

不同产地甘草水提液和醇提液指纹图谱研究

彭 灿^{1, 2, 3}, 谢晓婷^{1, 2, 3, 4*}, 彭代银^{1, 2, 4}, 俞年军^{1, 2, 4}, 陈卫东^{1, 2, 3, 4}, 曹 勇⁵, 朱月健⁵

1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012
2. 中药复方安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230012
3. 安徽省中医药科学院 药物制剂研究所, 安徽 合肥 230012
4. 安徽道地药材品质提升协同中心, 安徽 合肥 230012
5. 安徽济人药业有限公司, 安徽 亳州 236800

摘要:目的 建立不同产地甘草水提液和醇提液的 HPLC 指纹图谱, 以为不同产地甘草品控及甘草提取加工方法提供借鉴。方法 采用 HPLC 法建立 10 批不同产地甘草药材的水提液和醇提液的指纹图谱, 并对所获得的指纹图谱数据进行相似度评价和层次聚类分析。结果 建立了甘草水提液和醇提液的指纹图谱, 其中水提液指纹图谱确定了 16 个共有峰, 并指出 6 种成分, 10 批甘草的相似度在 0.030~0.999, 醇提液指纹图谱确定了 60 个共有峰, 并指出 7 种成分, 10 批甘草的相似度均大于 0.85。层次聚类分析结果显示能够很好地将不同地区的甘草水提液和醇提液予以分类, 提示产地气候环境、土壤条件等自然因素对甘草的内在品质产生较为显著的影响。结论 建立了稳定可靠的甘草水提液和醇提液 HPLC 指纹图谱评价方法, 为甘草质量标准研究及提取加工工艺的优化提供有力的理论依据和指导, 为临床用药方法的选择提供科学依据。

关键词: 甘草; 水提液; 醇提液; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 相似度评价; 层次聚类分析

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)15-3569-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.15.008

Fingerprint analysis of water and ethanol extracts of *Glycyrrhiza uralensis* from different habitats

PENG Can^{1, 2, 3}, XIE Xiao-ting^{1, 2, 3, 4}, PENG Dai-yin^{1, 2, 4}, YU Nian-jun^{1, 2, 4}, CHEN Wei-dong^{1, 2, 3, 4}, CAO Yong⁵, ZHU Yue-jian⁵

1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China
2. Anhui Key Laboratory of Chinese Medicinal Formula, Hefei 230012, China
3. Institute of Pharmaceutics, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei 230012, China
4. Synergetic Innovation Center of Anhui Authentic Chinese Medicine Quality Improvement, Hefei 230012, China
5. Anhui Jiren Pharmaceutical Co., Ltd., Bozhou 236800, China

Abstract: Objective The HPLC fingerprints of water extracts and alcohol extracts of *Glycyrrhiza uralensis* from different producing areas were established in order to provide reference for the quality control and the extraction and processing methods. **Methods** The HPLC fingerprints of water extracts and alcohol extracts of 10 batches of *G. uralensis* from different producing areas were established by HPLC method, and the similarity evaluation and hierarchical cluster analysis of the obtained fingerprint data were carried out. **Results** The fingerprint of water extracts and ethanol extracts of *G. uralensis* was established. There were 16 common peaks were identified from fingerprints of water extracts, and six components were identified, meanwhile, the fingerprints of water extracts showed that the similarity of 10 batches of *G. uralensis* was in the range of 0.030 and 0.999. Sixty common peaks were identified from fingerprints of ethanol extracts, and seven components were identified, meanwhile, the fingerprints of ethanol extracts showed that the similarity of 10 batches of *G. uralensis* were all greater than 0.85. The results of hierarchical cluster analysis showed that the water extracts and alcohol extracts of *G. uralensis* in different areas could be well classified, suggesting that natural factors such as the climate, soil conditions and other natural factors had a significant impact on the internal quality of licorice. **Conclusion** A stable and reliable HPLC fingerprint evaluation method for water extracts and alcohol extracts of *G. uralensis* has been established, which can provide a powerful theoretical

收稿日期: 2019-05-01

基金项目: 国家中药标准化资助项目 (ZYBZH-C-AH-02)

作者简介: 彭 灿 (1984—), 男, 副教授。Tel: 13956024560 E-mail: pengcankang@hotmail.com

*通信作者 谢晓婷 (1993—), 女, 硕士。Tel: 18356078082 E-mail: azyxxt0618@hotmail.com

basis and a guidance for the study of quality standard of *G. uralensis* and the optimization of extraction and processing technology, and provide a scientific basis for the choice of clinical medication.

