

· 质量控制与管理 ·

甘草 GAP 研究中的快速质量检测方法研究

王巧娥¹, 王文慎², 黎先春³, 王小如^{1, 3, *}

(1. 厦门大学化学系现代分析科学教育部重点实验室, 福建 厦门, 361005;

2. 厦门倍而思生化科技有限公司, 福建 厦门 361009;

3. 国家海洋局第一海洋研究所青岛市现代分析科技与中药标准化重点实验室, 山东 青岛 266061)

摘要: 目的 建立甘草 GAP 过程中的快速质量检验方法, 为甘草药材的快速质量检测提供方法依据。方法 提出甘草中水溶性有效物质群的概念并建立其含量的比色测定方法。以甘草酸作为定量的标准物质, 采用香草醛-浓硫酸试剂作显色剂, 用便携式小型光谱仪于 560 nm 处检测。结果 回归方程为 $Y = 1.1747C + 0.0873$, 相关系数 $r = 0.9705 (n = 3)$, 回收率为 92% ~ 99%, 在 0.0~0.96 mg/mL 范围内仪器读数与甘草酸浓度呈线性关系。结论 该方法简单、快速、廉价, 能够准确地反映甘草质量的优劣, 适合在准确度要求相对较低的甘草生产基地推广使用。

关键词: 甘草; 甘草酸; 三萜皂苷; 比色法; GAP

中图分类号: R 284.1

文献标识码: A

文章编号: 1004-2199(2004)01-0037-05

Rapid Quality Control of Licorice in Its GAP Research

WANG Qiao-e¹, WANG Wen-shen², WU Cheng-yu², Frank Lee³, WANG Xiao-ru^{1, 3, *}

(1. The key Laboratory of Analytical Science of MOE, the Department of Chemistry,

Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Xiamen Beiersi B & C Technology Co., Ltd., Xiamen 361009, China; 3. Qingdao Key Lab of Analytical Technology Development and Standardization of Chinese Medicines, First Institute Oceanography of SOA, Qingdao 266061, China)

Abstract Objective To develop a rapid method for the quality control of licorice in its GAP research. **Methods** Water-soluble triterpenoid saponins were defined as the active fraction in licorice and a colorimetric method using LED-based portable device has been developed for the first time to measure the content of this active fraction. The method was based on the specific color reaction occurring between triterpenoid saponins and vanillin-sulfuric acid reagent. Visible light absorption of 560 nm was chosen as the detection wavelength. **Results** The operating calibration curve ($Y = 1.1747C + 0.0873 \text{ mg/mL}$) was found to be linear at the range of 0.0~0.96 mg/mL glycyrrhizic acid in water ($r = 0.9705$). The recovery is 92~99%. **Conclusion** The method is simple, rapid and low-cost and is recommendable to evaluate the quality of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. in its GAP research.

Key words: licorice; glycyrrhizic acid; triterpenoid saponins; colorimetry; GAP

收稿日期: 2003-12-06

基金项目: 内蒙梁外甘草 GAP 研究与开发; 国家自然科学基金 2003 重点项目 (20235020)

作者简介: 王巧娥 (1976-), 女, 在读博士, 主要从事中草药有效成分的提取、分离和质量标准研究。Tel: 0592-5930602, E-mail: wqech@sohu.com.

* 通讯联系人, Tel: 0532-8893253; E-mail: anal_lab@xmu.edu.cn.

为了实现中药的现代化, 促进中药的产业化和国际化, 中药质量标准化研究已成为我国中药研究和产业界的热点。目前, 中医药工作者已形成共识, 中药材质量是影响中药现代化的“瓶颈”。为从源头上控制中药质量, 推进中药现代化的进程, 国家药品监督管理局于 2002 年 3 月颁布了《中药材生产质量管理规范, Good Agricultural Practice of Medicinal

Plants and Animals, GAP》并已于 2002 年 6 月 1 日试行。其中, 制定药材活性成分或指标成分的动态积累以确定采收期以及药材质量检测与认证标准操作规程(Standard Operating Procedure, SOP)是 GAP 明确规定的內容^[1]。因此, 建立简单、快速、廉价的中药材有效成分含量分析检测方法和质量检验方法已成为亟待解决的问题。

