

乌拉尔甘草高效液相指纹图谱的研究

金永新¹, 要林青¹, 封士兰², 李晓军³, 王莲萍³ (1. 兰州铁路局中心医院药剂科, 甘肃 兰州 730000; 2. 兰州医学院药理学系, 甘肃 兰州 730000; 3. 兰州医学院药本 98 级专题学生, 兰州 730000)

摘要:目的 对乌拉尔甘草进行高效液相指纹图谱的研究。方法 选择色谱柱: ODS-C₁₈, 流动相: 甲醇: 含 0.5% 冰醋酸的乙腈溶液 (20%) = 60: 40, 检测波长: 254nm, 分析时间: 60 min, 流速: 0.8 mL·min⁻¹ ~ 1.5 mL·min⁻¹。结果 确定具有代表性的 28 个峰作为共有峰, 建立指纹图谱。结论 该方法重现性、稳定性、精密性均较好, 可作为乌拉尔甘草的鉴别依据。

关键词: 乌拉尔甘草; 指纹图谱; 高效液相色谱

中图分类号: R282.5; R917.1

文献标识码: A

文章编号: 1007-7693(2004)02-0093-06

Study on HPLC fingerprint of Radix Glycyrrhizae

JIN Yong-xin¹, YAO Lin-qing¹, FENG Shi-lan², LI Xiao-jun³, WANG Lian-ping³ (1. Lanzhou Railway Central Hospital, Lanzhou 730000, China; 2. Pharmaceutical Department of Lanzhou medical college, Lanzhou 730000, Gansu, China; 3. Practising Students of Pharmaceutical Department of Lanzhou medical college, Lanzhou 730000, China)

作者简介: 金永新, 40 岁, 1982 年毕业于兰州医学院药理学系, 学士学位, 副主任药师

ABSTRACT:OBJECTIVE To study HPLC-fingerprint of Radix Glycyrrhizae . **METHOD** HPLC with C₁₈[4.6(μm) × 250mm]column was used ,the methanol-20 % acetonitrile with 0.5 % glacial acetic acid was used as mobile phase and the detection wavelength was 254nm . **RESULTS** Indicating 28 peaks in common ,and the HPLC fingerprint of Radix Glycyrrhizae was established . **CONCLUSION** This method is steady and accurate with a good repeatability and can be used as a quality control for Radix Glycyrrhizae .

KEY WORDS :Radix Glycyrrhizae ;fingerprint ;HPLC

甘草是重要的常用中药,来源于豆科(Leguminosae),蝶形花亚科(Papilionoideae)。甘草(Glycyrrhiza)属多种植物的根和根茎。据《中国药典》2000 版一部记载其原植物有 3 种,即乌拉尔甘草(Glycyrrhizae Fisch)、胀果甘草(Glycyrrhizae Bat)和光果甘草(G. glabral)。我国以乌拉尔甘草分布最广、产量最大^[1]。本实验以不同产地的乌拉尔甘草作为研究对象,采用高效液相色谱的检测方法,以梯度洗脱技术,对五个产地不同等级的样品进行分析,从中归纳出相对保留时间稳定的 28 个共有峰作为指纹峰,得到其指纹图谱,为鉴别提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

岛津高效液相色谱仪(SPD- MI10 AVP 二级阵列检测器, 二元泵 LG-10 AT); 超声仪 BI 21 OE MT。

1.2 试剂

乙腈、甲醇均为色谱纯,实验用水为二次重蒸馏水,其余试剂均为分析纯。

1.3 供试品

1.3.1 标准药材供试品

对照品甘草酸单铵盐,标准药材均由中国生物制品检定所提供(样品编号 1)。

1.3.2 原药材供试品 根据原药材供试品的不同来源,将其依次编为 2~11 号,其中,2 号、6 号是由甘肃省药材公司提供的等级药材,其余收集于兰州市药材市场,均由兰州医学院马志刚副教授鉴定为药典产品——乌拉尔甘草。以上供试品经低温干燥后,粉碎成粗粉备用。

