

甘草中甘草苷、甘草酸及总黄酮的测定 及其含量相关性研究

朱金霞, 郑国保, 孔德杰, 张源沛, 聂峰杰

(宁夏农林科学院 农业生物技术研究中心, 宁夏农业生物技术重点实验室, 宁夏 银川 750002)

摘要:以宁夏人工栽培的 1~3 a 生乌拉尔甘草为试材, 利用 70% 的乙醇超声提取, 采用高效液相色谱(HPLC)法同时测定甘草苷和甘草酸, 采用紫外分光光度(UV)法测定总黄酮含量, 并对 60 批次甘草中甘草苷、甘草酸和总黄酮的含量进行数据分析, 以研究甘草中甘草苷与甘草酸及总黄酮含量之间的相关性。结果表明:甘草中甘草总黄酮含量/甘草苷含量的值和甘草苷含量之间呈显著的幂函数关系;甘草酸含量/甘草苷含量的值和甘草苷含量之间呈显著的幂函数关系。

关键词:甘草苷;甘草酸;总黄酮;高效液相色谱;相关性

中图分类号:R 284.0 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)03-0149-03

甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch)是豆科植物的干燥根和根茎, 是常用的中药材, 具有补脾益气, 清热解毒, 祛痰止咳, 缓急止痛, 调和诸药的作用。常用于治疗脾胃虚弱, 倦怠乏力, 心悸气短, 咳嗽痰多, 脘腹、四肢挛急疼痛, 痈肿疮毒, 缓解药物毒性、烈性等病症^[1], 被广泛应用于中药复方中。

甘草中甘草苷、甘草酸及总黄酮等为甘草主要有效成分^[2-3]。目前, 对于甘草中甘草苷、甘草酸及总黄酮的测定方法研究较多^[4-7], 而对于甘草中有效成分含量之间的关系研究较少, 该试验在借鉴和改进中国药典中甘草苷和甘草酸测定方法的基础上, 采用 70% 的乙醇超声提取, 获得提取液, 然后采用高效液相色谱(HPLC)法对提取液中甘草酸及甘草苷进行同时测定, 并采用紫外分光光度(UV)法对提取液中黄酮类化合物进行测定, 分析 60 批宁夏栽培甘草的测定数据, 最终建立甘草苷、甘草酸和总黄酮含量之间的数学关系, 以期为甘草中主要有效成分含量之间相关性提供研究基础, 并可为甘草质量控制方法学研究提供参考依据。

第一作者简介:朱金霞(1977-), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向为植物化学及色谱分析。E-mail: jinxiashu001@163.com

责任作者:张源沛(1968-), 男, 博士, 研究员, 研究方向为农业节水技术集成研究。

基金项目:宁夏自治区科技攻关资助项目(0701254); 宁夏自治区自然科学基金资助项目(NZ0859)。

收稿日期:2013-11-01

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试所用的甘草样品均为 2008~2010 年采集, 宁夏人工栽培的 1~3 a 生乌拉尔甘草, 共 60 批; 供试甘草苷(批号: 111610-200604)和甘草酸(批号: 110731-200513)均购自中国药品生物制品检定所。

试剂: 乙腈、甲醇为色谱纯; 乙醇、磷酸为分析纯; 水为超纯水。

仪器: Water S(600E 型)高效液相色谱仪、Water S(2996 型)二极管阵列检测器、Empower 色谱工作站; UV-2800H 型紫外分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司); AS3120 超声波清洗仪(南京昕航科学仪器有限公司); 电热恒温鼓风干燥箱(上海优胜实验设备有限公司); HA-202M 电子分析天平(天津市奥佳科技有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 甘草苷和甘草酸的 HPLC 测定方法 色谱条件为色谱柱: 菲罗门 Synergi Hydro-RP (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.05% 磷酸溶液, 梯度洗脱: 0→8→16→20 min, 乙腈 19%→50%→65%→100%, 0.05% 磷酸 81%→50%→35%→0%; 柱温 30℃; 流速 1.0 mL/min; 检测波长 237 nm; 进样量 20 μL。对照品溶液的制备: 称取甘草苷对照品、甘草酸铵对照品适量, 精密称定, 加 70% 乙醇溶解定容, 配置含量分别为 0.1010、0.1740 mg/mL 的混合标准溶液, 其中甘草酸重量=甘草酸铵重量/1.0207。供试品溶液的制备: 取甘草粗粉约 0.15 g, 精密称定, 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(功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 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。标准曲线的制备: 精密吸取甘草酸和甘草苷混合标准溶液, 稀释 2、4、6、8、10 倍后, 进样 20 μ L, 按 1.2.1 的色谱条件测

