

乌拉尔甘草的UPLC指纹图谱研究^Δ

王 青^{1,2,3*}, 张亚楠^{1,2}, 张伟云^{1,2}, 吴 春^{1,2}, 黄秀梅^{1,2}, 毕丽伟^{1,2}, 王雅英^{1,2} (1. 厦门医学院药学系, 福建 厦门 361023; 2. 厦门市中药生物工程重点实验室, 福建 厦门 361023; 3. 福建省中药精加工与健康产品开发研究室, 福建 厦门 361023)

中图分类号 R284.1; R927.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)06-0774-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.06.13

摘 要 目的: 建立乌拉尔甘草的超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱。方法: 采用UPLC法。色谱柱为 Waters CORTECS UPLC C₁₈, 流动相为乙腈-0.1% 甲酸溶液(梯度洗脱), 流速为 0.3 mL/min, 检测波长为 254 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 1 μL。以甘草酸为参照, 测定 27 批药材样品的 UPLC 图谱, 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 A 版)进行相似度评价, 确定共有峰, 并对 27 批药材样品进行聚类分析。结果: 27 批药材样品的 UPLC 图谱有 20 个共有峰; 除 S2、S4、S19、S21、S22、S24 药材样品的相似度小于 0.90 外, 其余 21 批药材样品相似度均大于 0.90; 经验证, 该 21 批药材样品 UPLC 图谱与对照图谱具有较好的一致性。27 批药材样品可聚为 3 类, S24 为 I 类, S2、S4、S12、S19、S21、S22 为 II 类, 其余为 III 类。结论: 该研究所建指纹图谱可为甘草的质量评价提供参考。

关键词 乌拉尔甘草; 超高效液相色谱; 指纹图谱; 聚类分析; 质量控制

Study on UPLC Fingerprint of *Glycyrrhiza uralensis*

WANG Qing^{1,2,3}, ZHANG Yanan^{1,2}, ZHANG Weiyun^{1,2}, WU Chun^{1,2}, HUANG Xiumei^{1,2}, BI Liwei^{1,2}, WANG Yaying^{1,2} (1. Department of Pharmacy, Xiamen Medical College, Fujian Xiamen 361023, China; 2. Xiamen Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Bio-engineering, Fujian Xiamen 361023, China 3. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine and Health Products Development in Fujian, Fujian Xiamen 361023, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish UPLC fingerprint of *Glycyrrhiza uralensis*. METHODS: UPLC method was adopted. The determination was performed on Waters CORTECS UPLC C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% formic acid (gradient elution) at the flow rate of 0.3 mL/min. The detection wavelength was set at 254 nm, and column temperature was 30 ℃. The sample size was 1 μL. Using glycyrrhizic acid as control, UPLC chromatograms of 27 batches of sample were determined. Similarity evaluation was conducted by using TCM Chromatogram Fingerprint Similarity Evaluation System (2004 A edition) to determine common peak and conduct cluster analysis of 27 batches of samples. RESULTS: There were 20 common peaks in UPLC chromatograms of 27 batches of samples. The similarity degree of S2, S4, S19, S21, S22, S24 were less than 0.90, the others samples were more than 0.90. After validation, UPLC chromatograms of 21 batches of samples were in good agreement with control fingerprint. 27 batches of samples were clustered into 3 categories, in which S24 was category I; S2, S4, S12, S19, S21, S22 were category II; other were category III. CONCLUSIONS: Established fingerprint can provide reference for quality evaluation of *G. uralensis*.

