

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.05.03

UPLC – PDA 法测定甘草浸膏中甘草苷和甘草酸的含量

魏秀丽¹, 张传津^{1*}, 冯言言², 崔进², 李有志¹, 徐恩民¹

(1. 山东省兽药质量检验所, 山东省畜产品质量安全监测与风险评估重点实验室, 动物源细菌耐药性监测与精准化用药山东省工程实验室, 山东省动物用中药制剂工程实验室, 济南 250022; 2. 齐鲁动物保健品有限公司, 济南 250100)

[收稿日期] 2020-01-28 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 05-0018-07 [中图分类号] S859.79

[摘要] 建立超高效液相色谱(UPLC)测定甘草浸膏中主成分甘草苷和甘草酸的含量。采用反相高效液相色谱法对甘草苷和甘草酸进行色谱分离和快速定量测定。以 ACQUITY UPLC™ T₃ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm)为分离柱, 柱温: 35 ℃; 以乙腈-水(0.1% 冰乙酸 + 5 mmol/L 醋酸铵)进行梯度洗脱; 流速: 0.35 mL/min; 进样量: 1 μL; 检测波长为 232 nm。通过光谱图、保留时间和峰面积参数对甘草苷和甘草酸进行定性定量检测。甘草苷在 1~20 μg/mL 范围内线性关系良好($R^2 > 0.999$), 方法检出限为 0.5 μg/mL, 定量限为 1 μg/mL; 甘草酸在 10~200 μg/mL 范围内线性良好($R^2 > 0.999$), 方法检出限为 5 μg/mL, 定量限为 10 μg/mL, 完全满足检测需求。该方法色谱分离较好, 分析速度较快, 前处理简单, 适用于甘草浸膏中甘草苷和甘草酸的定性定量检测。

[关键词] 甘草浸膏; 超高效液相色谱法; 甘草苷; 甘草酸

Determination of Liquiritin and Glycyrrhizic Acid in Extractum Glycyrrhizae by UPLC – PDA

WEI Xiu-li¹, ZHANG Chuan-jin^{1*}, FENG Yan-yan², CUI Jin², LI You-zhi¹, XU En-min¹

(1. Institute of Veterinary Drug Quality Inspection of Shandong Province, Shandong Provincial Key Laboratory of Quality Safety Monitoring and Risk Assessment for Animal Products, China Shandong Engineering Laboratory for

Drug Resistance Monitoring and Precise Drug Use of Animal Origin Bacteria, Shandong Engineering Laboratory for

Chinese Traditional Medicine For Animal, Jinan 250022, China; 2. Qilu Animal Health Products Co., Ltd, Jinan 250100, China)

Corresponding author: ZHANG Chuan-jin, E-mail: 1153702137@qq.com

Abstract: This study aims to establish a high performance liquid chromatography (UPLC – PDA) test method for the determination of liquiritin and glycyrrhizic acid in extractum glycyrrhizae. UPLC was used to isolate and quantitatively determine liquiritin and glycyrrhizic acid. ACQUITY UPLC™ T₃ chromatographic column (2.1 mm × 100 mm, 1.8 mm) was used as the separation column, column temperature 35 ℃; gradient elution was performed

基金项目: 2019 年山东省农业重大应用技术创新项目“蛋鸡安全生产关键技术集成创新与示范”(SD2019XM004)

作者简介: 魏秀丽, 高级兽医师, 从事兽药和畜禽产品质量监督检验、标准制修订及新兽药研发工作。

通讯作者: 张传津。E-mail: 1153702137@qq.com

with acetonitrile – water (0.1% glacial acetic acid + 5 mmol/L ammonium acetate) solution as mobile phase; The flow rate was 0.35 mL/min, the injection volume was 1 μ L, and the wavelength was 232 nm. In this paper, the quantitative and qualitative determination of liquiritin and glycyrrhizic acid was carried out by spectrogram, retention time and peak area parameters. In the range of 1 ~ 20 μ g/mL of liquiritin, the linear relationship was good ($R^2 > 0.999$); the limit of detection was 0.5 μ g/mL, and the limit of quantitation was 1 μ g/mL; In the range of 10 ~ 200 μ g/mL of glycyrrhizic acid, the linear relationship was good ($R^2 > 0.999$); The limit of detection was 5 μ g/mL ($S/N > 3$), and the limit of quantitation was 10 μ g/mL ($S/N > 10$), which fully met the requirements. The test method was suitable for the qualitative and quantitative determination of liquiritin and glycyrrhizic acid in extractum glycyrrhizae for its good separation, quick analysis and easy sample treatment performance.

