

## 不同软化方法对甘草质量的影响

沈钱能<sup>1</sup>, 陈丽红<sup>1</sup>, 黄紫炎<sup>1</sup>, 郭爽<sup>1</sup>, 毛春芹<sup>1</sup>, 纪青华<sup>2</sup>, 陆兔林<sup>1\*</sup>, 王吓长<sup>1\*</sup>

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 连云港赣榆医药有限公司, 江苏 连云港 222100

**摘要:** **目的** 基于 HPLC 建立甘草指纹图谱及同时测定甘草中 6 个成分含量的分析方法, 并考察 4 种软化方式(淋润、常压蒸润、70 °C 减压蒸润与 85 °C 减压蒸润)对甘草质量的影响。**方法** 采用紫外分光光度法, 以甘草苷、甘草酸为对照品, 测定甘草中总黄酮及总皂苷的含量; 基于 HPLC 同时测定甘草中甘草苷、芒柄花苷、异甘草苷、甘草素、刺甘草查耳酮、甘草酸 6 个成分的含量, 比较了不同软化方法处理后的甘草中指标成分含量的变化; 利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统对不同软化处理后的甘草样品进行相似度评价, 并进行聚类分析。**结果** 总黄酮、总皂苷的结果显示, 未加工过的甘草中总黄酮与总皂苷的含量最高, 淋润的甘草总黄酮与总皂苷含量偏低。常压蒸润、70 °C 减压蒸润和 85 °C 减压蒸润这 3 种处理方法对甘草质量影响不大; 含量测定结果显示, 不同软化处理后, 异甘草苷的含量均显著降低, 而不同的软化处理组之间, 所有成分含量差异不显著。指纹图谱相似性评价与聚类分析表明, 3 批甘草不同软化处理方法后的样品与未加工组分别聚为一类, 而不同软化处理方法对于甘草整体化学成分组成无显著差异。**结论** 建立的分析方法, 能够快速、准确地同时测定甘草中的 6 种成分, 而且尤其需要对软化过程中异甘草苷的含量进行监测。综合生产成本、生产效率及不同指标的质量评价结果, 常压蒸润在生产过程中可行性最高。本研究为甘草软化的大生产提供了理论指导, 有利于进一步规范甘草饮片的生产流程。

**关键词:** 甘草; 软化; 多成分含量测定; 指纹图谱; 聚类分析; 淋润; 蒸润; 甘草苷; 甘草酸; 总黄酮; 总皂苷; 芒柄花苷; 异甘草苷; 甘草素; 刺甘草查耳酮

中图分类号: R283.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2020)01-0076-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.01.012

## Effects of different softening methods on quality of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*

SHEN Qian-neng<sup>1</sup>, CHEN Li-hong<sup>1</sup>, HUANG Zi-yan<sup>1</sup>, GUO Shuang<sup>1</sup>, MAO Chun-qin<sup>1</sup>, JI Qing-hua<sup>2</sup>,  
LU Tu-lin<sup>1</sup>, WANG Xia-chang<sup>1</sup>

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

2. Lianyungang Ganyu Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222100, China

**Abstract: Objective** A method was established to obtain fingerprint and determination of six components in *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* Pieces (GRRP) based on HPLC-PDA, and samples with four kinds of softening methods (showering moistening, steaming, 70 °C decompression steaming, 85 °C decompression steaming) were analyzed. **Methods** The content of total flavonoids and total saponins was determined by ultraviolet spectrophotometry with liquiritin and glycyrrhizic acid as reference materials. Simultaneous determination of six components of liquiritin, ononin, isoliquiritin, glycyrrhizin, echinatin, glycyrrhizic acid was performed based on HPLC. Changes of the components content in the samples which treated by different softening methods were compared. The similarity evaluation of samples with different softening methods was carried out by the chromatographic fingerprint similarity evaluation system of traditional Chinese medicine, and cluster analysis was also carried out. **Results** The results showed that the content of total flavonoids and total saponins in untreated samples was the highest, and the content of total flavonoids and total saponins in samples treated by showering moistening was the lowest. The three treatment methods of atmospheric pressure steaming, steaming

收稿日期: 2019-08-26

基金项目: “国家重点研发计划”资助项目(2018YFC1706500); “国家重点研发计划”资助项目(2018YFC1707000)

作者简介: 沈钱能, 男, 在读硕士, 主要从事中药炮制及中药饮片质量标准研究。Tel: 19852863037 E-mail: 1398461321@qq.com

\*通信作者 陆兔林, 教授, 博士生导师, 主要从事中药炮制及中药饮片质量标准研究。Tel: (025)85811835 E-mail: lutuling2005@126.com

王吓长, 教授, 博士生导师, 主要从事中药药效物质基础和质量标准研究。Tel: (025)85811293 E-mail: xiachangwang@njucm.edu.cn

decompression at 70 °C and steaming decompression at 85 °C had little effect on the samples. The content determination showed that the content of isoliquiritin was decreased significantly after softening treatment. The difference among the different softening treatment groups was not significant. The samples with different softening methods of the three batches of samples were grouped together with their raw products. Different softening methods had no significant difference in the composition of the medicinal herbs.

**Conclusion** The established method can quickly and accurately determine the six components, and in particular, the content of isoglycyrrhizin should be monitored. Combining production efficiency, production cost and quality evaluation, steaming is the most feasible in the production process. This study provided theoretical guidance for the large-scale production of softening, which was conducive to further standardizing the production process of GRRP.

