

桂枝甘草汤中 10 种成分在不同煎煮时间的变化研究

向 丽¹, 张贵君^{1,2*}, 王佳琳¹, 郭亚芳¹, 杨颜芳¹, 彭 慧², 孙启玉², 刘 亮²

1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102

2. 淄博万杰中医药研究所, 山东 淄博 255213

摘 要: **目的** 考察桂枝甘草汤中甘草酸、甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素、苯甲酸钠、香豆素、桂皮醇、桂皮酸、桂皮醛 10 种成分在不同煎煮时间下的变化。**方法** 采用 HPLC-DAD 多波长切换法同时测定不同煎煮时间 (10、20、30、40、50、60、90 min) 下桂枝甘草汤中 10 种成分。Hypersil Gold-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1% 磷酸溶液, 梯度洗脱; 体积流量: 0.8 mL/min; 柱温: 20 ℃; 进样量: 20 μL; 检测波长: 230 nm (甘草苷、甘草素、苯甲酸钠)、254 nm (甘草酸, 桂皮醇)、276 nm (香豆素、桂皮酸、桂皮醛)、370 nm (异甘草苷、异甘草素)。**结果** 随着煎煮时间的延长, 10 种成分的总量在 30 min 处达到最大值, 且最终趋向稳定; 桂枝中各成分的变化大体上是先增加后减少, 在 30 min 处达到最大值; 炙甘草中各成分量的变化除了在 40 min 处有减少外, 基本呈现递增趋势。**结论** 确定桂枝甘草汤的煎煮时间为 30 min, 为其临床应用提供了科学依据。

关键词: 桂枝甘草汤; 甘草酸; 甘草苷; 桂皮醛; 煎煮时间; HPLC-DAD 多波长切换法

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2017)02-0183-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.02.005

Changes of 10 components in Guizhi Gancan Decoction at various decocting time

XIANG Li¹, ZHANG Gui-jun^{1,2}, WANG Jia-lin¹, GUO Ya-fang¹, YANG Yan-fang¹, PENG Hui², SUN Qi-yu², LIU Liang²

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

2. Zibo Wanjie Institute of Traditional Chinese Medicine, Zibo 255213, China

Abstract: Objective To investigate the changes of 10 components, such as glycyrrhizic acid, liquiritin, isoliquiritin, isoliquiritigenin, liquiritigenin, sodium benzoate, coumarin, cinnamic alcohol, cinnamic acid, and cinnamaldehyde in Guizhi Gancan Decoction at various decocting time. **Methods** The contents of 10 active components in Guizhi Gancan Decoction decocted with different decocting time (10, 20, 30, 40, 50, 60, and 90 min) were simultaneously determined by HPLC-DAD with changing ultraviolet-visible wavelength. Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was carried out. The mobile phase was acetonitrile - 0.1% phosphoric acid solution (H₃PO₄) with gradient elution, with a flow rate of 0.8 mL/min. The column temperature was set at 20 ℃, and injection volume was 20 μL. The detection wavelength was set at 230 nm (liquiritin, liquiritigenin, and sodium benzoate), 254 nm (glycyrrhizic acid and cinnamic alcohol), 276 nm (coumarin, cinnamic acid, and cinnamaldehyde), and 370 nm (isoliquiritin and isoliquiritigenin). **Results** With the extension of decocting time, the content of 10 components had maximum at 30 min and tended to be stable. The content of each component in *Cinnamomi Ramulus* firstly increased to the highest levels at 30 min and then decreased. And content of each component in *Glycyrrhizae Radix* basically showed an upward trend except at 40 minutes. **Conclusion** The optimized decocting time of Guizhi Gancan Decoction is confirmed for 30 min, which provides a scientific basis to its clinical application.

