

甘草药材 HPLC 指纹图谱研究*

谢佳颖, 杨立国, 夏伟军, 张海元, 张英杰, 梅双喜[△]

(云南省药物研究所 / 云南白药集团创新研发中心 / 云南省中药和民族药新药创制企业重点实验室, 云南 昆明 650111)

摘要: 目的 建立甘草药材的 HPLC 指纹图谱。方法 采用高效液相色谱法, 选用 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6mm×250mm, 5 μ m) 色谱柱, 流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液, 分析时间为 70min, 各时间段检测波长为: 0~16min, 215nm; 16~22min, 360nm; 22~70min, 250nm。结果 建立了甘草药材的高效液相色谱指纹图谱, 确定 7 个共有色谱峰, 方法学验证结果符合指纹图谱相关要求。结论 该方法稳定、可靠、重复性好, 可作为不同批次甘草药材质量控制的评价方法。

关键词: 甘草; HPLC; 指纹图谱

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2015)05-0032-05

甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎, 春、秋二季采挖, 除去须根, 晒干。其性平、味甘, 归心、肺、脾、胃经, 具有补脾益气、清热解毒之功效, 临床上广泛应用于脾胃虚弱、倦怠乏力等证^[1-2]。

甘草是云南省药物研究所研制的“金品”痛舒胶囊、肿痛气雾剂等产品的重要原料之一^[3], 但由于药材受气候等生态环境的影响, 不同批次药材所含化学成分差别较大。为了有效的控制各批次甘草药材的质量, 我们运用 HPLC 方法对同一产地 10 批次甘草药材进行了指纹图谱测定, 为甘草药材质量的有效控制奠定了方法基础。

1 仪器和材料

Thermo UltiMate 3000 高效液相色谱仪 (Ulti-mate-3000 RS 四元泵、WPS-3000 自动进样器、TCC-3000 SD 柱温箱、DAD-3000 检测器、ChromeLeon 7.0 色谱工作站); SK8200HP 超声波清洗器 (上海科导超声仪器有限公司); 瑞士 Mettler Toledo AG285 电子天平; 甘草苷 (111610-200503) 购自中国食品药品检定研究院; 甘草酸 (130109) 和异甘草苷 (130418) 购自北京万佳首化生物科技有限公司; 蔗糖甘草苷和异甘草素葡萄糖苷为为本研究室从甘草药材中提取分离得到^[4-5]; 甘草药材

(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) 购自内蒙古, 经云南省药物研究所邱斌高级工程师鉴定, 标本保存于云南省药物研究所标本室; 乙腈为色谱级, 水为实验室自制重蒸水, 其它试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 液相色谱条件

色谱柱为 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m), 流动相为乙腈 (A)-0.05% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱程序见表 1。流速为 1 mL/min, 各时间段检测波长为: 0~16 min, 215 nm; 16~22 min, 360 nm; 22~70 min, 250 nm, 柱温为 30 $^{\circ}$ C, 进样量为 10 μ L, 检测时间为 70 min。

表 1 流动相梯度洗脱表

时间 min	A (乙腈) / %	B (0.05% 磷酸水) / %
0	16	84
10	18	82
15	25	75
20	25	75
40	37	63
65	90	10
70	16	84

2.2 混合对照品溶液的制备方法

分别称取异甘草素葡萄糖苷、异甘草苷、

* 基金项目: 云南省科技领军人才培养计划项目 (2014HA001)

收稿日期: 2015-07-06

作者简介: 谢佳颖 (1989-), 女, 云南大理人, 工程师, 主要从事天然药物化学方面的研究。

[△]通信作者: 梅双喜, E-mail: 13211783158@126.com

芹糖甘草苷、甘草苷和甘草酸适量,加入 70%乙醇制成每毫升含上述各对照品 20 μg 的混标溶液,摇匀,备用。

2.3 供试品溶液的制备方法

取甘草药材粉末约 0.1 g,置 60 mL 具塞锥形瓶中,加入 70%乙醇 25 mL,密塞,称重,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)30 min,放冷,再称定重量,加入 70%乙醇补足减失的重量,摇匀后,使用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,备用。