甘草有“国老”之称, 其主要成分甘草酸具有补脾益气、解毒保肝、润肺止咳、调和诸药的功效。通常被用来评价甘草的质量^[2]。对于甘草中甘草酸含量的测定, 报道较多的有重量法^[3,4]、比色法^[5-7]、高效毛细管电泳(HPCE)法^[8,9]、高效液相色谱(HPLC)法^[10]、薄层-紫外分光光度法^[11]和薄层扫描(TLS)法^[12]等。其中, HPLC、HPCE 和 TLS 都需要相应的仪器设备, 不仅投资和日常分析的费用较大, 而且对操作人员的要求也较高, 很难在甘草种植基地推广应用。重量法操作繁琐, 准确度差, 现在已很少使用。文献报道的比色法一般是先用硅胶薄层板分离, 然后将与甘草酸相应位置处的硅胶刮下, 溶剂提取后分离除去硅胶, 上清液用香草醛-浓硫酸试剂显色后于 556 nm 处测定吸光度。虽然该方法不需要昂贵的分析设备, 日常的分析费用也很低, 但存在操作繁琐、重现性差和分析时间长等缺点, 也不适合对 GAP 基地大量甘草样品的质量进行分析。

事实上, 中草药的药效成分十分复杂, 而且各种成分的相对含量随采收季节、生长环境、贮藏加工方法等的差异而不同, 因此单独 1~2 种活性成分的含量并不能代表药材的质量和效价^[13]。中医的理论核心和特色就是中医药的整体观、辨证施治原则和它们的综合性, 在用药方面, 讲究君、臣、佐、使相互配伍和各化学成分间的生、克、乘、侮等关系, 即使单味药, 其化学成分总数也达数十、百种之多, 中药的疗效基础是这些组分间的协同作用。针对甘草而言, 作者认为, 之所以可以用甘草酸的含量来评价其质量, 一方面是因为甘草酸的含量相对其他活性组分较高, 测定方便, 而更重要的原因在于甘草酸的含量与甘草中有效成分的总量之间存在正相关关系, 也就是说, 甘草酸含量高时, 其有效成分的总量也高。中医用药多采用水煎剂, 表明水溶性成分是其药理作用的物质基础, 是最主要的活性组分。因此, 用甘草水溶性活性成分的总量来评价甘草药材的品质优劣也许比单独用甘草酸的含量来评价更具科学性。基

于此, 本文提出了甘草中水溶性有效物质群的概念并建立了其含量的比色测定方法。该方法简化了甘草酸测定前的分离操作, 直接测定甘草热水提取液中能够与香草醛-浓硫酸试剂发生颜色反应的组分总量, 操作简单, 分析速度快, 结果能够准确地反映甘草质量的优劣, 比较适合在准确度要求相对较低的甘草生产基地推广使用。本文的工作是“内蒙古梁外甘草 GAP 研究与开发”项目的一部分, 所建立的快速质量检测方法已成功应用于甘草 GAP 基地大量样品的快速质量分析, 取得了满意的结果。

1 材料和仪器

1.1 材料

甘草: 内蒙古亿利科技实业股份有限公司“内蒙古梁外甘草 GAP 研究与开发”项目部采集并由中国医学科学院药用植物研究所林寿全教授鉴定。

甘草酸对照品: 内蒙古亿利科技实业股份有限公司李秉经理提供, 纯度(HPLC 法测)为 80%。

显色试剂: 0.45% (W/V) 香草醛-硫酸溶液(0.45 g 香草醛溶于 100 mL 78% 硫酸中, 临用前配制)。

香草醛为化学纯, 其余化学试剂均为分析纯; 水为去离子水; 用于 HPLC 分析的试剂为色谱纯。

1.2 仪器

Agilent 1100 HPLC 仪(美国惠普公司, 包括输液泵、脱气装置、自动进样装置和 DAD 检测器); MIKRO 22R 冷冻离心机(德国 Hettich 公司); SK3200LH 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司); LD-101B 型方形调节式中药切片机(中国温岭市大海药材机械厂); LD-06A 型高速中药粉碎机(中国温岭市大海药材机械厂); 小型高灵敏度光谱分析仪(长春吉林大学小天鹅仪器有限公司)。

