

岛津 Nexera LC-40 测定野生甘草中甘草苷和甘草酸含量

LC-183

摘要: 本文采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪建立了野生甘草样品中的甘草苷和甘草酸的同时测定方法, 在 14 min 内完成甘草样品分析。甘草苷在 10~80 $\mu\text{g/mL}$, 甘草酸在 100~800 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性良好, 校准曲线线性相关系数 r 在 0.999 以上, 且精密度和回收率实验结果良好。该方法具有简单、准确、分析时间短和溶剂消耗少等特点, 可应用于野生甘草中甘草苷和甘草酸的快速检测。

关键词: Nexera LC-40 甘草 甘草苷 甘草酸

甘草系豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *Glycyrrhiza inflata* Bat. 或光果甘草 *Glycyrrhiza glabra* L. 的干燥根和根茎, 我国甘草主要分布于内蒙古、陕西、甘肃、青海、新疆、山东等地。甘草具有补脾益气, 清热解毒, 祛痰止咳, 缓急止痛, 调和诸药之功效, 其主要成分为三萜类与黄酮类成分, 甘草苷及甘草酸则是这两类化合物中重要的单体活性成分。甘草酸有抗炎、抗病毒等作用, 甘草苷有抗抑郁、神经保护、肝脏毒性保护等作用。甘草属于大宗药材, 药用和食用两方面用量都很大。近几年来, 随着国家

对中药材质量监管力度的不断加大, 部分甘草的甘草苷和甘草酸达不到药典的标准。2015 年版《中国药典》规定, 使用高效液相色谱法对甘草中甘草苷和甘草酸含量进行测定, 要求干燥甘草品含甘草苷 ($\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_9$) 不得少于 0.50%, 甘草酸 ($\text{C}_{42}\text{H}_{62}\text{O}_{16}$) 不得少于 2.0%。

本实验采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱系统同时测定甘草苷和甘草酸含量, 该方法具有分析时间短, 结果准确的特点, 可为甘草中甘草苷和甘草酸含量的快速测定提供参考。

实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津 Nexera LC-40 液相色谱仪, 包括 CBM-40A Lite 系统控制器, DGU-405 脱气机, LC-40B XR 输送泵, SIL-40C XR 自动进样器, CTO-40S 柱温箱, SPD-M40A 检测器, LabSolutions Ver. 5.97 色谱工作站。



图 1 岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪

1.2 分析条件

色谱柱：SHIMADZU InertSustain C18 色谱柱 (2.1 mm I.D.×100 mm L., 2 μm)

流动相：A: 0.05%(v/v) 磷酸水溶液；B: 乙腈

流速：0.4 mL/min

柱温：40°C

检测波长：237 nm

进样体积：1 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相起始浓度为 14%，时间程序如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
3.50	Pumps	Pump B Conc.	14
4.00	Pumps	Pump B Conc.	40
10.00	Pumps	Pump B Conc.	50
10.50	Pumps	Pump B Conc.	100
11.00	Pumps	Pump B Conc.	14
14.00	Controller	Stop	

1.3 样品前处理

对照品溶液的制备：取甘草苷对照品和甘草酸对照品适量，精密称定，加 70% 乙醇分别制成 1 mg/mL 浓度的对照品溶液储备液。使用 70% 乙醇，稀释成不同浓度的甘草苷和甘草酸混合对照溶液。

供试品溶液的制备：取野生甘草样品粉末（过三号筛）约 0.2 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，即得供试品溶液。

