

苦参-甘草药对提取工艺的优化及其化学成分分析

赵洋^{1,2}, 张涛², 贾红梅², 于猛², 邹忠梅^{2*}

(1. 天津中医药大学, 天津 300193;

2. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193)

[摘要] 目的: 优选苦参-甘草药对的提取工艺, 并对其提取物的化学成分进行分析。方法: 以苦参碱、氧化苦参碱和甘草酸的转移率为指标, 在单因素试验基础上, 采用正交试验考察乙醇体积分数、提取次数、提取时间和液料比对苦参-甘草药对提取工艺的影响。利用 UPLC-Q-TOF/MS 对苦参-甘草药对提取物化学成分进行在线鉴定。结果: 苦参-甘草药对的最佳提取条件为加 8 倍量 60% 乙醇回流提取 2 次, 每次 2 h, 提取前浸泡 1 h; 苦参碱和氧化苦参碱总转移率 93.92%, 甘草酸转移率 99.23%。苦参-甘草药对提取物共鉴定出 49 个成分, 其中 28 个来自于苦参, 21 个来自于甘草。结论: 优选的提取工艺稳定可行。苦参-甘草药对配伍提取具有相互促进溶出的作用, 为阐明其他药对的药效物质基础及配伍机制提供参考。

[关键词] 苦参-甘草; 药对; 提取工艺; 苦参碱; 氧化苦参碱; 甘草酸

[中图分类号] R283.6; R284.1; R284.2; R917 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)03-0018-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017030018

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161117.1554.012.html>

[网络出版时间] 2016-11-17 15:54

Optimization of Extraction Process for Couplet Medicines of Sophorae Flavescentis Radix-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma and Identification of Its Chemical Constituents

ZHAO Yang^{1,2}, ZHANG Tao², JIA Hong-mei², YU Meng², ZOU Zhong-mei^{2*}

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjing 300193, China;

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of couplet medicines of Sophorae Flavescentis Radix-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma and to quickly identify the chemical constituents in its extract. **Method:** Taking transfer rates of matrine, oxymatrine and glycyrrhizic acid as comprehensive evaluation index, based on single factor tests, optimum extraction conditions of couplet medicines extract were selected by orthogonal test. The chemical constituents of couplet medicines extract were identified on-line by UPLC-Q-TOF/MS. **Result:** Optimum reflux extraction process was as follows: soaked for 1 h and extracted twice with 8 times the amount of 60% ethanol, 2 h for each time. Total transfer rate of matrine and oxymatrine was 93.92%, the extraction yield of glycyrrhizic acid was 99.23%. Furthermore, a total of 49 constituents were identified in couplet medicines extract, 28 constituents were from Sophorae Flavescentis Radix and 21 constituents were from Glycyrrhizae Radix et Rhizoma. **Conclusion:** The mixed extract has a certain auxo-action for extraction of matrine, oxymatrine and glycyrrhizic acid and the optimum extraction process is stable and feasible. Identification of chemical constituents in extract will be useful for elucidation of its active constituents and compatible mechanism.

[收稿日期] 20160419(016)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09103201-29);北京市自然科学基金项目(7132136)

[第一作者] 赵洋, 硕士, 从事中药成分分析研究, Tel:010-57833281, E-mail: youngzhao91@163.com

[通讯作者] * 邹忠梅, 博士, 研究员, 从事天然药物化学研究, Tel:010-57833290, E-mail: zmzou@implad.ac.cn

[Key words] Sophorae Flavescentis Radix-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma; couplet medicines; extraction technology; matrine; oxymatrine; glycyrrhizic acid

苦参具有清热燥湿、杀虫利尿的功效,主要活性成分为生物碱类和黄酮类化合物。生物碱类成分具有抗炎、抗心律失常、抗肿瘤和免疫调节等药理作用,其中苦参碱和氧化苦参碱在临床上已用于治疗慢性肝炎和肝纤维化等疾病^[1-2]。甘草具有补脾益气、调和诸药的功效,其活性成分主要为三萜皂类和黄酮类化合物。药理研究表明甘草具有抗炎、保肝、抗肿瘤和抗氧化等作用^[3]。苦参和甘草均为常用中药,二者配伍使用始见于苦参甘草汤。王绪平等^[4]对苦参及配伍甘草后的水煎液进行急性毒性研究,结果发现苦参-甘草配伍后小鼠死亡率降低,表明甘草具有降低苦参毒性的作用。前期研究发现以苦参-甘草(1:1)为主要药对的复方可通过降低博来霉素诱导的肺纤维化模型小鼠肺组织中白细胞介素-6,白细胞介素-17,转移生长因子- β 和羟基脯氨酸的水平来发挥抗肺纤维化作用,且苦参-甘草二者混合提取较单独提取效果好^[5]。

