

DOI 10.19656/j.cnki.1002-2406.20230707

不同土质和生长年限甘草HPLC指纹图谱 及3种成分含量测定研究

刘梅清,冯晓莉,刘媛媛,徐镜文,魏舒畅[✉],刘晓霞,万玲娟

(甘肃中医药大学药学院,甘肃 兰州 730000)

【摘要】目的:探究不同土质和生长年限甘草中甘草酸、甘草苷和甘草总黄酮的含量差异,并结合化学计量学分析方法为甘草质评质控体系的构建及其种植土质和适宜采收时间提供实验依据和参考。方法:采用HPLC法测定甘草苷和甘草酸含量,色谱条件:色谱柱为Symmetry C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流速1.0 mL/min,检测波长237 nm,柱温26℃,流动相为乙腈-0.05%磷酸水梯度洗脱系统;采用紫外分光光度法测定甘草总黄酮含量,运用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.1版)对HPLC指纹图谱进行共有峰确定和相似度评价;运用OriginPro软件(2021版)对含量测定结果进行3D绘图分析;运用SPSS Statistics 25统计学分析软件对样品进行聚类分析。结果:不同土质和生长年限栽培甘草HPLC指纹图谱共匹配24个共有峰成分,样品间相似度为0.917~0.991;3D绘图分析结果表明,不同土质和生长年限栽培甘草质量排序为3年沙地>5年沙地>3年土地>4年沙地>5年土地>4年土地,沙地种植的甘草质量明显高于土地;聚类分析结果可将不同土质和生长年限栽培甘草样品完全区分。结论:本研究所建立的甘草HPLC指纹图谱并结合化学计量学分析方法稳定可靠,可用于甘草质量评价研究与开发潜在标志物的探索。

【关键词】不同土质;生长年限;甘草;含量测定;化学计量学;质量评价

【引用格式】

刘梅清,冯晓莉,刘媛媛,等.不同土质和生长年限甘草HPLC指纹图谱及3种成分含量测定研究[J].中医药信息,2023,40(7):47-52.

LIU M Q, FENG X L, LIU Y Y, et al. Study on quality of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* with different soil quality and growth years[J]. Information on TCM, 2023, 40(7):47-52.

甘草(*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*)为常用中药材,在制药、食品、化工和印染等方面都有广泛应用^[1]。甘草的活性成分主要为三萜皂苷类、甘草总黄酮类及多糖类^[2]。其中三萜皂苷类主要含甘草酸,具有抗炎、抗病毒、抗癌、保肝等多种药理作用^[3];甘草总黄酮具有抗炎、抗病毒、抗氧化、强心、镇静和镇痛等作用^[4-6],甘草苷属于黄酮类的一种,对消化性溃疡、胃肠痉挛等有治疗作用,同时可改善血液循环,增强抵抗力^[7]。

近年来,由于掠夺性采挖,导致野生资源日趋枯竭,甘草药材的市场需求主要依靠栽培品供给^[8-9],其

质量易受生长环境、土质、生长年限的影响^[10],而中药质量控制和评价方法参差不齐,导致市售甘草品质存在良莠不齐的现象,直接影响临床疗效^[11]。目前,有关甘草HPLC指纹图谱的研究,大多集中于不同基原和产区的差异比较^[12-15],而对不同土质和生长年限栽培甘草之间的差异研究鲜有报道。因此,本实验联合使用HPLC和紫外分光光度法并结合化学计量学分析方法对不同土质和生长年限的栽培甘草进行质量分析,旨在找寻栽培甘草的适宜采收时间及种植土质,为栽培甘草的规范化种植提供实验依据,同时亦为其他中药材的质量

基金项目:甘肃省教育厅“双一流”科研重点项目(GSSYLXM-05)