2.4 方法学验证

2.4.1 精密度考察

取 1 号供试品溶液,连续进样 6 次,记录高效液相色谱图,计算各个共有峰的相对保留时间和相对峰面积,计算 RSD 值。各共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.02%~0.35%(表 2),各共有峰相对峰面积的 RSD 为 0.03%~0.13%(表 3),表明仪器性能较好,符合指纹图谱相关要求。

表 2 相对保留时间(将 3 号峰的相对保留时间定为 1.000)

指认峰	精密 度 1	精密 度 2	精密 度 3	精密 度 4	精密 度 5	精密 度 6	平均 值	RSD /%
1	0.460	0.460	0.460	0.459	0.460	0.459	0.460	0.04
2	0.927	0.927	0.927	0.927	0.928	0.927	0.927	0.02
3	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
4	1.670	1.669	1.669	1.668	1.669	1.667	1.668	0.10
5	1.772	1.772	1.771	1.770	1.771	1.769	1.771	0.09
6	3.808	3.805	3.806	3.801	3.804	3.800	3.804	0.30
7	4.047	4.044	4.043	4.039	4.041	4.038	4.042	0.35

表 3 相对峰面积(将 3 号峰的相对峰面积定为 1.000)

指认峰	精密 度 1	精密 度 2	精密 度 3	精密 度 4	精密 度 5	精密 度 6	平均 值	RSD /%
1	0.341	0.341	0.341	0.341	0.342	0.342	0.341	0.05
2	0.585	0.586	0.586	0.586	0.587	0.588	0.587	0.13
3	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
4	0.213	0.211	0.212	0.212	0.212	0.212	0.212	0.05
5	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.198	0.03
6	0.435	0.434	0.434	0.434	0.434	0.433	0.434	0.06
7	0.033	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.04

2.4.2 稳定性试验

取 1 号供试品溶液,分别在制备后的 0,2,4,8,12,24 h 进样,记录高效液相色谱图,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,计算 RSD 值。各

共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.05%~1.84%(表 4),各共有峰的相对峰面积的 RSD 为 0.02%~0.83%(表 5),表明供试品溶液在 24 h 内稳定,符合指纹图谱相关要求。

表 4 相对保留时间(将 3 号峰的相对保留时间定为 1.000)

指认峰	稳定性 0h	稳定性 4h	稳定性 8h	稳定性 12h	稳定性 24h	平均 值	RSD /%
1	0.461	0.459	0.459	0.459	0.461	0.460	0.10
2	0.927	0.928	0.928	0.928	0.927	0.928	0.05
3	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
4	1.670	1.661	1.661	1.660	1.672	1.665	0.58
5	1.772	1.764	1.764	1.763	1.774	1.767	0.56
6	3.811	3.787	3.786	3.783	3.815	3.796	1.51
7	4.052	4.023	4.021	4.018	4.056	4.034	1.84

表 5 相对峰面积(将 3 号峰的相对峰面积定为 1.000)

指认峰	稳定性 0h	稳定性 4h	稳定性 8h	稳定性 12h	稳定性 24h	平均 值	RSD /%
1	0.345	0.344	0.347	0.346	0.338	0.344	0.35
2	0.580	0.589	0.584	0.584	0.573	0.582	0.58
3	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
4	0.215	0.215	0.217	0.217	0.212	0.215	0.21
5	0.200	0.199	0.203	0.203	0.198	0.201	0.23
6	0.439	0.437	0.441	0.440	0.421	0.436	0.83
7	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.02

2.4.3 重复性试验

取 1 号甘草药材,按 2.3 项下供试品的制备方法制备 6 份供试品溶液,分别进样,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,计算 RSD 值。各共有峰相对保留时间的 RSD 值为 0.05%~1.47%(表 6),各共有峰相对峰面积的 RSD 值为 0.05%~0.36%(表 7),表明供试品溶液的制备方法重复性较好,符

表 6 相对保留时间(将 3 号峰的相对保留时间定为 1.000)

