

• 药剂与工艺 •

基于 HPLC 指纹图谱及多成分一测多评法定量的炙甘草饮片质量评价研究

裴玉琼¹, 石海培¹, 严辉¹, 黄胜良², 董伟², 汪国强², 包贝华^{1,3*}, 张丽^{1,3}

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023

2. 江苏融昱药业有限公司, 江苏 淮安 223001

3. 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心/中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心, 江苏 南京 210023

摘要: **目的** 建立新生化颗粒原料优质炙甘草饮片质量评价方法。**方法** 采用 HPLC 法建立优质炙甘草饮片指纹图谱; 采用一测多评法同时测定炙甘草饮片中 6 种有效成分(甘草苷、异甘草苷、甘草酸、甘草素、蔗糖甘草苷、蔗糖异甘草苷)的含量, 通过与外标法进行比较, 以确证一测多评法的可行性和科学性。**结果** 以基地收集与市售共计 30 批炙甘草饮片为研究对象, 建立了炙甘草饮片 HPLC 指纹图谱, 确定了 14 个共有峰, 对 7 个共有峰进行了化学成分确认, 并以共有峰的相对保留时间及部分共有峰的相对峰面积比值作为评价指标区分优质饮片与统货饮片; 建立了多成分一测多评定量方法, 以甘草苷(S1)、甘草酸(S2)为内参物, 得到异甘草苷的相对校正因子($f_{S1/A}$)平均值为 0.502、蔗糖甘草苷的相对校正因子($f_{S2/A}$)平均值为 0.578、蔗糖异甘草苷的相对校正因子($f_{S2/B}$)平均值为 0.252, 甘草素的相对校正因子($f_{S2/C}$)平均值为 0.257, 为新生化颗粒原料优质炙甘草饮片制定了更加完善的质量控制指标。**结论** 建立的方法可用于新生化颗粒原料炙甘草饮片的质量评价。

关键词: 炙甘草饮片; HPLC; 一测多评法; 指纹图谱; 质量评价; 甘草苷; 异甘草苷; 甘草酸; 甘草素; 蔗糖甘草苷; 蔗糖异甘草苷; 相对校正因子

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)18-4293-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.18.007

Quality evaluation of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Praeparata Cum Melle* based on HPLC fingerprint and multi-component quantitative analysis by QAMSPEI Yu-qiong¹, SHI Hai-pei¹, YAN Hui¹, HUANG Sheng-liang², DONG Wei², WANG Guo-qiang²,
BAO Bei-hua^{1,3}, ZHANG Li^{1,3}

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Rongyu Pharmaceutical Co., Ltd., Huaian 223001, China

3. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To establish the quality control method for high-quality *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Praeparata Cum Melle* (GRRPM) in Xinshenghua Granules (XG). **Methods** The HPLC fingerprint analysis method for high-quality GRRPM was developed. The method of quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) for simultaneously determining the six active constituents (liquiritin, isoliquiritin, glycyrrhizic acid, liquiritigenin, liquiritin apioside, and isoliquiritin apioside) was developed and

收稿日期: 2019-05-29

基金项目: 国家中药标准化项目“新生化颗粒标准化建设”(ZYBZH-C-JS-34)

作者简介: 裴玉琼(1982—), 女, 江苏阜宁人, 实验师, 硕士学位, 主要从事中药分析与质量标准研究工作。

Tel: 13915926263 E-mail: peiyuqiong@126.com

*通信作者 包贝华(1978—), 男, 江苏句容人, 硕士学位, 副教授, 主要从事中药分析与质量标准研究工作。

Tel: (025)85811519 E-mail: scotter01@163.com

evaluated by comparison of the quantitative results with external standard method. **Results** The fingerprints of GRRPM were established by HPLC from 30 batches. Fourteen peaks were acquired as common fingerprint peaks and seven peaks among them were identified with chemical reference. The relative retention time of common peaks and the peak area ratio of some common peaks were used to differentiate high-quality products from general products as indicators for fingerprint evaluation. With liquiritin and glycyrrhizic acid as internal standards, QAMS was developed and the mean relative correlation factors (RCFs) of isoliquiritin, liquiritigenin, liquiritin apioside, and isoliquiritin apioside were 0.502, 0.578, 0.252, and 0.257, respectively. The specifications of high-quality GRRPM were established for XG. **Conclusion** These methods could be used for quality control of high-quality GRRPM of XG.

Key words: *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Praeparata Cum Melle*; HPLC; quantitative analysis of multi-components by single-marker; fingerprint; quality control; liquiritin; isoliquiritin; glycyrrhizic acid; liquiritigenin; liquiritin apioside; isoliquiritin apioside; relative correlation factors

甘草是著名常见中药,为 40 种常见大宗药材品种之一,临床上有“十方九草”之说,在本草古籍中,甘草首载于《神农本草经》,列为上品,在两汉时期甘草已广泛应用于临床。炙甘草为甘草的炮制加工品,具有补脾和胃、益气复脉等功效,亦广泛用于各方剂^[1-2]。现代研究表明,甘草中的主要有效成分包括三萜皂苷类(甘草酸、甘草次酸等)、黄酮类(甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素等)^[3]、多糖类,同时还含有香豆素类、生物碱、氨基酸等。多种活性成分使甘草具有抗炎^[4]、抗氧化^[5]、抗肝损伤^[4,6-9]、抗病毒^[10]、抗肿瘤^[11]、免疫调节^[12]、抗糖尿病^[13]等多种药理作用。鉴于甘草的广阔市场前景,研究甘草的技术方法也在日益多元化。李文斌等^[14]依据国内甘草种质主要的形态和化学成分,计算其遗传多样性和变异系数,运用聚类分析和主成分分析进行统计分析,筛选品质优异的甘草种质。包芳等^[15]通过总结代谢组学在甘草的基原鉴定、炮制、药理和生态因子的研究进展,全面揭示了甘草作为常用中药材在各领域的多方面应用。

新生化颗粒来源于清代傅青山的妇科名著《傅青主女科》的“生化汤”,组方为当归、川芎、桃仁、炙甘草、干姜炭、益母草、红花,具有活血、祛瘀、止痛的功效,用于产后恶露不行、少腹疼痛、月经过多等病症,历来被称为“产后第一方”。新生化颗粒原料优质炙甘草饮片标准,是直接影响新生化制剂的优质均一性。

《中国药典》2015 年版炙甘草质量标准含量测定项下仅对甘草苷、甘草酸进行限定,指标较为单薄,无法全面评价饮片的质量优劣^[16]。周倩等^[17]建立了 HPLC 法测定生甘草、炙甘草中 5 个黄酮(甘草素葡萄糖苷、甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素)和 1 个三萜类(甘草酸铵)成分的含量。邓哲等^[18]采用中药质量常数评价方法对炙甘草饮

片等级进行了研究。任晓航等^[19]优化甘草微型饮片切制工艺,并以甘草苷、甘草酸、甘草素、甘草次酸、异甘草素、查耳酮的含有量为评价指标建立了甘草微型饮片 UPLC 指纹图谱。但结合对新生化颗粒的指纹图谱中炙甘草成分鉴别研究表明^[20],这些方法指标不能完全适用于新生化颗粒原料饮片的质量分析,故根据前期研究基础选择优质甘草药材,生产炙甘草饮片,以基地收集与市售共计 30 批饮片为研究对象,建立了一测多评法同时测定炙甘草中 6 种成分(甘草苷、异甘草苷、甘草酸、甘草素、芹糖甘草苷、芹糖异甘草苷)的方法及指纹图谱评价方法,从而保证新生化颗粒品质,该研究结果对促进新生化颗粒标准体系提质增效,推动新生化颗粒标准化进程具有重要意义。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters e2695 型高效液相色谱仪, 2998PDA 型紫外检测器,美国 Waters 公司; BP211D 型电子天平,赛多利斯科学仪器有限公司; Anke TGL-16B 离心机,上海安亭科学仪器厂; KH-500DB 型数控超声波清洗器,昆山禾创超声仪器有限公司; XFB-200 型高速中药粉碎机,吉首市中诚制药机械厂。