第一作者简介:刘梅清(1996-),女,硕士研究生,主要从事中药制剂工艺研究工作。

✉通信作者简介:魏舒畅(1969-),男,教授,主要从事中药制剂工艺研究工作。

评价方法提供参考。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(美国 Waters 公司, Waters e2695);超声波双频清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司, 25-12DTS);双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司, T9CS);Symmetry C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);ABT-100-5M-型分析天平(德国 KERN 公司, 十万分之一);200 × g 手提式高速粉碎机(温岭市林大机械有限公司, DFT-200A)。

乙腈、乙醇、甲醇为色谱纯;磷酸、氢氧化钾为分析纯;水为超纯水。甘草苷对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 111610-201607, 供含量测定用);甘草酸铵对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110731-201619, 供含量测定用)。

不同土质和生长年限甘草药材(3年生、4年生、5年生)采自甘肃瓜州种植基地, 在每个年限栽培小区中随机挖取 20~30 株, 所有样品用毛刷刷净泥土等杂质, 从各个部位分别剪下一部分, 低温烘干, 粉碎过 3 号筛备用。样品经甘肃中医药大学药学院魏舒畅教授鉴定为豆科植物甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)

的干燥根及根茎。

2 方法与结果

2.1 甘草酸、甘草苷的含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备

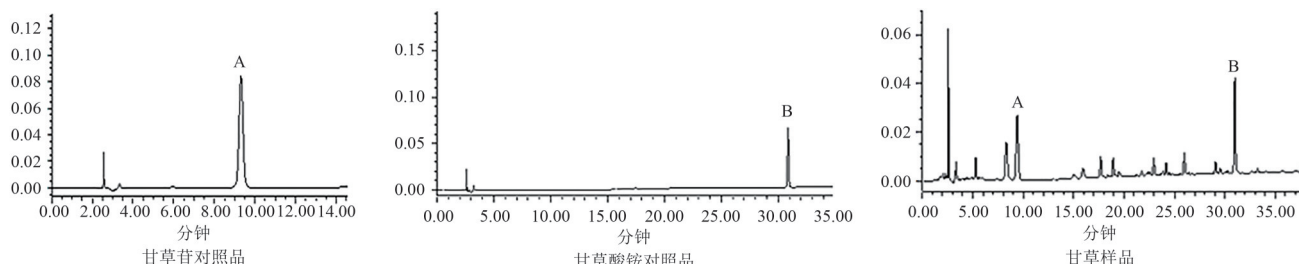
精密称取甘草酸铵、甘草苷对照品适量, 加 70% 乙醇分别制成含甘草酸铵 0.0207 mg/mL 和甘草苷 0.057 mg/mL 的对照品溶液, 备用。

2.1.2 供试品溶液的制备

取本品粉末(过 3 号筛)约 0.2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入体积分数 70% 乙醇 100 mL, 称重, 超声 30 min(功率 250 W, 频率 40 kHz), 放冷, 称重, 用体积分数 70% 乙醇补足减失的重量, 摇匀, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得^[16]。

2.1.3 色谱条件

色谱柱为 Symmetry C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相为 0.05% 磷酸水溶液-乙腈;梯度洗脱: 0~8 min, 19% 乙腈, 8~35 min, 19%~50% 乙腈, 35~36 min, 50%~100% 乙腈, 36~40 min, 100%~19% 乙腈;检测波长为 237 nm;柱温 26 °C;体积流量 1.0 mL/min;进样量 10 μL。色谱图见图 1。



注: A 为甘草苷; B 为甘草酸。

图1 甘草样品与对照品 HPLC 图

2.1.4 线性关系考察

精密吸取上述 2 种对照品溶液, 分别进样, 甘草酸铵溶液进样体积为 2、5、10、15、20、25、30 μL, 甘草苷溶液进样体积为 1、2、5、10、15、20 μL, 注入高效液相色谱仪测定。以峰面积值为纵坐标(Y), 进样体积为横坐标(X)进行线性回归, 得甘草酸的回归方程为 $Y = 12.02X - 2.070$, $r^2 = 1$, 线性范围 0.041 4~0.621 μg; 得甘草苷的回归方程为 $Y = 114.5X + 9.598$, $r^2 = 0.999$, 线性范围 0.057~1.14 μg。