目前,甘草和苦参的提取方法主要有回流法、超声法和超临界 CO₂ 流体萃取法^[6-7],其中回流法具有提取效率高、操作简便等优点,在中药提取中应用广泛^[8]。有学者在苦参提取中加入表面活性剂,以降低药材与溶剂之间的表面张力,增加药材中细胞渗透性,使溶剂最大限度地溶解药材中有效成分,显著增大了苦参碱提取率^[9-10]。刘玉红等^[11]以水为溶剂对甘草进行回流提取,结果煎液中甘草酸和甘草苷的提取率分别达 91.2% 和 92.2%。为最大程度地保留苦参-甘草药对中多种有效物质,发挥药对的最佳作用,本实验拟建立 HPLC 同时测定苦参-甘草药对提取物中苦参碱、氧化苦参碱和甘草酸含量的方法,在单因素试验基础上,以苦参碱、氧化苦参碱和甘草酸的转移率为评价指标,利用正交试验优选苦参-甘草(1:1)药对的混合提取工艺,并采用 UPLC-Q-TOF/MS 联用技术快速鉴定提取物中化学成分,为该药对的综合利用和开发提供实验依据。

1 材料

2690 型高效液相色谱仪和 ACQUITY™ 超高效液相色谱仪配置 Q-TOF 分析器的 SYNAPT G2 HDMS 高分辨质谱仪(美国 Waters 公司),AT201 型 1/10 万电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),LGJ-18 型冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司)。

苦参饮片和甘草饮片均购于北京同仁堂药材有限公司,经中国医学科学院药用植物研究所张本刚研究员鉴定,分别为豆科植物苦参 *Sophora flavescens* 的干燥根和豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 的干燥根及根茎,标本现保存于中国医学科学院药用植物研究所国家中药化合物库(苦参、甘草饮片编号分别为 KS-20150407,GC-20150104)。苦参碱、氧化苦参碱及甘草酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110805-200507,110780-200401,111089-200501,纯度均 > 98%),水为娃哈哈纯净水,甲醇、乙腈、甲酸、磷酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 药材的提取

2.1.1 苦参-甘草药对^[5] 取苦参和甘草饮片各 25 g,混合,加 10 倍量 60% 乙醇回流提取 2 次,每次 2 h,首次提取前浸泡 1 h,过滤,浓缩后真空冷冻干燥,得苦参-甘草药对提取物粉末,计算得率 32.31%。

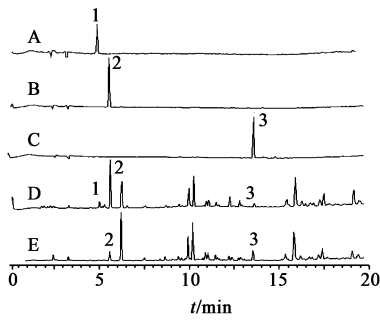
2.1.2 苦参和甘草单味药 取苦参和甘草饮片各 25 g,分别按 2.1.1 项下方法处理,分别得苦参和甘草单味药的提取物粉末,计算得率分别为 30.20% 和 31.49%。

2.2 苦参碱、氧化苦参碱和甘草酸的含量测定

2.2.1 样品溶液的制备 称取苦参-甘草提取物样品 7.0 mg,置于 10 mL 量瓶中,加 50% 甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,于 13 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,取上清液过 0.45 μ m 微孔滤膜,得供试品溶液。分别精密称取苦参碱、氧化苦参碱和甘草酸对照品适量,置于 2 mL 量瓶中,加 50% 甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,得质量浓度分别为 0.73,0.75,0.803 g·L⁻¹ 的对照品储备液。

2.2.2 色谱条件 CAPCELL PAK C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 35 $^{\circ}$ C,自动进样器温度 4 $^{\circ}$ C,进样量 10 μ L,检测波长 210 nm(苦参碱和氧化苦参碱)和 230 nm(甘草酸),流动相 0.1% 磷酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 2 min,95% ~ 87% A;2 ~ 5 min,87% ~ 80% A;5 ~ 20 min,80% ~ 100% A)。见图 1。