KEYWORDS *Glycyrrhiza uralensis*; UPLC; Fingerprint; Cluster analysis; Quality control

甘草始载于《神农本草经》, 被列为上品。2015 年版《中国药典》(一部)规定甘草为豆科植物甘草(又称乌拉尔甘草, *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^[1], 具有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛、调和诸药之功效。甘草是最常用的中药之一, 据报道 60% 的中药复方中含有甘草, 有关甘草药材的化学成分研究前期已较深入, 近几年又从其中分离得到了新的化学成分^[2-4]。

Δ 基金项目: 福建省中青年骨干教师教育科研项目(A类)(No. 闽教科[2013]43 号-JA13426); 厦门医学高等专科学校科研项目(No. 厦医专[2013]58 号-Z2013-09)

* 副教授。研究方向: 中药化学成分与质量控制。E-mail: xm-wq1122@163.com

虽然 2015 年版《中国药典》(一部)规定甘草的药材来源有 3 种, 但据笔者调研所知, 目前市场上流通的药材品种主要是乌拉尔甘草(也是栽培面积最大的一个品种), 其他两种药材在流通市场已很难见到。2015 年版《中国药典》(一部)项下关于甘草药材的质量控制是对主要成分甘草酸和甘草苷进行薄层色谱鉴别(TLC)及高效液相色谱法(HPLC)含量测定, 也有针对甘草药材及复方制剂的一些成分分析的相关报道, 但这种仅测定一两个指标成分的含量难以满足对药材质量的全面控制^[5-7]。为此, 笔者收集了不同地区产地的乌拉尔甘草, 建立其超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱, 对得到的数据进行处理, 结合相似度评价和聚类分析等方法, 对乌拉尔甘草进行质量分析和评价, 以期全面地控制该药材质量。

1 材料

1.1 仪器

Waters Acquity UPLC H-Class 型 UPLC 仪,包括四元超高压溶剂系统、自动进样恒温样品管理器、二极管阵列检测器和 Empower 2 色谱工作站(美国 Waters 公司);AG285 型十万分之一电子分析天平(德国 Sartorius 公司);ZEALWAY S10H 型超声提取器[致微(厦门)仪器有限公司];XFB-200 型万能粉碎机(湖南中诚制药机械厂)。

1.2 试剂

甘草酸对照品(批号: MUST-15080510)、甘草苷对照品(批号: MUST-15082811)、异甘草苷对照品(批号: MUST-15031204)、甘草素对照品(批号: MUST-15021104)、异甘草素对照品(批号: MUST-15042010)均购自成都曼斯特生物科技有限公司,经氢谱、碳谱、质谱、红外光谱和紫外光谱等检测确认其结构,按 HPLC 归一化法测得其纯度均大于 98%;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

1.3 药材

乌拉尔甘草(S1~S27)于2016年2月购于全国不同省份(见表1),经厦门医学院王雅英教授鉴定为真品。

表1 甘草药材来源

Tab 1 Source of *G. uralensis*

编号	来源	产地
S1	福建国大药房厦门杏东店	内蒙古
S2	山东威海燕喜堂连锁药店	内蒙古
S3	福建大田县南街社区服务站	内蒙古
S4	福建宁德福安众安康仁济药店	新疆
S5	福建厦门清泰堂药店	内蒙古
S6	福建泉州南安医药公司	内蒙古
S7	福建将乐县玉华大药房	内蒙古
S8	福建南平康佰家大药房	内蒙古
S9	河北唐山市迁安医药中西大药房	新疆
S10	福建厦门鹭燕大药房前埔店	内蒙古
S11	福建厦门海沧里实真药房	内蒙古
S12	福建南安延平大药店	新疆
S13	福建南安好又惠药店	内蒙古
S14	福建漳州云霄县康宁大药房	内蒙古
S15	福建闽清县梅城佳和宜又佳中心店	内蒙古
S16	福建泉州泉港宜又佳全国连锁药店	内蒙古
S17	贵州贵阳市云岩济元堂中医诊所	内蒙古
S18	福建国大药房厦门前埔店	内蒙古
S19	福建厦门莲福堂连锁药店	新疆
S20	贵州安顺市镇宁县丁旗美灵大药房	内蒙古
S21	陕西丹凤县绿洲大药房	新疆
S22	福建厦门九鼎药房	新疆
S23	福建厦门施普康药业有限公司新店分店	内蒙古
S24	福建永春县石鼓镇桃场社区第二卫生所	黑龙江
S25	福建龙岩武平康佰家大药房	内蒙古
S26	贵州贵阳同济康中西大药房	内蒙古
S27	福建柘荣县大众医药商店	内蒙古