1.2 试剂

对照品芹糖甘草苷(批号 JBZ180106-139)、芹糖异甘草苷(批号 JBZ180205-813)、异甘草苷(批号 JBZ180314-015)、甘草素(批号 JBZ0431),均购自南京金益柏生物科技有限公司,经 HPLC 分析,质量分数 $\geq 98\%$;对照品甘草苷(批号 111610-201607,质量分数 93.1%)、甘草酸铵(批号 110731-201619,质量分数 93.0%),中国食品药品检定研究院。乙腈,色谱纯,美国 Tedia 公司;甲醇,色谱纯,江苏汉邦科技有限公司;超纯水,Milli-Q 超纯水系统制备。

1.3 饮片

15 批 (S1~S15) 基地炙甘草饮片 (甘草药材产地为鄂尔多斯) 均由江苏融昱药业有限公司提供, 该 15 批炙甘草饮片经南京中医药大学严辉副教授鉴定为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的根及根茎蜜炙而成, 15 批 (S16~S30) 市售炙甘草饮片均购自安徽亳州药材市场。

2 指纹图谱的建立及共有峰确定

2.1 色谱条件

色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.2%甲酸水溶液; 梯度洗脱: 0~3 min, 5%~15%乙腈; 3~20 min, 15%~21%乙腈; 20~22 min, 21%~25%乙腈; 22~40 min, 25%~40%乙腈; 40~60 min, 40%~95%乙腈; 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长: 2998 型二极管阵列 PDA (210~400 nm) 的最大值; 进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取蔗糖甘草苷、甘草苷、蔗糖异甘草苷、异甘草苷、甘草素、甘草酸铵各对照品适量, 加甲醇配制成质量浓度分别为 57.000、125.192、18.702、27.785、15.670、253.332 μg/mL 的混合对照品溶液 (甘草酸质量=甘草酸铵质量/1.020 7)。

2.3 供试品溶液的制备

取本品粉末 (过三号筛) 约 0.2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入纯水 50 mL, 密塞, 称定质量, 80 ℃水浴中温浸 60 min, 超声处理 (功率 300 W, 频率 40 kHz) 10 min, 放冷, 再称定质量, 用纯水补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 精密吸取 S3 供试品溶液 10 μL, 连续进样 6 次, 以 13 号峰 (甘草酸) 为参照峰, 计算其他共有峰的相对保留时间 (RRT)、相对峰面积 (RA) 比值的 RSD, 结果见表 1, 表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 精密吸取 S3 供试品溶液 10 μL, 分别于制备后的 0、4、8、12、16、24 h 进样测定, 同“2.4.1”项下方法分析, 结果见表 1, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 称取 6 份 S3 样品粉末, 每份约 0.2 g, 精密称定, 按照“2.3”项下方法制备供试品溶液 6 份, 各精密吸取 10 μL 进样测定, 同“2.4.1”

表 1 共有峰 RRT 和 RA 的精密度、稳定性、重复性试验结果

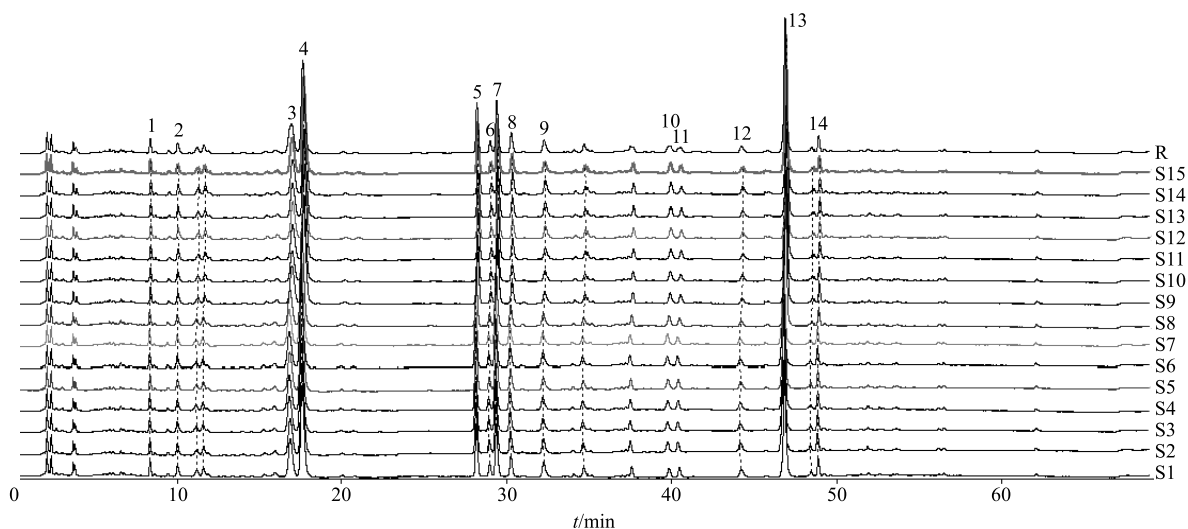
Table 1 RRT and RPA results of precision, stability and reproducibility test for common peaks

共有峰号	精密度 RSD/%		稳定性 RSD/%		重复性 RSD/%	
	RRT	RA	RRT	RA	RRT	RA
1	0.22	1.28	0.15	1.78	0.18	1.74
2	0.21	1.52	0.12	1.60	0.14	1.43
3	0.32	1.79	0.20	1.91	0.27	3.17
4	0.29	2.67	0.18	3.40	0.24	3.68
5	0.10	1.28	0.06	0.48	0.08	0.52
6	0.09	1.19	0.06	1.70	0.07	1.38
7	0.10	0.33	0.07	0.54	0.07	1.10
8	0.09	1.48	0.06	1.17	0.06	2.61
9	0.09	1.12	0.07	1.26	0.07	2.52
10	0.05	3.40	0.04	3.25	0.04	2.22
11	0.05	1.80	0.05	2.76	0.03	3.13
12	0.04	1.00	0.04	1.78	0.04	2.94
13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
14	0.02	0.81	0.03	0.49	0.02	1.44

项下方法进行分析, 结果见表 1, 表明该方法重复性较好。

2.5 炙甘草饮片指纹图谱分析

2.5.1 HPLC 指纹图谱的建立 分别取 30 批炙甘草样品, 按照“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.1”项下色谱条件测定。将色谱数据以 AIA 格式导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统” (2012 版) 软件, 对照图谱采用中位数法生成, 使用多点校正对色谱峰进行匹配, 生成基地样品、市售全谱峰匹配图, 分别见图 1、2, 生成的对照指纹图谱 (R) 比较, 见图 3。图 1 中的优质饮片的对照图谱, 其中与甘草酸 (峰 13) 参照物峰保留时间对应的峰为 S 峰, 优质炙甘草饮片与统货饮片分别在相对保留时间为 0.178 (峰 1)、0.214 (峰 2)、0.361 (峰 3)、0.376 (峰 4)、0.601 (峰 5)、0.618 (峰 6)、0.627 (峰 7)、0.646 (峰 8)、0.688 (峰 9)、0.850 (峰 10)、0.863 (峰 11)、0.943 (峰 12)、1.000 (峰 13)、1.042 (峰 14) 左右处呈现 14 个共有峰。经与对照品比对, 指认了 7 个共有峰, 3 号峰 (16.0 min) 为蔗糖甘草苷, 4 号峰 (16.1 min) 为甘草苷, 5 号峰 (26.6 min) 为蔗糖异甘草苷, 7 号峰 (27.8 min) 为异甘草苷, 9 号峰 (30.5 min) 为甘草素, 12 号峰 (41.7 min) 为异甘草素, 13 号峰 (44.2 min) 为甘草酸。



3-芹糖甘草苷 4-甘草苷 5-芹糖异甘草苷 7-异甘草苷 9-甘草素 12-异甘草素 13-甘草酸, 图2、3 同

3-liquiritin apioside 4-liquiritin 5-isoliquiritin apioside 7-isoliquiritin 9-liquiritigenin 12-isoliquiritin 13-glycyrrhizic acid, same as Fig. 2, 3