指认峰	重复 性 1	重复 性 2	重复 性 3	重复 性 4	重复 性 5	重复 性 6	平均 值	RSD /%
1	0.461	0.459	0.459	0.459	0.459	0.459	0.459	0.08
2	0.927	0.928	0.928	0.928	0.928	0.928	0.928	0.05
3	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
4	1.671	1.663	1.661	1.660	1.659	1.661	1.663	0.43
5	1.773	1.766	1.763	1.763	1.762	1.764	1.765	0.42
6	3.813	3.791	3.784	3.784	3.781	3.786	3.790	1.17
7	4.056	4.027	4.019	4.019	4.016	4.023	4.027	1.47

表 7 相对峰面积(将 3 号峰的相对峰面积定为 1.000)

指认峰	重复性 1	重复性 2	重复性 3	重复性 4	重复性 5	重复性 6	平均值	RSD /%
1	0.343	0.344	0.346	0.345	0.343	0.345	0.344	0.13
2	0.578	0.585	0.583	0.581	0.581	0.581	0.582	0.26
3	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
4	0.213	0.215	0.217	0.217	0.217	0.217	0.216	0.18
5	0.198	0.200	0.203	0.203	0.203	0.203	0.202	0.24
6	0.432	0.438	0.443	0.441	0.440	0.439	0.439	0.36
7	0.031	0.032	0.033	0.032	0.032	0.032	0.032	0.05

合指纹图谱相关要求。

2.5 指纹图谱及相似度计算

2.5.1 十批甘草药材指纹图谱的测定

按 2.1 项下 HPLC 条件测定同一产地 10 批次甘草药材的高效液相色谱指纹图谱,采用药典委员会推荐使用的“中药色谱指纹图谱相似度评

价系统”软件进行分析,得到了不同批次甘草药材指纹图谱的共有谱图,并确定了 7 个共有色谱峰(见图 1)。

2.5.2 同一产地 10 批次甘草药材指纹图谱相似度计算

采用药典委员会推荐使用的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件,计算得到了同一产地 10 批次甘草药材指纹图谱的相似度,其相似度均在 0.95 以上,表明同一产地不同批次甘草药材的相似度满足要求(见图 2)。

2.6 甘草药材部分特征峰的化学指认

取 1 号供试品溶液及混合对照品溶液进样,根据各个对照品的色谱保留时间可以对甘草药材的部分色谱峰进行指认,峰 2 为芹糖甘草苷,峰 3 为甘草苷,峰 4 为异甘草素葡萄糖苷,峰 5 为异甘草苷,峰 6 为甘草酸(见图 3)。

