

炮制对甘草中主要苷类成分质量分数及其煎出量的影响

张 敏, 王梦月, 刘雅茜, 李晓波*

上海交通大学药学院, 上海 200240

摘 要: 目的 单因素考察不同炮制方法对甘草中芹糖甘草苷(LQA)、甘草苷(LQN)、甘草苣荬苷(LCD, 异甘草素-葡萄糖苣荬苷)、异甘草苷(ILN)和甘草酸(GL)的质量分数、煎出量及煎出率的影响。方法 采用已建立的HPLC法, 同时测定甘草中LQA、LQN、LCD、ILN和GL在不同炮制条件下(不加或加入25%炼蜜, 加热60 min, 加热温度为90、110、130、150℃; 加入25%炼蜜, 加热温度为130℃, 加热30、60、90、120 min)的质量分数、煎出量, 计算煎出率。结果 随加热强度(温度及时间)的增大, 清烘制得的制甘草中LQA、LQN和GL的质量分数、煎出量显著降低, ILN的质量分数、煎出量显著增加, 但其煎出率显著降低。加入炼蜜使以上成分的质量分数、煎出量的变化幅度增强; 并在不同程度上影响LQA、LQN、GL的煎出率。结论 加热与加蜜对甘草中主要苷类成分的煎出率均有不同程度的影响。

关键词: 甘草; HPLC; 蜜炙; 煎出率; 单因素试验; 甘草苣荬苷; 甘草酸; 甘草苷

中图分类号: R283.1; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)07-1305-04

Changes of contents and decocted contents of main glycosides in *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* under different processing conditions

ZHANG Min, WANG Meng-yue, LIU Ya-qian, LI Xiao-bo

School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China

Abstract: **Objective** To investigate the changes of content, decocted content, and decocting rate of liquiritin apioside (LQA), liquiritin (LQN), licuroside (LCD), isoliquiritin (ILN), and glycyrrhizin (GL) in *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* under different processing conditions by single factor exploration. **Methods** A validated RP-HPLC method based on the prior work was applied to simultaneously determination of LQA, LQN, LCD, ILN, and GL in *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* and its decoction, which were processed under different baking temperatures (90, 110, 130, and 150℃) with or without refined honey and different baking times (30, 60, 90, and 120 min). And the decocting rates were calculated then. **Results** The contents in processed *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* and its decoction of LQA, LQN, and GL have descended significantly while those of ILN have increased with the baking temperature and baking time increasing. However, the decocting rate of ILN has descended. Compared to the baking process without refined honey, the honey process could improve the variation ranges of contents and decocted contents of the components much more significantly. And the honey process could influence the decocting rates of LQA, LQN, and GL to some extent. **Conclusion** The baking strength (baking temperatures and baking time) could affect contents, decocted contents, and decocting rates of each component in *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* to some extent and the addition with refined honey could collaborate the baking process to influence the contents of the glycosides in *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* and its decoction.

Key words: *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; HPLC; honey process; decocting rate; single factor exploration; licuroside; glycyrrhizin; liquiritin

甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *G. inflata* Bat. 或光果甘草 *G. glabra* L. 的干燥根和根茎, 味甘性平, 具有清热解

毒、祛痰止咳之功效^[1]。甘草蜜炙后强于补脾和胃、益气复脉^[2]。甘草中的主要化学成分为黄酮类和三萜皂苷类^[3-6], 其主要代表成分甘草苷和甘草酸为

收稿日期: 2010-09-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30973962)

作者简介: 张 敏(1983—), 女, 新疆乌鲁木齐人, 上海交通大学药学院 2007 级硕士研究生, 从事中药质量控制研究。

Tel: (021)34205222 13816364523 E-mail: abbyzhang5505910@gmail.com

*通讯作者 李晓波 Tel: (021)34204806 E-mail: xbli@sjtu.edu.cn

《中国药典》2010年版甘草质量控制的检测成分。水煎液是中药及复方临床应用中传统、常见的给药剂型,炮制对甘草苷类成分煎出率影响的研究尚未有报道。本实验采用 RP-HPLC 法考察炼蜜与加热强度对甘草中芹糖甘草苷 (liquiritin apioside, LQA)、甘草苷 (liquiritin, LQN)、甘草芹葡苷 (licuroside, LCD, 异甘草素-葡萄糖芹糖苷)、异甘草苷 (isoliquiritin, ILN) 和甘草酸 (glycyrrhizin, GL) 的质量分数、煎出量和煎出率的影响,为甘草的炮制工艺研究、质量控制以及临床应用提供依据。