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Waters CORTECS UPLC C₁₈(100 mm × 2.1

mm, 1.6 μm);流动相:乙腈(A) -0.1%甲酸溶液(B),梯度洗脱(洗脱程序见表2);流速:0.30 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:30 ℃,进样量:1 μL^[8-9]。

表2 梯度洗脱程序

Tab 2 Gradient elution programs

时间,min	A, %	B, %
0	20	80
2	25	75
10	40	60
18	60	40
20	20	80
25	20	80

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取各待测成分对照品适量,分别置于10 mL棕色量瓶中,加70%甲醇溶液溶解并定容,得单一对照品贮备液。分别取上述各单一对照品贮备液适量,置于同一10 mL棕色量瓶中,加70%甲醇溶液定容,制成混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密称取药材样品粉末(过40目筛)1.0 g,置于50 mL具塞锥形瓶中,加70%甲醇溶液40 mL,称定质量,超声(功率:150 W,频率:40 kHz)提取30 min,放冷;再次称定质量,加70%甲醇溶液补足减失的质量,摇匀,静置,经0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取“2.2.2”项下供试品溶液(编号:S1)适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,以甘草酸峰的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果,20个共有峰相对保留时间的RSD为0.07%~0.22%(n=6),相对峰面积的RSD为0.32%~1.25%(n=6),表明方法精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取“2.2.2”项下供试品溶液(编号:S1)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、16、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,以甘草酸峰的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果,20个共有峰相对保留时间的RSD为0.28%~0.74%(n=6),相对峰面积的RSD为1.03%~2.52%(n=6),表明供试品溶液于室温放置24 h内基本稳定。

2.3.3 重复性试验 精密称取药材样品(编号:S1)适量,共6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,以甘草酸峰的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果,20个共有峰相对保留时间的RSD为0.18%~0.69%(n=6),相对峰面积的RSD为0.71%~1.30%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.4 UPLC 指纹图谱的生成与相似度、共有峰相关数据分析

2.4.1 UPLC 指纹图谱的生成 取27批药材样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下

色谱条件进样测定,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 A 版)对 27 批药材样品的 UPLC 图谱进行分析,得 UPLC 指纹图谱,详见图 1、图 2。

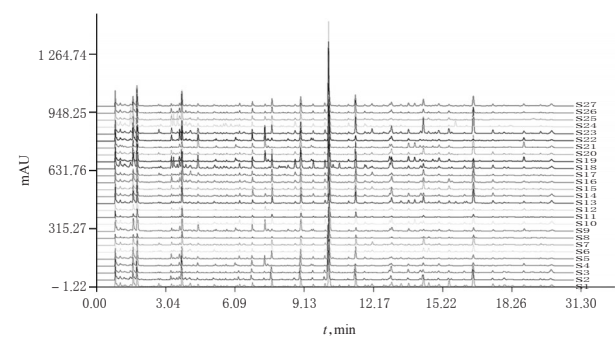


图 1 27 批药材样品的 UPLC 叠加指纹图谱
Fig 1 UPLC superposed fingerprint of 27 batches of samples

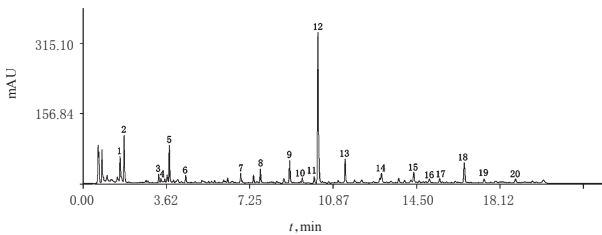


图 2 药材样品 UPLC 对照指纹图谱
Fig 2 UPLC control fingerprint of samples

2.4.2 相似度分析 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 A 版),以药材样品共有模式为对照,进行整体相似度评价。结果显示,除 S2、S4、S19、S21、S22 及 S24 等 6 批药材样品的相似度较低(<0.90)外,其余 21 批药材样品的相似度均大于 0.90,且与对照指纹图谱具有较好的一致性,表明大部分药材样品间差异较小、质量稳定性良好,详见表 3、表 4。

