

甘草浸膏 HPLC 指纹图谱及多指标成分含量测定研究

周越美¹, 冯超², 史煜华¹, 黄琴伟^{3*}, 张文婷^{3*} (1.浙江中医药大学, 杭州 310053; 2.杭州康仑中药饮片有限公司, 杭州 310000; 3.浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052)

摘要: 目的 建立甘草浸膏 HPLC 指纹图谱及多指标成分含量测定方法。方法 采用 HPLC 建立甘草浸膏的指纹图谱, 并通过中药色谱指纹图谱相似度评价系统对 13 家企业的 35 批次样品进行相似度评价; 以甘草苷、芹糖异甘草苷、异甘草苷、新异甘草苷、甘草查尔酮 B 和甘草酸 6 种成分为指标, 采用 Boston Green ODS 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以乙腈(A)-0.1%甲酸(B)为流动相, 梯度洗脱, 建立了甘草浸膏的多指标 HPLC 含量测定方法。结果 建立了甘草浸膏 HPLC 指纹图谱, 标定了 22 个共有峰, 并指认了其中 10 个共有峰, 35 批样品相似度均>0.96, 说明各批次甘草浸膏有较好的一致性; 建立了 6 种指标成分含量测定方法, 方法学考察符合规定。结论 本实验所建立的方法准确、简便、重复性好, 可用于全面评价甘草浸膏的质量。

关键词: 甘草浸膏; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 多指标成分含量测定; 甘草酸; 黄酮类成分

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)09-1046-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.09.005

引用本文:周越美, 冯超, 史煜华, 等. 甘草浸膏 HPLC 指纹图谱及多指标成分含量测定研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(9): 1046-1051.

Study on Fingerprint of Licorice Extract and the Content Determination of Its Multi-indicator

ZHOU Yuemei¹, FENG Chao², SHI Yuhua¹, HUANG Qinwei^{3*}, ZHANG Wenting^{3*} (1.Zhejiang Medical University, Hangzhou 310053, China; 2.Hangzhou Kanglun Traditional Chinese Medicine Yinpien Co., Ltd., Hangzhou 310000, China; 3.Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC fingerprint of licorice extract and a method for determination of multi-index components. **METHODS** The fingerprint of licorice extract was established by HPLC, and the similarity evaluation of HPLC fingerprint of 35 batches of licorice extract from 13 manufacturers was carried out by the chromatographic fingerprint similarity evaluation system of traditional Chinese medicine. Six index components including glycyrrhizin, celery glycyrrhizin, isoglycyrrhizin, neoisoglycoside, licorice chalcone B and glycyrrhizic acid were used as indicators, and the multi-indicator HPLC method for the determination of licorice extract was established by using a Boston Green ODS (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with acetonitrile(A)-0.1% formic acid(B) as the mobile phase gradient. **RESULTS** HPLC fingerprints of licorice extract were established, 22 common peaks were calibrated, and 10 common peaks were identified. The similarity of 35 batches of samples was >0.96, indicating that the different batches of licorice extract had good consistency. Six multi-indicator contents determination methods were established and methodological investigations were in compliance with the regulations. **CONCLUSION** The established methods are accurate, simple and reproducible, which can be used to comprehensively evaluate the quality of licorice extract.

KEYWORDS: licorice extract; HPLC; fingerprint; determination of multi-indicator content; glycyrrhizic acid; flavonoids

甘草浸膏作为原料药, 由豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *Glycyrrhiza inflata* Bat.、光果甘草 *Glycyrrhiza glabra* L.提取制得^[1], 被广泛应用于复方甘草片、藿香正气水、小儿止咳糖浆等化学药及中药复方制剂中, 其质量优劣直接影响药物的有效性。现代研究表明, 甘草中主要含三萜皂苷类、黄酮类、香豆素类、生

物碱类、多糖类和氨基酸等化学成分, 三萜皂苷和黄酮类是其主要活性成分, 具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤、免疫调节等药理作用^[2]。

中药成分复杂, 以单一成分为质控指标往往难以反映中药整体质量, 而指纹图谱具有整体性的特点, 能较全面地反映中药品质, 现已成为中药质量评价和控制研究的热点之一^[3]。近年来, 国