图1 15批基地优质炙甘草饮片的指纹图谱 (S1~S15) 及其对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 HPLC fingerprint of 15 batches of high-quality prepared licorice pieces from base (S1—S15) and its reference fingerprint (R)

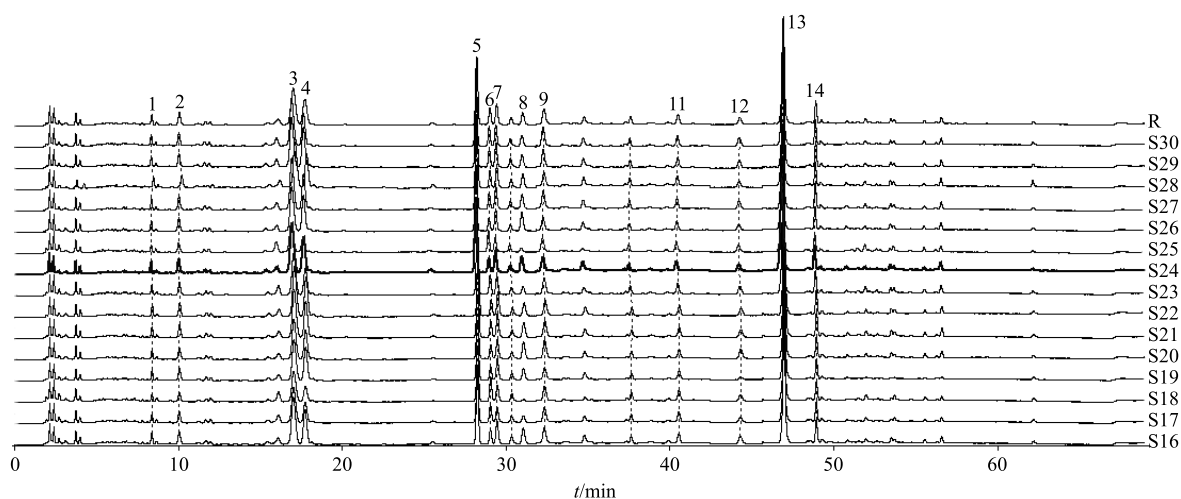


图2 15批市售统货炙甘草饮片的指纹图谱 (S16~S30) 及其对照指纹图谱 (R)

Fig. 2 HPLC fingerprint of 15 batches of commercial licorice pieces (S16—S30) and reference fingerprint (R)

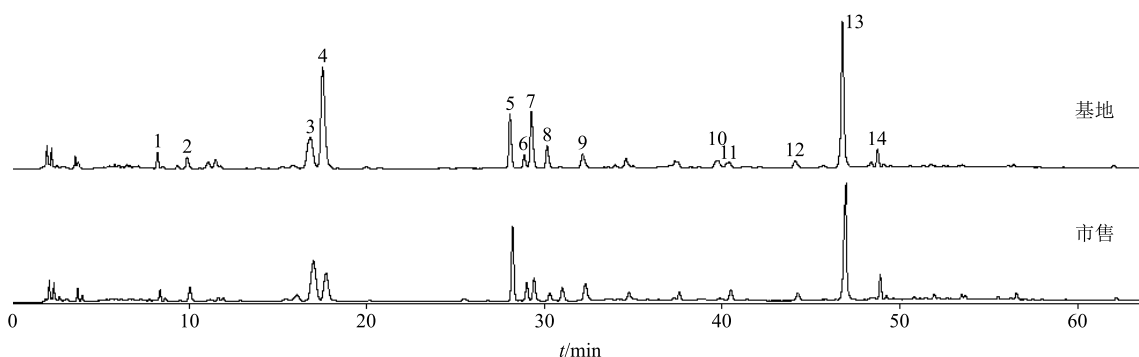


图3 生成的基地炙甘草饮片、市售炙甘草饮片指纹图谱比较

Fig. 3 Comparison of HPLC fingerprint of high-quality licorice pieces from base and commercial licorice pieces

2.5.2 相似度评价及共有峰比值分析 15 批优质 得到 30 批样品与对照指纹图谱的相似度分别为样品共有峰保留时间和峰面积 RSD 见表 2、3，市 0.997、0.995、0.986、0.992、0.989、0.985、0.995、售样品信息见表 4、5。以 S1 样品图谱为参考图谱， 0.983、0.979、0.991、0.988、0.989、0.986、0.992、

表 2 15 批基地优质炙甘草饮片共有峰 RRT 及其 RSD

Table 2 RRT and RSD of common peaks of 15 batches of high-quality prepared licorice pieces

编号	共有峰 RRT													
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13	峰 14
S1	0.178	0.214	0.360	0.376	0.601	0.618	0.627	0.646	0.688	0.850	0.863	0.944	1.000	1.042
S2	0.178	0.214	0.360	0.376	0.601	0.618	0.627	0.646	0.689	0.849	0.863	0.944	1.000	1.043
S3	0.178	0.214	0.359	0.375	0.601	0.618	0.626	0.645	0.688	0.849	0.862	0.943	1.000	1.043
S4	0.178	0.214	0.359	0.375	0.600	0.617	0.626	0.645	0.688	0.849	0.862	0.943	1.000	1.043
S5	0.178	0.214	0.360	0.375	0.601	0.618	0.627	0.646	0.688	0.849	0.863	0.943	1.000	1.043
S6	0.178	0.214	0.359	0.375	0.601	0.618	0.627	0.645	0.688	0.849	0.862	0.944	1.000	1.043
S7	0.178	0.214	0.359	0.375	0.600	0.618	0.626	0.645	0.688	0.849	0.862	0.944	1.000	1.043
S8	0.177	0.213	0.359	0.375	0.600	0.617	0.626	0.645	0.687	0.849	0.863	0.942	1.000	1.042
S9	0.178	0.214	0.362	0.377	0.602	0.619	0.627	0.646	0.689	0.850	0.863	0.943	1.000	1.042
S10	0.178	0.214	0.362	0.377	0.601	0.619	0.627	0.646	0.688	0.850	0.863	0.944	1.000	1.042
S11	0.179	0.214	0.362	0.378	0.602	0.619	0.627	0.646	0.689	0.850	0.863	0.943	1.000	1.042
S12	0.179	0.214	0.362	0.378	0.602	0.619	0.627	0.646	0.689	0.850	0.864	0.943	1.000	1.042
S13	0.179	0.214	0.362	0.378	0.601	0.618	0.627	0.646	0.688	0.850	0.863	0.943	1.000	1.042
S14	0.179	0.214	0.362	0.378	0.602	0.619	0.627	0.646	0.689	0.850	0.864	0.943	1.000	1.042
S15	0.179	0.214	0.362	0.378	0.602	0.619	0.627	0.646	0.689	0.850	0.864	0.943	1.000	1.042
RSD/%	0.23	0.11	0.38	0.32	0.10	0.09	0.09	0.07	0.06	0.07	0.07	0.03	0.00	0.04

表 3 15 批基地优质炙甘草饮片共有峰 RA 及其 RSD

Table 3 RA and RSD of common peaks of 15 batches of high-quality prepared licorice pieces

