

文章编号: 1006 - 2858(2004)05 - 0367 - 04

甘草药材薄层扫描指纹图谱研究

崔淑芬, 蒋轶伦, 王小如

(厦门大学 化学化工学院现代分析科学教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 目的 研究甘草药材的薄层扫描指纹图谱(TLCS-FP), 为科学评价及有效控制其质量提供可靠方法。方法 采用 1% (w) 氢氧化钠浸渍硅胶 GF254 预制板(Merck), 醋酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水(V V V V = 15 1 1 2) 为展开剂, 254 nm 紫外吸收扫描。结果 14 批甘草药材样品得到的 TLCS 指纹图谱有 6 个共有峰, 聚类分析结果正品甘草药材有较好的相似性; 三维图谱可对不同产地的甘草药材质量进行直观比较。结论 该 TLCS-FP 可用于甘草的真伪鉴别和质量评价。

关键词: 甘草; 薄层扫描法; 指纹图谱

中图分类号: R 944 文献标识码: A

中药甘草为豆科植物甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)、胀果甘草 (*Glycyrrhiza inflata* Bat.) 或光果甘草 (*Glycyrrhiza glabra* L.) 的干燥根及根茎。其中甘草是中药甘草的主要品种。甘草为重要的常用中药, 素有“国老”之称, 具止咳化痰、解毒清热、缓急止痛及调和诸药等作用, 俗称“十方九草”, 在临床上有大量的应用。甘草主要含三萜类和黄酮类成分^[1~3]。目前, 多用三萜类化合物甘草酸的含量测定(HPLC 法) 作为质量控制指标, 大量的质量控制研究也都是围绕甘草酸的含量测定方法而进行^[4,5]。国内外认同的可以全面反映中药内在质量的指纹图谱质控技术在甘草的应用则未见报道。作者对薄层扫描法(thin layer chromatography scanning method, 缩写 TLCS) 在甘草药材指纹图谱中的应用进行了初步研究。结合化学计量学中的聚类分析和相似度判断等方法, 对甘草药材进行真伪鉴别和质量控制。

1 仪器与试剂

CAMAG Linomat 5 半自动点样仪; CAMAG Scanner 3 薄层色谱扫描仪; 硅胶 GF 254 预制板 10 cm × 20 cm (Merck, 德国); 双槽展开缸; Grant XB14 超声波清洗机。

对照品: 甘草酸单铵盐(中国亿利资源集团公司李秉经理提供, 纯度 75% (w)); 甘草苷(由厦门大学傅博强博士制备, 纯度 96.4% (w))。

甘草样品来源见表 1, 全部样品由中国医学科学院药用植物研究所林寿全教授鉴定为甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) 的干燥根; 实验所用溶剂均为分析纯, 水为超纯水。

Table 1 Source of *G. uralensis*

Sample number	Cultivation	Collecting time	Region
1	Domestic	2001. 8	Xinjiang huami
2	Domestic	2001. 8	Xinjiang xinyuan
3	Domestic	2001. 8	Xinjiang buerjin
4	Wild	2001. 8	Xinjiang bu erjin
5	Domestic	2001. 8	Xinjiang hejing
6	Wild	2001. 8	Xinjiang hejing
7	Domestic	2000. 9	Hebei chengde
8	Domestic	2000. 9	Hebeishi jiazhuang
9	Wild	2002. 8	Heilongjiang anda
10	Domestic	2000. 8	Jilin baicheng
11	Wild	2000. 8	Jilin daan
12	Domestic	1998. 8	Neimeng aoshan
13	Domestic	1998. 8	Neimeng aohanqi
14	Wild	2002. 9	Neimenge jinaqi

2 方法

2.1 溶液制备

2.1.1 供试品溶液的制备

收稿日期: 2004 - 04 - 23

基金项目: 国家自然科学基金 2003 重点项目(20235020)

