

不同制法四逆汤中甘草苷含量比较

杨玉琴¹, 梁光义^{1,2*}, 秦利芬¹, 刘金环¹, 贺祝英³, 曹佩雪²

(1. 贵阳中医学院, 贵阳 550002; 2. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵阳 550002; 3. 中医学院第一附属医院, 贵阳 550002)

[摘要] 目的:对四逆汤传统汤剂、经方颗粒剂及单味配方颗粒剂中甘草苷的含量进行比较。方法:采用高效液相色谱法, Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.5% 冰乙酸(20:80), 流速 0.7 mL·min⁻¹, 检测波长 276 nm, 柱温 25 °C, 测定 3 种剂型中甘草苷的含量。结果:甘草苷(每处方)在传统汤剂中含量为 31.13 mg, 经方颗粒剂中含量为 48.48 mg, 单味配方颗粒剂中含量为 31.95。结论:3 种剂型中指标性成分甘草苷的含量有显著性差异。可为四逆汤剂型的进一步研究提供科学依据。

[关键词] 四逆汤; 甘草苷; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)24-0040-04

Comparison of Liquiritin Content in Different Methods of Sini Decoction

YANG Yu-qin¹, LIANG Guang-yi^{1,2*}, QIN Li-fen¹, LIU Jin-huan¹, HE Zhu-ying³, CAO Pei-xue²

(1. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China;

2. The Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the content of liquiritin in Sini traditional decoction, the granules and the single-flavor granules. **Method:** To determine the content of liquiritin by HPLC method Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) was used, the mobile phase of acetonitrile-0.1% acetic acid-water(20:80). The flow rate was 0.7 mL·min⁻¹ and the detection wave length was at 276 nm. The temperature of column was 25 °C. **Result:** The content of liquiritin was 31.13 mg in traditional decoction, 48.48 mg in the granules and 31.95 mg in the single-flavor granules in a prescription. **Conclusion:** The content of liquiritin is significantly different formulations, which can provide the scientific basis for further research of Sini decoction type.

[Key words] Sini decoction; liquiritin; HPLC

中药复方是祖国中医药学的一个重要组成部分,但复方汤剂的应用受到一些因素的影响,如药材

的质量难以控制,煎煮过程缺乏规范性,使用不方便等。将其制成经方颗粒或单味配方颗粒可解决传统汤剂的不足,但三者临床疗效是否一致,有效成分含量是否存在差异,有待进一步研究。本实验选取张仲景的经典名方四逆汤以甘草主要成分甘草苷的含量为评价指标,比较 3 种不同剂型中的含量差异,为四逆汤剂型的改进提供数据支持。

1 材料

1.1 仪器 Aglient 1100 高效液相色谱仪(自动进样器,四元泵, DAD 检测器), HP1100/WIND3D 化学

[收稿日期] 20110518(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30860364); 黔中医药发〔2008〕42号

[第一作者] 杨玉琴, 教授, 硕士生导师, 从事中药质量控制与新药研发, Tel: 13595144269, E-mail: yyq55824@163.com

[通讯作者] * 梁光义, 教授, 博士生导师, 从事中药化学与新药开发研究

工作站。

1.2 试药 甘草苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号111610-200503);乙腈为色谱纯,冰乙酸为分析纯,水为纯净水,其他试剂均为分析纯。

1.3 药材 黑附片(批号20090101),炙甘草(批号20090401),干姜(批号20081101),购于贵阳中医学院第一附属医院,经贵阳中医学院第一附属医院药剂科主任贺祝英教授鉴定为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 的子根的加工品,姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的干燥根茎,豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎。

2 方法与结果

2.1 传统汤剂、经方颗粒及单味配方颗粒样品的制备

2.1.1 传统汤剂(合煎)制备 按处方比例称取各味药材粗粉,加水6 000 mL,煎至2 400 mL,过滤,合并2次滤液,浓缩,定容至1 000 mL备用(传统方法)。