■ 结果与讨论

2.1 对照品液相图谱

按照 1.2 中分析条件，将浓度为 1 μg/mL 的对照品溶液上机分析，色谱图如图 2 所示。

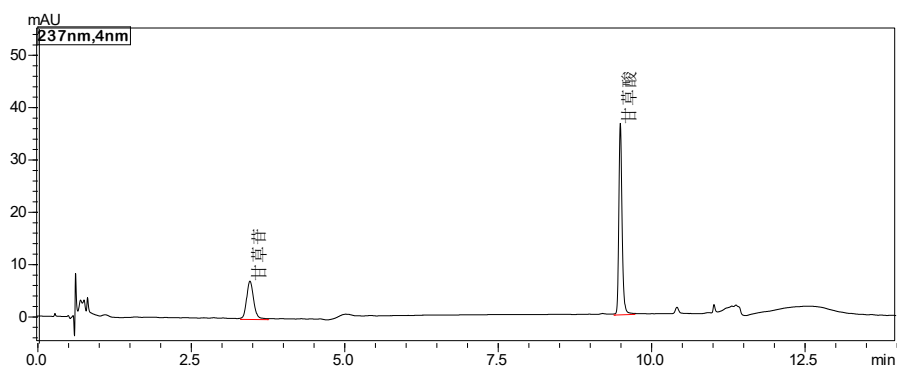


图 2 对照品溶液液相色谱图

2.2 专属性考察

采用二极管阵列检测器 (PDA) 对野生甘草样品色谱图中甘草苷和甘草酸色谱峰进行峰纯度检测。结果显示甘草苷和甘草酸色谱峰最小峰纯度相似度大于 0.995, 且纯度指数均大于零, 表明甘草苷和甘草酸色谱峰在出峰位置均未检测到杂质, 峰纯度良好。可见, 甘草中其他成分对含量测定无干扰, 检测结果见图 3 和图 4。

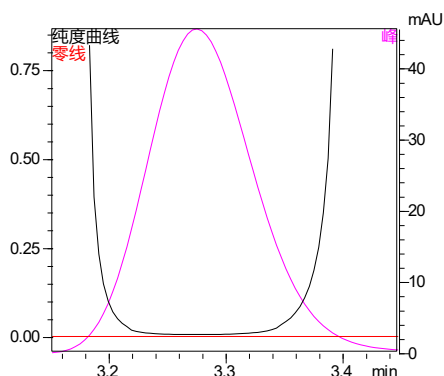


图 3 甘草苷色谱峰纯度检测结果

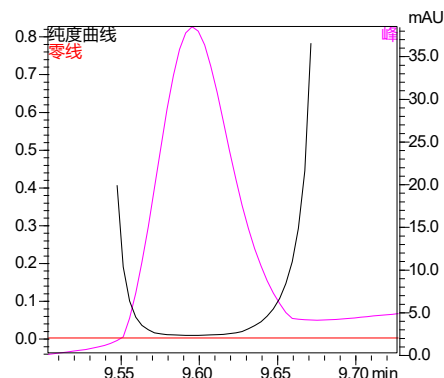


图 4 甘草酸色谱峰纯度检测结果

2.3 线性关系考察

精密吸取对照品储备液适量, 配制成不同浓度的甘草苷和甘草酸混合标准溶液, 按 1.2 中的分析条件进行测定, 外标法定量。以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制校准曲线如图 5 所示; 所得校准曲线线性关系良好, 线性方程及相关系数见表 2。

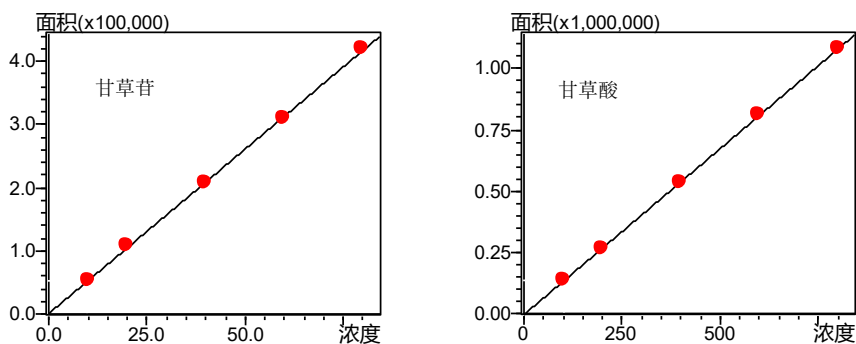


图 5 标准曲线

表 2 回归方程与线性范围

化合物	校准曲线	r	线性范围 (μg/mL)	准确度
甘草苷	$Y = (5209.73)X + (521.853)$	0.9999	10~80	99.1~102.5%
甘草酸	$Y = (1355.13)X + (-4834.69)$	0.9999	100~800	99.5~101.5%