供试品来源详见表 1。

2 实验方法

2.1 色谱条件

色谱柱 PenomenexC₁₈(4.6mm × 200mm,5μm) ODS 柱,检测波长 254nm,柱温室温,分析时间 60min,进样量 20μL。

表 1 供试品编号及来源

Tab 1 Number and source of samples

编号	来源	编号	来源
1	中国药品生物制品检定所	7	甘肃(产地不详)
2	甘肃酒泉	8	甘肃(产地不详)
3	内蒙古	9	甘肃靖远
4	宁夏	10	甘肃(产地不详)
5	甘肃会宁	11	新疆库尔勒
6	内蒙古杭锦旗		

2.2 供试品溶液的制备

精密称取甘草粗粉 1g,置于 5mL 量瓶中,加入 80 % 甲醇定容,密塞经超声振荡提取 40min,过滤,取续滤液 1mL,再经 0.45μm 滤膜过滤滤液为供试品溶液。

2.3 流动相及检测波长的选择

取标准药材供试液 20μL 进样,分别以甲醇-水、甲醇-冰醋酸(0.3 %~3 %)、乙腈-水、乙腈-冰醋酸(0.3 %~3 %)、甲醇-乙腈-冰醋酸(0.3 %~3 %) 不同比例的等度及梯度试验,记录 210,248,254,260,280nm5 个波长处的色谱图,结果表明以甲醇:含 0.5 % 冰醋酸的乙腈溶液(20 %) = 60: 40 为流动相,流速:0.8~1.5mL·min⁻¹,梯度洗脱,检测波长 254nm 为佳,见图 1。

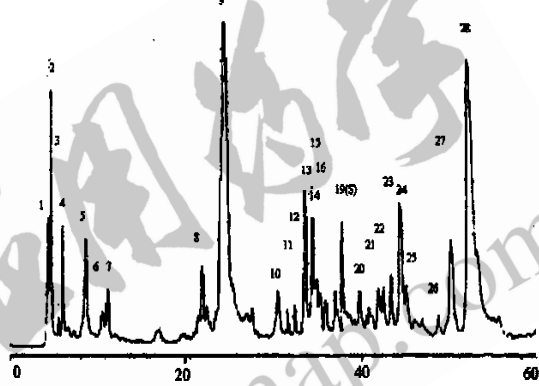


图 1 标准甘草药材的 HPLC 图谱(检测波长 254nm;甲醇:含 0.5 % 冰醋酸的乙腈溶液(20 %) = 60: 40;流速:0.8~1.5mL·min⁻¹) (28 号峰为甘草酸单铵盐峰)

Fig 1 HPLC chromatogram of Radix Glycyrrhizae (The detection wavelength :254nm ; with 0.5 % glacial acetic acid methanol : 20 % acetonitrile = 60: 40 ;flow rate : 0.8 ~ 1.5mL·min⁻¹)

2.4 精密度试验

取标准药材供试液,连续进样 5 次,检测色谱图,以 19 号峰作参照,计算各峰的相对保留时间和峰面积比值,1~28 号峰的相对保留时间 RSD<3 %,见表 2。

2.5 稳定性试验

取标准药材供试液,分别于 0,2,4,24,48h 检测色谱图,以 19 号峰(S 峰)作参照,计算各峰的相对保留时间,1~28 号峰的相对保留时间 RSD<3 %,见表 3。

表 2 精密度试验(相对保留时间)

Tab 2 Results of precision test(relative retention times)

峰号	NO1	NO2	NO3	NO4	NO5	RSD %
1	0.111	0.110	0.110	0.110	0.109	1.02
2	0.119	0.118	0.117	0.118	0.117	0.73
3	0.141	0.139	0.139	0.140	0.139	0.71
4	0.154	0.153	0.153	0.153	0.152	0.46
5	0.223	0.221	0.220	0.220	0.220	0.60
6	0.267	0.264	0.263	0.262	0.262	0.80
7	0.284	0.281	0.280	0.278	0.279	0.82
8	0.493	0.487	0.496	0.494	0.494	0.69
9	0.622	0.613	0.624	0.621	0.622	0.69
10	0.775	0.767	0.780	0.778	0.778	0.66