表 3 27 批药材样品(编号:S1~S14)相似度评价结果

Tab 3 Similarity evaluation result of 27 batches of samples(No.S1-S14)

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	对照
S1	1.000	0.956	0.963	0.896	0.949	0.972	0.988	0.966	0.915	0.960	0.958	0.927	0.988	0.974	0.970
S2	0.956	1.000	0.953	0.889	0.955	0.965	0.961	0.976	0.916	0.958	0.974	0.909	0.969	0.966	0.970
S3	0.963	0.953	1.000	0.921	0.972	0.959	0.958	0.947	0.930	0.976	0.957	0.946	0.975	0.980	0.976
S4	0.896	0.889	0.921	1.000	0.933	0.917	0.904	0.911	0.984	0.940	0.931	0.984	0.916	0.916	0.943
S5	0.949	0.955	0.972	0.933	1.000	0.982	0.957	0.968	0.950	0.982	0.982	0.951	0.963	0.963	0.990
S6	0.972	0.965	0.959	0.917	0.982	1.000	0.975	0.988	0.945	0.975	0.985	0.944	0.975	0.969	0.988
S7	0.988	0.961	0.958	0.904	0.957	0.975	1.000	0.975	0.923	0.962	0.969	0.931	0.985	0.975	0.975
S8	0.966	0.976	0.947	0.911	0.968	0.988	0.975	1.000	0.941	0.966	0.984	0.937	0.975	0.971	0.982
S9	0.915	0.916	0.930	0.984	0.950	0.945	0.923	0.941	1.000	0.963	0.959	0.992	0.936	0.940	0.967
S10	0.960	0.958	0.976	0.940	0.982	0.975	0.962	0.966	0.963	1.000	0.987	0.964	0.978	0.979	0.992
S11	0.958	0.974	0.957	0.931	0.982	0.985	0.969	0.984	0.959	0.987	1.000	0.952	0.973	0.970	0.993
S12	0.927	0.909	0.946	0.984	0.951	0.944	0.931	0.937	0.992	0.964	0.952	1.000	0.944	0.948	0.967
S13	0.988	0.969	0.975	0.916	0.963	0.975	0.985	0.975	0.936	0.978	0.973	0.944	1.000	0.990	0.982
S14	0.974	0.966	0.980	0.976	0.963	0.969	0.975	0.971	0.940	0.979	0.970	0.948	0.990	1.000	0.983
对照	0.970	0.970	0.976	0.943	0.990	0.988	0.975	0.982	0.967	0.992	0.993	0.967	0.982	0.983	1.000

表 4 27 批药材样品(编号:S15~S27)相似度评价结果

Tab 4 Similarity evaluation result of 27 batches of samples(No.S15-S27)

