

薄层色谱指纹图谱在甘草 GAP 生产与质控中的应用

崔淑芬^{1,2}, 蒋轶伦², 王小如^{2,3}

(1. 深圳职业技术学院生物应用工程系, 广东 深圳 518055; 2. 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; 3. 国家海洋局第一海洋研究所青岛现代分析技术及中药标准化重点实验室, 山东 青岛 266061)

摘要: 目的 研究甘草药材的薄层色谱指纹图谱, 为科学评价及有效控制其质量提供可靠方法。方法 样品经预处理后点于硅胶 GF₂₅₄ 预制板上, 以乙酸乙酯-乙酸-甲酸-水(15 1 1 2) 为展开剂, 于 254 nm 处进行吸收扫描。结果 甘草药材样品得到的薄层色谱指纹图谱有 6 个共有峰, 依此建立的柱状条形码图能快速地对药材品质作出评判。结论 采用 TLC 指纹图谱可有效控制 GAP 基地甘草的质量。

关键词: 甘草; 薄层色谱; 指纹图谱; GAP

中图分类号: R 284 1

文献标识码: A

文章编号: 1004-2199(2004)04-0003-04

The Application in GAP Production and Quality Control of *glycyrrhiza uralensis* Fisch by TLC Fingerprint Spectrum

CU I Shufen^{1,2}, J IANG Yilun², WANG Xiaoru^{2,3}

(1. Dept. of Biological Applied Eng., Shenzhen Polytechnic, Shenzhen 518055, China; 2. The Key Laboratory of Analytical Science of MOE, College of Chemistry and Chemical Eng. Xiamen University, Xiamen 361005, China; 3. Qingdao Key Lab of Analytical Technology Development and Standardization of Chinese Medicines, First Institute Oceanography of SOA, Qingdao 266061, China)

Abstract: Objective To set up a sensitive and specific TLC method for controlling the quality of *glycyrrhiza uralensis* Fisch. **Method** The sample solution was applied to the commercial pre-coated 20 × 10 cm silica gel F₂₅₄ plate (Merck) modified by 1% sodium hydroxide, ethyl acetate-formic acid-ethanoic acid-water (15 1 1 2) as the solvent system, and quantitative analysis was carried out using UV absorptive scanning at 254nm. **Result** The TLC-FP of *glycyrrhiza uralensis* Fisch. showed 6 characteristic common peaks. The pole graph based on the height of common peaks can be conveniently used to evaluate the quality of different samples. **Conclusion** Quality of GAP *glycyrrhiza uralensis* Fisch. can be controlled effectively by TLC fingerprint.

Key words: *Glycyrrhiza uralensis* Fisch; Thin layer chromatography; Fingerprint; GAP

以指纹图谱作为中草药的质量控制方法, 目前

已获国内外共识。中药指纹图谱是指某种中药材或中成药经适当处理后, 采用一定的分析手段, 得到的能够标示该中药材或中成药特性的色谱或光谱的图谱。薄层色谱法应用于中药指纹图谱研究, 方法简便, 设备易得, 非常适合我国的国情, 尤其适宜于 GAP 基地生产与质控需要。薄层色谱的实验成本低, 流动相(展开剂)组成灵活, 更换与选择方便, 离

收稿日期: 2004-05-04

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, 辽宁抚顺人, 在职博士研究生, 主要从事中草药及海洋药物研究。Tel: (0755) 26731146, E-mail: shufencui@163.com.