峰号	NO1	NO2	NO3	NO4	NO5	RSD%
11	0.816	0.805	0.820	0.818	0.818	0.74
12	0.820	0.809	0.832	0.830	0.829	1.16
13	0.847	0.839	0.851	0.850	0.849	0.57
14	0.863	0.856	0.867	0.866	0.866	0.52
15	0.872	0.865	0.875	0.875	0.874	0.48
16	0.888	0.882	0.882	0.890	0.891	0.45
17	0.903	0.894	0.907	0.906	0.903	0.55
18	0.971	0.982	0.984	0.984	0.984	0.58
19(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0
20	1.023	1.026	1.020	1.020	1.021	0.25
21	1.135	1.148	1.126	1.128	1.128	0.80
22	1.15	1.164	1.141	1.143	1.143	0.83
23	1.17	1.185	1.161	1.163	1.163	0.85
24	1.191	1.208	1.183	1.185	1.185	0.85
25	1.209	1.208	1.183	1.185	1.185	0.85
26	1.318	1.343	1.315	1.317	1.314	0.92
27	1.337	1.363	1.335	1.337	1.337	0.91
28	1.384	1.414	1.383	1.386	1.382	0.98

表 3 稳定性试验(相对保留时间)

Tab 3 Reasults of stability test(relative retention times)

峰号	0	2h	4h	24h	48h	RSD%
1	0.110	0.109	0.110	0.113	0.112	1.34
2	0.118	0.117	0.117	0.121	0.119	1.47
3	0.140	0.139	0.139	0.144	0.140	1.47
4	0.153	0.152	0.153	0.158	0.154	1.52
5	0.220	0.220	0.220	0.221	0.222	1.90
6	0.262	0.262	0.263	0.265	0.264	0.50
7	0.278	0.279	0.280	0.281	0.281	0.47
8	0.494	0.494	0.496	0.494	0.495	0.20
9	0.621	0.622	0.624	0.617	0.620	0.42
10	0.778	0.778	0.780	0.769	0.780	0.57
11	0.818	0.818	0.820	0.815	0.817	0.23
12	0.830	0.829	0.832	0.830	0.831	0.15
13	0.850	0.849	0.851	0.847	0.848	0.250
14	0.866	0.866	0.867	0.867	0.867	0.08
15	0.875	0.874	0.875	0.874	0.873	0.08
16	0.890	0.891	0.892	0.893	0.891	0.14
17	0.906	0.903	0.907	0.905	0.904	1.747
18	0.984	0.984	0.984	0.984	0.984	0
19(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0
20	1.020	1.021	1.020	1.022	1.021	0.08
21	1.128	1.128	1.126	1.130	1.127	0.13
22	1.143	1.143	1.141	1.144	1.142	0.11
23	1.128	1.128	1.126	1.130	1.127	0.13
24	1.185	1.185	1.183	1.181	1.182	0.15
25	1.026	1.026	1.023	1.025	1.024	0.11
26	1.314	1.314	1.315	1.316	1.315	0.4
27	1.337	1.334	1.335	1.336	1.336	0.01
28	1.386	1.382	1.383	1.380	1.381	0.17

2.6 重复性试验

取 6 号供试品 5 份,分别按照供试液的制备方法制备供试液,并分别进行检测,以 19 号峰(S 峰)作参照,计算各峰的相对保留时间,1~28 号峰的相对保留时间 RSD<3%(表 4)。

表 4 重复性试验(相对保留时间)

Tab 4 Reasults of repeatability test (relative retention times)

峰号	NO1	NO2	NO3	NO4	NO5	RSD%
1	0.110	0.107	0.108	0.108	0.108	0.46
2	0.118	0.115	0.117	0.117	0.117	1.96
3	0.144	0.140	0.141	0.142	0.140	1.55
4	0.155	0.152	0.153	0.153	0.152	0.80
5	0.224	0.220	0.221	0.220	0.219	0.88
6	0.269	0.266	0.267	0.266	0.265	0.59
7	0.288	0.283	0.282	0.281	0.280	1.10