1 仪器与材料

Shimadzu LC—2010AHT 型高效液相色谱仪 (日本岛津公司), LC—Solution 色谱工作站。乙腈为色谱纯,液相用水经 Milli-Q (美国密理博公司) 系统制得。

LQA、LQN、LCD、ILN、GL 均为从甘草的干燥根中分离得到,经 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、MS 鉴定结构, HPLC 检测质量分数均大于 95%。

生甘草 (批号 GY II 07020510) 购自内蒙古亿利科技实业股份有限公司,经上海交通大学药学院李晓波教授鉴定为 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根。炼蜜购自上海静安制药厂。

2 方法与结果

2.1 制甘草的制备

取生甘草药粉 0.5 g, 分别按如下条件炮制, 制得含 0.5 g 生药的制甘草药粉: 不加炼蜜, 分别于 90、110、130、150 $^{\circ}\text{C}$ 烘制 60 min, 得清烘甘草; 取生药量 25% 的炼蜜, 加水适量稀释后与生甘草药粉搅拌均匀, 分别于 90、110、130、150 $^{\circ}\text{C}$ 烘制 60 min, 得蜜炙甘草; 取生药量 25% 的炼蜜, 加水适量稀释后与生甘草药粉搅拌均匀, 于 130 $^{\circ}\text{C}$ 分别烘制 30、60、90、120 min, 得蜜炙甘草。

2.2 色谱条件^[7]

色谱柱为依利特 Hypersil ODS C_{18} 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 (A) -3% 乙酸水溶液 (B), 梯度洗脱: 0~12 min, 22%~25% A; 12~15 min, 25%~40% A; 15~30 min, 40%~60% A。柱温 35 $^{\circ}\text{C}$, 体积流量 0.6 mL/min, 检测波长 254 nm。

2.3 对照品溶液的制备

分别取 LQA、LQN、LCD、ILN、GL 对照品适量, 精密称定, 以 80% 甲醇溶解并定容至 25 mL, 得 LQA 0.228 mg/mL、LQN 0.272 mg/mL、LCD

0.064 mg/mL、LIN 0.064 mg/mL、GL 0.204 mg/mL 的对照品溶液, 于 -4 $^{\circ}\text{C}$ 储存。

2.4 供试品溶液的制备

取生甘草药粉 0.5 g、制甘草药粉 (含 0.5 g 生甘草), 分别置锥形瓶中以 60% 甲醇 25 mL 超声提取 30 min, 以 60% 甲醇补足减失的质量, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 用于测定 5 个苷类成分的量。

取生甘草药粉 0.5 g、制甘草药粉 (含 0.5 g 生甘草), 分别置锥形瓶中以 25 mL 水加热回流提取 30 min, 冷却后以水补足减失的质量, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 用于测定 5 个苷类成分的煎出量。

2.5 样品测定

测定生甘草、不同炮制条件下的制甘草中 5 个苷类成分的质量分数、煎出量, 计算煎出率 (煎出率 = 生、制甘草的煎出量 / 生、制甘草的量), 结果分别见表 1~4。

表 1 生甘草中 5 个苷类成分的质量分数、煎出量及煎出率 ($n=3$)

Table 1 Contents, decocted contents, and decocting rates of five glycosides in raw *Glycyrrhizae Radix* et *Rhizoma* ($n=3$)

成分	质量分数/(mg·g ⁻¹)	煎出量/(mg·g ⁻¹)	煎出率/%
LQA	13.03	12.88	98.17
LQN	21.09	17.55	82.97
LCD	2.66	1.40	52.54
ILN	2.55	1.65	64.87
GL	37.63	29.84	78.21