Key words: extractum glycyrrhizae; high performance liquid chromatography method; liquiritin; glycyrrhizic acid

甘草浸膏活性成分主要包括甘草苷、甘草酸, 在人医临床用于治疗支气管哮喘、咽炎、支气管炎等; 在兽医临床也用于缓解改善动物呼吸道疾病的症状, 主要功效为祛痰止咳, 也是制作甘草颗粒、甘草流浸膏等的原料。在中国药典和兽药典等文献中甘草浸膏或其他甘草制剂对甘草苷、甘草酸的含量测定均采用普通高效液相色谱方法^[1-7], 检测时间长。本实验研究了超高效液相色谱 – 二极管阵列检测法(UPLC – PDA)测定甘草浸膏中甘草苷和甘草酸的含量, 简单快速, 经济环保。

1 材料与方法

1.1 药品及试剂 甘草酸铵对照品, 批号 11073 – 2017020, 含量 97.7%, 中国食品药品检定研究院。甘草苷对照品, 批号 111610 – 201005, 含量 94.9%, 中国药品生物制品检定所。乙腈、冰醋酸、醋酸铵均为色谱纯; 乙醇分析纯; 超纯水。甘草浸膏, 来自兽药生产企业报批产品。

1.2 仪器 Waters Acquity™ Ultra performance LC 超高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; Waters2695 高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司。

1.3 方法

1.3.1 供试品溶液制备 精密称取本品研细后的粉末, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 乙醇 100 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理 30 min, 取出, 放冷, 再称定重量, 用 70% 乙醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

1.3.2 标准储备液的制备 精密称取甘草苷对照

品 0.02012 g, 置 50 mL 量瓶中, 加 70% 乙醇使溶解并稀释至刻度, 摇匀; 精密称取甘草酸铵对照品 (折合甘草酸为 0.01959 g), 置 100 mL 量瓶中, 加 70% 乙醇使溶解并稀释至刻度, 摇匀。

1.3.3 标准工作液的制备 取两种储备液适量, 配置成混合对照品溶液: 每 1 mL 含甘草苷 200 μ g、甘草酸 20 μ g 的溶液。依次倍比稀释得一系列标准曲线工作液: 10 μ g/mL 甘草苷 100 μ g/mL 甘草酸、5 μ g/mL 甘草苷 50 μ g/mL 甘草酸、2 μ g/mL 甘草苷 20 μ g/mL 甘草酸、1 μ g/mL 甘草苷 10 μ g/mL 甘草酸、0.5 μ g/mL 甘草苷 5 μ g/mL 甘草酸、0.2 μ g/mL 甘草苷 2 μ g/mL 甘草酸。

1.3.4 色谱操作条件及参数 色谱柱: T3 色谱柱 (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.8 μ m); 以乙腈为流动相 A, 0.1% 冰乙酸 + 5 mmol/L 醋酸铵为流动相 B, 按表 1 规定进行梯度洗脱; 二极管阵列检测器, 扫描范围 190 ~ 400 nm, 检测波长 232 nm, 柱温 35 $^{\circ}$ C, 进样室温度 10 $^{\circ}$ C, 流速为 0.35 mL/min, 进样量 1 μ L。

1.3.5 重复性试验和精密度试验 精密吸取甘草苷对照品溶液和甘草酸对照品溶液, 制成每 1 mL 含甘草苷 10 μ g、甘草酸 100 μ g 的混合对照品溶液, 重复配置 6 份, 进样, 计算甘草苷、甘草酸峰面积 RSD。

精密吸取甘草苷对照品溶液和甘草酸对照品溶液, 制成每 1 mL 含甘草苷 10 μ g、甘草酸 100 μ g 的混合对照品溶液, 重复进样 6 次, 计算甘草苷、甘草酸峰面积 RSD。