峰号	NO1	NO2	NO3	NO4	NO5	RSD%
8	0.507	0.504	0.503	0.503	0.501	0.44
9	0.630	0.633	0.633	0.636	0.633	0.34
10	0.780	0.788	0.791	0.796	0.793	0.78
11	0.831	0.827	0.828	0.833	0.833	0.34
12	0.836	0.832	0.832	0.838	0.846	0.69
13	0.850	0.856	0.858	0.863	0.860	0.57
14	0.869	0.877	0.877	0.882	0.879	0.55
15	0.894	0.901	0.901	0.904	0.902	0.42
16	0.906	0.912	0.913	0.917	0.915	0.46
17	0.912	0.918	0.927	0.922	0.920	0.60
18	0.986	0.987	0.987	0.987	0.987	0.05
19(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0
20	1.028	1.026	1.016	1.021	1.027	0.49
21	1.122	1.114	1.115	1.112	1.114	0.35
22	1.136	1.128	1.129	1.127	1.128	0.33
23	1.160	1.151	1.151	1.148	1.150	0.40
24	1.188	1.179	1.179	1.175	1.176	0.44
25	1.205	1.195	1.194	1.191	1.192	0.47
26	1.302	1.314	1.312	1.307	1.308	0.38
27	1.338	1.328	1.330	1.325	1.327	0.38
28	1.394	1.382	1.382	1.377	1.378	0.49

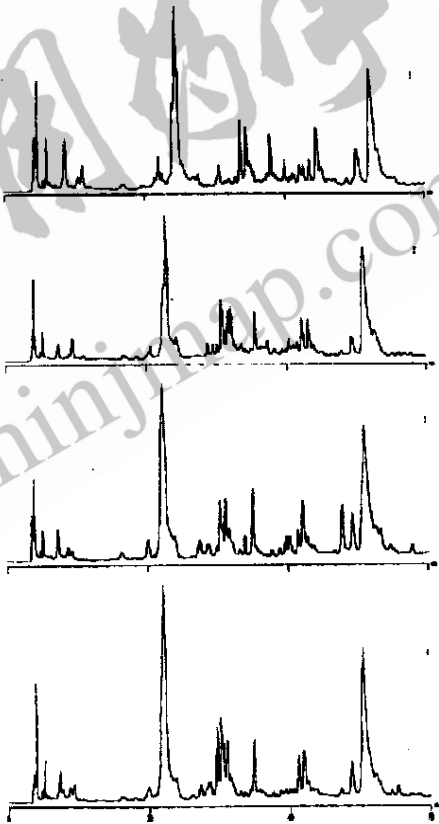


图 2 不同产地样品的 HPLC 图谱

Fig 2 HPLC chromatograms of different source samples

1.内蒙古;2.宁夏;3.甘肃会宁;4.内蒙古杭锦旗
1. Neimenggu;2. Ningxia;3. Gansuhuining;4. Neimengguhangjinqi

3 HPLC 指纹图谱及技术参数的确定

3.1 指纹图谱的确定

按供试品的制备和检测方法,对 1~11 号样品分别检测其色谱图,其所有成分的色谱峰在 60min 之内出完。用标准药材对照品色谱图,与其他样品的色谱图比较,结果整体峰貌一致,其中 28 个峰是共有的,确定为共有指纹峰。见图 1。

3.2 共有指纹峰保留时间的比值确定

以 1~11 号样品均有的峰面积较大,时间较居中,较稳定的 19 号峰为内参照峰(S),其相对保留时间为 1,计算各峰的相对保留时间,将各组数值列表,就组成了乌拉而甘草的 HPLC 指纹谱,见表 5。