2.1.2 经方颗粒制备 按传统汤剂制备方法制备得汤剂,进一步浓缩,常压80 ℃烘干,粉碎,得干浸膏粉备用(仅供实验用)。

2.1.3 单味配方颗粒制备 称取甘草药材粗粉100 g,先加8倍量水浸泡20 min,煎煮60 min过滤,滤渣加6倍量的水煎煮60 min,过滤,合并滤液,浓缩,常压80 ℃烘干,粉碎,得干浸膏粉备用(提取工艺由贵州宏宇药业提供)。

2.1.4 阴性样品的制备 按上述传统汤剂、制备方法,制备不含甘草的阴性样品。

2.2 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.5%冰乙酸(20:80),流速0.7 mL·min⁻¹,检测波长276 nm,柱温25 ℃^[2]。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取甘草苷对照品适量,加甲醇制成0.8 mg·L⁻¹的溶液,作为对照品溶液,备用。

2.4 供试品溶液的制备

2.4.1 传统汤剂供试品溶液 精密吸取2.1.1项下汤剂15 mL置具塞锥形瓶中,精密加入30 mL流动相,摇匀,过滤,续滤液用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即为传统汤剂供试品溶液,备用。

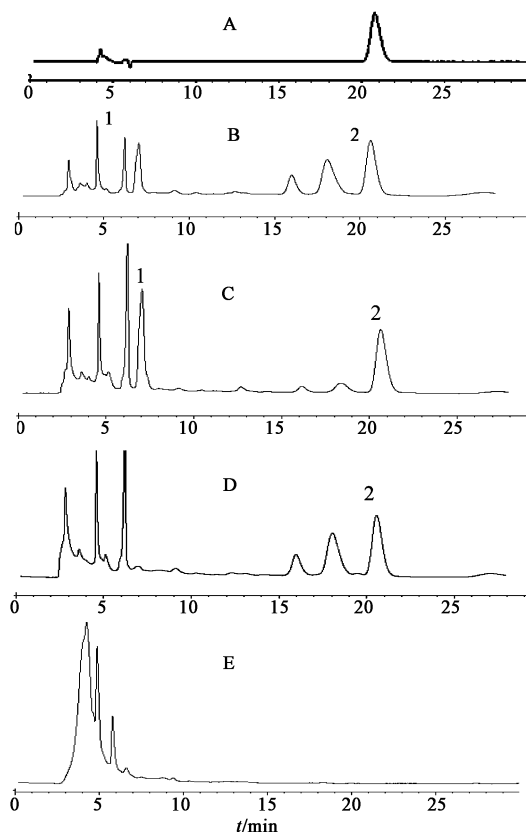
2.4.2 经方颗粒供试品溶液 精密称取2.1.2项下经方干浸膏粉约0.6 g,置具塞锥形瓶中,精密加

入45 mL流动相,称重,超声提取30 min,取出,放冷,补重,过滤,续滤液用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即为经方颗粒供试品溶液,备用。

2.4.3 单味配方颗粒供试品溶液 精密称取2.1.3项下干浸膏粉约0.4 g,置具塞锥形瓶中,精密加入50 mL流动相,称重,超声提取30 min,取出,放冷,补重,过滤,续滤液用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即为单味配方颗粒供试品溶液,备用。

2.4.4 阴性供试品溶液 按上述传统汤剂、经方颗粒及单味配方颗粒供试品溶液的制备方法,分别制备3种剂型的阴性供试品溶液,备用。

2.5 系统适用性试验 分别取甘草苷对照品溶液、传统汤剂供试品溶液、中药配方颗粒供试品溶液及阴性供试品溶液各10 μL,注入高效液相色谱仪,结果表明,甘草苷与样品中其他组分达到基线分离,分离度>1.5,理论塔板数以甘草苷计不低于4 000;阴性对照无干扰。结果见图1。



A. 对照品;B. 汤剂样品;C. 经方颗粒;

D. 单方颗粒;E. 缺甘草阴性样品;2. 甘草苷

图1 四逆汤不同制法甘草苷 HPLC

2.6 线性关系考察 分别精密吸取甘草苷对照品溶液2,4,6,8,10,12,14,16,18 μL,注入高效液相色谱

谱仪,记录峰面积。以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,计算得回归方程为 $Y = 2\,242.9X - 7.0164$ ($r = 0.9999$),甘草苷在 $0.16 \sim 1.44 \mu\text{g}$ 线性关系良好。