线操作占机时间短,可多品种、不同操作人员同时操作,时效高、成本低;薄层色谱图像形象直观;指纹特征提取可直观比较色谱图像,进而可数码处理、积分扫描。选择薄层色谱法对中药进行指纹图谱质量控制具有广阔的应用前景。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,是最常用的中药之一。其主要的有效成分群为黄酮类和三萜类化合物^[1,2,3]。甘草的化学成分比较复杂,且由于采收期、产地、等级等的不同,化学成分差异较大^[4]。为了稳定药材质量,合理确定甘草的采挖期,对 GAP 基地的药材质量进行科学评价和控制,作者采用现代薄层色谱成套设备,对内蒙古亿利资源集团 GAP 基地的甘草药材进行指纹图谱质控研究,为甘草药材生产与质量控制提供一种简便易行的科学方法。

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 GF₂₅₄ 预制板 10 × 20cm (Merck, 德国); 双槽展开缸; Grant XB 14 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%); 甘草苷(由厦门大学傅博强博士制备,纯度 96.4%)。

甘草样品来源于内蒙古亿利资源集团康美基地不同采挖期甘草和梁外沙地、滩地和梁地 5 种商品等级(特级、甲级、乙级、丙级、丁级)的甘草,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。

2 方法

2.1 样品的制备

2.1.1 供试品溶液的制备 精密称取甘草药材粉末(过 60 目筛)1.00 g,加石油醚 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

每个样品用 CAMAG Linomat 5 半自动点样仪条带状点样 3 μL 于硅胶 GF₂₅₄ 预制板(1% 氢氧化钠预处理)上,对照品分别点 1 μL、2 μL 和 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(15:1:1:2),上行展开 9 cm。取出薄层板,晾干。先在紫外光灯箱内 254 nm 下观察荧光猝灭色谱,然后将薄层板放入薄层扫描仪中,采用 D2&W 灯,254 nm 单波长吸收扫描,CAMAG WinCATS 软件自动进行数据处理。

2.3 指纹图谱方法学考察

2.3.1 精密度与重现性 取梁外沙地乙级甘草样品,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 1.2%,单峰高大于 5% 总峰高的色谱峰的相对峰高的 RSD 为 0.8% ~ 1.5%。

取梁外梁地乙级甘草样品 5 份,按供试品溶液制备方法制备供试品,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 1.2%,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 取梁外沙地乙级甘草样品供试品溶液,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 内进行紫外吸收扫描,主要峰的峰高 RSD 在 4.5% 以内。

3 结果

3.1 甘草薄层色谱指纹图谱的建立和识别

内蒙古梁外沙地、滩地和梁地各 5 个不同等级甘草 254 nm 紫外吸收扫描结果见图 1,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 R_f 在 0.15~0.85 的色谱峰进行分析,有 6 个共有峰,按照 R_f 值由小到大的顺序对共有峰进行编号。根据对照品的位置,确定其中 2 号峰为三萜类成分甘草酸,5 号峰是黄酮类成分甘草苷。

