

西北地区商品甘草 HPLC 指纹图谱

李成义, 马艳茹, 李越峰, 王明伟*
(甘肃中医学院, 兰州 730000)

[摘要] 目的:研究西北地区商品甘草的高效液相指纹图谱,为建立商品甘草的行业质量标准提供依据。方法:采用高效液相色谱法,选用 ZORBAX Edipse XDB-C₁₈ 柱(4.60 mm × 250 mm, 5 μm),柱温 25℃,以乙腈-0.05% 磷酸溶液为流动相,检测波长 237 nm,进行梯度洗脱,生成图谱。使用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A”和 SPSS 软件建立 HPLC 对照指纹图谱并进行聚类分析。结果:建立了西北地区商品甘草的高效液相指纹图谱,方法学验证符合要求。16 批商品甘草药材的指纹图谱有 10 个特征共有峰,与生成对照图谱比较相似度均 >0.904,通过聚类分析将 16 批药材聚为 4 类。结论:该方法稳定、可靠,本研究首次采用 HPLC 指纹图谱比较西北地区不同等级的商品甘草,为西北地区商品甘草的质量考察、等级划分提供有益参考。

[关键词] 商品甘草;高效液相色谱;指纹图谱;聚类分析;西北地区

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)09-0129-04

HPLC Fingerprint for Commercial Glycyrrhizae Radix from North-west China

LI Cheng-yi, MA Yan-ru, LI Yue-feng, WANG Ming-wei*
(Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** Research the HPLC fingerprint of the pieces of commercial Glycyrrhizae Radix

[收稿日期] 20111112(002)

[基金项目] 甘肃省自然科学基金项目(1010RJZA214);甘肃省中药材产业科技攻关项目(GYC09-13)

[第一作者] 李成义,教授,硕士生导师,从事中药品种与质量研究, Tel:0931-8765385, E-mail: gslichengyi@163.com

[通讯作者] *王明伟,讲师,硕士,从事中药品种与质量研究, Tel:13389330718, E-mail: wmw2009@126.com

效改变和质量标准制订具有实际应用价值。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S].2010:231.
[2] 龚千锋.中药炮制学[M].北京:中国中医药出版社,2006:111.
[3] 谢学建,张俊慧,马爱华.中药栀子研究进展[J].时珍国医国药,2000,11(10):943.
[4] 于洋,高昊,戴毅,等.栀子属植物化学成分的研究进展[J].中草药,2010,41(1):148.
[5] 盛萍,王新铃,王青,等.栀子炒炭前后多糖含量分析[J].时珍国医国药,2006,17(3):392.
[6] 陈红,肖永庆,张村,等.栀子炒制过程中栀子苷和藏红花素的含量变化[J].中国中药杂志,2007,32(10):990.
[7] 李小兵,张丽玲.栀子超临界 CO₂ 萃取物的 GC-MS 分析[J].中药材,2003,26(11):794.

[8] 刘海萍.栀子的化学成分及其质量研究[D].北京:首都师范大学,2007.
[9] An Adams, Kourosch Abbaspour Tehrani, Milda Keršienė, et al. Characterization of model melanoidins by the thermal degradation profile [J]. J Agri Food Chem, 2003, 51:4338.
[10] 张彤,马玮芸,陶建生,等.多指标综合评分法优选栀子炭炮制工艺[J].中国药师,2007,10(4):322.
[11] 黄继全.栀子的炮制工艺探讨[J].江西中医药,2007,38(5):63.
[12] Tawara J N, Johnston J J, Goodall M J. Degradation of 3-chloro-p-toluidine hydrochloride in watermelon Bait. Identification and chemical characterization of novel N-glucoside and oxopropanimine [J]. J Agri Food Chem, 1996, 44: 3983.
[13] 张敦铁. Maillard 反应中间体的研究 [D]. 武汉:华中科技大学,2006.

