

## UPLC 研究不同配伍对白虎汤中甘草酸含量的影响

吴君金<sup>1</sup>, 卢林<sup>1</sup>, 马强<sup>1</sup>, 李晓晶<sup>2</sup>, 顾丽<sup>2</sup>, 葛尔宁<sup>1</sup>, 苏燕<sup>2\*</sup>

(1. 浙江中医药大学分析测试中心, 杭州 310053;  
2. 内蒙古科技大学包头医学院基础学院, 内蒙古 包头 014060)

**[摘要]** 目的: 建立 UPLC 测定白虎汤中甘草酸含量的分析方法, 研究配伍对汤剂中甘草酸含量的影响。方法: 采用  $L_8(2^7)$  正交设计, 以 UPLC 测定白虎汤中甘草酸的含量。结果: 配伍降低了白虎汤复方药液中甘草酸的含量, 知母和粳米对甘草酸含量的影响存在显著性 ( $P < 0.05$ ), 石膏增加了甘草酸含量, 但影响不显著, 两两交互作用对甘草酸含量的影响不显著。结论: 知母和粳米降低了复方药液中甘草酸的含量。

**[关键词]** 超高压液相色谱; 甘草酸; 白虎汤; 甘草; 配伍

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)12-0021-04

## Effects of Compatibility on Content of Glycyrrhizic Acid in Baihutang by UPLC

WU Jun-jin<sup>1</sup>, LU Lin<sup>1</sup>, MA Qiang<sup>1</sup>, LI Xiao-jing<sup>2</sup>, GU Li<sup>2</sup>, GE Er-ning<sup>1</sup>, SU Yan<sup>2\*</sup>

(1. Analytical Testing Center, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;  
2. Basic Medical College, Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science & Technology, Baotou 014060, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the changes of glycyrrhizic acid in eight decoctions. **Method:** Different decoctions were prepared and analyzed by  $L_8(2^7)$  orthogonal design, the content of glycyrrhizic acid in each decoction was determined by UPLC and variance analysis was processed. **Result:** The glycyrrhizic acid content was decreased when Licorice compatible with other herbs. For Rhizoma Anemarrhenae and Rice, the difference of glycyrrhizic acid was significant ( $P < 0.05$ ); for Gypsum, the influence was insignificant, and the interactions between two of three were insignificant too. **Conclusion:** The content of glycyrrhizic acid in decoction was reduced by Rhizoma Anemarrhenae and Rice.

**[Key words]** UPLC; glycyrrhizic acid; Baihutang; Licorice; compatibility

白虎汤出自汉代医圣张仲景的《伤寒论》, 由石

膏、知母、甘草、粳米 4 味药组成, 主治阳明、气分热盛证, 具有清热生津的功效<sup>[1]</sup>。目前对白虎汤的药理作用研究较多<sup>[2-6]</sup>, 但对配伍引起的主要化学成分的变化报道较少, 主要仅集中在不同配伍对君药石膏中钙离子 ( $Ca^{2+}$ ) 溶出量影响的研究上<sup>[7-9]</sup>。中药汤剂在煎煮过程中, 各药味的成分相互影响, 产生助溶或沉淀等现象, 使中药汤剂中有效成分的煎出率产生变化, 直接影响中药汤剂在临床上的疗效。因此本实验将白虎汤中 4 味药进行不同配伍后, 采用分煎与合煎的方法考察甘草酸的含量变化。

超高效液相色谱 (UPLC) 是以  $1.7 \mu m$  填料作为

**[收稿日期]** 20100825(011)

**[基金项目]** 教育部科学技术研究重点项目 (210039); 内蒙古自然科学基金项目 (200711020913)

**[第一作者]** 吴君金, 在读硕士, 研究方向: 方剂有效成分及其变化规律研究, Tel: 0571-86613589, E-mail: wujunjin107@163.com

**[通讯作者]** \* 苏燕, 医学博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 方剂有效成分及其变化规律研究, Tel: 0472-7167841, Fax: 0472-7167836, E-mail: synmg@126.com

固定相,使色谱柱获得了更高的柱效,而且在较宽的流速范围内柱效保持恒定,通过提高流动相的流速而缩短分析时间,提高分析通量,有利于复杂样品的分离。相对于普通 HPLC 而言,UPLC 有更好的分离效率、峰容量以及灵敏度<sup>[10-12]</sup>。本实验通过使用 UPLC 研究不同配伍对甘草酸含量的影响,为深入研究白虎汤的配伍规律、作用机制及今后开发此方等提供参考。

