

四君子汤和理中丸中甘草酸及甘草苷含量测定

张 玲, 刘振丽*, 宋志前, 李林福, 贾宏伟, 王 淳

(中国中医科学院基础理论研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 测定四君子汤和理中丸中甘草酸及甘草苷含量。方法: HPLC 测定甘草酸及甘草苷含量, Zobax SB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱, 甘草酸采用甲醇-0.2 mol·L⁻¹ 醋酸铵溶液-冰醋酸 (58: 41: 1) 为流动相; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 250 nm。甘草苷采用乙腈-0.5% 冰醋酸 (18: 82) 为流动相; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 276 nm。结果: 四君子汤和理中丸中甘草酸含量分别为 1.41%、1.44%, 甘草苷分别为 0.603%、0.603%。结论: 两复方中甘草酸及甘草苷含量无明显差异。

[关键词] 四君子汤; 理中丸; 甘草酸; 甘草苷

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2007)06-0004-03

四君子汤由人参、白术、茯苓、炙甘草组成, 功能益气健脾, 主治脾胃气虚。理中丸由干姜、人参、白术、炙甘草组成, 功能温中祛寒, 主治脾胃虚寒。从组成药物看, 四君子汤与理中丸仅一味之差, 四君子汤重在益气健脾, 理中丸重在温中祛寒, 分别对应中医不同证, 与它们的组成药味以及各单味药成分间的配伍作用有关。课题组在以往的研究中, 采用利血平建立脾虚证模型, 发现血清中 GLU、ALP、JIL-6 在理中丸治疗组和四君子汤治疗组有较好区分度 (实验结果另文发表)。中医方剂是一复杂体系, 其疗效依赖于内在成分的种类和多寡。为研究两方作用的物质基础, 本研究采用 HPLC 法对两复方水煎剂中的主要化学成分甘草酸及甘草苷含量进行了测定, 并与单味药炙甘草水煎剂进行了比较。

1 仪器、材料与试剂

高效液相色谱仪: HP1100, G1322A 脱气机, G1311A 四元泵, G1316A 恒温箱, G1315B DAD 检测器, G1313A 自动进样器, HP 化学工作站; LG0508 理化干燥箱 (上海市实验仪器总厂)。四君子汤和理中丸复方饮片人参、茯苓、白术、炙甘草、干姜购于北京燕京医药公司。甘草酸单铵盐对照品 (批号: 110731-200407, 含量测定用)、甘草苷对照品 (批号: 111610-

200402, 含量测定用) 购自中国药品生物制品检定所。甲醇、乙腈为色谱纯, 水为重蒸水, 其它试剂为分析纯。

2 实验汤剂的制备

四君子汤: 称取人参、茯苓、白术和炙甘草各 20 g, 置圆底烧瓶中, 加入 10 倍水, 浸泡 30 min, 回流提取 2 次, 第 1 次 40 min, 第 2 次 30 min, 滤过, 合并滤液, 适当水浴浓缩, 定容于 250 mL 量瓶中, 得四君子汤药液。重复 1 次, 得四君子汤药液 1 2。

理中丸: 称取人参、干姜、白术和炙甘草各 20 g, 同上四君子汤制法, 得理中丸药液。重复 1 次, 得理中丸药液 1 2。

炙甘草: 称取炙甘草 20 g, 同上四君子汤制法, 得炙甘草药液。

3 甘草酸含量测定

3.1 色谱条件 Zobax SB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相甲醇-0.2 mol·L⁻¹ 醋酸铵溶液-冰醋酸 (58: 41: 1); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 250 nm; 柱温 30 °C。

3.2 对照品溶液的制备和线性关系的考察 取甘草酸单铵盐对照品, 加流动相溶解并制成含量为 0.26 mg·mL⁻¹ 的对照品溶液 (折合甘草酸为 0.247 mg·mL⁻¹)。

分别精密吸取对照品溶液 1, 3, 5, 7, 9 μL, 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定峰面积, 以测得的峰面积积分为纵坐标, 进样量 (μg) 为横坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程, $Y = 6.04 + 1.328X$, $r = 0.9999$, 表明甘草酸单铵盐在 0.26~2.34 μg 具有良

[收稿日期] 2006-07-31

[基金项目] 国家自然科学基金重大研究计划面上项目 (90209032)

[通讯作者] * 刘振丽, Tel: (010) 64014411-2503; E-mail: zhenli@liu@sina.com

好的线性关系。

3.3 供试品溶液的制备 取四君子汤和理中丸药液, 摇匀, 分别精密吸取 2.5 mL 药液(相当于 0.2 g 炙甘草), 置 50 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜(0.45 μm) 滤过, 取续滤液即得。

