

甘草颜色与 HPLC 指纹图谱信息相关性研究*

陈慧荣¹, 林相龙², 杨瑞琦¹, 曹光昭¹, 闫永红^{1**}, 邹慧琴^{1**}

(1. 北京中医药大学中药学院 北京 102488; 2. 北京宝德润生医药科技发展有限公司 北京 100088)

摘要:目的:甘草是我国常用大宗药材,研究甘草颜色与高效液相色谱(HPLC)指纹图谱的相关性对推动传统学科发展创新具有重要意义。方法:运用颜色数字化方法对甘草断面颜色进行定量分析,利用HPLC开展甘草指纹图谱分析,并对二者进行典型相关分析。结果:甘草断面颜色与HPLC指纹图谱信息之间有显著相关性。结论:颜色数字化指标值在一定程度内可以反映指纹图谱的分析结果。

关键词:甘草 颜色数字化 HPLC 指纹图谱 典型相关分析

doi:10.11842/wst.2018.06.017 中图分类号:R932 文献标识码:A

传统性状鉴别是中药饮片质量评价的有效方法,其中颜色是质量评价的重要指标之一,与其品质密切相关。如甘草自古以来以外皮红棕色、断面黄白色为佳,《本草经集注》称“赤皮断理,看之坚实者……最佳”^[1],《新编中药志》载“皮细紧、色红棕、断面黄白色、粉性足者为佳”^[2]。颜色对甘草质量的鉴别至关重要。然而,传统性状鉴定法的感官颜色存在主观性强、描述模糊等局限性,缺乏客观标准。

色度学是研究人的颜色视觉规律、颜色测量的理论和技术的—门学科,在中药领域的运用能使中药颜色描述实现客观化、规范化。国际发光照明委员会(CIE)色度学系统以3色原理为基础,即任何一个颜色,都能用线性无关的3个原色适当的相加混合与之匹配。三原色可任意选定,但其中的任何一种原色均不可由其他两种原色相加混合得到。与待测颜色达到匹配时所需要的三原色的数量,称为三刺激值。本实验采用的是目前应用较为广泛的CIE1976L*a*b均色空间系统^[3-5],其中,明度L*、色度a*和b*三个坐标轴互

相垂直。L*表示明度,明度越大,越偏白;明度越小,越偏黑;a*和b*表示不同的色调方向,+a*表示红方向,-a*表示绿方向;+b*表示黄方向,-b*表示蓝方向。

课题组前期研究,摸索并建立了甘草表面、断面颜色数字化的测量方法^[6],本研究在此基础上,采用色度学技术将甘草颜色客观化,并对其进行HPLC指纹图谱分析,探索整体化学成分质量与颜色的相关性。为将色度测定方法推广应用于其他药材的颜色测量提供理论依据,完善中药性状鉴别,推动传统学科发展创新。

1 实验材料

1.1 样品

收集来自甘肃西部地区、内蒙古杭锦旗、通辽、赤峰地区野生及栽培甘草样品共34份,所有样品经北京中医药大学中药资源与鉴定系闫永红教授鉴定,确定为甘草(乌拉尔甘草)*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.,样品编号见表1。

1.2 仪器

ZN-02小型粉碎机(北京兴时利和科技发展有限

收稿日期:2018-03-06

修回日期:2018-06-01

* 国家自然科学基金委面上基金项目(81573542):基于形态特征、药效物质及药理作用变化规律采用电子鼻建立苦杏仁“走油”预警机制及质量实时监测系统,负责人:闫永红;国家自然科学基金委青年基金项目(81403054):电子鼻技术快速无损评鉴阳春砂“真伪优劣”的基础研究,负责人:邹慧琴。