**Key words:** *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.; softening; multi-component determination; fingerprint; cluster analysis; showering moistening; steaming; liquiritin; glycyrrhizic acid; total flavonoids; total saponins; ononin; isoliquiritin; glycyrrhizin; echinatin

甘草为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *G. inflata* Bat. 或光果甘草 *G. glabra* L. 的干燥根和根茎<sup>[1]</sup>。甘草始载于《神农本草经》，被列为上品，具有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛、调和诸药等功效<sup>[2]</sup>。现代药理研究表明，甘草具有抗炎<sup>[3-4]</sup>、抗病毒<sup>[5]</sup>、抗抑郁<sup>[6]</sup>、保肝<sup>[7-8]</sup>等活性。甘草作为临床常用的中药材，素有“十方九草”之说，同时，甘草也是我国中药资源进出口贸易的大宗品种，使用量巨大<sup>[9]</sup>。

随着甘草及其制品的大量使用，甘草的加工过程受到越来越多的重视<sup>[10-12]</sup>，而甘草质地坚实，在切制前需要进行润药软化。润药是传统中药炮制的重要环节，老药工极其重视药材的软化过程，素有“七分润，三分切”的说法<sup>[13]</sup>，历代药典及各省市炮制规范中对甘草药材的软化方法描述为“润透”。传统的软化加工方法有浸泡、淋润，而现今为了提高生产效率，部分甘草的产地加工常用常压蒸润的方法<sup>[14-15]</sup>，也有企业利用低压环境通入蒸气对甘草进行软化的减压蒸润法<sup>[16]</sup>。相关研究表明，浸泡及淋润后的甘草，均出现有效成分流失的情况，进而影响饮片的质量<sup>[17-19]</sup>。甘草中的有效成分大多能够溶于热水<sup>[20-23]</sup>，在蒸润过程中极有可能也会造成损失。因此，不同软化方法对甘草质量的影响需要进一步研究。

《中国药典》2015年版对甘草中甘草苷、甘草酸的含量进行检测，而芒柄花苷、异甘草苷、甘草素、刺甘草查耳酮也是甘草潜在活性成分<sup>[24-27]</sup>，具有抗炎、抗病毒、抗氧化等多种药理活性，同时已有相关研究将其作为甘草的质量评价依据<sup>[28-29]</sup>。故本研究建立测定甘草中甘草苷、芒柄花苷、异甘草苷、甘草素、刺甘草查耳酮、甘草酸6个成分含量并结合指纹图谱的方法，对淋润、常压蒸润、70 °C减压蒸润、85 °C减压蒸润4种方法软化后的甘草质

量进行分析评价，为甘草软化过程中的质量控制提供依据，进而为优化甘草加工方法提供科学指导。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪，美国 Agilent 公司；大连依利特 Hypersil ODS2 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱；G-9 紫外扫描仪，南京菲勒仪器有限公司；DZF-6050 真空干燥箱，上海精宏实验设备有限公司；MS-105D 电子分析天平，瑞士梅特勒-托利多公司；KQ-500E 数控超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司。

### 1.2 试药

对照品甘草苷（批号 G-009-181216）、异甘草苷（批号 Y-120-181216）、甘草素（批号 G-036-180507）、刺甘草查耳酮（批号 C-050-180426）、异甘草素（批号 Y-008-181216）、甘草酸（批号 G-004-181219）均购自成都瑞芬思生物科技有限公司，对照品芒柄花苷（批号 486-62-4）购自上海诗丹德生物技术有限公司，各对照品质量分数均>98%。

乙腈、磷酸为色谱纯；实验用水为双蒸水；其他试剂均为分析纯，山东禹王实业有限公司化工分公司。

3批甘草药材，批号 H1900210、H1900220、H1900230，由盛实百草药业有限公司提供，产地为甘肃环县，经南京中医药大学药学院中药资源专业陈丽红副教授鉴定为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎。

## 2 方法与结果

### 2.1 甘草不同软化处理方法

**2.1.1 淋润** 将甘草药材用纱布包裹后置于阴凉处，每隔2h用清水喷淋，共润制6h。用手工切药刀将其切成厚片（2~4mm），置于60 °C烘箱中干燥<sup>[30]</sup>，备用。

**2.1.2 常压蒸润** 将甘草药材置于圆气的蒸锅中码放整齐, 蒸润 15 min, 取出后立即用手工切药刀切厚片 (2~4 mm), 置于 60 °C 烘箱中干燥<sup>[9]</sup>, 备用。

**2.1.3 70 °C 减压蒸润** 将甘草药材置于 70 °C 真空干燥箱中码放整齐, 下方放置适量沸水, 水循环真空泵抽至真空 (真空度 -0.09 MPa), 减压蒸润 25 min, 取出后立即用手工切药刀切厚片 (2~4 mm), 置于 60 °C 烘箱中干燥, 备用。

**2.1.4 85 °C 减压蒸润** 将甘草药材置于 85 °C 真空干燥箱中, 下方放置适量沸水, 水循环真空泵抽至真空 (真空度 -0.09 MPa), 减压蒸润 20 min, 取出后立即用手工切药刀切厚片 (2~4 mm), 置于 60 °C 烘箱中干燥, 备用。

3 批甘草经软化后得到的甘草饮片信息见表 1, 编号 S1~S15 为 3 批甘草分别以 5 种不同处理方法得到的样本, S1~S5 为批号 H1900210 的甘草, S6~S10 为批号 H1900220 的甘草, S11~S15 为批号 H1900230 的甘草。

