

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.11.013

# 高效液相色谱法同时测定甘草总黄酮口腔贴膜中甘草查尔酮 A 和甘草素含量\*

林晓春<sup>1</sup>, 李旭桂<sup>1</sup>, 张志勤<sup>2</sup>, 郑锦坤<sup>1</sup>, 翁立冬<sup>2△</sup>

(1. 广东省粤北人民医院, 广东 韶关 512025; 2. 南方医科大学中医药学院, 广东 广州 510515)

**摘要:**目的 建立同时测定甘草总黄酮口腔贴膜中甘草查尔酮 A 和甘草素含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Agilent HC - C<sub>18</sub> 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈(A) - 0.1% 磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0 ~ 10 min 时 20% A ~ 30% A, 10 ~ 30 min 时 30% A ~ 45% A, 30 ~ 40 min 时 45% A ~ 60% A, 40 ~ 50 min 时 60% A ~ 90% A), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 276 nm(0 ~ 30 min)、365 nm(30 ~ 50 min), 柱温为 30 ℃, 进样量为 10 μL。结果 甘草查尔酮 A、甘草素的质量浓度分别在 4.16 ~ 166.40 μg/mL 和 0.384 ~ 15.360 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好, 精密性、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 3%; 平均加样回收率分别为 99.04% 和 98.81%, RSD 分别为 1.06% 和 1.13% (n=9)。结论 该方法操作简便、专属性强、准确度高, 可用于甘草总黄酮口腔贴膜中甘草查尔酮 A 和甘草素的含量测定。

**关键词:** 高效液相色谱法; 甘草总黄酮口腔贴膜; 甘草查尔酮 A; 甘草素; 含量测定

中图分类号: R927.2; R988.2

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)11-0047-03

## Simultaneous Determination of Licochalcone A and Liquiritigenin in Glycyrrhizic Flavone Oral Patch by HPLC

LIN Xiaochun<sup>1</sup>, LI Xugui<sup>1</sup>, ZHANG Zhiqin<sup>2</sup>, ZHENG Jinkun<sup>1</sup>, WENG Lidong<sup>2</sup>

(1. Yue Bei People's Hospital, Shaoguan, Guangdong, China 512025; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China 510515)

**Abstract:** **Objective** To establish a high-performance liquid chromatography(HPLC) method for simultaneous determination of licochalcone A and liquiritigenin in Glycyrrhizic Flavone Oral Patch. **Methods** The chromatographic column was Agilent HC - C<sub>18</sub> column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile(A) - 0.1% phosphoric acid solution(B) with gradient elution(0 - 10 min, 20% A - 30% A; 10 - 30 min, 30% A - 45% A; 30 - 40 min, 45% A - 60% A; 40 - 50 min, 60% A - 90% A), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelengths were 276 nm(0 - 30 min) and 365 nm(30 - 50 min), the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear ranges of licochalcone A and liquiritigenin were 4.16 - 166.40 μg/mL, 0.384 - 15.360 μg/mL, respectively. RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 3%. The average recoveries of licochalcone A and liquiritigenin were 99.04% (RSD = 1.06%, n = 9) and 98.81% (RSD = 1.13%, n = 9), respectively. **Conclusion** The method is simple, specific and accurate, which can be used for the content determination of licochalcone A and liquiritigenin in Glycyrrhizic Flavone Oral Patch.

**Key words:** HPLC; Glycyrrhizic Flavone Oral Patch; licochalcone A; liquiritigenin; content determination

甘草总黄酮为甘草的主要有效成分, 具有显著抗应激、镇痛、抗炎、抗自由基损伤、调节免疫功能、促进上皮细胞增殖、修复黏膜完整性等多种生物活性作用<sup>[1-5]</sup>。前期研究中以其为主药制备了甘草总黄酮双层缓释口腔贴膜, 所得贴膜生物性能良好<sup>[6]</sup>, 并具有良好的抗炎、镇痛、促进黏膜完整性修复的作用, 但尚不明确其主要成分和质控指标。甘草总黄酮的成分包含水溶性和脂溶性, 化学成分有黄酮类、异黄酮类、查尔酮和二氢黄酮类, 其中二氢查尔酮和查尔酮是甘草总黄酮的主要成分, 且甘草查尔酮 A 和甘草素分别为其代表成

分及活性成分。本研究中建立了同时测定甘草总黄酮口腔贴膜中甘草查尔酮 A 和甘草素含量的高效液相色谱法, 为甘草总黄酮口腔贴膜的质量控制提供参考。现报道如下。

### 1 仪器与试剂

#### 1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); BSA124S 型电子天平(德国赛多利斯公司, 精度为万分之一); KQ-300ES 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司, 功率为 300 W, 频率为 40 kHz)。