2.1.5 精密度试验

精密吸取甘草酸铵及甘草苷对照品溶液各 10 μL, 按“2.1.3”项下色谱条件连续进样 6 次。结果甘草酸铵峰面积的 RSD 为 0.97%, 甘草苷峰面积 RSD 为 1.43%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验

按“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1.3”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算含量。结果甘草酸含量的 RSD 为 1.76%, 甘草苷含量的 RSD 为 1.31%, 表明该方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验

取同一份供试品溶液, 于 0、1、4、8、12、24、48 h 进样测定。结果甘草酸含量的 RSD 为 1.36%, 甘草苷含量的 RSD 为 0.89%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.1.8 加样回收率试验

取已测定含量的同一批供试品溶液 9 份, 分为 3 组, 每组分别按已知含量的 50%、100%、150% 比例精密加入相应的甘草酸铵、甘草苷对照品溶液, 按“2.1.3”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算回收率。结果甘草酸和甘草苷的平均加样回收率分别为

99.45%、100.03%,RSD 分别为2.10%、1.59%,表明该方法合理可靠、准确度较高。

2.2 甘草总黄酮的含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备

精密称定甘草苷对照品 1.57 mg,置于 10 mL 容量瓶中,纯甲醇溶解并定容至刻度,备用。

2.2.2 检测波长的确定

精密吸取甘草苷对照品溶液 2 mL,加甲醇 5 mL,再加 10% KOH 溶液 1.25 mL,室温放置 5 min,甲醇定容至 25 mL,以甲醇为参比,于 200 ~ 600 nm 处扫描,结果在 335 nm 处有最大吸收峰,以同样的方法对甲醇和 10% KOH 溶液进行扫描,结果发现此处无吸收^[17]。另精密吸取测定甘草总黄酮的样品溶液 1.25 mL,依上述操作,结果在 335 nm 处同样有吸收峰,因此确定甘草总黄酮的检测波长为 335 nm。

2.2.3 标准曲线的制备

分别精密吸取甘草苷对照品溶液 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL,置于 25 mL 容量瓶中,加入甲醇 5 mL,再加入 10% KOH 溶液 1.25 mL,在室温下放置 5 min,甲

醇定容,以甲醇为参比,测定 335 nm 处的吸光度。以甘草苷对照品浓度 C (μg/mL)为横坐标,吸光度 A 为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $A = 0.06372C + 0.08011$ ($r = 0.9997$),线性范围为 1.593 ~ 15.93 μg/mL。

2.2.4 样品的测定

精密量取同“2.1.2”的供试品溶液 1 mL,用纯水稀释至 25 mL,摇匀,在精密量取该溶液 2 mL,显色方法同“2.2.2”。在波长 335 nm 处测定吸光度,从标准曲线上读出供试品溶液中总黄酮的浓度,计算即得总黄酮的含量。

2.3 不同土质和生长年限甘草中有效成分含量测定结果

取 3 ~ 5 年生不同土质栽培甘草样品,共 6 批,每批样品各取 3 份,分别按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.3”项下色谱条件进样,记录峰面积,外标法计算甘草酸和甘草苷含量,按“2.2.4”项下方法测定甘草总黄酮含量。由结果可明显看出,沙地种植的甘草质量明显高于土地,不同年限生长的甘草,质量最好的为 3 年生,5 年次之,4 年较差。具体结果见表 1。

表1 不同土质和生长年限甘草中甘草酸、甘草苷及甘草总黄酮含量测定结果(%)