基金项目: 浙江省中医药科技计划项目(2017ZA076)

作者简介: 周越美, 女, 硕士生 Tel: 13777884504 E-mail: 1172566825@qq.com *通信作者: 张文婷, 女, 主任中药师, 硕士 Tel: (0571)87180337 E-mail: leozhwt@163.com 黄琴伟, 女, 副主任中药师 Tel: 13957122401 E-mail: qingwei-h@163.com

内外已有多位学者对甘草的指纹图谱进行研究^[4-6],而对甘草浸膏指纹图谱的研究尚未见报道。此外,文献查阅和调研显示,不同来源甘草间成分差异较大^[7-8],因此不同来源甘草所提取的甘草浸膏成分也会存在差异。甘草浸膏收载于中国药典 2015 年版一部,仅收载有甘草苷与甘草酸的含量测定方法,目前对甘草浸膏的研究也仅限于甘草苷与甘草酸的含量测定^[9-12],测定指标相对单一,难以满足现阶段甘草浸膏的质控要求,故甘草浸膏的质量标准有待于提高与完善。

本实验收集了 13 家主流生产企业 35 批甘草浸膏。通过建立甘草浸膏 HPLC 指纹图谱,利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统对其进行相似度评价;建立多指标含量测定方法,指认了 10 个成分,选取甘草苷、芹糖异甘草苷、异甘草苷、新异甘草苷、甘草查尔酮 B 和甘草酸为指标性成分,并对其进行了含量测定,从而更好地评价甘草浸膏的质量,为全面开展甘草浸膏的质量控制以及提高甘草浸膏的质量标准提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司,配备 G1311B 四元泵、G1329B 自动进样仪、G1316A 柱温箱、G4212B 二极管阵列检测器、Agilent Chemstation 色谱工作站);KQ-300VDB 型双频数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司);XPE205 电子天平(瑞士 Mettler Toledo);Milli-Q Advantage A10 纯水仪(Millipore 公司)。

1.2 试剂

35 批甘草浸膏样品信息见表 1。甘草苷对照品(批号:11610-201607;纯度:93.1%)和甘草酸铵对照品(批号:110731-201619;纯度:93.0%)购于中国食品药品检定研究院;芹糖异甘草苷(批号:P13A9F58700;纯度 \geq 98%)、异甘草苷(批号:R07D8F50056;纯度 \geq 98%)、新异甘草苷(批号:Y12J9H65564;纯度 \geq 98%)和甘草查尔酮 B(批号:P15D6F7553;纯度 \geq 98%)对照品均购于上海源叶生物科技有限公司,均为供含量测定用;甲醇(杭州化学试剂有限公司,分析纯);乙腈、甲酸(MERCK 公司,色谱纯);水为 Millipore 超纯水。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

取甘草浸膏,研细,取约 0.1 g,精密称定,

置具塞锥形瓶中,精密加入 70%甲醇 50 mL,密塞,称定重量,超声处理 30 min,取出,放冷,再称定重量,用 70%甲醇补足减失的重量,摇匀使溶解,滤过,取续滤液,即得。

表 1 甘草浸膏信息

Tab. 1 Licorice extract Information

编号	品名	批号	生产企业
JG1	甘草浸膏	20170301	企业 1
JG2	甘草浸膏	20170501	企业 1
JG3	甘草浸膏	20170601	企业 1
JG4	甘草浸膏	920180701	企业 2
JG5	甘草浸膏	920180702	企业 2
JG6	甘草浸膏	920180703	企业 2
JG7	甘草浸膏	201705121	企业 3
JG8	甘草浸膏	201705122	企业 3
JG9	甘草浸膏	201705123	企业 3
JG10	甘草浸膏	20180315	企业 4
JG11	甘草浸膏	20180323	企业 4
JG12	甘草浸膏	20180520	企业 4
JG13	甘草浸膏	20180521	企业 4
JG14	甘草浸膏	20180504	企业 4
JG15	甘草浸膏	20180505	企业 4
JG16	甘草浸膏	158194	企业 5
JG17	甘草浸膏	158195	企业 5
JG18	甘草浸膏	158196	企业 5
JG19	甘草浸膏	2017042601	企业 6
JG20	甘草浸膏	20171201	企业 7
JG21	甘草浸膏	20180501	企业 7
JG22	甘草浸膏	20180502	企业 7
JG23	甘草浸膏	2018061	企业 8
JG24	甘草浸膏	2018062	企业 8
JG25	甘草浸膏	2018063	企业 8
JG26	甘草浸膏	2018064	企业 8
JG27	甘草浸膏	y-148-171101	企业 8
JG28	甘草浸膏	820180202	企业 9
JG29	甘草浸膏	170701	企业 10
JG30	甘草浸膏	160161	企业 11
JG31	甘草浸膏	/	企业 11
JG32	甘草浸膏	y033-170401	企业 12
JG33	甘草浸膏	2018022101	企业 13
JG34	甘草浸膏	2018030201	企业 13
JG35	甘草浸膏	2018030101	企业 13

