

RP-HPLC 测定不同产地光果甘草废渣中光甘草定含量

闵杰^a, 木合布力·阿布力孜^{a*}, 孟磊^b, 李宏智^a (新疆医科大学, a.药学院药物化学有机教研室, b.分析测试中心, 乌鲁木齐 830054)

摘要: 目的 利用反相高效液相色谱法测定由不同产地光果甘草制备的甘草废渣中光甘草定的含量。方法 对4种产地的光果甘草用同一种水提法制备甘草废渣;再用不同提取法制备6种总黄酮粗提物;采用Symmetry C₁₈反相色谱柱,流动相为乙腈-水-冰醋酸(55:44:1),检测波长为282 nm,流速为1.0 mL·min⁻¹,柱温为30℃,测定各样品中光甘草定的含量。结果 光甘草定在0.09~0.45 mg·mL⁻¹内呈良好线性关系($r=0.9997$),平均回收率100.2%,RSD为0.89%。6种总黄酮粗提物中光甘草定含量分别为1.31%,1.16%,1.59%,2.93%,0.98%,0.85%;4种甘草废渣中,光甘草定含量分别为0.225%,0.290%,0.211%,0.218%。结论 反相高效液相色谱法简便、快速、重复性好,适用于光果甘草中光甘草定的含量测定。4种光果甘草废渣中,新疆和静的光果甘草废渣所含光甘草定含量明显高于其他产地的光果甘草废渣。此外,利用甲醇回流提取法制备光甘草定时,提取率和总黄酮出膏率都高于乙醇回流提取法和甲醇超声提取法。

关键词: 反相高效液相色谱法;光果甘草废渣;光甘草定;含量测定

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2010)07-0637-04

RP-HPLC Determination of Glabridin Content in Different Licorice Residues from *Glycyrrhiza glabra* L

MIN Jie^a, MOURBOUL Ablise^{a*}, MENG Lei^b, LI Hongzhi^a (Xinjiang Medical University, a. Department of Medicinal and Organic Chemistry, b. Drug Analytical Center, Urumqi 830054, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To use the RP-HPLC method for determination of glabridin content in different origins of *Glycyrrhiza glabra* L (licorice). **METHODS** Four samples of licorice residue were prepared from 4 origins of *Glycyrrhiza glabra* L with same water extraction method; six samples of licorice flavonoid crude extracts were prepared from 4 samples of licorice residues with different extraction methods. The Symmetry C₁₈ column was used for the determination of glabridin content; mobile phase was acetonitrile-water-glacial acetic acid (55:44:1); detection wavelength was 282 nm, column temperature was 30℃. **RESULTS** There was a good linear relationship when the concentration of glabridin was in the range of 0.09–0.45 mg·mL⁻¹ ($r=0.9997$). The average recovery rate was 100.2% and the RSD was 0.89%. The content of glabridin in the six samples was 1.31%, 1.16%, 1.59%, 2.93%, 0.98% and 0.85%, respectively; and the content of glabridin in four samples of licorice residue were 0.225%, 0.290%, 0.211% and 0.218%, respectively. **CONCLUSION** The detection by RP-HPLC is a simple and easy method for determination of Glabridin in *Glycyrrhiza glabra*. The glabridin content in Xinjiang Hejing licorice is higher than those of other sources. Furthermore, the reflux-extraction method by methanol is more effective method for increasing the extract yield and glabridin content than those of the extraction by ethanol or by ultrasonic methanol extraction.