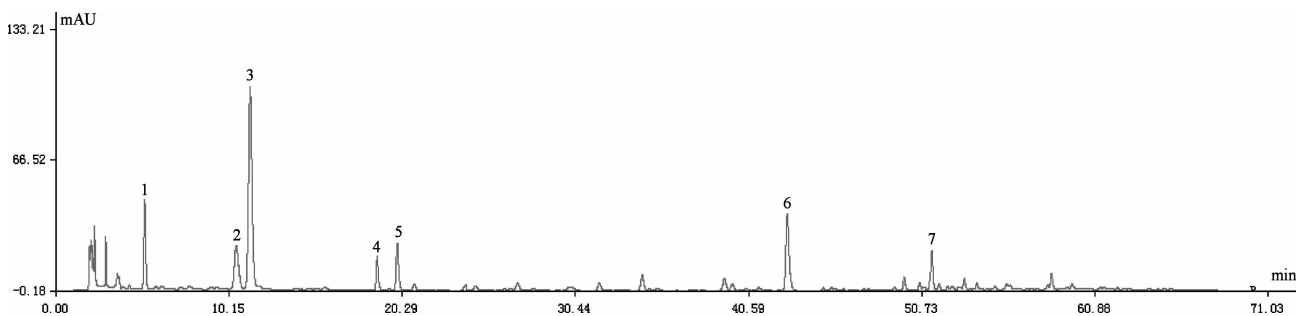


图 1 甘草药材 HPLC 对照指纹图谱

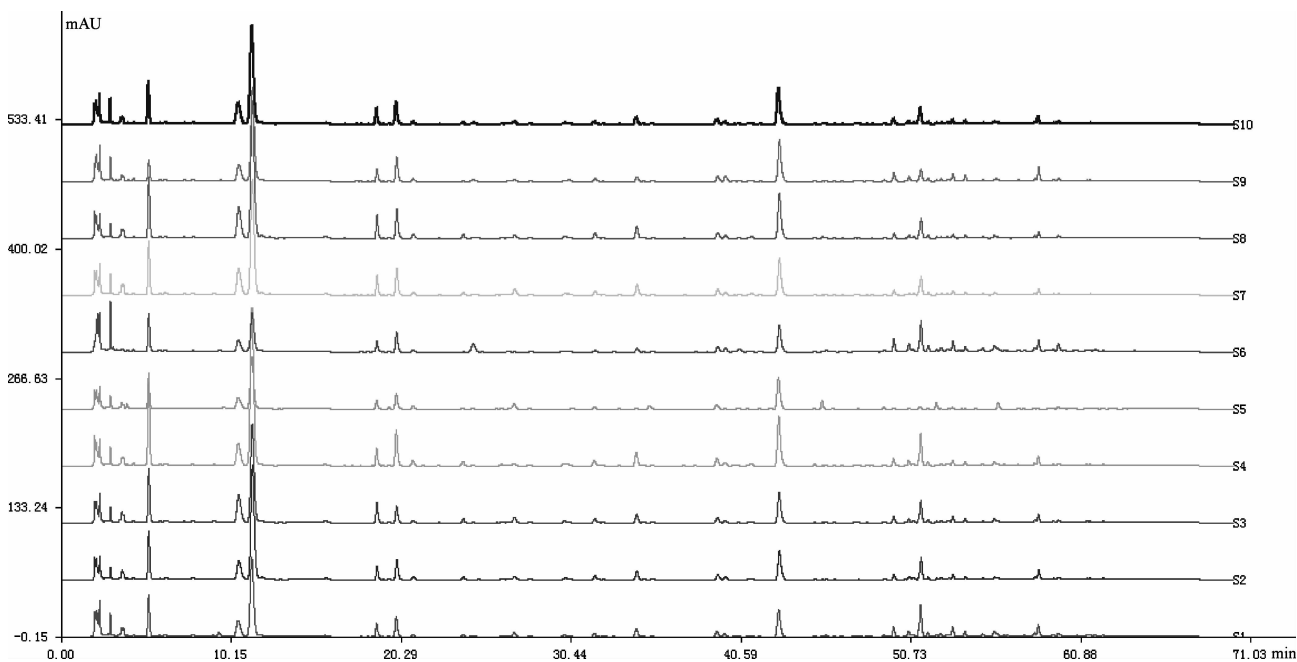


图 2 同一产地 10 批次甘草药材 HPLC 指纹图谱

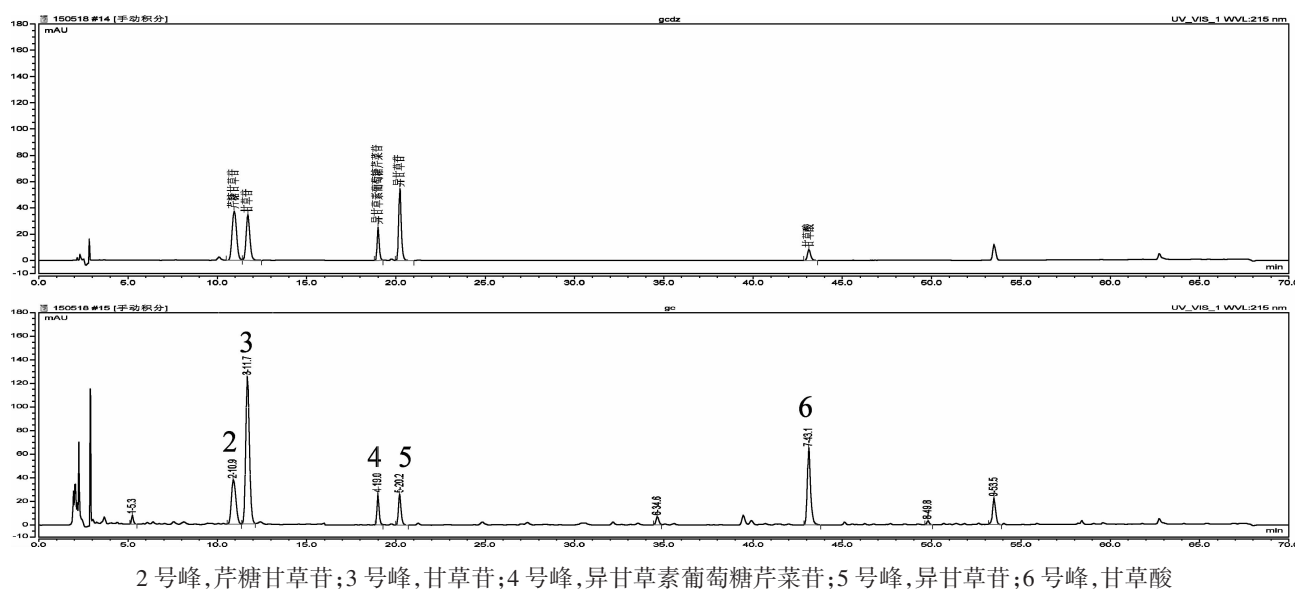


图3 混合对照品(上图)和甘草药材(下图)的 HPLC 图谱

3 讨论

① 本研究对甲醇、乙腈和酸水系统进行了摸索,发现乙腈-0.05%磷酸水系统分离情况较好,各色谱峰均达到比较好分离,故确定乙腈-0.05%磷酸水系统作为甘草药材液相色谱指纹图谱的流动相。

② 实验过程中考察了3种不同提取方式(超声、冷浸和回流),发现3种提取方式的提取效率相似,故最终选择操作简便的超声作为药材的提取方式。

③ 根据二极管阵列检测器全波长扫描给出的各指标成分的最大吸收波长可知:蔗糖甘草苷和甘草苷(2号峰和3号峰)的最大吸收波长为215 nm,异甘草素葡萄糖苷和异甘草苷(4号峰和5号峰)的最大吸收波长为360 nm,甘草酸(6号峰)的最大吸收波长为250 nm。所以,确定各时间段的检测波长如下:0~16 min, 215 nm; 16~22 min, 360 nm; 22~70 min, 250 nm。

④ 甘草药材中的主要化学成分包括黄酮类、三萜类、多糖类和生物碱类^[6-10],具有镇咳平喘、抗肿瘤、抗炎、抗病毒等作用^[11-15]。上述黄酮类和三萜类化学成分很可能是云南省药物研究所研制的“金品”痛舒胶囊、肿痛气雾剂等产品的活性成分,本研究所建立的甘草药材的 HPLC 指纹图谱方法,对上述黄酮类和三萜类化学成分进行了测定,可用于甘草药材的质量控制,为实现“金

品”痛舒胶囊、肿痛气雾剂等产品质量的均一、稳定奠定了方法基础。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2010 年版(一部) [M]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:80-81.