3.4 精密度试验 精密吸取同一理中丸供试品溶液重复进样 5 次, 甘草酸单铵盐峰面积的 RSD 分别为 1.2%。

3.5 稳定性试验 精密吸取同一理中丸供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 24 h 进样, 结果表明供试品在 24 h 内稳定。

3.6 重复性试验 取同一理中丸药液, 5 份, 按供试

品溶液处理, 进行含量测定, 测得的甘草酸单铵盐含量 RSD 为 1.4%。

3.7 回收率试验: 取同一理中丸药液 1.25 mL, 5 份, 精密称定, 分别精密加入甘草酸单铵盐对照品, 按供试品溶液处理, 进行含量测定, 计算甘草酸单铵盐回收率为 99.9%, RSD 为 2.5%。结果见表 1。

3.8 供试品溶液中甘草酸单铵盐含量测定 分别精密吸取各供试品溶液 5 μL、对照品溶液 3 μL 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 计算样品中甘草酸单铵盐含量, 折算成甘草酸含量。结果见表 3。色谱图见图 1。

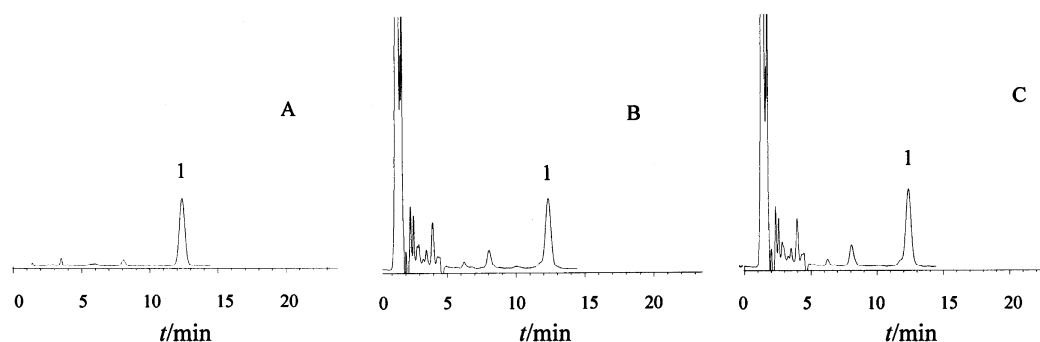


图 1 四君子汤、理中丸中甘草酸单铵盐 HPLC 图

A. 对照品; B. 四君子汤; C. 理中丸; 1. 甘草酸单铵盐(对照品峰名)

表 1 甘草酸含量测定回收率试验结果

供试品 取样量 (mL)	供试品中 甘草酸量 (mg)	添加的甘 草酸量 (mg)	测得的甘 草酸量 (mg)	回收率 (%)	平均回 收率 (%)	RSD (%)
1.25	1.44	1.40	2.81	97.86		
1.25	1.44	1.40	2.82	98.57		
1.25	1.44	1.40	2.89	103.57	99.86	2.5
1.25	1.44	1.40	2.81	97.86		
1.25	1.44	1.40	2.86	101.43		

4 甘草苷含量测定

4.1 色谱条件 Zobax SB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相乙腈-0.5% 冰醋酸(18: 82); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 276 nm; 柱温 30 °C。

4.2 对照品溶液的制备和线性关系的考察 分别精密称取甘草苷对照品, 加甲醇配制成含量为 0.038 mg·mL⁻¹ 的对照品溶液。

分别精密吸取对照品溶液 1, 2, 3, 4, 5 μL, 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定峰面积, 以测得的峰面积积分为纵坐标, 进样量(μg) 为横坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程, $Y = 8.15 + 117X$, $r = 0.9998$, 表明甘草苷在 0.038~ 0.19 μg 具有良好的

线性关系。

4.3 供试品溶液的制备 取四君子汤和理中丸药液, 摇匀, 分别精密吸取 1.0 mL 药液(相当于 0.08 g 炙甘草), 置 50 mL 量瓶中, 加 20% 乙腈稀释至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜(0.45 μm) 滤过, 取续滤液即得。

4.4 精密度试验 精密吸取同一四君子汤供试品溶液重复进样 5 次, 甘草苷峰面积的 RSD 分别为 2.1%。

4.5 稳定性试验 精密吸取同一四君子汤供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 24 h 进样, 结果表明供试品在 24 h 内稳定。

4.6 重复性试验 取同一四君子汤供试品溶液, 5 份, 按供试品溶液处理, 进行含量测定, 测得的甘草苷含量 RSD 为 1.1%。

4.7 回收率试验: 取同一四君子汤药液 0.5 mL, 5 份, 精密称定, 分别精密加入甘草苷对照品, 按供试品溶液处理, 进行含量测定, 计算甘草苷回收率为 96.4%, RSD 为 2.1%。结果见表 2。

