

甘草中甘草苷、异甘草苷对照品的制备及鉴定^{*}

★ 何明珍^{1**} 黄小平² 冯育林^{1,2***} 张小娟¹ 杨世林^{1,2} (1. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心 南昌 330006; 2. 江西中医学院 南昌 330008)

摘要:目的:研究中药甘草中甘草苷、异甘草苷对照品的制备方法。方法:采用大孔吸附树脂、聚酰胺色谱、凝胶色谱、制备色谱等方法分离制备对照品,采用波谱方法对其进行结构鉴定。结果:从甘草中分离出甘草苷、异甘草苷对照品。结论:该对照品可作为控制甘草总黄酮制剂质量的指标成分。

关键词:甘草;甘草苷;异甘草苷;对照品制备

中图分类号:R 284.2 **文献标识码:**A

Preparation of Liquiritin and Isoliquiritin from the Roots of *Glycyrrhiza inflata*

HE Ming-zhen¹, HUANG Xiao-ping², FENG Yu-lin^{1,2}, ZHANG Xiao-juan¹, YANG Shi-lin^{1,2}

1. National Pharmaceutical Engineering Center For Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006;

2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004

Abstract: Objective: To isolate and purify high purity liquiritin and isoliquiritin from the roots of *Glycyrrhiza inflata*. Methods: Compounds were isolated and purified by macroporous resin, Polyamide ect. Their structures were identified in the basis of various modern spectroscopic analyses. Results: High purity liquiritin and isoliquiritin were isolated from the roots of *Glycyrrhiza inflata*. Conclusion: High purity liquiritin and isoliquiritin can be used in the quality control of the materials and medicament of liquiritin and isoliquiritin.

Key words: *Glycyrrhiza inflata* Batal.; Liquiritin; Isoliquiritin; Preparation method

甘草为豆科植物甘草属乌拉尔甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)、胀果甘草(*G. inflata* Batal.)、光果甘草(*G. glabra* L.)的干燥根及根茎^[1],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。甘草中黄酮类成分具有多种生物活性,除了消炎、抗菌、抗变态等作用外,在抗氧化、抗癌、防癌、抗肿瘤等也有明显的作用^[2]。现代药理研究表明甘草苷、异甘草苷为甘草黄酮类的主要有效成分。本实验研究甘草中同时制备甘草苷、异甘草苷这两个黄酮类成分的工艺,同时对其进行结构鉴定和纯度检查,其含量大于98%,达到了定性和定量用对照品的要求,可作为甘草药材及其制剂质量控制的对照品。

1 仪器与材料

Agilent1100型液相色谱仪,二极管阵列检测器,ARX-300核磁共振光谱仪(TMS内标,瑞士Bruker公司),日本YanacoMP-S3熔点测定仪(未校正,广州实技科学仪器有限公司),ZF-I型三用紫外分析仪(上海顾村电光仪器厂),A B-8大孔树脂(天津农药厂),聚酰胺和聚酰胺薄膜(浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂),Sephadex LH-20(Pharmacia公司),乙腈和甲醇(色谱纯,天津市康科德科技有限公司),水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

甘草药材购于樟树中药材市场,由江西中医学院杨世林教授鉴定为胀果甘草 *G. inflata* Batal. 的根。

* 基金项目:科技部中小企业创新基金项目(04C26213601234)

** 作者简介:何明珍(1977-),女,广西省桂林人,硕士,研究方向为中草药活性成分研究。Tel:(0791)7119633 E-mail:hmz07@163.com

*** 通讯作者:冯育林, Tel:(0791)7119632 E-mail:fengyulin2003@hotmail.com

2 方法与结果

2.1 制备工艺

甘草 5 kg,加 70% 的乙醇回流提取 2 次,每次 1.5 h,滤过,合并滤液,回收乙醇得浸膏 800 g。浸膏经大孔树脂 AB-8 柱层析,用乙醇-水系统梯度洗脱,分别收集 50% 和 70% 的乙醇溶液洗脱部分。70% 的乙醇溶液部分经聚酰胺柱层析,乙醇-水系统梯度洗脱,收集 50% 的乙醇溶液洗脱部分,凝胶柱层析分离,得到黄色晶体(50 mg)。50% 的乙醇溶液洗脱部分经制备液相制备,得白色晶体(150 mg)。