\*基金项目: 2019 年广东省中医药局面上科研项目[20191325]; 2018 年韶关市卫生计生科研项目[Y18082]; 广东省高校大学生创新创业训练计划项目[201812121158]; 广东省医院药学研究基金[2018A25]。

第一作者: 林晓春, 男, 硕士研究生, 副主任药师, 研究方向为医院药学, (电子信箱)xiaochunll@163.com。

△通信作者: 翁立冬, 男, 大学本科, 实验师, 研究方向为药物制剂, (电子信箱)37370614@qq.com。

## 1.2 试药

甘草查尔酮 A 对照品(批号为 150924, 含量为 98.5%), 甘草素对照品(批号为 140827, 含量为 98.8%), 均购自成都克洛玛生物科技有限公司; 甘草总黄酮口腔贴膜(自制, 批号分别为 20181213-01, 20181213-02, 20181213-03); 乙腈、甲醇(色谱纯, 德国默克公司); 磷酸(分析纯, 广东光华化学厂有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent HC-C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A) - 0.1% 磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0 ~ 10 min 时 20% A ~ 30% A, 10 ~ 30 min 时 30% A ~ 45% A, 30 ~ 40 min 时 45% A ~ 60% A, 40 ~ 50 min 时 60% A ~ 90% A); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 276 nm(0 ~ 30 min), 365 nm(30 ~ 50 min); 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。

### 2.2 溶液制备

取甘草查尔酮 A 对照品和甘草素对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解, 置 25 mL 容量瓶中定容, 分别制成每 1 mL 甲醇含甘草查尔酮 A 208 μg、甘草素 19.2 μg 的对照品溶液。取甘草总黄酮口腔贴膜 0.3 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 30 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 滤过, 即得供试品溶液。按样品制备方法制备不含甘草总黄酮的口腔贴膜, 依法制备不含甘草总黄酮的阴性对照品溶液。

### 2.3 方法学考察

专属性试验: 取 2.2 项下 3 种溶液各 10 μL, 按 2.1 项下色谱条件进样测定。结果供试品溶液色谱中, 有 2 个与对照品溶液色谱相对应的色谱峰, 阴性对照无干扰。详见图 1。

线性关系考察: 分别精密吸取 2.2 项下含甘草查尔酮 A 和甘草素的对照品溶液 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mL, 加甲醇定容至 5.0 mL, 按 2.1 项下色谱条件分别进样 10 μL, 测定峰面积。以质量浓度( $X$ , μg/mL)为

横坐标、峰面积( $Y$ )为纵坐标绘制标准曲线, 得回归方程, 甘草查尔酮 A 为  $Y = 6\,135.7X + 31.029$  ( $R^2 = 0.999\,9$ ,  $n = 6$ ), 甘草素为  $Y = 16\,529X + 56\,197$  ( $R^2 = 0.999\,9$ ,  $n = 6$ )。结果表明, 甘草查尔酮 A 和甘草素的质量浓度分别在 4.16 ~ 166.40 μg/mL 和 0.384 ~ 15.360 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

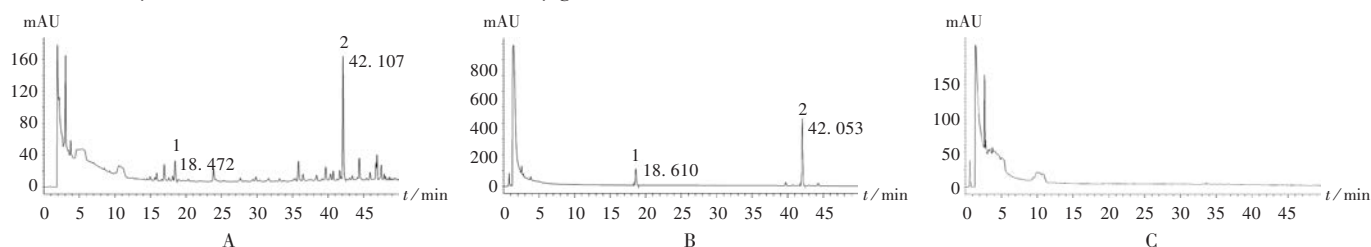
检测限考察: 将混合对照品溶液逐步稀释后, 分别精密吸取 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 测定, 以信噪比( $S/N$ )为 3 考察检测限。结果甘草查尔酮 A 和甘草素的检测限分别为 0.13 μg/mL 和 0.096 μg/mL。

