

· 专 栏 ·

· 中药与天然药 ·

## 甘草饮片 HPCE 指纹图谱研究

周逸芝, 韩乐, 刘训红\*, 傅兴圣, 许虎, 李俊松, 蔡宝昌, 图提古丽·奥布力(南京中医药大学, 南京 210046)

**摘要:** 目的 建立甘草饮片 HPCE-DAD 指纹图谱分析方法, 并对甘草及其炮制品的指纹图谱进行比较。方法 采用高效毛细管电泳法进行色谱分离, 以 40 mmol·L<sup>-1</sup> 硼砂-10 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钠-10% 甲醇(pH=8.6)为运行缓冲液, 分离电压为 20 kV, 波长为 254 nm, 以甘草酸为参照物(IS), 测定其指纹图谱, 并作模糊聚类法分析和相似度评价。结果 初步建立了以 10 个共有峰为特征指纹信息的甘草饮片 HPCE-DAD 指纹图谱, 发现少数甘草饮片的指纹图谱有一定差异, 生品与其炮制品的指纹谱中共有峰相对峰面积差异显著。结论 本方法准确可靠, 重现性好, 可作为甘草饮片内在质量评价的依据。

**关键词:** 甘草; 高效毛细管电泳二极管阵列检测法; 指纹图谱

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2012)05-0405-05

### Study on HPCE Fingerprint of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma

ZHOU Yizhi, HAN Le, LIU Xunhong\*, FU Xingsheng, XU Hu, LI Junsong, CAI Baochang, TUTIGULI·Aobuli (Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish the analytical method for the fingerprint of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma by HPCE-DAD and compare the fingerprints of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma and its processed products. **METHODS** Based on the mode of high performance capillary electrophoresis, 40 mmol·L<sup>-1</sup> sodium borate-10 mmol·L<sup>-1</sup> sodium dihydrogen phosphate-10% methanol (pH 8.6) was used as buffer solution. The separation voltage was 20 kV and the detection wavelength was set at 254 nm. Glycyrrhizic acid was used as reference standard, the chromatographic fingerprint were determined. The data were analyzed by fuzzy cluster and fingerprint similarity evaluation software to compare the similarity of samples. **RESULTS** HPCE-DAD fingerprints with 10 common peaks of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma were established preliminarily. It was discovered that a small number of samples differed from others. Regarding to the fingerprints of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma and its processed products, there were obvious differences in the relative areas of common peaks. **CONCLUSION** The method is reliable, accurate and can be used for quality control of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma.

**KEY WORDS:** Glycyrrhizae Radix et Rhizoma; HPCE-DAD; fingerprint

甘草为中医临床最常用药之一, 系豆科植物甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)、胀果甘草(*G. inflata* Bat.)或光果甘草(*G. glabra* L.)干燥根和根茎, 具有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、调和诸药等功效, 用于脾胃虚弱, 倦怠乏力, 心悸气短, 咳嗽痰多, 四肢痠疼疼痛, 痈肿疮毒, 缓解药物毒性<sup>[1]</sup>。生甘草性味甘偏凉, 长于泻火解毒, 化痰止咳, 蜜炙后性味甘温, 补脾益气的功效甚佳。现代研究表明, 甘草的主要活性成分为黄酮类

和皂苷类。甘草苷具有保肝<sup>[2]</sup>及抗抑郁样作用<sup>[3]</sup>; 甘草酸具有抗炎, 保肝, 抗病毒及类固醇样作用, 且在治疗肾病, 心脏疾病及抗癌等方面有着广泛的应用。目前对甘草的质量控制, 多以甘草酸及甘草苷等作为考察指标<sup>[4-5]</sup>, 这种对单一成分的检测不足以全面反映药材的质量, 也缺乏专属性。中药色谱指纹图谱用于中药质量控制, 比目前沿用的方法提供的信息要丰富。有关甘草指纹图谱的研究已有文献报道, 采用的方法主要是高效液

**基金项目:** 江苏省中药炮制重点实验室开放式课题(ZYPZ007); 江苏省科技厅“科技基础实施建设计划”专项(BM2009903); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(YSXK-2010)

**作者简介:** 周逸芝, 女, 硕士生 Tel: (025)85811511 E-mail: zhou\_yi\_zhi@126.com \*通信作者: 刘训红, 男, 硕士, 教授 Tel: (025)85811511 E-mail: liuxunh1959@sohu.com