2.2 对照品溶液的制备

取甘草苷、芹糖异甘草苷、异甘草苷、新异甘草苷、甘草查尔酮 B 和甘草酸对照品适量,精密称定,加 70%甲醇制成每 1 mL 含甘草苷 15.67 μ g、芹糖异甘草苷 13.82 μ g、异甘草苷 8.71 μ g、新异甘草苷 9.27 μ g、甘草查尔酮 B 6.22 μ g、甘草酸 176.33 μ g 的混合溶液,即得。

2.3 色谱条件

色谱柱: Boston Green ODS(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m); 检测波长 0~17 min 275 nm, 17~24 min

360 nm, 24~45 min 250 nm; 流速 1 mL·min⁻¹; 柱温: 30 °C; 进样量 10 μL; 流动相为乙腈(A)-0.1% 甲酸(B), 梯度洗脱: 0~5 min, 3%→18%A, 5~35 min, 18%→50%A, 35~45 min, 50%→70%A。色谱图见图 1。

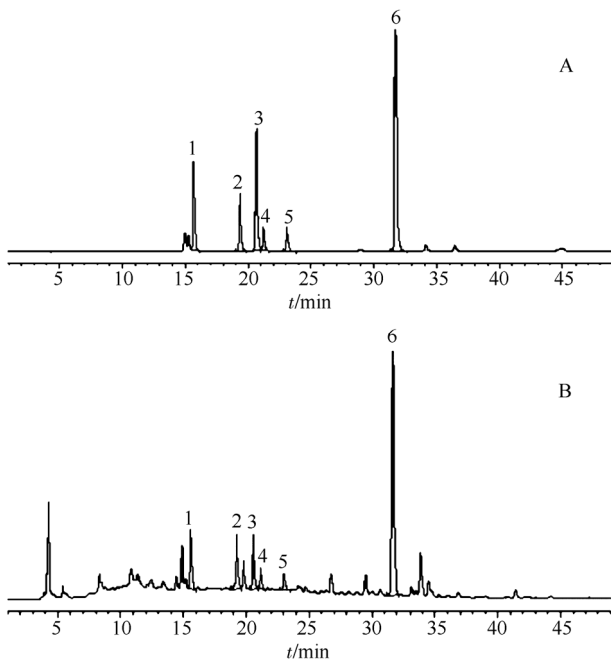


图 1 高效液相色谱图

A-混合对照品; B-甘草浸膏供试品; 1-甘草苷; 2-芹糖异甘草苷; 3-异甘草苷; 4-新异甘草苷; 5-甘草查尔酮 B; 6-甘草酸。

Fig. 1 HPLC chromatogram

A-mixed reference; B-sample of licorice extract; 1-glycyrrhizin; 2-celery isoglycyrrhizin; 3-isoglycyrrhizin; 4-neoisoglycide; 5-licorice chalcone B; 6-glycyrrhizic acid.