2.2.3 线性关系考察 精密吸取苦参碱、氧化苦参碱和甘草酸对照品溶液适量,混合,加 50% 甲醇



A, B. 对照品 (210 nm); C. 对照品 (230 nm); D. 供试品 (210 nm); E. 供试品 (230 nm); 1. 苦参碱; 2. 氧化苦参碱; 3. 甘草酸

图 1 苦参-甘草提取物 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of *Sophorae Flavescentis Radix-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* extract

稀释,得系列混合对照品溶液,按 2.2.2 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得苦参碱、氧化苦参碱及甘草酸回归方程分别为 $Y = 4\,830.40X - 387.66$ ($r = 0.999\,9$), $Y = 318.90X + 34.68$ ($r = 0.999\,9$), $Y = 1\,052.70X - 39.09$ ($r = 0.999\,9$), 线性范围依次为 1.5 ~ 150.0, 3.5 ~ 350.0, 1.0 ~ 100.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2.4 精密度试验 取 2.2.3 项下混合对照品溶液(苦参碱、氧化苦参碱和甘草酸质量浓度分别为 75.0, 175.0 和 50.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$),按 2.2.2 项下条件重复进样 6 次,计算苦参碱、氧化苦参碱和甘草酸峰面积的 RSD 分别为 2.5%, 2.3% 和 1.3%。

2.2.5 重复性试验 精密称取同一苦参-甘草药对提取物 6 份,按 2.2.1 项下方法平行制备供试品溶液,按 2.2.2 项下条件测定,计算苦参碱、氧化苦参碱和甘草酸的质量分数分别为 5.04, 64.21 和 28.19 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 4.2%, 0.9% 和 1.0%。

2.2.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液进样 10 μL ,分别于制备后 0, 4, 8, 12, 16, 24 h 按 2.2.2 项下条件测定,计算苦参碱、氧化苦参碱和甘草酸峰面积的 RSD 分别为 1.3%, 1.0% 和 1.5%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.7 加样回收试验 精密称取 9 份已知含量的苦参-甘草提取物样品粉末(编号 KG-20150303,苦参碱、氧化苦参碱和甘草酸质量分数分别为 0.39%, 7.13% 和 2.85%),每份约 3.50 mg,分别置于 10 mL 量瓶中,按样品中苦参碱、氧化苦参碱和甘草酸含量的 80%, 100% 和 120% 精密加入单独放置的苦参碱、氧化苦参碱和甘草酸对照品溶液适量,按 2.2.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.2 项下条件测定,结果苦参碱、氧化苦参碱和甘草酸的平均

加样回收率均在 95% ~ 105%, RSD 分别为 1.4%, 0.5% 和 1.2%。

2.3 单因素试验考察

2.3.1 提取溶剂 取苦参和甘草饮片各 25 g,共 4 份,分别加 10 倍量溶剂(水, 30% 乙醇, 60% 乙醇和 90% 乙醇)回流提取 2 次,每次 2 h,首次提取前浸泡 1 h,过滤,浓缩后真空冷冻干燥,得提取物粉末并称量,结果见表 1。

表 1 不同考察因素对苦参-甘草中指标性成分转移率的影响

Table 1 Influence of factors on transfer rates of matrine, oxymatrine and glycyrrhizic acid from *Sophorae Flavescentis Radix-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*

因素	水平	(苦参碱 + 氧化苦参碱)质量分数 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$		(苦参碱 + 氧化苦参碱)转移率 / %	
		提取物质量 / g	甘草酸质量分数 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	甘草酸转移率 / %	甘草酸转移率 / %
提取溶剂	水	15.73	46.34	21.44	72.18
	30% 乙醇	15.39	64.03	24.70	81.36
	60% 乙醇	16.45	69.09	28.21	99.32
	90% 乙醇	8.94	81.60	17.13	32.77
提取时间	1 h	12.74	77.34	30.31	82.64
	2 h	16.45	69.09	28.21	99.32
	3 h	15.40	73.72	29.92	98.60
液料比	8:1	14.76	68.93	30.02	94.83
	10:1	16.45	69.09	28.21	99.32
	12:1	15.14	73.78	27.69	89.73
提取次数	1 次	11.61	73.53	29.43	73.13
	2 次	16.45	69.09	28.21	99.32
	3 次	15.66	76.86	25.47	85.38