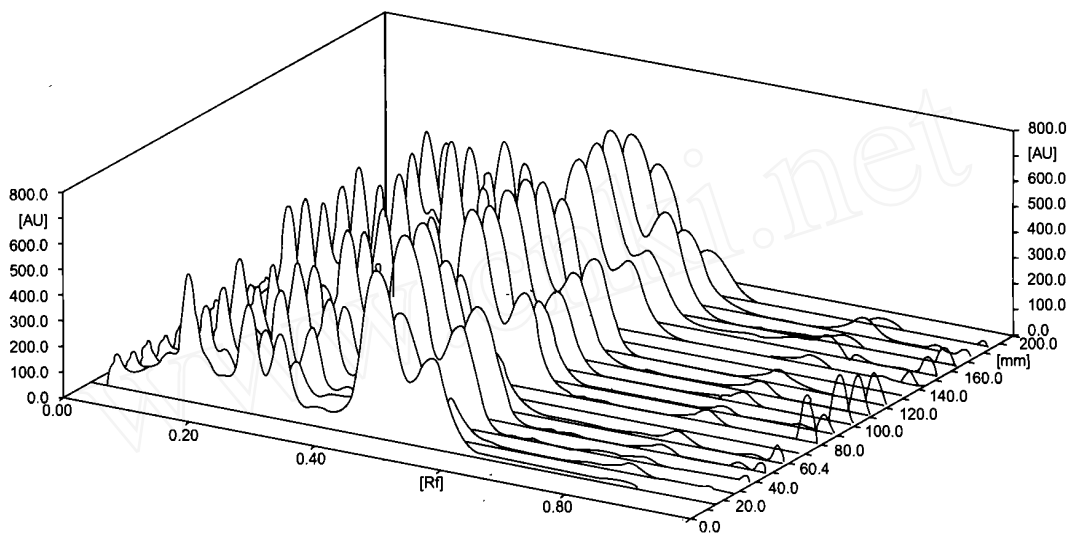


图 1 梁外甘草的薄层色谱指纹图谱

Fig 1 TLC fingerprint spectrum of liangwai *G. uralensis*

3.2 薄层色谱指纹图谱应用于甘草等级评价

我们根据甘草薄层色谱指纹图谱结果, 作成柱状图见图 2。它们为梁外沙地、滩地和梁地不同商品等级甘草质量的直观比较。甘草药材传统的等级划分主要根据药材的外观性状, 同一产地主要根据粗细大小进行质量等级评价。例如梁外特级条草需直径 26 mm 以上, 甲级草直径 19~ 26 mm, 乙级草直径 13~ 19 mm, 丙级草直径 10~ 13 mm, 丁级草直径 6~ 10 mm。这种等级划分方法虽然简单, 但从甘

草有效成分群指纹图谱结果来看, 此种方法并不能真实全面反映甘草的内在质量。沙地甘草甲级的 6 个共有峰的峰高在所有等级中都几乎为最低, 表明沙地甲级甘草的有效成分群含量较少, 和其等级质量并不相符。曹爱兰等曾根据甘草酸的含量对甘草等级划分进行了研究^[5], 结果亦表明传统的甘草等级划分有一定缺陷。利用有效成分群指纹图谱对甘草等级进行评价, 则可以更加全面科学地对甘草的质量进行评价。

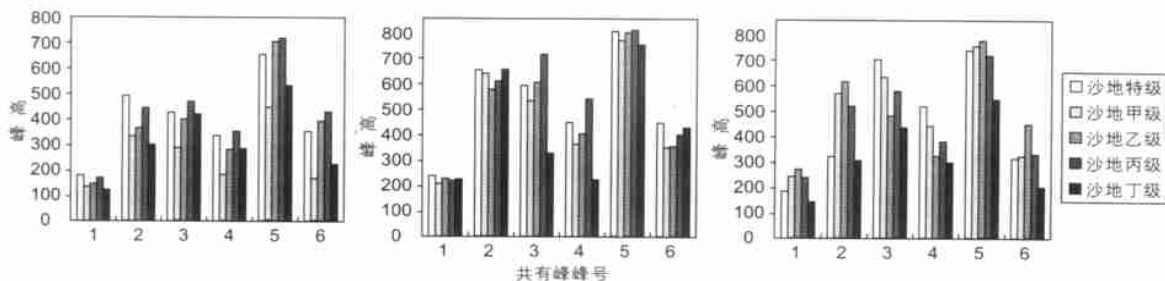


图 2 梁外不同商品等级甘草的薄层色谱特征指纹峰柱状图

Fig 2 The pole graph of TLC fingerprints of *Liangwai G. uralensis* of various levels

3.3 甘草质量动态研究结果

亿利资源集团康美基地 2000 年移栽的半野生甘草, 于 2002 年 7 月开始进行动态研究, 每月中旬采样, 除冰冻的 2002 年 11 月~ 2003 年 2 月, 进行

了一年周期的可采挖期甘草质量动态研究, 其结果见图 3。从试验结果可以看出, 甘草酸有两个含量高峰, 一个为 2002 年 7 月, 另一个高峰为次年的 6 月, 2003 年 3 月为甘草酸含量最低的月份。其他 5 个共

