

不同基原甘草的分子鉴定及市售甘草药材的质量评价

杨 瑞¹, 李文东², 马永生¹, 周 姗¹, 薛宇涛¹, 林瑞超^{3*}, 刘 颖^{1*}

(1. 北京中医药大学生命科学院, 北京 100102; 2. 北京市药品检验所, 北京 102206;
3. 北京中医药大学中药品质评价研究中心, 北京 100102)

摘要: 甘草是我国最常用的大宗中药材之一, 在《神农本草经》中被列为上品。2015 版《中华人民共和国药典》规定, 乌拉尔甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、光果甘草 *Glycyrrhiza glabra* L. 及胀果甘草 *Glycyrrhiza inflata* Bat. 的干燥根及根茎可作为甘草入药。然而不同基原甘草药效差异显著, 而通过传统方法对其进行鉴别十分困难。为了快速、准确地对不同基原甘草进行鉴定, 本文从全国 7 省份 21 居群采集了 240 株甘草。利用 PCR 扩增获得了长度为 616 bp 的 ITS 序列以及 389 bp 的 *psbA-trnH* 序列; 通过 DNAMAN 比对分析, 在 ITS 序列中找到 4 个变异位点, 并确定了 2 种 ITS 单倍型, 在 *psbA-trnH* 序列中找到 3 个变异位点, 并确定了 4 种 *psbA-trnH* 单倍型; 结合 ITS 及 *psbA-trnH* 序列分析, 确定了 3 种基原甘草的分子鉴定方案。利用该方案对来自全国 4 个主要中药材市场的 40 份甘草药材进行了准确鉴定, 并进一步利用 HPLC 法测定各药材中 2 种三萜类有效成分 (甘草酸及异甘草酸) 及 4 种黄酮类有效成分 (甘草素、异甘草素、甘草苷、异甘草苷) 的含量, 应用 SPSS 21.0 对 HPLC 结果进行统计学分析, 从而对市售甘草药材的质量进行评价。本文为不同基原甘草的准确鉴定提供了分子鉴定方案, 并且对甘草药材的流通现状及质量评价具有指导意义。

关键词: 乌拉尔甘草; 光果甘草; 胀果甘草; ITS; *psbA-trnH*; 分子鉴定; HPLC; 质量评价
中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2017) 02-0318-09

The molecular identification of licorice species and the quality evaluation of licorice slices

YANG Rui¹, LI Wen-dong², MA Yong-sheng¹, ZHOU Shan¹, XUE Yu-tao¹, LIN Rui-chao^{3*}, LIU Ying^{1*}

(1. School of Life Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China; 2. Beijing Institute for Drug Control, Beijing 102206, China; 3. Traditional Chinese Medicine Quality Evaluation Research Center, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract: Licorice is one of the most common herbs in traditional Chinese medicine, and classified as top grade in *Shen Nong Ben Cao Jing*. There are three different original plants of licorice stipulated in Chinese Pharmacopeia, *Glycyrrhiza uralensis* Fisch., *Glycyrrhiza glabra* L., and *Glycyrrhiza inflata* Bat. However, previous investigation showed that the pharmacodynamic effects of the three licorices were quite different. It is very difficult to identify them by the classical identification methods. In order to establish a fast and effective identification method, we collected 240 licorice plants from 21 populations of 7 provinces, and amplified their ITS and *psbA-trnH* sequences. ITS sequences with a full length of 616 bp and *psbA-trnH* sequences with a full length of 389 bp were obtained separately. Using DNAMAN to analyze these sequences, 4 variable sites were

收稿日期: 2016-06-21; 修回日期: 2016-07-27.

基金项目: 国家科技重大专项资助项目 (2014ZX09304307001).

*通讯作者 Tel: 86-10-84738653, E-mail: linrch307@sina.com;

Tel: 86-10-84738646, E-mail: liuyliwd@sina.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-0602

found in ITS sequences and 2 ITS haplotypes were determined, and 3 variable sites were found in *psbA-trnH* sequences and 4 *psbA-trnH* haplotypes were determined. With the combination analysis of ITS and *psbA-trnH* sequences, the molecular identification method of original licorice was established. Using this method, 40 samples of licorice slices collected from 4 main herbal material markets in China were identified successfully. Furthermore, the contents of 2 triterpenes, 18 α -glycyrrhizic acid and 18 β -glycyrrhizic acid, and 4 flavonoids, liquiritin, isoliquiritin, liquiritigenin, and isoliquiritigenin in these licorice pieces were examined by HPLC and the results were analyzed using SPSS 21.0. This study provides a new method in identification of licorice, which may serve as a guideline for quality control of licorice slices.

Key words: *Glycyrrhiza uralensis*; *Glycyrrhiza glabra*; *Glycyrrhiza inflata*; ITS; *psbA-trnH*; molecular identification; HPLC; quality evaluation

甘草是我国最常用的大宗药材之一,始载于《神农本草经》,被列为上品^[1],在临床方剂中使用频率极高,素有“十方九草”之称,有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛、调和诸药的功效^[2]。随着现代研究的不断深入,从甘草中分离得到了大量的活性成分,包括三萜类化合物,如甘草酸、异甘草酸,黄酮类化合物,如甘草苷、甘草素,以及甘草多糖,发挥着抗癌^[3,4]、抗病毒^[5,6]、抗炎^[7,8]、保肝^[9,10]等多种药理作用。自20世纪80年代以来,我国甘草的年需求量一直在3.75万吨以上^[11]。

2015版《中华人民共和国药典》^[2]规定,有3种基原植物的干燥根及根茎可作为甘草入药,即:乌拉尔甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)、光果甘草(*Glycyrrhiza glabra* L.)及胀果甘草(*Glycyrrhiza inflata* Bat.)。其中,以乌拉尔甘草分布最广、产量最高。有研究表明,不同基原甘草存在明显的药效差异^[12,13],本课题组前期研究也发现,不同基原甘草的有效成分含量差异显著,质量存在很大区别^[14],对其进行有效鉴定对于保证临床用药的效果及安全性十分必要。然而,3种基原甘草为同属,入药部位均为根部,其显微特征极为相似,因此,难以通过传统的性状鉴定和显微鉴定手段对其进行有效区分。