2.2 结构鉴定

2.2.1 甘草苷 白色针状晶体, mp: 212 ~ 213℃, FAB-MS m/z : 419 ($M+1$)⁺; $IRV_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3400, 2960, 1650, 1610, 1510, 1470, 1290, 1230, 1090; UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 275, 311 (弱); $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ : 5.52 (1H, d, $J=12.4\text{Hz}$, H-2), 2.67 (1H, d, $J=14\text{Hz}$, H-3), 3.13 (1H, dd, $J=16.4, 12.8\text{Hz}$, H-3), 7.65 (1H, d, $J=8.4\text{Hz}$, H-5), 6.51 (1H, d, $J=8.8\text{Hz}$, H-6), 6.35 (1H, d, $J=2\text{Hz}$, H-8), 7.44 (1H, d, $J=8.4\text{Hz}$, H-2', 6'), 7.06 (1H, d, $J=8.4\text{Hz}$, H-3', 5'); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) δ : 78.56 (C-2), 43.06 (C-3), 189.82 (C-4), 128.30 (C-5), 110.45 (C-6), 164.53 (C-7), 102.47 (C-8), 162.95 (C-9), 113.43 (C-10), 132.22 (C-1'), 127.91 (C-2', 6'), 116.03 (C-3', 5'), 157.34 (C-4'), 100.15 (C-1''), 73.09 (C-2''), 76.93 (C-3''), 69.57 (C-4''), 76.49 (C-5''), 60.55 (C-6'')。以上数据与文献报道^[3]一致,鉴定为甘草苷(liquiritin)

2.2.2 异甘草苷 黄色针状晶体, mp: 148 ~ 150℃, FAB-MS m/z : 419 ($M+1$)⁺; UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 240, 260, 332, 360; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.85 (1H, d, $J=15\text{Hz}$), 7.85 (1H, d, $J=15\text{Hz}$), 7.82 (1H, dd, $J=8.8\text{Hz}$, H-2, 6), 7.17 (1H, dd, $J=8.8\text{Hz}$, H-3, 5), 6.39 (1H, d, $J=2.4\text{Hz}$, H-3'), 6.49 (1H, dd, $J=8.8, 2.4\text{Hz}$, H-5'), 8.14 (1H, d, $J=9.2\text{Hz}$, H-6'), 5.07 (1H, d, $J=7.6\text{Hz}$, H-1''); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 119.83 (C- α), 144.49 (C- β), 192.78 (C=O), 129.81 (C-1), 133.42 (C-2, 6), 117.7 (C-3, 5), 160.76 (C-4), 114.28 (C-1'), 166.02 (C-2'), 103.61 (C-3'), 167.05 (C-4'), 108.31 (C-5'), 131.32 (C-6'), 101.47 (C-1''), 74.43 (C-2''), 77.65 (C-3''), 71.07 (C-4''), 77.85 (C-5''), 62.39 (C-6'')。以上数据与文献报道^[4]一致,鉴定

为异甘草苷(isoliquiritin)。

2.3 纯度检查

2.3.1 对照品的杂质检查 薄层色谱鉴别法分析:分别取适量甘草苷、异甘草苷,加甲醇制成 2 mg/ml 的溶液,5 μl 点样在硅胶 GF₂₅₄ 板上以氯仿:甲醇(6:1)为展开剂,展开,晾干,用 10% 浓硫酸乙醇溶液显色,都为一个斑点。

高效液相色谱法分析: Hypersil ODS2 (250 mm $\times$ 4.60 mm, 5 μm) 色谱柱;分别以甲醇-0.1% 冰醋酸水溶液(20:80), 甲醇-0.1% 冰醋酸水溶液(40:60), 甲醇-0.1% 冰醋酸水溶液(60:40)为流动相测定;检测波长 276 nm。结果表明,三种流动相下对照品均为一个主峰。改变流相分析时未出现异常峰。

2.3.2 面积归一化法纯度检查 色谱条件: Hypersil ODS2 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,流动相为甲醇-0.1% 冰醋酸溶液(40:60),流速为 1 ml $\cdot$ min⁻¹。检测波长为 276 nm。对照品溶液浓度为 1.02 mg/ml,采集时间比保留时间延长 1 倍以上,面积归一化法计算,甘草苷和异甘草苷的纯度分别为: 99.9%, 99.7%。

3 讨论

由于中药甘草中含有大量黄酮,故先采用大孔树脂分离出总的黄酮。再作进一步分离,由于主要含有黄酮类等结构极为相似的杂质成分,所以分离难度很大,需要经过聚酰胺柱层析、凝胶柱层析、制备液相制备才能得到纯品。

分离制备的纯品经紫外光谱、红外光谱、质谱、核磁等波谱学方法分析,确定为甘草苷和异甘草苷。以面积归一化法检查其纯度大于 98.0%,符合药典规定的标准物质的质量要求,可作为含量测定用对照品。

甘草苷、异甘草苷为甘草中黄酮类成分的主要活性成分,该对照品的制备为甘草总黄酮的新药开发提供了物质基础。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:化学工业出版社,2005.
- [2] 贾国惠,贾世山. 甘草中黄酮的药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志,1998,33(9):513-515.
- [3] 丛景香,林炳昌. 甘草甙的分离纯化及鉴定[J]. 精细化工,2005,22(12):912-915.
- [4] 张海军,刘援,张如意. 乌拉尔甘草中黄酮甙类成分的研究[J]. 药学报,1994,29(6):471.

(收稿日期:2009-06-17)