相光谱法<sup>[6-7]</sup>。毛细管电泳技术作为一种新型分析技术,兼有电泳和色谱技术的双重特点,具有高效、高速、高灵敏度、样品适用范围广等一系列优点。本实验采用高效毛细管电泳法对甘草饮片指纹图谱的构建进行了探讨,并与其炮制品进行比较分析,以期规范甘草饮片市场及确保药材内在质量的均一性和稳定性提供较全面的质量控制手段。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

G1600-AX 高效毛细管电泳仪(美国 Agilent 公司),配惠普化学工作站、二极管阵列检测器(DAD)、自动进样器;Rotavapor R-3 旋转蒸发仪(瑞士 BUCHI 公司);pHS-3C 型 pH 计(上海康仪仪器有限公司);KQ-500E 型超声波清洗器(500W, 40 kHz, 昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 试剂

硼砂(南京化学试剂一厂,分析纯);磷酸二氢钠(上海荣润化工有限公司,分析纯);氢氧化钠(上海化学试剂有限公司,分析纯);甲醇(国药集团化学试剂有限公司,分析纯);无水乙醇(南京化学试剂有限公司,分析纯);乙酸(南京化学试剂有限公司,分析纯);配制缓冲溶液和供试品溶液所用的水均为重蒸馏水。

对照品:甘草次酸(批号:110723-200612,纯度>98%)、甘草苷(批号:111610-201005,纯度>98%)购于中国药品生物制品检定所;甘草酸铵(批号:101027,纯度>98%)、异甘草苷(批号:100729,纯度>98%)、甘草素(批号:100927,纯度>98%)、异甘草素(批号:100603,纯度>98%)购于上海融禾医药科技有限公司。

### 1.3 药材

样品:甘草不同批次商品饮片信息见表 1。S1~S10 为甘草药材商品,均经南京中医药大学中药鉴定教研室刘训红教授鉴定为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎。S11 为 S3 相对应的炮制品,按 2010 年版中国药典规定自制。留样凭证存放于南京中医药大学江苏省中药炮制重点实验室。

## 2 方法与结果

### 2.1 电泳条件

未涂渍标准熔融石英毛细管(64.5 cm×75 μm,有效长度 56 cm, Agilent 科技有限公司);运行缓

表 1 甘草饮片样品

Tab 1 Sample of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma

编号	品名	产地	提供单位	批号
S1	甘草	内蒙古	南京市中医院	101009
S2	甘草	甘肃	南中医药大百草堂	110102
S3	甘草	内蒙古	江苏省中医院	101001
S4	甘草	内蒙古	南京轩德堂中医门诊部	100812
S5	甘草	内蒙古	安徽国鑫中药饮片有限公司	20101201
S6	甘草	新疆	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司	110108
S7	甘草	内蒙古	安徽省亳州市永刚饮片厂	20070801
S8	甘草	新疆	南京药业股份有限公司中药饮片厂	101108
S9	甘草	内蒙古	南中医药大国医堂	101109
S10	甘草	内蒙古	南京市交通医院	101211
S11	炙甘草	内蒙古	江苏省中医院	101001

冲液:40 mmol·L<sup>-1</sup>硼砂-10 mmol·L<sup>-1</sup>磷酸二氢钠-10%甲醇(pH 8.6);检测波长:254 nm;分离电压:20 kV;压力进样:5 kPa×6 s;毛细管温度:20 ℃。毛细管使用前依次用 0.1 mmol·L<sup>-1</sup>氢氧化钠溶液、重蒸馏水和运行缓冲液压力冲洗 5, 10, 5 min, 样品分析间隔用 0.1 mmol·L<sup>-1</sup>氢氧化钠溶液、水、缓冲液平衡 3, 5, 5 min。上述试剂使用前均经 0.22 μm 滤膜过滤,并超声脱气。