DNA条形码技术是近些年发展起来的物种鉴定新技术,已被成功应用于多个物种^[15-19],但在植物中还没有一个可以接受的通用条形码。2009年,国际条形码工作组提出 $matK+rbcL$ 作为植物中通用的条形码序列^[20];在同年的第三届国际条形码大会上,*psbA-trnH*和ITS/ITS2被列为 $matK+rbcL$ 的补充序列;2011年,中国条形码工作组通过对中国种子植物中75科141属1757种共约6286样本的4个DNA候选条形码片段(*rbcL*、*matK*、*psbA-trnH*和ITS)进行分析,认为ITS序列和ITS2序列的物种分辨效率显著高于 $rbcL+matK$,而*psbA-trnH*序列被证明鉴定

能力优于其他叶绿体基因序列^[21]。因此,基于前人的研究基础,本文将ITS序列和*psbA-trnH*序列作为鉴定3种不同基原甘草的备选DNA条形码。

本文采集了来自新疆、内蒙、甘肃、青海、山西、黑龙江、宁夏7个省区21个居群的240株野生及栽培甘草,建立了3种基原甘草的分子鉴定方法。利用此方法对40份来自全国4个主要中药材集散中心的甘草药材进行分子鉴定,同时对市售甘草药材的质量进行调查。《中华人民共和国药典》规定,甘草酸和甘草苷为甘草的指标性成分,基于近年来对于甘草活性成分药理作用的报道^[22-34],为更加全面地对甘草质量进行评价,本文对甘草酸、异甘草酸、甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素等6个主要成分的含量进行测定,以期对市售甘草药材的质量评价提供依据。本文的结论对于不同基原甘草的准确鉴定具有重要价值,且对于掌握市售甘草药材的流通现状以及质量评价具有指导意义。

材料与方法

甘草植物材料 收集来自全国7个省区21个居群的240株野生和栽培甘草样品,包括乌拉尔甘草样品120份、光果甘草样品60份和胀果甘草样品60份,由北京中医药大学中药学院刘春生教授鉴定,用作建立不同基原甘草分子鉴定方案的实验材料,详细情况见表1。

甘草药材材料 40份甘草药材样品收集自全国4个主要中药材集散中心,包括:河北安国药材市场10份(AG1~AG10)、安徽亳州药材市场10份(BZ1~BZ10)、四川成都荷花池药材市场10份(HG1~HG1)和河南禹州药材市场10份(YG1~YG10)。

实验仪器 1-13000型离心机(Sigma);移液枪(Eppendorf);TProfessional热循环分析仪(Biometra);

Table 1 Licorice plant materials for establishment of molecular original identification method

Population	Species	Location	Longitude and latitude	Wild/Cultivated	Quantity
1	<i>G. uralensis</i>	Erdos, Inner Mongolia	E109°44'37.71" N39°51'51.07"	Wild	10
2	<i>G. uralensis</i>	Ejina Banner, Inner Mongolia	E101°03'29.96" N41°57'42.88"	Wild	10
3	<i>G. uralensis</i>	Bayannur, Inner Mongolia	E107°29'42.69" N40°49'48.40"	Wild	10
4	<i>G. uralensis</i>	Hangjinqi, Inner Mongolia	E108°44'42.99" N39°50'1.23" ' "	Cultivated	10
5	<i>G. uralensis</i>	Wuwei, Gansu	E102°32'35.25" N37°53'25.67"	Wild	10
6	<i>G. uralensis</i>	Dingxi, Gansu	E104°38'42.53" N35°35'23.04"	Wild	10
7	<i>G. uralensis</i>	Guide, Qinghai	E101°25'23.52" N36°02'34.75"	Cultivated	10
8	<i>G. uralensis</i>	Yingxian, Shanxi	E113°14'35.40" N39°35'17.20"	Cultivated	10
9	<i>G. uralensis</i>	Wuzhong, Ningxia	E106°14'15.15" N37°59'22.76"	Wild	10
10	<i>G. uralensis</i>	Yanchi, Ningxia	E107°24'45.44" N37°47'14.71"	Cultivated	10
11	<i>G. uralensis</i>	Xiamaguan, Ningxia	E106°26'52.32" N37°07'2.83"	Cultivated	20
12	<i>G. inflata</i>	Alar, Xinjiang	E81°16'56.48" N40°36'33.12"	Wild	10
13	<i>G. inflata</i>	Hohhot, Inner Mongolia	E111°29'58.17" N40°52'38.04"	Wild	10
14	<i>G. inflata</i>	Etuohe Front Banner, Inner Mongolia	E107°27'12.23" N38°11'9.14"	Cultivated	10
15	<i>G. inflata</i>	Chifeng, Inner Mongolia	E118°59'18.67" N42°14'49.12"	Wild	10
16	<i>G. inflata</i>	Xiamaguan, Ningxia	E106°26'52.46" N37°07'2.86"	Cultivated	20
17	<i>G. glabra</i>	Jiuquan, Gansu	E98°27'53.12" N39°43'36.18"	Wild	10
18	<i>G. glabra</i>	Zhaozhou, Heilongjiang	E125°17'21.27" N45°41'26.02"	Cultivated	10
19	<i>G. glabra</i>	Dafang, Xinjiang	E87°25'49.59" N43°47'44.38"	Cultivated	10
20	<i>G. glabra</i>	Alar, Xinjiang	E81°16'56.50" N40°36'33.20"	Wild	10
21	<i>G. glabra</i>	Xiamaguan, Ningxia	E106°26'52.40" N37°07'2.80"	Cultivated	20

BG-gdsAUTO510 型凝胶成像系统; DYY-6C 型电泳仪 (北京市六一仪器厂); 高效液相色谱仪: Agilent 1100; Waters 2998; 色谱柱: CAPCELL PAK C₁₈ MGII (4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 日本资生堂株式会社); Agela Durashell C₁₈-AM (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 十万分之一电子天平 CPA225D (德国赛多利斯科学仪器有限公司); 超声清洗仪 KQ-250E (昆山市超声仪器有限公司)。