2.3.2 提取时间 取苦参和甘草饮片各 25 g,共 3 份,加 10 倍量 60% 乙醇提取,提取时间分别为 1, 2, 3 h,其他提取条件同 2.3.1 项,结果见表 1。

2.3.3 液料比 取苦参和甘草饮片各 25 g,共 3 份,加 10 倍量 60% 乙醇提取 2 h,液料比分别为 8:1, 10:1, 12:1,其他提取条件同 2.3.1 项,结果见表 1。

2.3.4 提取次数 取苦参和甘草饮片各 25 g,共 3 份,加 10 倍量 60% 乙醇提取 2 h,液料比 8:1,提取次数分别为 1, 2, 3 次,其他提取条件同 2.3.1 项,结果见表 1。

2.4 正交试验优选 在单因素试验基础上,选取乙醇体积分数、提取时间、液料比和提取次数为考察因素,每个因素设计 3 个水平,以苦参-甘草药对中苦参碱 + 氧化苦参碱、甘草酸转移率的综合评分为

指标。取苦参和甘草饮片各 25 g, 共 9 份, 首次提取前浸泡 1 h。试验安排及结果见表 2, 方差分析见表 3。由直观分析可知, 各因素对苦参-甘草药对提取效果的影响顺序为 $D > B > A > C$ 。以极差最小的因素 C 为误差项进行方差分析, 结果表明因素 D 具有显著性影响, 其他因素则无显著性影响。故最佳提取工艺 $A_2B_3C_1D_3$, 即加 8 倍量 60% 乙醇回流提取 3 次, 每次 3 h, 首次提取前浸泡 1 h。结果生产成本考虑, 可将提取时间和提取次数分别修改为 2 h 和 2 次。

表 2 苦参-甘草药对提取工艺的正交试验分析
Table 2 Orthogonal test analysis for extraction process of *Sophorae Flavescentis Radix-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*

No.	A 乙醇体 积分数 /%	B 提取 时间 /h	C 液料比 /mL·g ⁻¹	D 提取数 /次	(苦参碱 + 氧化苦参 碱) 转移 率/%	甘草酸 转移率 /%	综合 评分
1	30	1	8:1	1	56.66	62.87	1.20
2	30	2	10:1	2	89.09	86.24	1.75
3	30	3	12:1	3	87.72	97.71	1.85
4	60	1	10:1	3	98.35	85.04	1.83
5	60	2	12:1	1	74.30	63.33	1.38
6	60	3	8:1	2	94.76	98.77	1.94
7	75	1	12:1	2	79.65	76.01	1.56
8	75	2	8:1	3	96.86	93.33	1.90
9	75	3	10:1	1	73.27	69.28	1.43

注: 综合评分 = (苦参碱 + 氧化苦参碱) 转移率 + 甘草酸转移率。

表 3 综合评分方差分析
Table 3 Variance analysis for composite score

方差来源	SS	F	P
A	0.022	1.83	>0.05
B	0.070	5.83	>0.05
C(误差)	0.012	1.00	
D	0.457	38.08	<0.05

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19$ 。

2.5 验证试验 取苦参和甘草饮片各 25 g, 共 3 份, 按最佳提取工艺 ($A_2B_3C_1D_3$) 和修改后工艺 ($A_2B_2C_1D_2$) 进行验证试验。药对提取后过滤, 浓缩后真空冷冻干燥, 得提取物。精密称取提取物 7.0 mg, 按 2.2.1 项下方法处理, 测得苦参碱、氧化苦参碱及甘草酸质量分数分别为 6.09, 62.12, 28.19 mg·g⁻¹。结果表明提取时间和提取次数调整后对甘草酸转移率无显著性影响, 但苦参碱和氧化苦参碱总转移率降低至 93.92%。综合考虑提取效率与生产成本, 确定苦参-甘草药对最佳提取工艺组