编号	共有峰 RA													
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13	峰 14
S1	0.073	0.074	0.438	0.934	0.341	0.083	0.357	0.149	0.132	0.081	0.072	0.074	1.000	0.105
S2	0.071	0.074	0.425	0.960	0.331	0.082	0.378	0.161	0.134	0.082	0.073	0.071	1.000	0.101
S3	0.072	0.074	0.431	0.955	0.342	0.082	0.368	0.158	0.126	0.082	0.069	0.068	1.000	0.102
S4	0.074	0.077	0.436	0.940	0.384	0.081	0.366	0.149	0.130	0.082	0.074	0.068	1.000	0.107
S5	0.070	0.072	0.457	0.969	0.334	0.084	0.375	0.159	0.117	0.084	0.070	0.067	1.000	0.103
S6	0.071	0.075	0.428	0.937	0.331	0.083	0.366	0.152	0.131	0.079	0.076	0.069	1.000	0.103
S7	0.076	0.078	0.444	1.068	0.332	0.073	0.414	0.155	0.112	0.101	0.064	0.058	1.000	0.091
S8	0.070	0.074	0.428	1.017	0.320	0.074	0.400	0.158	0.119	0.086	0.065	0.052	1.000	0.096
S9	0.072	0.075	0.428	1.000	0.322	0.077	0.385	0.150	0.114	0.088	0.070	0.047	1.000	0.096
S10	0.076	0.082	0.441	1.072	0.334	0.072	0.419	0.148	0.119	0.092	0.061	0.068	1.000	0.090
S11	0.074	0.076	0.427	1.005	0.327	0.079	0.387	0.151	0.114	0.088	0.067	0.045	1.000	0.097
S12	0.074	0.075	0.433	0.966	0.327	0.077	0.373	0.153	0.119	0.091	0.066	0.062	1.000	0.098
S13	0.070	0.073	0.418	0.973	0.318	0.078	0.382	0.142	0.135	0.086	0.064	0.057	1.000	0.097
S14	0.073	0.071	0.418	1.054	0.321	0.073	0.427	0.158	0.121	0.090	0.055	0.072	1.000	0.089
S15	0.073	0.070	0.447	1.025	0.334	0.077	0.403	0.147	0.104	0.092	0.063	0.053	1.000	0.094
RSD/%	2.78	3.76	2.49	4.75	4.69	5.22	5.53	3.51	7.52	6.62	8.13	15.09	0.00	5.64

表 4 15 批市售炙甘草饮片共有峰 RRT 及其 RSD

Table 4 RRT and RSD of common peaks of commercial prepared licorice pieces

编号	共有峰 RRT													
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13	峰 14
S16	0.178	0.214	0.362	0.377	0.601	0.618	0.627	0.646	0.689	0.000	0.863	0.943	1.000	1.042
S17	0.178	0.214	0.362	0.378	0.601	0.618	0.627	0.646	0.689	0.000	0.863	0.944	1.000	1.042
S18	0.178	0.214	0.363	0.378	0.602	0.619	0.627	0.646	0.689	0.850	0.863	0.943	1.000	1.042
S19	0.179	0.214	0.363	0.378	0.601	0.619	0.627	0.646	0.689	0.000	0.863	0.943	1.000	1.042
S20	0.179	0.214	0.363	0.378	0.601	0.618	0.627	0.646	0.689	0.000	0.863	0.943	1.000	1.042
S21	0.179	0.214	0.363	0.378	0.602	0.619	0.627	0.646	0.689	0.000	0.864	0.943	1.000	1.042
S22	0.179	0.214	0.363	0.379	0.602	0.619	0.628	0.647	0.689	0.000	0.864	0.944	1.000	1.042
S23	0.179	0.214	0.363	0.378	0.602	0.619	0.628	0.647	0.689	0.000	0.863	0.944	1.000	1.042
S24	0.178	0.214	0.362	0.377	0.601	0.618	0.627	0.646	0.689	0.000	0.863	0.944	1.000	1.043
S25	0.178	0.214	0.360	0.376	0.600	0.618	0.626	0.645	0.688	0.849	0.862	0.943	1.000	1.043
S26	0.178	0.214	0.361	0.376	0.601	0.618	0.627	0.646	0.688	0.000	0.863	0.944	1.000	1.043
S27	0.178	0.214	0.361	0.376	0.601	0.618	0.627	0.646	0.688	0.000	0.863	0.943	1.000	1.043
S28	0.181	0.218	0.365	0.380	0.602	0.619	0.628	0.647	0.689	0.000	0.863	0.943	1.000	1.042
S29	0.178	0.214	0.360	0.376	0.601	0.618	0.626	0.645	0.688	0.000	0.863	0.943	1.000	1.042
S30	0.178	0.214	0.361	0.376	0.601	0.618	0.626	0.645	0.688	0.000	0.863	0.944	1.000	1.042
RSD/%	0.41	0.45	0.37	0.33	0.09	0.08	0.08	0.08	0.07	263.90	0.05	0.03	0.00	0.03

表 5 15 批市售炙甘草饮片共有峰 RA 及其 RSD

Table 5 RA and RSD of common peaks of commercial prepared licorice pieces

编号	共有峰 RA													
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13	峰 14
S16	0.059	0.103	0.654	0.421	0.529	0.107	0.197	0.066	0.170	0.000	0.075	0.079	1.000	0.152
S17	0.052	0.108	0.583	0.284	0.509	0.164	0.161	0.067	0.191	0.000	0.104	0.073	1.000	0.166
S18	0.051	0.091	0.547	0.237	0.522	0.231	0.184	0.079	0.211	0.033	0.123	0.088	1.000	0.173
S19	0.057	0.113	0.635	0.458	0.520	0.111	0.212	0.059	0.154	0.000	0.082	0.030	1.000	0.152
S20	0.050	0.105	0.587	0.381	0.527	0.114	0.187	0.067	0.225	0.000	0.076	0.109	1.000	0.154
S21	0.057	0.105	0.629	0.418	0.537	0.114	0.195	0.068	0.171	0.000	0.080	0.080	1.000	0.158
S22	0.063	0.106	0.673	0.456	0.554	0.116	0.201	0.072	0.152	0.000	0.079	0.075	1.000	0.158
S23	0.054	0.105	0.629	0.347	0.528	0.156	0.174	0.069	0.184	0.000	0.096	0.093	1.000	0.162
S24	0.058	0.112	0.654	0.382	0.544	0.106	0.184	0.059	0.159	0.000	0.084	0.067	1.000	0.156
S25	0.054	0.102	0.574	0.225	0.504	0.226	0.166	0.073	0.203	0.035	0.119	0.109	1.000	0.162
S26	0.060	0.112	0.616	0.411	0.508	0.099	0.196	0.064	0.149	0.000	0.079	0.066	1.000	0.159
S27	0.052	0.102	0.637	0.351	0.548	0.114	0.178	0.061	0.173	0.000	0.079	0.077	1.000	0.158
S28	0.054	0.100	0.609	0.384	0.543	0.128	0.182	0.075	0.164	0.000	0.081	0.064	1.000	0.151
S29	0.051	0.095	0.615	0.398	0.536	0.129	0.193	0.074	0.173	0.000	0.079	0.078	1.000	0.158
S30	0.052	0.091	0.615	0.371	0.533	0.138	0.172	0.064	0.194	0.000	0.081	0.092	1.000	0.154
RSD/%	6.85	6.78	5.43	19.18	2.82	30.28	7.52	8.75	12.68	264.04	17.55	24.65	0.00	3.62

0.990、0.965、0.974、0.973、0.968、0.971、0.980、0.959、0.956、0.968、0.974、0.972、0.980、0.973、0.959、0.952。表明仅根据相似度结果无法区分基地

优质饮片与市售饮片，但进一步通过比较特征峰相对峰面积比值，可以明显看出优质炙甘草饮片与统货饮片的差异，见表 6。其中，基地优质炙甘草饮

表 6 主要特征峰 RA 比值

Table 6 RA ratio of main common peaks

编号	峰 3/峰 4	峰 5/峰 7	峰 6/峰 8	编号	峰 3/峰 4	峰 5/峰 7	峰 6/峰 8	编号	峰 3/峰 4	峰 5/峰 7	峰 6/峰 8
S1	0.468	0.955	0.558	S11	0.425	0.844	0.521	S21	1.507	2.751	1.672
S2	0.443	0.876	0.509	S12	0.449	0.877	0.506	S22	1.476	2.760	1.617
S3	0.452	0.929	0.519	S13	0.429	0.831	0.547	S23	1.812	3.034	2.269
S4	0.463	1.047	0.547	S14	0.396	0.752	0.460	S24	1.709	2.962	1.775
S5	0.472	0.892	0.526	S15	0.435	0.829	0.521	S25	2.550	3.044	3.075
S6	0.457	0.904	0.549	S16	1.554	2.691	1.630	S26	1.498	2.588	1.544
S7	0.416	0.803	0.470	S17	2.053	3.167	2.440	S27	1.813	3.071	1.860
S8	0.420	0.801	0.469	S18	2.306	2.838	2.932	S28	1.586	2.981	1.699
S9	0.428	0.837	0.512	S19	1.384	2.453	1.899	S29	1.544	2.780	1.744
S10	0.411	0.797	0.488	S20	1.539	2.824	1.695	S30	1.654	3.092	2.148