实验试剂 广谱植物基因组 DNA 快速提取试剂盒、2×Taq PCR Master Mix 酶、BM2000+DNA Marker 购自北京博迈德科技发展有限公司; 对照品甘草酸单铵盐 (批号 MUST-16011310, 纯度 98.86%) 和甘草素 (批号 MUSF14050911, 纯度 98%) 购自成都曼斯特公司; 异甘草酸镁 (批号 100879-201302, 纯度 90.8%) 购自中国食品药品检定研究院; 异甘草苷 (批号 120526, 纯度 98%) 购自世纪奥科公司; 甘草苷 (批号 111610-201106, 纯度 98%) 和异甘草素 (批号 131020, 纯度 98%) 购自成都普菲德公司; 乙腈 (色谱纯) 与甲醇 (色谱纯) 购自 Merck 公司; 甲醇 (分析纯) 与磷酸 (分析纯) 购自北京化学试剂有限公司; 实验用水为屈臣氏蒸馏水。

DNA 的提取、PCR 扩增及测序 取 0.1 g 甘草样品干燥叶片, 采用博迈德广谱植物基因组 DNA 快速提取试剂盒进行总 DNA 提取。PCR 扩增 ITS 序列

及 *psbA-trnH* 序列所用引物均为通用引物。ITS 序列: 正向引物 P1: 5'-AGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGT AGG-3', 反向引物 P4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATAT GC-3'。 *psbA-trnH* 序列: 正向引物 F: 5'-GTTATGCAT GAACGTAATGCTC-3', 反向引物 R: 5'-CGCGCATG GTGGATTCACAATCC-3'。ITS 序列和 *psbA-trnH* 序列的 PCR 扩增体系及程序相同。PCR 反应体系: 2×Taq PCR Master Mix 酶 15.0 μL, 正、反向引物各 1.0 μL (5 μmol·L⁻¹), 总 DNA 3.0 μL, 加 ddH₂O 至 30.0 μL。PCR 扩增程序: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 60 s (35 个循环); 72 °C 10 min; 4 °C 保存。1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 送上海生工生物工程服务有限公司测序。

不同基原甘草分子鉴定方法的建立 将扩增获得的 ITS 序列和 *psbA-trnH* 序列上传至 GenBank 数据库, 进行 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 比对, 以确定是否为目标序列。采用 Contig Express 3.0 (Informax., Inc, USA) 对序列进行拼接和校对。将校对完成的 ITS 序列和 *psbA-trnH* 序列导入 DNAMAN 6.0 (Lynnon Biosoft Co., LTD, USA) 软件, 分别进行比对分析, 统计 ITS 序列和 *psbA-trnH* 序列的单倍型信息, 并在 GenBank 中注册。基于多态性位点差异, 确定物种与单倍型的对应关系, 从而建立分子鉴定方案。

市售甘草药材的分子鉴定 分别提取 40 份甘草药材的总 DNA, 提取方法与甘草叶片 DNA 提取方法相同, 扩增其 ITS 序列和 *psbA-trnH* 序列, 利用已建立的分子鉴定方案对其进行物种鉴定。

HPLC 法分析市售甘草药材中三萜成分的含量 按照本课题组已建立的方法^[14]对甘草药材中的甘草酸以及异甘草酸进行含量测定。色谱条件: 色谱仪: Waters 2998 液相色谱仪; 色谱柱: Agela Durashell C₁₈-AM 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 10 mmol·L⁻¹ 高氯酸铵水溶液 (用氨水调节 pH 8.2)-甲醇比例为 48:52; 流速: 0.8 mL·min⁻¹; 检测波长: 250 nm; 柱温: 50℃; 进样量: 20 μL。对照品储备液的制备: 分别精密称定甘草酸铵和异甘草酸镁的对照品适量, 加 50% 甲醇水溶液制成每 1 mL 含甘草酸单铵盐 0.231 2 mg 和异甘草酸镁 0.011 0 mg 的混合溶液, 即得混合对照品溶液。供试品溶液的制备: 将甘草药材烘干至恒重, 取样品粉末 (过三号药典筛) 0.1 g, 精密称定, 置于 50 mL 量瓶中, 加入 50% 甲醇水溶液至刻度, 密塞, 超声 (频率 50 kHz, 功率 250 W) 提取 30 min, 放冷, 补足失重, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得供试品溶液。线性: 分别精密量取混合对照品溶液 1、2.5、10、15、20 μL, 注入高效液相色谱仪, 测定, 以进样量为纵坐标, 峰面积为横坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程。

HPLC 法分析市售甘草药材中黄酮类成分的含量 按照本课题组已建立的方法^[35]对甘草药材中的 4 种黄酮类化合物进行含量测定。色谱条件: 色谱仪: Agilent 1100; 色谱柱: CAPCELL PAK C₁₈ MGII (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1% 磷酸溶液; 梯度洗脱条件: 0~15 min 20%~25% 乙腈, 15~30 min 25%~40% 乙腈, 30~40 min 40%~60% 乙腈, 40~41 min 65%~95% 乙腈。检测波长: 276 nm (0~13 min), 360 nm (13~23 min), 276 nm (23~28 min), 376 nm (28~55 min); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 30℃; 进样量: 20 μL。对照品储备液的制备方法: 分别精密称取甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素对照品适量, 加 50% 甲醇水溶液制成每 1 mL 分别含有甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素 0.011 880、0.005 760、0.001 202、0.002 368 mg 的混合溶液, 作为对照品溶液。供试品溶液的制备: 方法同三萜成分含量测定部分。线性: 分别精密量取混合对照品溶液 1、2、5、10、15、20 μL, 注入高效液相色谱仪, 测定, 以峰面积为横坐标, 进样量为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程。

HPLC 数据分析 运用统计软件 SPSS (Statistical Product and Service Solutions) 21.0 (IBM Institute Inc., USA) 中的配对 *T* 检验和 *Spearman* 相关性分析, 对甘草药材中 2 种三萜类成分、4 种黄酮类成分、总三萜皂苷以及总黄酮的含量进行统计学分析, 从而对不同基原甘草药材的质量进行评价。