3.3 八强峰的确定

八强峰系指某样品色谱峰中相对面积值较高的前 8 个色谱峰,可以从量的角度比较 11 个样品组分差异性^[2],见表 6。

表 5 乌拉尔甘草的 HPLC 指纹谱

Tab 5 HPLC fingerprint of Radix Glycyrrhizae

峰号	样品(α /相对峰面积)											α 均值
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
1	0.110/ 1.130	0.112/ 3.381	0.110/ 6.570	0.109/ 0.720	0.109/ 0.365	0.113/ 0.737	0.109/ 0.477	0.110/ 0.347	0.111/ 0.868	0.112/ 0.480	0.114/ 0.622	0.111
2	0.118/ 0.810	0.121/ 0.359	0.118/ 0.079	0.118/ 0.958	0.118/ 0.848	0.118/ 0.334	0.119/ 0.616	0.119/ 0.741	0.120/ 1.297	0.122/ 0.824	0.123/ 0.802	0.119
3	0.139/ 0.595	0.146/ 0.468	0.143/ 1.073	0.142/ 0.128	0.142/ 0.093	0.145/ 0.265	0.143/ 0.095	0.143/ 0.113	0.145/ 0.155	0.146/ 0.123	0.145/ 0.268	0.144
4	0.153/ 0.674	0.158/ 1.524	0.156/ 1.922	0.154/ 0.401	0.154/ 0.406	0.158/ 0.503	0.155/ 0.241	0.156/ 0.327	0.157/ 0.695	0.159/ 0.454	0.157/ 0.339	0.156
5	0.221/ 2.338	0.224/ 3.920	0.225/ 1.091	0.221/ 0.522	0.221/ 0.679	0.224/ 1.593	0.222/ 0.533	0.224/ 0.353	0.223/ 0.593	0.225/ 0.502	0.222/ 0.516	0.223
6	0.233/ 0.455	0.236/ 0.840	0.236/ 0.512	0.233/ 0.298	0.233/ 0.266	0.237/ 0.231	0.234/ 0.133			0.237/ 0.123	0.238/ 0.149	0.235
7	0.264/ 0.637	0.269/ 1.177	0.271/ 0.802	0.263/ 0.467	0.265/ 0.317	0.266/ 0.645	0.265/ 0.300	0.271/ 0.071	0.267/ 0.145	0.269/ 0.146	0.264/ 0.784	0.267
8	0.281/ 0.761	0.282/ 0.592	0.288/ 0.465	0.280/ 0.883	0.282/ 0.314	0.281/ 0.908	0.283/ 0.208	0.286/ 0.415	0.281/ 0.541	0.284/ 0.203	0.282/ 0.110	0.283
9	0.487/ 0.148	0.483/ 0.150	0.478/ 0.068	0.471/ 0.283	0.479/ 0.069	0.479/ 0.277	0.481/ 0.062	0.478/ 0.099	0.476/ 0.112	0.476/ 0.060	0.479/ 0.308	0.479
10	0.535/ 0.456	0.532/ 0.570		0.539/ 0.659	0.535/ 0.252	0.537/ 1.225	0.531/ 0.124	0.532/ 0.233	0.533/ 0.088			