作者简介: 崔淑芬(1969 -), 女(汉族), 辽宁抚顺人, 在职博士, 主要从事中草药及海洋药物研究。Tel: (0755) 26731146, 13692201107, E-mail: shufencui @163.com。

精密称取甘草药材粉末(过60目筛)1.00 g,加无水乙醚60 mL,置具塞三角瓶中,超声处理30 min,滤过。药渣加甲醇60 mL,超声提取60 min,滤过,滤液蒸干。残渣加水40 mL溶解,用水饱和正丁醇提取3次,每次20 mL。合并正丁醇提取液,用水洗涤2次,置水浴上蒸干。残渣精密加入甲醇2.0 mL使溶解,定容。0.45 μm滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液。

2.1.2 对照品溶液的制备

精密称取对照品甘草酸单铵盐4.10 mg、甘草苷7.70 mg,精密加入甲醇2.0 mL,超声处理10 min,作为对照品溶液。

2.2 薄层色谱实验条件

2.2.1 层析条件

每个样品用CAMAG Linomat 5半自动点样仪带状点样3 μL于硅胶GF254预制板(质量分数为1%氢氧化钠预处理)上,对照品分别点1、2、3 μL。点样后的薄层板于P₂O₅干燥器内抽真空后放置30 min,即可取出薄层板放入一个槽中已有展开剂的双槽展开缸中。展开剂组成:醋酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水(V/V/V/V=15/1/1/2),上行展开9 cm。取出薄层板,晾干。

2.2.2 扫描条件

D2 & W灯,254 nm单波长吸收扫描,Wincats软件自动进行数据处理。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度与重现性

取3号样品,按供试品溶液制备方法制备供试品,同板相同点样6次,检测指纹图谱。结果表明,各色谱峰的相对比移值的RSD均低于1.0%,单峰高大于5%总峰高的色谱峰的相对峰高的RSD为0.6%~1.4%。

取4号样品5份,按“2.1.1”条制备供试品,检测指纹图谱。结果表明,各色谱峰的相对比移值的RSD均低于1.0%,单峰高大于5%总峰高的色谱峰的相对峰高的RSD为3.8%~5.1%。

2.3.2 稳定性

取3号供试品溶液,分别在0、6、24和48 h点样检测指纹图谱。结果表明,各色谱峰的相对保留时间和主要峰的峰高比值基本没有明显变化。另外,展开后结果48 h内扫描,主要峰的峰高RSD在4.6%以内。

3 结果与分析

3.1 甘草药材 TLCS-FP 的建立

甘草药材的薄层扫描图谱见图1。

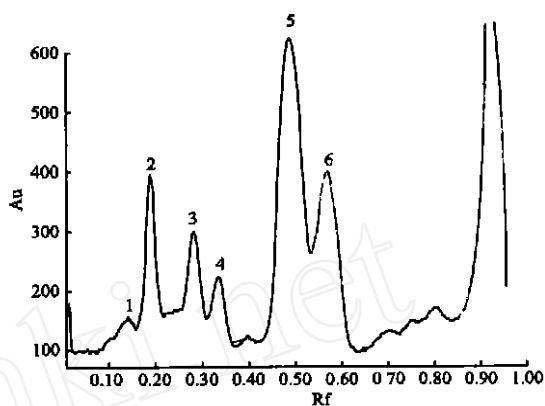


Fig. 1 The TLCS-FP of *G. uralensis*

由于多数峰没有达到基线分离,而且峰形宽窄不一,用峰面积表达各峰之间的比例关系并不确切,故以峰高值表达。取Rf在0.15~0.85的色谱峰进行分析,有6个共有峰,其中2号峰为甘草酸,5号峰为甘草苷。1~6号指纹峰的分度度分别为:0.9、1.2、0.8、0.7、0.5和0.5。指纹峰中甘草酸的分离度较好,所以取甘草酸作为参照物,以其比移值和峰高为1,计算各峰的相对比移值和相对峰高。

