

HPLC法测定不同产地甘草中光甘草定的含量

胡新华^{1,2*}, 陈玩珊², 袁劲松^{3#}(1.汕头大学医学院, 广东 汕头 515000; 2.深圳市人民医院中药库, 广东 深圳 518000; 3.北京大学深圳医院药剂科, 广东 深圳 518000)

中图分类号 R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)06-0824-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.06.33

摘要 目的:建立测定甘草中光甘草定含量的方法,并对不同产地甘草中光甘草定的含量进行测定。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Inertsil ODS,流动相为乙腈-0.05%磷酸(梯度洗脱),流速为 0.8 ml/min,检测波长为 280 nm,柱温为 35 ℃,进样量为 20 μl。结果:光甘草定的检测进样量线性范围为 0.906~18.12 μg/ml($r=0.9997$);精密性、稳定性、重复性试验的 RSD<3%;加样回收率为 98.73%~101.90%, RSD=1.25% ($n=6$)。不同产地甘草中光甘草定的含量差异明显。结论:该方法操作简单、精密度高、结果准确,可用于甘草中光甘草定的含量测定。

关键词 高效液相色谱法;甘草;不同产地;光甘草定;含量测定

Content Determination of Glabridin in Glycyrrhizae Radix et Rhizoma from Different Regions by HPLC

HU Xinhua^{1,2}, CHEN Wanshan², YUAN Jinsong³(1.College of Medicine, Shantou University, Guangdong Shantou 515000, China; 2.Traditional Chinese Pharmacy of Shenzhen People's Hospital, Guangdong Shenzhen 518000, China; 3.Dept. of Pharmacy, Shenzhen Hospital of Peking University, Guangdong Shenzhen 518000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of glabridin in Glycyrrhizae Radix et Rhizoma from different regions. METHODS: HPLC was performed on the column of Inertsil ODS-SP with mobile phase of acetonitrile-0.05% phosphoric acid (gradient elution) at a flow rate of 0.8 ml/min, detection wavelength was 280 nm, the column temperature was 35 ℃, and the injection volume was 20 μl. RESULTS: The linear range of glabridin was 0.906-18.12 μg/ml($r=0.9997$), RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 3%; recovery was 98.73%-101.90% (RSD=1.25%, $n=6$). There were obvious differences among the glabridin contents in *G. uralensis* from different regions. CONCLUSIONS: The method is simple and accurate with high precision, and can be used for the content determination of glabridin in Glycyrrhizae Radix et Rhizoma.

KEYWORDS HPLC; Glycyrrhizae Radix et Rhizoma; Different regions; Glabridin; Content determination

甘草 Glycyrrhizae Radix et Rhizoma 为豆科甘草属乌拉尔甘草、胀果甘草或光果甘草的干燥根和根茎^[1],其中光果甘草中的特有成分光甘草定越来越受到人们的重视^[2]。现代药理研究表明,光甘草定具有调节免疫^[3]、降血脂^[4]、降血糖^[5]、类雌激素^[6]、抗菌^[7]、抗氧化^[8-9]等作用。此外,光甘草定在心血管疾病的预防上也有良好的发展前景^[10];在美容界,光甘草定更有着“美白黄金”的称号^[11]。以上足以说明光甘草定在医药界、食品界、美容界的重要性^[12]。甘草产地众多,寻找光甘草定含量较高的甘草产地就显得尤为重要。因此,采用高效液相色谱(HPLC)法对 21 个不同产地甘草中的光甘草定进行了含量测定^[13-14]。

1 材料

1.1 仪器

20A 型 HPLC 仪,包括 SIL-20A 型自动进样器、SPD-M20A 型紫外检测器、LC solution 色谱工作站(日本 Shimadzu 公司);MS105DU 型十万分之一电子天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司);KQ-500DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率:500 W,频率:40 kHz)。