[责任编辑 蔡仲德]

from the north-west China, and establish the quality standards of commercial *Glycyrrhizae Radix* to provide a basis for the industry. **Method:** High performance liquid chromatography was used for the separation on. Choice ZORBAX Edipse XDB-C₁₈ column (4.60 mm × 250 mm, 5 μm), column temperature was maintained at 25 °C, with acetonitrile-0.05% phosphoric acid was selected as mobile phase by gradient elution, the detection wavelength was set at 237 nm, the gradient elution were adopted. Using the 'chromatographic fingerprint evaluation system 2004A' and SPSS software was used to establish HPLC fingerprint comparison and cluster analysis. **Result:** Established the HPLC fingerprint of the pieces of commercial *Glycyrrhizae Radix* from the north-west area China was established, and the results of methodological study met the technical requirements for fingerprinting. Ten common peaks were found in the fingerprint of Sixteen batches of commercial *Glycyrrhizae Radix*, the similarity was greater than 0.904, and four groups were divided by cluster analysis, together into four groups. **Conclusion:** This is the first use of HPLC fingerprint to compare different levels of commercial *Glycyrrhizae Radix* from the north-west China. The HPLC method is stable and reliable to provide a scientific basis of quality inspection and classification for the commercial *Glycyrrhizae Radix*.

[**Key words**] commercial *Glycyrrhizae Radix*; HPLC; fingerprint; cluster analysis; north-west China

甘草始载于《神农本草经》,列为上品。2010 年版《中国药典》^[1] 收录的品种为甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *G. inflata* Bat.、或光果甘草 *G. glabra* L. 的干燥根和根茎。甘肃、新疆是我国西北地区乌拉尔甘草的主要产区。然而随着产地药材甘草商品规格的多变,市场上混淆品和伪品的出现,导致其价格差异较大,等级混乱,缺乏可靠的质量标准。近年来对于甘草的质量控制研究多集中在其指标性成分的含量测定上^[2-5],而目前对中药材的质量控制多使用指纹图谱的方法^[6-7]。本研究采用 HPLC,对西北地区不同商品等级的甘草 HPLC 指纹图谱进行初步研究,利用软件筛选特征色谱峰,运用聚类分析的方法对样品进行分类,为全面评价药材商品质量提供新思路,亦是指纹图谱研究用于不同等级商品鉴别的初步尝试。

1 材料

1.1 仪器 高效液相 Agilent 1200(安捷伦公司),检测器 G131513 二极管阵列检测器(美国),BS 224 S 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),KQ-250 型高频数控超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司);DJ-02 型中药粉碎机(上海淀久中药机械制造有限公司)。

1.2 试剂 甲醇(色谱纯,天津市光复精细化工研究所),乙腈(色谱纯,天津市光复精细化工研究所,产品批号 Q/12NK 4021-2003),磷酸为优级纯,水为娃哈哈纯净水。

1.3 对照品 甘草苷(中国药品生物制品检定所,批号 111610-200604);甘草酸铵(中国药品生物制品检定所,批号 110731-200615)。

1.4 样品 商品甘草采自甘肃、新疆各地区,共 16 批次,经甘肃中医学院中药鉴定学教研室李成义教授鉴定,为豆科植物甘草 *G. uralensis* Fisch. 的干燥根(表 1)。西北地区的乌拉尔甘草可以很好的反映出目前市面上商品甘草的质量情况^[8]。

2 方法

2.1 色谱条件 色谱柱为 ZORBAX Edipse XDB-C₁₈柱(4.60 mm × 250 mm, 5 μm),以乙腈(A)-0.05% 磷酸溶液(B)为流动相,按照表 2 所示洗脱条件进行梯度洗脱;流速为 1.0 mL·min⁻¹,进样量为 10 μL,柱温为 25 °C,检测波长为 237 nm,记录 40 min 的色谱图。理论塔板数按甘草苷峰计算不得低于 5 000。

2.2 对照品溶液的制备 取甘草苷对照品、甘草酸铵对照品适量,精密称定,加入 70% 乙醇分别制成每 1 mL 含甘草苷 20 μg、甘草酸铵 0.2 mg 的溶液。

2.3 供试品溶液的制备 分别取甘草粉末(过三号筛)0.2 g,精密称定后,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 乙醇 100 mL,密塞,称定质量,超声处理 30 min,放冷,再称定质量,用 70% 乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,作为供试品溶液。