精密度试验: 精密吸取甘草查尔酮 A (142.0 μg/mL) 和甘草素 (16.0 μg/mL) 的混合对照品溶液, 过滤, 吸取续滤液 10 μL, 连续进样测定 6 次。结果甘草查尔酮 A 和甘草素的平均峰面积分别为 3 999.5 和 1 126.7,  $RSD$  为 1.11% 和 1.10% ( $n = 6$ ), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 取 0.3 g 样品, 精密称定, 依法制备供试品溶液, 分别于 0, 6, 12, 18, 24 h 时进样测定峰面积, 计算含量。结果甘草查尔酮 A 和甘草素的  $RSD$  分别为 0.77% 和 1.72% ( $n = 5$ ), 表明供试品溶液 24 h 内稳定。

重复性试验: 取样品 6 份, 依法制备供试品溶液, 分别精密吸取 10 μL, 进样测定峰面积, 计算含量。结果甘草查尔酮 A 和甘草素的含量分别为 10.225 7 mg/g 和 0.693 3 mg/g,  $RSD$  分别为 2.02% 和 2.45% ( $n = 6$ ), 表明方法重复性好。

加样回收试验: 取甘草查尔酮 A 对照品和甘草素对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解, 置 25.0 mL 容量瓶中, 配制成混合对照品溶液(含甘草查尔酮 A 105.00 μg/mL, 甘草素 6.50 μg/mL), 取已知含量的甘草总黄酮膜剂(含甘草查尔酮 A 102.426 4 μg/mL, 甘草素 6.945 6 μg/mL) 0.3 g, 精密称定, 依法制备供试品溶液, 分别精密量取供试品溶液 0.5, 1.0, 2.0 mL, 置 5 mL 容量瓶中, 精密加入 1.0 mL 混合对照品溶液, 用甲醇定容至刻度, 过滤, 分别取续滤液 10 μL, 进样测定, 记录色谱峰面积, 并计算加样回收率。结果见表 1。



1. 甘草素 2. 甘草查尔酮 A  
A. 供试品溶液 B. 对照品溶液 C. 阴性对照品溶液

图 1 高效液相色谱图

1. liquiritigenin 2. licochalcone A

A. Test solution B. Reference solution C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

表1 加样回收试验结果( $n=9$ )  
Tab.1 Results of the recovery tests( $n=9$ )

| 样品含量( $\mu\text{g}$ ) |          | 加入量( $\mu\text{g}$ ) |      | 测得量( $\mu\text{g}$ ) |          | 回收率(%) |        | $\bar{X}$ (%) |       | RSD(%) |      |
|-----------------------|----------|----------------------|------|----------------------|----------|--------|--------|---------------|-------|--------|------|
| A                     | B        | A                    | B    | A                    | B        | A      | B      | A             | B     | A      | B    |
| 51.213 2              | 3.472 8  | 105.00               | 6.50 | 154.608 7            | 9.924 4  | 98.47  | 99.26  |               |       |        |      |
| 51.213 2              | 3.472 8  | 105.00               | 6.50 | 155.296 5            | 9.844 8  | 99.13  | 98.03  |               |       |        |      |
| 51.213 2              | 3.472 8  | 105.00               | 6.50 | 155.914 6            | 9.878 2  | 99.72  | 98.54  |               |       |        |      |
| 102.426 4             | 6.945 6  | 105.00               | 6.50 | 205.221 8            | 13.331 5 | 97.90  | 98.24  |               |       |        |      |
| 102.426 4             | 6.945 6  | 105.00               | 6.50 | 204.786 2            | 13.249 9 | 97.49  | 96.99  | 99.04         | 98.81 | 1.06   | 1.13 |
| 102.426 4             | 6.945 6  | 105.00               | 6.50 | 205.732 5            | 13.432 6 | 98.39  | 99.80  |               |       |        |      |
| 204.852 8             | 13.891 2 | 105.00               | 6.50 | 310.538 4            | 20.410 2 | 100.65 | 100.29 |               |       |        |      |
| 204.852 8             | 13.891 2 | 105.00               | 6.50 | 309.412 7            | 20.345 7 | 99.58  | 99.30  |               |       |        |      |
| 204.852 8             | 13.891 2 | 105.00               | 6.50 | 309.927 2            | 20.412 3 | 100.07 | 100.32 |               |       |        |      |

注:A为甘草查尔酮A,B为甘草素。

Note: A is licochalcone A, B is liquiritigenin.

