的含量进行测定, 以期对甘草头的综合开发利用和质量监控提供借鉴。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Waters 2695 四元梯度高效液相色谱仪, Waters 2996 二极管矩阵检测器(美国 Waters 公司), KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), Sartorius BS323S 电子天平(德国赛多利斯公司)。

收稿日期: 2013-08-21

修回日期: 2013-08-29

\* 北京市教委共建项目: 串联型中药制药过程集成建模与优化技术研究, 负责人: 史新元。

\*\* 通讯作者: 史新元, 副教授, 研究生导师, 主要研究方向: 中药生物技术。

## 1.2 试药

甘草苷(批号:111610-201005)、甘草酸铵(批号:110731-201116)购自中国药品生物制品检定院,异甘草苷(批号:120526)购自北京世纪奥科生物技术有限公司,甘草素(批号:100927)购自上海融禾医药科技有限公司;甘草饮片、甘草头均由北京中医药大学刘春生教授鉴定为乌拉尔甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.;乙腈为色谱纯(Fish公司),磷酸为分析纯,水为自制高纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液制备

#### 2.1.1 混和对照品溶液

精密称取甘草苷、异甘草苷、甘草素、甘草酸铵对照品适量,分别用70%乙醇定量稀释制成0.775 0、0.168 0、0.041 12、2.161 2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,作为对照品贮备液,备用。依次精密量取上述4个对照品储备液0.70、0.50、0.60、0.90 mL,置同一10 mL量瓶中,加70%乙醇稀释至刻度,制成甘草苷、异甘草苷、甘草素和甘草酸浓度分别为54.25、8.4、2.47、203.5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合溶液,即得。

#### 2.1.2 供试品溶液

取甘草饮片或甘草头粉末(过65目筛)约0.15 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入70%乙醇25 mL,密塞,称定重量,超声处理(功率250 W,频率40 kHz)30 min,放冷,再次称重,用70%乙醇补足损失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

### 2.2 色谱条件

Diamonsil  $\text{C}_{18}$  色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm,5  $\mu\text{m}$ );流动相:A为乙腈,B为0.1%磷酸水溶液;梯度程序见表1;流速1.0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ;检测波长:0~18 min在276 nm检测甘草苷,18~24 min在360 nm检测异甘草苷,24~30 min在276 nm检测甘草素,30~65 min在250 nm检测甘草酸;柱温30 $^{\circ}\text{C}$ ;进样量10  $\mu\text{L}$ 。在上述色谱条件下,以甘草酸计算理论塔板数大于5 000,各相邻色谱峰间分离度大于1.5,见图1。

### 2.3 线性关系考察

分别精密量取上述混合对照品溶液2、5、10、15、20  $\mu\text{L}$ 注入高效液相色谱仪,测定。以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程,结果见表2,表明4种成分的反应与浓度之间

呈良好的线性关系。

表1 流动相梯度条件

时间/min	乙腈/%	0.1%磷酸水溶液/%
0	20	80
5	20	80
15	25	75
25	25	75
35	50	50
50	95	5
55	20	80
65	20	80