### 1 材料

Waters Acquity™ Ultra performance LC 色谱仪(美国 Waters 公司),ABI35-S 型电子分析天平(瑞士 METTLER 公司),5702 型离心机(德国 EPPENDORF 公司)。甘草酸单铵盐对照品购自上海同田生物技术有限公司(批号 09081222),色谱纯甲醇购自美国 TEDIA 公司,分析纯醋酸铵和冰醋酸购自上海国药化学试剂有限公司。

石膏、知母、炙甘草购自浙江中医药大学中药饮片厂,粳米购于市场,以上药材经浙江中医药大学葛尔宁研究员鉴定,石膏为单斜晶系含水硫酸钙(CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O)的矿石,知母为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* 的干燥根茎,甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 的干燥根茎,粳米为禾本科植物稻 *Oryza sativa* 的种仁。

### 2 方法与结果

#### 2.1 白虎汤中甘草酸含量的测定

**2.1.1 色谱条件** ACQUITY UPLC BEH RP<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm × 100 mm,1.7 μm),流动相乙腈-0.2 mol·L<sup>-1</sup>醋酸铵溶液-冰醋酸(30:69:1),柱温 37 °C,流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 250 nm。

**2.1.2 标准曲线** 精密称定甘草酸对照品 1.00 mg,置 10 mL 量瓶中,用流动相溶解定容即得对照品溶液。依次进样 0.2,0.4,0.8,1.2,1.6,2.0 μL 对照品溶液,以进样量(X)为横坐标,色谱峰面积(A)为纵坐标,求得回归方程  $A = 30\ 892.26 X - 245.79$  ( $r = 0.9997$ )。表明进样量在 0.020 0 ~ 0.200 0 μg 线性关系良好。

**2.1.3 供试品溶液和阴性溶液制备** 按处方剂量(石膏 50 g,知母 18 g,甘草 6 g,粳米 9 g)称取各配伍组和阴性对照组所需药材各 3 份,加水 500 mL,于烧杯中浸泡 30 min,然后煮沸 20 min,纱布过滤,定容至 500 mL,精密移取 1 mL 药液定容至 10 mL,取适量药液 3 000 r 离心 10 min,0.22 μm 微孔滤膜

过滤后装入进样瓶中,依次进样 1 μL,测定浓度,计算白虎汤复方汤剂药液中甘草酸质量分数为 11.35 mg/剂,RSD 0.473 5% ( $n = 3$ )。见图 1。

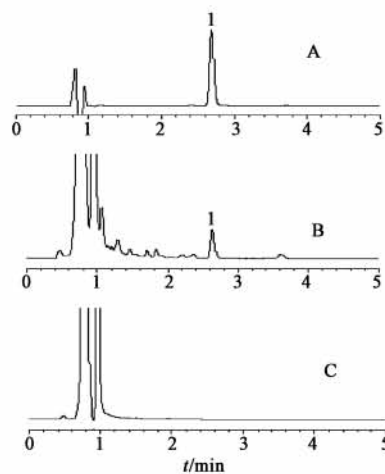


图 1 白虎汤 UPLC

A. 对照品;B. 样品;C. 缺甘草阴性对照;1. 甘草酸

**2.1.4 精密度试验** 取某一份供试品溶液,重复进样 6 次,甘草酸峰面积 RSD 0.095 7%。

**2.1.5 稳定性试验** 取某一份供试品溶液,在配制后 0,2,4,8,12,24 h 进样,测定甘草酸峰面积 RSD 0.694 8%,表明 24 h 内供试品溶液稳定。

**2.1.6 加样回收率** 平行精密量取已知含量的白虎汤药液 1 mL,分别加入 0.023 0 g·L<sup>-1</sup> 的甘草酸对照品溶液 1 mL,按照 2.1.3 项下操作,测定,结果平均回收率为 98.72%,RSD 0.641 6% ( $n = 4$ )。

#### 2.2 配伍对白虎汤中甘草酸含量的影响

**2.2.1 L<sub>8</sub>(2<sup>7</sup>) 配伍的正交设计** 选石膏、知母、粳米作为 3 个因素,选用药和不用药为 2 个水平,同时考虑两两交互作用,因素水平见表 1。

表 1 白虎汤配伍因素水平

| 水平 | A 石膏 | B 知母 | C 粳米 |
|----|------|------|------|
| 1  | 用药   | 用药   | 用药   |
| 2  | 不用药  | 不用药  | 不用药  |