3.2 聚类分析

利用Excell软件对14批甘草药材的TLCS-FP中各特征峰的相对峰高进行聚类分析,以相关系数为测度的聚类图结果见图2。

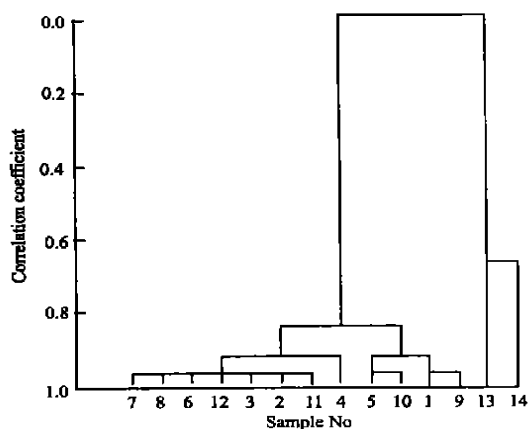


Fig. 2 The plot of cluster analysis of samples

从聚类分析结果可以看出,正品甘草(无论是野生还是人工种植)相似度较大,相关系数大都在0.90以上,只有13号人工种植样品和其他样品相差较大,可能和种植方式有关。

3.3 薄层扫描三维指纹图谱

同板测定了 14 批甘草样品,WINCAT 软件自动生成原点 to 溶剂前沿的 TLCS-3D 指纹图谱,结果见图 3。根据各样品共有峰峰高的直观比

较,可以方便的进行质量评价及控制。14 批样品的测定结果看,甘草药材道地产区内蒙额济纳旗野生甘草、内蒙宝山人工甘草的主要特征峰峰高明显高于其他样品。

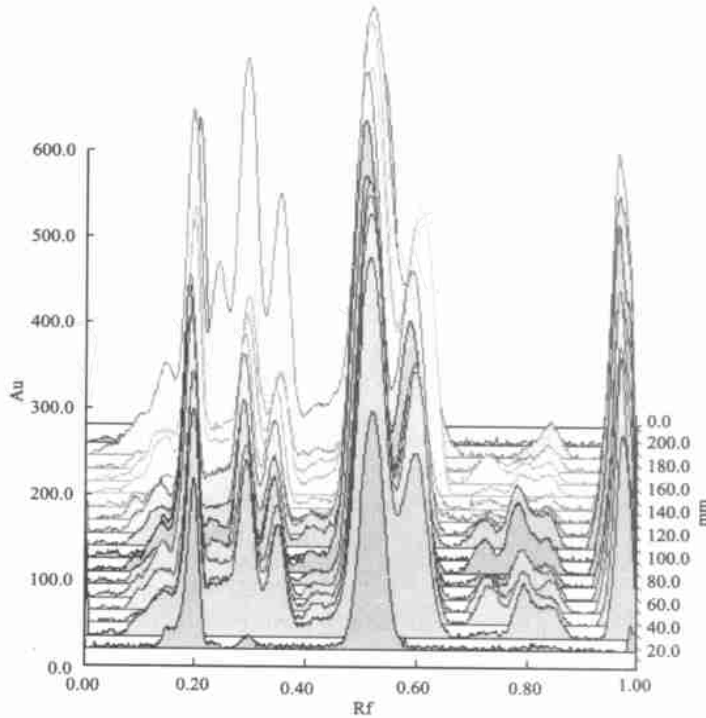


Fig. 3 TLCS-3D-FP of 14 samples

现代薄层色谱配以高质量的薄层扫描仪,用固定波长对薄层展开的各斑点作薄层扫描的扫描图谱比目测的层析图谱更为客观准确,因而具有更好的指纹意义。加之薄层色谱突出的方法简便、设备价廉、多路柱效应、分析速度快等优点,非常易于推广和便于执行,尤其适合 GAP 基地和中成药企业对大批原料药材进行总体质量控制之需。