** 通讯作者:闫永红,教授,主要研究方向:中药品质评价;邹慧琴,副研究员,主要研究方向:中药品质评价。

表1 收集的野生及栽培甘草样品基本信息

编号	样品名称	编号	样品名称	编号	样品名称
1	杭锦旗巴音乌素野生1	13	杭锦旗八年栽培1	24	陇西二年栽培
2	杭锦旗巴音乌素野生2	14	杭锦旗八年栽培2	25	酒泉三年栽培1
3	杭锦旗巴音乌素野生3	15	杭锦旗八年栽培4	26	酒泉三年栽培2
4	杭锦旗独贵塔拉野生1	16	杭锦旗三年栽培2	27	酒泉三年栽培3
5	杭锦旗独贵塔拉野生2	17	杭锦旗八年栽培5	28	玉门三年栽培1
6	陇西野生1	18	玉门野生1	29	玉门三年栽培2
7	陇西野生2	19	玉门野生2	30	张掖三年栽培
8	陇西野生3	20	杭锦旗八年栽培3	31	张掖二年栽培1
9	赤峰野生1	21	杭锦旗三年栽培1	32	张掖二年栽培2
10	赤峰野生2	22	杭锦旗二年栽培1	33	通辽二年栽培
11	通辽野生1	23	杭锦旗二年栽培2	34	通辽一年栽培
12	通辽野生2				

公司);U-3010紫外可见分光光度计(日本日立公司);Agilent 1100型高效液相色谱仪,四元泵,DAD检测器,自动进样器,柱温箱,Agilent 1100色谱工作站;DIKMA Platisil ODS色谱柱(5 μm, 250×4.6 mm);0.45 μm针筒式微孔滤膜过滤器;BP211D型1/100000电子分析天平(德国赛多利斯);KQ-500DE型数控超声波清洗器(江苏省昆山市超声仪器有限公司)。

1.3 试剂

乙腈为色谱纯(赛默飞世尔科技(中国)有限公司);甲醇、磷酸等为分析纯(北京化工厂);水为屈臣氏纯净水;甘草酸铵标准品(供含量测定用,甘草酸重量=甘草酸铵重量/1.0207,中国食品药品检定研究院,生产批号110731-200615)、甘草苷标准品(供含量测定用,中国食品药品检定研究院,生产批号111610-201005)。

2 实验方法

2.1 甘草断面颜色测量方法^[7]

2.1.1 样品制备

将甘草切成长约2 cm的小段,对甘草段施以压力,令表皮脱落,将去皮的甘草段打粉,过3号筛,粉末置于自制玻璃测色皿中,盖上石英镜片,以测色皿中粉末不随意晃动为准。

2.1.2 颜色测定条件

采用日立3010紫外可见分光光度计进行测量,测量起止波长:380-780 nm;狭缝宽度:1 nm;照明光源:D₆₅;视场选择:10度视角;扫描速度:600 nm·min⁻¹。

2.1.3 精密度考察

取杭锦旗野生样品,按上述供试品制备方法制备供试品,连续测量5次。测量结果RSD均小于3%,结果间ΔE*ab均小于1,ΔE*ab平均值=0.09,色差低于人眼可变范围。表明结果稳定。

2.1.4 重复性考察

随机取杭锦旗野生样品5份,按上述供试品制备方法制备供试品,分别进行测量。测量结果显示RSD均小于3%,结果间ΔE*ab均小于1,ΔE*ab平均值=0.52,色差低于人眼可变辨范围。表明结果稳定。

2.2 HPLC指纹图谱方法的建立^[8]

2.2.1 标准溶液的制备

精密称取甘草酸铵及甘草苷对照品,加入提取液(甲醇:5%氨水=80:20),制成每1 mL含甘草酸0.2 mg、甘草苷0.2 mg的对照品溶液,备用。

2.2.2 供试品溶液的制备

将各甘草样品粉碎,过3号筛。精密称取0.1g于25 mL量瓶中,加入约25 mL提取液(甲醇:5%氨水=80:20),冷浸24 h。超声提取30 min(功率50 kw),放冷至室温,加提取液至刻度,摇匀后过0.45 μm微孔滤膜,即得供试品溶液,备用。

2.2.3 色谱条件

流动相A:0.1%磷酸水(每500 mL含7滴THF),流动相B:乙腈。梯度洗脱条件及检测波长见表2。流速为0.8 mL·min⁻¹,进样量为15 μL,柱温24℃,检测时间为50 min。

按照按上述确定的供试品、对照品制备方法及其

试条件进行样品分析(图1、2、3)。

2.2.4 精密度考察

取甘草酸含量相对较高的杭锦旗野生甘草样品为供试品。按供试品制备方法制备1份,以上述选定方法连续进样5次,考察方法精密度(图4)。

比较共有峰中,单峰面积大于5%总峰面积、分离效果较好的三个色谱峰的保留时间、峰面积,并计算相对标准偏差,色谱峰保留时间的RSD为0.05–0.08%,峰面积的RSD为0.14–0.51%。样品图谱经国家药典委员会中药色谱指纹图谱相似度评价系统进行自动匹配,不经多点校正,相似度在0.998–1.000之间(不包括自身比较),该方法精密度良好。