11	0.595/ 0.544				0.546/ 0.141	0.551/ 0.499	0.545/ 0.110	0.550/ 0.330		0.546/ 0.104		
12	0.599/ 1.716	0.599/ 0.811			0.602/ 3.454	0.598/ 2.497	0.598/ 1.757	0.571/ 2.182	0.601/ 3.269		0.593/ 4.224	
13	0.613/ 9.658	0.614/ 17.765	0.615/ 25.728	0.607/ 20.03	0.612/ 7.395	0.612/ 12.465	0.611/ 7.377	0.608/ 5.433	0.612/ 9.447	0.614/ 6.499	0.610/ 2.583	0.612
14	0.767/ 0.409	0.768/ 0.944	0.767/ 1.220	0.766/ 1.101	0.768/ 0.292	0.766/ 0.666	0.766/ 0.415	0.763/ 0.757	0.775/ 0.319	0.769/ 0.254	0.747/ 0.570	0.765
15	0.805/ 0.093	0.806/ 0.469	0.803/ 0.638	0.801/ 0.341	0.800/ 0.125	0.806/ 0.136	0.803/ 0.278	0.804/ 0.214	0.803/ 0.034	0.803/ 0.497	0.804/ 0.196	0.803
16	0.809/ 0.110	0.810/ 0.688	0.806/ 0.714	0.804/ 0.539	0.805/ 0.265	0.811/ 0.172	0.805/ 0.333	0.807/ 0.313	0.808/ 0.591	0.805/ 0.671	0.807/ 0.283	0.807
17	0.839/ 5.545	0.842/ 15.164	0.833/ 6.494	0.838/ 6.543	0.840/ 5.456	0.841/ 4.876	0.839/ 2.804	0.837/ 5.866	0.840/ 8.086	0.840/ 3.222	0.839/ 6.066	0.839
18	0.856/ 5.545	0.857/ 15.164	0.851/ 6.494	0.858/ 6.543	0.856/ 5.456	0.855/ 4.876	0.855/ 2.804	0.855/ 5.866	0.855/ 8.086	0.855/ 3.222	0.851/ 6.066	0.855
19	0.865/ 5.545	0.867/ 15.164	0.863/ 6.494	0.864/ 6.543	0.864/ 5.456	0.867/ 4.876	0.864/ 2.804	0.882/ 5.866	0.865/ 8.086	0.866/ 3.222	0.865/ 6.066	0.865
20	0.882/ 5.545	0.883/ 15.164	0.883/ 6.494	0.880/ 6.543	0.882/ 5.456	0.882/ 4.876	0.881/ 2.804	0.882/ 5.866	0.882/ 8.086	0.881/ 3.222	0.881/ 6.066	0.882
21	0.894/ 5.545	0.898/ 15.164	0.897/ 6.494	0.896/ 6.543	0.897/ 5.456	0.899/ 4.876	0.896/ 2.804	0.896/ 5.866	0.897/ 8.086	0.897/ 3.222	0.894/ 6.066	0.896