表 1 甘草饮片信息  
Table 1 Information of GRRP

| 样本编号 | 批号       | 加工方法       |
|------|----------|------------|
| S1   | H1900210 | 未加工        |
| S2   | H1900210 | 淋润         |
| S3   | H1900210 | 常压蒸润       |
| S4   | H1900210 | 70 °C 减压蒸润 |
| S5   | H1900210 | 85 °C 减压蒸润 |
| S6   | H1900220 | 未加工        |
| S7   | H1900220 | 淋润         |
| S8   | H1900220 | 常压蒸润       |
| S9   | H1900220 | 70 °C 减压蒸润 |
| S10  | H1900220 | 85 °C 减压蒸润 |
| S11  | H1900230 | 未加工        |
| S12  | H1900230 | 淋润         |
| S13  | H1900230 | 常压蒸润       |
| S14  | H1900230 | 70 °C 减压蒸润 |
| S15  | H1900230 | 85 °C 减压蒸润 |

## 2.2 不同软化方法的甘草总黄酮和总皂苷测定

**2.2.1 对照品溶液的制备** 精密称取甘草苷适量, 用甲醇溶解, 定容至 10 mL 量瓶中, 得质量浓度为 0.884 mg/mL 的对照品溶液, 备用。精密称取甘草酸适量, 用甲醇溶解, 定容至 10 mL 量瓶中, 得质量浓度为 0.946 mg/mL 的对照品溶液, 备用。

## 2.2.2 供试品溶液的制备

(1) 总黄酮供试品溶液: 精密称取不同加工方法得到的甘草样品粉末 (S1~S15 各样品分别打粉、混匀, 过三号筛) 0.25 g, 加 25 mL 甲醇, 称定质量, 超声 40 min, 再次称定质量, 补足损失的质量后滤过, 收集滤液, 即得。

(2) 总皂苷供试品溶液: 精密称取不同加工的甘草样品粉末 (S1~S15 各样品分别打粉、混匀, 过三号筛) 0.25 g, 加含 1% 氨水的甲醇 25 mL, 称定质量, 超声 1 h, 再次称定质量, 补足损失的质量后滤过, 收集滤液, 即得。

## 2.2.3 检测波长

(1) 总黄酮的检测波长: 精确吸取甘草苷对照品溶液及供试品溶液 0.5 mL, 分别加入甲醇 1 mL, 再加入 10% KOH 溶液 0.5 mL, 放置 5 min 后用甲醇定容至 10 mL, 再精确吸取甘草苷对照品溶液及供试品溶液 0.5 mL, 分别加入甲醇直接定容至 10 mL 作为空白对照, 于 200~700 nm 处进行全波长扫描。结果表明, 甘草苷对照品溶液及供试品溶液在 336 nm 处有最大吸收, 故选择 336 nm 测定总黄酮的含量。

(2) 总皂苷的检测波长: 精确吸取甘草酸对照品溶液及供试品溶液 0.2 mL, 70 °C 水浴挥干溶剂, 加入 0.2 mL 5% 香草醛-冰醋酸溶液, 加入 0.8 mL 高氯酸, 摇匀, 55 °C 水浴 20 min, 流水冷却至室温, 冰醋酸定容至 5 mL, 另以甲醇同法显色处理作为空白溶液, 于 200~700 nm 处进行全波长扫描。结果表明甘草酸对照品溶液及供试品溶液在 594 nm 处有最大吸收, 故选择 594 nm 测定总皂苷的含量。

## 2.2.4 方法学考察

(1) 线性关系考察: 精确吸取甘草苷、甘草酸对照品溶液各 20、50、100、200、400  $\mu$ L, 按“2.2.3”项下方法制备不同质量浓度的对照品溶液及空白溶液, 分别于 336、594 nm 处测定吸光度 ( $A$ ) 值。分别以甘草苷、甘草酸的质量浓度为横坐标 ( $X$ ), 以  $A$  值为纵坐标 ( $Y$ ) 绘制标准曲线, 得其回归方程分别为  $Y=6.5969X-0.0934$ ,  $r=0.9978$  和  $Y=2.0369X-0.0086$ ,  $r=0.9980$ 。结果表明, 总黄酮检测质量浓度在 1.768~35.360  $\mu$ g/mL 与  $A$  值呈良好线性关系, 总皂苷检测质量浓度在 3.784~75.680  $\mu$ g/mL 与  $A$  值呈良好线性关系。

(2) 精密度考察: 精确吸取甘草苷、甘草酸对照品溶液 50  $\mu$ L, 按“2.2.3”项下方法制备对应的

对照品溶液及空白溶液,甘草苷于 336 nm 处测定  $A$  值,重复 6 次, RSD 为 0.51%,甘草酸于 594 nm 处测定  $A$  值,重复 6 次, RSD 为 0.37%,表明该法精密度良好。

(3) 重复性考察:精密称取编号为 S1 的甘草粉末 6 份,按“2.2.2”项下方法分别制备成供试品溶液,按“2.2.3”项下方法测定总黄酮及总皂苷,结果总黄酮平均质量分数为 5.99%, RSD 为 1.53%,总皂苷平均质量分数为 11.95%, RSD 为 2.16%,表明该方法重复性良好。

(4) 稳定性考察:精密称取编号为 S1 的甘草粉末 1 份,按“2.2.2”项下方法分别制备成供试品溶液,按“2.2.3”项下方法每隔 20 min 测定总黄酮及总皂苷,计算得 RSD 分别为 2.33%、2.07%,表明样品溶液在 2 h 内稳定。