Key words: *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.; water extract; ethanol extract; HPLC; fingerprinting; similarity-assessing method; hierarchical cluster analysis

甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *G. inflata* Bat. 或光果甘草 *G. glabra* L. 的干燥根及根茎^[1]。甘草为中医临床常用药之一，素有“国老”之称，具有补脾益气、镇咳化痰、缓急止痛、清热解毒、缓和药性的功效^[2]。本品始载于《神农本草经》，列为上品，临床上具有抗炎、抗病毒、调节心脑血管、抗肿瘤、抗氧化等多种药理活性^[3-8]。

《中国药典》2015 年版收载的甘草产地主要集中在我国西北部新疆、甘肃、内蒙古等地区^[9]，在疏风解毒胶囊国家中药标准化项目的资助下，笔者对我国甘草的产地分布进行了较为系统的考察，发现现有主产区新疆、甘肃产地甘草其种子均来源于内蒙古，而原始主产地内蒙古主要以提供甘草种子为主要产业，甘草药材种植面积较小，产地气候环境、土壤条件的变化均有可能引起甘草内在品质的差异。此外，甘草应用广泛，具有“十方九草”之美誉，在很多中药复方制剂和配方颗粒中，甘草常作为“佐剂”用于调和药性，很多以醇提液作为药液进一步处理加工成制剂，此种加工工艺与传统的汤剂水煎工艺相左，势必会引起化学成分的变化进而影响药效，与此同时，已有大量文献已报道甘草含多种化学成分，主要为三萜类和黄酮类化合物^[10-11]，此外还含有香豆素类、生物碱、多糖等多种成分^[12]，这些成分的溶解性有较大差异，不同提取液所含化学成分肯定也会存在较大差异，提示有必要对甘草不同提取液所含化学成分差异进行深入研究。

在前期利用 HPLC 法同时测定多种甘草有效成分用于甘草质控的基础上，本研究采用评价更为整体全面、中药质量评价最为成熟的 HPLC 指纹图谱法，对不同产地甘草的水提液和醇提液进行系统分析，并通过指纹图谱相似度评价和层次聚类分析，以探究气候环境、土壤条件等产地因素及提取加工工艺对甘草品质的影响，以期为甘草质量标准研究及提取加工工艺的优化提供理论依据和指导，为临床用药方法的选择提供一定的科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

岛津 CBM-20A 高效液相色谱（四元泵、自动进样器、柱温箱、PDA 检测器）；AB135-S 型十万分之一电子分析天平（德国 Mettler Toledo 公司）；Cascade 超纯水仪（美国 Pall 公司）；KQ-300B 超声波清洗器；中药色谱指纹图谱相似度评价系统（国家药典委员会，版本 2004A）。

1.2 材料

乙腈（色谱纯），磷酸（分析纯，CAS7664-38-2）；水为超纯水；对照品甘草酸（批号 17032205，质量分数≥99.55%）；芹糖异甘草苷（批号 PRF7061501，质量分数≥98.00%）；芹糖甘草苷（批号 PRF8022729，质量分数≥98.00%）；甘草苷（批号 17030801，质量分数 98.50%）；异甘草苷（批号 17031204，质量分数≥99.99%）；甘草素（批号 17022104，质量分数≥99.07%）；甘草查耳酮 B（批号 17030804，质量分数≥99.74%）；编号 S1~S10 的甘草药材，分别来自内蒙、新疆、甘肃，经安徽中医药大学俞年军教授鉴定为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.。样品信息见表 1。

表 1 样品来源信息表

Table 1 Sample source information

编号	样品名称	来源
S1	甘草	甘肃兰州
S2	甘草	甘肃兰州
S3	甘草	甘肃兰州
S4	甘草	新疆库尔勒
S5	甘草	新疆库尔勒
S6	甘草	新疆库尔勒
S7	甘草	内蒙古赤峰
S8	甘草	内蒙古赤峰
S9	甘草	内蒙古赤峰
S10	甘草	内蒙古通辽