* 主管中药师,硕士研究生。研究方向:药学。电话:0755-22942678。E-mail:huxinhua2015@163.com

通信作者:主任中药师,硕士。研究方向:药学。电话:0755-83923333。E-mail:yjs888@163.com

1.2 试剂

光甘草定对照品(中药固体制剂制造技术国家工程研究中心,批号:G10-130615,纯度≥98%);乙腈为色谱纯,甲醇、磷酸为分析纯,水为双蒸水。

1.3 药材

甘草经北京大学深圳医院药剂科主任中药师袁劲松鉴定为真品。甘草的产地和批号见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Inertsil ODS(250 mm×46 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.05%磷酸(B)水溶液;梯度洗脱(洗脱程序见表 2);流速:0.8 ml/min;检测波长:280 nm;柱温:35 ℃;进样量:20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取光甘草定对照品适量,精密称定,置于 10 ml 棕色量瓶中,加 70% 甲醇溶解并定容,摇匀,制成质量浓度为 302 μg/ml 的光甘草定对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取甘草药材样品打成粗粉(过 1 号筛),取上述粗粉 1 g,精密称定,置于 150 ml 具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 100 ml,称定质量,超声处理 30 min,放至室温(25 ℃),再次称定质量,用 70% 甲醇补足缺失的质量,滤过,取续滤液,即得。

2.3 系统适用性试验

表1 甘草的产地和批号

Tab 1 *Clycyrrhizae Radix et Rhizoma* from different regions and batches numbers

产地	批号
乌兹别克斯坦	20131216A
中国新疆沙雅县	20131216B
中国新疆拜城县	20131216C
哈萨克斯坦	20131216D
中国新疆温宿县	20131216E
阿塞拜疆	20131227F
中国新疆阿拉尔市和田河	20131227G
中国新疆阿拉尔市卡尔顿	20131227H
中国新疆阿克苏地区五团	20131227I
中国新疆阿拉尔市十四团	20131227J
中国新疆博湖县水工六连	20131227K
中国新疆阿拉尔市十六团	20131227L
中国新疆和田地区墨玉县	20131227M
中国新疆和田地区洛浦县	20131227N
哈萨克斯坦南	20131227O
中国新疆喀什地区巴楚县	20131227P
中国新疆阿拉尔市三河聚	20131227Q
中国新疆阿拉尔市	20131227R
中国新疆和田县	20120924S
中国新疆阿瓦提县	20120924T
中国新疆伊犁州	20120924U

表2 梯度洗脱程序
Tab 2 Gradient elution program

时间, min	A, %	B, %
0	25	75
10	40	60
25	53	47
40	53	47
45	80	20
59	25	75

分别精密量取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,光甘草定的色谱峰可达到基线分离,分离度>1.5,理论板数>40 000。

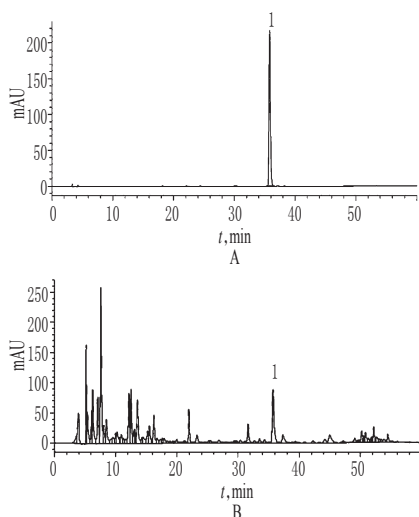


图1 高效液相色谱图

A. 对照品; B. 供试品; 1. 光甘草定

Fig 1 HPLC chromatographs

A. reference substance; B. test sample; 1. glabridin

2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”项下光甘草定对照品溶液 3 ml, 置于 10 ml 量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 即得质量浓度为 90.6 μg/ml 的对照品贮备液。分别精密吸取上述贮备液 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 ml, 分别置于 10 ml 量瓶中, 加 70% 甲醇定容, 摇匀, 即得质量浓度分别为 0.906、4.503、9.06、13.59、18.12 μg/ml 的系列对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以光甘草定质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归, 得光甘草定的回归方程为 $y = 55\ 922x + 38\ 060$ ($r = 0.999\ 7$)。结果表明, 光甘草定的检测质量浓度线性范围为 0.906~18.12 μg/ml。