(5) 加样回收率考察:精密称取已知含量的编号为 S1 的甘草粉末 125.0 mg, 6 份,分别加入含样品量 100%的对照品溶液,按“2.2.2”项下方法分别制备成供试品溶液,按“2.2.3”项下方法测定总黄酮及总皂苷的  $A$  值,计算平均加样回收率。结果总黄酮及总皂苷平均加样回收率分别为 97.5%、98.7%, RSD 分别为 2.68%、2.11%,表明所建立含量测定方法准确度良好。

**2.2.5 不同软化方法甘草中总黄酮、总皂苷测定结果** 按“2.2.2”项下方法将 S1~S15 样品分别制备成供试品溶液,按“2.2.3”项下方法测定总黄酮及总皂苷的含量,并计算综合得分(综合得分=总黄酮质量分数 $\times$ 50%+总皂苷质量分数 $\times$ 50%),实验结果见表 2。结果表明,未处理过的甘草中总黄酮与总皂苷的含量最高,淋润的总黄酮与总皂苷含量偏低。常压蒸润、70℃减压蒸润和 85℃减压蒸润这 3 种处理方法在 3 批甘草处理结果中各有高低, H1900210 批次甘草 85℃减压蒸润处理后的总黄酮与总皂苷的含量最高, H1900220 批次甘草 70℃减压蒸润处理后的总黄酮与总皂苷的含量最高, H1900230 批次甘草常压蒸润处理后的总黄酮与总皂苷的含量最高。

## 2.3 不同软化方法的甘草多成分含量测定

**2.3.1 色谱条件** 色谱柱为大连依利特 Hypersil ODS2 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m),流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液,梯度洗脱:0~12 min, 20%乙腈; 12~15 min, 20%~24%乙腈; 15~25 min, 24%乙腈; 25~32 min, 24%~37%乙腈; 32~45 min,

表 2 不同软化方法甘草中总黄酮、总皂苷质量分数 ( $n=3$ )  
Table 2 Content of total flavonoids and saponins in GRRP by different softening methods ( $n=3$ )

| 编号  | 软化方法    | 总黄酮/% | 总皂苷/% | 综合得分/% | 排名 |
|-----|---------|-------|-------|--------|----|
| S1  | 未加工     | 6.04  | 11.94 | 8.990  | 1  |
| S2  | 淋润      | 5.49  | 10.48 | 7.985  | 4  |
| S3  | 常压蒸润    | 5.19  | 10.61 | 7.900  | 5  |
| S4  | 70℃减压蒸润 | 5.89  | 10.12 | 8.005  | 3  |
| S5  | 85℃减压蒸润 | 5.16  | 11.32 | 8.240  | 2  |
| S6  | 未加工     | 5.62  | 11.53 | 8.575  | 1  |
| S7  | 淋润      | 4.09  | 10.70 | 7.395  | 5  |
| S8  | 常压蒸润    | 4.15  | 11.16 | 7.655  | 4  |
| S9  | 70℃减压蒸润 | 4.71  | 11.28 | 7.995  | 2  |
| S10 | 85℃减压蒸润 | 4.26  | 11.13 | 7.695  | 3  |
| S11 | 未加工     | 6.37  | 11.41 | 8.890  | 1  |
| S12 | 淋润      | 4.69  | 9.53  | 7.110  | 5  |
| S13 | 常压蒸润    | 5.31  | 11.48 | 8.395  | 2  |
| S14 | 70℃减压蒸润 | 4.57  | 11.58 | 8.075  | 4  |
| S15 | 85℃减压蒸润 | 5.35  | 11.10 | 8.225  | 3  |

37%乙腈; 45~48 min, 37%~40%乙腈; 48~52 min, 40%~55%乙腈; 52~68 min, 55%~70%乙腈; 体积流量为 1 mL/min; 柱温 30℃; 检测波长 237 nm; 进样量 15  $\mu$ L。

**2.3.2 对照品溶液的制备** 精密称取各对照品适量,加甲醇配制含甘草苷 433.26  $\mu$ g/mL、芒柄花苷 13.23  $\mu$ g/mL、异甘草苷 124.25  $\mu$ g/mL、甘草素 78.705  $\mu$ g/mL、刺甘草查耳酮 48.0  $\mu$ g/mL、甘草酸 1 125.0  $\mu$ g/mL 的混合对照品溶液,避光置于 4℃冰箱中,备用。

**2.3.3 供试品溶液的制备** 精密称取甘草粉末 0.5 g,置具塞锥形瓶中,精密加入 70%乙醇 50 mL,密塞,称定质量,超声(功率 250 W,频率 40 kHz) 30 min,放冷,补足减失的质量,滤过,收集滤液即得。

## 2.3.4 方法学考察

(1) 线性关系考察:精密量取对照品溶液适量稀释成一系列不同质量浓度的混合对照品溶液,按“2.3.1”项下色谱条件进样 15  $\mu$ L 测定,每个质量浓度进样 2 针,记录各峰面积,以质量浓度为横坐标( $X$ ),峰面积为纵坐标( $Y$ ),计算标准曲线回归方程。结果分别为甘草苷  $Y=1\ 180.1\ X+124.1$ ,  $r=0.999\ 8$ , 43.33~433.3  $\mu$ g/mL; 芒柄花苷  $Y=1\ 750.6\ X+11.8$ ,  $r=0.999\ 1$ , 1.323~13.23  $\mu$ g/mL; 异甘草