Key words: Guizhi Gancan Decoction; glycyrrhizic acid; liquiritin; cinnamaldehyde; decocting time; HPLC-DAD with changing

收稿日期: 2016-10-28

基金项目: 北京中医药大学在读研究生项目 (2016-JYB-XS103)

作者简介: 向 丽 (1990—), 女, 硕士, 研究方向: 中药药效组分及药效组分质量评价体系研究。Tel: 15624965368 E-mail: 370012429@qq.com

*通信作者 张贵君 (1954—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 中药鉴定方法学、中药药效组分、中药质量标准化研究。

Tel: 13501027481 E-mail: guijunzhang@163.com

桂枝甘草汤出自东汉时期张仲景《伤寒论》，由桂枝（去皮）和炙甘草按质量比 2:1 组成，具有温补心阳、生阳化气之功效，是治疗心阳虚之祖方^[1]。其有效成分主要有挥发油类、有机酸类、香豆素类、甾体类、黄酮类、三萜类、生物碱类以及多糖类成分^[2-3]。桂枝甘草汤以汤剂入药，而影响汤剂的质量因素众多，如浸泡、加水量、煎煮时间、煎煮火候、煎煮次数、煎药器具等^[4]。目前常见的中药煎煮方法为浸泡 20~30 min，加水量以浸泡后淹没药材 2~3 cm 为准，火候“先武后文”，煎煮 2 次，煎煮的器具多为砂锅^[5-6]，而煎煮时间的长短则往往由药物的气味质地决定。中药多以复方入药，不同性质的药味其煎煮时间不一致。而目前对煎煮时间考察多停留于单味药，考察指标也往往局限于少数几个成分或某一类成分，忽略了中药复方的复杂性和整体性。因此对由不同气味质地的单味药配伍组成的复方进行煎煮时间考察是及其必要的。因此，本研究以桂枝甘草汤中甘草酸、甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素、苯甲酸钠、香豆素、桂皮醇、桂皮酸、桂皮醛作为指标，采用 HPLC-DAD 法测定不同煎煮时间下的各成分的变化，确定其最佳煎煮时间，为桂枝甘草汤的质量控制提供理论依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

UltiMate 3000 Series 型高效液相色谱仪 (Thermo); AL104 型电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; KQ-250B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药材与试剂

炙甘草购自河北省安国市万联中药饮片有限公司，桂枝购自聚旭堂药店，以上药材经北京中医药大学中药学院中药鉴定系张贵君教授鉴定分别为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎、樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥嫩枝；甘草酸（批号 150407）、甘草苷（批号 141029）、异甘草苷（批号 150714）、甘草素（批号 150511）、异甘草素（批号 141020）、香豆素（批号 150419）、桂皮醇（批号 160503）、桂皮酸（批号 140924）、桂皮醛（批号 160503）对照品购于成都普菲德生物技术有限公司，质量分数均≥98%；苯甲酸钠对照品（批号 100433-200301，质量分数≥98%）由中国食品药品检定研究院提供；乙腈（色谱纯，上海星可高纯溶剂有限公司）；磷酸（分析纯，

国药集团化学试剂有限公司）；纯净水（杭州娃哈哈集团有限公司）。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

分别精密称取甘草酸、甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素、苯甲酸钠、香豆素、桂皮醇、桂皮酸、桂皮醛对照品适量，加甲醇制成质量浓度分别为 55.5、47.5、42.5、40.5、38.5、11.0、29.1、30.0、55.0、30.0 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