编号	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21	S22	S23	S24	S25	S26	S27	对照
S15	1.000	0.989	0.953	0.963	0.917	0.976	0.909	0.942	0.985	0.909	0.977	0.983	0.990	0.987
S16	0.989	1.000	0.971	0.972	0.911	0.984	0.899	0.937	0.975	0.926	0.982	0.983	0.988	0.990
S17	0.953	0.971	1.000	0.951	0.868	0.966	0.856	0.894	0.944	0.913	0.967	0.948	0.963	0.959
S18	0.963	0.972	0.951	1.000	0.894	0.948	0.897	0.931	0.943	0.965	0.976	0.978	0.972	0.984
S19	0.917	0.911	0.868	0.894	1.000	0.874	0.984	0.979	0.887	0.822	0.933	0.939	0.933	0.934
S20	0.976	0.984	0.966	0.948	0.874	1.000	0.864	0.891	0.981	0.891	0.954	0.946	0.969	0.964
S21	0.909	0.899	0.856	0.897	0.984	0.864	1.000	0.975	0.882	0.823	0.922	0.930	0.928	0.927
S22	0.912	0.937	0.894	0.931	0.979	0.891	0.975	1.000	0.901	0.876	0.962	0.969	0.950	0.961
S23	0.985	0.975	0.944	0.943	0.887	0.981	0.882	0.901	1.000	0.879	0.947	0.955	0.978	0.965
S24	0.879	0.926	0.913	0.965	0.822	0.891	0.823	0.876	0.879	1.000	0.942	0.940	0.923	0.941
S25	0.977	0.982	0.967	0.976	0.933	0.954	0.922	0.962	0.947	0.942	1.000	0.989	0.981	0.989
S26	0.983	0.983	0.948	0.978	0.939	0.946	0.930	0.969	0.955	0.940	0.989	1.000	0.989	0.995
S27	0.990	0.988	0.963	0.972	0.933	0.969	0.928	0.950	0.978	0.923	0.981	0.989	1.000	0.993
对照	0.987	0.990	0.959	0.984	0.934	0.964	0.927	0.961	0.965	0.941	0.989	0.995	0.993	1.000

2.4.3 UPLC 指纹图谱中共有峰的指认及相关分析 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 A 版)对 27 批药材样品的 UPLC 图谱进行比较分析^[10]。27 批药材样品有 20 个共有峰,通过与对照品对照,指认了其中的 5 个峰,分别为 2 号峰(甘草苷)、5 号峰(异甘

草苷)、6 号峰(甘草素)、8 号峰(异甘草素)、12 号峰(甘草酸)。其中,12 号色谱峰分离良好、峰面积最大且为所有药材样品共有,确定其为参照峰,计算其他峰相对于 12 号峰的相对保留时间、相对峰面积,详见表 5~表 8。

表5 27批药材样品(编号:S1~S14)UPLC图谱共有峰的相对保留时间

Tab 5 Relative retention time of common peak in UPLC chromatogram of 27 batches of samples(No.S1-S14)														
峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14
1	0.157	0.156	0.156	0.157	0.157	0.158	0.158	0.158	0.158	0.158	0.157	0.158	0.157	0.157
2	0.174	0.173	0.173	0.174	0.174	0.175	0.175	0.175	0.175	0.175	0.175	0.174	0.174	0.174
3	0.322	0.321	0.321	0.322	0.322	0.322	0.323	0.323	0.323	0.323	0.323	0.322	0.322	0.322
4	0.332	0.331	0.331	0.331	0.331	0.332	0.332	0.332	0.332	0.332	0.332	0.332	0.332	0.332
5	0.368	0.367	0.366	0.367	0.367	0.368	0.368	0.368	0.368	0.368	0.368	0.367	0.367	0.367
6	0.437	0.436	0.435	0.436	0.436	0.436	0.437	0.437	0.437	0.437	0.437	0.436	0.437	0.437
7	0.617	0.613	0.614	0.613	0.615	0.615	0.615	0.615	0.615	0.616	0.615	0.615	0.617	0.617
8	0.755	0.754	0.754	0.754	0.755	0.755	0.755	0.755	0.754	0.755	0.755	0.756	0.756	0.757
9	0.880	0.879	0.879	0.879	0.880	0.879	0.879	0.880	0.879	0.880	0.880	0.880	0.881	0.880
10	0.933	0.933	0.933	0.933	0.933	0.933	0.933	0.933	0.933	0.934	0.933	0.933	0.934	0.933
11	0.984	0.984	0.984	0.984	0.984	0.984	0.984	0.984	0.984	0.984	0.984	0.984	0.984	0.984
12	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
13	1.116	1.117	1.117	1.116	1.116	1.116	1.116	1.116	1.116	1.116	1.116	1.115	1.116	1.115
14	1.271	1.273	1.272	1.271	1.272	1.271	1.271	1.270	1.271	1.271	1.270	1.270	1.271	1.271
15	1.408	1.411	1.410	1.409	1.409	1.408	1.408	1.407	1.408	1.407	1.407	1.407	1.408	1.408
16	1.475	1.478	1.477	1.477	1.475	1.474	1.474	1.473	1.475	1.474	1.473	1.474	1.475	1.475
17	1.519	1.522	1.521	1.520	1.519	1.518	1.518	1.517	1.518	1.518	1.517	1.517	1.519	1.518
18	1.623	1.627	1.626	1.625	1.624	1.623	1.623	1.622	1.623	1.622	1.622	1.622	1.623	1.623
19	1.707	1.712	1.711	1.709	1.709	1.708	1.707	1.706	1.707	1.707	1.706	1.706	1.708	1.708
20	1.841	1.847	1.845	1.843	1.842	1.841	1.840	1.842	1.841	1.840	1.839	1.840	1.841	1.840

