

應用高效液相層析法作甘草及其製劑中 Glycyrrhizin 之鑑別及含量測定

陳婉淑 秦 玲 許秀錦 陳 本 鄭建詒

摘 要

以 2 N 鹽酸溶液在沸騰水浴上加熱 90 分鐘將甘草主成分甘草甜素 (Glycyrrhizin) 水解為一分子甘草次酸 (Glycyrrhetic acid) 及二分子葡萄糖醛酸 (Glucuronic acid) 後，應用高效液相層析法 (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) 分離並定量甘草次酸；本實驗法可供甘草藥材及其製劑中 Glycyrrhizin 之鑑別及含量測定，其分離效果良好，精確度高，敏感度為 $0.1 \mu\text{g}$ 。以此法測定 17 種甘草藥材中 Glycyrrhizin 含量範圍在 3.0 ~ 9.2 %。

前 言

甘草 (Glycyrrhizae Radix) 為神農本草經草部上品，歷代諸家本草均有著錄，為歷史最久、使用頻度最高、消耗量最多的藥材之一，用於緩和、鎮座、祛痰、矯味藥，並用於胃、十二指腸潰瘍；其主要成分 Glycyrrhizin 乃一種 Saponin Glucoside，此物質分解時可生成 Glucuronic acid，於肝臟中與有毒物質結合而具解毒作用，故自古即用於解毒劑，俗稱「解百藥之毒」，除供藥用外，並用於醬油之甘味料、菸草之添加劑等。甘草係豆科 (Leguminosae) 植物，我國西北一帶所產者，以 *Glycyrrhiza glandulifera* WALDSTEIN et KITAI (=*G. glabra* LINNAEUS var. *glandulifera* REGEL et HERDER) 為主，產於東北一帶者以 *G. uralensis* FISCHER et DE CANDOLLE 為主，藥用部份為根及走莖；中華藥典 (C.H.P. III) 尚未見收載甘草主成分 Glycyrrhizin 之鑑別及含量測定法，國內外則已有應用重量法^{4,5}、比色法²、氣相層析法³、薄層層析斑點掃描法⁴ 甚至高效液相層析法直接鑑別及定量 Glycyrrhizin 之報告，但因製劑成分複雜，分離效果往往未臻理想 (圖一)，另一方面因 Glycyrrhizin 為一分子 Glycyrrhetic acid 及二分子 Glucuronic acid 以 Ether linkage 連接而成

，在中藥製劑之抽提過程中，此 linkage 在酸性水溶液中可能斷裂，造成直接測定 Glycyrrhizin 之誤差；本試驗法係應用 HPLC 測定其酸水解產物 Glycyrrhetic acid，間接來鑑別及定量 Glycyrrhizin，適可改善上述兩項缺點，獲得理想、精確之結果。

材 料 與 方 法

一、儀器及器具

(一) HPLC 系統：包括 1. 溶媒輸送系統 (Waters, Model 6000A) 2. 逆相層析管 (Waters, μ -Bondapak C₁₈, 30 cm × 3.9 mm I.D.) 3. UV 計測器 (Waters, Model 450) 4. Data module (Waters, Model 730)。

(二) Milli-Q water purification system (Millipore Corp.)

(三) Millipore filter (Millipore, MILLEX-HV)

(四) 遠心分離機 (KOKUSAN, H-103N SERIES)

(五) 減壓濃縮裝置：包括 1. Büchi; CH-9230 2. Yamato Handy Aspirator。

(六) 索氏抽提裝置 (250 ml, 台製)。

二、標準品及試藥

(一) Glycyrrhizin: Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.

($\Rightarrow$) Methanol, Glacial Acetic Acid, Dichloromethane, Hydrochloric acid : Merck ; G.R. grade.

($\Rightarrow$) Methanol : L.C. grade.

三、檢體

($\Rightarrow$) 甘草藥材 (Glycyrrhiza spp.) 17 件。

($\Rightarrow$) 台灣地區市售含甘草中藥濃縮製劑 16 件, 一般製劑 10 件; 共計 26 件。

四、實驗方法

($\Rightarrow$) 標準品溶液之調製:

精確稱取 Glycyrrhizin 25mg、50 mg、75 mg 及 100 mg 分別溶於甲醇 50 ml 中, 精確量取 2 ml 置入三角燒瓶中, 加 2 N 鹽酸溶液 20ml, 置於沸騰水浴上加熱 90 分鐘, 冷卻後加 Dichloromethane 30ml 振搖混合 5 分鐘後遠心分離, 取 Dichloromethane 層, 水層再以 Dichloromethane 30 ml 抽取 2 次, 合併 Dichloromethane 抽出液, 減壓濃縮至乾, 殘留物加甲醇 2 ml 溶解後, 用 Millipore filter 過濾, 調製成各種濃度之標準品溶液。