片指纹图谱中,以峰 13(甘草酸)为对照峰,峰 3(芹糖甘草苷)与峰 4(甘草苷)相对峰面积比值不得大于 1.00,峰 5(芹糖异甘草苷)与峰 7(异甘草苷)相对峰面积比值不得小于 0.70 及不得大于 1.20,峰 6 与峰 8 的相对峰面积比值不得大于 1.00;统货饮片对共有峰相对峰面积比值不作要求。

3 多成分一测多评法的建立及含量测定

3.1 色谱条件

色谱柱为 Waters XSelect HSS C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液;梯度洗脱:0~5 min, 15%~19%乙腈;5~22 min, 19%~35%乙腈;22~25 min, 35%~40%乙腈;25~32 min, 40%乙腈;32~35 min, 40%~95%乙腈;35~40 min, 95%乙腈;检测波长:276 nm(芹糖甘草苷、甘草苷、甘草素)、360 nm(芹糖异甘草苷、异甘草苷)、250 nm(甘草酸);体积流量为 1 mL/min;柱温 30 ℃;进样量 10 μL。该条件下混合对照品和样品色谱图见图 4。

3.2 对照品溶液的制备

精密称取芹糖甘草苷、甘草苷、芹糖异甘草苷、异甘草苷、甘草素、甘草酸铵对照品适量,加甲醇配制成质量浓度分别为 57.000、125.192、18.702、27.785、15.670、253.332 μg/mL 的混合对照品溶液(甘草酸质量=甘草酸铵质量/1.020 7)。

3.3 供试品溶液的制备

取本品粉末(过三号筛)约 0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 75%甲醇 50 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率 300 W,频率 40 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用 75%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

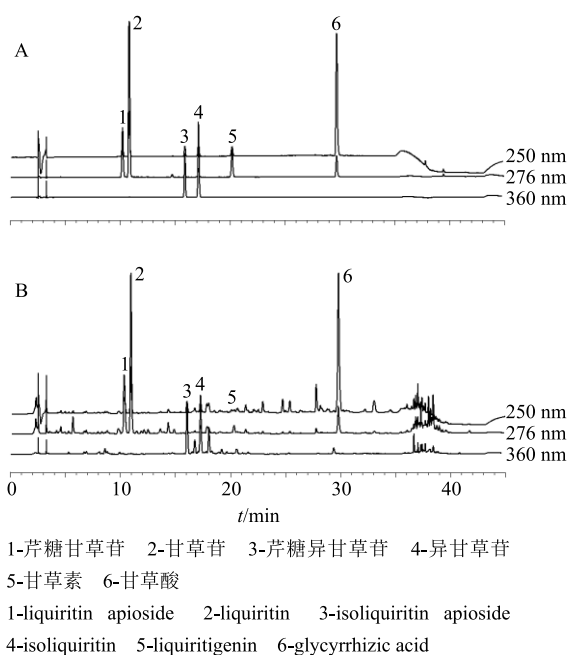


图 4 混合对照品 (A) 和供试品溶液 (B) 的 HPLC 图谱
Fig. 4 HPLC chromatograms of mixed reference substance (A) and samples (B)

3.4 方法学考察

3.4.1 线性关系考察 将“3.2”项下混合对照品溶液为 1#,用甲醇依次向下梯度稀释 2 倍,得到混合对照品溶液 2#~6#,精密吸取各对照品溶液 10 μL,按“3.1”项下色谱条件测定,以各对照品的峰面积为纵坐标(Y),质量浓度为横坐标(X),绘制标准曲线,进行线性回归,得回归方程分别为芹糖甘草苷 $Y=13\ 841\ X-12\ 487$, $r=0.999\ 7$,线性范围 1.781~57.000 μg/mL;甘草苷 $Y=19\ 172\ X-36\ 205$, $r=0.999\ 7$,线性范围 3.912~125.192 μg/mL;芹糖异甘草苷 $Y=31\ 824\ X-9\ 651.5$, $r=0.999\ 7$,线性

范围 0.584~18.702 $\mu\text{g/mL}$; 异甘草苷 $Y=38\ 287X-16\ 343$, $r=0.999\ 7$, 线性范围 0.868~27.785 $\mu\text{g/mL}$; 甘草素 $Y=31\ 709X-8\ 770.2$, $r=0.999\ 7$, 线性范围 0.490~15.670 $\mu\text{g/mL}$; 甘草酸铵 $Y=80\ 51.6X-34\ 742$, $r=0.999\ 6$, 线性范围 7.917~253.332 $\mu\text{g/mL}$ 。各待测成分相关系数均大于 0.999 0, 表明线性关系良好。

3.4.2 精密度试验 取混合对照品溶液 2#, 连续进样 6 次, 记录各化合物的峰面积, 计算其 RSD 值, 结果见表 7, 表明该方法精密度良好。

表 7 含量测定精密度、稳定性、重复性、加样回收率试验结果

Table 7 Results of precision, stability, reproducibility and recovery test for content determination

成分	精密度	稳定性	重复性试验		回收率试验	
	RSD/%	RSD/%	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	RSD/%	平均回收率/%	RSD/%
蔗糖甘草苷	0.70	2.50	7.090	2.47	97.71	2.66
甘草苷	0.62	2.09	12.925	2.46	94.98	2.47
蔗糖异甘草苷	0.66	1.88	2.052	2.41	99.57	2.53
异甘草苷	0.64	1.61	2.361	2.45	100.15	2.84
甘草素	0.42	0.83	0.536	2.70	107.72	0.76
甘草酸铵	0.70	0.53	30.060	2.46	99.58	2.22

3.4.5 加样回收率试验 称取 S3 样品粉末 6 份, 每份约 0.1 g, 精密称定, 分别加入与待测成分含量相近的各对照品, 按“3.3”项下方法制备成供试品溶液, 按照“3.1”项下条件分别精密吸取 10 μL 测定并计算 6 个待测成分的加样回收率及 RSD, 结果见表 7, 表明回收率均符合要求。

3.5 相对校正因子 ($f_{s/i}$) 的确定

3.5.1 $f_{s/i}$ 的计算 取“3.4.1”项下 1#~6#混合对照品溶液, 按照“3.1”项下色谱条件, 各精密吸取 10 μL 测定, 以甘草苷为内参物 S1, 测定甘草苷 (S1)、异甘草苷 (a) 峰面积; 以甘草酸为内参物 S2, 测定蔗糖甘草苷 (A)、蔗糖异甘草苷 (B)、甘草素 (C)、甘草酸 (S2) 的峰面积, 按公式 $f_{s/i}=f_s/f_i=(A_s/C_s)/(A_i/C_i)$ (其中 A_s 为内参物的峰面积, C_s 为内参物的浓度, A_i 为其余组分的峰面积, C_i 为其余组分的浓度) 计算, 得到异甘草苷的 $f_{s/i}$ ($f_{S1/a}$) 平均值为 0.502; 得到蔗糖甘草苷的 $f_{s/i}$ ($f_{S2/A}$) 平均值为 0.578; 蔗糖异甘草苷的 $f_{s/i}$ ($f_{S2/B}$) 平均值为 0.252; 甘草素的 $f_{s/i}$ ($f_{S2/C}$) 平均值为 0.257, 结果见表 8。