表 1 梯度洗脱条件表

Tab 1 Gradient elution condition

时间/min	流动相 A/% (乙腈)	流动相 B/% 水(0.1%冰乙酸+ 5mmol/L 醋酸铵)	曲线
0	10	90	
0~1	10→20	90→80	6
1~4.5	20	80	6
4.5~7	20→30	80→70	6
7~9	30→40	70→60	6
9~10	40→30	60→70	6
10~10.5	30→10	70→90	6
10.5~11	10	90	6

1.3.6 检测限和定量限的测定 对甘草苷、甘草酸的标准工作液进行 UPLC 分析,并逐级降低其浓度,以溶液检测时的信噪比(S/N)分别大于等于 3 和 10 作为药物的检测限和定量限。

1.3.7 不同色谱条件样品检测比较 使用高效液相色谱仪(参照中华人民共和国兽药典 2015 年版甘草浸膏质量标准色谱条件^[1],流速 1.0 mL/min;进样量 10 μL)和超高效液相色谱仪在不同的色谱条件下运行,对同一样品中两主成分甘草苷、甘草酸的含量和出峰时间分别进行比较。

1.3.8 稳定性试验 进样室温度设置到 10 ℃。取 1.3.5 项下 10 μg/mL 甘草苷 100 μg/mL 甘草酸溶液,在 10 ℃放置 3、6、12、24 h,各进样 1 μL,计算甘草苷、甘草酸各自的峰面积 RSD。

2 结果与分析

2.1 色谱分离 在优化的色谱条件下,测得甘草苷、甘草酸色谱峰峰形良好,且均达到基线分离,在 1.3.4 项条件下,甘草苷、甘草酸对照品和甘草浸膏样品待测液色谱保留时间为 3.17、8.95 min 左右,分离度均满足要求。

2.2 线性 在选定的色谱条件下,使用梯度洗脱的方法,可以有效地分离目的峰,甘草酸在 10~200 μg/mL 范围内的标准曲线: $y = 1167.9x + 1986.4$, $R^2 > 0.999$;甘草苷在 1~20 μg/mL 范围内的标准曲线: $y = 7348.3x + 1104.8$, $R^2 = 0.999$ 。

理论塔板数:甘草酸、甘草苷均大于 20000,分离度大于 4.9,对称因子 1.1。校正曲线见图 1 - 图 2。

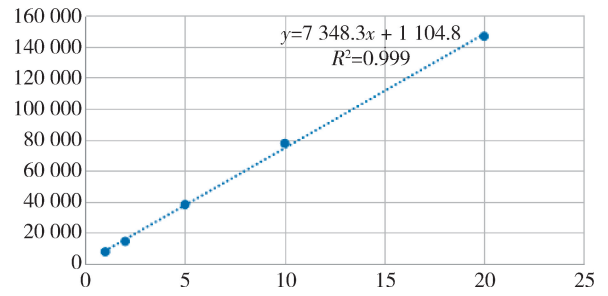


图 1 甘草苷标准曲线

Fig 1 Standard curve of liquiritin

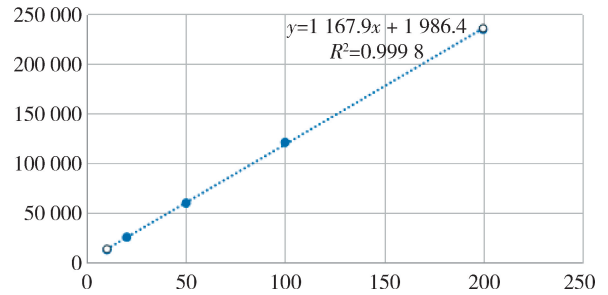


图 2 甘草酸标准曲线

Fig 2 Standard curve of glycyrrhizic acid

2.3 重复性试验和精密度试验 配制 10 μg/mL 甘草苷 100 μg/mL 甘草酸对照品溶液,重复配置 6 份,进样,计算甘草苷、甘草酸峰面积 RSD 分别为 0.53%、0.48%,满足实验要求。

取 10 μg/mL 甘草苷 100 μg/mL 甘草酸对照品溶液,重复进样 6 次,计算甘草苷、甘草酸峰面积 RSD 分别为 0.41%、0.39%,满足实验要求。