2.4 指纹图谱

2.4.1 仪器精密度试验 取同一供试品溶液(JG4), 按“2.3”项下色谱条件, 连续进样 6 次, 每次进样 10 μL, 记录色谱图, 并按国家药典委提供的中药色谱指纹图谱相似度评价系统对其相似度进行评价, 以全谱峰匹配模式进行相似度计算, 结果相似度均>0.99, 表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取同一供试品溶液(JG4), 按“2.3”项下色谱条件分别在 0, 2, 6, 12, 24, 48 h 进样, 记录色谱图, 并按国家药典委提供的中药色谱指纹图谱相似度评价系统对其相似度进行评价, 以全谱峰匹配模式进行相似度计算, 结果相似度均>0.99, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 取同一供试品溶液(JG4)6 份, 按“2.3”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 并按国家药典委提供的中药色谱指纹图谱相似度评价系统对其相似度进行评价, 以全谱峰匹

配模式进行相似度计算, 结果相似度均>0.99, 表明本法具有较好的重复性, 符合指纹图谱的技术要求。

2.4.4 标准对照指纹图谱的建立 按“2.1”项下供试品溶液的制备方法确定的色谱条件, 制备甘草浸膏供试品溶液。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统对 35 批次甘草浸膏进行指纹图谱相似度分析和匹配分析研究, 共标定 22 个共有峰。经查阅文献资料, 通过二维线性离子阱静电轨道阱组合式高分辨质谱(LTQ-Orbitrap-MS)技术及对照品对照法, 指认 10 个共有峰, 分别为芹糖甘草苷(5 号峰)、新甘草苷(6 号峰)、甘草苷(7 号峰)、芹糖异甘草苷(8 号峰)、异甘草苷(10 号峰)、新异甘草苷(11 号峰)、甘草查尔酮 B(12 号峰)、甘草素(14 号峰)、甘草酸(17 号峰)、异甘草素(18 号峰)。其中甘草酸色谱峰分离度较好, 峰面积较大且稳定, 保留时间合适, 故确定甘草酸(17 号峰)为参照峰, 建立标准甘草浸膏对照指纹图谱, 见图 2。35 批甘草浸膏的指纹图谱叠加图见图 3。

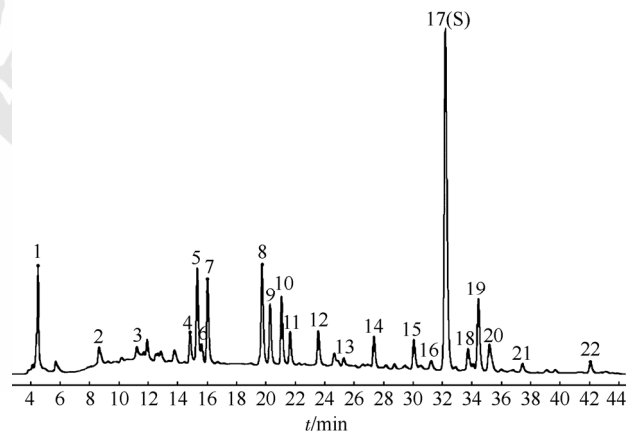


图 2 甘草浸膏对照指纹图谱

Fig. 2 Control fingerprint of licorice extract

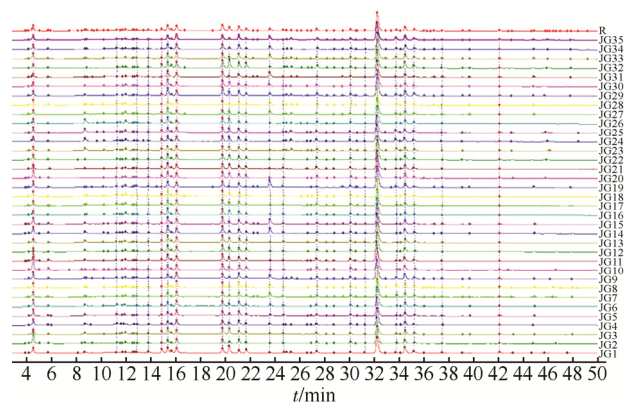


图 3 35 批甘草浸膏的指纹图谱叠加图

Fig. 3 Fingerprint overlay of 35 batches of licorice extract

2.4.5 样品测定 对 35 批甘草浸膏样品进行指纹图谱相似度的测定, 运用上述生成的甘草浸膏对照指纹图谱作对照, 采用国家药典委提供的中药色谱指纹图谱相似度评价系统, 以共有峰计算相似度, 结果见表 2。35 批样品相似度均>0.96。