3.5.2 $f_{s/i}$ 的耐用性试验

(1) 不同液相色谱仪器及色谱柱对 $f_{s/i}$ 的影响: 本实验考察了 Waters e2695、Agilent 1260 2 种液相

3.4.3 稳定性试验 取 S3 供试品溶液, 分别于制备后 0、4、8、12、24 h 进样分析, 计算各成分峰面积 RSD 值, 结果见表 7, 表明供试品溶液在 24 h 内基本良好。

3.4.4 重复性试验 称取 S3 样品粉末 6 份, 每份约 0.2 g, 精密称定, 按照“3.3”项下方法制备成供试品溶液 6 份, 按照“3.1”项下条件, 各精密吸取 10 μL 测定, 根据所建立的标准曲线计算各待测成分的平均含量及 RSD 值, 结果见表 7, 表明该方法的重复性良好。

表 8 $f_{s/i}$ 的计算结果

Table 8 $f_{s/i}$ of be-measured components

对照溶液编号	$f_{S1/a}$	$f_{S2/A}$	$f_{S2/B}$	$f_{S2/C}$
1#	0.504	0.584	0.254	0.254
2#	0.499	0.575	0.252	0.269
3#	0.504	0.573	0.251	0.257
4#	0.502	0.574	0.250	0.253
5#	0.501	0.580	0.252	0.254
6#	0.501	0.581	0.253	0.254
平均值	0.502	0.578	0.252	0.257
RSD/%	0.376	0.761	0.523	2.342

色谱系统, 以及 Waters XSelect HSS C₁₈、Agilent 5 HC-C₁₈ (2)、Hedra ODS-2 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 3 种色谱柱对 $f_{s/i}$ 的影响, 得到各成分的 $f_{s/i}$ 的 RSD 均<5%, 表明 $f_{s/i}$ 在不同液相色谱仪器及色谱柱下的耐用性良好, 见表 9。

(2) 不同体积流量对 $f_{s/i}$ 的影响: 采用 Waters XSelect HSS C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱和 Waters e2695 液相色谱仪, 考察体积流量分别为 0.9、1.0、1.1 mL/min 对 $f_{s/i}$ 的影响, 得到各成分的 $f_{s/i}$ 的 RSD 均<5%, 见表 10。结果显示, 不同体积流量对 $f_{s/i}$ 无明显影响, $f_{s/i}$ 在体积流量 0.9~1.1 mL/min

表 9 不同液相色谱仪器及色谱柱所测定的 $f_{s/i}$

Table 9 Relative correction factors determined by different instructions and chromatographic columns

液相色谱仪器	色谱柱	$f_{S1/A}$	$f_{S2/A}$	$f_{S2/B}$	$f_{S2/C}$
Agilent 1260	Agilent 5 HC-C ₁₈ (2)	0.501	0.569	0.248	0.247
	Waters XSelect HSS C ₁₈	0.501	0.580	0.252	0.254
	Hedra ODS-2 C ₁₈	0.504	0.569	0.248	0.249
Waters 2695	Agilent 5 HC-C ₁₈ (2)	0.490	0.587	0.249	0.251
	Waters XSelect HSS C ₁₈	0.488	0.597	0.251	0.253
	Hedra ODS-2 C ₁₈	0.489	0.571	0.243	0.245
平均值	—	0.496	0.579	0.248	0.250
RSD/%	—	1.46	1.95	1.26	1.35

表 10 不同体积流量测得的 $f_{s/i}$

Table 10 Relative correction factors determined by different flow rate

体积流量/(mL·min ⁻¹)	$f_{S1/A}$	$f_{S2/A}$	$f_{S2/B}$	$f_{S2/C}$
0.9	0.501	0.583	0.254	0.255
1.0	0.501	0.580	0.252	0.254
1.1	0.501	0.582	0.253	0.255
平均值	0.501	0.581	0.253	0.255
RSD/%	0.09	0.32	0.35	0.36

耐用性良好。

(3) 不同柱温对 $f_{s/i}$ 的影响: 采用 Waters XSelect HSS C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱和 Waters e2695 液相色谱仪, 考察不同柱温分别为 28、30、32 °C 对 $f_{s/i}$ 的影响, 得到各成分的 $f_{s/i}$ 的 RSD 均 < 5%, 见表 11。结果显示, 不同柱温对 $f_{s/i}$ 无明显影响, $f_{s/i}$ 在柱温 28~32 °C 耐用性良好。

(4) $f_{s/i}$ 的确定: 根据上述试验数据结果, 最终确定异甘草苷对于甘草苷的 $f_{S1/A}$ 为 0.502, 芹糖甘草苷、芹糖异甘草苷、甘草素对于甘草酸的 $f_{S2/A}$ 为 0.578, $f_{S2/B}$ 为 0.252, $f_{S2/C}$ 为 0.257。

3.5.3 待测成分色谱峰的定位 采用 Waters X Select HSS C₁₈、Agilent 5 HC-C₁₈ (2)、Hedra ODS-2

C₁₈ 3 种色谱柱分别测定芹糖甘草苷、甘草苷、芹糖异甘草苷、异甘草苷、甘草酸在 Waters 2695、Agilent 1260 2 种液相色谱系统上的保留时间 (RT), 计算异甘草苷相对于甘草苷的相对保留时间 ($r_a = RT_{\text{异甘草苷}} / RT_{\text{甘草苷}}$), 计算芹糖甘草苷、芹糖异甘草苷、甘草素相对于甘草酸的相对保留时间 ($r_A = RT_{\text{芹糖甘草苷}} / RT_{\text{甘草酸}}$ 、 $r_B = RT_{\text{芹糖异甘草苷}} / RT_{\text{甘草酸}}$ 、 $r_C = RT_{\text{甘草素}} / RT_{\text{甘草酸}}$), 得到异甘草苷、芹糖甘草苷、芹糖异甘草苷、甘草素的 r_a 、 r_A 、 r_B 、 r_C 的平均值分别为 1.536、0.368、0.555、0.713, RSD 分别为 2.15%、5.12%、3.10%、5.82%, 见表 12。表明在不同液相色谱仪器及色谱柱中, 异甘草苷、芹糖甘草苷、芹糖异甘草苷、甘草素的 r_a 、 r_A 、 r_B 、 r_C 耐用性较好。

3.5.4 一测多评法 (QAMS) 与外标法 (ESM) 结果分析 分别取 30 批炙甘草饮片, 按照“3.3”项下方法制备供试品溶液, 按“3.1”项下色谱条件进行测定, 记录各色谱峰峰面积, 以“3.2”项下混合对照品溶液稀释 4 倍的溶液为外标对照品溶液, 分别用 ESM 和 QAMS 测定甘草酸、芹糖甘草苷、芹糖异甘草苷、甘草素、甘草苷、异甘草苷的含量, 采用相对误差 (RE) 来表示 2 种方法测得结果的差异, $RE = (W_{QAMS} - W_{ESM}) / W_{ESM}$ (W_{QAMS} 为 QAMS 测得的含量, W_{ESM} 为 ESM 测得的含量), 结果见表 13, 除甘草素外, RE 均 < 5%, 结果表明 2 种方法测得的各成分含量无显著性差异, QAMS 在炙甘草饮片的多指标成分质量评价中应用是可行的, 考虑到饮片中甘草素的含量较低 (< 0.05%), 不建议列入指标。

根据测定结果, 可以看出部分市售饮片甘草苷含量低于《中国药典》2015 年版规定的含量要求 0.50%。基地样品中, 甘草苷、甘草酸含量均高于《中国药典》2015 年版规定限量, 甘草苷与芹糖甘

表 11 不同柱温测得的 $f_{s/i}$

Table 11 Relative correction factors determined by different column temperature

柱温/°C	$f_{S1/A}$	$f_{S2/A}$	$f_{S2/B}$	$f_{S2/C}$
28	0.500	0.573	0.249	0.251
30	0.501	0.580	0.252	0.254
32	0.501	0.579	0.252	0.253
平均值	0.501	0.577	0.251	0.253
RSD/%	0.15	0.59	0.64	0.56