2.4 检测限和定量限 0.5 μg/mL 甘草苷 5 μg/mL 甘草酸对照品溶液信噪比大于 3 为检出限,1 μg/mL 甘草苷 10 μg/mL 甘草酸对照品溶液信噪比大于 10 为定量限。

2.5 不同色谱条件样品检测结果比较 不同波长下的主成分响应值的比较见表 2。通过响应值比较及光谱图各成分的最大吸收波长,并顾及两种成分的峰面积平衡,选择 232 nm。色谱图见图 3 - 图 13。

表 2 不同波长下的主成分相应情况

不同波长	对照品 UPLC		样品 1 UPLC			
	甘草苷峰面积	甘草酸峰面积	甘草苷峰面积	甘草酸峰面积	分离度	对称因子
237 nm	117791	341364	89456	305103	4.98	1.1
252 nm	31962	496480	24233	450001	4.98	1.1
232 nm	146623	231521	111780	112294	5.00	1.1

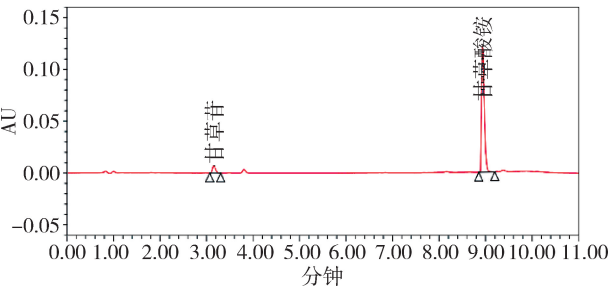


图 3 对照品 20μg/mL 甘草苷 200μg/mL 甘草酸
UPLC 色谱图(252 nm)

Fig 3 UPLC chromatogram of reference solution of
20μg/mL Liquiritin and 200μg/mL glycyrrhizic acid

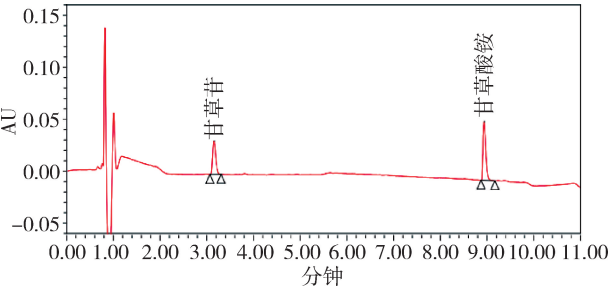


图 4 对照品 20μg/mL 甘草苷 200 μg/mL 甘草酸
UPLC 色谱图(232 nm)

Fig 4 UPLC chromatogram of reference solution of
20 μg/mL Liquiritin and 200 μg/mL glycyrrhizic acid

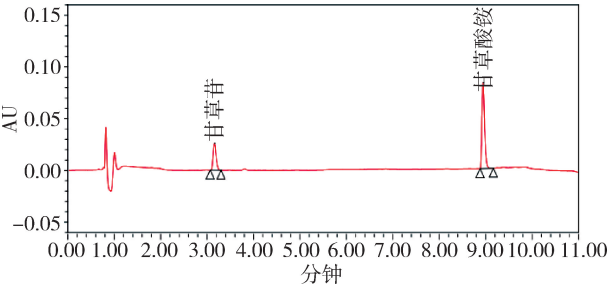


图 5 对照品 20μg/mL 甘草苷 200μg/mL 甘草酸
UPLC 色谱图(237 nm)

Fig 5 UPLC chromatogram of reference solution of
20μg/mL Liquiritin and 200μg/mL glycyrrhizic acid

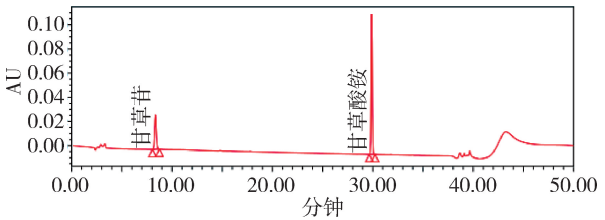


图 6 对照品 20 μg/mL 甘草苷 200 μg/mL 甘草酸
HPLC 色谱图(237 nm)

Fig 6 UPLC chromatogram of reference solution of
20μg/mL Liquiritin and 200μg/mL glycyrrhizic acid