结果

1 基于 ITS 序列和 *psbA-trnH* 序列的甘草分子鉴定

1.1 ITS 序列变异位点及单倍型分析 240 份甘草样品 ITS 序列的 PCR 成功率及测序成功率均为 100%。测序结果显示 ITS 序列长度为 616 bp, 其中 ITS1 长度为 234 bp、5.8 S 为 164 bp、ITS2 为 218 bp。DNAMAN 序列分析结果显示: 3 个物种的 ITS 序列共存在 4 个变异位点 (表 2): ITS1 区域 187 bp 处, 乌拉尔甘草为 C, 光果甘草与胀果甘草均为 T; 5.8S 区域, 3 个物种序列完全一致; ITS2 区域 411~413 bp 处, 乌拉尔甘草为 TGC, 光果甘草与胀果甘草均为 CAA。所有 ITS 序列在种内保持 100% 一致。乌拉尔甘草为单倍型 ITS-I (187C-411T-412G-413C), 栽培和野生品种无区别; 光果甘草与胀果甘草均为单倍型 ITS-II (187T-411C-412A-413A), 栽培和野生品种无区别。因此, ITS 序列可以将乌拉尔甘草从 3 种甘草中鉴定出来, 但无法对光果甘草和胀果甘草进行区分。

Table 2 ITS haplotypes of *G. uralensis*, *G. glabra*, and *G. inflata*.

Species	Haplotype	ITS variable site/bp				GenBank accession No.
		187	411	412	413	
<i>G. uralensis</i>	ITS-I	C	T	G	C	KU356133
<i>G. glabra</i>	ITS-II	T	C	A	A	KU356134
<i>G. inflata</i>	ITS-II	T	C	A	A	KU356135

1.2 *psbA-trnH* 序列变异位点及单倍型分析 240 份甘草样品 *psbA-trnH* 序列的 PCR 成功率及测序成功率均为 100%。测序及序列分析结果显示: *psbA-trnH* 序列长度为 389 bp; 存在 3 个变异位点, 分别位于 224 bp、270 bp 和 323 bp; 可分为 4 种单倍型, 即: 单倍型 PSB-I (224A-270C-323G)、单倍型 PSB-II (224A-270T-323G)、单倍型 PSB-III (224C-270T-323G) 和单倍型 PSB-IV (224A-270T-323A)。其中, 单倍型 PSB-I、PSB-II 为乌拉尔甘草特有单倍型, 单倍型 PSB-IV 为光果甘草特有单倍型, 而单倍型 PSB-III 在乌拉尔甘草和胀果甘草中均有出现。*psbA-trnH* 序列单倍型分布情况见表 3。

Table 3 *psbA-trnH* haplotypes of *G. uralensis*, *G. glabra*, and *G. inflata*

Species	Haplotype	<i>psbA-trnH</i> variable site/bp			GenBank accession No.
		224	270	323	
<i>G. uralensis</i>	PSB-I	A	C	G	KU356136
<i>G. uralensis</i>	PSB-II	A	T	G	KU356137
<i>G. uralensis</i>	PSB-III	C	T	G	KU356138
<i>G. inflata</i>	PSB-III	C	T	G	KU356139
<i>G. glabra</i>	PSB-IV	A	T	A	KU356140

1.3 不同基原甘草分子鉴定方法的建立 根据以上 ITS 序列和 *psbA-trnH* 序列的鉴定结果, 建立两种鉴定方案。方案一: 在对 3 种基原甘草进行分子鉴定时, 首先选择 *psbA-trnH* 序列, 若样品的 *psbA-trnH* 序列为单倍型 PSB-I 或 PSB-II, 可确定为乌拉尔甘草; 若为单倍型 PSB-IV, 可确定为光果甘草; 若为单倍型 PSB-III, 则需进一步扩增其 ITS 序列, 若 ITS 序列为单倍型 ITS-I 则为乌拉尔甘草, 若为单倍型 ITS-II 则为胀果甘草。方案二: 在对 3 种基原甘草进行分子鉴定时, 首先对 ITS 序列进行扩增, 若为单倍型 ITS-I 则为乌拉尔甘草, 若为单倍型 ITS-II 则为光果甘草

或胀果甘草, 需进一步扩增其 *psbA-trnH* 序列, 若为单倍型 PSB-IV, 可确定为光果甘草, 若为单倍型 PSB-III, 可确定为胀果甘草。综上, 《中华人民共和国药典》规定的 3 种基原甘草可以通过以上两种分子鉴定方案, 通过 *psbA-trnH* 序列结合 ITS 序列进行准确鉴定。

2 市售甘草药材的物种鉴定及质量评价

2.1 市售甘草药材的物种鉴定 按照已建立的甘草分子鉴定方法, 对 40 份甘草药材进行鉴定, 结果显示该方法能够成功鉴定全部的甘草药材, 40 份甘草药材中, 乌拉尔甘草 28 份、光果甘草 12 份、胀果甘草 0 份, 鉴定结果见表 4。

2.2 市售甘草药材中三萜类及黄酮类化合物的含量分析 HPLC 色谱图如图 1 所示, A 显示异甘草酸和甘草酸的保留时间分别为 12.508、13.417 min; B 显示甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素的保留时间分别为 9.207、19.654、23.999、35.254 min; C 和 D 分别为乌拉尔甘草药材中三萜类及黄酮类化合物的 HPLC 色谱图; E 和 F 分别为光果甘草药材中三萜类及黄酮类化合物的 HPLC 色谱图。