表 2 不同批次甘草浸膏相似度结果

Tab. 2 Similarity results of different batches of licorice extract

编号	批号	相似度	编号	批号	相似度
JG1	20170301	0.972	JG19	2017042601	0.975
JG2	20170501	0.967	JG20	20171201	0.989
JG3	20170601	0.988	JG21	20180501	0.992
JG4	920180701	0.989	JG22	20180502	0.994
JG5	920180702	0.992	JG23	2018061	0.983
JG6	920180703	0.993	JG24	2018062	0.979
JG7	201705121	0.990	JG25	2018063	0.977
JG8	201705122	0.981	JG26	2018064	0.975
JG9	201705123	0.988	JG27	y-148-171101	0.989
JG10	20180315	0.972	JG28	820180202	0.990
JG11	20180323	0.990	JG29	170701	0.992
JG12	20180520	0.989	JG30	160161	0.989
JG13	20180521	0.991	JG31	/	0.972
JG14	20180504	0.988	JG32	y033-170401	0.967
JG15	20180505	0.991	JG33	2018022101	0.990
JG16	158194	0.988	JG34	2018030201	0.993
JG17	158195	0.992	JG35	2018030101	0.984
JG18	158196	0.991			

2.5 多指标成分含量的测定

2.5.1 线性关系考察 精密吸取甘草苷、芹糖异甘草苷、异甘草苷、新异甘草苷、甘草查尔酮 B 和甘草酸对照品储备溶液, 分别配成 16.832, 10.800, 14.520, 5.616, 2.334, 135.563 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 混合对照品储备液。按“2.3”项下色谱条件, 以 0.5, 1, 3, 5, 10, 20 μL 的进样体积依次进样; 对各成分色谱峰面积(Y)、进样量(X)进行回归, 计算回归方程。结果显示, 甘草苷、芹糖异甘草苷、异甘草苷、新异甘草苷、甘草查尔酮 B 和甘草酸分别在 8.416~336.6 ng, 5.400~216.0 ng, 7.260~290.4 ng, 2.808~112.3 ng, 1.167~46.68 ng 和 67.78~2 711 ng 进样量内有良好的线性关系。结果见表 3。

2.5.2 仪器精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 10 μL , 连续进样 6 次, 记录色谱图。结果甘草苷、芹糖异甘草苷、异甘草苷、新异甘草苷、甘草查尔酮 B 和甘草酸峰面积的 RSD 分别为 1.7%, 1.7%, 1.7%, 1.7%, 1.8% 和 1.6%, 表明仪器精密度良好。

表 3 6 种指标成分线性关系考察

Tab. 3 Investigation on the linearities of the calibration curves of 6 marker components

成分	回归方程	R ²	线性范围/ng
甘草苷	Y=3 610.7X+1.228 8	1.000 0	8.416~336.6
芹糖异甘草苷	Y=3 759.4X+0.317 6	1.000 0	5.400~216.0
异甘草苷	Y=6 026.6X-2.496 0	1.000 0	7.260~290.4
新异甘草苷	Y=3 197X-4.821 3	0.999 1	2.808~112.3
甘草查尔酮 B	Y=7 508.5X+0.129 4	1.000 0	1.167~46.68
甘草酸	Y=1 425.6X+1.280 7	1.000 0	67.78~2 711

2.5.3 稳定性试验 取同一供试品(JG4), 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 分别于 0, 2, 6, 12, 24, 48 h 进样, 按“2.3”项下色谱条件进样, 记录色谱图。结果显示甘草苷、芹糖异甘草苷、异甘草苷、新异甘草苷、甘草查尔酮 B 和甘草酸峰面积的 RSD 分别为 1.9%, 2.2%, 2.5%, 2.1%, 1.9% 和 1.4%, 表明样品溶液于 48 h 内稳定性良好。

2.5.4 重复性试验 取同一供试品(JG4)6 份, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件进样, 记录色谱图。结果显示甘草苷、芹糖异甘草苷、异甘草苷、新异甘草苷、甘草查尔酮 B 和甘草酸含量的 RSD 分别为 2.6%, 2.8%, 2.7%, 2.5%, 2.6% 和 2.4%, 表明方法重复性良好。