4 讨论

4.1 乌拉尔甘草 HPLC 指纹图谱的分析

乌拉尔甘草 HPLC 指纹图谱中有 28 个峰是被测定的 11 个样品所共有的,可作为鉴别乌拉尔甘草的必备条件。未列入共有峰的,其中有 3 个峰为 8 个样品所共有,另外各 1 个峰分别为 9 个样品、7 个样品和 6 个样品所共有,这些差别可能与中药材的生物多样性有关,是否可利用这一点来区别不同产地、不同采收期的药材,将是我们今后的研究方向。

峰号	样品(α /相对峰面积)											α 均值
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
18	0.982/ 0.355	0.978/ 0.300	0.979/ 0.177	0.985/ 0.208	0.984/ 0.180	0.983/ 0.221	0.978/ 0.081	0.983/ 0.239	0.984/ 0.421	0.982/ 0.169	0.979/ 0.318	0.982
19(S)	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1
20	1.026/ 0.249	1.024/ 0.438	1.024/ 0.121	1.025/ 0.114	1.024/ 0.160	1.024/ 0.232	1.025/ 0.074	1.025/ 0.276	1.024/ 0.464	1.024/ 0.201	1.025/ 0.334	1.025
	1.014/ 0.213	1.013/ 0.129	1.013/ 0.201	1.014/ 0.262	1.013/ 1.071	1.013/ 0.245	1.013/ 0.139	1.011/ 0.149				
	1.087/ 0.232					1.081/ 0.171	1.083/ 0.103	1.083/ 0.345	1.078/ 0.403	1.085/ 0.226	1.086/ 0.321	
21	1.148/ 0.812	1.156/ 1.454	1.144/ 0.444	1.156/ 0.443	1.155/ 0.240	1.158/ 0.694	1.140/ 0.183	1.146/ 0.571	1.137/ 0.831	1.142/ 0.282	1.144/ 0.106	1.148
22	1.164/ 0.544	1.178/ 1.175	1.160/ 1.998	1.173/ 0.334	1.171/ 0.151	1.175/ 0.626	1.159/ 0.222	1.162/ 0.185	1.161/ 0.839	1.169/ 0.421	1.164/ 0.349	1.167
23	1.185/ 0.756	1.186/ 0.106	1.178/ 3.921	1.195/ 0.872	1.190/ 0.875	1.198/ 0.737	1.197/ 0.472	1.182/ 0.366	1.172/ 0.297	1.179/ 0.204	1.182/ 0.299	1.186
24	1.208/ 2.113	1.195/ 1.298	1.201/ 1.345	1.216/ 3.869	1.214/ 1.142	1.222/ 2.163	1.218/ 1.104	1.203/ 1.074	1.192/ 2.311	1.202/ 1.414	1.207/ 0.177	1.207
25	1.229/ 0.704	1.216/ 5.564	1.224/ 4.445	1.235/ 1.245	1.233/ 0.313	1.237/ 0.744	1.240/ 0.327	1.230/ 0.136	1.217/ 1.354	1.229/ 0.698	1.226/ 1.203	1.229
26	1.343/ 0.206	1.344/ 0.645	1.331/ 4.226	1.348/ 0.309	1.341/ 0.082	1.330/ 0.136	1.325/ 1.126	1.348/ 0.269	1.356/ 0.359	1.355/ 0.226	1.336/ 0.168	1.342
27	1.363/ 1.510	1.365/ 4.399	1.379/ 4.521	1.368/ 2.229	1.366/ 0.994	1.362/ 1.988	1.370/ 1.013	1.371/ 0.050	1.368/ 1.235	1.379/ 1.847	1.376/ 0.913	1.370
28	1.414/ 8.703	1.421/ 20.211	1.439/ 16.985	1.417/ 15.289	1.415/ 6.813	1.415/ 8.953	1.419/ 6.916	1.445/ 6.765	1.415/ 13.271	1.423/ 9.387	1.425/ 6.008	1.423

表 6 样品的八强峰

Tab 6 Comparison of eight stronger peaks between samples

样品	八强峰(α /相对面积)								相对总面积
	1	2	3	4	5	6	7	8	
1	0.613/9.658	1.414/8.703	0.221/2.338	1.208/2.113	1.363/1.510	0.110/1.130	0.118/0.816	1.148/0.812	26.290
2	1.421/20.211	0.614/17.765	1.216/5.564	1.365/4.399	0.224/3.920	0.112/3.381	0.121/3.359	0.158/1.524	60.123
3	0.615/25.728	1.439/16.985	0.110/6.570	0.118/6.079	1.379/4.521	1.224/4.445	1.331/4.226	1.178/3.921	72.475
4	0.607/20.030	1.417/15.289	1.216/3.869	1.368/2.229	1.235/1.245	0.766/1.101	0.118/0.958	0.280/0.883	48.309
5	0.612/7.395	1.415/6.813	1.214/1.142	1.366/0.994	1.190/0.875	0.118/0.845	0.221/0.679	0.154/0.406	21.146
6	0.612/12.465	1.415/8.953	1.222/2.163	1.362/1.988	0.224/1.593	0.281/0.908	1.237/0.744	0.113/0.737	30.960
7	0.611/7.377	1.419/6.916	1.325/1.126	1.218/1.104	1.370/1.013	0.119/0.616	0.222/0.533	0.109/0.477	19.162
8	1.445/6.765	0.608/5.433	1.203/1.074	0.763/0.757	0.119/0.741	1.146/0.571	0.286/0.415	1.182/0.366	16.122
9	1.415/13.271	0.612/9.447	1.192/2.311	1.217/1.354	0.120/1.297	1.368/1.235	0.111/0.868	1.161/0.839	30.156
10	1.423/9.387	0.614/6.499	1.379/1.847	1.202/1.414	0.122/0.824	1.229/0.698	0.805/0.671	0.225/0.502	21.842
11	1.425/6.008	0.610/2.583	1.226/1.203	1.376/0.913	0.123/0.802	0.264/0.784	0.114/0.622	0.747/0.570	13.405