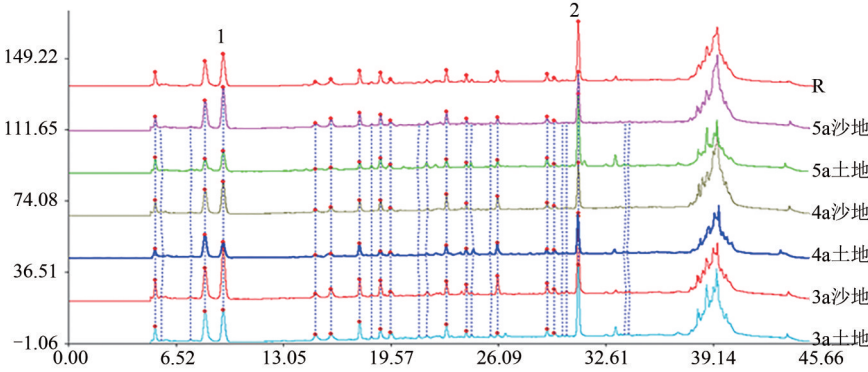
土质	3年生			4年生			5年生		
	甘草酸	甘草苷	甘草总黄酮	甘草酸	甘草苷	甘草总黄酮	甘草酸	甘草苷	甘草总黄酮
土地	2.70	0.59	2.41	1.57	0.31	1.26	1.94	0.38	1.48
	2.69	0.58	2.36	1.55	0.30	1.22	1.92	0.37	1.46
	2.72	0.61	2.49	1.59	0.31	1.27	1.96	0.39	1.52
	2.81	0.96	3.79	1.73	0.59	2.37	2.77	0.77	2.96
沙地	2.91	0.99	3.92	1.70	0.59	2.30	2.75	0.76	2.92
	2.85	0.97	3.79	1.76	0.57	2.30	2.80	0.79	3.03

2.4 化学计量学分析

2.4.1 特征图谱的建立和相似度评价

本实验建立了 3 ~ 5 年生不同土质栽培甘草 HPLC 指纹图谱,并将指纹图谱数据以 AIA 格式导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012.1 版)中,由于 3 年沙地色谱峰的峰面积相对较高且分离度较好,故

将其作为参照图谱,剪切保留时间小于 5 min 的溶剂峰,采用平均数法,时间窗宽度为 0.10 min,多点校正后进行全谱峰匹配,生成对照图谱,见图 2。共确定了 24 个共有峰,样品间相似度在 0.917 ~ 0.991,通过与对照品色谱图(图 1)比对,指认了 2 个成分,分别为甘草苷(1 号峰)和甘草酸(2 号峰)。



注:1为甘草苷;2为甘草酸。

图2 不同土质和生长年限甘草药材 HPLC 特征图谱

2.4.2 不同土质和生长年限甘草中有效成分质量分数动态变化分析

运用 OriginPro 2021 版软件对不同土质和生长年限甘草中主要有效成分含量测定结果进行 3D 绘图分析,见图 3。可明显看出不同土质和生长年限栽培甘草中甘草苷、甘草酸和甘草总黄酮的质量分数差异较大,其中沙地种植的甘草质量明显高于土地,3年生甘草中各类成分明显高于4年生和5年生。不同土质和生长年限栽培甘草质量排序为3年沙地>5年沙地>3年土地>4年沙地>5年土地>4年土地。

2.4.3 聚类分析

将不同土质和生长年限栽培甘草中测定的3个有效成分含量导入 SPSS Statistics 25 统计学软件,采用组间联接法,以平方欧式距离为测度,对 18 批样品进行聚类分析,见图 4。结果,同一土质及生长年限的甘草

被聚为一类,当欧式距离为 10 时,18 批样品被聚为三大类,说明不同土质和生长年限甘草样品之间,其质量差异较大,其中 3 年沙地为一类,5 年沙地和 3 年土地为一类,其他样品为一类。