### 2.2 对照品溶液制备

混合对照品溶液:取甘草酸铵 9.93 mg、甘草次酸 10.06 mg、甘草素 10.29 mg、异甘草素 9.99 mg、甘草苷 10.00 mg、异甘草苷 10.13 mg,精密称定,分别置于 10 mL 量瓶中,用 50%甲醇溶解并定容。制得浓度分别为甘草酸 0.973 mg·mL<sup>-1</sup>、甘草次酸 1.006 mg·mL<sup>-1</sup>、甘草素 1.029 mg·mL<sup>-1</sup>、异甘草素 0.999 mg·mL<sup>-1</sup>、甘草苷 1.000 mg·mL<sup>-1</sup> 和异甘草苷 1.013 mg·mL<sup>-1</sup> 的对照品储备液(甘草酸质量=甘草酸铵质量/1.0207)。精密吸取甘草酸储备液 3 mL,甘草次酸储备液、甘草素储备液各 1 mL,异甘草素、异甘草苷储备液各 0.5 mL,甘草苷 2 mL,置 10 mL 量瓶中,用 50%甲醇定容,即得甘草酸 0.291 9 mg·mL<sup>-1</sup>、甘草次酸为 0.100 6 mg·mL<sup>-1</sup>、甘草素为 0.102 9 mg·mL<sup>-1</sup>、异甘草素为 0.050 0 mg·mL<sup>-1</sup>、甘草苷为 0.200 0 mg·mL<sup>-1</sup>、异甘草苷为 0.050 7 mg·mL<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液。

### 2.3 供试品溶液制备

精密称取样品粉末(过 3 号筛)1.0 g,置具塞锥形瓶中,精密加入 50%甲醇 20 mL,超声提取 30 min,过滤,滤液用 50%甲醇定容至 100 mL 量瓶中,摇匀,过 0.22 μm 微孔滤膜,作为供试品溶液。

### 2.4 方法学考察

**2.4.1 仪器精密度试验** 取同一批次供试品(S5)溶液,连续进样 5 次,测定指纹图谱,用“中药指纹图谱相似度评价系统(2004A)”软件计算,结果相似度均>0.992,表明供试品进样精密度良好。

**2.4.2 稳定性试验** 取同一批次供试品(S5)溶液,分别在 1, 2, 4, 8, 16, 24 h 进样,测定指纹图谱,用“中药指纹图谱相似度评价系统(2004A)”软件计算,结果相似度均>0.987,说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.4.3 重复性试验** 取同一批次样品(S5)粉末 6 份,平行操作,制备供试品溶液,测定指纹图谱,用“中药指纹图谱相似度评价系统(2004A)”软件计算,结果相似度均>0.865,表明本法测定的重复性尚好。

以上结果表明指纹图谱中各色谱峰的相对迁移时间和峰面积基本一致,相似度较高,符合指纹图谱研究的技术要求。

## 2.5 指纹图谱的建立

将供试品溶液分别放入自动进样的样品管中,按选定的测试条件进行检测。按“2.1”项下条件测定所有供试品 HPCE 色谱图。根据不同批次供试品测定结果所给出的峰数、峰值(积分值)和峰位(相对迁移时间)等相关参数,进行分析、比较,制定优化的指纹图谱,结果见图 1, 图 2。

## 2.6 指纹图谱分析

**2.6.1 共有指纹峰标定** 经对供试品 HPCE 色谱图的分析、比较,甘草标定 10 个共有峰作为指纹

图谱的特征峰,2, 5, 9, 10 号峰与对照品对照分别鉴定为甘草苷、甘草素、甘草酸、异甘草素。以 9 号峰甘草酸为参照峰,分别求出各共有峰与之相比的 $\alpha$ 值(调整迁移时间之比)和各共有峰的相对峰面积(峰面积之比),结果见表 2。

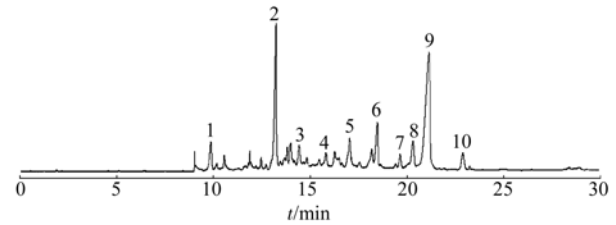


图 1 甘草的 HPCE-DAD 指纹图谱

2-甘草苷; 5-甘草素; 9-甘草酸; 10-异甘草素

Fig 1 The fingerprint chromatogram of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma by HPCE-DAD