2.2.5 重现性考察

取杭锦旗野生甘草样品5份,按供试品制备方法提取,以上述选定方法依次进样各一次,扣除称样量差别(称样量尽量接近),考察方法重现性。比较共有峰中,单峰面积大于5%总峰面积、分离效果较好的三个色谱峰保留时间、峰面积,并计算相对标准偏差,色谱峰保留时间的RSD为0.19–0.2%,峰面积的RSD为1–2.25%,相似度在0.986–0.999之间(不包括自身比较),表明该方法重现性良好。

2.2.6 稳定性考察

用考察精密度的同一样品,分别在0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 36, 48 h进样,考察方法稳定性(样品于室温放置)。比较共有峰中,单峰面积大于5%总峰面积、分离效果较好的三个色谱峰的保留时间、峰面积,并计算相对标准偏差,相似度在0.997–1.000之间(不包括自身比较),表明供试液在24 h内稳定。

3 结果与分析

3.1 甘草断面颜色测量结果

对34批甘草样品分别进行断面颜色值的测量,每个样品重复测定三遍,记录颜色指标的平均值,结果见表3。实验选择L*a*b*色空间中L*、a*、b*的值作为颜色测量指标。

3.2 甘草样品HPLC指纹图谱测定结果

将所有栽培甘草样品指纹图谱进行叠加,用色谱指纹图谱相似度软件对其进行分析,得到了甘草栽培品HPLC对照指纹图谱,见图5,共计74个色谱峰,其中共有峰20个,占总面积的92%;通过对所有甘草野生指纹图谱进行分析,得到了野生甘草HPLC对照指