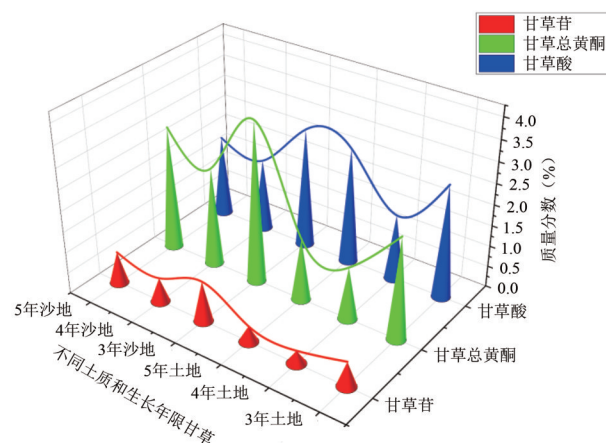


图3 不同土质和生长年限甘草中有效成分质量分数动态变化图

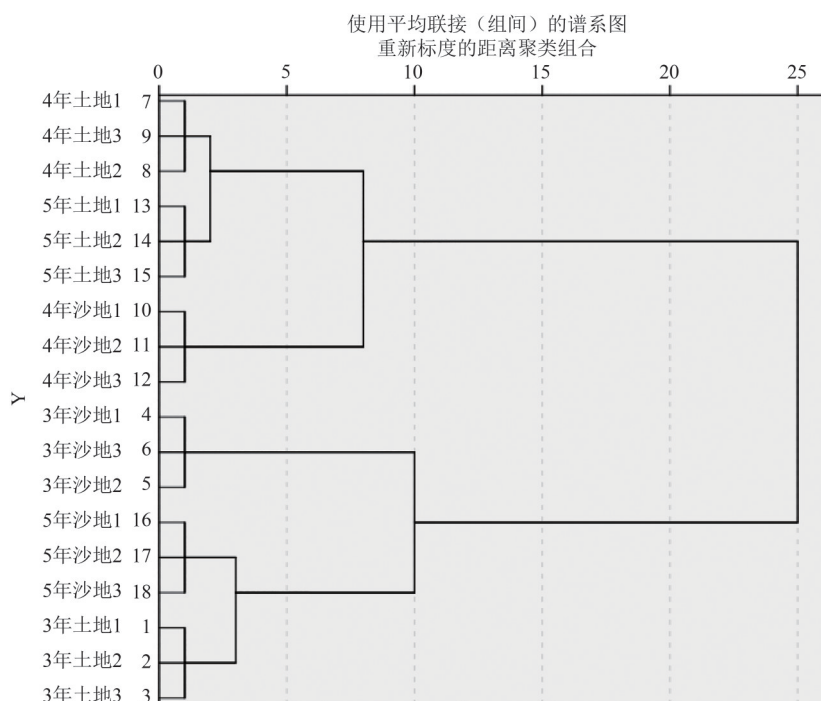


图4 不同土质和生长年限甘草样品聚类谱系图

3 讨论

甘草的主要化学成分为三萜皂苷和总黄酮类,深入研究该类成分在不同土质和生长年限之间的差异对于全面控制甘草质量具有重要意义。本实验采用 HPLC 法对甘草中的甘草苷和甘草酸进行含量测定,采用 UV 法对甘草总黄酮进行含量测定,总黄酮的含量测定一般选用芦丁、甘草苷、柚皮素作为对照品^[18],本实验选用甘草苷,是因为甘草总黄酮类成分主要是二氢黄酮(甘草苷、甘草素)和查尔酮(异甘草苷、异甘草素),但是芦丁属于黄酮醇类化合物,因此,选用甘草苷作为对照品更