($\Rightarrow$) 檢品溶液之調製:

精確稱取經切片、粉碎、乾燥之甘草藥材粉末 1 g 或相當於甘草標誌含量 1 g 之中藥製劑粉末移入索氏抽提器中, 加甲醇 200 ml 在 80 $^{\circ}$ C 水浴上附迴流冷凝器加溫抽提至無色, 並將抽提液以 TLC

法與 Glycyrrhizin 標準品比對至未檢出 Glycyrrhizin 後, 將抽提液減壓濃縮, 濃縮液移至 100 ml 容量瓶中, 加甲醇至 100 ml; 精確量取 2ml 置入三角燒瓶中, 加 2 N 鹽酸溶液 20 ml 後依上法操作, 調製成檢品溶液。

($\Rightarrow$) 高效液相層析之條件:

1. 層析管: μ -Bondapak C_{18} ; 30 cm $\times$ 3.9 mm I.D.

2. 移動相: Methanol : Water : Glacial Acetic Acid = 85 : 15 : 1

3. 流速: 2.0 ml/min

4. 偵測器: UV 254 nm; Auf: 0.4

5. 記錄紙速度: 0.25 cm/min

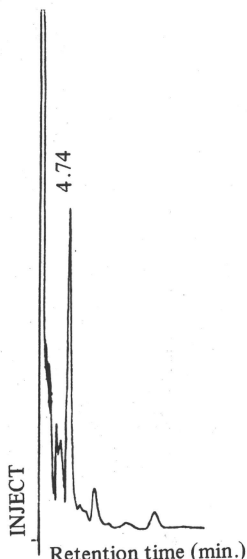
($\Rightarrow$) 實驗步驟:

1. 取各種不同濃度之標準品溶液各 10 μ l 分別注入高效液相層析儀中, 將其面積積分值與濃度關係繪成標準曲線 (圖二、三)。

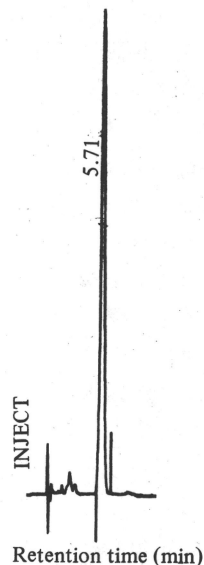
2. 取檢品溶液 10 μ l 分別注入高效液相層析儀中, 於室溫下 (23 $^{\circ}$ C) 作層析分離。

結 果

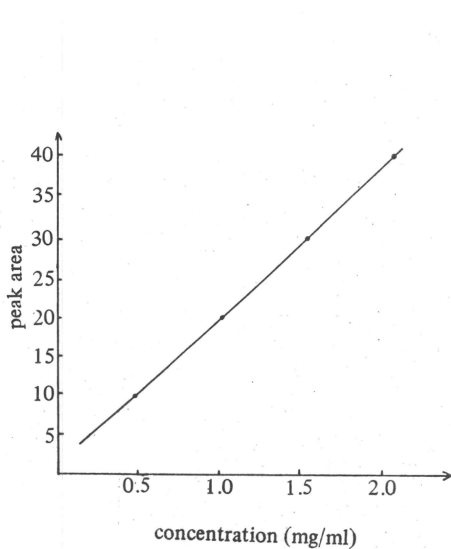
以 HPLC 法測定 Glycyrrhetic acid 來鑑別及定量甘草藥材及其製劑中之 Glycyrrhizin 滯留時間約為 5.7 分鐘 (圖四、五), 與圖一比較可知其分離效果良好, 精確度高。