2 方法与结果

2.1 色谱条件

2.1.1 甘草水提液色谱条件 色谱柱为 SinoChrom ODS-BP C₁₈（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为乙腈（A）-0.05%磷酸水溶液（B），梯度洗脱：0~

11 min, 85%~78% B; 11~23 min, 78%~76% B; 23~26 min, 76%~73% B; 26~29 min, 73% B; 29~37 min, 73%~70% B; 37~60 min, 70%~54% B; 60~66 min, 54%~50% B; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 237 nm; 进样体积 20 μ L。

2.1.2 甘草醇提液色谱条件 色谱柱为 SinoChrom ODS-BP C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈 (A)-0.1%磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱: 0~5 min, 80%~70% B; 5~8 min, 70%~65% B; 8~18 min, 65%~50% B; 18~25 min, 50%~40% B; 25~30 min, 40%~30% B; 30~35 min, 30%~20% B; 35~40 min, 20%~40% B; 40~43 min, 40%~50% B; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 237 nm; 进样体积 20 μ L。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液的制备 (1) 水提液: 取甘草药材 (切成小段) 25 g, 精密称定, 先加 18 倍量水煎煮 2 h, 倒出煎煮液, 再加 12 倍量水煎煮 1 h, 倒出煎煮液, 2 次煎煮液合并浓缩至质量浓度为 0.1 g/mL, 滤过, 取续滤液, 即得。(2) 醇提液: 精密称取甘草药材 (过三号筛) 2 g 置于 50 mL 量瓶中, 加入 70%乙醇溶液定量, 密塞, 称定质量, 超声 30 min (功率 500 W, 频率 40 kHz), 取出放至室温, 称定质量, 用 70%乙醇补足损失质量, 用 0.22 μ m 滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取各蔗糖甘草苷、蔗糖异甘草苷、甘草苷、异甘草苷、甘草酸、甘草素、甘草查耳酮 B 对照品适量, 分别加入 70%乙醇溶解至 1 mg/mL, 即得单个对照品溶液。分别取各对照品溶液适量于同一量瓶中, 加入 70%乙醇定量至含各对照品 20 μ g/mL 的混合对照品溶液。

2.3 指纹图谱的建立

2.3.1 精密度试验 取同一批 (S1) 甘草样品, 按“2.2.1”项下制备甘草水提液和醇提液, 分别按“2.1.1”和“2.1.2”项下色谱条件连续进样 6 次, 测定甘草水提液和醇提液指纹图谱。结果以 1 号峰的保留时间和峰面积为参照, 计算样品中所含共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积。各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.5%, 相对峰面积 RSD 均小于 3.0%, 表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验 取编号 S1 的甘草样品 6 份, 按“2.2.1”项下制备甘草水提液和醇提液, 分别按“2.1.1”和“2.1.2”项下色谱条件进样, 记录色谱

峰。结果以 1 号峰的保留时间和峰面积为参照, 计算样品中所含共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积。各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.35%, 相对峰面积 RSD 均小于 2.5%。

2.3.3 稳定性试验 取同一批 (S1) 甘草样品, 按“2.2.1”项下制备甘草水提液和醇提液, 分别按“2.1.1”和“2.1.2”项下色谱条件在 0、2、4、8、12、24 h 测定指纹图谱, 记录色谱峰。结果以 1 号峰的保留时间和峰面积为参照, 计算样品中所含共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积。各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 1.3%, 相对峰面积 RSD 均小于 3.0%。

2.3.4 指纹图谱的建立及部分共有峰的指认 取 10 批甘草 (S1~S10), 按“2.2.1”项下制备甘草水提液和醇提液, 按照“2.2.2”项下制备甘草苷、甘草酸、甘草素、异甘草苷、蔗糖甘草苷、蔗糖异甘草苷、甘草查耳酮 B 的混合对照品溶液进样, 分别按“2.1.1”和“2.1.2”项下色谱条件进行测定。建立水提液和醇提液指纹图谱对照图谱 (图 1)。