2.5.1 不同炮制条件下甘草中 5 个苷类成分的质量分数、煎出量 生甘草经不同工艺炮制后, 除 ILN 的质量分数一直高于生品外, 部分制甘草中 LQA、LQN、LCD 和 GL 的质量分数与生品相比会有一定程度的升高, 表 2 中 90、110、130 $^{\circ}\text{C}$ 条件下炮制的样品和表 3 中 90 $^{\circ}\text{C}$ 条件下炮制的样品中各苷类成分的质量分数均高于生品, 但随着加热强度 (温度、时间) 的增大而降低。表明生甘草经炮制后各苷类成分的质量分数并不一定会降低, 经过适当的炮制, 有些苷类成分的质量分数会有所上升。

制甘草中各苷类成分的质量分数、煎出量的变化趋势相似, 即随着加热强度 (温度、时间) 的增大而呈现单一的变化趋势: LQA、LQN、LCD、GL

的质量分数随加热强度的增大而降低, ILN 的质量分数随加热强度的增大而增加。进一步比较 90~150 ℃制甘草中(表 2、3)各成分质量分数、煎出量的变化幅度, 结果显示蜜炙甘草各苷类成分质量分数的变化幅度(90 ℃与 150 ℃的比较)均显著

高于不加蜜的清烘甘草; 蜜炙甘草各苷类成分煎出量的变化幅度除 LCD 外, 均显著高于不加蜜的清烘甘草。表明炮制中除加热强度外, 炼蜜的加入协同加热因素, 能够影响甘草中主要苷类成分的质量分数及煎出量。

表 2 不加炼蜜、固定加热时间 60 min、在不同加热温度下制甘草中 5 个苷类成分的质量分数、煎出量及煎出率 ($n=3$)

Table 2 Contents, decocted contents, and decocting rates of five glycosides in *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* processed under different heating temperatures in 60 min without adding refined honey ($n=3$)

温度/℃	质量分数/(mg·g ⁻¹)					煎出量/(mg·g ⁻¹)					煎出率/%				
	LQA	LQN	LCD	ILN	GL	LQA	LQN	LCD	ILN	GL	LQA	LQN	LCD	ILN	GL
90	14.22	22.31	2.79	2.72	38.43	13.57	18.21	1.33	1.49	30.69	95.42	81.63	47.92	54.68	79.85
110	14.00	21.99	2.77	2.76	38.47	13.06	17.39	1.22	1.47	30.09	93.94	79.66	44.39	53.89	79.09
130	14.03	21.93	2.73	2.92	38.45	13.02	17.29	1.24	1.46	29.15	93.26	79.30	45.89	50.35	76.29
150	12.35	19.25	2.60	3.86	36.94	12.39	16.05	1.17	1.68	28.65	99.09	84.34	45.35	42.99	78.01

表 3 加入 25%炼蜜、固定加热时间 60 min、在不同加热温度下制甘草中 5 个苷类成分的质量分数、煎出量及煎出率 ($n=3$)

Table 3 Contents, decocted contents, and decocting rates of five glycosides in *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* processed under different heating temperatures in 60 min by adding 25% refined honey ($n=3$)

温度/℃	质量分数/(mg·g ⁻¹)					煎出量/(mg·g ⁻¹)					煎出率/%				
	LQA	LQN	LCD	ILN	GL	LQA	LQN	LCD	ILN	GL	LQA	LQN	LCD	ILN	GL
90	14.15	22.27	2.75	2.70	38.61	13.29	17.72	1.31	1.33	29.86	92.63	79.04	47.39	48.95	77.08
110	13.74	21.24	2.64	3.07	36.17	13.04	17.04	1.22	1.35	28.55	94.03	79.70	46.52	44.28	79.09
130	13.61	20.69	2.47	3.31	36.39	12.78	17.06	1.16	1.51	28.72	95.27	83.46	48.69	46.52	81.57
150	11.76	16.43	2.47	4.80	34.36	10.48	14.07	1.22	1.99	25.23	89.03	85.61	49.41	41.38	73.44