定, 记录峰面积, 并对供试品浓度作图, 得直线回归方程为: 甘草苷: $Y = 2\ 035\ 317.0X - 52\ 350.2$, $R^2 = 0.9998$, 6.3125~101.0 μ g/mL 范围内呈良好的线性关系; 甘草酸: $Y = 8 \times 10^6 X + 106\ 193$, $R^2 = 0.9962$, 10.875~174.0 μ g/mL 范围内呈良好的线性关系。

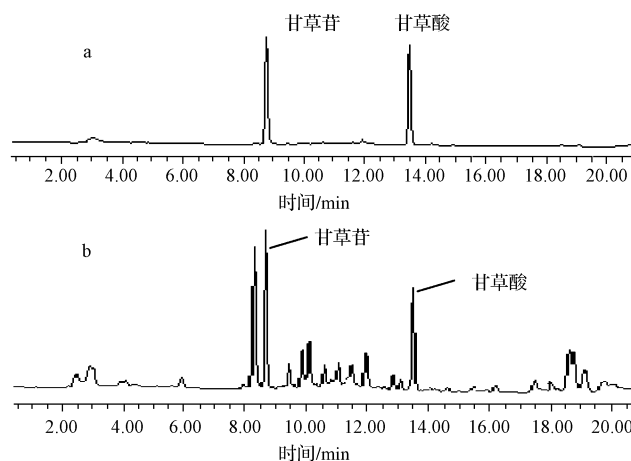


图 1 HPLC 色谱图

注: a: 甘草标准品; b: 甘草提取液。

Fig. 1 HPLC chromatograms

Note: a: Reference substances of *Licorice*; b: Herb of *Licorice*.

1.2.2 总黄酮含量的测定方法 标准曲线的制备: 精密吸取 0.4041 mg/mL 的甘草苷对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 分别置 10 mL 容量瓶中, 加入 10% 的 KOH 溶液 0.5 mL, 放置 5 min 后, 用 70% 的乙醇稀释至刻度, 以 70% 的乙醇稀释至刻度作为空白溶液, 放置 90 min, 在 400 nm 的波长处测定吸光度, 以溶液浓度(Y)对吸光度值(X)进行线性回归。回归方程为 $Y = 0.00768 + 0.01421X$ ($R^2 = 0.9989$), 总黄酮在 8.082~40.41 μ g/mL 范围内成良好的线性关系。样品的测定: 精密量同 1.2.1 的供试品溶液 1.0 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 显色方法同 1.2.1。在 400 nm 的波长处测定吸光度, 从标准曲线上读出供试品溶液中总黄酮的浓度计算即得。

2 结果与分析

2.1 宁夏栽培甘草中甘草苷含量、甘草酸含量和总黄酮含量

从表 1 可以看出, 宁夏不同栽培条件及不同栽培年限下, 甘草中 3 种有效成分含量存在差异, 其中甘草苷含量相差最大, 达到 15.1 倍, 甘草酸含量相差次之, 为 6.8 倍, 而总黄酮含量相差最小, 仅为 1.5 倍。但从均值来看, 甘草中甘草苷含量和甘草酸含量均达到了药典的规定, 只有个别批次含量不达标。

表 1 甘草中甘草苷含量、甘草酸含量和总黄酮含量比较

Table 1 The content of glycyrrhizin, glycyrrhizic acid and the total flavonoids in *Licorice* %

	甘草苷含量	甘草酸含量	总黄酮含量
最大值	2.554	5.105	6.979
最小值	0.169	0.755	4.697
平均值	0.608	2.576	5.711

2.2 甘草中甘草苷含量与总黄酮含量的关系

从图 2 可以看出, 总黄酮含量和甘草苷含量的比值, 与甘草苷含量呈幂函数关系, 其中 $R^2 = 0.9812$ 。总黄酮含量和甘草苷含量的比值主要处于 2.70~33.56 之间, 这表明甘草中总黄酮含量和甘草苷的含量之间有一定的相关性。

2.3 甘草中甘草苷含量与甘草酸含量的关系

从图 3 可以看出, 甘草酸含量和甘草苷含量的比值与甘草苷含量呈幂函数关系, 其中 $R^2 = 0.8922$, 可见甘草中甘草苷含量和甘草酸含量也存在一定的相关关系。

3 讨论与结论

该试验采用了乙腈-磷酸(浓度为 0.01%~0.1%)溶液为流动相, 选择大连依利特 ODS-BP (5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm) 和菲罗门 Synergi Hydro-RP