苷  $Y=718.0 X+9.5$ ,  $r=0.999\ 7$ ,  $12.43\sim 124.3\ \mu\text{g/mL}$ ; 甘草素  $Y=2\ 313.0 X+17.4$ ,  $r=0.999\ 9$ ,  $7.871\sim 78.71\ \mu\text{g/mL}$ ; 刺甘草查耳酮  $Y=1\ 253.5 X+4.0$ ,  $r=0.999\ 8$ ,  $4.800\sim 48.0\ \mu\text{g/mL}$ ; 甘草酸  $Y=331.2 X+52.3$ ,  $r=0.999\ 9$ ,  $112.5\sim 1\ 125.0\ \mu\text{g/mL}$ 。

(2) 精密度考察: 精密称取编号为 S2 的甘草粉末 1 份, 按“2.3.3”项下方法制备成供试品溶液, 重复进样 6 次, 计算甘草苷、芒柄花苷、异甘草苷、甘草素、刺甘草查耳酮、甘草酸峰面积的 RSD 值分别为 0.38%、0.41%、0.33%、0.40%、0.95%、0.54%, 表明仪器精密度良好。

(3) 重复性考察: 精密称取编号为 S2 的甘草粉末共 6 份, 按“2.3.3”项下方法分别制备成供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件进样, 计算甘草苷、芒柄花苷、异甘草苷、甘草素、刺甘草查耳酮、甘草酸质量分数的 RSD 值分别为 0.93%、1.32%、1.03%、2.64%、1.99%、2.34%, 表明该方法重复性良好。

(4) 稳定性考察: 精密称取编号为 S2 的甘草粉末 1 份, 按“2.3.3”项下方法分别制备成供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样, 计算甘草苷、芒柄花苷、异甘草苷、甘草素、刺甘草查耳酮、甘草酸峰面积的 RSD 值分别为 1.98%、1.72%、2.83%、2.23%、1.59%、2.04%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

(5) 加样回收率考察: 精密称取已测定的编号为 S2 的甘草粉末 0.125 g, 共 9 份, 分成 3 组, 每组 3 份。分别精密添加相当于已知含量的甘草苷、芒柄花苷、异甘草苷、甘草素、刺甘草查耳酮、甘草酸的混合对照品溶液 0.5、1.0、1.5 mL, 制备成供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件测定, 计算平均回收率。结果甘草苷、芒柄花苷、异甘草苷、甘草素、刺甘草查耳酮、甘草酸平均加样回收率为 99.32%、97.21%、97.19%、99.23%、98.93%、101.23%, RSD 为 1.12%、2.41%、2.30%、1.09%、1.72%、2.44%。

**2.3.5 甘草多成分含量测定结果** 甘草样品中甘草苷、芒柄花苷、异甘草苷、甘草素、刺甘草查耳酮、异甘草素、甘草酸的含量见表 3。结果表明, 甘草酸在所有样品中均为含量最高的成分 (5.88%~8.82%), 甘草苷次之 (2.69%~3.89%), 未经过加工的甘草 (S1、S6、S11) 所有成分的含量均高于软化处理组。通过对不同软化处理方式的比较 (图 1) 发现, 甘草苷与芒柄花苷的含量在软化前后, 以及不同软化方法之间均没有显著性差异, 而异甘草苷、甘草素、刺甘草查耳酮、甘草酸在软化之后含量均有下降趋势, 软化处理后, 异甘草苷的含量显著降低 ( $P<0.01$ )。淋润后, 刺甘草查耳酮显著降低 ( $P<0.01$ ), 常压蒸润后含量也显著降低 ( $P<0.05$ )。甘草酸在淋润后, 含量显著降低 ( $P<0.05$ )。不同的软化处理组之间, 所有成分含量差异不显著。

表 3 不同软化方法甘草样品中 6 种成分的含量测定 ( $n=3$ )

Table 3 Determination of six components in GRRP by different softening methods ( $n=3$ )

| 编号  | 甘草苷/% | 芒柄花苷/% | 异甘草苷/% | 甘草素/% | 刺甘草查耳酮/% | 甘草酸/% |
|-----|-------|--------|--------|-------|----------|-------|
| S1  | 3.49  | 0.08   | 1.03   | 0.45  | 0.31     | 8.65  |
| S2  | 3.08  | 0.06   | 0.77   | 0.32  | 0.21     | 6.25  |
| S3  | 2.85  | 0.06   | 0.80   | 0.36  | 0.20     | 7.00  |
| S4  | 3.10  | 0.07   | 0.77   | 0.39  | 0.25     | 7.02  |
| S5  | 2.89  | 0.06   | 0.80   | 0.36  | 0.23     | 7.19  |
| S6  | 3.32  | 0.04   | 0.98   | 0.40  | 0.26     | 7.67  |
| S7  | 2.69  | 0.03   | 0.75   | 0.36  | 0.17     | 5.88  |
| S8  | 2.69  | 0.03   | 0.76   | 0.35  | 0.21     | 6.12  |
| S9  | 2.92  | 0.03   | 0.75   | 0.39  | 0.23     | 6.24  |
| S10 | 2.83  | 0.03   | 0.77   | 0.41  | 0.22     | 6.29  |
| S11 | 3.89  | 0.05   | 1.03   | 0.44  | 0.25     | 8.82  |
| S12 | 3.29  | 0.04   | 0.81   | 0.35  | 0.17     | 7.00  |
| S13 | 3.33  | 0.04   | 0.83   | 0.38  | 0.20     | 7.38  |
| S14 | 3.36  | 0.04   | 0.83   | 0.39  | 0.21     | 7.56  |
| S15 | 3.36  | 0.04   | 0.84   | 0.38  | 0.21     | 7.53  |