2 实验方法

2.1 供试液制备

取甘草样品粉末约 0.25 g (需准确记录), 置 25 mL 容量瓶中, 用 20 mL 80℃ 热水超声提取 60 min。用水定容至刻度, 离心, 上清液即为每毫升含 0.01 g 生药的供试液。

2.2 标准溶液的制备

准确称取甘草酸对照品 0.100 0 g, 用 50% 乙醇溶解, 完全转移至 25 mL 容量瓶中, 定容至刻度, 得甘草酸浓度为 3.2 mg/mL (甘草酸纯度按 80% 计)的对照品储备液。

分别取甘草酸对照品储备液 0.8、1.2、2.0、3.0 mL 于 10 mL 容量瓶中,用 50% 乙醇定容至刻度,分别得浓度为 0.256、0.384、0.640、0.96 mg/mL 的系列标准液。

2.3 比色测定方法

取 1.0 mL 供试液,置于 25 mL 磨口具塞锥形瓶中,加显色试剂 20 mL,60℃ 水浴中反应 20 min,冰水中冷却 1 min,以蒸馏水为参比,用小型高灵敏度分光光度计于 560 nm 波长处测定。

2.4 HPLC 含量测定

2.4.1 色谱条件 色谱柱: Kromasil KR100-5C₁₈ (150 mm × 4.6 mm),柱温: 室温;进样量: 15 μL

流动相: 乙腈-水(含 0.05% 三氟乙酸)梯度洗脱,梯度条件: 乙腈: 20% (0 min)-40% (5 min)-50% (10 min);流速: 0.8 mL/min

检测: DAD 检测器, 254 nm, 参考波长: 500 nm; 波长宽度: 16 nm

2.4.2 工作曲线 按上述 HPLC 条件,分别将浓度为 0.04、0.08、0.16、0.32、0.48 mg/mL 的系列标准溶液进样,以甘草酸的峰面积 A 为纵坐标,甘草酸质量 m (μg) 为横坐标绘制工作曲线,得回归方程: $A = 749.2m - 1.55$, $r = 0.9999$ 。在 0.60~7.2 μg 范围内峰面积与甘草酸质量呈线性关系, $RSD = 1.22\%$ ($n = 5$)。

3 结果与讨论

3.1 方法建立及显色条件确定

甘草的药理研究表明,其主要的活性成分是三萜皂苷类和黄酮类化合物,前者大部分溶于热水,且能够与香草醛-浓硫酸试剂发生显色反应,代表化合物是甘草酸。基于此,本文把甘草中水溶性的三萜皂苷类化合物定义为能够评价甘草质量的水溶性有效物质群,相应的,对其含量的测定采用甘草酸的比色测定方法,定量分析的标准物质也采用甘草酸。为了简化操作,根据文献^[5]的方法,将文献^[14]的方法作了改进,直接将香草醛溶于 78% 的硫酸中配置 0.45% (W/V) 的香草醛硫酸溶液作为显色试剂,一次性加入样品液后 60℃ 反应 20 min。实验结果表明,显色试剂的体积 10 倍于样品液的体积时,显色完全且光度计读数适中。

3.2 提取方法选择

根据甘草酸易溶于热水的特点,本文选择 80℃ 的热水为提取溶剂。据报道,甘草中甘草酸的提取多

采用冷浸、热浸、渗漉、索氏、超声波、微波提取等方法^[15-18]。其中,超声波提取和微波提取的效率高,速度快,不破坏有效成分,二者相比较,前者的操作较后者简单、安全。因此,本文选择超声波法提取甘草中的有效成分,制备分析液。

根据初步试验结果,样品液的生药浓度为 0.01 g/mL 时,光度计读数在其最佳范围内。在此条件下,以甘草酸的提取率为指标考察了两种方法的提取率。

方法一: 甘草(0.25 g), 80℃ 热水(5 mL) 超声提取 4 次(15 min/次),定容至 25 mL。

方法二: 甘草(0.25 g), 20 mL 80℃ 热水超声提取 50 min,定容至 25 mL。

结果表明,方法一 中甘草酸的提取率为方法二的 91.0%,但操作简单。因此,本文选择方法一 制备分析液,并将提取时间延长至 60 min。剩余甘草渣用 5 mL 80℃ 水再次提取,然后用与测定样品相同的方法进行检测,结果未检出甘草酸残留,表明已提取完全。