表 12 不同液相色谱仪器、色谱柱测得的 RRT

Table 12 RRT determined by different instructions and chromatographic columns

液相色谱仪器	色谱柱	r_a	r_A	r_B	r_C
Agilent 1260	Agilent 5 HC-C ₁₈ (2)	1.537	0.360	0.543	0.676
	Waters XSelect HSS C ₁₈	1.583	0.345	0.536	0.682
	Hedra ODS-2 C ₁₈	1.506	0.386	0.571	0.755
Waters 2695	Agilent 5 HC-C ₁₈ (2)	1.530	0.367	0.552	0.691
	Waters XSelect HSS C ₁₈	1.563	0.355	0.545	0.699
	Hedra ODS-2 C ₁₈	1.497	0.394	0.580	0.774
平均值	—	1.536	0.368	0.555	0.713
RSD/%	—	2.15	5.12	3.10	5.82

表 13 ESM 及 QAMS 测定炙甘草饮片中 6 个成分的对比结果 ($n=2$)Table 13 Comparison of six components in *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Praeparata Cum Melle* by external standard method and QAMS ($n=2$)

样品	甘草酸/%				蔗糖甘草苷/%			蔗糖异甘草苷/%			甘草素/%			甘草苷/%		异甘草苷/%		
编号	ESM	ESM	QAMS	RE	ESM	QAMS	RE	ESM	QAMS	RE	ESM	ESM	QAMS	RE	ESM	QAMS	RE	
S1	2.870	0.672	0.671	-0.15	0.184	0.182	-0.74	0.038	0.032	-15.79	1.150	0.190	0.188	-1.05				
S2	2.962	0.686	0.684	-0.29	0.189	0.187	-0.77	0.042	0.036	-14.29	1.209	0.211	0.209	-0.95				
S3	3.011	0.712	0.710	-0.28	0.196	0.195	-0.67	0.041	0.036	-12.20	1.214	0.203	0.200	-1.48				
S4	2.956	0.683	0.682	-0.15	0.187	0.185	-0.79	0.038	0.033	-13.16	1.164	0.197	0.195	-1.02				
S5	2.850	0.684	0.683	-0.15	0.188	0.186	-0.63	0.037	0.031	-16.22	1.164	0.189	0.187	-1.06				
S6	2.971	0.688	0.686	-0.29	0.189	0.187	-0.79	0.041	0.035	-14.63	1.184	0.193	0.190	-1.55				
S7	2.867	0.671	0.669	-0.30	0.185	0.183	-0.73	0.038	0.032	-15.79	1.237	0.209	0.206	-1.44				
S8	2.782	0.645	0.644	-0.16	0.176	0.174	-0.86	0.040	0.035	-12.50	1.186	0.197	0.194	-1.52				
S9	2.948	0.692	0.691	-0.14	0.190	0.189	-0.70	0.038	0.033	-13.16	1.294	0.215	0.213	-0.93				
S10	2.960	0.690	0.689	-0.14	0.191	0.190	-0.72	0.039	0.033	-15.38	1.283	0.215	0.213	-0.93				
S11	3.019	0.669	0.666	-0.45	0.182	0.180	-1.06	0.039	0.033	-15.38	1.231	0.201	0.198	-1.49				
S12	2.894	0.655	0.653	-0.31	0.179	0.177	-0.94	0.038	0.032	-15.79	1.159	0.189	0.186	-1.59				
S13	2.983	0.656	0.653	-0.46	0.177	0.175	-1.10	0.041	0.035	-14.63	1.213	0.201	0.198	-1.49				
S14	2.988	0.667	0.664	-0.45	0.181	0.180	-0.98	0.040	0.035	-12.50	1.307	0.219	0.216	-1.37				
S15	2.928	0.670	0.668	-0.30	0.184	0.183	-0.85	0.038	0.032	-15.79	1.209	0.201	0.198	-1.49				
S16	2.483	0.833	0.844	1.32	0.257	0.260	1.17	0.057	0.052	-8.77	0.507	0.091	0.088	-3.30				
S17	2.191	0.707	0.716	1.27	0.224	0.227	1.34	0.050	0.045	-10.00	0.393	0.079	0.077	-2.53				
S18	2.043	0.634	0.644	1.58	0.213	0.217	1.88	0.049	0.044	-10.20	0.299	0.077	0.079	2.60				
S19	2.559	0.863	0.873	1.16	0.268	0.271	1.12	0.049	0.044	-10.20	0.560	0.099	0.096	-3.03				
S20	2.352	0.759	0.768	1.19	0.241	0.244	1.24	0.059	0.055	-6.78	0.495	0.091	0.089	-2.20				
S21	2.553	0.865	0.876	1.27	0.267	0.271	1.50	0.050	0.044	-12.00	0.553	0.101	0.099	-1.98				
S22	2.568	0.908	0.920	1.32	0.278	0.281	1.08	0.047	0.042	-10.64	0.577	0.100	0.097	-3.00				
S23	2.241	0.755	0.765	1.32	0.236	0.239	1.27	0.043	0.038	-11.63	0.433	0.086	0.084	-2.33				
S24	2.460	0.890	0.902	1.35	0.272	0.276	1.47	0.039	0.034	-12.82	0.536	0.091	0.088	-3.30				
S25	1.933	0.596	0.605	1.51	0.198	0.201	1.52	0.048	0.043	-10.42	0.293	0.075	0.077	2.67				
S26	2.421	0.822	0.832	1.22	0.245	0.248	1.22	0.042	0.036	-14.29	0.525	0.087	0.084	-3.45				
S27	2.616	0.912	0.923	1.21	0.287	0.290	1.05	0.042	0.037	-11.90	0.549	0.097	0.094	-3.09				
S28	2.320	0.819	0.831	1.47	0.253	0.256	1.19	0.043	0.038	-11.63	0.488	0.087	0.084	-3.45				
S29	2.382	0.812	0.822	1.23	0.248	0.251	1.21	0.045	0.040	-11.11	0.543	0.096	0.093	-3.13				
S30	2.623	0.883	0.893	1.13	0.278	0.281	1.08	0.058	0.053	-8.62	0.544	0.101	0.099	-1.98				

甘草苷含量比值均 >1.50 ，甘草苷与甘草酸含量比值均 >0.40 ，甘草苷与蔗糖异甘草苷含量比值均 >6.0 ，异甘草苷与蔗糖异甘草苷含量比值均 >0.90 ，明显区分于市售各批次样品。为更好的切合生产实际情况，结合《中国药典》2015年版要求，初步将优质标准中甘草苷、甘草酸的含量限定要求按药典限度提升，故本标准草案中初步提出基地优质炙甘草饮片的各成分含量限定：本品按干燥品计算，优质饮片含蔗糖甘草苷($C_{26}H_{30}O_{13}$)不得少于 0.55% ，甘草苷($C_{21}H_{22}O_9$)不得少于 0.90% ，蔗糖异甘草苷($C_{26}H_{30}O_{13}$)不得少于 0.15% ，异甘草苷($C_{21}H_{22}O_9$)不得少于 0.15% ，甘草酸($C_{42}H_{62}O_{16}$)不得少于 2.0% ，其中，甘草苷含量/蔗糖甘草苷含量不得少于 1.50% 且不得大于 2.50% ，甘草苷含量/甘草酸含量不得少于 0.40% 且不得大于 0.55% ，甘草苷含量/蔗糖异甘草苷含量不得少于 6.0% 且不得大于 8.0% ，异甘草苷含量/蔗糖异甘草苷含量不得少于 0.90% 且不得大于 1.20% ；统货饮片含甘草苷($C_{26}H_{30}O_{13}$)不得少于 0.50% ，甘草酸($C_{42}H_{62}O_{16}$)不得少于 1.0% 。

4 讨论

4.1 实验研究背景

新生化颗粒中炙甘草为使药，味甘以缓之，令活血化安药作用更为持续而缓和，且能补虚扶脾，调和诸药，故炙甘草饮片的质量，直接影响新生化制剂的药效。目前药典收载甘草药材基原有3种，分别为豆科植物甘草 *G. uralensis* Fisch.、胀果甘草 *G. inflata* Bat. 和光果甘草 *G. glabra* L. 的干燥根和根茎。