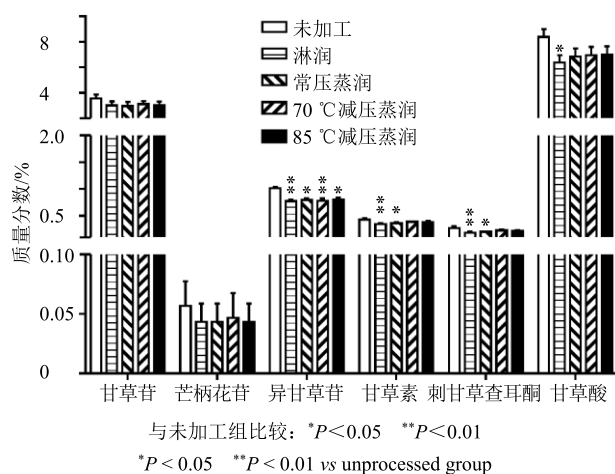


图 1 5 种处理方式的甘草成分含量比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 1 Comparison of components content in GRRP with five different processing methods ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

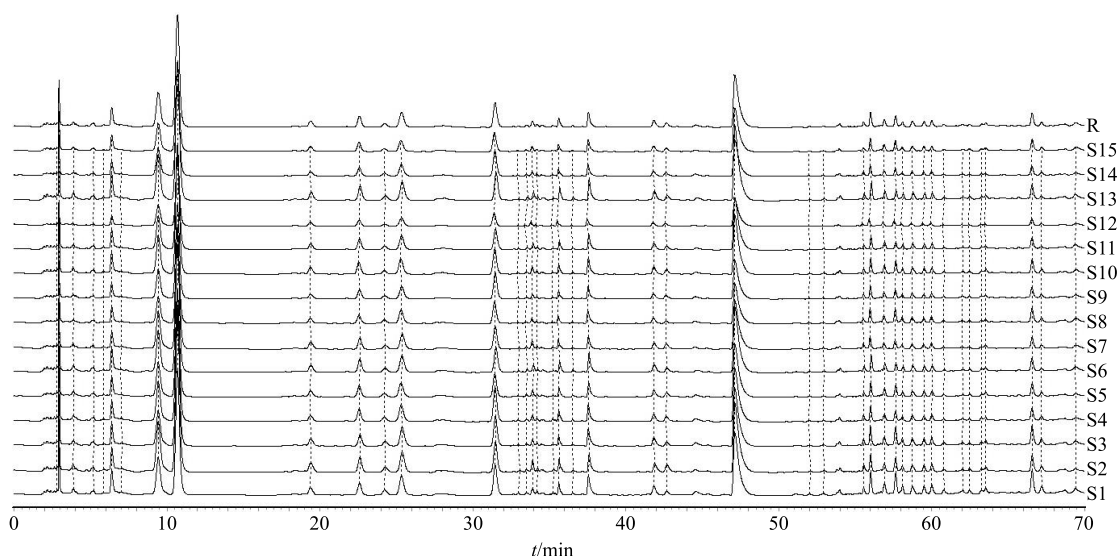


图 2 15 批甘草样品指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprints of 15 batches of GRRP samples

似度分析,结果显示 15 批甘草样品的相似度均大于 0.99,表明甘草不同加工后的得到的饮片具有较好的一致性。

**2.4.2 聚类分析** 将甘草指纹图谱标定的 15 个色谱峰峰面积导入 SPSS 24.0 统计软件,峰面积数据进行 Z 得分标准化后,再以平方 Euclidean 距离为度量标准,采用组间联接法,对标准化的数据进行系统聚类,结果见图 4。根据聚类分析结果,在度量距离为 25 时,15 批甘草样品为一类,而 3 批甘草的不同软化处理方法样品与未加工组分别聚为一类。说明 3 批甘草间质量存在差异,而不同软化处理对于甘草成分组成没有显著差异,与相似度分析结果一致。

## 2.4 不同软化方法的甘草指纹图谱研究

**2.4.1 指纹图谱研究** 精密称取编号为 S1~S15 的甘草粉末,按“2.3.3”项下方法分别制备成供试品溶液,按“2.3.1”项下色谱条件进样,得到 HPLC 指纹图谱。通过中药色谱指纹图谱相似度评价软件系统(2012 年版),以 S1 的指纹图谱作为参照图谱,采用平均数法,进行多点校正和色谱峰匹配,得到不同软化处理后甘草样品的指纹图谱,见图 2。

根据指纹图谱分析结果,共标定了 15 个共有峰,经对照品指认,确认了其中的 6 个共有峰,分别为甘草苷(2 号峰)、芒柄花苷(5 号峰)、异甘草苷(6 号峰)、甘草素(7 号峰)、刺甘草查耳酮(9 号峰)、甘草酸(12 号峰),见图 3。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 年版)软件进行相

## 3 讨论

本研究在前期查阅文献的基础上<sup>[16-19]</sup>,结合实际情况,考察了甘草 4 种软化工艺包括淋润、常压蒸润、70 °C 减压蒸润、85 °C 减压蒸润。通过真空干燥箱加温将水汽化后软化药材,可实施性较高,故本研究用其来模拟减压蒸润。淋润分别考察了 5、6、7、8 h 4 个时间点,常压蒸润、70 °C 减压蒸润、85 °C 减压蒸润 3 种软化方法分别考察了 10、15、20、25、30 min 5 个时间点,观察甘草的软化程度及测定其吸水量。当软化时间过短,软化未完全,当软化时间过长,甘草吸水过多,切制时容易出现连刀片,也容易切烂。结果发现当药材含水量约为 40% 左右时,水分已渗透入药材内部,适合切制,