2.4 测定方法 分别精取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后,记录相对峰面积。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 取甘草(金塔县中东镇:条草一级)供试品溶液,按 2.4 项下方法测定,连续进样 6 次,以甘草苷和甘草酸铵的保留时间、峰面积为参照,对其他主要共有峰的相对保留时间、相对峰面积

表 1 西北地区商品甘草的来源及产地

No.	商品等级	样品编号	来源	品种
S1	毛草	GC20101114003	甘肃省瓜州县南岔镇	甘草(栽培品)
S2	条草三级	GC20101114002	甘肃省瓜州县南岔镇	甘草(栽培品)
S3	条草二级	GC20101114001	甘肃省瓜州县南岔镇	甘草(栽培品)
S4	毛草	GC20101114007	甘肃省玉门市布隆吉乡	甘草(栽培品)
S5	条草三级	GC20101114006	甘肃省玉门市布隆吉乡	甘草(栽培品)
S6	条草二级	GC20101114005	甘肃省玉门市布隆吉乡	甘草(栽培品)
S7	条草三级	GC20101113003	甘肃省金塔县中东镇	甘草(栽培品)
S8	条草二级	GC20101113002	甘肃省金塔县中东镇	甘草(栽培品)
S9	条草一级	GC20101113001	甘肃省金塔县中东镇	甘草(栽培品)
S10	毛草	GC20101107023	甘肃省定西市漳县(首阳药市)	甘草(栽培品)
S11	条草三级	GC20101107022	甘肃省定西市漳县(首阳药市)	甘草(栽培品)
S12	条草二级	GC20101107021	甘肃省定西市漳县(首阳药市)	甘草(栽培品)
S13	毛草	XGC201011014	新疆克拉玛依市	甘草(栽培品)
S14	条草三级	XGC201011013	新疆克拉玛依市	甘草(栽培品)
S15	条草二级	XGC201011012	新疆克拉玛依市	甘草(栽培品)
S16	条草一级	XGC201011011	新疆克拉玛依市	甘草(栽培品)

表 2 梯度洗脱条件

t/min	乙腈/%	0.05%磷酸溶液/%
0~8	1981	
8~35	19~50	81~50
35~36	50~100	50~0
36~40	100~19	0~81

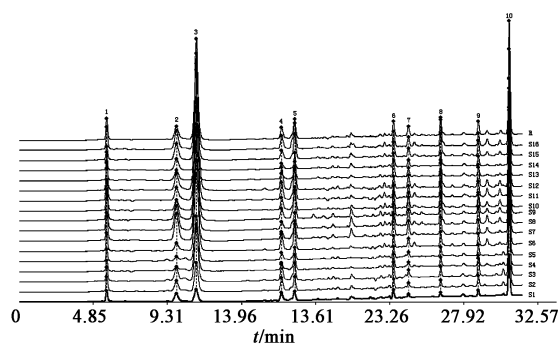
做以统计。结果甘草苷 RSD 0.31%,甘草酸铵 RSD 0.19%,其他主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 <3%,表明仪器精密良好。

2.5.2 稳定性试验 取甘草(金塔县中东镇:条草一级)供试品溶液,分别于 0,2,4,6,8,10,12,16,20,24 h 按 2.4 项下方法进行测定,以甘草苷和甘草酸铵的保留时间、峰面积为参照,对其他主要共有峰的相对保留时间、相对峰面积做以统计。结果甘草苷 RSD 1.73%,甘草酸铵 RSD 1.90%,其他主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 <3%,表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.5.3 重复性试验 取甘草(金塔县中东镇:条草一级)6 份,按照 2.3 供试品溶液的制备进行制备,按 2.4 项下方法依次测定,以甘草苷和甘草酸铵的保留时间、峰面积为参照,对其他主要共有峰的相对保留时间、相对峰面积做以统计。结果甘草苷 RSD 2.05%,甘草酸铵 RSD 2.68%,其他主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 <3%,表明重复性良好。

3 结果

3.1 指纹图谱的采集 分取 16 批次商品药材甘草,粉末约 0.2 g,精密称定,按 2.3 项下的方法进行供试品溶液的制备。按 2.4 项下的方法进行测定。使用药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)》对 16 批次不同等级的商品甘草其色谱峰进行多点校正和匹配数据,以中位数法,生成对照图谱 R,见图 1。