表6 27批药材样品(编号:S15~S27)UPLC图谱共有峰的相对保留时间

Tab 6 Relative retention time of common peak in UPLC chromatogram of 27 batches of samples(No.S15-S27)														
峰号	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21	S22	S23	S24	S25	S26	S27	
1	0.157	0.157	0.158	0.158	0.157	0.157	0.157	0.157	0.157	0.146	0.157	0.157	0.157	0.157
2	0.174	0.174	0.175	0.175	0.174	0.174	0.174	0.174	0.174	0.158	0.174	0.174	0.174	0.174
3	0.322	0.323	0.323	0.322	0.322	0.322	0.323	0.323	0.323	0.323	0.322	0.322	0.322	0.322
4	0.332	0.332	0.332	0.332	0.331	0.331	0.332	0.332	0.332	0.332	0.331	0.331	0.332	0.332
5	0.368	0.369	0.368	0.368	0.367	0.367	0.368	0.368	0.368	0.368	0.367	0.367	0.368	0.368
6	0.437	0.438	0.437	0.436	0.436	0.437	0.437	0.437	0.437	0.437	0.437	0.437	0.437	0.437
7	0.618	0.617	0.616	0.616	0.616	0.617	0.615	0.616	0.615	0.616	0.616	0.617	0.617	0.617
8	0.757	0.756	0.755	0.756	0.756	0.757	0.755	0.755	0.755	0.755	0.756	0.757	0.757	0.757
9	0.881	0.880	0.879	0.880	0.880	0.880	0.880	0.880	0.880	0.880	0.880	0.881	0.881	0.881
10	0.934	0.933	0.933	0.934	0.934	0.934	0.933	0.933	0.933	0.934	0.934	0.934	0.934	0.934
11	0.984	0.984	0.984	0.985	0.984	0.984	0.984	0.984	0.984	0.984	0.984	0.984	0.984	0.984
12	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
13	1.116	1.117	1.116	1.116	1.116	1.116	1.117	1.117	1.116	1.116	1.116	1.116	1.116	1.116
14	1.272	1.272	1.271	1.271	1.271	1.134	1.272	1.272	1.271	1.271	1.271	1.272	1.272	1.272
15	1.409	1.409	1.407	1.408	1.409	1.410	1.410	1.409	1.408	1.412	1.408	1.409	1.410	1.410
16	1.476	1.476	1.474	1.476	1.477	1.476	1.477	1.476	1.474	1.470	1.475	1.476	1.477	1.477
17	1.520	1.519	1.517	1.518	1.520	1.520	1.520	1.520	1.518	1.518	1.519	1.520	1.521	1.521
18	1.624	1.624	1.622	1.624	1.624	1.625	1.624	1.624	1.623	1.624	1.624	1.625	1.625	1.625
19	1.709	1.709	1.707	1.708	1.709	1.709	1.709	1.709	1.708	1.709	1.709	1.709	1.710	1.710
20	1.842	1.843	1.840	1.842	1.842	1.843	1.843	1.843	1.841	1.847	1.843	1.843	1.843	1.843