本试验使用 SPD-M40 检测器, 该检测器通过“高级光学系统控温”功能可分别对流通池、光源和光学系统的温度进行控制, 减少了外部温度变化对系统的影响, 可显著降低基线波动, 从而可获得更加准确的目标化合物峰面积。

2.4 精密度试验

精密吸取甘草苷浓度为 20 μg/mL 和甘草酸浓度为 200 μg/mL 的混合对照品溶液，重复进样 6 次，每次进样 1 μL，按上述色谱条件测定峰面积。结果显示甘草苷和甘草酸峰面积的 RSD 分别为 0.53% 和 0.10% (n=6)，表明仪器精密度良好。

表 3 精密度试验结果 (n=6)

No.	甘草苷	甘草酸
1	104444	265169
2	105420	264935
3	105986	265468
4	105636	264788
5	106235	264776
6	105602	264749
平均值	105554	264981
峰面积 RSD	0.53%	0.10%

Nexera LC-40 高效液相色谱系统配置了 LC-40B XR 输送泵，可实现延时短且精度高的高压梯度洗脱。每个泵单元柱塞一次冲程的送液量为 10 μL，能够最大程度降低流速脉动值和脉动产生周期，为仪器良好的精密度提供硬件保障。

2.5 加样回收率试验

分别精密量取已知甘草苷和甘草酸含量的野生甘草样品 5 份，各 0.2 g，再加入一定量的甘草苷和甘草酸的对照储备液，按照 1.3 项下方法制备供试品溶液，测定回收率，结果见表 4。

表 4 加样回收率试验结果 (n=5)

取样量 (g)	样品含量 (mg)		加入量 (mg)		测得含量 (mg)		回收率 (%)		平均回收率 (%)	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0.201	3.04	7.99	2.80	3.40	5.75	11.30	96.6	97.3		
0.199	2.99	7.91	2.80	3.40	5.71	11.27	97.1	98.8		
0.200	3.03	7.96	2.80	3.40	5.76	11.28	97.4	97.6	97.5	98.2
0.201	3.05	7.97	2.80	3.40	5.79	11.32	97.9	98.5		
0.200	3.01	7.93	2.80	3.40	5.76	11.28	98.3	98.6		

注：A 为甘草苷；B 为甘草酸

2.6 实际样品分析结果

按照上述试验条件，对市售野生甘草样品中甘草苷和甘草酸进行检测（见图 6），计算供试品中甘草苷和甘草酸的含量分别为 0.15% 和 3.96%，均满足 2015 年版《中国药典》规定的甘草中甘草苷和甘草酸含量要求。

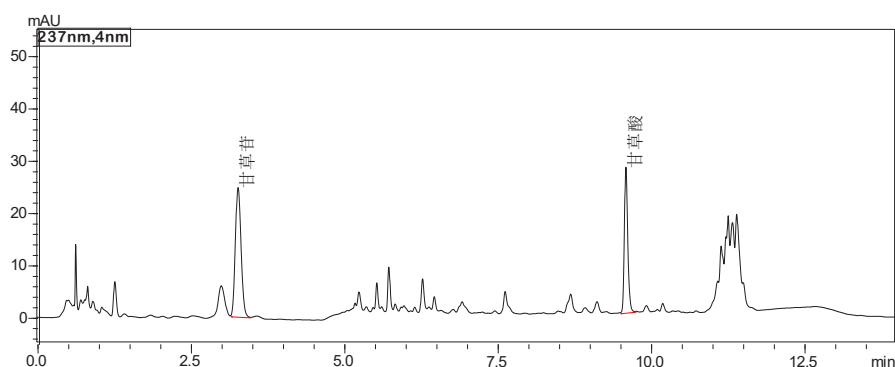


图 6 野生甘草样品中甘草苷和甘草酸分析图谱

■ 结论

本研究应用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪建立了野生甘草样品中的甘草苷和甘草酸同时测定的方法，在 14 min 内完成甘草样品分析，较传统 HPLC 方法大大缩短了分析时间。甘草苷在 10~80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，甘草酸在 100~800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性良好，校准曲线线性相关系数 r 在 0.999 以上，且精密度和回收率实验结果良好。该方法具有简单、准确、快速和溶剂消耗少等特点，可用于甘草样品中甘草苷和甘草酸成分的快速检测，同时为中药有效成分含量的快速测定提供参考。