合为 $A_2B_2C_1D_2$, 即加 8 倍量 60% 乙醇提取 2 次, 每次 2 h, 首次提取前浸泡 1 h。

2.6 苦参-甘草药对提取物的化学成分分析

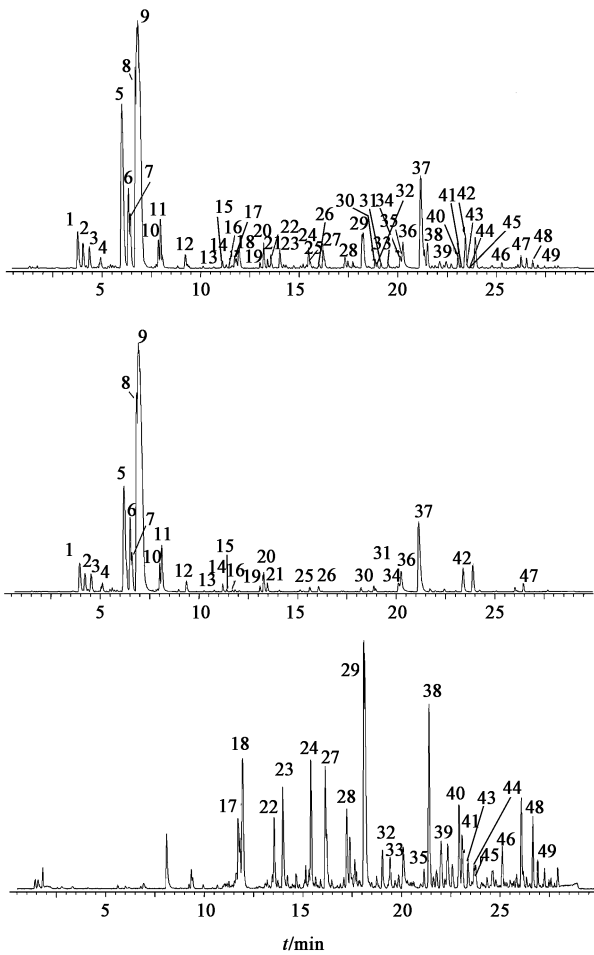
2.6.1 样品溶液的制备 精密称取苦参-甘草药对提取物 20.0 mg, 置于 2 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 13 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液过 0.2 μm 微孔滤膜过滤, 待分析。根据单味药在相同提取条件下得率 (苦参、甘草提取物得率分别为 29.22%, 30.01%), 精密称取相同生药量的苦参提取物 (9.15 mg) 和甘草提取物 (9.40 mg), 置于 2 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 13 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液过 0.2 μm 微孔滤膜, 制得样品溶液。

2.6.2 色谱条件 采用 HSS T3 色谱柱 (2.1 mm × 150 mm, 1.7 μm), 流动相 0.1% 甲酸水溶液 (A) 和 0.1% 甲酸乙腈溶液 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 3 min, 1% ~ 5% B; 3 ~ 5 min, 5% ~ 10% B; 5 ~ 8 min, 10% ~ 18% B; 8 ~ 15 min, 18% ~ 40% B; 15 ~ 23 min, 40% ~ 60% B; 23 ~ 28 min, 60% ~ 100% B), 流速 0.3 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 样品室温度 20 °C, 进样量 5 μL。

2.6.3 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI) 在正离子模式采集数据, 正离子毛细管电压 3.0 kV, 离子源温度 120 °C, 正离子锥孔电压 45 V, 二级锥孔电压 3 V, 脱溶剂气温度 450 °C, 流速 800 L·h⁻¹, 锥孔气流 40 L·h⁻¹, 扫描时间间隔 0.02 s, 扫描时间 0.1 s, 质量扫描范围 m/z 50 ~ 1 200, 数据采集形式 centroid, 灵敏性 resolution, 动态范围 extended。数据采集过程中采用 2 ng·L⁻¹ 亮氨酸-脑啡肽溶液进行实时精确质量校正 (正离子模式 m/z 556.277 1), 频率 20 s。

2.6.4 样品分析 应用 UPLC-Q-TOF/MS 分析苦参-甘草提取物、苦参和甘草单味药的提取物。正离子模式下各提取物基峰见图 2。

2.6.5 化学成分的鉴定 通过对苦参-甘草提取物的基峰中离子峰进行精确质量数测定, 应用 MassLynx V4.1 软件推测化合物可能的元素组成, 结合植物来源和质谱碎片, 并与文献报道和相关数据库 (ChemSpider 和 MassBank) 比较, 对其中 49 个色谱峰进行了鉴定。一级质谱以 $[M + H]^+$ 加合离子出现, 主要包括生物碱类、黄酮及其苷类、三萜皂苷类化合物, 见表 4。一级质谱所得精确分子质量和计算所得理论值比较误差均在 ±5 ppm 以内。通过对苦参-甘草药对提取物中化合物来源进行归属, 发现其中 28 个化合物来自于苦参, 21 个化合物来自于甘草。