**2.2.2 试验安排及结果分析** 按照 L<sub>8</sub>(2<sup>7</sup>) 正交设计安排试验,结果见表 2,方差分析见表 3。

### 3 讨论

表 3 方差分析表明,知母和粳米对甘草酸的含量影响差异存在显著性,但两两交互作用则没有显著性影响。表 2 显示,虽然石膏增加了甘草酸的含量,但影响不显著。上述各配伍组甘草酸含量依次为:甘草单煎 > 两药配伍 > 三药配伍 > 白虎汤复方。

表2 白虎汤配伍  $L_8(2^7)$  正交试验设计

| No.      | A      | B      | A × B  | C      | A × C  | B × C  | A × B × C | 甘草酸/(mg/剂) |
|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----------|------------|
| 1        | 1      | 1      | 1      | 1      | 1      | 1      | 1         | 11.35      |
| 2        | 1      | 1      | 1      | 2      | 2      | 2      | 2         | 41.86      |
| 3        | 1      | 2      | 2      | 1      | 1      | 2      | 2         | 34.02      |
| 4        | 1      | 2      | 2      | 2      | 2      | 1      | 1         | 81.07      |
| 5        | 2      | 1      | 2      | 1      | 2      | 1      | 2         | 36.13      |
| 6        | 2      | 1      | 2      | 2      | 1      | 2      | 1         | 73.87      |
| 7        | 2      | 2      | 1      | 1      | 2      | 2      | 1         | 73.14      |
| 8        | 2      | 2      | 1      | 2      | 1      | 1      | 2         | 77.21      |
| $T_{1k}$ | 168.30 | 163.21 | 203.56 | 154.64 | 196.45 | 205.76 | 239.43    | 428.65     |
| $T_{2k}$ | 260.35 | 265.44 | 225.09 | 274.01 | 232.20 | 222.89 | 189.22    |            |

表3 方差分析

| 方差来源                                  | SS       | f | F     | P     |
|---------------------------------------|----------|---|-------|-------|
| A                                     | 1 059.15 | 1 | 7.44  | >0.05 |
| B                                     | 1 305.61 | 1 | 9.17  | <0.05 |
| C                                     | 1 781.15 | 1 | 12.51 | <0.05 |
| 误差(A × B × C + A × B + A × C + B × C) | 569.51   | 4 |       |       |

注:  $F_{0.05}(1,4) = 7.71, F_{0.01}(1,4) = 21.20$ 。

这可能由于甘草酸与知母中菝葜皂苷元和芒果苷形成复合物,也可能由于甘草酸与粳米中淀粉形成复合物导致甘草酸含量降低的。究竟是何种原因导致甘草酸含量降低,有待进一步研究。

虽然复方药液中甘草酸含量比单味药甘草水煎药液含量低,但是并不意味着配伍后药效一定比单味药的药效低。因为中医复方的临床疗效是方中各化学成分之间相互作用的整体效果。对本方药理作用研究发现,白虎汤复方对疫苗法致热家兔的解热作用,明显优于单用本方中有解热作用的君药石膏和臣药知母,而方中佐药甘草和粳米单用无解热作用<sup>[2]</sup>。但陈求浩等研究了甘草中有效成分甘草酸与石膏中金属离子配伍能力及其药理作用却发现,无解热作用的甘草酸可与石膏中  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  等金属离子形成不同稳定程度的配合物,并且上述甘草酸金属配合物均有解热作用<sup>[13]</sup>。马强等研究了不同配伍对白虎汤中  $Ca^{2+}$  溶出量的影响,发现知母与石膏配伍合煎可明显抑制石膏中解热有效成分  $Ca^{2+}$  的溶出,而甘草则可抵消知母对石膏中  $Ca^{2+}$  溶出的负面影响,促进石膏中  $Ca^{2+}$  的溶出,使