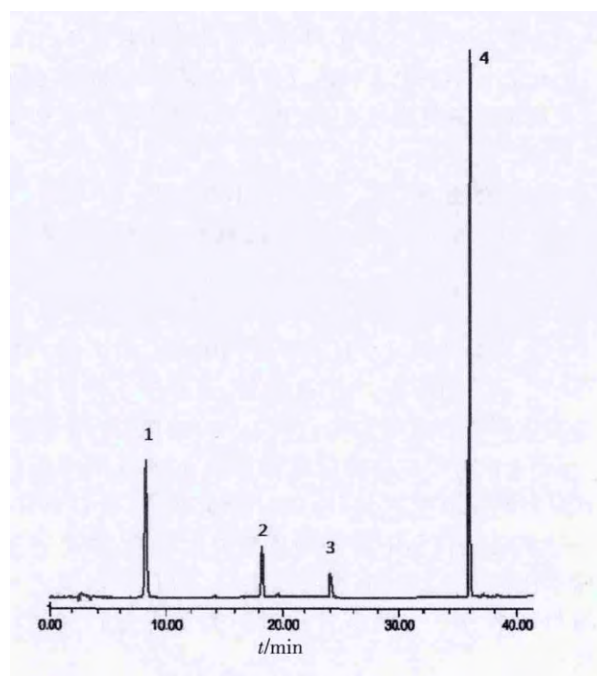


图1 混合对照品的HPLC图

注:1.甘草苷;2.异甘草苷;3.甘草素;4.甘草酸。

表2 甘草苷、异甘草苷、甘草素和甘草酸的线性关系

化合物	标准曲线方程	r	线性范围/ $\mu\text{g}$
甘草苷	$Y=1.7\times 10^6 X-253.73$	0.999 5	0.108 5~1.085
异甘草苷	$Y=3.8\times 10^6 X-9 663.7$	0.999 8	0.016 8~0.168
甘草素	$Y=3.2\times 10^6 X-9 400.8$	0.999 8	0.004 94~0.049 4
甘草酸	$Y=7.9\times 10^5 X-3 235.1$	0.999 9	0.407~4.07

表3 加样回收率试验结果

名称	样品中含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
甘草苷	0.879 1	0.411 8	1.240 0	99.58	97.19	0.48
	0.880 8	0.411 8	1.229 4	96.62		
	0.882 5	0.411 8	1.257 2	102.97		
	0.875 6	0.823 7	1.616 2	95.86		
	0.875 0	0.823 7	1.616 7	96.00		
	0.869 2	0.823 7	1.603 2	95.02		
	0.880 8	1.235 5	2.025 1	96.61		
	0.881 4	1.235 5	2.014 6	95.71		
	0.873 2	1.235 5	2.019 7	96.35		
异甘草苷	0.125 2	0.062 4	0.189 9	103.72	100.04	0.48
	0.123 9	0.062 4	0.186 5	100.37		
	0.124 8	0.062 4	0.191 3	106.50		
	0.124 1	0.124 8	0.248 6	99.77		
	0.123 4	0.124 8	0.248 6	100.33		
	0.124 7	0.124 8	0.251 1	101.35		
	0.123 8	0.187 1	0.303 3	95.93		
	0.124 2	0.187 1	0.303 0	95.49		
	0.124 0	0.187 1	0.305 4	96.94		
甘草素	0.033 6	0.016 4	0.050 0	100.09	100.89	0.81
	0.033 7	0.016 4	0.050 4	101.42		
	0.033 9	0.016 4	0.049 8	96.45		
	0.033 8	0.032 9	0.067 6	102.77		
	0.033 0	0.032 9	0.065 7	99.34		
	0.033 8	0.032 9	0.067 7	102.77		
	0.033 1	0.049 3	0.082 8	100.66		
	0.033 1	0.049 3	0.083 9	103.00		
	0.033 7	0.049 3	0.083 8	101.54		
甘草酸	3.077 3	1.469 8	4.532 0	98.98	96.61	0.79
	3.108 0	1.469 8	4.557 8	98.64		
	3.087 5	1.469 8	4.547 9	99.36		
	3.103 9	2.939 6	5.900 1	95.12		
	3.021 9	2.939 6	5.842 8	95.97		
	3.099 8	2.939 6	5.898 3	95.20		
	3.083 4	4.409 3	7.274 7	95.06		
	3.030 1	4.409 3	7.242 4	95.53		
	3.089 6	4.409 3	7.306 0	95.62		

## 2.4 精密度试验

取甘草饮片粉末约 0.15 g,精密称定,制备供试品溶液,按“2.2”项下条件连续进样 6 次,测得甘草苷、异甘草苷、甘草素、甘草酸峰面积的 RSD 分别为 0.74%、1.09%、0.68%、0.50%,表明精密度良好。

## 2.5 重复性试验

取甘草饮片粉末约 0.15 g,共 6 份,精密称定,制备供试品溶液,按“2.2”项下条件进样,测得甘草苷、异甘草苷、甘草素及甘草酸平均含量分别为 5.81、0.824、0.224、20.5 mg·g<sup>-1</sup>;RSD 分别为 2.19%、1.89%、1.37%、2.34%,表明方法的重复性良好。

## 2.6 加样回收率试验

称取已知含量(甘草苷、异甘草苷、甘草素及甘草酸的含量分别为 5.81、0.824、0.224、20.5 mg·g<sup>-1</sup>)的甘草药材粉末共 9 份,每份约 0.15 g,精密称定,分别准确加入甘草苷、异甘草苷、甘草素、甘草酸的对照品储备液适量,制备供试品溶液,按“2.2”项下条件进样,计算回收率,结果见表 3。结果表明该方法的加样回收率符合要求。