3.3 工作曲线

按 2.3 节的显色方法,分别测定系列标准溶液的吸光度,平行三次,取平均值。以仪器读数 Y 为纵坐标,甘草酸浓度 C (mg/mL) 为横坐标绘制工作曲线,50% 乙醇空白作为浓度为零的点参与回归,得回归方程: $Y = 1.1747C + 0.0873$, $r = 0.9705$ ($n = 3$)。在 0.0~0.96 mg/mL 范围内仪器读数与甘草酸浓度呈线性关系。

3.4 精密度考察

同一对照品溶液重复测定 5 次,仪器读数 RSD 为 2.76%。

3.5 重复性试验

同一供试甘草药材,分别按前述“样品液制备”方法进行操作,制备样品溶液 5 份,进样测定,水溶性成分含量的 RSD 为 3.54%。

3.6 甘草酸回收率实验

分别称取甘草酸含量已知的甘草样品 4 份,依次加入不同量的甘草酸对照品,按前述“样品液制备”方法进行操作,制备样品溶液 4 份,进行测定,计算得到该方法的甘草酸回收率在 92%~99% 范围内,平均回收率为 95.8% ($RSD = 3.05\%$)。这说明方法的准确度能够满足现场快速分析的要求。

3.7 实际样品测定

在对实际样品进行分析时, 为了进一步验证方法的准确性以及水溶性三萜皂苷用于甘草质量评价的有效性, 所有样品都同时用 HPLC 方法准确测定了甘草酸的含量。表 1~ 2 中甘草酸的百分含量系 HPLC 测得, 水溶性三萜皂苷的百分含量系本文方法测定的结果, R 为水溶性三萜皂苷含量与甘草酸含量之比, 用于说明两种结果之间的相关性。

表 1 全国不同地区和品种甘草样品的分析结果

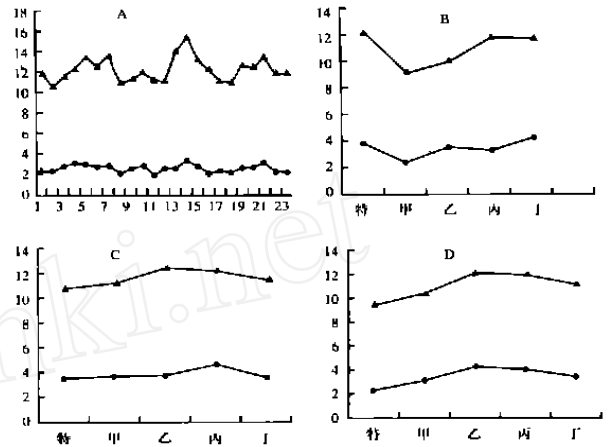
Tab 1 Analytical results of different kinds of licorices collected in different regions

样品编号(产地)	甘草酸含量/%	水溶性三萜皂苷含量/%	R
G-Rg-2001-08-乌(新疆哈密)	2.20	11.76	5.35
G-Rg-2001-08-乌(新疆和静)	2.25	10.55	4.69
G-Rg-2001-08-乌(新疆新源)	2.87	11.40	3.97
G-Rg-2001-08-乌(新疆布尔津)	3.07	12.17	3.96
G-Rg-2001-08-乌(陕西延安)	3.02	13.22	4.38
G-Rg-1999-08-乌(甘肃庆阳)	2.74	12.58	4.59
G-Rg-1998-08-乌(内蒙元宝山)	2.88	13.49	4.68
G-Rg-2000-08-乌(吉林白城)	2.18	11.00	5.05
G-Rg-2000-09-乌(河北承德)	2.61	11.27	4.32
G-Rg-2000-09-乌(河北石家庄)	2.96	11.93	4.03
G-Rg-2000-08-乌(山西侯马)	2.06	11.27	5.47
G-Ys-1991-08-乌(甘肃民勤)	2.70	11.10	4.11
G-Ys-1998-08-乌(宁夏盐城)	2.74	14.07	5.14
G-Ys-2002-08-乌(吉林大安)	3.50	15.26	4.36
G-Ys-2002-08-乌(黑龙江安达)	2.98	13.15	4.41
G-Ys-1998-08-乌(敖汗旗(赤峰))	2.26	12.29	5.44
G-Ys-2001-08-乌(新疆布尔津)	2.50	11.26	4.50
G-Ys-2001-08-乌(新疆和静)	2.39	11.05	4.62
G-Ys-2001-08-光(新疆巩留)	2.74	12.70	4.64
G-Ys-2001-08-胀(新疆阿克苏)	2.90	12.54	4.32
G-Ys-2001-08-胀(新疆哈密)	3.29	13.43	4.08
G-Ys-2001-08-胀(新疆巴楚)	2.52	12.03	4.77
G-Ys-2001-08-胀(新疆和田)	2.46	12.03	4.89

