

甘草干姜汤中 8 种药效组分的含量测定

杨颜芳¹, 张贵君^{1,2,*}, 王晶娟¹, 孙启玉², 刘亮², 彭慧², 向丽¹

¹北京中医药大学, 北京 100102; ²淄博万杰中医药研究所, 淄博 255000

摘要: 分析测定不同本草所载甘草干姜汤中的 8 种药效组分, 为其建立与临床疗效相对应的质量标准提供技术和思路。甘草干姜汤按照传统煎煮方法制备, 用高效液相色谱(HPLC)对其药效组分进行测定。流动相(A) 0.1% 磷酸水溶液-(B) 乙腈, 梯度洗脱(0~5 min, 5%~15% B; 5~10 min, 15%~22% B; 10~15 min, 22%~26% B; 15~30 min, 26%~28% B; 30~32 min, 28%~55% B; 32~35 min, 55%~60% B; 35~40 min, 60%~63% B; 40~45 min, 63%~65% B), 流速 0.6 mL/min, 柱温 30 °C。所得不同甘草干姜汤中的 8 种药效组分(甘草苷、异甘草苷、甘草素、甘草酸、异甘草素、6-姜酚、8-姜酚、6-姜烯酚)含量分别为 175.68、20.23、10.87、367.79、1.99、29.48、9.93、4.88 μg/mL(炙甘草 12 g-干姜 6 g); 243.14、29.87、14.97、624.53、3.29、22.42、14.97、3.14 μg/mL(炙甘草 12 g-炮干姜 6 g); 151.42、17.45、8.92、344.03、1.52、24.2、7.17、0.84 μg/mL(炙甘草 9 g-炮干姜 9 g)。本实验所采用的 HPLC 法快速、可靠, 所测得的 8 种药效组分可作为甘草干姜汤质量控制的科学指标, 也为建立与临床疗效相对应、安全、有效、稳定的中药质量评价体系提供一个新方向。

关键词: 甘草干姜汤; 临床疗效; 质量控制; 药效组分

中图分类号: R917

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.5.016

Determination of 8 Active Components in Gancao-Ganjiang-Tang by High-Performance Liquid Chromatography

YANG Yan-fang¹, ZHANG Gui-jun^{1,2,*}, WANG Jing-juan¹, SUN Qi-yu², LIU Liang², PENG Hui², XIANG Li¹

¹Department of Pharmacognosy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

²Zibo Wanjie Institute of Chinese medicine, Zibo 255000, China

Abstract: Gancao-Ganjiang-Tang (GGT) is a Traditional Chinese medicine (TCM) Prescription and is a representative prescription for recuperating depleted Yang in Treatise on Febrile Diseases. The TCM theory believes that the efficacy of medicinal herbs is decided by the multicomponents which consist of different kinds of chemical constituents with bioactivities, but not by a monomer constituent. To determine 8 active compositions alignment in GGT so as to provide technology and ideas for the establishment of quality standard in accordance with its therapeutic effects, a new TCM (including single herb and prescription) quality control method is proposed. A high-performance liquid chromatography (HPLC) was established for the simultaneous determination of 8 compounds in GGT. The analysis was performed on a Hypersil Gold-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column at a flow rate of 0.6 mL/min. The mobile phase consisted of acetonitrile (A) and 0.1% H₃PO₄ aqueous (B) using a gradient elution of 5%-15% A at 0-5 min, 15%-22% A at 5-10 min, 22%-26% A at 10-15 min, 26%-28% A at 15-30 min, 28%-55% A at 30-32 min, 55%-60% A at 32-35 min, 60%-63% A at 35-40 min, and 63%-65% A at 40-45 min. The column temperature was holding on 30 °C. The total contents of the 8 compounds in different GGT varied from 555.56 to 956.33 μg/mL, and the composition of them were also varied. The results showed that the dosage and compatibility of medicinal herbs have influenced the content of chemical compounds of TCM Prescription while the content of chemical compounds have act on clinical efficacy. Quality evaluation and active essence screening of TCM should be based on the TCM theory and clinical effectiveness. The method was applied to the simultaneous determination of eight compounds in GGT and was proven to be suitable for quality evaluation of GGT.