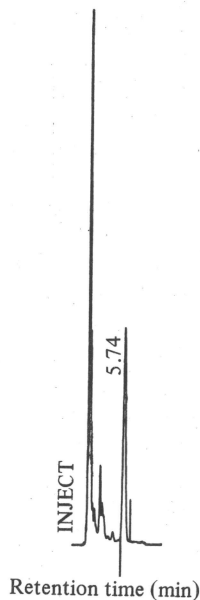
圖一 含甘草中藥製劑未經酸水解之甲醇抽出液高效液相層析圖。



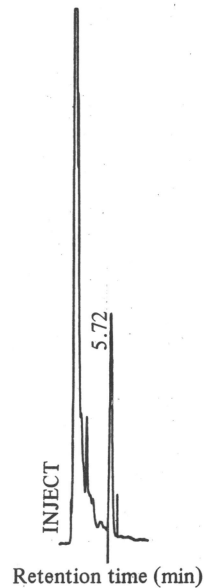
圖二 Glycyrrhizin 標準品溶液之高效液相層析圖。



圖三 Glycyrrhizin 標準品經酸水解成 Glycyrrhetic Acid 後，以 HPLC 作含量測定之標準曲線。



圖四 甘草藥材檢品溶液之高效液相層析圖。



圖五 含甘草中藥製劑檢品溶液之高效液相層析圖。

甘草藥材 17 件因產地、等第之不同 Glycyrrhizin 含量各有所別 (表一)。

含甘草中藥製劑 26 件中，10 件一般製劑 Glycyrrhizin 之平均含量為 6.2%，16 件濃縮製劑之平均含量為 1.7%。

討 論

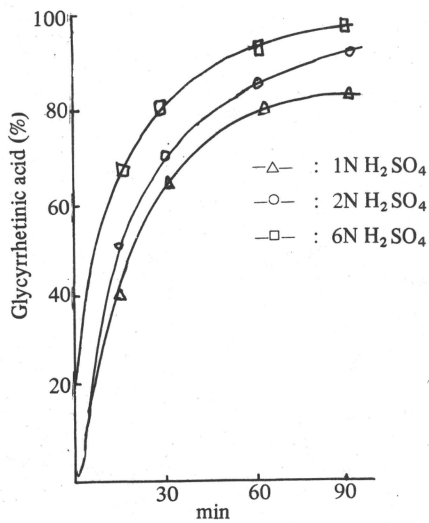
實驗中曾就 Glycyrrhizin 水解條件之酸的種類、濃度及加熱時間予以研討，結果以 2 N 鹽酸溶液加熱 90 分鐘時水解率 94% 為最高且最穩定 (

圖六、七)。

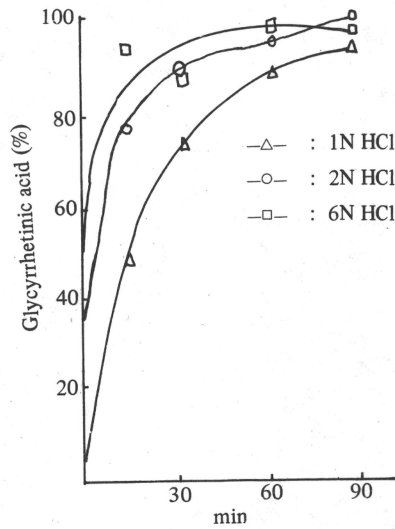
含甘草中藥製劑中濃縮製劑之 Glycyrrhizin 含量測定結果 1.7% 有偏低現象，其可能影響之原因有下列三點：一、檢體製造抽提過程的損失及所採用甘草藥材之品質高低。二、Glycyrrhizin 與製劑中其它中藥材所含某些種類之 Alkaloid (如 Berberine 等) 產生沉澱反應⁶ 而影響其含量測定結果。三、濃縮製劑使用吸附力強之賦形劑 (如 Volka-cid 等) 會減少 Glycyrrhizin 30~40% 之溶出量，致使含量測定值偏低。

表一 甘草藥材中 Glycyrrhizin 之含量測定結果

中 藥 材	件 數	Glycyrrhizin 含 量 (%)	平均值 (%)
梁 外 特 字 草	2	8.7 ~ 9.2	9.0
梁 外 甲 字 草	2	6.4 ~ 6.8	6.6
梁 外 乙 字 草	1	6.0	—
梁 外 丙 字 草	1	5.1	—
梁 外 丁 字 草	1	4.9	—
梁 外 毛 草	1	4.3	—
西 鎮 草	9	3.0 ~ 8.2	5.5



圖六 以硫酸水解 Glycyrrhizin 時 H₂SO₄ 濃度、加熱時間與水解百分率關係圖。



圖七 以鹽酸水解 Glycyrrhizin 時 HCl 濃度、加熱時間與水解百分率關係圖。

參考文獻

1. 日本藥局方解說書, 1981. p. 284. 日本公定書協會。
2. Cundiff, R.H. 1964. Anal. Chem. 36, 1871. (1964)
3. 野崎ウ. 1970. 藥誌. 90, 693.
4. 陳玉盤. 1978. 台灣藥學雜誌第三十卷, 第二期
5. 山口一孝. 1961. 植物成分分析法. 下卷, p. 288.
6. 有地滋. 1978. Proc. symp. WAKAN-YAKU 11, 24 ~ 28.

HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF GLYCYRRHIZIN IN LICORICE & IT'S PHARMACEUTICAL PREPARATIONS

WAN-SU CHEN, LING CHYN, SHOW-JIIN SHEU,
BEEN CHEN AND CHIEN-YI CHENG

ABSTRACT

Glycyrrhizin in Licorice and it's pharmaceutical preparations is decomposed to one molecular Glycyrrhetic acid and two molecular Glucuronic acid by 2N Hydrochloric acid, then we apply a reverse phase High Performance Liquid Chromatographic method to analysis Glycyrrhetic

acid so as to identify and determine the quantity of Glycyrrhizin indirectly. This method results great separation, accuracy and high reproducibility could be applied to routine analysis of Glycyrrhizin.