A. 苦参-甘草提取物; B. 苦参提取物; C. 甘草提取物

图 2 苦参-甘草药对及其单味药提取物正离子模式下的 UPLC-Q-TOF/MS 基峰

Fig. 2 Base peak ion chromatograms of *Sophorae Flavescentis Radix-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* and its single herb extracts in positive mode of UPLC-Q-TOF/MS

表 4 UPLC-Q-TOF/MS 鉴定苦参-甘草药对中的化学成分

Table 4 Chemical constituents of *Sophorae Flavescentis Radix-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* extract identified by UPLC-Q-TOF/MS

No.	t_R /min	化合物	分子式	$[M+H]^+ m/z$	误差/ppm	MS^E	植物来源
1	3.45	N-甲基金雀花碱	$C_{12}H_{16}N_2O$	205.134 4	1.5	146.063 8	苦参
2	3.71	金雀花碱	$C_{11}H_{14}N_2O$	191.118 5	0.5	148.076 4	苦参
3	4.05	脲嘧啶碱	$C_{15}H_{20}N_2O_2$	261.160 9	2.3	243.470 5, 170.152 9	苦参
4	4.56	6,7-二羟基羽扇豆碱	$C_{15}H_{20}N_2O$	281.186 9	1.4	-	苦参
5	5.75	苦参碱	$C_{15}H_{24}N_2O$	249.196 7	0.0	247.184 0, 150.125 0	苦参
6	6.05	槐定碱	$C_{15}H_{24}N_2O$	249.197 5	3.2	247.181 7, 150.127 5	苦参
7	6.15	槐果碱	$C_{15}H_{22}N_2O$	247.181 9	3.6	179.153 8	苦参
8	6.40	9 α -羟基氧化槐果碱	$C_{15}H_{22}N_2O_2$	263.177 0	3.8	245.165 7	苦参
9	6.48	氧化苦参碱	$C_{15}H_{24}N_2O_2$	265.192 4	3.0	205.135 5	苦参
10	7.59	9 α -羟基氧化苦参碱	$C_{15}H_{24}N_2O_2$	265.191 7	0.4	-	苦参
11	7.70	5 α -羟基氧化苦参碱	$C_{15}H_{24}N_2O_2$	265.192 1	1.9	-	苦参
12	8.97	氧化槐醇	$C_{15}H_{24}N_2O_3$	281.187 3	2.8	127.041 0	苦参

3 讨论

苦参甘草汤最早记载于孙思邈的《千金药方》，由苦参、甘草和熏黄按 1:1:1 配伍而成的经典复方，主治痢疾不止。苦参-甘草是临床上治疗肝病和免疫系统疾病的常用药对^[12-13]。关于苦参和甘草单味药的主要活性成分提取纯化工艺已有大量研究报道，甘草提取常使用碱水或乙醇回流法，以增大甘草酸转移率^[14-15]，而苦参提取过程中可加入稀酸溶液来提高其生物碱的提取效率^[16]，显然这与苦参、甘草中主要化学成分具有酸碱性有关。但酸碱提取只改善了生物碱类和甘草酸类化合物的溶出，并未改变其他活性成分的提取效率，不能保障中药多成分多靶点综合作用的优势。有学者报道甘草中皂苷类成分可通过其表面活性剂的性质对中药活性成分起到增溶作用^[17]。药对配伍混合煎煮过程中常伴随复杂的物理和化学反应，通过这些化学物质间的相互作用，使得药对溶出的功效物质发生了量变与质变，从而影响药对整体功效的变化^[18]。

苦参中主要含有生物碱类和苦参酮类化合物，而甘草主要含有三萜皂苷类和黄酮类成分。目前，有关苦参和甘草提取工艺多选择 60% 乙醇为提取溶剂^[19-22]，以期最大程度地保留苦参-甘草药对中多种有效物质。因此，本文以苦参碱、氧化苦参碱和甘草酸的转移率为指标，采用单因素试验和正交试验优选提取工艺。同时，本文采用 UPLC-Q-TOF/MS 对苦参-甘草药对提取物中化学成分进行了快速鉴定，共鉴定 49 个成分，主要包括生物碱类、黄酮类和三萜皂苷类等化合物，表明优选的提取工艺保留了