Key words: Gancao-Ganjiang-Tang; clinical effectiveness; TCM quality control; multicomponents

收稿日期: 2016-07-18 接受日期: 2017-03-10

基金项目: 国家自然科学基金(81303217)

* 通信作者 Tel: 86-013501027481; E-mail: guijunzhang@163.com

甘草干姜汤为张仲景所创, 最早载于《伤寒论》, 后又见于《金匱要略》、《仁斋直指方论》, 三方药物基原相同, 但在饮片配伍、剂量及功效主治上均

有差异。《伤寒论》炙甘草-干姜(12 g:6 g),主治伤寒挟虚误汗引发的上焦阳虚^[1];《金匱要略》炙甘草-炮干姜(12 g:6 g),主治肺痿咳吐涎沫^[2];《仁斋直指方论》炙甘草-炮干姜(9 g:9 g),主治男女诸虚出血,胃寒不能引气归原^[3]。甘草干姜汤虽组方简单,却药专力宏,近年来,对肺痿、哮喘、眩晕、尿频、吐疟等病症均有良好的治疗效果^[4-5]。

中药多以复方入药,其功能以单味药的功效为基础,但不是简单单味药功效的总和。配伍后的中药在功效上有所侧重,说明其组分发生了变化,即量和质的改变。中药药效组分理论提出^[6]:中药由药效组分和天然辅料组成,构成了一个有机整体。临床使用的中药是复方及其制剂,而饮片是中药的起点和原料。中药的药效组分由配伍饮片构成,这个药效组分实质上是化学组分和信息物质组分的组合,化学组分由多种化合物组成,信息物质组分由蛋白质类组分、核酸类组分和多糖类组分构成,各类组分不是简单的成分堆积,而是遵循自然规律有机的结合,形成一个质和量相对稳定的比例组合(药效组分)。当配伍饮片或配伍比例发生改变,药效组分也随之改变,其所对应的适应症也有所不同。运用中药药效组分理论,可阐释中药品质的本质特征,建立符合临床用药特征的中药质量标准和鉴定方法。

本实验采用传统水煎煮法制备甘草干姜汤,在有效性、安全性和稳定性等方面与经方一致。选取具水溶性、药理作用明确、分析方法成熟且与复方传统功效或直接或间接相关的成分(甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素、甘草酸、6-姜酚、6-姜烯酚、8-姜酚)作为研究和分析的对象。其中,甘草酸^[7-9]抗炎、抗过敏、保肝、保护神经、调节免疫、降糖、抑制胆汁淤积;甘草苷和异甘草苷^[10-12]抗抑郁、保肝、止咳、抗菌、抗氧化;甘草素^[13,14]抗癌、抗溃疡、解痉、止痛;异甘草素^[15]抗炎、抗心律失常。姜酚类物质^[16]对心脏有兴奋作用,并可扩张血管,促进血液循环;此外还有提高脑组织中超氧化物歧化酶活性;改善缺血组织代谢和缺氧状况等作用。

甘草干姜汤流传至今仍广泛运用于临床,本文以中药药效组分理论为指导,分析测定甘草干姜汤中的8种药效组分,为解析其药效本质提供科学数据,也为建立与临床疗效相对应的质量评价方法奠定基础。同时对应于目前用一种或几种化学单体来控制中药质量,并且规定化学单体的含量只有下限

而没有上限存在一定用药不安全隐患的中药质量控制方法提出一种新的中药质量评价模式,即在中药药效组分理论指导下,用药效组分去标定中药、中药复方及其制剂,以期建立安全、有效、稳定的中药质量评价体系。

