

3种方法制备的四逆汤中甘草苷、甘草酸含量测定

王晓莉, 巩丽丽, 容蓉*, 杨勇, 吕青涛, 王海燕
(山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] 目的:对四逆汤传统法、药典收录的水提醇沉法、各单味药分提合并法制备的四逆汤中甘草苷、甘草酸含量进行比较。方法:采用HPLC测定3种不同的方法提取液中甘草苷、甘草酸的含量, C_{18} 色谱柱, 流动相乙腈-0.05% 磷酸水, 梯度洗脱, 柱温 25 °C, 检测波长 237 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样量 10 μ L。结果:甘草苷在传统汤剂中含量为 2.57 mg·g⁻¹, 经方合剂中的含量为 2.21 mg·g⁻¹, 单味配方合并液中含量为 3.58 mg·g⁻¹; 甘草酸在传统汤剂中含量为 1.96 mg·g⁻¹, 经方合剂中的含量为 1.84 mg·g⁻¹, 单味配方合并液中含量为 3.04 mg·g⁻¹。结论:四逆汤单提合并法中甘草苷、甘草酸含量高, 且各制法的四逆汤中甘草苷、甘草酸含量均有显著性差异, 为四逆汤提取方法研究提供依据。

[关键词] 四逆汤; 甘草苷; 甘草酸; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0071-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20120113.1032.007 **[网络出版时间]** 2012-01-13 10:32

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120113.1032.007.html>

[收稿日期] 20110921(015)

[基金项目] 山东省高等学校科技计划项目(Z09LF31)

[第一作者] 王晓莉, 在读硕士, 从事中药复方活性成分与质量控制研究, Tel: 0531-89628593, E-mail: wangxiali0401@163.com

[通讯作者] * 容蓉, 教授, 从事中药复方活性成分与质量控制研究, Tel: 0531-89628593, E-mail: r. rong@sdutem.edu.cn

品平均含量为 2.83%, RSD 0.63%。

3 讨论

Norswertianolin 是尖叶假龙胆的活性成分之一, 对其进行含量测定的过程中我们考察了不同流动相体系对 norswertianolin 的分离情况, 结果发现只有在 0.1% 磷酸水溶液(A)-乙腈(B)(80:20)的条件下, 主峰与杂质峰可以达到基线分离($R > 1.5$), 符合测定要求。

由于文献报道 norswertianolin 具有比较显著的药理活性^[5], 我们在上述色谱条件下测得 6 份尖叶假龙胆中 norswertianolin 的平均质量分数为 2.83%, 说明尖叶假龙胆中 norswertianolin 的含量较高, 所以我们选择 norswertianolin 为研究对象, 对其进行含量测定。本文首次建立了反相高效液相色谱法测定尖叶假龙胆中 norswertianolin 的含量, 该方法简便、准确、重复性好, 对尖叶假龙胆中 norswertianolin 的含量控制提供了可靠依据, 同时为

尖叶假龙胆在民间的传统应用提供了依据。

[参考文献]

- [1] 李旻辉, 孙亚红, 宋晓玲. 中国假龙胆属植物传统药物学的调查研究[J]. 包头医学院学报, 2010, 26(3):3.
- [2] Lv L J, Li, M H, Terpenoids, flavonoids and xanthenes from *Gentianella acuta* (Gentianaceae) [J]. Biochem Syst Ecol, 2009, 37: 497.
- [3] 李旻辉, 靳敏, 张海涛, 等. 尖叶假龙胆化学成分研究[J]. 包头医学院报, 2011, 27(2):13.
- [4] Li M H, Zhou L S, Fang H Y, et al. Quantification of Xanthenes in a Mongolian health tea using high-performance liquid chromatography [J]. J Med Plants Research, 2010, 4(17):1704.
- [5] Li M H, Li L, Yang Y M, et al. Genus gentianella moench: A phytochemical and ethnopharmacological review[J]. Chinese Herbal Med, 2010, 2(4):262.