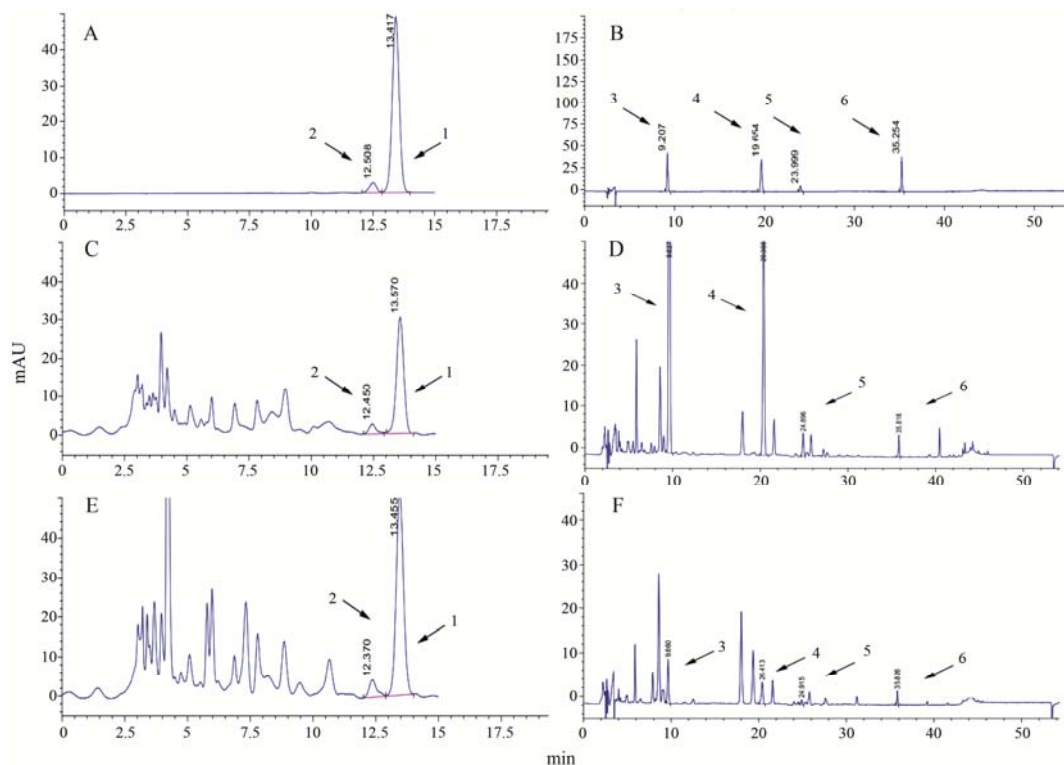


Figure 1 HPLC chromatograms of reference substance and samples. Compound 1–6: 18β-Glycyrrhizic acid, 18α-glycyrrhizic acid, liquiritin, isoliquiritin, liquiritigenin, and isoliquiritigenin, separately. A: HPLC chromatogram of reference substances 18β-glycyrrhizic acid and 18α-glycyrrhizic acid; B: HPLC chromatogram of reference substances liquiritin, isoliquiritin, liquiritigenin, and isoliquiritigenin; C: HPLC chromatogram of 18β-glycyrrhizic acid and 18α-glycyrrhizic acid in *G. uralensis*; D: HPLC chromatogram of liquiritin, isoliquiritin, liquiritigenin, and isoliquiritigenin in *G. uralensis*; E: HPLC chromatogram of 18β-glycyrrhizic acid and 18α-glycyrrhizic acid in *G. glabra*; F: HPLC chromatogram of liquiritin, isoliquiritin, liquiritigenin, and isoliquiritigenin in *G. glabra*

Table 4 Molecular identification and HPLC results of 40 licorice slices

Sample	Haplotype	Molecular identification result	Content / %					
			18 β -Glycyrrhizic acid	18 α -Glycyrrhizic acid	Liquiritin	Isoliquiritin	Liquiritigenin	Isoliquiritigenin
AG1	PSB-IV	<i>G. glabra</i>	4.166 5	0.134 9	1.111 6	0.064 3	0.083 9	0.008 5
AG2	PSB-IV	<i>G. glabra</i>	2.954 5	0.109 9	0.485 0	0.025 0	0.028 8	0.003 7
AG3	PSB-IV	<i>G. glabra</i>	2.120 3	0.085 7	0.713 8	0.048 7	0.072 2	0.007 1
AG4	PSB-IV	<i>G. glabra</i>	2.344 4	0.099 7	0.722 3	0.037 8	0.060 1	0.008 8
AG5	PSB-I	<i>G. uralensis</i>	1.348 8	0.054 8	1.077 0	0.126 7	0.144 6	0.012 1
AG6	PSB-I	<i>G. uralensis</i>	1.847 6	0.060 0	1.537 3	0.179 6	0.166 6	0.020 9
AG7	PSB-I	<i>G. uralensis</i>	1.834 5	0.068 9	1.164 6	0.146 8	0.126 3	0.021 7
AG8	PSB-I	<i>G. uralensis</i>	1.808 8	0.069 9	1.096 1	0.107 9	0.111 4	0.012 8
AG9	PSB-III+ITS-I	<i>G. uralensis</i>	1.844 5	0.053 6	1.666 0	0.071 9	0.148 9	0.015 9
AG10	PSB-I	<i>G. uralensis</i>	1.849 6	0.058 4	1.111 6	0.104 3	0.123 9	0.013 5
BG1	PSB-I	<i>G. uralensis</i>	2.095 9	0.086 3	1.628 4	0.092 9	0.118 8	0.014 1
BG2	PSB-I	<i>G. uralensis</i>	1.611 4	0.069 7	1.490 6	0.099 4	0.122 6	0.014 4
BG3	PSB-I	<i>G. uralensis</i>	1.600 1	0.050 2	1.101 7	0.100 2	0.138 6	0.016 1
BG4	PSB-II	<i>G. uralensis</i>	1.632 8	0.049 5	1.261 9	0.092 1	0.131 9	0.013 6
BG5	PSB-I	<i>G. uralensis</i>	2.392 9	0.096 5	1.081 2	0.092 8	0.179 8	0.014 9
BG6	PSB-II	<i>G. uralensis</i>	2.016 7	0.088 0	0.909 1	0.097 3	0.157 0	0.009 1
BG7	PSB-I	<i>G. uralensis</i>	1.171 2	0.029 8	0.936 8	0.098 5	0.142 4	0.016 1
BG8	PSB-II	<i>G. uralensis</i>	0.938 9	0.043 5	1.177 9	0.107 3	0.123 9	0.011 6
BG9	PSB-II	<i>G. uralensis</i>	1.660 4	0.043 4	1.280 9	0.125 4	0.143 0	0.028 5
BG10	PSB-II	<i>G. uralensis</i>	2.002 6	0.059 1	0.929 3	0.105 4	0.245 4	0.038 0
HG1	PSB-I	<i>G. uralensis</i>	1.592 1	0.023 5	0.921 4	0.109 5	0.143 9	0.009 3
HG2	PSB-IV	<i>G. glabra</i>	2.659 1	0.097 1	0.754 4	0.055 9	0.085 8	0.006 9
HG3	PSB-I	<i>G. uralensis</i>	2.019 5	0.061 3	0.998 5	0.097 5	0.138 3	0.013 0
HG4	PSB-I	<i>G. uralensis</i>	2.158 7	0.069 3	0.925 5	0.086 8	0.120 0	0.025 4
HG5	PSB-I	<i>G. uralensis</i>	2.163 8	0.058 8	0.827 9	0.088 1	0.159 9	0.011 9
HG6	PSB-IV	<i>G. glabra</i>	2.625 4	0.094 0	0.469 9	0.051 1	0.045 9	0.009 3
HG7	PSB-IV	<i>G. glabra</i>	2.406 0	0.087 3	0.489 1	0.041 7	0.083 3	0.008 3
HG8	PSB-I	<i>G. uralensis</i>	2.090 8	0.071 0	0.865 9	0.102 3	0.121 6	0.023 0
HG9	PSB-IV	<i>G. glabra</i>	2.286 3	0.092 4	0.531 8	0.062 4	0.064 7	0.008 9
HG10	PSB-I	<i>G. uralensis</i>	2.056 5	0.070 0	0.799 9	0.099 1	0.140 8	0.018 4
YG1	PSB-IV	<i>G. glabra</i>	2.103 9	0.083 5	0.427 2	0.041 7	0.063 6	0.009 0
YG2	PSB-I	<i>G. uralensis</i>	1.886 3	0.058 7	0.848 3	0.109 5	0.147 7	0.019 4
YG3	PSB-I	<i>G. uralensis</i>	1.797 8	0.053 0	0.805 9	0.092 7	0.138 2	0.017 6
YG4	PSB-I	<i>G. uralensis</i>	1.451 0	0.053 2	0.796 6	0.083 3	0.124 7	0.013 0
YG5	PSB-IV	<i>G. glabra</i>	2.649 0	0.098 9	0.367 0	0.047 4	0.030 1	0.006 1
YG6	PSB-I	<i>G. uralensis</i>	1.731 1	0.044 6	0.570 6	0.106 4	0.136 3	0.016 3
YG7	PSB-IV	<i>G. glabra</i>	2.003 1	0.081 4	0.613 4	0.052 8	0.032 6	0.009 6
YG8	PSB-IV	<i>G. glabra</i>	2.037 9	0.082 0	0.680 0	0.064 5	0.032 7	0.008 4
YG9	PSB-I	<i>G. uralensis</i>	1.533 3	0.045 8	0.846 1	0.095 5	0.135 7	0.016 1
YG10	PSB-I	<i>G. uralensis</i>	1.466 5	0.049 4	0.716 5	0.086 7	0.141 1	0.015 3