2.7 精密度试验 精密吸取甘草苷对照品溶液 $10 \mu\text{L}$,连续进样 6 次,在上述色谱条件测定面积,结果 RSD 0.31% ,表明精密度良好。

2.8 重复性试验 分别取 3 种剂型样品各 6 份,按上述供试品溶液的制备方法制备和色谱条件测定,计算甘草苷的含量,RSD 分别为 1.75% , 2.10% , 1.47% ,结果表明该方法具有良好的重复性。

2.9 稳定性试验 取传统汤剂、经方颗粒、单味配方颗粒供试品溶液,按上述色谱条件,分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 测定,RSD 分别为 1.81% , 1.74% , 1.48% ,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.10 加样回收率试验 分别精密称取已知含量传统汤剂、经方颗粒、单味配方颗粒样品各 9 份,加入适量甘草苷对照品溶液,按供试品溶液制备方法处理,按上述色谱条件测定。结果见表 1~3。

表 1 传统汤剂加样回收试验

取样量	样品含量	加入量	测得量	回收率	平均回收率	RSD
/mL	/mg	/mg	/mg	/%	/%	/%
5	1.59	1.28	2.89	101.56		
5	1.59	1.28	2.92	103.91		
5	1.59	1.28	2.88	100.78		
5	1.59	1.7	3.25	97.65		
5	1.59	1.7	3.29	100.00	100.22	2.46
5	1.59	1.7	3.25	97.65		
5	1.59	2.13	3.74	100.94		
5	1.59	2.13	3.78	102.82		
5	1.59	2.13	3.65	96.71		

表 2 经方颗粒加样回收试验

取样量	原有量	加入量	测得量	回收率	平均回收率	RSD
/g	/mg	/mg	/mg	/%	/%	/%
0.2086	1.84	1.28	3.15	102.03		
0.2093	1.85	1.28	3.09	96.89		
0.2064	1.82	1.28	3.06	96.86		
0.2093	1.85	1.70	3.46	94.76		
0.2096	1.85	1.70	3.49	95.92	96.82	2.08
0.2089	1.85	1.70	3.49	96.58		
0.2076	1.83	2.13	3.87	95.58		
0.2051	1.81	2.13	3.88	96.85		
0.2083	1.84	2.13	3.88	95.89		

2.11 样品含量测定 按供试品溶液制备方法分别处理样品,按上述色谱条件进行测定,结果传统汤

剂、经方颗粒、单味配方颗粒样品含量分别为 $31.13, 48.48, 31.95 \text{ mg/处方}$ 。

表 3 单味配方颗粒加样回收试验

取样量	样品含量	加入量	测得量	回收率	平均回收率	RSD
/g	/mg	/mg	/mg	/%	/%	/%
0.4048	1.74	1.28	2.98	96.88		
0.4033	1.74	1.28	2.98	96.88		
0.4091	1.76	1.28	3.03	99.22		
0.4075	1.75	1.70	3.39	96.47		
0.4018	1.73	1.70	3.44	100.59	98.15	1.66
0.4011	1.73	1.70	3.41	98.82		
0.4001	1.72	2.13	3.77	96.24		
0.4005	1.72	2.13	3.81	98.12		
0.4007	1.72	2.13	3.86	100.13		

3 讨论

四逆汤经方出自张仲景的《伤寒论》,上面有明确规定以水三升,煮取一升二合,去渣。分温再服^[3]。根据《伤寒论读本》中的古今换算(一升等于二百毫升)为每处方加水 600 mL 煮至 240 mL ^[4]。

采用 Spss 13.0 单因素方差分析对甘草苷的含量进行分析,结果显示分煎与合煎甘草苷的含量无显著性差异,此结果可为四逆汤的进一步研究提供参考。

经方颗粒中甘草苷的含量明显高于传统汤剂和单味配方颗粒,可能是经方颗粒在浓缩干燥过程中发生了变化而导致甘草苷的含量增加,这其中的变化现无法确定,有待于进一步的研究。