2-liquiritin; 5-liquiritigenin; 9-glycyrrhizic acid; 10-isoliquiritigenin

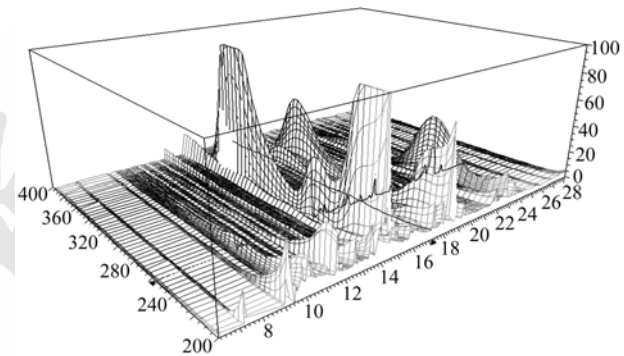


图 2 甘草的三维 HPCE-DAD 指纹图谱

Fig 2 Three dimensional fingerprint chromatogram of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma by HPCE-DAD

表 2 甘草 HPCE-DAD 指纹图谱中共有峰的相对迁移时间 $\alpha$ 值和相对峰面积

Tab 2 The relative migration time ( $\alpha$ ) and the relative peak area in the fingerprint of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma by HPCE-DAD

峰号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
相对迁移时间/ $\alpha$	0.468 1	0.618 5	0.690 0	0.752 4	0.792 5	0.877 8	0.943 2	0.955 1	1.000 0	1.087 8	
相 对 峰 面 积	S1	0.164 4	0.469 4	0.103 6	0.069 8	0.178 4	0.133 6	0.083 3	0.129 3	1.000 0	0.142 1
	S2	0.167 3	0.581 8	0.107 6	0.078 5	0.168 2	0.131 2	0.082 3	0.131 2	1.000 0	0.155 8
	S3	0.187 3	0.690 1	0.132 3	0.099 9	0.205 0	0.161 5	0.093 4	0.132 6	1.000 0	0.170 8
	S4	0.163 4	0.482 7	0.095 6	0.069 3	0.204 3	0.234 6	0.077 7	0.129 0	1.000 0	0.146 2
	S5	0.162 7	0.502 4	0.092 5	0.065 4	0.201 0	0.157 4	0.080 9	0.122 0	1.000 0	0.168 0
	S6	0.159 0	0.545 5	0.095 5	0.074 0	0.224 7	0.279 1	0.100 6	0.120 4	1.000 0	0.179 2
	S7	0.175 9	0.697 7	0.114 5	0.080 6	0.217 3	0.246 3	0.099 1	0.128 7	1.000 0	0.185 0
	S8	0.148 1	0.570 5	0.100 9	0.079 0	0.193 1	0.193 1	0.095 0	0.119 3	1.000 0	0.163 3
	S9	0.147 7	0.576 8	0.083 8	0.048 3	0.124 5	0.109 6	0.099 6	0.133 5	1.000 0	0.189 1
	S10	0.160 0	0.658 2	0.098 7	0.057 5	0.212 4	0.258 9	0.093 4	0.131 2	1.000 0	0.173 3

**2.6.2 指纹图谱的聚类分析** 选择甘草 HPCE 指纹图谱中 10 个比较明显的共有峰,根据表 2 中的数据,用 SPSS 软件中的 hierarchical cluster analysis

对 10 个生甘草样品进行聚类分析,所用聚类方法为 average linkage (between groups),距离公式为 square euclidean distance,得不同样品甘草的聚类

分析图, 结果见图 3, 图 4。

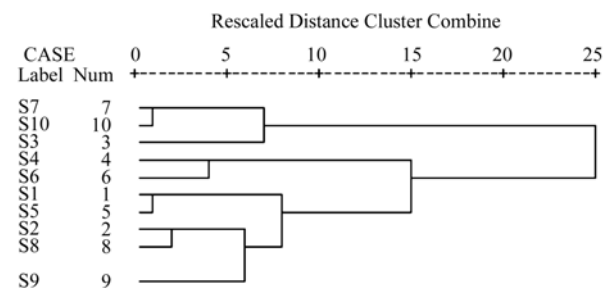


图 3 生甘草 HPCE-DAD 指纹图谱的聚类分析图

Fig 3 The cluste diagram of the fingerprint of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma by HPCE-DAD

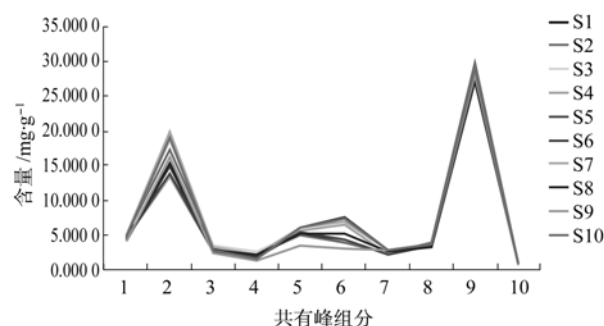


图 4 甘草 HPCE-DAD 指纹图谱中共有峰组分含量图

Fig 4 The content of the common peak components in the fingerprint of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma by HPCE-DAD