有峰亦表明 6 月份为甘草的最佳采收期, 而 3 月份最不适合采收。

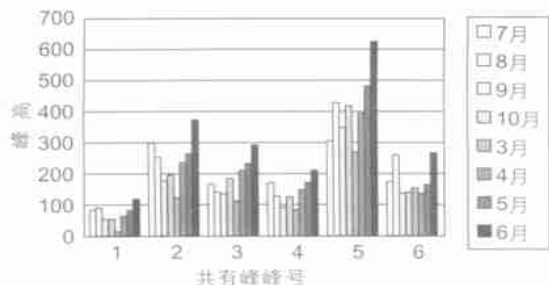


图 3 甘草薄层色谱指纹图谱动态结果

Fig 3 The dynamic results of TLC fingerprints of *G. uralensis*

4 讨论

4.1 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, 易于推广和使用, 尤其适合 GAP 基地对大批原料药材进行总体质量控制之需。但由于薄层色谱为开放系统, 离线操作, 变更操作容易, 为保证指纹图谱结果的重现性, 操作人员必须进行严格的单元操作培训, 试验时需

注意环境因素(温度、湿度等)的影响。

4.2 柱状图非常适合于充分发挥指纹图谱在定性鉴别和半定量分析中的作用。与单纯的色谱指纹图谱比较, 指纹柱状图更有利于样品间峰形的比较分析, 更容易获得主要指标成分相对含量的信息, 从而能够快速地对样品进行鉴别和对其品质作出评价。

致谢: 本研究的样品收集得到中国亿利资源集团公司李秉经理和厦门大学一开区高新技术研究开发基地王文慎经理的帮助, 实验研究方法得益于海洋一所青岛现代分析技术及中药标准化重点实验室黎先春教授及厦门市开区科技局李伟老师的指导, 在此一并致以衷心的感谢。

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
- [2] 刘勤, 刘永隆. 甘草属植物黄酮成分的研究概况[J]. 中国药理学杂志, 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
- [4] 曹靖宇, 刘茵. 甘草中甘草酸的提取分离和测定[J]. 甘肃化工, 1993, 3: 27
- [5] 曹爱兰, 常思明, 杜文娟. 内蒙产不同商品等级野生甘草质量研究[J]. 现代中医药, 2003, 1: 69

2005 年全国各医药期刊征订启事

《湖北中医杂志》是综合性中医药科技期刊, 由湖北中医学院主办, 国内外公开发行人。设有论著、名医经验、专病证治、中西医结合、诊断与治法、临床报道、方药纵横、针灸骨伤、中药园地、养生护理、综述等栏目, 用以介绍和交流有关中医或中西医结合方面的最新成果。适宜各级中医、中西医结合工作者和中医爱好者阅读。

本刊为月刊, 每月 10 日出版。每册定价 4.00 元, 全年定价 48 元。统一刊号: CN 42-1189/R, ISSN 1000-0704。国内代号: 38-52。欢迎新老订户订阅。编辑部可代办邮购。地址: 武汉市武昌区昙华林特 1 号: 湖北中医学院内, 邮编: 430061。

《河北中医》杂志是国内外公开发行的综合性中医药学术期刊, 本刊注重临床, 讲究实用, 兼顾科研与教学、普及与提高。辟有论著、名老中医经验、临床报道、经验交流、中西医结合、中药方剂、新药临床、针灸按摩、男性病证治、眼病证治、学术探讨、实验研究、中医护理、文献综述等栏目。

本刊为月刊, 每月 28 日出版, 每期订价 6.00 元, 全年 72.00 元。国内邮发代号 18-30, 国内统一刊号 CN 13-1067/R, 国际标准刊号 ISSN 1002-2619。欢迎广大读者到各地邮局订阅, 也可直接汇款至我部邮购。持订阅收据复印件投稿进可优先录用。地址: 石家庄市青园街 241 号河北中医杂志社, 邮编: 050021, 电话: 0311-5883896, 传真: 0311-5812687, 杂志社: E-mail: hbzhyi@tom.com