1 仪器与材料

Thermo 3000 高效液相色谱仪(DAD 检测器 DAD-3000,四元泵 LPG-3400SD,自动进样器 WPS-3000),Hypersil Gold-C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm)色谱柱;电子分析天平 BT25S(十万分之一,线性误差 $a \leq \pm 0.05$ mg, Sartorius, GER)。

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)、甘草酸(批号 150407)、6-姜酚(批号 140921)、6-姜烯酚(批号 140826)、8-姜酚(批号 141015)对照品均购自成都普菲德生物技术有限公司,纯度均 $\geq 98\%$ 。乙腈为色谱纯(Fisher, USA),水为哇哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。

炙甘草、干姜购自安国市万联中药饮片有限公司,经北京中医药大学张贵君教授鉴定分别为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 干燥根和根茎的蜜炙品,姜科植物 *Zingiber officinale* Rosc. 的干燥根茎。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱 Hypersil Gold-C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相(A)0.1%磷酸水溶液-(B)乙腈,梯度洗脱(0~5 min,5%~15% B;5~10 min,15%~22% B;10~15 min,22%~26% B;15~30 min,26%~28% B;30~32 min,28%~55% B;32~35 min,55%~60% B;35~40 min,60%~63% B;40~45 min,63%~65% B),流速0.6 mL/min,柱温30℃,进样量20 μL。检测波长235 nm(甘草苷、甘草素),254 nm(甘草酸),280 nm(6-姜酚、6-姜烯酚、8-姜酚),370 nm(异甘草苷、异甘草素)。见图1。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取8种对照品,分别置10 mL容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,作为对照品溶液。8种对照品溶液的浓度分别为甘草苷0.92 mg/mL,异甘草苷1.04 mg/mL,甘草素0.98 mg/mL,甘草酸1.50 mg/mL,异甘草素1.38 mg/mL,6-姜酚0.82 mg/

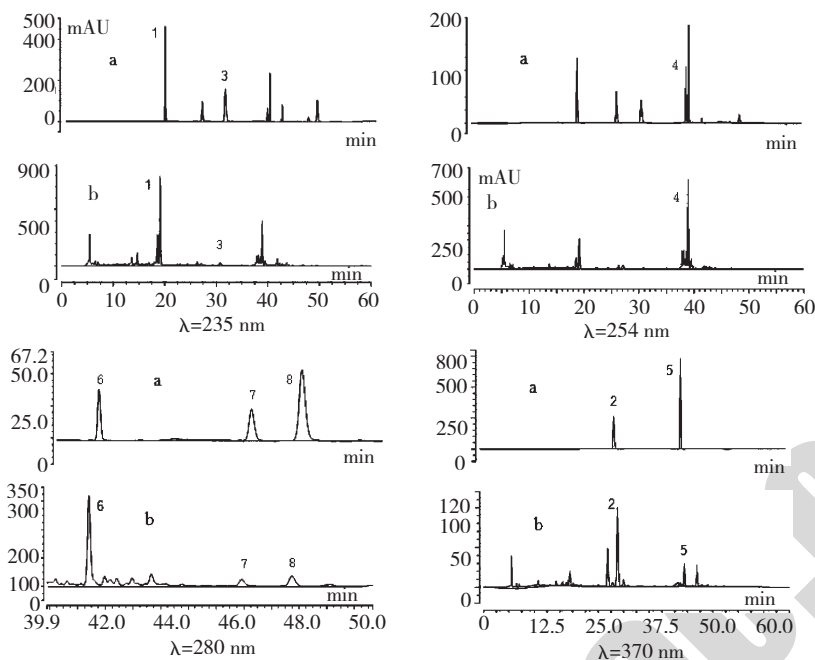


图1 对照品(a)及甘草干姜汤(b)在不同波长下的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of standard mixture(a) and GGT sample(b)