各活性成分的标准曲线如下: 甘草酸: $Y=1\times 10^{-6}X+1.42\times 10^{-2}$ ($R^2=0.999\ 9$); 异甘草酸: $Y=7\times 10^{-7}X+1.52\times 10^{-3}$ ($R^2=1$); 甘草苷: $Y=6\times 10^{-4}X+9\times 10^{-5}$ ($R^2=0.999\ 9$); 异甘草苷: $Y=2\times 10^{-4}X+4\times 10^{-5}$ ($R^2=0.999\ 8$); 甘草素: $Y=3\times 10^{-4}X+3\times 10^{-5}$ ($R^2=0.999\ 9$); 异甘草素: $Y=1\times 10^{-4}X-4\times 10^{-5}$ ($R^2=0.999\ 2$).

各甘草药材中甘草酸、异甘草酸、甘草苷、异甘

草苷、甘草素、异甘草素的含量见表 4 及图 2A~2F。各甘草药材中总三萜及总黄酮的含量见图 2G 和 2H。

2.3 市售甘草药材的质量评价 以甘草酸和异甘草酸的含量之和作为总三萜皂苷含量, 以甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素的含量之和作为总黄酮含量。以甘草酸、异甘草酸、甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素、总三萜皂苷以及总黄酮的含量分别作为评

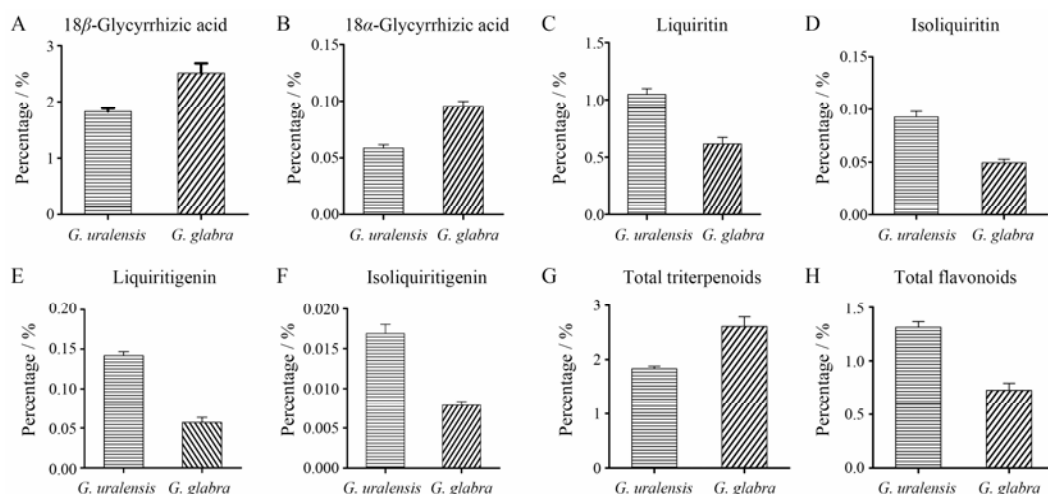


Figure 2 The triterpenoids and flavonoids contents in 40 licorice slices. A–F: The contents of 18β-glycyrrhizic acid, 18α-glycyrrhizic acid, liquiritin, isoliquiritin, liquiritigenin, and isoliquiritigenin in *G. uralensis* and *G. glabra*; G, H: The contents of total saponins and total flavonoids in *G. uralensis* and *G. glabra*

价指标, 以配对 *t* 检验的方法对 2 种不同基原甘草药材中各成分的含量进行统计学分析, 结果见表 5。统计结果显示, 以上 6 种化合物、总三萜皂苷以及总黄酮的含量在 2 种基原甘草药材中均存在显著差异, 光果甘草的甘草酸、异甘草酸以及总三萜皂苷的含量均明显高于乌拉尔甘草; 而乌拉尔甘草的 4 种黄酮类化合物以及总黄酮的含量则明显高于光果甘草。