课题团队在评价甘草药材及产地调研时发现，很多产地栽培时都存在将甘草和胀果甘草混种，加工后难以分开，导致市售药材饮片很多是多基源的混种品。本团队研究确定了以甘草为新生化颗粒优质药材，作为生产优质炙甘草饮片原料，从而生产新生化颗粒。在指纹图谱和定量研究中，结合新生化颗粒的制备工艺，确定水提取作为指纹图谱的测定提取溶剂，根据新生化颗粒中指纹图谱成分确定了甘草苷、异甘草苷、甘草酸、甘草素、蔗糖甘草苷、蔗糖异甘草苷等成分作为指标，此外结合优选药材优选时发现这几个指标成分比值能区分优质药材饮片（乌拉尔甘草基原）与一般药材饮片（甘草、胀果甘草的混种品），故选择了甘草苷、异甘草苷、甘草酸、甘草素、蔗糖甘草苷、蔗糖异甘草苷

等为定量指标。

4.2 指纹图谱相似度及差异性分析

研究指纹图谱时对提取溶剂的选择、不同温浸温度（室温、 40 、 60 、 80 、 100 $^{\circ}C$ ）、不同温浸时间（ 20 、 30 、 40 、 50 、 60 min）、不同超声时间（ 10 、 20 、 30 、 40 min）、不同料液比（ $1:25$ 、 $1:50$ 、 $1:100$ 、 $1:250$ 、 $1:500$ ）进行考察，优化了指纹图谱测定的提取方法。实验数据分析初期，拟将相似度作为饮片分级指标，但得出的30批炙甘草饮片相似度均能达到 0.95 以上，无法区分基地优质饮片与市售饮片，但数据分析表明部分共有峰的RA比值能区分，故本实验指纹图谱研究中舍弃相似度评价指标，以共有峰的RRT及部分共有峰的RA比值作为评价指纹图谱的指标，规定在优质饮片及统货饮片在规定位置出现相应的色谱峰，并以部分共有峰的RA比值规定基地优质饮片，用来区分优质饮片与统货饮片，统货饮片RA比值不作要求。

4.3 炙甘草中6种有效成分含量差异分析

QAMS 不仅在缺少对照品的情况下可以实现质量控制和定量分析，且能有效地降低多组分含量测定的成本^[21-22]。由于现行炙甘草质量标准含量测定项下仅对甘草苷、甘草酸进行限定，指标较为单薄，无法全面的评价饮片质量优劣、区分基地优质饮片与市售统货饮片，故新增蔗糖甘草苷、蔗糖异甘草苷、异甘草苷成分，以含量比值的关系区分优质饮片。本实验建立的一种多波长同时测定甘草中主要的6个有效成分的QAMS方法，通过对提取溶剂（ 100% 甲醇、 100% 乙醇、 25% 甲醇、 50% 甲醇、 75% 甲醇）、超声时间（ 30 、 40 、 50 、 60 、 90 min）及不同液料比（ $1:50$ 、 $1:100$ 、 $1:250$ 、 $1:500$ ）的条件考察确定含量测定时的提取方法。通过测定甘草苷和甘草酸的含量，计算出了异甘草苷、蔗糖甘草苷、蔗糖异甘草苷的相对校正因子，并计算各组分的量，实现一测多评。将15批基地优质饮片与15批市售统货饮片的QAMS结果与ESM实测值进行比较，验证了该QAMS的可行性和科学性；将该30批的结果进行比较，优质饮片的有效成分含量更加均一，且甘草酸、甘草苷及异甘草苷的含量明显高于市售统货，故为新生化颗粒原料优质炙甘草饮片制定了更完善的质量指标。

本实验采用HPLC法建立优质炙甘草饮片指纹图谱，并采用QAMS测定甘草苷、甘草酸、异甘草苷、蔗糖甘草苷、蔗糖异甘草苷等有效成分含量，

并规定优质炙甘草中各成分限度指标, 为建立新生化颗粒优质标准提供依据。

参考文献

- [1] 高晓娟, 赵 丹, 赵建军, 等. 甘草的本草考证 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(2): 193-198.
- [2] 王佳琳, 张贵君, 向 丽, 等. 桂枝、炙甘草剂量变化对桂枝甘草汤药效组分的影响 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(4): 728-733.
- [3] 朱靖博, 籍立新, 萧 伟, 等. 反相二维色谱制备甘草中黄酮类化合物 [J]. 中草药, 2018, 49(9): 2033-2040.
- [4] Li Y, Sun F, Jing Z, *et al.* Glycyrrhizic acid exerts anti-inflammatory effect to improve cerebral vasospasm secondary to subarachnoid hemorrhage in a rat model [J]. *Neurol Res*, 2017, 39(8): 727-732.
- [5] Rui F, Nan L, Jiang X, *et al.* HPLC-DAD-MS/MS identification and HPLC-ABTS⁺ online antioxidant activity evaluation of bioactive compounds in liquorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) extract [J]. *Eur Food Res Technol*, 2015, 240(5): 1035-1048.
- [6] 朱世超, 郑学敏, 张 玥, 等. 甘草次酸衍生物抗肝纤维化的实验研究 [J]. 中草药, 2017, 48(17): 3554-3559.
- [7] 张明发, 沈雅琴. 甘草及其有效成分抗脂肪肝和抗肥胖的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(4): 439-447.
- [8] 常明向, 吴梅梅, 李瀚旻. 姜黄素与甘草次酸联用对肝癌 HepG-2 细胞增殖的抑制作用 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(1): 42-47.
- [9] Cao L, Ding W, Jia R, *et al.* Anti-inflammatory and hepatoprotective effects of glycyrrhetic acid on CCl₄-induced damage in precision-cut liver slices from Jian carp (*Cyprinus carpio* var. *jian*) through inhibition of the NF- κ B pathway [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2017, 64: 234-242.
- [10] Baltina L A, Zarubaev V V, Baltina L A, *et al.* Glycyrrhizic acid derivatives as in fluenza A/H1N1 virus inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25(8): 1742-1746.
- [11] 黄雨婷, 迟宗良, 王姝梅, 等. 甘草中的黄酮类成分及其抗肿瘤活性研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2017, 26(13): 1532-1537.
- [12] Han S, Sun L, He F, *et al.* Anti-allergic activity of glycyrrhizic acid on IgE-mediated allergic reaction by regulation of allergy-related immune cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 7222-7231.
- [13] Pastorino G, Cornara L, Soares S, *et al.* Liquorice (*Glycyrrhiza glabra*): A phytochemical and pharmacological review [J]. *Phytother Res*, 2018, 32(12): 2323-2339.
- [14] 李文斌, 魏胜利, 罗 琳, 等. 甘草种质主要形态性状和化学成分的遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2019, 50(2): 517-525.
- [15] 包 芳, 李羽涵, 杨志刚, 等. 甘草代谢组学的研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(19): 4662-4669.
- [16] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [17] 周 倩, 戴衍朋, 王 亮, 等. HPLC 法测定生甘草、炙甘草中 6 种成分 [J]. 中成药, 2016, 38(2): 378-382.
- [18] 邓 哲, 石 佳, 沈 立, 等. 基于中药质量常数的炙甘草饮片等级评价研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(9): 1-11.
- [19] 任晓航, 岳英男, 史 辑, 等. 甘草微型饮片切制工艺及 UPLC 指纹图谱 [J]. 中成药, 2019, 41(1): 124-129.
- [20] 左雯雯, 吴 鑫, 黄胜良, 等. 新生化颗粒的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(18): 3676-3682.
- [21] 秦昆明, 杨 冰, 胡 静, 等. 一测多评法在中药多组分质量控制中的应用现状与思考 [J]. 中草药, 2018, 49(3): 725-731.
- [22] 张 平, 马 潇, 李冬华, 等. 白芷饮片全国评价性抽检结果分析与多指标成分一测多评法研究 [J]. 中草药, 2019, 50(14): 3329-3336.