表2 甘草HPLC检测中流动相梯度条件及检测波长

时间/分钟	流动相B/%	波长/nm
0	10	275
10	25	
18		360
20	32	
25		248
60	70	

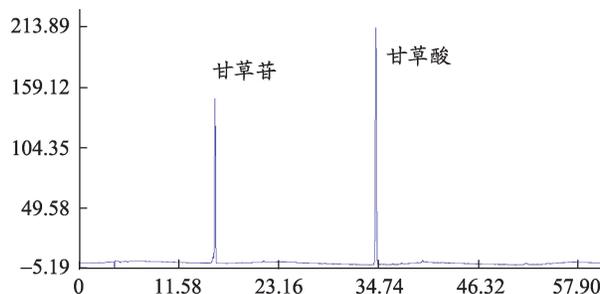


图1 甘草对照品HPLC色谱图

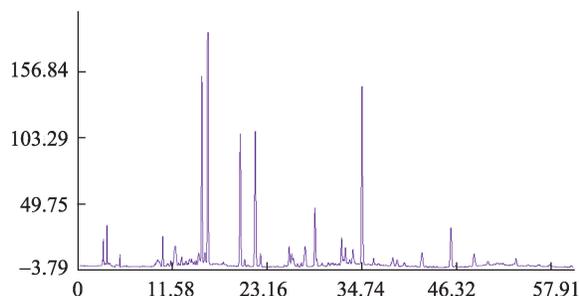


图2 甘草栽培样品HPLC色谱图

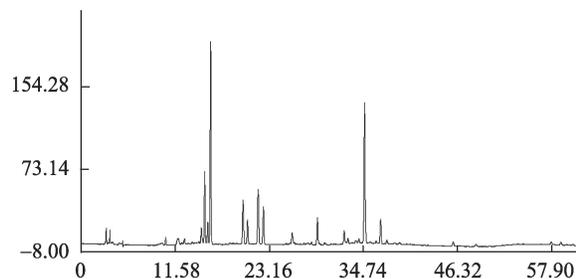


图3 甘草野生品HPLC色谱图

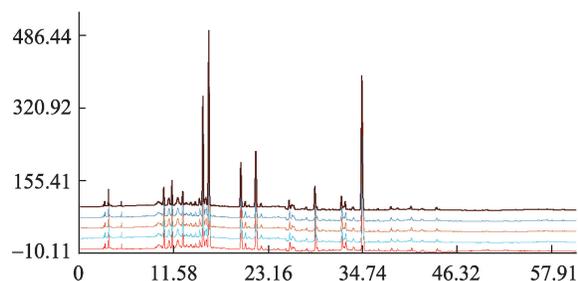


图4 精密度考察

表3 甘草断面颜色测量指标值

编号	断面颜色			编号	断面颜色		
	L*	a*	b*		L*	a*	b*
1	86.01	-3.71	32.28	18	79.15	-0.21	32.08
2	84.44	-3.97	32.9	19	80.83	-1.07	31.6
3	82.55	-2.69	33.94	20	80.77	-0.29	30.24
4	77.38	-0.14	31.33	21	86.61	-3.11	29.82
5	81.61	-1.18	32.74	22	84.29	-1.48	27.54
6	81.17	-1.19	33.74	23	83.74	-1.64	27.58
7	74.07	2.62	35.05	24	88.61	-4.23	23.26
8	81.09	-1.55	33.51	25	82.41	-0.3	27.84
9	81.35	-1.51	29.3	26	81.81	-1.41	26.21
10	82.33	-1.01	30.46	27	81.37	0.08	28.28
11	83.35	-1.55	28.75	28	83.24	-2	27.55
12	79	-1.74	29.6	29	84.15	-2.33	27.39
13	83.17	-2.3	33.65	30	81.29	-0.23	22.92
14	79.27	-0.2	32.74	31	83.44	-0.95	20.13
15	79.87	0.78	34.19	32	83.79	-1.48	20.29
16	82.76	-2.08	31.79	33	88.83	-3.27	19.12
17	84.84	-3.51	30.58	34	88.52	-3.47	20.06

表4 甘草HPLC指纹图谱共有峰保留时间

峰号	保留时间		峰号	保留时间	
	栽培甘草	野生甘草		栽培甘草	野生甘草
1	9.787	9.591	11	25.882	25.364
2	10.401	10.193	12	26.180	25.656
3	14.788	14.492	13	29.006	28.426
4	15.188	14.884	14	32.277	31.631
5	15.567	15.256	15	32.741	32.086
6	15.917	15.599	16	34.777	34.081
7	19.902	19.504	17	36.754	36.019
8	20.441	20.032	18	42.105	42.099
9	21.738	21.303	19	45.642	
10	22.383	21.935	20	48.490	

纹图谱,见图6,经相似度软件分析匹配后,共给出79个色谱峰,其中共有峰17个,占总面积91%,见表4。

结合表4和图5及6可以看出,栽培甘草和野生甘草的HPLC指纹图谱中大多数指纹峰的峰形、保留时间基本一致,差异主要集中在40 min之后的18、19、20号峰。

结合文献^[8]以及上述色谱图可知色谱图前段23 min以前以二氢黄酮苷、查尔酮苷和黄酮苷类成分为主,时间中段25 min到35 min以五环三萜类皂苷成分为主,40分钟之后以香豆素类和黄酮类为主。以此为据,初步将1-10号峰划为一组,其以黄酮苷类成分