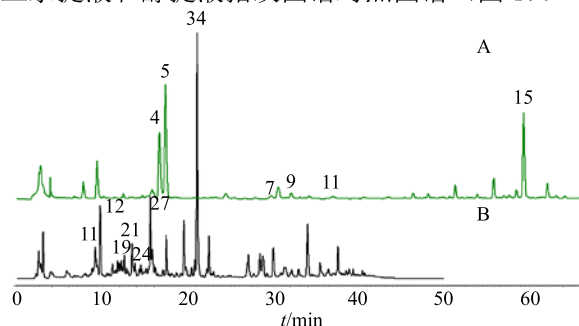
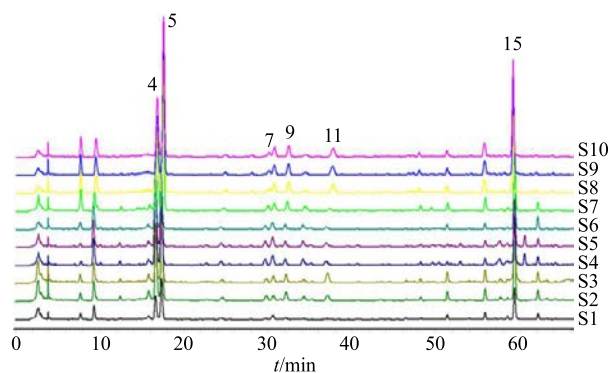


图 1 甘草水提液 (A) 和醇提液 (B) 对照图谱

Fig. 1 Chromatogram of fingerprint of water extracts (A) and ethanol extracts (B) of *G. uralensis*

根据水提液指纹图谱峰的保留时间, 确定了 16 个共有峰, 并指认出 6 种成分 (图 2), 分别为蔗糖甘草苷 (4 号峰)、甘草苷 (5 号峰)、蔗糖异甘草苷 (7 号峰)、异甘草苷 (9 号峰)、甘草素 (11 号峰)、甘草酸 (15 号峰); 根据醇提液指纹图谱峰的保留时间, 确定了 60 个共有峰, 并指认出 7 种成分 (图 3), 分别为蔗糖甘草苷 (11 号峰)、甘草苷 (12 号峰)、蔗糖异甘草苷 (19 号峰)、异甘草苷 (21 号峰)、甘草查耳酮 B (24 号峰)、甘草素 (27 号峰)、甘草酸 (34 号峰)。

2.3.5 指纹图谱相似度 (S) 评价 采用国家药典委员会发行的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012A 版》对 10 批甘草的水提液和醇提液指纹图



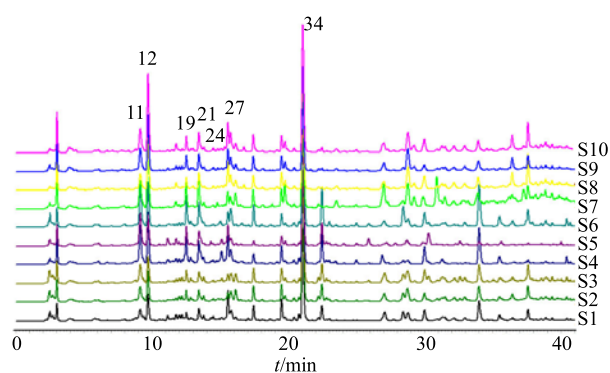
4-芹糖甘草苷 5-甘草苷 7-芹糖异甘草苷 9-异甘草苷 11-甘草素 15-甘草酸
4-celery glycyrrhizin 5-glycyrrhizin 7-celyl isoglycyrrhizin 9-isoglycoside 11-glycyrrhizin 15-glycyrrhizic acid

图 2 甘草水提液指纹图

Fig. 2 Chromatogram of fingerprint of water extracts of *G. uralensis*

谱进行相似度分析 (表 2、3)。结果显示, 水提液指纹图谱相似度较低 (0.030~0.999), 而醇提液指纹图谱相似度均大于 0.85。

2.3.6 指纹图谱层级聚类分析 甘草水提液和醇提液层次聚类分析结果显示, 10 批甘草水提液分为 2 个主要聚类, 内蒙产甘草分为 I 类, 其中 S7、S8、



11-芹糖甘草苷 12-甘草苷 19-芹糖异甘草苷 21-异甘草苷 24-甘草查耳酮 B 27-甘草素 34-甘草酸
11-celin glycyrrhizin 12-glycyrrhizin 19-celylglyisogluco side 21-isoglycyrrhizin 24-licorice chalcone B 27-glycyrrhizin 34-glycyrrhizic acid