R. 对照图谱

图 1 16 批次商品甘草 HPLC 及对照图谱

3.2 共有峰的确定及相似度评价 将 16 批次甘草的色谱图数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)》软件进行数据分析,确定了 10 个共有色谱峰,以对照指纹图谱为对照模板计算各个色谱图的相似度均 >0.904。其中,经对照品对照比较,确定 3 号峰为甘草苷,10 号峰为甘草酸(图 1)。

3.3 聚类分析 采用 16 批次商品甘草色谱数据中 10 个共有特征峰的相对峰面积值,使用 SPSS 19 软件进行系统聚类分析,选用类间平均法作为聚类方法,采用平方欧式距离作为测度方法,得到如图 2 所示的树状结构图。由 16 批不同商品等级甘草指纹图谱可知,由于商品等级的不同,指标性成分甘草酸和甘草苷的峰面积以及其他共有峰峰面积不同,它们之间的相似度存在一定的差异。16 批次样品可以聚为 4 类:1,4,10,13 号样品聚一类,均是毛草;2,5,7,11,14 号样品聚为一类,均是条草三级;3,6,8,12,15 号样品聚为一类,均是条草二级;9,16 号样品聚为一类,他们均是条草一级。

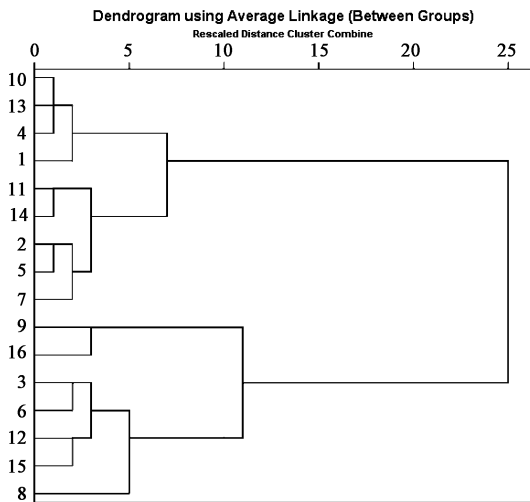


图 2 16 批次商品甘草聚类分析树状结构

4 讨论

近年来对于甘草的质量控制研究多集中在其指标性成分的含量测定上,然而对于市场流通中的商品甘草的等级划分,确缺少一个系统的质量评价模

式。本研究根据西北地区不同商品等级甘草初步建立的指纹图谱,发现样品在主要色谱峰的峰高和峰面积具有显著的差异性,且呈现良好的规律性,指纹图谱及聚类分析结果与甘草商品等级的划分基本一致。这一结果为商品甘草以及甘草相关制剂的质量研究提供了科学依据。据此可以初步推断商品甘草主要色谱峰的峰高与峰面积与其商品等级等因素有关系。因此,下一步我们将重点研究不同产地、不同商品等级之间的成分影响,为最终很好地反映出不同等级商品甘草的质量关系奠定基础,使商品甘草的质量标准划分更科学、更全面、更客观、更符合实际。

[参考文献]

- [1] 中国药典[S].一部. 2010:80.
- [2] 索建兰,沈峰. HPLC 法测定甘草中甘草酸的含量[J]. 陕西中医,2010,31(2):226.
- [3] 曹海禄,周应群. 甘草药材中甘草酸含量影响因素的研究概述[J]. 中国现代中药,2009,11(2):6.
- [4] 范瑞,刘汝成,冯慧. 高效液相色谱法测定复方甘草片中甘草酸的含量[J]. 海峡药学,2010,22(8):113.
- [5] 宋丽军,谭晓梅,罗佳波. HPLC 法同时测定甘草中甘草苷、甘草酸、甘草次酸含量[J]. 中药材,2009,32(3):378.
- [6] 詹雪艳,史新元,段天璇,等. 色谱指纹图谱相似度方法的研究进展[J]. 中国实验方剂学,2011,17(2):1071.
- [7] 周玉新,雷海明. 中药指纹图谱研究技术[M]. 北京:化学工业出版社,2002:131.
- [8] 钮正睿,毛淑杰,顾雪竹,等. 中药炮制辅料甘草汁的质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(21):100.

[责任编辑 蔡仲德]