KEY WORDS: RP-HPLC; *Glycyrrhiza glabra* residues; glabridin; content determination

甘草中的活性成分主要包括3类:三萜类(以甘草甜素为主)、黄酮类和多糖类。甘草黄酮类成分(licorice flavonoids)具有多种生理功能,如抗脂质过氧化、抑制多种肿瘤细胞的增殖和诱导凋亡等^[1-2]。光甘草定(glabridin)是光果甘草所特有的异黄酮类成分,它不仅在光果甘草黄酮类成分中含量最高(占11%),而且具有良好的药用开发价值。作为光果甘草中的主要脂溶性异黄酮,光甘草定

主要留存在提取甘草水溶性成分后留下的甘草废渣中。在药理实验中,光甘草定显示出明显的抗氧化、保护神经细胞作用及一定的降血脂和降血压等作用^[1-4],在心脑血管疾病的防治药物研究中亦显示出良好的前景。

为考察不同产地的光果甘草中异黄酮类活性成分光甘草定的含量,本研究利用反相高效液相色谱法对从国内外采集的4种甘草中光甘草定的

基金项目: 国家十一五科技支撑项目基金(2006BA106A18-20)

作者简介: 闵杰,男,硕士生 Tel: 13999152524 E-mail: minjie1019@21cn.com

*通信作者: 木合布力·阿布力孜,博士,教授

Tel: (0991)4362470 E-mail: mourboul@hotmail.com

含量进行测定, 并对提取工艺进行初步研究, 从而为光果甘草黄酮类成分的综合开发利用和质量标准研究奠定一定基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪, 紫外检测器, 色谱工作站, Symmetry C₁₈柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); SK2510HP型数控超声清洗仪(上海科导超声仪器有限公司); DT200型电子天平(常熟市衡器厂); N-1001型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司)。

1.2 试剂

光甘草定对照品(沈阳市吉洗化原料有限公司, 纯度: 90%, 批号: P90-X12593); 4种甘草药材, 分别取样于吉尔吉斯斯坦、新疆和静、库尔勒市、巴楚县, 由新疆医科大学药学院生药-天然药物化学教研室的帕丽达教授鉴定均为光果甘草根(*Glycyrrhiza glabra* L)。将药材按文献[5]热水提取法提取水溶性物质并除去之(主要为水溶性三萜类成分甘草甜素), 然后制备甘草废渣并备用; 乙腈为色谱纯, 水为新制重蒸水, 甲醇、冰醋酸为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[6]

色谱柱: Symmetry C₁₈柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水-冰醋酸(55:44:1), 流速1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为282 nm, 柱温30 °C, 进样量10 μL。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取光甘草定对照品5.0 mg, 置10 mL量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 再精密吸取1 mL置10 mL量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液(含光甘草定0.045 mg·mL⁻¹), 放置备用。

2.3 光果甘草总黄酮粗提物的制备^[7]

2.3.1 甘草废渣的制备 准确称取四种光果甘草药材各5.0 g, 用热水提法除去水溶性成分, 制备甘草废渣后, 备用。

2.3.2 甘草总黄酮粗提物的制备 ①分别称取“2.3.1”项下方法制备的3份吉尔吉斯光果甘草废渣各1.00 g, 分别用甲醇和乙醇回流提取或用甲醇超声提取(40 °C, 50 min)各2次, 过滤后, 滤液减压浓缩至干, 获得总黄酮粗提物, 计算出膏率并备用; ②分别称取新疆和静、库尔勒市和巴楚县的光果甘草废渣各1.00 g, 用甲醇回流提取法制

备总黄酮粗提物, 计算出膏率并备用。

2.4 供试品溶液的制备

精密称取甘草总黄酮提取物粉末各20.0 mg, 置10 mL量瓶, 甲醇溶解, 摇匀, 0.45 μm滤膜过滤, 待用。

2.5 检测波长的选择

取光甘草定对照品溶液(以甲醇为溶剂)在200~400 nm波长处进行扫描, 最大吸收波长为230 nm和282 nm, 本实验选择检测波长为282 nm。光甘草定对照品的色谱图见图1。