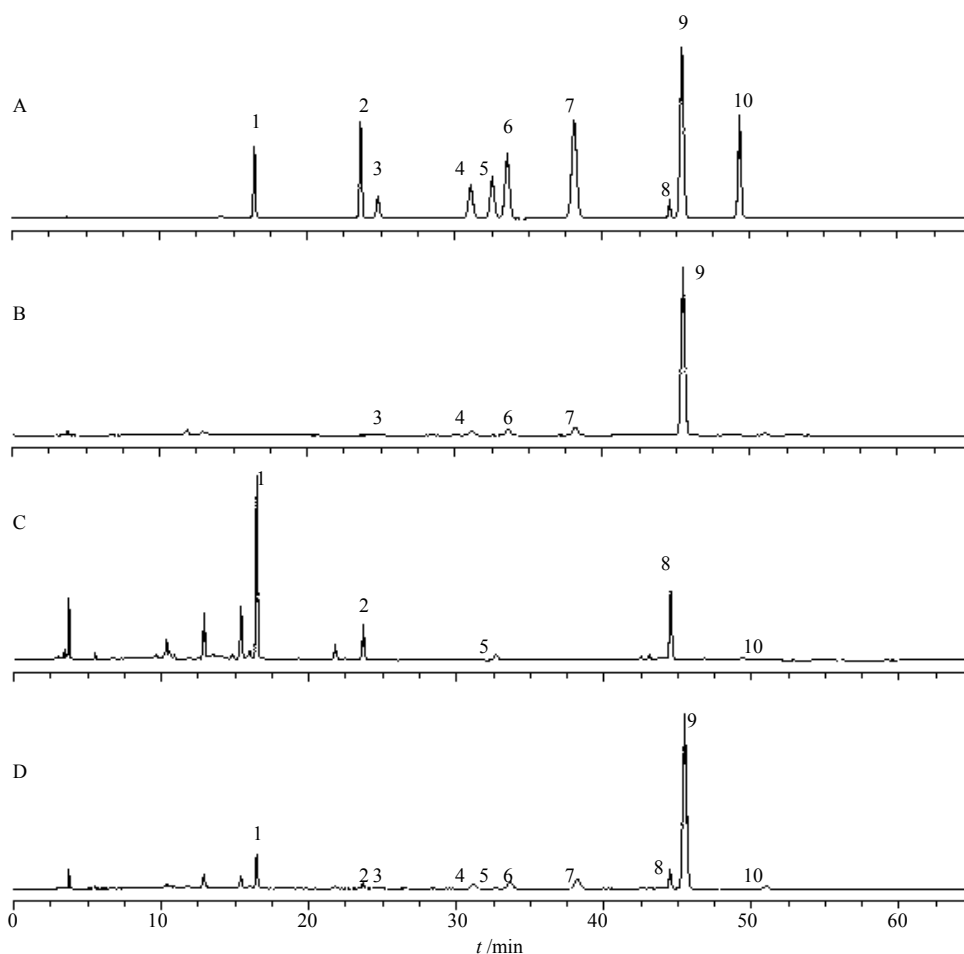
精密称取 12 g 桂枝、6 g 炙甘草，共 7 份，分别加入 10 倍量水，浸泡 30 min，先用武火加热至沸后，再分别用文火保持微沸 10、20、30、40、50、60、90 min，共煎 2 次，合并滤液，冷却，加水至 360 mL，混匀。分别精密量取 3 mL 滤液置 10 mL 量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，离心 5 min，上清液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过，即得。按上述方法每个时间组重复 3 次，并制备缺桂枝和缺炙甘草的阴性样品溶液。

2.3 色谱条件

Hypersil Gold-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 (A) - 0.1% 磷酸溶液 (B); 梯度洗脱: 0~5 min, 5%~21% A; 5~10 min, 21%~25% A; 10~15 min, 25%~28% A; 15~18 min, 28%~31% A; 18~35 min, 31%~32% A; 35~37 min, 32%~42% A; 37~50 min, 42%~47% A; 50~55 min, 47%~5% A; 55~65 min, 5%; 体积流量: 0.8 mL/min; 柱温: 20 °C; 进样量: 20 μL; 检测波长: 230 nm (甘草苷、甘草素、苯甲酸钠)、254 nm (甘草酸、桂皮醇)、276 nm (香豆素、桂皮酸、桂皮醛)、370 nm (异甘草苷、异甘草素)。色谱图见图 1。

2.4 线性关系考察

分别精密称取甘草酸、甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素、苯甲酸钠、香豆素、桂皮醇、桂皮酸、桂皮醛对照品适量，加甲醇制成质量浓度分别为 214.0、84.0、16.6、5.7、3.9、7.8、19.4、12.0、44.0、100.0 μg/mL 的混合对照品溶液（母液）。各精密量取母液 4.0、3.0、2.0、1.0、0.5、0.1 mL 置 5 mL 量瓶中，加甲醇至刻度，分别进样 20 μL 测定。以峰面积为纵坐标，质量浓度为横坐标进行回归处理，各成分线性回归方程、线性范围及相关系数见表 1。



1-甘草苷 2-异甘草苷 3-苯甲酸钠 4-香豆素 5-甘草素 6-桂皮醇 7-桂皮酸 8-甘草酸 9-桂皮醛 10-异甘草素
1-liquiritin 2-isoliquiritin 3-sodium benzoate 4-coumarin 5-liquiritigenin 6-cinnamic alcohol 7-cinnamic acid 8-glycyrrhizic acid 9-cinnamaldehyde
10-isoliquiritigenin