续表 4

No.	t_R /min	化合物	分子式	$[M+H]^+ m/z$	误差/ppm	MS ^E	植物来源
13	10.40	槐属双苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	579.171 0	-0.7	285.076 7	苦参
14	10.85	澳白檀苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	579.172 1	1.2	285.076 4	苦参
15	11.06	kakkanin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	579.170 9	-0.9	285.076 7	苦参
16	11.35	三叶豆紫檀苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	447.131 0	4.2	-	苦参
17	11.48	甘草素	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	257.082 5	4.3	137.024 7	甘草
18	11.72	异甘草素	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	257.082 6	4.7	137.024 2	甘草
19	12.78	-	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₄	577.155 9	0.3	445.113 6	苦参
20	12.97	苦参醇 O	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₃	563.178 0	2.7	269.081 8	苦参
21	13.17	苦参黄酮 A	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₃	563.177 4	1.6	269.081 5	苦参
22	13.35	甘草苷	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	419.133 5	-1.7	257.082 1	甘草
23	13.79	formomentin	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	269.081 5	0.4	257.082 3	甘草
24	15.24	甘草皂苷 A ₃	C ₄₈ H ₇₂ O ₂₁	985.461 3	-3.1	809.431 5, 615.387 8, 453.338 1	甘草
25	15.35	毛蕊异黄酮	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	285.076 5	0.7	-	苦参
26	15.80	三叶豆紫檀苷-6'-O-丙二酸酯	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₃	555.111 2	-0.5	-	苦参
27	15.99	22β-乙酰氧甘草酸	C ₄₄ H ₆₄ O ₁₈	881.417 1	-4.5	705.385 3, 529.356 5	甘草
28	17.11	甘草皂苷 G ₂	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	839.406 5	-0.1	663.375 9, 487.343 1, 469.332 6, 451.320 0	甘草
29	18.00	甘草酸	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	823.411 2	-0.5	647.383 9, 471.350 6, 453.340 5	甘草
30	18.67	刺芒柄花素	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	269.081 2	-0.7	249.187 7	苦参
31	18.76	异黄酮醇	C ₂₁ H ₂₂ O ₅	355.154 2	-0.8	299.092 3	苦参
32	18.96	葡萄糖苷酸基甘草次酸	C ₃₆ H ₅₄ O ₁₀	647.378 8	-1.1	453.336 5, 471.346 7	甘草
33	19.36	甘草瑞酮	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	369.133 8	1.6	-	甘草
34	19.94	苦参醇 N	C ₂₆ H ₃₀ O ₇	455.207 9	2.0	303.160 9	苦参
35	20.03	1-甲氧基菜豆异类黄酮	C ₂₁ H ₂₀ O ₅	353.139 7	2.3	-	甘草
36	20.08	苦参醇 I	C ₂₆ H ₃₀ O ₇	455.207 4	0.9	303.160 9	苦参
37	21.00	苦参酮	C ₂₆ H ₃₀ O ₆	439.213 4	3.7	303.161 2	苦参
38	21.36	甘草香豆素	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	369.134 7	2.4	193.050 5	甘草
39	22.00	glyurallin A	C ₂₁ H ₂₀ O ₅	353.103 1		299.090 2	甘草
40	22.91	格里西轮	C ₂₂ H ₂₂ O ₆	383.150 0	1.3	327.086 6, 299.059 3	甘草
41	23.07	甘草查尔酮 A	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	339.160 1	1.5	299.091 4	甘草
42	23.29	甲基苦参新醇 C	C ₂₇ H ₃₂ O ₆	453.227 3	-0.9	439.176 0, 329.102 9	苦参
43	23.40	异甘草黄酮醇	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	355.118 4	0.6	-	甘草
44	23.70	甘草酚	C ₂₁ H ₁₈ O ₆	367.118 6	1.1	283.066 5	甘草
45	23.79	异甘草酚	C ₂₁ H ₁₈ O ₆	367.119 0	1.2	283.066 4	甘草
46	25.16	甘草利酮	C ₂₂ H ₂₂ O ₆	383.150 0	1.3	353.105 5, 313.071 9	甘草
47	26.42	异苦参酮	C ₂₆ H ₃₀ O ₆	439.213 5	3.2	303.158 9	苦参
48	26.74	甘草异黄烷 C	C ₂₆ H ₃₀ O ₅	423.215 3	-5.0	367.118 0	甘草
49	26.99	1-甲氧基榕叶酚	C ₂₆ H ₃₀ O ₅	423.216 8	-0.7	367.154 0, 221.118 4, 191.107 5	甘草