图 3 甘草醇提液指纹图谱

Fig. 3 Chromatogram of fingerprint of ethanol extracts of *G. uralensis*

S10 为一组, S9 为一组; 新疆和甘肃产甘草分为 II 类, S1、S4、S5、S6 为一组, S2、S3 为一组 (图 4); 醇提液同样分为 2 个主要聚类, 其中 S10 为 I 类, S1~S9 为 II 类, 且其中内蒙产甘草 S7、S8、S9 分为一组 (图 5)。

表 2 10 批样品水提液指纹图谱的相似度

Table 2 Similarity of water extract fingerprint of 10 batches of samples

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
S1	1.000									
S2	0.959	1.000								
S3	0.967	0.981	1.000							
S4	0.918	0.890	0.936	1.000						
S5	0.357	0.404	0.327	0.255	1.000					
S6	0.953	0.954	0.963	0.954	0.374	1.000				
S7	0.034	0.029	0.025	0.016	0.643	0.024	1.000			
S8	0.208	0.220	0.177	0.137	0.888	0.197	0.815	1.000		
S9	0.915	0.884	0.930	0.876	0.232	0.904	0.033	0.127	1.000	
S10	0.035	0.030	0.025	0.016	0.640	0.024	0.999	0.813	0.033	1.000

表 3 10 批样品醇提液指纹图谱的相似度

Table 3 Similarity of ethanol extract fingerprint of 10 batches of samples

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
S1	1.000									
S2	0.967	1.000								
S3	0.960	0.988	1.000							
S4	0.952	0.935	0.935	1.000						
S5	0.910	0.921	0.919	0.940	1.000					
S6	0.955	0.963	0.960	0.973	0.933	1.000				
S7	0.899	0.938	0.923	0.871	0.851	0.889	1.000			
S8	0.933	0.958	0.937	0.885	0.883	0.904	0.947	1.000		
S9	0.934	0.963	0.938	0.912	0.915	0.926	0.948	0.976	1.000	
S10	0.924	0.947	0.924	0.889	0.879	0.902	0.945	0.982	0.978	1.000

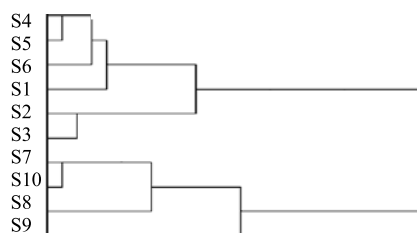


图 4 10 批不同产地甘草水提液指纹图谱层次聚类分析

Fig. 4 Hierarchical cluster analysis of water extractd of 10 batches *G. uralensis* from different habitats

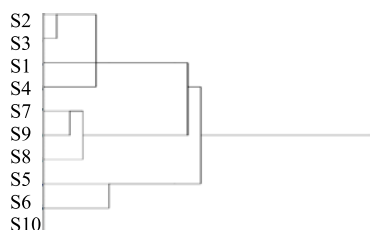


图 5 10 批不同产地甘草醇提液指纹图谱层次聚类分析

Fig. 5 Hierarchical cluster analysis of ethanol extracts of 10 batches *G. uralensis* from different habitats

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

实验中分别考察了乙腈-0.05%磷酸水溶液、乙腈-0.10%磷酸水溶液和乙腈-0.10%甲酸水溶液流动相系统,结果表明乙腈-0.05%磷酸水溶液和乙腈-0.10%磷酸水溶液系统能达到较好的分离。考虑到中药材在临床上多以煎煮的形式用药,故水提液选择了煎煮法,而醇提方法采用传统中药材现代提取加工常用的超声提取法。实验采用 DAD 检测器进行全波长分析,发现在 230 nm 波长下,基线较平稳,且分离度好,所得共有峰多,故最终选用 230 nm。

3.2 色谱峰指认结果分析

由 10 批甘草水提液和醇提液指纹图谱结果可知,水提液共确定了 16 个共有峰,并指认出 6 种成分,而醇提液共确定了 60 个共有峰,并指认出 7 种成分(图 3),从指纹图谱谱峰信息不难发现,不同提取方式所得提取液其提取成分种类存在显著差异,结合指认的成分进一步分析不难发现,水溶性差的甘草查耳酮 B 通过传统的水煎法难以使其溶出,提示提取方式对中药有效成分的溶出有非常明显的影响。