[责任编辑 蔡仲德]

Analysis of Licorice Glucoside and Glycyrrhizic Acid Content in Sini Decoction Processed by Three Different Extraction Methods

WANG Xiao-li, GONG Li-li, RONG Rong*, YANG Yong, LV Qing-tao, WANG Hai-yan
(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the contents of licorice glucoside and glycyrrhizic acid in Sini Decoction processed by traditional extraction method, water extraction and alcohol precipitation method included in Pharmacopoeia and the single herb separately extracted then combined method. **Method:** To determine the the contents of licorice glucoside and glycyrrhizic acid was determined by three extraction method. Separation was carried out on C_{18} column. A linear solvent gradient elution is used and solvent A was acetonitrile, and solvent B is water containing 0.05% phosphoric acid. The flow rate was $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ and the detector was set at 237 nm. **Result:** The content of licorice glucoside was $2.57 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ in the traditional decoction, $2.21 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ in the mixture and $3.58 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ in the single herb formula combined solution in a prescription. The content of glycyrrhizic acid was $1.96 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ in the traditional decoction, $1.84 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ in the mixture and $3.04 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ in the single herb formula combined solution in a prescription. **Conclusion:** The contents of licorice glucoside and glycyrrhizic acid in the single herb formula combined solution in a prescription is higher than the others. The contents of licorice glucoside and glycyrrhizic acid is significantly different in the preparation processed by different extraction methods which can provide references for Sini decoction extraction technology.

[Key words] Sini decoction; licorice glucoside; glycyrrhizic acid; HPLC

四逆汤是张仲景《伤寒论》中治疗少阴虚寒症的主方。四逆汤由炮附子、干姜、炙甘草(3:2:3)组成,是中医回阳救逆的经典名方,具有强心、抗休克作用。现代临床观察和药理研究表明,四逆汤能保护心肌、改善心功能、防止缺血-再灌注的损伤,特别是对冠心病、心绞痛患者的对症治疗很有效果^[1]。文献报道附子生物碱是四逆汤有效成分组合中的关键因素,但干姜挥发油和甘草酸粗品也是组方中不可或缺的因素^[2]。因此,为考察不同提取方法制备的四逆汤中有效成分的提取率,本文以炙甘草中黄酮类成分甘草苷、甘草酸为指标成分之一,测定其含量;对传统水提法、药典收录的水提醇沉法及针对各单味药有效成分分别提取后合并制备的四逆汤中甘草苷、甘草酸的含量进行了测定。

1 仪器和试剂

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(包括脱气机、四元泵、自动进样器、恒温箱、DAD 检测器), Chem Station 色谱工作站, KQ-250E 型医用超声波清洗器(群山市超声仪器有限公司), 国华恒温振荡器, AF240 型电子天平(瑞士梅特勒公司), RE-52C 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

药材购于山东济南建联药店,均经山东中医药

大学李峰教授鉴定为道地药材。黑附子(毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的子根的炮制加工品)、干姜(姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rose. 的干燥根茎)(产地四川), 炙甘草(豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的炮制加工品,产地内蒙古), 甘草苷对照品和甘草酸铵对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号分别为 A0040 和 A0039,含量均 > 98%), 实验用水为蒸馏水, 色谱用水为娃哈哈纯净水, 乙腈、甲醇、磷酸为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验 Aglient Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温 25 °C, 检测波长 237 nm, 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量 10 μL, 流动相 A-乙腈, B-0.05% 磷酸水, 梯度洗脱, 梯度程序见表 1^[3]。理论塔板数按甘草苷峰计算不低于 5 000, 各待测组分峰与相邻成分峰的分离度均符合规定。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取甘草苷和甘草酸铵对照品适量, 分别加 70% 乙醇制成每 1 mL 中含甘草苷 1.05 mg 和甘草酸铵 1.18 mg 甘草酸铵

表1 梯度洗脱条件

t/min	A/%	B/%
0	19	81
8	19	81
35	50	50
36	100	0

的对照品储备液。分别精密吸取上述储备液适量于量瓶中,用70%乙醇稀释至所需质量浓度(甘草苷 $0.0525\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,甘草酸铵 $0.059\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),即得2种组分的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备

2.2.2.1 传统汤剂样品 取药材粗粉(过20目筛)黑附子12g,炙甘草12g,干姜8g,加8倍量水浸泡1h,煎煮30min,过滤,残渣加6倍量水煎煮20min,过滤,滤液合并,浓缩至60mL,冷藏备用。

2.2.2.2 药典复方提取液 取药材粗粉(过20目筛)黑附子12g,炙甘草12g,加8倍量水加热回流提取2h,过滤,残渣加6倍量水加热回流提取1h,过滤,滤液合并。取药材粗粉(过20目筛)干姜粉末8g,置于250mL烧瓶中,加12倍量水,水蒸气蒸馏提取5h,挥发油和蒸馏后水溶液备用,残渣加6倍量水煎煮1h,过滤,煎液合并再与附子、炙甘草提取液合并,浓缩至60mL,加无水乙醇180mL,静置10h后离心,得上清液,将其旋蒸浓缩至60mL,冷藏备用。