合理,误差更小。显色原理为二氢黄酮在碱液条件下开环,可以转变成异构体-查尔酮类化合物。

本实验建立了不同土质和生长年限栽培甘草的指纹图谱并对其进行相似度评价,提取出 24 个共有峰,相似度均在 0.917 以上,说明不同土质和生长年限甘草中有效成分种类相对稳定。运用 OriginPro 2021 版软件对含量测定结果进行 3D 绘图分析,运用 SPSS Statistics 25 统计学软件对 18 批样品进行聚类分析,结果表明不同土质和生长年限的甘草质量差异显著,3 年生沙地甘草质量最好,当中的甘草酸、甘草苷与甘

草总黄酮质量分数分别可达到2.86%、0.97%、3.83%。不同土质和生长年限栽培甘草质量排序为3年沙地>5年沙地>3年土地>4年沙地>5年土地>4年土地,可明显看出,沙地种植的甘草质量明显高于土地,因此,甘草更适合种植于沙地中,最佳生长期为3年;聚类分析结果可将不同土质和生长年限栽培甘草样品完全区分,当欧式距离为10时,18批样品被聚为三大类,其中3年沙地为一类,5年沙地和3年土地为一类,其他样品为一类。

综上所述,HPLC指纹图谱技术结合化学计量学分析方法稳定可靠,能体现出更多的样本信息,且在评价药材质量方面彰显了此法的适用性,本研究所建立的方法,同样可应用于甘草不同基原、不同部位及不同炮制加工方式的品质研究,亦可延伸到其他中药材。本实验可为甘草药材的质量评价提供较全面、客观和准确的实验依据,同时可为优质甘草规范化种植及其潜在中药质量标志物的开发探索提供参考。

【参考文献】

- [1] 李娜,张晨,钟赣生,等.不同品种甘草化学成分、药理作用的研究进展及质量标志物(Q-Marker)预测分析[J].中草药,2021,52(24):7680-7692.
- [2] 常冠华,薄颖异,崔洁,等.基于UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS分析甘草地上部分主要化学成分[J].中国中药杂志,2021,46(6):1449-1459.
- [3] 牛志超,高少雄,郑晓宇.超声提取联合膜分离技术纯化甘草酸的工艺[J].食品工业,2020,41(2):122-125.
- [4] 刘宗争,邓旭明,王建锋.甘草总黄酮对鸡产气荚膜梭菌坏死性肠炎的治疗作用[J].中国兽医学报,2019,39(4):716-721.
- [5] 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.
- [6] 袁勇,邢建国,王新春,等.异甘草素微乳改善大鼠小肠吸收的研究[J].中国药学杂志,2013,48(2):128-131.
- [7] 李越峰,边甜甜,司昕雷,等.不同采收期对甘草中甘草苷、甘草酸及甘草多糖含量的影响[J].中兽医医药杂志,2016,35(5):47-50.
- [8] 王程成.甘草的品质评价及盐胁迫下品质形成机制研究[D].南京:南京中医药大学,2020:3-10.
- [9] 邓桃妹,彭灿,彭代银,等.甘草化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的探讨[J].中国中药杂志,2021,46(11):2660-2676.
- [10] 吴渭江,罗昱,罗江溢,等.基于HPLC特征图谱及主要成分含量测定等方法对不同产地甘草进行质量评价[J].湖南中医杂志,2022,38(9):175-180,192.
- [11] 李钺,王升,田壮,等.甘草粉末粒度分布与其品质的相关性研究[J].中国现代中药,2022,24(8):1456-1462.
- [12] 金辉,司昕蕾,边甜甜,等.不同产地甘草的HPLC指纹图谱研究[J].中兽医医药杂志,2018,37(4):49-52.
- [13] 樊建,沈莹,邓代千,等.3种基原甘草主要化学成分的差异及应用探讨[J].中华中医药学刊,2022,40(5):113-118.
- [14] 杨瑞,袁伯川,马永生,等.3种不同基原甘草中4个主要黄酮类化合物的含量分析[J].药物分析杂志,2016,36(10):1729-1736.
- [15] 张黎娟,汪盈盈,李飞.不同产地甘草中甘草苷等五种成分的含量比较研究[J].文山学院学报,2019,32(6):24-27.
- [16] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[M].北京:中国医药科技出版社,2020:88.
- [17] 朱应怀,刘晓霞,宋晓春.甘草总黄酮氨水提取及超滤纯化工艺研究[J].中国现代应用药学,2017,34(4):492-495.
- [18] 张振巍,张娜娜,李月梅.不同品种甘草中总黄酮的含量考察[J].中国药师,2013,16(1):49-51.