2.5.5 加样回收率试验 精密称取已知含量供试品(JG4)6 份, 每份 0.05 g, 精密加入混合对照品溶液和 70% 甲醇适量, 定容至 50 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理 30 min, 取出, 放冷, 再称定重量, 用 70% 甲醇补足减失的重量, 摇匀使溶解, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。按“2.3”项下色谱条件进行测定。分别计算加样回收率, 结果见表 4。

2.5.6 样品测定 取 35 批甘草浸膏, 按“2.3”项下色谱条件进行测定, 结果见表 5。

3 讨论

3.1 测定指标的选择

本实验采用 LTQ-Orbitrap-MS 对甘草浸膏进行质谱定性分析, 借助 LTQ-Orbitrap-MS 的高质量准确度, 提供化合物的精确分子量和二级碎片离子, 对甘草浸膏的化学成分进行指认和确证。结合对照品对照法鉴别了甘草酸、芹糖甘草苷、新甘草苷、甘草苷、芹糖异甘草苷、异甘草苷、新异甘草苷、甘草查尔酮、甘草素和异甘草素 10 个成分, 结果发现芹糖甘草苷和新甘草苷色谱峰重叠, 甘草素、异甘草素附近有杂质峰干扰, 故最终选择甘草苷、芹糖异甘草苷、异甘草苷、新异

表 4 甘草浸膏中 6 个指标成分的回收率试验结果(n=6)

Tab. 4 Recoveries result of 6 marked components in licorice extract(n=6)

成分	称样量/ g	原有量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %	成分	称样量/ g	原有量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
甘草苷	0.054 01	0.398	0.421	0.824	101.11	100.1	2.1	新异甘 草苷	0.054 01	0.161	0.141	0.299	99.82	99.0	2.7
	0.052 86	0.390	0.421	0.809	99.53				0.052 86	0.158	0.141	0.294	94.68		
	0.054 98	0.405	0.421	0.840	103.29				0.054 98	0.164	0.141	0.307	99.40		
	0.056 41	0.416	0.421	0.840	100.77				0.056 41	0.168	0.141	0.310	101.09		
	0.052 38	0.386	0.421	0.812	96.87				0.052 38	0.156	0.141	0.295	97.19		
	0.062 18	0.459	0.421	0.890	99.28				0.062 18	0.186	0.141	0.324	101.83		
蔗糖异 甘草苷	0.054 01	0.368	0.297	0.652	95.21	95.1	2.1	甘草查 尔酮 B	0.054 01	0.052	0.058	0.124	100.41	103.8	2.3
	0.052 86	0.360	0.297	0.639	92.35				0.052 86	0.051	0.058	0.118	102.91		
	0.054 98	0.375	0.297	0.668	97.92				0.054 98	0.053	0.058	0.115	106.68		
	0.056 41	0.384	0.297	0.669	94.84				0.056 41	0.054	0.058	0.116	106.30		
	0.052 38	0.357	0.297	0.646	96.38				0.052 38	0.050	0.058	0.115	103.18		
	0.062 18	0.424	0.297	0.707	93.66				0.062 18	0.059	0.058	0.125	103.02		
异甘 草苷	0.054 01	0.201	0.363	0.571	103.41	103.3	1.5	甘草酸	0.054 01	4.737	3.304	8.011	96.02	98.3	2.6
	0.052 86	0.197	0.363	0.562	101.78				0.052 86	4.636	3.304	7.841	94.90		
	0.054 98	0.205	0.363	0.577	103.67				0.054 98	4.822	3.304	8.239	101.53		
	0.056 41	0.210	0.363	0.576	102.24				0.056 41	4.947	3.304	8.296	98.57		
	0.052 38	0.195	0.363	0.562	102.43				0.052 38	4.594	3.304	7.972	100.86		
	0.062 18	0.232	0.363	0.610	106.06				0.062 18	5.454	3.304	8.763	98.14		

表 5 35 批甘草浸膏中 6 种成分含量测定结果(n=2)

Tab. 5 Determination result of six components in 35 batches of licorice extract(n=2)