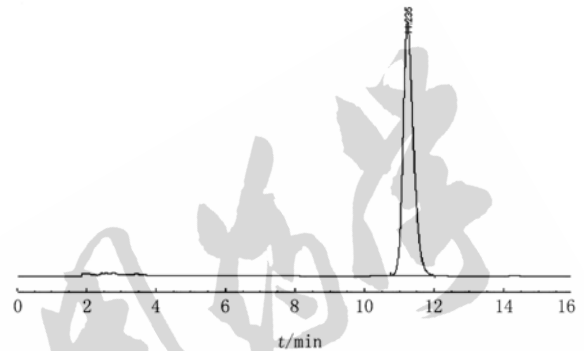


图1 光甘草定对照品的高效液相图谱

Fig 1 HPLC chromatogram of glabridin reference substance

2.6 标准曲线的建立

分别配制0.090, 0.15, 0.18, 0.27, 0.36, 0.45 mg·mL⁻¹不同浓度的溶液, 摇匀, 0.45 μm滤膜过滤, 待用。进样量为10 μL。按上述色谱条件测定光甘草定峰面积, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程为: $Y=35\ 477X-70.089$ ($r=0.999\ 7$), 表明光甘草定在0.09~0.45 mg·mL⁻¹内线性关系良好。

2.7 仪器精密度试验

精密吸取同一供试品溶液, 重复进样6次, 得峰面积RSD为0.84%。

2.8 精密度试验

精密称取同一甘草粉末样品6份, 按“2.4”项下方法制备, 按“2.1”项下方法测定, 测得的光甘草定平均含量为1.31%, RSD为1.4%。

2.9 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液, 按“2.1”项下方法测定, 在0, 2, 4, 8, 12, 48 h进行测定。结果RSD为0.47%, 表明供试品溶液在48 h内稳定。

2.10 加样回收率试验

精密称取已知含量的甘草样品6份, 置100 mL量瓶中, 分别加入光甘草定对照品适量及甲醇

100 mL, 按“2.4”项下方法制得加样回收样品液。按“2.1”项下方法测定, 计算回收率, 结果平均回收率为100.2%, RSD为0.89%, 结果见表1。

表1 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 1 Results of recovery test(n=6)

| 本底值/ mg | 测得值/ mg | 加入值/ mg | 回收率/ % | 平均回收率/ % | RSD/ % |
|------------|------------|------------|-----------|-------------|-----------|
| 1.5 | 2.79 | 1.3 | 99.2 | 100.2 | 0.89 |
| 1.5 | 2.79 | 1.3 | 99.2 | | |
| 1.5 | 2.80 | 1.3 | 100.0 | | |
| 1.5 | 2.81 | 1.3 | 100.7 | | |
| 1.5 | 2.82 | 1.3 | 101.5 | | |
| 1.5 | 2.81 | 1.3 | 100.7 | | |

2.11 样品的测定

取甘草总黄酮供试品溶液, 按“2.1”项下方

表2 不同产地光果甘草废渣中光甘草定含量测定结果

Tab 2 Content determination results of glabridin in different licorice residues

| 样品来源 | 提取方法 | 出膏率/% | 粗提取物中光甘草定含量/% | SD | 甘草废渣中光甘草定含量/% |
|------------|--------|-------|---------------|-------|---------------|
| 吉尔吉斯斯坦甘草废渣 | 甲醇回流提取 | 6.60 | 1.31 | 0.01 | 0.225 |
| | 乙醇回流提取 | 6.20 | 1.16 | 0.012 | 0.226 |
| | 甲醇超声提取 | 3.20 | 1.59 | 0.011 | 0.225 |
| 新疆和静甘草废渣 | 甲醇回流提取 | 5.87 | 2.93 | 0.01 | 0.290 |
| 新疆库尔勒甘草废渣 | 甲醇回流提取 | 4.50 | 0.98 | 0.012 | 0.211 |
| 新疆巴楚甘草废渣 | 甲醇回流提取 | 4.80 | 0.85 | 0.011 | 0.218 |

3 讨论

本研究对光果甘草中总黄酮的提取方法对光甘草定含量的影响进行考察, 并利用RP-HPLC对4种产地的光果甘草废渣中光甘草定的含量进行测定。

首先考察了样品的提取方法, 参照文献[7], 分别利用甲醇或乙醇加温回流提取法和甲醇超声提取法制备总黄酮提取物, 并对出膏率和光甘草定含量进行测定和比较, 发现利用甲醇回流提取法时, 光甘草定的提取率和总黄酮的出膏率都高于乙醇回流提取法。利用超声提取法时, 虽然提取物中光甘草定含量较高, 但其出膏率不到甲醇回流提取法的一半, 提取率明显低于回流提取法。因此, 利用甲醇或乙醇回流提取法提取光甘草定时, 效果比超声提取法好, 适合于工业化生产。