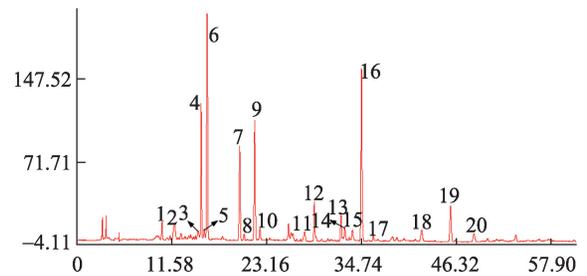


图5 栽培甘草HPLC对照指纹图谱

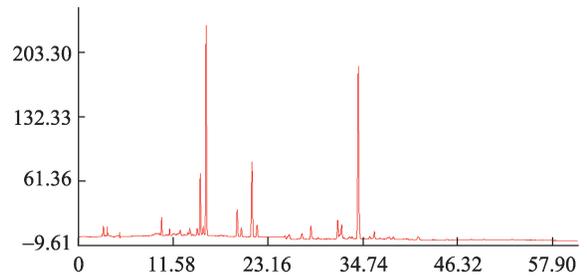


图6 野生甘草HPLC对照指纹图谱

为主;将11-17号峰划为一组,其以三萜皂苷类成分为主;将18-20号峰划为一组,其以香豆素类成分为主。按照上述分类对34份甘草样品进行总结。

以各指纹图谱中测得的甘草酸峰面积为1,计算各样品图谱中色谱峰的峰面积比值,求得三部分的相对峰面积和,结果见表5。

3.3 甘草断面颜色指标值与HPLC指纹图谱信息的典型相关分析

甘草样品颜色指标值L*、a*、b*与HPLC指纹图谱三组色谱峰相对峰面积和为两组连续变量,且经过主成分检验法均符合多元正态分布^[9],符合典型相关分析的条件。运用SAS9.4对34份甘草样品断面颜色指标值L*、a*、b*与HPLC指纹图谱三组色谱峰相对峰面积和做典型相关分析,得到3对典型变量(见表6)。典型相关系数用似然比法检验与0是否有显著差异,结果显示,第1、2典型相关系数具有统计学意义,第1、2典型相关系数分别为0.787035和0.603669,特征值的贡献率分别为73.67%,25.95%,前两对变量的累计贡献率高达99.62%。结果表明甘草断面颜色与HPLC指纹图谱有显著相关性。

4 讨论

在对中药材的质量控制上,多年来一直是通过有效成分或指标性成分的含量测定来检测。目前有关甘草质量评价的报道很多,主要以用HPLC测定甘草

表5 甘草三组色谱峰相对峰面积和

样品编号	1-10号相对峰面积和	11-17号相对峰面积和	18-20号相对峰面积和	样品编号	1-10号相对峰面积和	11-17号相对峰面积和	18-20号相对峰面积和
1	0.2639	0.1923	0.0015	18	0.2131	0.2143	0
2	0.3538	0.2153	0.0295	19	0.2667	0.2194	0
3	0.3456	0.2239	0.0201	20	0.296	0.1924	0.0118
4	0.2715	0.2079	0	21	0.3463	0.2477	0.032
5	0.3287	0.2061	0.004	22	0.2797	0.2268	0.0529
6	0.4352	0.2482	0.0054	23	0.2986	0.2394	0.0326
7	0.1575	0.1842	0.0165	24	0.3531	0.2174	0.1224
8	0.2932	0.1951	0.0403	25	0.1991	0.2136	0.0323
9	0.2836	0.2013	0.0138	26	0.3212	0.2198	0.0241
10	0.263	0.2055	0.0179	27	0.1795	0.2452	0.0448
11	0.3022	0.2343	0.0111	28	0.2416	0.2338	0.0293
12	0.2952	0.1912	0.0067	29	0.3003	0.2388	0.0344
13	0.2734	0.1936	0.0073	30	0.2217	0.2479	0.0058
14	0.2577	0.1938	0.0078	31	0.3541	0.2319	0.1013
15	0.241	0.1936	0.0121	32	0.4248	0.26	0.1474
16	0.3598	0.227	0.0571	33	0.3942	0.241	0.02
17	0.4218	0.2195	0.0103	34	0.3096	0.2581	0.1508

酸、甘草苷等指标成分为主^[10-14]。

尽管以化学成分作为评价中药质量的标准更直观,但这种方法需要满足两个前提,一是中药材中所测得的确是有效成分;二是所含的有效成分或指标成分的含量与所有有效成分的含量比是固定的。但是每一味中药材中都含有多种成分,是一个复杂的系统,不同的有效成分以及有效成分不同的含量比例使每一味中药材看起来更像一个中医复方。因此,经过几千年临床验证而总结的传统药材性状仍具有很高的价值。

中药色泽是中药质量标准的重要指标之一,越来越多的学者关注了中药及中药饮片的颜色测量。邹慧琴等^[7]基于色度学理论建立了甘草断面及表皮颜色指标数字化的方法;熊吟等^[15]使用色度计对金银花粉末进行测量,并结合药材内部物质含量测定结果进行相

表6 甘草断面颜色与 HPLC 指纹图谱的典型相关分析

典型变量对子	典型相关系数	贡献率/%	累计贡献率/%	Pr > F
1	0.787035	73.67	73.67	< .0001
2	0.603669	25.95	99.62	0.0087
3	0.090899	0.38	100.00	0.6208