图1 混合对照品(A)、缺炙甘草阴性样品(B)、缺桂枝阴性样品(C)和桂枝甘草汤(D)的HPLC图谱
Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), negative sample without *Glycyrrhizae Radix* (B), negative sample without *Cinnamomi Ramulus* (C) and Guizhi Gancao Decoction (D)

表1 10种成分的线性回归方程、线性范围及相关系数

Table 1 Calibration curves, linear ranges, and correlation coefficients of 10 components

成分	回归方程	相关系数 (r)	线性范围/ μg
甘草酸	$Y=314.05 X-1.932 6$	0.999 2	4.320 0~216.000 0
甘草苷	$Y=930.29 X+0.475 5$	0.999 4	1.680 0~84.000 0
异甘草苷	$Y=1 538.6 X-0.007 9$	0.999 5	0.332 0~16.600 0
甘草素	$Y=1 443.5 X+0.025 0$	0.999 9	0.114 8~5.740 0
异甘草素	$Y=2 740.4 X-0.144 2$	0.999 3	0.077 0~3.850 0
苯甲酸钠	$Y=1 694.3 X+0.157 4$	0.999 9	0.156 0~7.800 0
香豆素	$Y=2 066.5 X-0.042 3$	0.999 2	0.388 0~19.400 0
桂皮醇	$Y=4 222.7 X+0.024 6$	0.999 8	0.240 0~12.000 0
桂皮酸	$Y=5 046.8 X-0.269 7$	0.999 7	0.880 0~44.000 0
桂皮醛	$Y=8 377.4 X+0.060 6$	0.999 2	2.000 0~100.000 0

2.5 精密度试验

精密吸取对照品混合溶液 10 μL , 连续进样 6 次, 测定并计算甘草酸、甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素、苯甲酸钠、香豆素、桂皮醇、桂皮酸、桂皮醛峰面积的 RSD 值, 结果分别为 0.30%、0.16%、0.15%、0.24%、0.57%、0.34%、0.18%、0.26%、0.17%、0.16%。

2.6 重复性试验

精密称取 12 g 桂枝、6 g 炙甘草, 按 2.2 项下方法制备 6 份煎煮时间为 30 min 的供试品溶液, 分别进样 20 μL , 测定并计算甘草酸、甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素、苯甲酸钠、香豆素、桂皮醇、桂皮酸、桂皮醛质量分数的 RSD 值, 结果分别为 1.11%、1.02%、1.10%、1.43%、1.26%、1.05%、1.35%、0.77%、1.19%、0.75%。

2.7 稳定性试验

精密吸取煎煮时间为 30 min 的供试品溶液 20 μL , 分别于制备后的 0、2、4、8、12、24 h 进样测定, 测定并计算甘草酸、甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素、苯甲酸钠、香豆素、桂皮醇、桂皮酸、桂皮醛峰面积的 RSD 值, 结果分别为 0.37%、0.88%、0.90%、1.48%、0.99%、1.37%、1.39%、0.45%、0.41%、0.09%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验

精密量取已知各成分质量浓度的煎煮时间为 30 min 的供试品溶液 1.5 mL, 平行 9 份, 于 10 mL 量瓶中, 分别加入供试品溶液的 80%、100%、120% 质量的对照品各 3 份, 制备供试品溶液, 测定并计算甘草酸、甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素、苯甲酸钠、香豆素、桂皮醇、桂皮酸、桂皮醛的回收率。结果各成分的平均回收率分别为 99.17%、98.03%、98.94%、98.58%、97.77%、97.90%、98.26%、99.11%、98.78%, RSD 值分别为 0.61%、0.43%、0.52%、1.02%、1.26%、1.38%、1.19%、0.97%、0.74%、0.68%。

2.9 各成分测定和变化

将制得的不同煎煮时间的桂枝甘草汤样品进样测定, 根据标准曲线计算各样品中 10 种成分的质量浓度, 其变化趋势见图 2。

可以看出, 随着煎煮时间延长, 各成分的量均发生改变, 在 10~30 min 均呈现递增趋势, 30 min 之后的变化趋势则不尽相同, 如桂枝部分桂皮醛、香豆素呈持续递减趋势; 桂皮酸、桂皮醇和苯甲