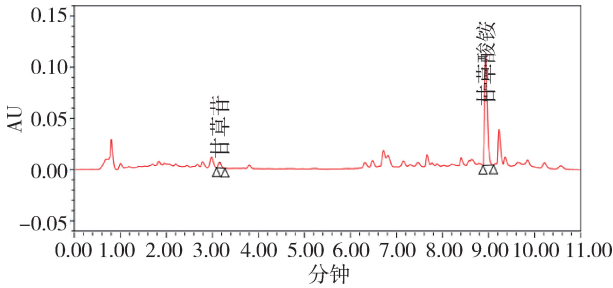


图 7 样品 1 UPLC 色谱图(252 nm)

Fig 7 UPLC chromatogram of sample 1

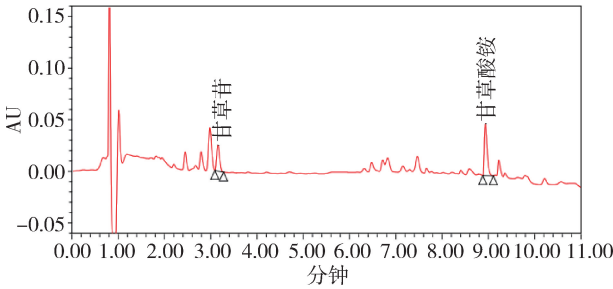


图 8 样品 1 UPLC 色谱图(232 nm)