苦参-甘草药对中多种有效物质。目前生物碱与三萜皂苷类化合物的药效研究较多,但对于苦参-甘草

药对中黄酮类化合物的研究较少。通过与单味药比较,发现所鉴定的成分中 28 个来自于苦参,21 个

来自于甘草,但配伍前后各成分的比例变化及协同作用尚有待进一步研究证实。

[参考文献]

- [1] 景宇,陶冶. 苦参碱抗纤维化机制研究进展[J]. 四川医学,2006,27(12):1233-1235.
- [2] LIU L, LU W, MA Z, et al. Oxymatrine attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice via the inhibition of inducible nitric oxide synthase expression and the TGF- β /Smad signaling pathway[J]. Int J Mol Med,2012,29(5):815-822.
- [3] Asl M, Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and its bioactive compounds [J]. Phytother Res,2008,22(6):709-724.
- [4] 王绪平,黄孝闻,王娜妮,等. 苦参配伍甘草的水煎液对小鼠急性毒性的影响研究[J]. 中华中医药学刊,2015,33(7):1653-1655.
- [5] GAO Y, YAO L, ZHAO Y, et al. The Chinese herbal medicine formula mKG suppresses pulmonary fibrosis of mice induced by bleomycin[J]. Int J Mol Sci,2016,17(2):238.
- [6] 谭桂莲,秦邦才. 中药苦参提取方法的比较和工艺条件优化[J]. 时珍国医国药,2006,17(1):74-75.
- [7] 吴伟康,奉建芳,黄小蕊,等. 甘草提取工艺的初步研究[J]. 中草药,2001,32(3):210-212.
- [8] 张奎远,余世春,谢冬梅. 苦参提取工艺的优化选择[J]. 基层中药杂志,2002,16(1):13-14.
- [9] 鲁传华,谢冬梅,邹爱峰,等. 正向胶束法提取苦参总碱及比较分析研究[J]. 中华中医药学刊,2003,21(9):1444-1445.
- [10] 李晓梅. 非离子表面活性剂在苦参碱提取中的应用[J]. 山西化工,2004,24(3):30-31.
- [11] 刘玉红,崔红梅,陈燕,等. 正交试验法研究甘草的提取工艺[J]. 中草药,2004,26(3):239-241.
- [12] WAN X Y, LUO M, LI X D, et al. Hepatoprotective and anti-hepatocarcinogenic effects of glycyrrhizin and matrine[J]. Chem Biol Interact,2009,181:15-19.
- [13] 黄亮,漆林艳,陈志良,等. 复方抗肝纤维化处方的优化[J]. 南方医科大学学报,2012,32(1):106-108.
- [14] 章玉华,白凤梅,葛毅强,等. 甘草酸的提取、精制及影响因素分析[J]. 食品工业科技,2003(12):66-68.
- [15] 黄惠莲,周燕双,宋丽莉. 不同提取工艺下甘草提取物中甘草酸铵含量测定研究[J]. 中国当代医药,2011,18(33):47-50.
- [16] 全燕,王锦玉,张锴镔,等. 苦参总生物碱提取纯化工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(1):19-22.
- [17] Sasaki Y, Mizutani K, Kasai R, et al. Solubilizing properties of glycyrrhizin and its derivatives: solubilization of saikosaponin a, the saponin of Bupleuri Radix[J]. Chem Pharm Bull,1988,36(9):3491-3495.
- [18] 唐于平,段金廛,郭盛,等. 药对量效关系研究的认识与思考[J]. 南京中医药大学学报,2009,25(1):21-26.
- [19] 于鹏飞,王建平,蒋海强,等. 甘草中黄酮类抗氧化成分的提取工艺研究[J]. 食品与药品,2008,10(9):25-27.
- [20] 黄明进,王文全,沈寿茂. 甘草总黄酮和总皂苷成分的提取工艺及其含量分析[J]. 中国现代中药,2010,12(4):24-27.
- [21] 彭程,胡晋红,朱全刚,等. 正交试验优选苦参方中苦参有效成分的提取工艺[J]. 药学服务与研究,2007,7(2):124-127.
- [22] 邹妹妹,王贵学. 中药苦参中苦参碱类成分超声波提取工艺[J]. 重庆大学学报:自然科学版,2007,30(7):130-133.

[责任编辑 刘德文]