钠则先减少后增加。炙甘草部分甘草酸、甘草苷、异甘草苷先减少后增加; 甘草素和异甘草素则继续增加, 在 50 min 处达到最大值随后减少趋向平缓。还可以发现, 桂枝中各成分总量同桂皮醛变化趋势相似: 先增加后减少, 在 30 min 时达到最大值; 炙甘草各成分总量同甘草酸、甘草苷变化趋势相似: 先增加, 至 30 min 后减少, 再增加; 10 种成分总量和炙甘草 5 种成分总量变化趋势相似。

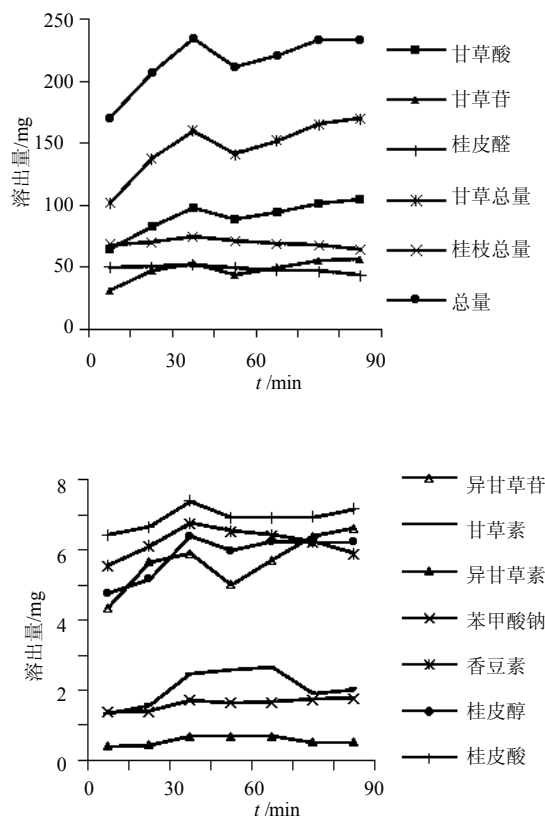


图 2 桂枝甘草汤中各成分含量及总量变化趋势

Fig. 2 Change trend of each or total content of components in Guizhi Gancan Decoction

3 讨论

复方中药由两种或两种以上的单味药按照君臣佐使的原则配伍形成, 而每味药的药性存在一定的差异, 有的药物随着煎煮时间的延长, 其有效成分溶出的越多^[7], 有的药物因含有易挥发性成分则不宜久煎, 如桂枝甘草汤中桂枝属于芳香类药物, 其有效成分多为挥发类, 不宜久煎, 实验结果亦表明桂枝各成分总量在 30 min 处达到最大值, 之后则有所下降。而炙甘草中各成分总量除在 40 min 处有所下降外基本上呈现上升的趋势, 说明煎煮时间的延长有利于炙甘草中有效物质的溶出。随着煎煮时

间的增加, 10 种成分的量变化各不相同, 其最佳煎煮时间也不同。当把它们进行相加时, 发现在 30 min 处有最大值, 这一结果与传统煎煮时间相吻合, 亦说明通过某个或少数几个成分的量来考察煎煮时间不够全面, 应选择能体现中药整体性的有效成分作为其考察指标。总而言之, 对于药物性质较复杂的复方, 正确掌握其煎煮时间对提高用药质量和临床疗效具有重大意义。

参考文献

- [1] 钟相根. 大国医系列之张仲景传世名方: 伤寒论卷 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2013: 75.
- [2] 许源, 宿树兰, 王团结, 等. 桂枝的化学成分与药理

活性研究进展 [J]. 中药材, 2013, 36(4): 674-678.

- [3] 张玉龙, 王梦月, 杨静玉, 等. 炙甘草化学成分及药理作用研究进展 [J]. 上海中医药大学学报, 2015, 29(3): 99-102.
- [4] 李学林, 孟菲. 浅析影响汤剂煎煮质量的因素 [J]. 中医杂志, 2006, 47(6): 421-422.
- [5] 梁世香. 中药煎煮的基本方法与注意事项 [J]. 今日药学, 2008, 18(2): 38-39.
- [6] 胡思一, 蔡进章, 包菁菁. 煎药之法, 最宜深讲 [J]. 海峡药学, 2006, 18(3): 153-155.
- [7] 李瑞煜, 张定堃, 韩雪, 等. 基于代谢组学方法的制附片煎煮过程成分变化规律及煎煮时限探讨 [J]. 中草药, 2016, 47(1): 38-45.