4.2 不同产地 来源的乌拉尔甘草,其 HPLC 指纹图谱的整体峰貌一致,说明其主要成分是相同的,但主要峰群的相对峰面积差异较大,表现为在八强峰中排序的不同和相对总面积的差异。从八强峰的统计结果看, α 值为 0.807,0.111,0.119,0.156,0.223,0.283,0.612,0.765,1.148,1.167,1.186,1.207,1.229,1.342,1.423,1.370 的 16 个峰在 11 个样品的八强峰中出现,其中 α 值 0.612 和 1.423(甘草酸单铵盐峰)二峰均以较高的峰面积而位于第一、二位,而 α 值为 0.119,1.370 的峰在八强峰中出现频率也较高,8 个样品进入。相对总面

积最高的达 72.475,最低的只有 13.405,说明不同产地 来源的乌拉尔甘草化学成分的含量差异较大,质量参差不齐,据文献记载甘草中以乌拉尔甘草分布最广、产量最大,总黄酮、总皂苷、香豆素的含量也最高,但不同产地,含量不同^[2,3],这与本次试验的结果相一致。

4.3 色谱条件的筛选

关于甘草成分的高效液相研究的文献较多^[4-5],但我们试验均不适于甘草的高效液相指纹图谱分析,本实验通过反复的比较,最后筛选出液相色谱方法,并规范了具体的实

验条件,使获得色谱图出峰多、分离度、分辨率均较为理想,并按照国家药品监督管理局颁发的“中药注射剂指纹图谱研究的技术要求”中原药材部分的有关规定,对其稳定性、仪器精密度、试验方法重现性作了考察,结果均符合规定,可将其作为甘草的高效液相指纹图谱分析的测定方法。

4.4 提取溶剂与方法的选择

根据甘草中主要化学成分皂苷、黄酮等的性质,先后比较试验了不同浓度的甲醇、乙醇的水溶液,分别用索氏、冷浸、超声三种提取方法提取标准药材,经对色谱图的比较,以80%甲醇作提取溶剂,超声45 min提取获得色谱图出峰多、分离度、分辨率较为理想。

4.5 关于 α 窗口的设定

由于保留时间受各种试验因素影响,每次实验数据不可能完全一致,通过对试验中的 α 值及指纹峰位置的比较,本次实验的 α 值窗口(相对误差)为2%,即可信限 $\pm 2\%$ 。 α 值在指纹谱研究中是一个重要的定性参数,因此建议有关指纹图谱的研究文章应说明 α 值的相对误差,有关指纹图谱的法规应对此有明确规定,这在特征峰多而密集的难辨认指纹谱中尤其重要。

4.6 有关色谱柱的试验情况

本次试验中,柱温在室温17~19℃条件下,获得的色谱图无明显差异。曾选择Kromasal C₁₈柱与Penomenex C₁₈柱获得的色谱图比较,主要峰群的整体图貌基本一致,但一些小的特征峰不完全一致(主要表现在相对保留时间和分辨率上的差异),而且重现性差。

本实验通过反复摸索,建立了乌拉尔甘草的高效液相指纹图谱的分析方法,对于其鉴别及相应制剂质量控制一定会起到积极的作用。

参考文献

- [1] 曾路,楼之岑,张如意.国产甘草的质量评价[J].药学学报,1991,26(10):788.
- [2] 洪苡坤,王智华,李旭.HPLC相对保留值指纹谱法鉴别大黄[J].中国中药杂志,1993,18(11):650.
- [3] 杨岚,刘永隆,林寿金.六种甘草属植物根中黄酮成分的高效液相色谱分析[J].药学学报,1990,25(11):840.
- [4] 傅密宁,戴富宝,郑汉臣,傅克治.高效液相法测定甘草中甘草酸的含量[J].第二医科大学学报,1989,10(3):257.
- [5] 惠寿年,董阿珍.国内对甘草化学成分的研究进展[J].中成药,1999,30(4):313.

收稿日期:2003-03-30