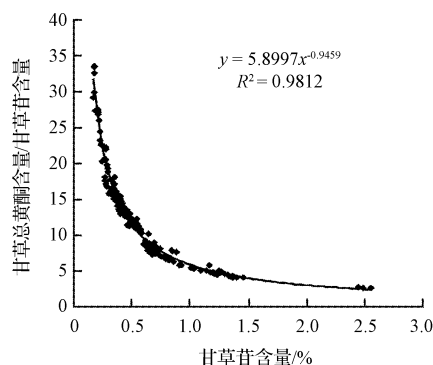


图2 甘草苷含量和总黄酮含量的关系

Fig. 2 The relationship between the content of liquiritin and total flavonoid

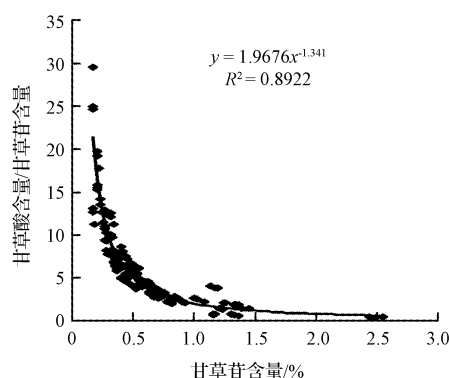


图3 甘草苷含量与甘草酸含量之间的关系

Fig. 3 The relationship between the content of liquiritin and glycyrrhizic acid in flavonoid

(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱,经过分析优化,菲罗门 Synergi Hydro-RP 色谱柱具有分离度高、测定时间短和加样回收率好的优点,最终获得了 20 min 内分离测定甘草苷和甘草酸的色谱条件。试验结果表明,甘草总黄酮含量和甘草苷含量的比值和甘草苷含量之间呈显著的幂函数关系, $Y=5.8997X^{-0.9459}$, $R^2=0.9812$;甘草酸含量(%)和甘草苷含量(%)的比值和甘草苷含量(%)之间呈显著的幂函数关系, $Y=1.9676X^{-1.341}$, $R^2=0.8922$ 。

甘草中甘草苷与甘草总黄酮和甘草酸均存在一定的函数关系,但其相关性的原因尚需进一步研究。另外,由于试验数据所限,只分析了宁夏不同试验条件下栽培甘草中有效成分含量之间存在这样的函数关系,是否与产地有关,还需进一步研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:化学工业出版社, 2010:80-81.
- [2] 季宇彬,姜薇,范玉玲,等. 甘草黄酮的研究进展[J]. 中草药,2004,35(9):5-6.
- [3] 闫永红,王文全,杨娜. HPLC 测定栽培甘草中甘草苷的含量[J]. 中国中药杂志,2006,31(11):926-927.
- [4] 陈云华. 不同来源甘草的化学成分及相关药效的研究[D]. 北京:北京中医药大学,2008:5-7.
- [5] 段天璇,于密密,王文全,等. HPLC 法同时测定甘草指纹图谱暨甘草苷、甘草酸含量[J]. 中成药,2006,28(2):161-165.
- [6] 伍蔚萍,孙文基,阎宏涛,等. 分光光度法测定甘草中总黄酮的含量[J]. 药物分析杂志,2005,25(4):469-472.
- [7] 冯薇,王文全,赵平然. 甘草总黄酮含量测定方法研究[J]. 时珍国医国药,2007,18(11):2608-2610.

Study on the Determination of Liquiritin, Glycyrrhizic Acid and Total Flavonoids in *Licoric* and Their Relationships

ZHU Jin-xia, ZHENG Guo-bao, KONG De-jie, ZHANG Yuan-pei, NIE Feng-jie

(Key Lab of Agricultural Biotechnology of Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Science, Center of Agricultural Biotechnology, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan, Ningxia 750002)

Abstract: Taking 1~3 years old *Licoric* as material, using 70% ethanol as extraction solution, using HPLC for the determination of liquiritin and glycyrrhizic acid simultaneously, using UV spectrophotometry for determination the content of total flavonoid, the relationship between the content of liquiritin with glycyrrhizic acid and total flavonoids in *Licoric* were studied. The data of liquiritin, glycyrrhizic acid and total flavonoids about 60 batches of *Licoric* was analyzed. The results showed that the ratio between the content of glycyrrhiza flavonoids and licorice glycoside to the content of glycyrrhizin in *Licorice* was in line with the power function significantly; the ratio between the content of glycyrrhizic acid and the content of glycyrrhizin in *Licorice* was in line with the power function.

Key words: liquiritin; glycyrrhizic acid; total flavonoids; HPLC; relationship