关性分析,结果金银花颜色值与所含总黄酮含量相关;谢晋等^[16]发现丹皮饮片断面的颜色b*值与饮片中所含丹皮酚的含量存在稳定的相关性。

通过中药外观色泽的客观量化,有望建立一套具有中医药特色的中药质量评价方法,为中药现代化提供新思路。然而中药饮片大多形态体积不一、表面粗糙不平,需要对测量面进行预处理,使色度测量具有一定困难。另外,对中药的人为染色也是中药“辩色论质”的新挑战^[5]。

参考文献

- 1 梁·陶弘景编. 本草经集注. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 206.
- 2 肖培根主编. 新编中药志. 北京: 化学工业出版社, 2002: 266.
- 3 郑元林, 杨淑蕙, 周世生, 等. CIE 1976 LAB 色差公式的均匀性研究. 包装工程, 2005, 26(2): 48-49.
- 4 Xuan Z, Bin G. The Image recognition of mobile robot based on CIE lab space. *International Journal of Information Technology and Computer Science*, 2014, 6(2): 29-35.
- 5 徐曼菲, 吴志生, 刘晓娜, 等. 从辨色论质谈中药质量评价方法. 中国中药杂志, 2016, 41(2): 177-181.
- 6 林相龙. 中药材颜色数字化分析方法的建立及在甘草质量评价中的应用. 北京中医药大学, 2012.
- 7 邹慧琴, 李硕, 林相龙, 等. 基于色度学理论的甘草颜色数字化方法

- 学研究. 世界科学技术-中医药现代化, 2014, 16(12): 2681-2685.
- 8 闫永红. 不同来源甘草的质量特征及评价研究. 北京中医药大学, 2006.
- 9 朱宁, 赵肖肖, 唐庆华. 多元正态性检验三种方法的比较及SAS程序设计. 苏州大学学报(自然科学版), 2012, 28(3): 20-25.
- 10 陈云华, 赵晓霞, 王文全, 等. 高效液相色谱法同时测定甘草中甘草酸、甘草苷、异甘草素的含量. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(8): 52-54.
- 11 周姗, 袁伯川, 杨瑞, 等. HPLC法分析12产地甘草中4种主要黄酮类化合物的含量. 中华中医药学刊, 2017, 35(8): 1943-1947.
- 12 马婷婷, 龚慕辛, 王智民, 等. 甘草色泽与有效成分含量的相关性研究. 中国中药杂志, 2017, 42(19): 3776-3785.
- 13 李铮, 孟兰兰, 傅欣彤, 等. 甘草对照提取物的制备及质量研究. 药物分析杂志, 2017, 37(4): 664-669.
- 14 杨瑞, 李文东, 马永生, 等. 不同基原甘草的分子鉴定及市售甘草药材的质量评价. 药学报, 2017, 52(2): 318-326.
- 15 熊吟, 肖潇, 闫永红, 等. 基于色度分析原理的金银花有效成分含量与颜色值相关性研究. 中华中医药学刊, 2013, 31(3): 667-670.
- 16 谢晋, 彭华胜, 张群林, 等. 基于颜色特征的牡丹皮贮藏年限鉴别及质量评价研究. 中药材, 2016, 39(6): 1232-1235.

Study on Correlation between Color and HPLC Fingerprint of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*

Chen Huirong¹, Lin Xianglong², Yang Ruiqi¹, Cao Guangzhao¹, Yan Yonghong¹, Zou Huiqin¹

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China;

2. Beijing Body Revival Medical Technology Limited Company, Beijing 100088, China)

Abstract: *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* is one of the traditional herbal medicine used in China, study on the correlation between the cross-section color and HPLC fingerprints of them have important significance for promoting the development of traditional disciplines. Quantitative analysis of the color of sample cross section was carried out by color digital method, fingerprint analysis was carried out by HPLC, and the canonical correlation analysis was carried out between them. The results showed that there was a significant correlation between the color of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* cross section and the information of HPLC fingerprinting. Results indicated that, The digitized indexes of color of cross section could reflect the result of fingerprint analysis to some extent.

Keywords: *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*, color digital, HPLC fingerprint, canonical, correlation analysis

(责任编辑:刘 宁 马雅静,责任译审:王 昭)