结果显示, 当距离标尺在 1 时, 样品 S1、S5, 样品 S7、S10 各归为一类; 在 2 时, 样品 S2、S8 归为一类; 在 4 时, 样品 S4、S6 归为一类; 在 5 时, 样品 S2、S8 与 S9 归为一类; 在 7 时, 样品 S3 与 S7、S10 归为一类; 在 8 时, S1、S5 与 S2、S8、S9 各归为一类; 在 14 时, 样品 S3、S4、S6 与 S1、S2、S5、S8、S9 归为一类; 当距离标尺在 25 时, 所有样品才归为一类。

**2.6.3 色谱峰的重叠率** 以甘草对照谱图(R)为基准, 按以下公式计算[待测样品与对照谱图共有的峰数 $\times 2 /$ (待测样品与对照谱图峰数和)] $\times 100\%$ , 1~10 号样品色谱峰的重叠率依次为: 84.66%, 87.35%, 86.35%, 85.60%, 84.45%, 85.60%, 86.35%, 87.35%, 83.88%, 86.35%。

**2.6.4 相似度评价** 将测试数据导入国家药典委员会“中药指纹图谱相似度评价系统(2004A)”软件, 经校正选峰, 设定匹配模式, 将色谱峰自动匹配, 生成对照图谱(图 5), 进行色谱峰差异性评价和整体相似性评价。各相似度值如下: S1-0.985, S2-0.959, S3-0.950, S4-0.970, S5-0.980, S6-0.972, S7-0.966, S8-0.955, S9-0.975, S10-0.963。结果

表明, 生甘草样品指纹谱相似度较好( $>0.95$ )。

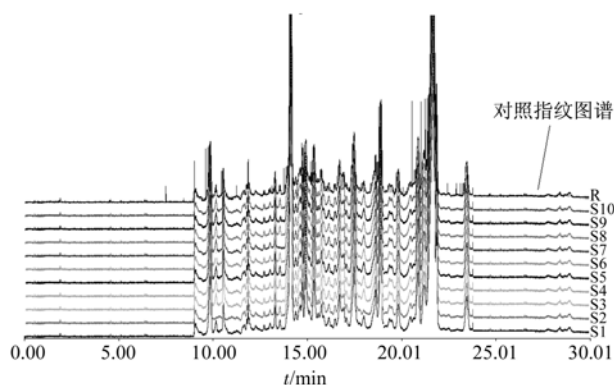


图 5 甘草样品 HPCE 指纹图谱共有模式

Fig 5 The standard fingerprint chromatogram of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma by HPCE-DAD

**2.6.5 生品与其炮制品的指纹谱比较** 经对甘草生品(S3)与其炮制品(S11)的指纹图谱比较、分析, 炙甘草具有甘草生品的 7 个共有峰, 但色谱峰的重叠率、n 强峰峰面积比值及色谱图相似度具有一定差异。以甘草生品(S3)为基准, 计算炮制品色谱峰的重叠率, 炙甘草为 75.2%; 生甘草以甘草苷、甘草素、甘草酸及异甘草素为 n 强峰, 其峰面积比值为 0.690 1 : 0.205 0 : 1 : 0.170 8, 炙甘草以甘草苷、甘草素及甘草酸为 n 强峰, 其峰面积比值为 0.654 3 : 0.206 6 : 1; 以甘草生品(S3)为基准, 计算炮制品色谱图的相似度, 炙甘草为 0.806, 结果见图 6。

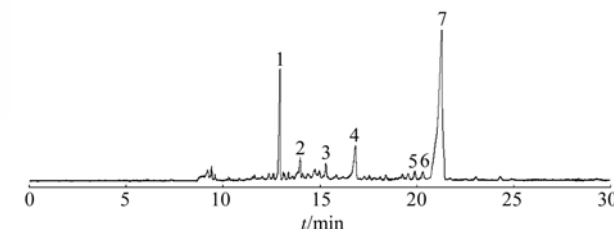


图 6 炙甘草的 HPCE-DAD 色谱图

1-甘草苷; 4-甘草素; 7-甘草酸

Fig 6 The fingerprint of processed Glycyrrhizae Radix et Rhizoma by HPCE-DAD

1-liquiritin; 4-liquiritigenin; 7-glycyrrhizic acid

### 3 讨论

#### 3.1 电泳条件的优化

缓冲液体系、缓冲液浓度及 pH 值的选择: 实验考察了硼砂、硼砂-磷酸二氢钠和硼砂-磷酸二氢钠-甲醇 3 个缓冲体系, 经反复实验确定以硼砂-磷酸二氢钠-甲醇为缓冲体系, 色谱峰峰形、分离度较好。在此基础上, 对缓冲液浓度及 pH 值进行