编号	质量分数/μg·g ⁻¹						总黄酮	甘草酸
	甘草苷	蔗糖异甘草苷	异甘草苷	新异甘草苷	甘草查尔酮 B			
JG1	8.206	7.821	2.738	6.805	0.496	26.066	87.972	
JG2	6.912	6.601	3.647	2.892	0.512	20.564	93.895	
JG3	6.428	9.872	3.066	4.567	0.704	24.637	88.500	
JG4	7.981	6.702	4.033	3.231	1.035	22.982	94.920	
JG5	7.731	6.490	3.874	3.128	1.103	22.326	91.011	
JG6	8.339	7.168	4.178	3.407	1.257	24.349	98.090	
JG7	7.000	7.669	4.045	2.654	2.962	24.330	93.190	
JG8	9.804	7.812	5.200	3.787	2.199	28.802	89.515	
JG9	8.785	7.899	4.750	3.201	3.702	28.337	107.949	
JG10	7.427	9.123	3.991	5.362	0.384	26.287	116.789	
JG11	7.098	10.402	3.603	4.583	0.383	26.069	98.874	
JG12	7.396	9.714	3.386	5.751	0.431	26.678	80.903	
JG13	7.620	10.513	3.457	5.403	0.459	27.452	89.131	
JG14	7.209	11.359	6.972	1.063	3.887	30.490	96.463	
JG15	7.102	10.570	6.862	1.186	3.517	29.237	95.573	
JG16	7.427	8.732	3.404	2.391	0.659	22.613	85.910	
JG17	7.477	8.237	3.404	2.401	0.539	22.058	68.400	
JG18	7.366	8.273	3.368	2.385	0.552	21.944	67.453	
JG19	6.769	5.559	6.593	0.339	5.441	24.701	102.345	
JG20	6.783	5.596	7.078	1.966	0.520	21.943	98.784	
JG21	6.667	5.287	5.679	1.771	0.511	19.915	97.967	
JG22	6.670	5.106	6.271	1.727	0.507	20.281	96.972	
JG23	6.996	7.991	3.439	3.118	0.804	22.348	87.427	
JG24	6.876	8.132	3.442	2.970	0.546	21.966	86.142	
JG25	6.839	7.993	3.469	2.885	0.558	21.744	85.264	
JG26	4.395	9.323	1.744	2.838	0.757	19.057	68.247	
JG27	6.009	8.058	2.084	2.584	3.573	22.308	86.895	
JG28	6.717	6.385	3.213	1.884	2.626	20.825	87.673	
JG29	7.443	13.537	4.274	4.104	2.204	31.562	107.674	
JG30	5.946	10.461	2.508	2.742	2.399	24.056	86.906	
JG31	6.778	8.948	2.637	0.906	4.675	23.944	91.596	
JG32	8.158	12.101	4.900	8.931	1.076	35.166	92.643	
JG33	8.849	9.060	4.742	2.753	3.255	28.659	99.189	
JG34	7.603	8.543	3.935	1.929	2.324	24.334	91.216	
JG35	8.530	8.370	4.753	2.640	3.368	27.661	97.966	
RSD/%	11.49	23.80	36.49	36.62	75.13	13.59	11.13	

甘草苷、甘草查尔酮 B 和甘草酸作为指标成分，其中甘草酸为三萜皂苷，其余 5 个成分均为黄酮类成分。

3.2 提取方法的比较

以甘草浸膏 JG4 作为实验对象，在超声提取方法中比较了 50% 甲醇、70% 甲醇、90% 甲醇 3 种不同溶剂，不同提取时间(20, 30, 40 min)，不同称样量(0.08, 1.00, 0.12 g)对甘草浸膏不同成分的提取效果，结果表明以 70% 甲醇为提取溶剂，称取 1.00 g 样品，超声提取 30 min 即可将甘草浸膏中的 6 种待测成分基本提取完全。

3.3 测定波长的选择

根据甘草苷、芹糖异甘草苷、异甘草苷、新异甘草苷、甘草查尔酮 B 和甘草酸 200~400 nm 的光谱图，甘草酸检测波长为 250 nm，甘草苷检测波长为 275 nm，芹糖异甘草苷、异甘草苷、新异甘草苷和甘草查尔酮 B 检测波长为 360 nm。结合各成分的出峰时间，故确定波长的选择为 0~17 min 275 nm，17~24 min 360 nm，24~45 min 250 nm。