3.3 相似度结果分析

3 个地区的数据综合分析发现,相较于醇提

液相似度均大于 0.85,甘草水提液相似度较低。对新疆、甘肃、内蒙古 3 个地区甘草水提液指纹图谱进行单独分析,各地区相似度不低于 0.948、0.954 和 0.959,表明建立的指纹图谱方法是合理的。基于甘草水提液相似度较差的原因分析,认为是内蒙产甘草其水溶性成分与新疆、甘肃产地有较大差异导致,提示产地环境、土壤等自然条件会对中药材质量产生明显影响;同时,相同中药材的醇提物指纹图谱呈现出更高的相似度,笔者分析与以下原因有关:其一,醇提物指纹图谱共确定 60 个共有峰,更多的共有峰信息可能弱化了由单一的某个或某几个成分含量上差异对相似度所造成的影响;其二,通过水煎能充分溶出的水溶性物质采用醇提的方式并不能使其完全溶出,该结果也揭示了在中药复方制剂提取工艺设计阶段应充分结合各药材的有效组分和功效筛选最优提取工艺的必要性。当然,该研究采用相对模糊的指纹图谱、有限的指认峰信息比较不同提取方式对提取液成分的影响,尚难窥其全貌,但是此研究结果为后续采用 Q-TOF-MS 等全通量、高灵敏度的分析手段进行更为全面、深入分析提供了理论支持。

3.4 层次聚类分析结果

通过层次聚类分析,笔者进一步验证了内蒙药材与新疆、甘肃药材之间的差异。10 批甘草水提液和醇提液均分为 2 个主要聚类,内蒙古产甘草与新疆、甘肃产甘草实现了有效的分离,且不同提取条件下获取的不同数据进一步实现了交互验证,确证了产地差异对甘草药材质量的显著影响。基于甘草的产地历史变迁,原始主产地内蒙古甘草其质量有别于甘肃、新疆产甘草,此结果同时也侧面证实了道地药材的科学内涵和必要性。

本研究建立了甘草水提液和醇提液 HPLC 指纹图谱方法,并对 10 批甘草样品进行了相似度评价和层次聚类分析。建立的水提液和醇提液指纹图谱均能够较好地将原始产地内蒙产甘草与新疆、甘肃产甘草予以区分。水提液和醇提液的指纹图谱相似性分析和层次聚类分析结果充分说明产地的不同对甘草的内在品质产生较为明显的影响,此外,不同提取工艺所提取的有效成分是有差异的,这可能会进一步影响其药效。因此,在中药道地药材研究及后续产品开发、临床应用过程中,应重点关注产地气候环境、提取工艺对药材和复方制剂内在品质的影响。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 尚志钧辑校. 本草经集注 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994.
- [3] 张 鹏, 杨 杰, 高 翔, 等. 黄酮类化合物抗炎作用及其作用机制研究进展 [J]. 畜牧与兽医, 2018, 50(2): 134-137.
- [4] 张 敏, 李晶晶. 甘草黄酮类化合物对 CDK1 的抑制活性及体内外抗肝癌活性 [J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(1): 72-78.
- [5] 卓立宏, 黄群增, 郭应臣. 铜铁甘草酸配合物的合成及其抗氧化活性研究 [J]. 化学研究与应用, 2008, 20(7): 869-871.
- [6] 刘冬羽. 甘草总黄酮及甘草查尔酮 A 对溃疡性结肠炎的治疗作用及其分子机制研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2016.
- [7] 管 燕, 谢强敏. 甘草黄酮对肺部炎症小鼠细胞因子表达和氧化反应的调节作用 [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1254-1259.
- [8] 何 璐, 王 勇, 吕跃东, 等. 甘草黄酮的提取分离及抗菌活性研究 [J]. 湖北农业科学, 2008, 47(2): 217-219.
- [9] 汪河滨, 罗 锋, 万 英, 等. 新疆光果甘草 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中成药, 2008, 30(10): 1412-1414.
- [10] Al-Hazimi H M A, Al-Jaber N A. Phenolic compounds from *Glycyrrhiza* plants (Leguminosae) review article I [J]. *J Saudi Chem Soc*, 2005, 9(2): 347-356.
- [11] 崔永明. 甘草黄酮的分离鉴定、药效及其指纹图谱研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2008.
- [12] Zhang Q, Ye M. Chemical analysis of the Chinese herbal medicine Gan-Cao (licorice) [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(11): 1954-1962.