Fig 8 UPLC chromatogram of sample 1

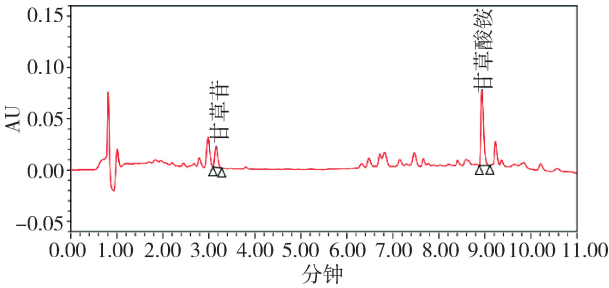


图 9 样品 1 UPLC 色谱图(237 nm)
Fig 9 UPLC chromatogram of sample 1

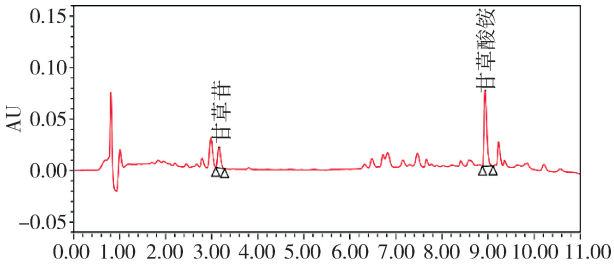


图 12 样品 2 色谱图 UPLC(237 nm)
Fig 12 UPLC chromatogram of sample 2

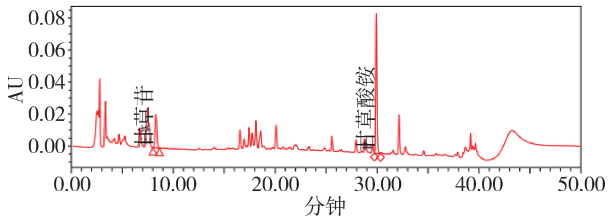


图 10 样品 1 HPLC 色谱图(237 nm)
Fig 10 HPLC chromatogram of sample 1

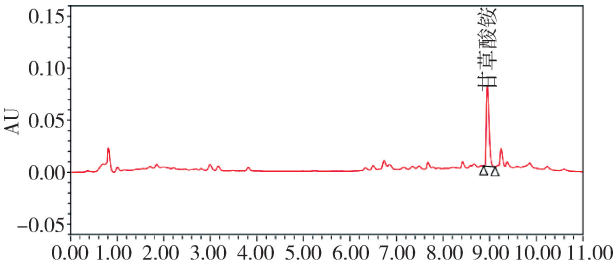


图 13 样品 2 色谱图 UPLC(252 nm)
Fig 13 UPLC chromatogram of sample 2

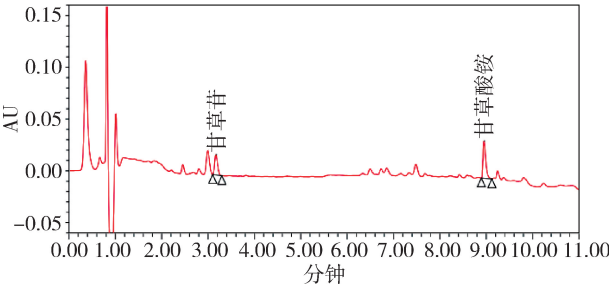


图 11 样品 2 UPLC 色谱图(232 nm)
Fig 11 UPLC chromatogram of sample 2

使用 Waters 超高效液相色谱仪(本实验色谱条件见 1.3.4)和高效液相色谱仪(见 1.3.7),对同一样品中按湿品计算两主成分甘草苷、甘草酸的含量分别进行了比较,无显著差异,相对偏差均小于 1%,表明本实验方法简单可行,结果精确可靠。结果见表 3。

表 3 不同色谱条件检测结果 (n=4)

Tab 3 Test results using different chromatographic method (n=4)

甘草浸膏 不同企业产品	水分/%	甘草苷		甘草酸	
		UPLC	HPLC	UPLC	HPLC
样品 1	8.5	0.705;0.711	0.696;0.704	6.598;6.688	6.590;6.664
	8.5	0.71	0.70	6.63	6.63
样品 2	5.3	0.665;0.669	0.657;0.660	7.567;7.621	7.511;7.601
	5.3	0.67	0.66	7.59	7.56

由于两种色谱方法均已通过其方法学验证,均可以准确控制其指标成分。从检测效率上看,优选超高效法(UPLC),各色谱图见图 3 – 图 10。从样

品噪音和峰形分离度等方面来看,优选超高效液相色谱仪条件,背景更干净,与杂质峰的分离度更好。
2.6 稳定性试验 按照实验方法,将对照品溶液

贮存一段时间后进样,所得到的图谱中甘草苷、甘草酸峰面积 *RSD* 分别为 0.38%、0.46%,说明样品稳定,满足实验要求。

3 讨论与结论

3.1 检测波长的选择 本研究将甘草苷、甘草酸的对照溶液利用 PDA 检测器采集其光谱图,在波长 190 ~ 400 nm 范围内进行扫描,发现甘草苷在 232 nm 处有最大吸收,甘草酸在 252 nm 处有最大吸收,根据光谱图可以判断含有主成分,能替代药典中 2 项鉴别:颜色反应和薄层鉴别,而且快速,不需要繁杂的处理过程,减少了硫酸、正丁醇、乙酸乙酯等多种提取溶剂和薄层展开溶剂,可以节约数小时提取、展开、喷雾等所需要的工作量。

参考兽药典含量测定项中选用的波长 237 nm,在本实验中选择 232、237、252 nm 分别采集色谱图考察其峰面积响应、对称因子以及分离度等,由于甘草苷的响应值较低,最终选择 232 nm 作为检测波长。光谱图见图 14 – 图 15。两者保留时间分别为 3.2、8.9 min。

3.2 流动相流速的比较 超高效液相流动相的流速为 0.35 mL/min,需要运行 11 min,每针运行需要 3.85 mL 流动相;高效液相色谱仪器流速为 1.0 mL/min,运行时间 50 min,每针运行需要 50 mL 流动相。超高效液相色谱更节约实验耗材溶剂等,每运行一针流动相节省 46.15 mL。在废液处理高成本的今天,超高效液相色谱方法更有优势,更经济快捷。

3.3 本方法与药典方法的结果对比 本实验选择了两个企业的甘草浸膏进行含量测定,分别采用高效液相色谱方法和超高效液相色谱方法,甘草浸膏甘草苷和甘草酸含量相对偏差均小于 1%,本方法运行一针需要 11 min,比药典方法 50 min 节约了 39 min 的时间,大大提高检测效率。