- [2] 张翠英, 常段玲, 周应群, 等. 乌拉尔甘草水溶性成分的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32 (12):842-845.
- [3] 云南省药物研究所. 云南省药物研究所制药厂金品系列药品临床推介[J]. 云南中医中药杂志, 2004, 25(5):50.
- [4] Kitagawa I, Chen WZ, Hori K, et al. Chemical studies of Chinese Licorice-Roots. Evaluation of five new flavonoid constituents from the roots of *Glycyrrhiza glabra* L. collected in Xinjiang [J]. Chem. Pharm. Bull, 1994, 42 (5):1056-1062.
- [5] 白虹, 窦德强, 裴玉萍, 等. 栽培甘草的化学成分研究[J]. 中草药, 2005, 36(5):652-654.
- [6] 张永, 严安定, 高建. 液质联用技术鉴定甘草提取物中的主要化学成分[J]. 中成药, 2012, 34(6):1111-1115.
- [7] 惠寿年, 董阿玲. 国内对甘草化学成分的研究进展[J]. 中草药, 1999, 30(4):313-315.
- [8] 梁冰, 杨爱馥, 黄凤兰, 等. 甘草属化学成分及药理作用研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2006, 37(1):115-119.
- [9] 彭励, 胡正海. 甘草生物学及化学成分的研究进展[J]. 中草药, 2005, 36(11):1744-1747.
- [10] 李薇, 宋新波, 张丽娟, 等. 甘草中化学成分研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(7):40-44.