表7 27批药材样品(编号:S1~S14)UPLC图谱共有峰的相对峰面积

Tab 7 Relative peak area of common peak in UPLC chromatogram of 27 batches of samples(No.S1-S14)														
峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14
1	0.191	0.130	0.203	0.184	0.179	0.228	0.198	0.229	0.180	0.108	0.112	0.213	0.203	0.200
2	0.226	0.196	0.207	0.515	0.208	0.226	0.232	0.246	0.449	0.284	0.268	0.461	0.261	0.245
3	0.033	0.057	0.040	0.039	0.061	0.020	0.056	0.057	0.034	0.018	0.031	0.066	0.026	0.031
4	0.019	0.030	0.021	0.014	0.021	0.021	0.024	0.025	0.019	0.012	0.017	0.022	0.023	0.021
5	0.200	0.396	0.102	0.138	0.156	0.254	0.218	0.358	0.202	0.169	0.283	0.133	0.235	0.221
6	0.036	0.039	0.037	0.061	0.039	0.015	0.052	0.023	0.094	0.037	0.023	0.038	0.031	0.040
7	0.035	0.058	0.041	0.016	0.041	0.033	0.045	0.037	0.019	0.051	0.039	0.018	0.044	0.049
8	0.089	0.122	0.114	0.021	0.108	0.093	0.109	0.080	0.030	0.119	0.091	0.039	0.103	0.132
9	0.129	0.165	0.161	0.227	0.138	0.114	0.138	0.127	0.189	0.173	0.144	0.192	0.150	0.156
10	0.039	0.036	0.044	0.026	0.032	0.028	0.029	0.027	0.028	0.039	0.033	0.021	0.035	0.045

续表 7

Continued tab 7

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14
11	0.043	0.058	0.054	0.011	0.046	0.040	0.051	0.044	0.015	0.056	0.052	0.017	0.048	0.050
12	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
13	0.200	0.189	0.185	0.037	0.187	0.188	0.190	0.187	0.054	0.183	0.180	0.063	0.191	0.172
14	0.087	0.097	0.174	0.076	0.043	0.021	0.082	0.062	0.069	0.094	0.046	0.118	0.120	0.185
15	0.217	0.101	0.080	0.074	0.039	0.074	0.210	0.086	0.030	0.048	0.065	0.069	0.152	0.070
16	0.052	0.033	0.049	0.054	0.021	0.014	0.038	0.011	0.027	0.037	0.025	0.041	0.056	0.039
17	0.114	0.030	0.045	0.021	0.008	0.029	0.020	0.034	0.022	0.023	0.010	0.029	0.046	0.023
18	0.296	0.228	0.183	0.077	0.072	0.137	0.294	0.190	0.058	0.122	0.114	0.081	0.281	0.278
19	0.052	0.033	0.051	0.013	0.018	0.022	0.026	0.028	0.021	0.042	0.020	0.022	0.059	0.072
20	0.035	0.015	0.051	0.057	0.013	0.011	0.021	0.012	0.041	0.038	0.017	0.068	0.037	0.028