表 4 加入 25%炼蜜、固定烘制温度 130 ℃、在不同加热时间下制甘草中 5 个苷类成分的质量分数、煎出量及煎出率 ($n=3$)

Table 4 Contents, decocted contents, and decocting rates of five glycosides in *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* processed in different heating times at 130 ℃ by adding 25% refined honey ($n=3$)

时间/min	质量分数/(mg·g ⁻¹)					煎出量/(mg·g ⁻¹)					煎出率/%				
	LQA	LQN	LCD	ILN	GL	LQA	LQN	LCD	ILN	GL	LQA	LQN	LCD	ILN	GL
30	13.75	21.85	2.60	2.87	38.39	12.69	17.29	1.25	1.46	29.39	94.19	79.94	48.15	51.12	76.72
60	13.82	21.23	2.60	3.18	36.90	12.72	16.96	1.24	1.58	28.49	93.33	80.47	48.55	51.03	76.85
90	12.43	18.64	2.14	3.03	32.35	11.77	16.12	1.18	1.60	27.32	93.26	85.12	54.15	52.83	83.54
120	11.98	17.73	2.10	3.21	32.23	11.75	15.23	1.08	1.68	26.58	98.45	86.28	52.16	52.37	83.75

2.5.2 不同炮制条件下甘草中 5 个苷类成分的煎出率 生、制甘草中 5 个苷类成分的煎出率从大到小依次为 LQA (89.03%~98.45%)、LQN (79.04%~86.28%)、GL (73.44%~83.75%)、ILN (41.38%~64.87%) 和 LCD (44.39%~54.15%)。表明 5 个苷类成分在水中的溶出有较大差别。

在对加热温度的考察中, 生甘草加热后 LCD 的煎出率显著降低, 但随着温度的增高变化不大。而 ILN 的煎出率随温度的增大而显著降低。其中不

加蜜的清烘甘草与生品相比 LQA 的煎出率在 110、130 ℃显著低于生品, 但在 150 ℃时增大至与生品相当; GL 的煎出率在整个考察水平中与生品相当; LQN 在 150 ℃时的煎出率显著高于生品。在蜜炙甘草中, 与生品相比 LQA 和 GL 的煎出率在 150 ℃时显著降低, 而 LQN 的煎出率一直与生品相当。在加热时间的考察中, LQN 和 GL 受加热时间的影响不大, 其煎出率与生品相当; ILN 在加热后其煎出率显著低于生品, 但在不同加热条件下的煎出率相

当,无显著变化。结果表明,加热、加蜜对甘草中主要苷类成分的煎出率均有不同程度的影响,但对 ILN 的影响最为明显,即该成分随加热强度的增大其煎出率显著降低。

3 讨论

本实验在等生药量的基础上对甘草不同炮制条件进行单因素考察,确保不同制甘草中主要苷类成分的质量分数、水煎液煎出率变化的可比性。加热方法以烘制代替炒制,可实现精确控温,利于对加热温度的考察。中药饮片的传统剂型为水煎液,故以水为提取溶媒加热回流模拟传统水煎法,提取 30 min。

LQA 和 LQN 属于二氢黄酮类化合物,ILN 和 LCD 属于异黄酮类化合物,GL 属于三萜皂苷。归属于不同类型的化合物是导致该 5 个苷类成分在水中溶出差异性的主要原因。

炮制后,甘草中部分苷类成分的质量分数反而增大,可能是由于适度的加热使得饮片的结构疏松,利于苷类成分的溶出,因此其质量分数、煎出量高于生品。但苷类成分最终或因对强热的不稳定,随着加热强度的增大发生降解或变构,故而质量分数或煎出量降低。