从色谱图对比可见,合煎(传统汤剂、经方颗粒剂)过程中有新的化学成分出现(峰 1),而分煎样品(单味配方颗粒)仅是将各单味颗粒进行混合,就缺少峰 1 这个成分,因此分煎形式的配方颗粒是否能与合煎剂的药效相当,以及对产生的新成分定性都是值得深入研究的问题。

[参考文献]

- [1] 湖北中医学院. 伤寒论讲义[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,1986:232.
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2010:80.
- [3] 张仲景. 伤寒论[M]. 李培生,成肇仁. 北京:人民卫生出版社,2006:437.
- [4] 杨殿兴,傅元谋. 伤寒论读本[M]. 北京:化学工业出版社,2006:附录二 358.

[责任编辑 蔡仲德]

微波协助提取在中药饮片含量测定中的应用(3) ——微波法与药典法测定土茯苓中落新妇苷含量比较

方婧¹, 付梅红^{1*}, 杨洪军¹, 张贝贝¹, 王祝举¹, 杨岚¹, 杨雪燕², 张梦阳², 张康丁³, 张东¹

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 沈阳药科大学, 沈阳 110016;

3. 邢台医学高等专科学校, 河北 邢台 054000)

[摘要] 目的: 建立微波协助提取法提取土茯苓中有效成分落新妇苷含量测定方法, 比较微波协助提取法与药典法提取落新妇苷优势。方法: 采用 Dikma Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1% 冰醋酸水溶液(39:61), 检测波长 291 nm, 柱温 30 °C, 流速 1 mL·min⁻¹。结果: 微波提取时间 10 min, 提取温度 60 °C, 提取溶剂 60% 乙醇。落新妇苷在 0.04 ~ 0.8 μg 呈良好线性关系($r=0.9999$)。平均回收率 99.80% ($n=6$)。结论: 微波提取法较药典法提取落新妇苷更简便快速、结果准确, 为一种符合环保绿色理念的含量测定方法, 可用于检测土茯苓饮片中有有效成分落新妇苷含量。

[关键词] 微波提取; 土茯苓; 落新妇苷; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)24-0043-03

Determination of Microwave-assisted Extraction of Chinese Cut Crude Drugs (3) Comparison of Determination of Astilbin from *Smilax glabra* between Microwave-assisted Extraction and Chinese Pharmacopeia Method

FANG Jing¹, FU Mei-hong^{1*}, YANG Hong-jun¹, ZHANG Bei-bei¹, WANG Zhu-ju¹,
YANG Lan¹, YANG Xue-yan², ZHANG Meng-yang², ZHANG Kang-ding³, ZHANG Dong¹

(1. Institute of Chinses Materia Medica, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China; 2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

3. Xingtai Medical College, Xingtai 054000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a microwave-assisted extraction method for the extraction of the astilbin from *Smilax glabra*. Comparison of the determination of astilbin from *Smilax glabra* between microwave-assisted extraction and Chinese pharmacopeia method. **Method:** Dikma Diamonsil C₁₈ column(4.6 mm × 150 mm, 5 μm) was used. The mobile phase of methanol-0.1% acetic acid-water (39:61). The temperature of column was 30 °C. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was at 291 nm. **Result:** Microwave extractive time was 10 min, the temperature was 60 °C, the extraction solvent was 60% ethanol. The calibration curve was in good linearity with in the range from 0.04 to 0.8 μg ($r=0.9999$). The average recovery was 99.80% ($n=6$). **Conclusion:** The method is simple, rapid, as well as precise and reliable, and can be used for the determination of astilbin from *Smilax glabra*.

[Key words] microwave-assisted extraction; *Smilax glabra*; astilbin; determination

[收稿日期] 20110510(009)

[基金项目] “重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09308-003); 国家科技支撑计划子课题(2006BAI09B07-02)

[第一作者] 方婧, 技师, 从事中药化学成分与质量评价研究, Tel:010-64062692

[通讯作者] * 付梅红, 研究员, 从事中药化学与质量评价研究, Tel:010-64062692