4.8 供试品溶液中甘草苷含量测定 分别精密吸取各供试品溶液 5 μL、对照品溶液 2 μL 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 计算样品中甘草苷含量。结果见表 3, 色谱图见图 2。

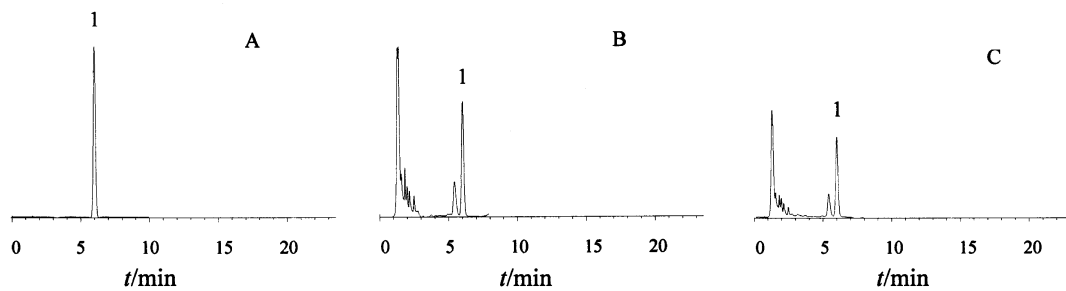


图 2 四君子汤、理中丸中甘草苷 HPLC 图

A. 对照品; B. 四君子汤; C. 理中丸; 1. 甘草苷(对照品峰名)

依据药典 2005 年版一部甘草项下方法, 测定炙甘草饮片中甘草酸和甘草苷含量。

表 2 甘草苷含量测定回收率试验结果

供试品 取样量 (mL)	供试品中 甘草酸量 (mg)	添加的甘 草酸量 (mg)	测得的甘 草酸量 (mg)	回收率 (%)	平均回 收率 (%)	RSD (%)
0.50	0.241 2	0.25	0.490 2	99.60		
0.50	0.241 2	0.25	0.480 2	95.60		
0.50	0.241 2	0.25	0.482 7	96.60	96.42	2.1
0.50	0.241 2	0.25	0.479 1	95.16		
0.50	0.241 2	0.25	0.470 0	95.12		

表 3 四君子汤、理中丸中甘草酸和甘草苷含量测定结果(%)

名称	甘草酸	平均甘 草酸	RSD	甘草苷	平均甘 草苷	RSD	
理中丸	药液 1	1.46		0.625			
		1.47		0.599			
	药液 2	1.40	1.41	2.1	0.593	0.603	2.4
		1.43		0.597			
四君子汤	药液 1	1.46		0.601			
		1.40		0.607			
	药液 2	1.37	1.44	2.8	0.609	0.603	1.1
		1.41		0.595			
炙甘草汤剂	1.35			0.508			
	1.30	1.32	2.1	0.512	0.510	0.40	

5 结果与讨论

中药方剂是一复杂体系, 其疗效依赖于所含物质基础—多种化学成分按君、臣、佐、使在多靶点上的整体协同效应。方剂作用的实质是方中所含的各种有效成分及药物配伍后的功效变化, 故进行方剂的物质基础—化学成分含量、化学成分群的组成成分及其组成比例等的研究是十分必要的。

已有研究报道, 中药配伍后可使某些单味药中的成分含量升高或降低。如四逆汤中附子与甘草共煎后, 使甘草酸含量明显降低^[1]。四君子汤合煎液中甘草酸含量高于甘草单煎液中含量^[2]。本试验结果显示, 四君子汤、理中丸两复方水煎剂中甘草酸和甘草苷含量无明显差异, 表明两复方单一药味茯苓和干姜的不同, 不会引起甘草中两种成分含量的不同, 但两复方合煎液中两种成分含量均高于甘草单煎液中含量, 原因有待于进一步研究。

本实验在 2 复方汤剂的制备中曾采用临床常用的煎煮方法, 尽管采用电磁炉可以控制火候, 但由于煎煮中水分的不断蒸发, 造成平行试验的两份样品含量测定的误差很大。因此, 在实际实验中, 提取时间参考了临床用药煎煮时间, 但采用了回流提取的方法, 从而使试验误差降低, 提高了含量测定的准确性。

[参考文献]

- [1] 陈建萍, 谭炳炎, 吴伟康, 等. 四逆汤中附子与甘草配伍规律研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2001; 7(3): 16.
- [2] 王涛, 江滨, 曾元儿. 四君子汤合、单煎液中甘草酸含量的测定[J]. 广东药学, 2002; 12(4): 8.