2.5 检测限和定量限考察

取“2.4”项下最低质量浓度的对照品溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 按信噪比为 3:1 计算, 光甘草定的检测限为 0.14 μg/ml; 按信噪比为 10:1 计算, 光甘草定的定量限为 0.46 μg/ml。

2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下对照品溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 光甘草定峰面积的 RSD=0.60% ($n=6$), 表明本试验精密度良好。

2.7 稳定性试验

取甘草样品(批号: 20131227H) 1 g, 精密称定, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别于放置 0、2、4、8、12、24 h 时按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果, 光甘草定峰面积的 RSD=0.42% ($n=6$), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取甘草样品(批号: 20131227H) 6 份, 每份 1 g, 精密称定, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 光甘草定峰面积的 RSD=2.32% ($n=6$), 说明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取甘草样品(批号: 20131227H) 6 份, 每份 0.5 g, 精密称定, 置于 150 ml 具塞锥形瓶中, 分别加光甘草定对照品适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下方法进样测定, 记录峰面积并计算加样回收率, 结果见表 3。

表3 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 3 Results of recovery test(n=6)

称样量, g	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
0.502 1	803.36	812	1612.54	99.65		
0.499 8	799.68	798	1608.20	101.32		
0.487 5	780.00	803	1588.48	100.68	100.67	1.25
0.512 0	819.20	815	1623.89	98.73		
0.502 3	803.68	806	1625.01	101.90		
0.512 1	819.36	796	1629.22	101.74		

2.10 样品含量测定

取不同产地和批号的甘草各 1 g, 精密称定, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算样品含量, 结果见表 4。

3 讨论

3.1 流动相的选择

笔者就流动相进行了考察, 曾尝试采用甲醇-0.05% 磷酸为流动相, 采用梯度洗脱方式对流动相进行处理, 结果通过不断调整梯度洗脱程序后, 发现光甘草定仍得不到较好的分离度。于是, 参考相关文献^[12]对流动相进行调整, 笔者采用乙

表4 样品含量测定结果(n=3)

Tab 4 Results of contents determination of samples(n=3)

样品批号	光甘草定, %	样品批号	光甘草定, %
20131216A	0.20	20131227L	未检测到
20131216B	未检测到	20131227M	未检测到
20131216C	未检测到	20131227N	未检测到
20131216D	0.19	20131227O	0.23
20131216E	未检测到	20131227P	0.03
20131227F	0.12	20131227Q	0.09
20131227G	未检测到	20131227R	0.07
20131227H	0.16	20120924S	0.20
20131227I	未检测到	20120924T	0.02
20131227J	未检测到	20120924U	0.02
20131227K	0.12		

睛-0.05%磷酸为流动相,结果通过多次调整梯度洗脱程序后,光甘草定能得到较好的分离度。

3.2 对含量测定结果的分析

产地是甘草质量的重要影响因素。甘草在我国的主要产地有内蒙古、甘肃、新疆等,其中光甘草定主要分布于新疆、青海等地^[15]。为了考察不同产地中光甘草定的含量,笔者采集了21个不同产地的甘草,主要来自新疆和新疆以北的哈萨克斯坦、阿塞拜疆等地。由含量测定结果可知,沙雅、拜城、温宿、和田河、五团、十四团、十六团、和田墨玉、和田洛浦等地的甘草中均未检测到光甘草定;巴楚、阿瓦提、伊犁等地的甘草光甘草定含量较低(含量为0.02~0.03%);乌兹别克斯坦、哈萨克斯坦、阿塞拜疆、卡尔顿、哈萨克斯坦南等地的光甘草定含量较高,均大于0.1%,特别是哈萨克斯坦南部地区的甘草中光甘草定的含量较高,约为0.23%,说明不同产地甘草中光甘草定的含量存在明显差异。

综上所述,本方法操作简单、精密度高、结果准确,可用于甘草中光甘草定的含量测定。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:80.
- [2] 汪忠波,蔡明忠.高效液相色谱法测定不同种类甘草中光甘草定的含量[J].湖北中医杂志,2011,33(12):74.