运用 SPSS 21.0 分析软件中的 *Spearman* 相关性分析, 对 40 份甘草药材样品中甘草酸与异甘草酸、甘草苷与异甘草苷、甘草素与异甘草素的含量进行相关性分析, 结果见表 6。结果表明, 在乌拉尔甘草与光果甘草中, 甘草酸与异甘草酸含量、甘草苷与异甘草苷含量、甘草素与异甘草素含量均具有显著的相关关系。

Table 5 The Paired *t*-test results

Compound	<i>P</i>
18β-Glycyrrhizic acid	0.001 9
18α-Glycyrrhizic acid	< 0.000 1
Liquiritin	< 0.000 1
Isoliquiritin	0.000 9
Liquiritigenin	< 0.000 1
Isoliquiritigenin	0.000 3
Total saponins	0.012 4
Total flavonoids	< 0.000 1

Table 6 The *Spearman* correlation results

Compound	<i>r_s</i>	<i>P</i>
18β-Glycyrrhizic acid and 18α-Glycyrrhizic acid	0.890	< 0.000 1
Liquiritin and isoliquiritin	0.648	< 0.000 1
Liquiritigenin and isoliquiritigenin	0.628	< 0.000 1

讨论

目前对于《中华人民共和国药典》规定的 3 种基原甘草的鉴定多集中于生药形态组织学^[36, 37]及化学成分含量上的差异^[12], 本文收集了来自全国 7 个省份 21 个居群的 240 株甘草, 通过 ITS 序列结合 *psbA-trnH* 序列分析, 确定不同基原甘草特有的单倍型, 从而从分子水平达到了鉴定 3 种基原甘草的目的。利用本论文中建立的分子鉴定方案, 本文对来自全国 4 个主要中药材市场的 40 份甘草药材进行了准确有效的基原鉴定。结果显示, 在 4 个主要药材市场中均未发现胀果甘草样品, 说明市场上流通的甘草主体为乌拉尔甘草 (28 份) 和光果甘草 (12 份)。

为了进一步调查市售甘草药材的质量, 本文利用 HPLC 对 40 份甘草药材中 2 种三萜类成分和 4 种黄酮类成分进行了含量测定。分析结果显示, 光果甘草样品中, 三萜类成分含量均显著高于乌拉尔甘草样品; 而乌拉尔甘草样品中, 黄酮类成分含量则显著高于光果甘草样品。由此提示, 不同基原甘草可用于不同目标成分的获得, 从而提高药材的使用效率。此外, 不同有效成分的药理活性差异很大, 如甘草酸和异甘草酸在治疗肝病以及发挥抗病毒作用方面具有的不可替代的活性^[38, 39], 而黄酮类成分在抗氧化、治疗神经退行性疾病方面具有显著疗效^[40, 41], 由此提示, 不同基原甘草的药效不同, 在疾病的治疗及使用方面应区分对待。此外, 通过对化合物含量的相关性进行比较分析, 发现甘草酸与异甘草酸、甘草苷与异甘草苷、甘草素与异甘草素含量之间存在着显著相关性, 由此可见, 其代谢途径上存在某种联系, 值得深

入探讨。

《中华人民共和国药典》规定, 甘草药材中甘草酸含量不得低于 2.0%, 甘草苷含量不得低于 0.5%。通过对四大药材市场的甘草药材质量进行考察发现, 质量最好的甘草样品中, 甘草酸含量可高达 4.2%, 而品质较差的甘草样品中, 甘草酸含量不足 1.0%。40 份甘草药材样品中, 甘草酸含量未达标的为 19 份, 甘草苷含量未达标的为 5 份。由于市场流通的甘草以栽培甘草为主, 因此人工栽培甘草的质量仍需进一步提高, 而药材市场也需要进一步加强监管。

References

- [1] Sen L. Shennong's Herbal (神农本草经) [M]. Shanghai: Shanghai Technology and Health Press, 1959: 35.
- [2] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. (中华人民共和国药典: 一部) [S]. Part I. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 87.
- [3] Wang KL, Hsia SM, Chan CJ, et al. Inhibitory effects of isoliquiritigenin on the migration and invasion of human breast cancer cells [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2014, 17: 337–349.
- [4] Li S, Zhu JH, Cao LP, et al. Growth inhibitory *in vitro* effects of glycyrrhizic acid in U251 glioblastoma cell line [J]. *Neurol Sci*, 2014, 35: 1115–1120.
- [5] Kwon HJ, Kim HH, Ryu YB, et al. *In vitro* anti-rotavirus activity of polyphenol compounds isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* [J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18: 7668–7674.
- [6] Feng YC, Wang KC, Chiang LC, et al. Water extract of licorice had anti-viral activity against human respiratory syncytial virus in human respiratory tract cell lines [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 148: 466–473.
- [7] Wu TY, Khor TO, Saw CL, et al. Anti-inflammatory/anti-oxidative stress activities and differential regulation of Nrf2-mediated genes by non-polar fractions of tea *Chrysanthemum zawadskii* and licorice *Glycyrrhiza uralensis* [J]. *AAPS J*, 2011, 13: 1–13.
- [8] Chandrasekaran CV, Deepak HB, Thiyagarajan P, et al. Dual inhibitory effect of *Glycyrrhiza glabra* (GutGard™) on COX and LOX products [J]. *Phytomedicine*, 2011, 18: 278–284.
- [9] Sharifzadeh M, Shamsa F, Shiran S, et al. A time course analysis of systemic administration of aqueous licorice extract on spatial memory retention in rats [J]. *Planta Med*, 2008, 74: 485–490.
- [10] Abe K, Ikeda T, Wake K, et al. Glycyrrhizin prevents of lipopolysaccharide/*D*-galactosamine-induced liver injury through down-regulation of matrix metalloproteinase-9 in mice [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2008, 60: 91–97.
- [11] Liu YY, Liu CS, Zeng BF, et al. Research progress on germplasm resources of *Glycyrrhiza Radix et Rhizoma* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2013, 44: 3593–3598.
- [12] Tang LQ, Zhang ST, Liu S, et al. Content determination of glycyrrhizic acid in *Glycyrrhiza uralensis* from different sources by HPLC [J]. *China Pharm (中国药房)*, 2010, 21: 3700–3701.
- [13] Liu YC, Li Z, Ma LD, et al. Simultaneous determination of 4 flavonoid glycosides in licorice and application in original plants identification [J]. *Chin Pharm J (中国药理学杂志)*, 2011, 46: 1112–1116.
- [14] Yang R, Li WD, Yuan BC, et al. Simultaneous determination of 18 α -glycyrrhizic acid and 18 β -glycyrrhizic acid in three licorice samples from different origin by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2016, 36: 1078–1084.
- [15] Bruyns PV, Mapaya R, Hedderson TJ. A new subgeneric classification for euphorbia (Euphorbiaceae) in southern Africa based on ITS and *psbA-trnH* sequence data [J]. *Taxon*, 2006, 55: 397–420.
- [16] Yao H, Song JY, Ma XY, et al. Identification *Dendrobium* species by a candidate DNA barcode sequence: the chloroplast *psbA-trnH* intergenic region [J]. *Planta Med*, 2009, 75: 667–669.
- [17] Ma XY, Xie CX, Liu C, et al. Species identification of medicinal pteridophytes by a DNA barcode marker, the chloroplast *psbA-trnH* intergenic region [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33: 1919–1924.
- [18] Alzate F, Ramirez M. Phylogenetic analyses of Bomarea (Alstroemeriaceae) based on combined analyses of nrDNA ITS, *psbA-trnH*, *rpoB-trnC* and *matK* sequences [J]. *Taxon*, 2008, 57: 853–862.
- [19] Liu Y, Zhang L, Liu Z, et al. Species identification of Rhododendron (Ericaceae) using the chloroplast deoxyribonucleic acid *psbA-trnH* genetic marker [J]. *Pharmacogn Mag*, 2012, 8: 29–36.
- [20] CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for landplants [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2009, 106: 12794.
- [21] Chen SL, Yao H, Han JP, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. *PLoS One*, 2010: e8613.
- [22] Pang HG, Huang TQ, Song JN, et al. Inhibiting HMGB1 with glycyrrhizic acid protects brain injury after DAI *via* its anti-inflammatory effect [J]. *Mediators Inflamm*, 2016, 2016: 4569521.
- [23] Baltina LA, Zarubaev VV, Baltina LA, et al. Glycyrrhizic acid derivatives as influenza A/H1N1 virus inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25: 1742–1746.