本实验建立了超高效液相色谱法对甘草浸膏中甘草苷和甘草酸进行定性和定量测定,具备精准快捷、经济环保的特点,可以作为企业内控标准方法,有效控制甘草浸膏质量。

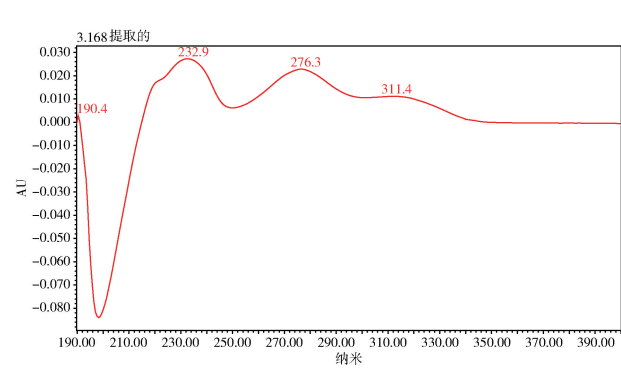


图 14 甘草苷对照溶液光谱图

Fig 14 Control solution spectrum of liquiritin

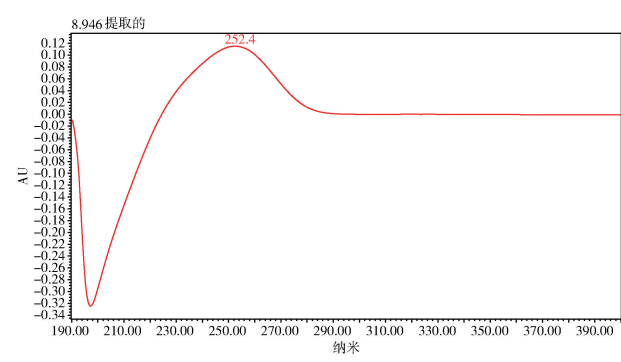


图 15 甘草酸对照溶液光谱图

Fig 15 Control solution spectrum of glycyrrhizic acid

参考文献:

[1] 中华人民共和国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2015 年版[S].
Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 2015 Edition[S].

[2] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版[S].
Commission of Chinese Pharmacopoeia. Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 2015 Edition [S].

[3] 周倩,戴衍朋,王亮,等. HPLC 法测定生甘草、炙甘草中 6 种成分[J]. 中成药, 2016, 38(2): 378 – 382.
Zhou Q, Dai Y P, Wang L, et al. Determination of 6 components in raw licorice and grilled licorice by HPLC[J]. Chinese patent medicine, 2016, 38(2): 378 – 382.

[4] 赵月然,卢丹. HPLC 法同时测定复方甘草片中甘草苷、异甘草苷、甘草素、甘草酸[J]. 中成药, 2014, 36(4): 867 – 869.
Zhao Y R, Lu D. Determination of liquiritin, isoliquiritin, glycyrrhizin and glycyrrhizic Acid in compound licorice tablets by HPLC [J]. Chinese patent medicine, 2014, 36(4): 867 – 869.

- [5] 犹卫,王敏,马天俊. HPLC 法测定复方甘草合剂中甘草苷的含量[J]. 资源开发与市场, 2005, (6): 13-28.
- Yu W, Wang M, Ma T J. Determination of liquiritin in compound liquorice mixture by HPLC [J]. Resource Development and Marketing, 2005, (6): 13-28.
- [6] 王敏, 龚慕辛, 刘正跃, 等. 芍药甘草滴丸的制备及其芍药苷、甘草苷和甘草酸的 HPLC 含量测定[J]. 世界中医药, 2019, 14(2): 315-319.
- Wang M, Gong M X, Liu Z Y, *et al.* preparation of paeoniflorin and HPLC content determination of paeoniflorin, Liquiritin and glycyrrhizic acid [J]. World Traditional Chinese Medicine, 2019, 14(2): 315-319.
- [7] 罗燕燕, 刘效栓, 肖正国, 等. HPLC 双波长法同时测定甘草药渣提取物中甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素及甘草酸含量[J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(12): 64-67.
- Luo Y Y, Liu X S, Xiao Z G, *et al.* Simultaneous determination of liquiritin, isoliquiritin, glycyrrhizin, isoliquiritigenin and glycyrrhizic acid in licorice extract by HPLC dual wavelength spectrophotometry [J]. Chinese Journal of Chinese Medicine, 2017, 24(12): 64-67.

(编辑: 侯向辉)