- [3] 王晓利,聊城水,程源斌,等.甘草甜素甘草多糖和光甘草定对小鼠巨噬细胞的毒性和免疫功能的调节[J].中国兽医科学,2014,44(3):320.
- [4] 骆从艳,王新春,江发寿,等.RP-HPLC测定光果甘草中光甘草定的含量[J].农垦医学,2009,31(4):311.
- [5] 闵杰,木合布力·阿布力孜,孟磊,等.RP-HPLC测定不同产地光果甘草废渣中光甘草定含量[J].中国现代应用药学,2010,27(7):637.
- [6] 徐岩,张清溪,袁其朋,等.响应面法优化超声提取光果甘草中光甘草定的工艺研究[J].食品科技,2009,34(12):235.
- [7] 赵全民,于录,邓旭明,等.中药单体化合物光甘草定的体外抗菌活性研究[J].中国预防兽医学报,2010,32(3):225.
- [8] 骆从艳,慕春海,王园姬,等.光甘草定抑制酪氨酸酶及体外抗氧化活性的研究[J].中药材,2010,33(11):1776.
- [9] 木合布力·阿布力孜,热娜·卡斯木,马淑艳,等.甘草中光甘草定的提取和抗氧化活性研究[J].天然药物研究与开发,2007,19(4):675.
- [10] 赛力曼·哈得尔,李宏智,木合布力·阿布力孜,等.新疆甘草黄酮类成分光甘草定的制备工艺改进[J].亚太传统医药,2008,4(9):27.
- [11] 杜茹芸,陆志芸,虞成华.高效液相色谱法测定化妆品中光甘草定的含量[J].香料香精化妆品,2014,8(4):35.
- [12] 郭瑞丽,李雪琴,张晓鹏.光果甘草中光甘草定的微波辅助提取研究[J].时珍国医国药,2011,22(8):1817.
- [13] 李红霞,王雪芹,李振国,等.不同产地金银花与山银花主要成分的含量比较[J].中国药房,2011,22(31):2935.
- [14] 李霞,李巍,张化,等.HPLC测定3种甘草废渣中光甘草定的含量[J].中国现代中药,2011,13(6):24.
- [15] 范玉涵,王银军,张爱军,等.光甘草定提取工艺的优化及分离[J].宁夏医科大学学报,2014,36(1):111.

(收稿日期:2015-08-31 修回日期:2015-12-09)

(编辑:刘柳)

全国医疗器械监督管理工作会议在京召开

本刊讯 2016年1月21至22日,全国医疗器械监督管理工作会议在京召开。会议贯彻落实2016年全国食品药品监督管理暨党风廉政建设工作会议精神,全面总结2015年全国医疗器械监督管理工作,深入分析当前面临的形势,部署2016年医疗器械监督管理重点工作。

会议指出,2015年是全面完成“十二五”、精心谋划“十三五”的关键之年,也是食品药品监管领域重要改革之年,各级食品药品监管部门认真贯彻党中央、国务院的决策部署,大力推动落实“四有两责”,医疗器械监管工作取得新进展。一是全面贯彻落实《医疗器械监督管理条例》,制定出台相关配套

规章和规范性文件,医疗器械监管法规体系基本形成,大力加强法规培训,确保法规制度有效执行;二是提升审评审批质量和效率,加快对创新产品的审评审批,医疗器械审评审批制度改革取得初步成效;三是强化风险管理,采取防控措施,加强生产、经营、使用全程监管,医疗器械监管工作切实加强;四是圆满完成“十二五”规划任务,建立完善医疗器械法规、标准、检验检测、不良事件监测体系,医疗器械安全责任体系初步形成;五是医疗器械国际交流合作进一步深化,取得了丰富成果,借鉴国际经验,提高我国医疗器械监管水平。