了考察,结果表明,当缓冲液浓度为  $40 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  硼砂- $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸二氢钠-10%甲醇时各色谱峰的分离度较好;当 pH 为 8.6 时各组分可以达到基线分离。

分离电压和运行温度的选择:考察了分离电压在 16~25 kV 范围内对各组分迁移时间的影响,结果表明,当分离电压为 20 kV 时样品及对照品各待测组分仍然可以达到基线分离且节省时间;考察了运行温度在 20~25 °C 范围内对各组分迁移时间的影响,结果表明,当运行温度为 20 °C 时样品的各组分分离效果好,且分析时间缩短。

检测波长的选择:采用二极管阵列检测器对检测波长进行考察,记录并比较不同波长的色谱图。结果在 254 nm 检测波长下,色谱图中色谱峰较多,信息丰富。

### 3.2 指纹谱分析

指纹谱分析结果表明,不同批次甘草样品之间既有相关性,又有区别。相应共有指纹峰均已在色谱图上体现,色谱峰重叠率、指纹谱相似度较好,但各峰面积有所不同,说明不同来源、不同批次甘草饮片其成分含量有一定差异。通过与对照品对照分析,甘草苷、甘草素、甘草酸、异甘草素可列为甘草指纹谱共有特征峰中 n 强峰,而甘草次酸、异甘草苷分别在个别批次商品饮片中,峰较小或未检出,未标定为共有特征峰;甘草苷、甘草素、甘草酸、异甘草素峰面积比值为  $(0.50\sim 0.70) : (0.12\sim 0.22) : 1 : (0.14\sim 0.19)$ , 这对评价甘草饮片质量具有一定意义。

甘草生品(S3)与其炮制品(S11)的色谱图比较表明,生甘草与炙甘草共有指纹峰数目、色谱峰的重叠率及色谱图相似度具有一定差异。尤其是炮制前后 n 强峰峰面积比值具有一定变化,甘草苷、甘草素、甘草酸峰面积比值:生甘草为  $0.690 1 : 0.205 0 : 1$ ,炙甘草为  $0.654 3 : 0.206 6 : 1$ ,这可作为甘草饮片质量控制的一项重要指标。

本实验初步建立了甘草饮片 HPCE 指纹图谱分析方法,为甘草饮片内在质量的评价和控制提供了科学依据。

### REFERENCES

- [1] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版.一部) [S]. 2010: 80.
- [2] DING X S, DAI D Z. Protective effect of liquiritin on the hepatotoxicity induced by  $\text{CCl}_4$  [J]. *Pharmacol Clin Chin Med(中药药理与临床)*, 2002, 18(6): 12-13.
- [3] ZHAO Z Y, WANG W X, GUO H Z, et al. Anti-depressive effect of liquiritin on chronic stress depression in rats [J]. *Chin J Clin Rehabil(中国临床康复)*, 2006, 10(27): 69-72.
- [4] SHEN Y, SHEN J C, ZHUANG Z X, et al. Comparison between HPCE and HPLC for the analysis of main active components in licorice [J]. *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2006, 26(4): 421-425.
- [5] DUAN T X, YU M M, LIU C S, et al. Simultaneous determination of glycyrrhizic acid, liquiritin and fingerprint of licorice by RP-HPLC [J]. *Chin Tradit Pat Med(中成药)*, 2006, 28(2): 161-165.
- [6] ZHU Z J, XIONG F L, ZHANG X Q, et al. Studies on HPLC fingerprint of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* from different areas. [J]. *Her Med(医药导报)*, 2011, 30(8): 1090-1091.
- [7] ZHOU Q, LÜ J, LI G H, et al. HPLC fingerprint spectrum of honey-fried *Radix Glycyrrhizae* [J]. *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2010, 35(12): 1547-15550.

收稿日期: 2011-09-08