2.2.2.3 各单味药分提合 黑附子中生物碱的提取:药材粗粉(过20目筛)12g,精密称定,24倍量pH1.0酸水提取2次,振荡浸提,每次 $1.5\text{ h}^{[4]}$,过滤,合并滤液并浓缩至约30mL。

炙甘草中黄酮类的提取:药材粗粉(过20目筛)12g,精密称定,20倍量0.3%氨水-60%乙醇加热回流提取4次,每次 $2\text{ h}^{[5]}$,过滤,合并滤液并浓缩至约30mL。

干姜中挥发油的提取:药材粗粉(过20目筛)8g,精密称定,14倍量水,浸泡3h后水蒸气蒸馏提取5h,挥发油和蒸馏后水溶液备用,残渣加6倍量水煎煮1h,煎液与上次蒸馏后水溶液合并^[6],浓缩至约20mL。

将各单味药提取液转移合并为80mL,冷藏备用。

2.2.2.4 HPLC 供试品溶液的制备 取传统提取液2mL,药典提取液2mL,各单味药分提合并液2.67mL(折合炙甘草药材量0.4g)分别置于25mL

量瓶中,加70%乙醇定容至刻度,混匀静置过夜。过滤,取续滤液,经 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,即得复方供试品溶液1~3。

2.3 线性关系考察 分别取2.2.1项下甘草苷、甘草酸铵混合对照品溶液1,2,4,6,8,10 μL ,甘草苷、甘草酸铵对照品溶液1,2,5,10,15,20 μL ,按2.1项下色谱条件测定,记录峰面积。以对照品量 X 对色谱峰面积 Y 进行线性回归,结果甘草苷和甘草酸铵的线性回归方程分别为 $Y = 2\ 637\ 084.94X + 8.81$, ($r = 0.999\ 6$); $Y = 686\ 194.11X - 2.26$ ($r = 1.000\ 0$)。线性范围分别为 $0.052\ 5 \sim 0.525\ \mu\text{g}$ 和 $0.059 \sim 1.180\ \mu\text{g}$ 。

2.4 精密度试验 取2.2.1项下甘草苷和甘草酸铵对照品溶液10 μL ,按2.1项下色谱条件测定,连续进样5次,测得甘草苷和甘草酸铵峰面积的RSD分别为0.2%,0.1%,表明精密度良好。

2.5 重复性试验 取同一批号的药材6份(黑附子3g,炙甘草3g,干姜2g)精密称取,按2.2.2.1项下方法制备传统复方提取液,按2.1项下色谱条件测定,按外标法分别计算甘草苷和甘草酸铵的含量,测得含量分别为 $2.543, 1.902\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,RSD分别为0.3%,0.5% ($n = 5$)。

2.6 稳定性试验 取同一批号的药材6份(黑附子3g,炙甘草3g,干姜2g)精密称取,按2.2.2.1项下方法制备传统复方提取液,于室温下在同一天不同时间点(0,2,4,8,12h)分别进样10 μL ,并于12h进样后置 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,于24h后取出进样10 μL ,结果甘草苷和甘草酸铵峰面积的RSD分别为0.8%,0.9%,表明供试品溶液在24h内稳定。

2.7 加样回收率试验 取已知含量的同一批药材6份,每份黑附子0.2g,炙甘草0.2g,干姜0.13g(含甘草苷、甘草酸质量分数分别为 $2.545, 1.860\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$),分别加入甘草苷对照品溶液1mL($0.525\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),甘草酸铵对照品溶液700 μL (取 $1.18\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 母液稀释2倍, $0.590\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),按2.2.2.1项下方法制备传统复方提取液,同一色谱条件进样10 μL ,按外标法测定其含量,计算平均加样回收率和RSD。结果见表2。

2.8 含量测定 取四逆汤各药材粗粉适量,按2.2.2项下方法制备复方供试品溶液1~3,按2.1项下色谱条件测定。按外标法分别计算供试品溶液中甘草苷和甘草酸铵的含量($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)。结果见图1和表3。

表 2 甘草苷、甘草酸铵加样回收试验 (n=6)