4 讨论

在参考前人工作的基础上^[6,7],对展开剂的选择进行了系统的比较实验。结果表明,醋酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水(V V V V = 15 1 1 2)系统能较好地分离甘草的有效成分群(三萜和黄酮类),Rf 大小适宜。而其他展开系统则多对黄酮类或三萜类某类成分分离效果较好,甘草整体有效成分指纹特征的提取则以本系统为佳。

温度和相对湿度对甘草的薄层色谱行为具有很大的影响,实验表明,展开时温度在 28 以

上,湿度控制采用作者所用的操作方法,分析结果和方法的重现性基本令人满意。

致谢:中国亿利资源集团公司李秉经理和厦门大学一开区区高新技术研究开发基地王文慎经理帮助采集样本,谨致谢意。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 刘勤,刘永隆. 甘草属植物黄酮成分的研究概况[J]. 中国药学杂志,1989,24(12):709.
- [3] Guanbin Li, Hongyi Zhang, Yuquan Fan, et al. Migration behavior and separation of active components in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch and its commercial extract by micellar electrokinetic pillary chromatography [J]. J Chromatogra A, 1999, 863:105-114.
- [4] 程晓霞,向瑛. 甘草及其制剂中甘草酸的定量方法研究概况[J]. 时珍国医国药,2000,11(4):380.
- [5] 曹佩雪,梁光义,徐必学,等. HPLC 法测定麻黄汤煎及合煎汤剂中甘草酸含量[J]. 中草药,2001,32

(1):981 - 983.

[7] 王树瑞,刘雁清,宋爱萍.栽培品甘草的质量研究

[6] 徐子硕.甘草及其制剂中化学成分测定方法进展

[J].药物分析杂志,1994,14(3):49 - 51.

[J].中草药,1994,25(7):385 - 386.

Study on the TLCS fingerprint of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.

CUI Shu-fen, JIANG Yi-lun, WANG Xiao-ru

(The Key Laboratory of Analytical Science, Ministry of Education, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Objective To establish a sensitive and specific TLCS method for controlling the quality of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. **Method** The characteristic TLCS chromatogram was obtained by using pre-coated 20 cm \times 10 cm silica gel 60F254 plate (Merck) modified by 1% sodium hydroxide, ethyl acetate-formic acid-acetic acid-water (15:1:1:2) as the solvent system, and quantitative analysis was carried out using UV absorptive scanning at 254 nm. **Result** The TLCS-FP of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch., showing 6 characteristic peaks, was established by 14 lots of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. By cluster analysis and similarity calculation, the similarity of the positive samples was very high. 3D graph was selected to compare the results. **Conclusion** This method can be used to identify and evaluate the quality of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.

Key words: *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.; thin layer chromatography scanning method; fingerprint spectrum

(上接第 360 页)

an HiQ sil C₁₈V column (4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m) using methanol-20 mmol L⁻¹ tetrabutyl ammonium bromide-triethylamine (90:10:0.02) (pH was adjusted to 6.9 with HOAc) as the mobile phase and detected at 210 nm. The flow rate was 0.3 mL \cdot min⁻¹ and 20 μ L sample solution was injected every time. **Results** There was good liner relationship between the peak area and concentration at the ranges of 0.20 ~ 3.1 μ g ($r = 0.9999$) and 0.84 ~ 13.4 μ g ($r = 0.9999$) for oleanolic acid and ursolic acid respectively. The average recovery rates ($n = 9$) of oleanolic acid and ursolic acid were 98.3% (RSD = 1.3%) and 98.0% (RSD = 1.4%), respectively. **Conclusion** The method can be used scientifically to determine the contents of oleanolic acid and ursolic acid quantitatively in *Hedyotis diffusa* Willd. of different sources simultaneously.

Key words: HPLC; *Hedyotis diffusa* Willd.; oleanolic acid; ursolic acid