## 2.4 样品含量测定

取3批(批号分别为20181213-01,20181213-02,20181213-03)样品各0.3 g,精密称定,依法制备供试品溶液,分别精密吸取10  $\mu\text{L}$ 进样测定,记录峰面积,并分别计算含量。结果甘草查尔酮A和甘草素的平均含量分别为102.208 3 mg/g和0.693 5 mg/g。

## 3 讨论

### 3.1 提取方法选择

甘草总黄酮的含量测定多采用超声波提取、微波提取、萃取等方法<sup>[7-10]</sup>。口腔贴膜以交联羧甲基纤维素钠、海藻酸钠(ALG)、聚乙烯醇为载药层膜材料,甘草总黄酮分散在缓释凝胶骨架中,采用超声提取方法可促使药物从骨架中充分溶解、释放,故提取方法确定为超声提取。

### 3.2 提取溶剂选择

考察了不同提取溶液(甲醇、乙醇、70%乙醇、水)下甘草查尔酮A和甘草素的含量,结果采用甲醇和70%乙醇为提取溶剂时甘草查尔酮A和甘草素的含量最高,结合流动相的选择,且载药膜材料的ALG、甘油、吐温为水溶性基质,70%乙醇可导致基质溶解、释放,进而干扰含量的测定,故提取溶剂确定为甲醇。

### 3.3 洗脱方法选择<sup>[11-12]</sup>

甘草查尔酮A为查尔酮类黄酮,甘草素为二氢黄酮类,两者极性不同,通过改变乙腈洗脱浓度,由低到高增加流动相极性,可使甘草查尔酮A和甘草素在适宜的保留时间内洗脱出来,故洗脱方法确定为梯度洗脱。

### 3.4 检测波长选择

甘草查尔酮A和甘草素的吸收波长不同,故检测波长选择0~30 min时276 nm,30~50 min时365 nm。

### 3.5 方法评价

本研究中建立的方法操作简便、专属性强、准确度高,可用于甘草总黄酮口腔贴膜中甘草查尔酮A和甘

草素的含量测定。

## 参考文献

- [1] 方芳,邢文倩,王沙沙,等.甘草药用价值及其提取分离方法的研究进展[J].工艺与装备,2017(5):34-42.
- [2] CHIU YJ, LEE CM, LIN TH, et al. Chinese Herbal Medicine Glycyrrhiza inflata Reduces A $\beta$  Aggregation and Exerts Neuroprotection through Anti-Oxidation and Anti-Inflammation[J]. Am J Chin Med, 2018, 46(4):1-25.
- [3] 林晓春,陈育尧,白殊同,等.甘草总黄酮对慢性浅表性胃炎大鼠胃粘膜损伤的保护作用[J].南方医科大学学报,2013, 33(2):299-304.
- [4] 林晓春,陈育尧,白殊同,等.安胃疡抗炎镇痛作用及对慢性浅表性胃炎大鼠胃粘膜损伤的抑制[J].中药药理与临床, 2013, 29(2):74-77.
- [5] LIU JS, ZHENG J, LIN XC, et al. The Total Flavonoid Extract from Glycyrrhiza inflat Bat. Suppresses Atrophic Gastritis in Rats through the Akt/MAPK Pathway[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2020(53):1-9.
- [6] 林晓春,翁立冬,张志勤,等.甘草总黄酮双层缓释口腔贴膜的制备[J].今日药学,2019,29(4):228-230.
- [7] 常婧,周娅静,石海燕,等.甘草总黄酮提取工艺优化[J].亚太传统医药,2014,10(8):24-25.
- [8] 朱应怀,刘晓霞,宋晓春,等.甘草总黄酮氨水提取及超滤纯化工艺研究[J].中国现代应用药学,2017,34(4):492-495.
- [9] 朱飞娥,田自华,张子义.甘草总黄酮微波法提取工艺的研究[J].畜牧与饲料科学,2008(5):1-2.
- [10] 张腊腊,胡浩斌,王宗博,等.超声-微波协同提取甘草渣中总黄酮工艺优化[J].中国酿造,2017,36(4):163-167.
- [11] 左婷,翁立冬,刘莉,等.HPLC同时测定甘蒲祛斑凝胶中甘草素、异甘草素、甘草查尔酮A的含量[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(8):73-76.
- [12] 刘永,文振催,黄志刚,等.HPLC法同时测定甘草总黄酮分散片中甘草素和甘草查尔酮A的含量[J].今日药学, 2016, 26(1):19-21.

(收稿日期:2020-07-07;修回日期:2020-10-09)