3.4 色谱柱的选择

比较 Green ODS-AQ(4.6 mm×250 mm, 5 μm) 和 Boston Green ODS(4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱，结果后者所测成分峰形良好，且与其他成分峰达到基线分离，故选择 Boston Green ODS 色谱柱。

3.5 指纹图谱评价

本研究采用指标成分和指纹图谱相结合的方法控制甘草浸膏的质量，并快速获得不同样品间的相似性。甘草酸是甘草浸膏中的主要药理活性成分，在指纹图谱中峰面积相对较大且较稳定，因此作为参比峰。通过中药特征图谱软件对 35 批甘草浸膏进行分析，指认了 10 个共有峰，系统判定的 22 个共有峰整体反映了其化学成分特征。35 批样品平均相似度均>0.96，说明甘草浸膏的制备工艺稳定，样品间一致性良好。

3.6 样品测定结果分析与评价

目前，甘草原料的来源主要有野生、栽培和进口。研究表明，不同来源、不同产地、不同生长年限均会造成甘草质量上的差别^[13]。此外，国家对中药提取物实行备案制管理，不同生产企业生产的甘草浸膏因生产工艺、设备等因素也会带来产品质量上的差异。中药成分复杂，仅建立某

单一成分的含量测定，在很大程度上有较大的片面性，本实验对 35 批次甘草浸膏的 6 种指标性成分测定结果显示，不同企业、不同批次各指标成分差异较大，可见同时测定多指标成分的含量对甘草浸膏的质量控制是非常必要的。

3.7 对建立方法的总体评价

本实验利用 HPLC，在同一色谱条件下，首次建立了甘草浸膏 HPLC 指纹图谱，可用于考察生产工艺的稳定性及批间一致性评价；建立了多指标成分含量测定方法，同时测定甘草苷、芹糖异甘草苷、异甘草苷、新异甘草苷、甘草查尔酮 B 和甘草酸 6 种指标成分的含量。将模糊鉴别与精准定量分析相结合，能够系统快速地对甘草浸膏进行质量评价，相比现行标准，能够更为全面地控制产品质量。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2015: 86.
- [2] 李明. 甘草的研究概况[J]. 甘肃中医学院学报, 2000, 17(3): 59-63.
- [3] 龚千锋. 中药炮制学[M]. 第 2 版. 北京: 中国中医药出版社, 2012.
- [4] 王存琴, 龙泉江. 甘草炮制的文献研究[J]. 甘肃中医, 2007, 20(3): 42-44.
- [5] 任德权. 中药指纹图谱质控技术的意义与作用[J]. 中药材, 2001, 24(4): 235-239.
- [6] 屠鹏飞. 高效液相色谱法制定中药材和中药注射剂特征指纹图谱的探讨[J]. 中成药, 2000, 22(7): 516.
- [7] TANG L Q, ZHANG S T, LIU S, et al. Content determination of glycyrrhizic acid in *Glycyrrhiza uralensis* from different sources by HPLC [J]. China Pharm(中国药房), 2010, 21(39): 3700-3701.
- [8] 甄中锋. 多基源甘草药材 HPLC 指纹图谱及指标性成分研究[J]. 四川中医, 2018, 36(12): 178-180.
- [9] 王紫秋, 雷凯琴, 包冬香. HPLC 法测定甘草浸膏中甘草酸的含量[J]. 浙江化工, 2002, 33(2): 20-21.
- [10] YANG S H, KONG L F, DONG S Q, et al. Determination of liquiritin and glycyrrhizic acid in Radix Glycyrrhizae and extractum glycyrrhizae by UPLC [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2013, 19(17): 157-160.
- [11] WANG L Q. Simultaneous determination of glycyrrhizic acid and liquiritin in extractum glycyrrhizae by RP-HPLC [J]. China Pharm(中国药业), 2009, 18(17): 16-17.
- [12] 赵燕, 李晓晔, 杨兴斌. 甘草浸膏中甘草酸含量的测定[J]. 第四军医大学学报, 2001(17): 1575.
- [13] ZHANG L J, WANG Y Y, LI F. A Comparative study on the contents of glycyrrhizin and other five components in *Glycyrrhiza uralensis* from different origins [J]. J Wenshan Univ(文山学院学报), 2019, 32(6): 24-27.

收稿日期: 2019-06-14

(本文责编: 蔡珊珊)