另外, 本实验考察样品中光甘草定含量的测定方法。参照文献[6], 利用RP-HPLC对不同产地的4种光果甘草废渣中光甘草定进行含量测定, 结果采用反相色谱柱, 流动相为乙腈-水-冰醋酸(55:44:1), 检测波长为282 nm时, 可对光甘草定进行满意的分离并可排除其他因素对测定的干扰。因此, 反相高效液相色谱法简便、快速、重

复性好, 适用于甘草中光甘草定的含量测定。

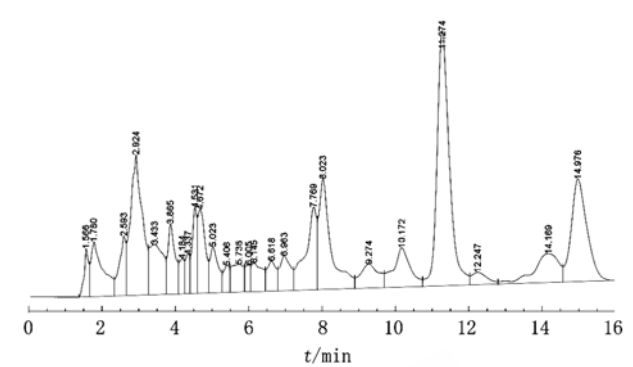


图2 光果甘草甲醇粗提取物的高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatogram of methanolic crude extract of licorice

复性好, 适用于甘草中光甘草定的含量测定。

光甘草定是光果甘草中的主要异黄酮类成分之一, 在甘草精制总黄酮中含量最高, 可达11%^[1]。光甘草定具有抗氧化、抗动脉粥样硬化、降血脂和降血压等作用, 在动脉粥样硬化和心脑血管疾病的防治中有较好的研究开发前景。

我国西北地区光果甘草资源丰富, 储备量大, 有野生和人工栽培基地。本试验对光果甘草资源的深入研究、对光果甘草黄酮类成分的综合开发利用以及对产品质量标准研究具有一定参考价值。

REFERENCES

- [1] FUHRMAN B, VOLKOVA N, KAPLAN M, et al. Anti-atherosclerotic effects of licorice extract supplementation on hyper-cholesterolemic patients: increased resistance of LDL to atherogenic modifications, reduced plasma lipid levels, and decreased systolic blood pressure [J]. Nutrition, 2002, 18 (3): 268-273.
- [2] KUNTZ S, WENZEL U, DANIEL H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines [J]. Eur J Nutr, 1999, 38 (3): 133-142.
- [3] YU X Q, XUE C C, ZHOU Z W, et al. In vitro and in vivo neuroprotective effect and mechanisms of glabridin, a major active isoflavan from Glycyrrhiza glabra (licorice) [J]. Life Sci,

- 2008, 82(6): 68-78.
- [4] MOURBOUL A, RENA K, MA S Y, et al. Isolation and Antioxidant Property of Glabridin [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2007, 19(4): 675-682.
- [5] LI Z H, LIANG K Y. Study on the extration technology of glycyrrhicin [J]. J Chongqing Tech Business Univ: Nat Sci(重庆工商大学学报: 自然科学版), 2004, 21(6): 567-569.
- [6] WU W P, YAN H T, SUN W J, et al. HPLC determination of the content of Liquiritin in Glycyrrhiza root [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2004, 24(4): 425-427.
- [7] MINGLEI T, HONGYUAN Y, KYUNG H R. Extraction of Glycyrrhizic acid and glabridin from Licorice [J]. Int J Mol Sci, 2008, 9(4): 571-577.

收稿日期: 2009-11-02