- [11] 贾国惠,贾世山. 甘草中黄酮的药理作用研究进展[J]. 中国药学杂志,1998,33(9):513-516.
- [12] 王访,苏耀海. 甘草的药理作用及临床应用[J]. 时珍国医国药,2002,13(5):303-304.
- [13] 李德芳,王振华,罗锋,等. 异甘草素的药理作用研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(2):362-364.
- [14] 张玉龙,王梦月,杨静玉,等. 炙甘草化学成分及药理作用研究进展[J]. 上海中医药大学学报,2015,29(3):99-102.
- [15] 陈超,李宁,倪慧,等. 甘草化学成分分离、细胞培养和分析研究进展[J]. 现代药物与临床,2011,26(3):188-194.
- (编辑:杨阳)

Study on the HPLC Fingerprints of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.

XIE Jiaying, YANG Liguang, XIA Weijun, ZHANG Haiyuan, ZHANG Yingjie, MEI Shuangxi[△]

(Yunnan Institute of Materia Medica/Yunnan Bai Yao Group Innovation and R&D Center/Yunnan Province Company Key Laboratory for TCM and Ethnic Drug of New Drug Creation, Kunming 650111, China)

ABSTRACT: **Objective** To develop a HPLC fingerprints of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. **Methods** The HPLC method was adopted on ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) analytical column by gradient elution with acetonitrile and phosphoric acid water solution(0.05%) as mobile phase. The analysis time was 70 min and the detection wavelength was 215 nm(0-16 min), 360 nm (16-22 min) and 250 nm (22-70 min). **Results** The HPLC standard fingerprint chromatogram of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. which consists of 7 common characteristic peaks. The results of method validation accorded with the technical standard of fingerprints. **Conclusion** The method is stable, accurate, reliable, and can provide a scientific basis for the quality control of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.

KEY WORDS: *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.; HPLC; fingerprints

(上接第 31 页)

- [4] 李琼. 补肾通脉方改善 PCOS 大鼠胰岛素抵抗和排卵障碍的分子机制研究[D]. 武汉:华中科技大学,2009.
- [5] 张娟,朱桂金,王昕荣,等. 硫酸普拉睾酮钠诱导大鼠多囊卵巢综合征动物模型的实验研究 [J]. 中国优生与遗传杂志,2007,15(2):83-84,96.
- [6] 冯光荣,尤昭玲,贺冰. 多囊卵巢综合征动物模型建立的研究现状与展望 [J]. 湖南中医药导报,2004,10 (1):45-46.
- [7] Lee MT, Anderson E, Lee GY. Changes in ovarian morphology and serum hormones in the rat after treatment with dehydroepiandrosterone[J]. Anatomical Record, 1991, 231(2): 185-192.
- [8] 李光伟,潘孝仁, Lillioja S, 等. 检测人群胰岛素敏感性的—项新指数[J]. 中华内科杂志, 1993, 32(10): 656-659.
- [9] 高金玲. 多囊卵巢综合征研究进展 [J]. 中国中医药资讯, 2010, 2(16): 151-152.
- [10] 乐杰. 妇产科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2008:315-316.
- [11] 安丰艳,隋文美,于秀红,等. 多囊卵巢综合征的中医临床施治[J]. 按摩与康复医学(中旬刊),2012,3(12):379.
- [12] 史志刚,渠会莹. 从痰瘀脾虚论治胰岛素抵抗[J]. 疑难病杂志,2002,1(4):249-250.
- [13] 陈英群,董福轮,王宇锋,等. 从脾论治胰岛素抵抗糖脂代谢紊乱的思路[J]. 中医杂志,2008,49(3):273-275.
- [14] 熊曼琪,郑兆智. 内分泌科专病与风湿病中医临床诊治[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:35.
- [15] 贾伟平,项坤三,陈俊茜. 中国人糖耐量异常与胰岛素抵抗和胰岛素分泌 [J]. 中国糖尿病杂志,2000,8(2): 67-71.
- (编辑:杨阳)