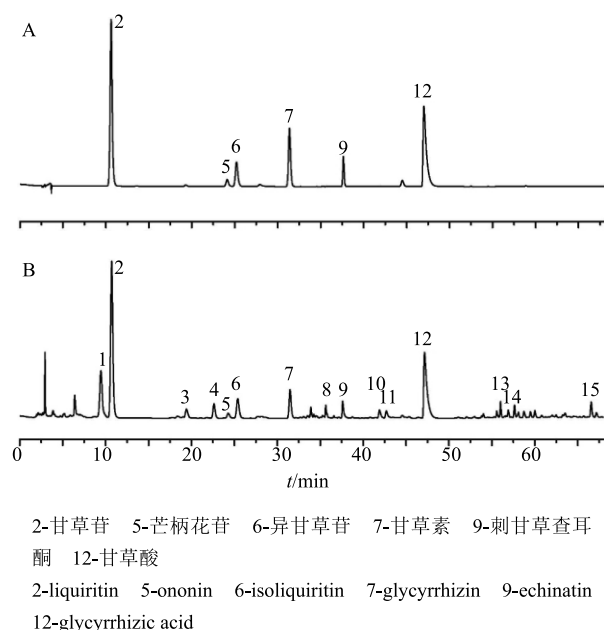


图 3 混合对照品 HPLC 图 (A) 及指纹图谱共有模式 (B)  
Fig. 3 HPLC of mixed reference substances (A) and chromatogram of reference fingerprint of GRRP (B)

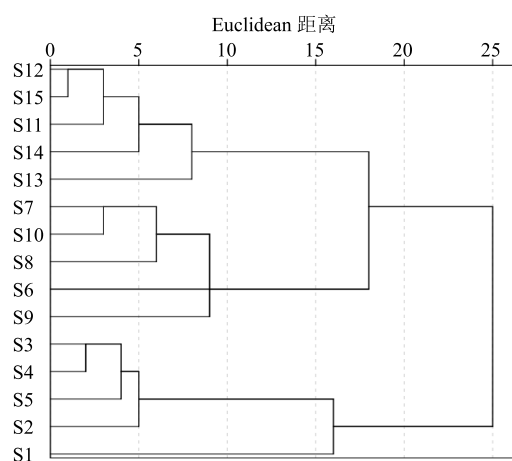


图 4 15 批样品聚类树状图

Fig. 4 Dendrogram of 15 batches of samples

最终确定不同软化工艺为淋润 6 h、常压蒸润 15 min、70 °C 减压蒸润 25 min、85 °C 减压蒸润 20 min。

通过甘草苷、芒柄花苷、异甘草苷、甘草素、刺甘草查耳酮、甘草酸作为甘草多成分含量测定的评价指标,并结合总黄酮、总皂苷的测定,对不同软化处理后的甘草进行全面的质量评价。结果表明,3 批甘草的内在品质存在差异,可能是由于收集的样品均为野生,且生长年限不同。已研究表明,甘草活性成分含量会随生长年限变化而升高<sup>[31-32]</sup>,从而导致不同年限的药材质量出现差别。不同方法软化后发现,未加工的甘草各指标含量最高,不同软

化处理后成分均有所流失,其中异甘草苷的含量均显著降低,可能与其水溶性较好有关<sup>[33-34]</sup>。不同的软化方式间,淋润的甘草整体水分含量不均,药材表面与内部质地软化程度有所差别,甘草成分流失最多,原因可能为淋润软化的时间较长,部分成分溶于水所致。常压蒸润所需时间最短,软化甘草较生品而言表面红棕色略有加深,蒸润过程中大量的高温水蒸气与甘草药材接触,部分在表面凝聚成水滴滴落,成分也随之流失。减压蒸润能够使药材在负压条件下,充分吸收蒸气,整体水分含量均匀,外观色泽上更接近原药材,相比更有利于成分的保留,其中 70 °C 减压蒸润最优,但在实际操作过程中,减压蒸润需要药材处于真空环境下,操作步骤较为繁琐,耗时略长。指纹图谱的结果表明,不同软化处理方法对于甘草整体化学成分组成无显著差异,相似度较高。综合上述结果,最终结合企业实际生产中需要控制成本,提高效率等需求,常压蒸润的软化方式更具有优势。

本实验还进行了不同干燥方法对甘草的质量影响研究,比较了晒干、60 °C 烘干、80 °C 烘干。结果表明,晒干后的甘草各指标含量较低,60 °C 烘干和 80 °C 烘干的甘草质量较优,两者间无显著性差异。因此在实际生产过程中将干燥温度控制在 60~80 °C 较为合适。

利用常压蒸润的加工方法具有较高可行性,保留其有效成分同时能够极大地节约时间,提高生产效率。甘草饮片工业化大生产的具体工艺参数有待后期进行更深一步的研究,以期甘草饮片生产现代化、产业化发展奠定基础。

#### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 裴玉琼, 石海培, 严 辉, 等. 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 [J]. 中草药, 2019, 50(18): 4293-4304.
- [3] 张明发, 沈雅琴. 甘草及其活性成分对生殖系统药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2014, 37(4): 367-374.
- [4] Shin E M, Zhou H Y, Guo L Y, et al. Anti-inflammatory effects of glycyrol isolated from *Glycyrrhiza uralensis* in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages [J]. *Int Immunopharmacol*, 2008, 8(11): 1524-1532.
- [5] Adianti M, Aoki C, Komoto M, et al. Anti-hepatitis C virus compounds obtained from *Glycyrrhiza uralensis* and other *Glycyrrhiza* species [J]. *Microbiol Immunol*,

- 2014, 58(3): 180-187.
- [6] Wang W, Hu X, Zhao Z, *et al.* Antidepressant-like effects of liquiritin and isoliquiritin from *Glycyrrhiza uralensis* in the forced swimming test and tail suspension test in mice [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2008, 32(5): 1179-1184.
- [7] Ji S, Li Z, Song W, *et al.* Bioactive constituents of *Glycyrrhiza uralensis* (Licorice): Discovery of the effective components of a traditional herbal medicine [J]. *J Nat Prod*, 2016, 79(2): 281-292.
- [8] 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.
- [9] 马帅, 王诺, 杨光, 等. 我国甘草及其制品进出口调查研究 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(11): 2193-2199.
- [10] 曾飞. 甘草配方颗粒生产过程固体废物资源化价值发现与转化利用 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2018.
- [11] 王琼, 李捷, 司马依·合斯莱提. 新疆甘草资源开发利用现状与保护措施 [J]. *草食家畜*, 2018, 3(2): 52-56.
- [12] 朱子博. 甘草提取甘草酸后废料的综合利用 [D]. 洛阳: 河南科技大学, 2019.
- [13] 李燕, 许润春. 浅谈目前润药过程中存在的问题 [J]. *中药与临床*, 2018, 9(3): 14-18.
- [14] 龚千锋, 郑晗, 张凤. 甘草采收、加工与炮制 [J]. *江西中医药*, 2007, 38(10): 58-59.
- [15] 刘影, 侯俊玲, 王文全. 甘草产地加工技术调查研究 [J]. *中国现代中药*, 2013, 15(7): 580-583.
- [16] 李智, 于泳. 气相置换法加工甘草饮片的工艺研究 [J]. *黑龙江医药*, 2006, 19(2): 116-117.
- [17] 梁新松. 甘草最佳软化方法探讨 [J]. *时珍国医国药*, 2001, 12(4): 322-323.
- [18] 冯薇, 王文全, 赵平然, 等. 甘草润制前后药用活性成分比较研究 [J]. *时珍国医国药*, 2007, 18(8): 1804-1806.
- [19] 陈洁, 戴衍朋, 孙立立, 等. Box-Behnken 设计-效应面法优选甘草切制工艺 [J]. *中草药*, 2013, 44(12): 1579-1583.
- [20] Wang Y, Zhang X, Ma X, *et al.* Study on the kinetic model, thermodynamic and physicochemical properties of *Glycyrrhiza* polysaccharide by ultrasonic assisted extraction [J]. *Ultrason Sonochem*, 2019, 51: 249-257.
- [21] 孙晓燕, 王继龙, 刘晓霞, 等. 络合萃取异甘草苷的工艺条件研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(20): 4920-4924.
- [22] Shabkhiz M A, Eikani M H, Bashiri Sadr Z, *et al.* Superheated water extraction of glycyrrhizic acid from licorice root [J]. *Food Chem*, 2016, 210: 396-401.
- [23] 周博, 蒲红利, 王继龙, 等. 基于超滤-络合萃取及反萃取技术的甘草苷制备工艺研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(5): 1095-1099.
- [24] Zhou Y L, Ho W S. Combination of liquiritin, isoliquiritin and isoliquirigenin induce apoptotic cell death through upregulating p53 and p21 in the A549 non-small cell lung cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(1): 298-304.
- [25] Dong L, Yin L, Zhang Y, *et al.* Anti-inflammatory effects of ononin on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells [J]. *Mol Immunol*, 2017, 83(3): 46-51.
- [26] Cinatl J, Morgenstern B, Bauer G, *et al.* Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus [J]. *Lancet*, 2003, 361(9374): 2045-2046.
- [27] Ming L J, Yin A C Y. Therapeutic effects of glycyrrhizic acid [J]. *Nat Prod Commun*, 2013, 8(3): 415-418.
- [28] 梁帅杰, 青梅, 于娟, 等. 不同种苗类型甘草的质量评价研究 [J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(6): 1459-1462.
- [29] 张友波, 徐崑, 杨秀伟, 等. RP-HPLC 法同时测定不同产地甘草中9个主要成分的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2013, 33(2): 214-219.
- [30] 吴皓, 胡昌江. 中药炮制学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012.
- [31] 冯薇, 王文全, 赵平然. 栽培年限和采收期对甘草总皂苷、总黄酮含量的影响 [J]. *中药材*, 2008, 31(2): 184-186.
- [32] 魏胜利, 王文全, 王继永, 等. 我国不同产区野生与栽培甘草的甘草酸含量及其影响因子的初步研究 [J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(10): 1341-1345.
- [33] 张翠英, 常断玲, 周应群, 等. 乌拉尔甘草水溶性成分的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. *北京中医药大学学报*, 2009, 32(12): 842-845.
- [34] 郑云枫, 段伟萍, 杨阳, 等. 多成分定性/定量分析结合模式识别分析3个主产区乌拉尔甘草水溶性特征组分 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(12): 2544-2551.