注: $R = 4.60 \pm 0.45$

3.7.1 全国不同地区和品种的甘草样品分析 表 1 列出了全国不同地区和品种甘草样品的分析结果。表 1 的结果表明, 比色法测得的水溶性三萜皂苷的含量约为甘草酸含量的 4~ 5 倍(具体的相关关系与水溶性三萜皂苷中甘草酸的百分含量有关), 二者在数量上的高低变化趋势相似见图 1, 说明本法测定的水溶性三萜皂苷的含量与甘草酸的含量之间存在正相关关系。因此, 本法测定的甘草中水溶性三萜皂苷的含量可以用来评价甘草药材的质量。从图 1 中还可看出, 在所测定的甘草样品中, 采于吉林大安的野生乌拉尔甘草中甘草酸和水溶性三萜皂苷的含量均最高, 质量最好, 其次是陕西延安和内蒙元宝山

的人工乌拉尔甘草, 宁夏盐城和黑龙江安达的野生乌拉尔甘草, 新疆哈密的野生胀果甘草, 质量最差的是采于吉林白城的人工乌拉尔甘草。野生甘草和人工甘草的质量无明显区别, 胀果、光果和乌拉尔甘草的质量也无明显区别。整体上看, 两个评价指标(水溶性三萜皂苷含量和甘草酸含量)的结论一致, 进一步证明了本方法的可行性。



— — 水溶性三萜皂苷 — — 甘草酸
— — water-soluble triterpenoid saponins
— — glycyrrhizic acid
A-全国不同地区和品种的甘草 B-梁地不同等级甘草
C-沙地不同等级甘草 D-滩地不同等级甘草
A-D different kinds of licorices collected from different regions
B-Licorices grown in Leung wai soil
C-Licorices grown in sandy soil
D-Licorices grown in Teng wai soil

图 1 甘草样品中甘草酸和水溶性三萜皂苷含量的变化趋势

Fig 1 Changes of the content of glycyrrhizic acid and water-soluble triterpenoid saponins in licorice samples

3.7.2 梁外商品甘草样品的分析 表 2 中数据表明, 梁外商品甘草药材中甘草酸的含量都大于《中国药典》规定的 2%, 质量达到并超过了《中国药典》的要求。通过计算得, 表 2 中甘草酸含量和水溶性三萜皂苷含量两组数据间的相关系数 $r = 0.8564$, 大于样品数为 15 时两组数据的相关系数临界值 0.641 ($\alpha = 0.01$), 故两组数据具有较好的相关性, 本方法的结果可靠, 其测定值的大小能够反映所测甘草药材中甘草酸含量的高低, 从而能够反映甘草药材质量的优劣。不同生态环境的甘草样品中有效成分的变化趋势见图 1。

表 2 梁外商品甘草样品的分析结果
 Tab 2 Analytical results of Liangwei Licorices

等级	生态环境	甘草酸含量/%	水溶性三萜皂苷含量/%	R
特级	梁地	3.86	12.15	3.15
	沙地	3.44	10.78	3.13
甲级	滩地	2.42	9.52	3.93
	梁地	2.43	9.28	3.82
	沙地	3.66	11.18	3.05
乙级	滩地	3.26	10.54	3.23
	梁地	3.60	10.14	2.82
	沙地	3.85	12.47	3.24
丙级	滩地	4.54	12.30	2.71
	梁地	3.44	11.91	3.46
	沙地	4.75	12.31	2.59
丁级	滩地	4.29	12.11	2.82
	梁地	4.43	11.85	2.67
	沙地	3.77	11.66	3.09
	滩地	3.67	11.47	3.13