测定成分	样品中 含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	均值 /%	RSD /%
甘草苷	0.509	0.525	1.015	96.38	99.52	2.16
	0.510	0.525	1.030	99.05		
	0.504	0.525	1.020	98.29		
	0.513	0.525	1.049	102.10		
	0.505	0.525	1.028	99.62		
	0.520	0.525	1.054	101.71		
甘草酸铵	0.372	0.413	0.780	102.66	101.74	1.69
	0.380	0.413	0.794	104.36		
	0.375	0.413	0.815	100.97		
	0.383	0.413	0.807	101.94		
	0.370	0.413	0.811	99.27		
	0.377	0.413	0.809	101.21		

表 3 3 种制备方法中甘草苷、甘草酸含量测定 (n=3)

方法	mg·g ⁻¹	
	甘草苷	甘草酸 (m _{甘草酸铵} /1.0207)
传统法	2.573	1.956
药典法	2.206	1.839
各单味药分提合并法	3.580	3.036

3 讨论

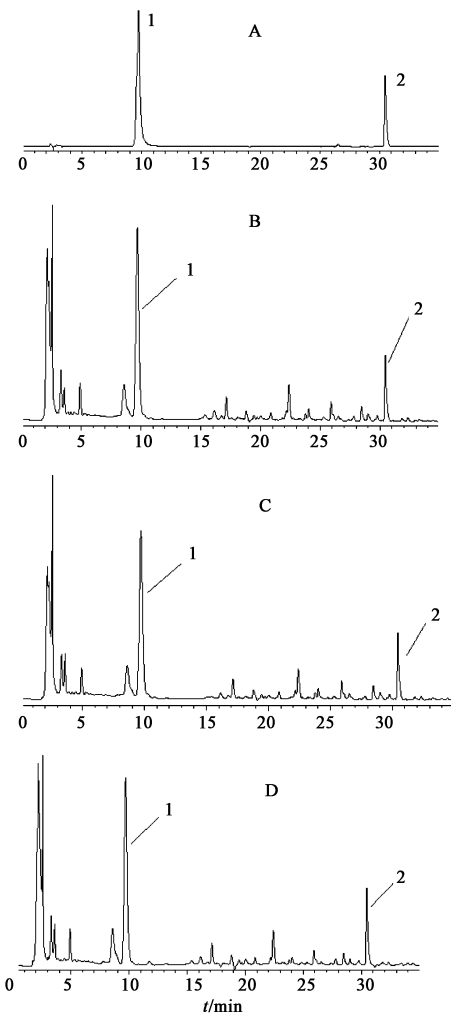
本实验针对传统复方提取法及药典提取法进行分析。传统法多为群药合煎,存在有效成分提取率不高,毒性成分减毒机制不明,挥发性成分散失等不足;药典收录的四逆汤合剂的制备方法为水提醇沉(挥发油单提后合并),会造成成分损失。经检索相关文献,根据各单味药所含成分的化学性质,对黑附子中生物碱采用酸提取,炙甘草皂苷类成分采用氨醇提取,干姜挥发油单独提取后、保留水提液,将各单药提取液合并,制备复方提取液,甘草苷、甘草酸含量较前两种提取方法均有显著提高。该实验研究为四逆汤的提取方法优化奠定基础。

实验同时发现,与炙甘草药材中甘草苷、甘草酸含量相比,在复方提取液中两种成分含量均降低,可能是甘草中甘草苷、甘草酸与附子中生物碱发生沉淀反应,这为四逆汤中附子配伍甘草减毒机制提供了依据,也验证了中药临床配伍的合理性。

[参考文献]

- [1] 窦有业,杜蓉. 四逆汤的临床应用与实验研究进展[J]. 医药导报, 2008, 27(1): 74.
- [2] 孙慧兰,吴伟康. 四逆汤有效成分不同组合抗心肌缺血再灌注损伤的作用研究[J]. 中草药, 2002, 33(4): 333.
- [3] 中国药典. 一部[S]. 2010: 80.
- [4] 李书华,陈封政,黄晓辉,等. 附子中生物碱正交提取工艺和吸附树脂的筛选研究[J]. 中成药, 2010, 32(8): 1419.
- [5] 赵炜镭,师清芝,唐星,等. 甘草中甘草酸和甘草苷的提取纯化工艺研究[J]. 中国药房, 2009, 20(6): 426.
- [6] 孔维军,赵艳玲,山丽梅,等. 正交法优选干姜挥发油提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(3): 19.

[责任编辑 蔡仲德]



1. 甘草苷; 2. 甘草酸铵

图 1 甘草苷、甘草酸铵混合对照品(A)、复方供试品溶液 1(B)
复方供试品溶液 2(C)、复方供试品溶液 3(D) HPLC