表 8 27 批药材样品(编号:S15~S27)UPLC 图谱共有峰的相对峰面积

Tab 8 Relative peak area of common peak in UPLC chromatogram of 27 batches of samples(No.S15-S27)													
峰号	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21	S22	S23	S24	S25	S26	S27
1	0.194	0.161	0.094	0.213	0.151	0.230	0.135	0.128	0.188	0.162	0.174	0.139	0.130
2	0.302	0.265	0.219	0.147	0.562	0.216	0.484	0.452	0.247	0.038	0.296	0.302	0.278
3	0.048	0.064	0.033	0.069	0.029	0.062	0.023	0.051	0.052	0.095	0.064	0.055	0.032
4	0.017	0.017	0.022	0.076	0.017	0.028	0.016	0.013	0.014	0.108	0.020	0.017	0.018
5	0.164	0.269	0.447	0.236	0.156	0.304	0.105	0.151	0.126	0.287	0.302	0.188	0.198
6	0.033	0.031	0.075	0.093	0.038	0.051	0.192	0.073	0.066	0.030	0.049	0.034	0.042
7	0.029	0.031	0.051	0.033	0.019	0.035	0.012	0.012	0.028	0.018	0.025	0.035	0.040
8	0.075	0.095	0.118	0.096	0.034	0.089	0.019	0.030	0.085	0.097	0.065	0.081	0.100
9	0.121	0.132	0.153	0.150	0.238	0.152	0.215	0.153	0.128	0.104	0.131	0.138	0.146
10	0.032	0.034	0.031	0.052	0.027	0.037	0.024	0.025	0.030	0.032	0.024	0.028	0.029
11	0.040	0.043	0.056	0.055	0.012	0.041	0.004	0.014	0.041	0.037	0.031	0.047	0.044
12	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
13	0.176	0.178	0.183	0.177	0.037	0.169	0.017	0.056	0.196	0.242	0.152	0.186	0.174
14	0.048	0.111	0.074	0.091	0.112	0.132	0.093	0.072	0.117	0.005	0.030	0.060	0.076
15	0.146	0.075	0.151	0.044	0.041	0.143	0.043	0.014	0.204	0.011	0.073	0.066	0.127
16	0.030	0.026	0.034	0.025	0.088	0.045	0.060	0.017	0.056	0.004	0.017	0.021	0.049
17	0.058	0.059	0.017	0.008	0.052	0.042	0.047	0.015	0.072	0.019	0.049	0.034	0.026
18	0.252	0.257	0.252	0.084	0.040	0.416	0.024	0.023	0.359	0.006	0.107	0.097	0.185
19	0.033	0.045	0.026	0.029	0.022	0.060	0.015	0.011	0.053	0.002	0.015	0.020	0.036
20	0.018	0.024	0.016	0.014	0.102	0.037	0.134	0.042	0.041	0.004	0.013	0.019	0.040

2.5 聚类分析

运用SPSS 19.0软件对甘草指纹图谱中共有峰的相对峰面积进行系统聚类,采用组间平均数联接法,根据聚类分析结果,将药材样品大致分为3大类:S24为Ⅰ类, S2、S4、S12、S19、S21、S22为Ⅱ类,其余为Ⅲ类,详见图3。

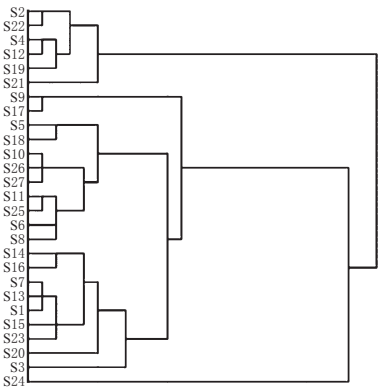


图 3 聚类分析树形图

Fig 3 Cluster analysis tree diagram

3 讨论

甘草中含有大量的以甘草苷、甘草素为代表的黄酮苷元及其苷类,甘草酸、甘草次酸为代表的三萜皂苷类以及香豆素、二苯乙烯类等数量众多的化合物。甘草不仅以单方及复方制剂应用于临床,还被广泛应用于食品和化妆品工业。本研究建立的UPLC法较HPLC法分析时间更短、色谱峰分离度更好,并确认了指纹图谱中含量较高的主要色谱峰。通过相似度评价和聚类分析结果发现,27批不同产地药材样品中,21批药材的指纹图谱相似度均大于0.90,说明该药材质量总体较为稳定;对于试验得到的20个共有峰,通过与对照品比较,明确了5个主要成分的归属。另外,对于药材样品中大量的其他未知成分,尚需进一步结合质谱、药效学研究等手段进行深入探讨,以说明其差异对质量优劣的影响。本试验结果对于建立科学、合理的甘草药材质量评价方法,提高其质量控制标准均有重要的意义。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:86.
[2] 周彪,万传星.甘草地上部分化学成分研究[J].中草药,2016,47(1):21-25.