注: $R = 3.12 \pm 0.38$

4 讨论

随着中药现代化的快速发展,尤其在进入 WTO 后,建立健全的科学化中药系列标准,规范中药材的质量管理与控制,是实现中药产业现代化首要的一环。GAP(优良农业规范)作为国际上进行药品生产质量控制的五 P 之首,其实施主要在中药材的生产基地,甚至在田间等,因此,建立一套简便、快速、经济的中药材有效成分含量分析检测方法就尤为重要和有着深远意义。本文介绍的快速测定方法是根据 GAP 实施过程的实际需要所建立起来的,现已用于内蒙古梁外甘草 GAP 研究及实验基地质量控制中,为甘草药材的实际生产提供了方法依据,具有较好的经济效益和社会意义。

需要说明的是,本文介绍的快速测定方法是在借鉴甘草酸的比色测定方法的基础上建立的,甘草中的水溶性成分十分复杂,除了三萜皂苷类化合物外,还有其他的化学成分,因此,所得结果只能从水溶性三萜皂苷成分含量这个方面评价甘草的质量,其最大的优点在于简单、快速,分析费用低廉,需要全面评价甘草药材的质量时还要借助其它的分析数

据,如微量元素、水分、灰份等。

参考文献

- [1] 段金廛,周嘉琳,沈平尔.论中药配方颗粒与实施 GAP[J]. GAP 研究与实践, 2002, 2(1): 9-10
- [2] 国家药典委员会.中国药典(一部)[S].北京:化学工业出版社, 2000. 65-66
- [3] 曾路,张如意,王动,等.粗毛甘草化学成分的研究[J].植物学报, 1991, 33(2): 124-129, 315
- [4] 陈炜,刘建宇,王德军.出口甘草膏中甘草酸含量测定方法对比[J].现代商检科技, 1998, 8(3): 37-38
- [5] 刘岩,胡汉芳,阎正,等.用比色法测定不同产地甘草中甘草酸的含量[J].河北大学学报(自然科学版), 1998, 18(4): 369-374
- [6] 都静莹,王其灏,裴雅群,等.亚甲兰比色法测定甘草及其制剂中甘草酸的含量[J].医药工业, 1987, 18(10): 451-454
- [7] 陆蕴如,邵爱新.用香草醛-硫酸比色法测定次片甘草及蜜炙甘草中甘草酸的含量[J].药物分析杂志, 1981, 1(2): 84-90
- [8] Gu H Y, Gong L D, Yu J H. Measurement and comparison of glycyrrhizic acid contents in root of licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) from different cultivating area[J]. Journal of Forestry Research, 2002, 13(2): 141-143
- [9] Li G B, Zhang H Y, Fan Y Q, et al. Migration behavior and separation of active components in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch and its commercial extract by micellar electrokinetic capillary chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 1999, 863: 105
- [10] 梁月琴,刘琴棣,吴德政.用高效液相色谱法测定甘草及其制剂中甘草酸含量[J].军事医学科学院院刊, 1991, 21(3): 214-215
- [11] 邓立育,姚德海,李铁柱,等.薄层比色法测定甘草中甘草酸含量的研究[J].化学工程师, 2001, 82(1): 35-36
- [12] 张继,杨永利,王莱.双波长薄层扫描法测定乌拉尔甘草中甘草酸的含量[J].西北师范大学学报(自然科学版), 1998, 34(1): 63-65
- [13] 李影.对中药材生产企业实施 GAP 管理的几点讨论[J]. GAP 研究与实践, 2002, 2(1): 50-51
- [14] 鱼红闪,吴少杰,金凤婵,等.树脂法提取甘草中甘草苷的研究[J].食品与发酵工业, 1999, 25(1): 40-43
- [15] 高素莲,王学梅.甘草中皂甙和黄酮类化合物的提取分离与测定.安徽大学学报(自然科学版)[J], 2000, 24(4): 70-74
- [16] 赵茜,李秉涛,刘欣.超声强化甘草酸提取的研究[J].食品科技, 2000, (5): 38-39
- [17] 郭锦棠,杨俊红,李雄勇,等.微波与索氏提取甘草酸的正交实验研究[J].中国药学杂志, 2002, 37(12): 919-922
- [18] Pan X J, Liu H Z, Jia G H, et al. Microwave-assisted extraction of glycyrrhizic acid from licorice root [J]. Biochemical Engineering Journal, 2000, (5): 173