## 2.7 样品含量测定

取不同批次甘草药材,制备供试品溶液,按“2.2”项下条件进样测定,结果见图 2。以外标法计算样品含量,结果见表 4。

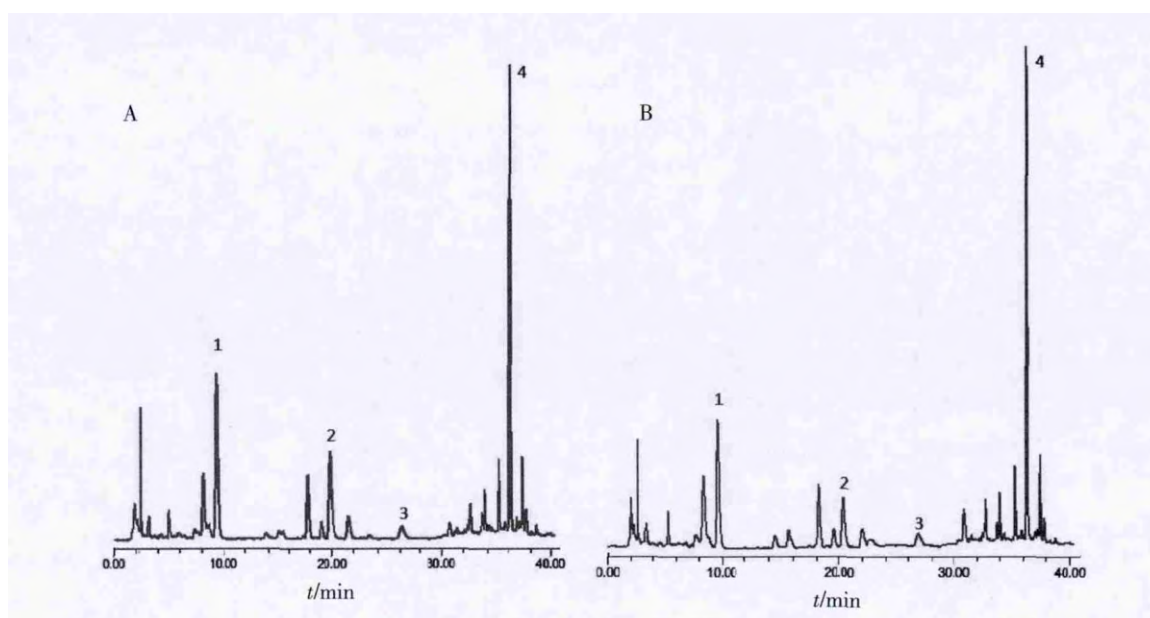


图 2 甘草饮片(A)和甘草头(B)的 HPLC 图

注:1.甘草苷;2.异甘草苷;3.甘草素;4.甘草酸。

表 4 甘草及甘草头含量测定( $n=3$ )

批次	甘草苷/%	异甘草苷/%	甘草素/%	甘草酸/%
甘草-1	0.567±0.003	0.053 3±0.001 1	0.018 7±0.000 1	1.830±0.008
甘草-2	0.404±0.003	0.059 6±0.001 2	0.038 6±0.001 4	1.754±0.008
甘草-3	0.541±0.001	0.072 9±0.000 5	0.053 3±0.000 3	2.057±0.012
甘草-4	0.525±0.003	0.071 2±0.000 3	0.093 9±0.001 2	2.276±0.008
甘草-5	0.530±0.003	0.107 3±0.002 0	0.037 6±0.000 5	1.808±0.008
甘草饮片平均值	0.513±0.003	0.072 9±0.001 0	0.048 4±0.000 7	1.945±0.009
甘草头-6	0.506±0.002	0.073 8±0.000 9	0.021 5±0.000 2	1.776±0.019
甘草头-7	0.406±0.003	0.053 4±0.001 2	0.050 8±0.000 8	1.484±0.046
甘草头平均值	0.456±0.003	0.063 6±0.001 1	0.036 2±0.000 5	1.630±0.033

## 3 讨论

本文建立 HPLC 法同时测定甘草中甘草苷、异甘草苷、甘草素和甘草酸 4 种成分在甘草中的含量差异较大,最大吸收波长也不相同,采用 DAD 检测器同时测定,提高了不同成分检测的灵敏度。结果显示,该方法方便、准确、灵敏度高,重复性好,可用于甘草的质量评价。