(收稿日期:2022-10-12)

Study on Quality of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* with Different Soil Quality and Growth Years

LIU Meiqing, FENG Xiaoli, LIU Yuanyuan, XU Yiwen, WEI Shuchang[✉], LIU Xiaoxia, WAN Lingjuan
(College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

【Abstract】 Objective: To investigate the content changes of glycyrrhizic acid, glycyrrhizin and total flavonoids in *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* with different soil quality and growing years, and to provide experimental basis and reference for the construction of quality control system of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*, planting soil quality and suitable harvesting time. Methods: HPLC was used to determine glycyrrhizin and glycyrrhizic acid. The chromatographic conditions were as follows, Symmetry C₁₈ column was (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), flow rate was 1.0 mL/min, detection wavelength was 237 nm, column temperature was 26 °C, mobile phase was Acetonitrile - 0.05% phosphoric acid gradient elution system. The total flavonoids of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* were determined by ultraviolet spectrophotometry. The TCM chromatographic fingerprint similarity evaluation system (2012 Version I) was used to determine the common peak and evaluate the similarity of HPLC fingerprint. The content determination results were analyzed by 3D mapping using OriginPro software (2021 edition). SPSS Statistics 25 was used for cluster

analysis. Results: The HPLC fingerprints of cultivated *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* with different soil quality and growth years matched 24 common peak components, and the similarity between samples was 0.917–0.991. The results of 3D mapping analysis showed that the quality of cultivated *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* in different soil quality and growth years was ranked as 3-year sandy land, 5-year sandy land, 3-year land, 4-year sandy land, 5-year land and 4-year land in order, and the quality of cultivated *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* in sandy land was significantly higher than that in land. The results of cluster analysis could completely distinguish the cultivated *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* samples with different soil quality and growth years. Conclusion: The HPLC fingerprint of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* combined with the chemometrics analysis method is stable and reliable, which can be applied to the quality evaluation of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* and the exploration of potential markers.

【Key words】 Different soil quality; Length of growth; *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; Content determination; Chemometrics; Quality evaluation

(上接第 22 页)

total distance of open field experiment were increased ($P < 0.05$), and the forced swimming immobility time was shortened in the Tianxin Jieyu group ($P < 0.001$); of which the improvements in the Tianxin Jieyu group were more significant than those in the Wenshen group, the Shugan group and the Shugan Jianpi group. Compared with those in the model group, the serum content of CAMP was increased in the Tianxin Jieyu group and the Wenshen group ($P < 0.001$, $P < 0.01$); however there was no change in serum content of CAMP in the other groups ($P > 0.05$). Compared with those in the model group, the PKA expression in cortex was increased and the protein expressions of CREB, BDNF and ADRB2 in hippocampus were promoted in the Tianxin Jieyu group; compared with that in the model group, the PKA expression in cortex was increased in the Wenshen group; there were no significant changes in the PKA expression and the protein expressions of CREB, BDNF and ADRB2 in the other groups. Conclusion: Tianxin Jieyu Formula can play the role in anti-depression through influencing CAMP/PKA/CREB/BDNF signaling pathway. Its effect is better than single application of soothing Liver, warming Kidney or soothing Liver and strengthening Spleen, with its multiple treatment targets.

【Key words】 Depression; Tianxin Jieyu Formula; CAMP/PKA/CREB/BDNF signaling pathway; Warming Kidney; Soothing Liver