得白虎汤复方药液中  $Ca^{2+}$  的溶出量增高<sup>[9]</sup>。可见,复方药液中某些有效成分含量低于单味药,并不能说明复方配伍的不科学性。白虎汤复方配伍可使解热有效成分  $Ca^{2+}$  溶出量增加,并可形成新的有解热作用的有效成分。这表明,中医方剂“君臣佐使”的组方原则确有其规律性和合理性。复方配伍可使一部分药物中有效成分溶出量增加或形成新的有效成分以增强复方药效,还可以通过各药物间相须、相使的作用,抵消某些药物之间的相互抑制作用,提高主药药效。但复方配伍是如何通过各药物间相互作用,使甘草抵消了知母对石膏中  $Ca^{2+}$  溶出量的影响,甘草与知母、甘草与粳米之间相互作用如何导致甘草酸含量的降低,尚有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] 段富津. 方剂学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1995:69.
- [2] 沈映君. 中药药理学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2000:168.
- [3] 谭毓治,彭旦明,肖舜玲,等. 九个方剂对大鼠实验性发热的影响[J]. 中国中药杂志,1989,14(5):51.
- [4] 文小平,毛平. 白虎汤退热的药理研究近况[J]. 上海中医药杂志,1994,28(1):45.
- [5] 张保国,程铁锋,刘庆芳. 白虎汤药效及现代临床研究[J]. 中成药,2009,31(8):1272.
- [6] 夏怡,李祥,陈建伟,等. 石膏及白虎汤清热泻火功效的实验研究[J]. 现代中药研究与实践,2009,23(2):48.

DOI:CNKI:11-3495/R.20110420.0929.002

## 芩翘抗感颗粒提取工艺优选

曹杰,方睿,张海鸣,费超,杜树山\*

(中药资源保护与利用北京市重点实验室 北京师范大学教育部资源药物工程研究中心,北京 100875)

**[摘要]** 目的:优选芩翘抗感颗粒提取工艺。方法:以干膏量、黄芩苷提取量为评价指标,选择加水量、提取时间、提取次数为考察因素,利用正交试验  $L_9(3^4)$  确定了芩翘抗感颗粒的水提取工艺。结果:最佳提取工艺为加水8倍量,煎煮3次,每次煎煮2h。结论:提取工艺简单、可行。

**[关键词]** 芩翘抗感颗粒;提取工艺;正交试验

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)12-0024-03

### Extraction Process of Qinqiao Kanggan Granules

CAO Jie, FANG Rui, ZHANG Hai-ming, FEI Chao, DU Shu-shan\*

(1. Protection and Utilization of Traditional Chinese Medicine of Beijing Area Major Laboratory,  
Center for Natural Medicine Engineering Ministry of Education China,  
Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

**[Abstract]** **Objective:** To make the optimum process conditions of extraction for Qinqiao Kanggan Granules. **Method:** Orthogonal design was applied to investigate the optimum extraction process of Qinqiao Kanggan Granules with baicalin and dry-paste as marker. **Result:** Optimum processing condition was as follows: water extraction three times with 8 double, 2 h. **Conclusion:** This method is simple and can apply rightly in mass production.

**[Key words]** Qinqiao Kanggan Granules; extraction process; orthogonal design

**[收稿日期]** 20101015(010)

**[基金项目]** 国家科技支撑计划课题(2007BAI48B10)

**[第一作者]** 曹杰,硕士生,研究方向:中药物质基础, Tel:010-62205268, E-mail: jessiejie209@163.com

**[通讯作者]** \*杜树山,副教授,博士,从事中药及其民族药物物质的基础研究, Tel:010-62208032, E-mail: dushushan@ires.cn

**[网络出版时间]** 2011-04-20 09:29

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110420.0929.002.html>

- [7] 马强,苏琨,苏燕,等. 不同配伍条件下白虎汤中钙离子溶出规律研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(9):2178.
- [8] 丁选胜,戴德哉,汤晓赞. 人参白虎汤配伍规律研究-不同配伍条件下钙离子含量变化[J]. 中草药, 2004, 35(2):156.
- [9] 马强,苏琨,盛振华,等. ICP-AES法研究不同配伍条件下白虎汤中钙离子溶出规律[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5):86.
- [10] 金高娃,章飞芳,薛兴亚. 超高速液相色谱在复杂体系中中药分离分析中的应用[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2006, 8(3):106.
- [11] Wren S A, Tchelitcheff P. Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development [J]. J Chromatogr A, 2006, 1119(1-2):140.
- [12] 卢林,吴君金,马强,等. UPLC法测定地黄中梓醇的含量[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(6):1309.
- [13] Chen Q H, Wu B F, Cui W J. Studies on traditional Chinese medical prescription Ma Xing Shi Gan Tang by bio-coordination chemistry[J]. J Chin Pharm Sci, 1993, 2(1):85.

[责任编辑 仝燕]