本研究结果中,甘草未加炼蜜经 150 °C 加热 60 min 后 GL 的质量分数与生品相当;加入 25% 炼蜜后经 150 °C 加热 60 min GL 的质量分数比生品有显著降低。表明炼蜜的加入的确影响甘草饮片中 GL 的变化。GL 的熔点为 214 °C,有报道 GL 单体在 200 °C 加热 15 min 后开始降解为 18- β 甘草次酸,而在 150 °C 时加热 60 min 时尚未发生降解^[8]。推测炼蜜的加入促进甘草饮片中 GL 的降解,但具体变化原因有待进一步研究。

有报道内蒙古、新疆、甘肃出产的甘草经蜜炙后黄酮质量分数均有不同程度的提高^[9]。本实验 ILN 的质量分数在不加蜜或加蜜的条件下均伴随加热强度的增大而上升,但加蜜后其质量分数的增大程度显著高于不加蜜的。从 ILN 和 LCD 的化学结构上分析,ILN 是 LCD 末端的蔗糖水解后的产物。LCD 随加热强度的增强而下降,有可能水解为 ILN。但对 ILN 与 LCD 的变化幅度做相关性检验,并未显示二者的变化具有相关性。推测可能是因为由 LCD 水解而来的 ILN 在高温状态下发生了进一步的降解,具体过程有待进一步的研究。

天然蜂蜜的主要成分为蔗糖、果糖和葡萄糖,并含有一定的酶类,如淀粉酶、转化酶等^[10]。但蜜制法所用到的蜂蜜为经加热处理后的炼蜜,酶类成分因受强热而失活,因此推断在对中药蜜炙的过程中不会有酶的降解作用。蜂蜜随着储藏时间、温度或处理中加热温度的升高,羟甲基糠醛的质量分数有所升高^[11],此外还原糖的转化增强。蜜炙过程中以上物质的转化是否影响甘草主要苷类成分的质量分数、煎出量和煎出率,具体原因有待进一步探究。

甘草中 ILN 的质量分数随加热强度的增强而增大且显著高于生品,但加热后的煎出量比生品低,导致其煎出率显著低于生品。由此可见饮片中苷类成分的质量分数并不代表实际应用中的煎出量,因此饮片煎出量对饮片的临床应用有实际的指导意义。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 陈兰英, 罗 雄, 胡瑞刚, 等. 炙甘草汤对气血两虚心律失常大鼠血流动力学的影响 [J]. 中草药, 2009, 40(9): 1438-1440.
- [3] 何 华, 葛志伟, 刘 雳, 等. 甘草黄酮对阿霉素细胞毒性的影响及其构效关系研究 [J]. 中草药, 2010, 41(6): 941-945.
- [4] Zhang Q Y, Ye M. Chemical analysis of the Chinese herbal medicine Gan-Cao (licorice) [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(11): 1954-1969.
- [5] 管 燕, 谢强敏. 甘草黄酮对肺部炎症小鼠细胞因子表达和氧化反应的调节作用 [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1254-1259.
- [6] 张明发, 沈雅琴. 甘草粗提物及其黄酮类成分的抗肿瘤作用 [J]. 现代药物与临床, 2010, 25(2): 124-129.
- [7] 刘雅茜, 王梦月, 史海明, 等. 高效液相色谱法测定甘草及其炮制品中 5 种活性成分的含量 [J]. 中国药学杂志, 2008, 43(16): 1268-1271.
- [8] Sung M W, Li P C H. Chemical analysis of raw, dry-roasted, and honey-roasted licorice by capillary electrophoresis [J]. *Electrophoresis*, 2004, 25 (20): 3434-3440.
- [9] 张爱华, 文红梅, 彭国平, 等. HPLC 法测定甘草中总黄酮含量 [A]. 中国化学会第十届全国有机分析研讨会论文集 (上册) [C]. 济南: 中国化学会, 1998.
- [10] 顾雪竹, 李先端, 钟银燕, 等. 蜂蜜的现代研究及应用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(6): 70-73.
- [11] 曾哲灵, 叶贞雄, 万冬满, 等. 加热过程对蜂蜜中羟甲基糠醛含量的影响 [J]. 南昌大学学报: 理科版, 2002, 26(1): 67-70.