- [24] Cheng Y, Zhang J, Shang J, et al. Prevention of free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity in HepG2 cells by magnesium isoglycyrrhizinate *in vitro* [J]. *Pharmacology*, 2009, 84: 183–190.
- [25] He YQ, Zeng FQ, Liu Q, et al. Protective effect of magnesium isoglycyrrhizinate on ethanol-induced testicular injuries in mice [J]. *J Biomed Res*, 2010, 24: 153–160.
- [26] Zhao Z, Wang W, Guo H, et al. Antidepressant-like effect of liquiritin from *Glycyrrhiza uralensis* in chronic variable stress induced depression model rats [J]. *Behav Brain Res*, 2008, 194: 108–113.
- [27] 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: 1179–1184.
- [28] Zhou Y, Ho WS. Combination of liquiritin, isoliquiritin and isoliquiritigenin induce apoptotic cell death through upregulating p53 and p21 in the A549 non-small cell lung cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2014, 31: 298–304.
- [29] Kaur P, Kaur S, Kumar N, et al. Evaluation of antigenotoxic activity of isoliquiritin apioside from *Glycyrrhiza glabra* L [J]. *Toxicol in Vitro*, 2009, 23: 680–686.
- [30] Kang HE, Jung HY, Yu KC, et al. Pharmacokinetics of liquiritigenin in mice, rats, rabbits, and dogs, and animal scale-up [J]. *J Pharm Sci*, 2009, 98: 4327–4342.
- [31] Chen L, Chen W, Qian X, et al. Liquiritigenin alleviates mechanical and cold hyperalgesia in a rat neuropathic pain model [J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 5676.
- [32] Kim YW, Ki SH, Lee JR, et al. Liquiritigenin, an aglycone of liquiritin in *Glycyrrhizae radix*, prevents acute liver injuries in rats induced by acetaminophen with or without buthionine sulfoximine [J]. *Chem Biol Interact*, 2006, 161:125–138.
- [33] Kanazawa M, Satomi Y, Mizutani Y, et al. Isoliquiritigenin inhibits the growth of prostate cancer [J]. *Eur Urol*, 2003, 43: 580–586.
- [34] Takahashi T, Takasuka N, Iigo M, et al. Isoliquiritigenin, a flavonoid from licorice, reduces prostaglandin E2, and nitric oxide, causes apoptosis, and suppresses aberrant crypt foci development [J]. *Cancer Sci*, 2004, 95: 448–453.
- [35] Yang R, Yuan BC, Ma YS, et al. Simultaneous determination of liquiritin, isoliquiritin, liquiritigenin and isoliquiritigenin in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch., *Glycyrrhiza glabra* L., and *Glycyrrhiza inflata* Bat. by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2016, 36: 1729–1736.
- [36] Zeng Lu, Li SH, Lou ZQ. Study on the pharmacognosy morphology of Chinese licorice [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 1988, 23: 200–208.
- [37] Zhang JJ, Lin HM, Liu T. Study on characteristics and identify indexes of three kinds of medicine licorice seeds [J]. *J Gansu Agric Univ (甘肃农业大学学报)*, 2012, 47: 68–72.
- [38] Tang HF, Mao LG, Jiang RA, et al. Protective effect against monoammonium glycyrrhizinate on lipopolysaccharide induced acute lung injury in mice [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2007, 42: 954–958.
- [39] Yang J, Yu JP. Effects of 18 α -glycyrrhizic acid on rat liver cytochrome P450 isoenzymes and phase II transferase [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2001, 36: 321–324.
- [40] Fan ZZ, Zhao HW, Guo J, et al. Antidepressant activities of flavonoids from *Glycyrrhiza uralensis* and its neurogenesis protective effect in rats [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2012, 47: 1612–1617.
- [41] Fu Y, Chen J, Li YJ, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of six flavonoids separated from licorice [J]. *Food Chem*, 2013, 141: 1063–1071.