本文选取产自瓜州的不同批次甘草饮片和甘草头,测定了甘草苷、异甘草苷、甘草素和甘草酸 4 个成分的含量。结果表明,甘草饮片及甘草头中均含有这 4 种成分,从多批测定结果分析,不同批次间同一成分的含量存在差异。其中甘草苷和甘草酸含量在不同批次间比较接近,而异甘草苷和甘草素在批次间含量差异比较大且比例也有变化,提示这两个成分更能体现不同批次甘草饮片质量的差异。

2010 版《中国药典》规定甘草药用部位为根及根茎<sup>[9]</sup>,而甘草头往往作为饮片生产中的边角料被弃之不用。在临床研究中甘草具有清热解毒、止咳祛痰、缓急止痛、补脾和胃及调和诸药的功效<sup>[10]</sup>,而甘草头具有善行瘀血、消肿痛,用于金疮肿毒的功效<sup>[11]</sup>。由表 3 可知,甘草饮片和甘草头中 4 种成分的含量差别不大,其中异甘草苷和甘草素甚至有个

别批次略大于甘草饮片,可考虑将其作为活性成分提取的原料。本文研究结果为甘草头药用价值的开发利用提供依据。

## 参考文献

- 1 王月辉,乔斌,蒋建英,等.甘草药材 HPLC 指纹图谱的研究.化学工业与工程,2006,23(3):250~253.
- 2 王振辉,李超生,王海森,等.甘草苷提取工艺正交试验优化.中国实验方剂学杂志,2011,17(10):30~32.
- 3 周翠,杨燕云,张振秋,等.波长切换 HPLC 法同时测定甘草及其炮制品中 7 个物质的含量.药物分析杂志,2011,31(11):2067~2072.
- 4 李成义,马艳茹.西北地区商品甘草 HPLC 指纹图谱.中国实验方剂学杂志,2012,18(9):129~132.
- 5 王海军.当年甘草套种孜然高培技术.甘肃农业科技,2012(5):57~58.
- 6 赵光毅,朱秋莲,聂红霞,等.瓜州县乌拉尔甘草一体化栽培技术.农业科技与信息,2012(2):59~60.
- 7 赵晓莉,崔小兵,吴皓.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.中成药,2002,24(3):175~178.
- 8 李伟,王跃飞,文红梅,等.HPLC-DAD 同时分析甘草中 7 种有效成分.中国药学杂志,2008,43(24):1914~1918.
- 9 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部).北京:中国医药科技出版社,2010:80~81.
- 10 付玉杰,祖元刚,赵春建,等.RP-HPLC 法测定甘草中甘草苷和异甘草苷的含量.中草药,2004,35(5):576~577.
- 11 关红霞,姚丽蓉.试论甘草在临床的合理应用.新疆中医药,2010,28(4):51~52.

### Simultaneous Determination of Four Constituents in Roots and Knotty Rhizome of *Glycyrrhiza uralensis* by HPLC

Guo Mingye, Zhang Yanling, Li Yang, Shi Xinyuan

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

**Abstract:** This study was aimed to establish an HPLC method for the determination of liquiritin, isoliquiritin, liquiritigenin and glycyrrhizic acid in roots and knotty rhizome of *Glycyrrhiza uralensis*. The analysis was performed on a Diamonsil C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) by using a gradient elution with mobile phase of water, phosphoric acid, acetonitrile at the flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was 276 nm (0~18 min), 360 nm (18~24 min), 276 nm(24~30 min), and 250 nm (30~65 min). The column temperature was set at 30°C. The results showed that the linear range of iquiritin, isoliquiritin, liquiritigenin, glycyrrhizic acid was 0.108 5~1.085、0.016 8~0.168、0.0049 4~0.049 4、0.407~4.07μg, respectively. The average recoveries of four constituents were 96.61%~100.89%, with RSD ≤ 0.81%. The contents of four constituents in roots of five batches were 0.513%, 0.072 9%, 0.048 4%, and 1.945%, respectively. Contents of four constituents in knotty rhizome from two batches were 0.456%, 0.063 6%, 0.036 2%, and 1.630%, respectively. It was concluded that

(World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica) 362

there was good linear relationship between the response and concentration. Contents of four constituents in knotty rhizome were basically the same as those in the roots. The knotty rhizome can be used as raw material for the extraction of active components.

**Keywords:** *Glycyrrhiza uralensis*, knotty licorice rhizome, HPLC, liquiritin, isoliquiritin, liquiritigenin, glycyrrhizic acid

(责任编辑:叶丽萍 张志华,责任译审:王 晶)