注:1. 甘草苷;2. 异甘草苷;3. 甘草素;4. 甘草酸;5. 异甘草素;6. 6-姜酚;7. 8-姜酚;8. 6-姜烯酚

Note: 1. liquiritin; 2. isoliquiritin; 3. liquiritigenin; 4. glycyrrhizic acid; 5. isoliquiritigenin; 6. 6-gingerol; 7. 8-gingerol; 8. 6-shogaol

mL, 6-姜烯酚 0.74 mg/mL, 8-姜酚 0.86 mg/mL。

2.3 供试品溶液及阴性样品溶液的制备

按表1 配伍称取各味药材,加10倍量水,浸泡30 min,煎煮30 min,滤过,残渣加10倍量水,水沸后再煎30 min,趁热过滤,合并两次滤液,浓缩1/2

体积(共制备3批)。取浓缩液3 mL至10 mL容量瓶中,甲醇稀释至刻度,转移至离心管中10000 rpm离心5 min,取上清液即为供试品。进样前用0.22 μm滤膜过滤。同法制备缺少甘草和缺少干姜的阴性样品溶液。

表1 供试品配伍及来源

Table 1 The compatibility and source of testing samples

来源 Reference	配伍与剂量 Compatibility and dosage	主治病症 Symptoms
《伤寒论》(样品I)	炙甘草-干姜 12 g:6 g	伤寒挟虚误汗引发的上焦阳虚
《金匮要略》(样品II)	炙甘草-炮干姜 12 g:6 g	肺痿咳吐涎沫
《仁斋直指方论》(样品III)	炙甘草-炮干姜 9 g:9 g	男女诸虚出血,胃寒不能引气归原

2.4 线性关系考察

精密吸取不同浓度各对照品溶液分别进样,按色谱条件测定各成分的峰面积。以峰面积积分为

纵坐标(Y),对照品进样量(μg)为纵坐标(X),绘制标准曲线,结果8个成分均成良好的线性关系(表2)。

表2 各组分的回归方程、相关系数和线性范围

Table 2 The regression equation, correlation coefficient and linear range of each component

对照品 Standard	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient(r^2)	线性范围 Linear range(μg/mL)
甘草苷 Liquiritin	$y = 0.2557x - 0.5111$	0.9998	18.5000 ~ 296.0000
异甘草苷 Isoliquiritin	$y = 1.6975x - 2.2464$	0.9999	7.9688 ~ 127.5000
甘草素 Liquiritigenin	$y = 1.3507x - 1.1905$	0.9997	5.0625 ~ 81.0000

对照品 Standard	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient (r^2)	线性范围 Linear range ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
甘草酸 Glycyrrhizic acid	$y = 0.2929x - 3.2464$	0.9998	69.3750 ~ 1110.0000
异甘草素 Isoliquiritigenin	$y = 2.8843x - 0.2564$	0.9997	0.9625 ~ 77.0000
6-姜酚 6-Gingerol	$y = 0.2292x - 0.6900$	0.9995	10.6250 ~ 170.0000
8-姜酚 8-Gingerol	$y = 0.2742x - 0.6137$	0.9997	5.4375 ~ 87.0000
6-姜烯酚 6-Shogaol	$y = 2.4176x - 0.6731$	0.9996	0.7500 ~ 96.0000

2.5 精密度实验

取同一供试品溶液(样品 I),按确定的色谱条件,连续进样 6 次,测定并计算甘草苷、异甘草苷、甘草素、甘草酸、异甘草素、6-姜酚、8-姜酚、6-姜烯酚 8 个药效组分峰面积的 RSD 值,结果分别为 0.88%、1.02%、1.73%、0.99%、1.67%、1.58%、1.29%、1.42%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性实验

取同一供试品溶液(样品 I),按确定的色谱条件,分别于配制后 0、4、8、10、12、24 h 进样,测定并计算甘草苷、异甘草苷、甘草素、甘草酸、异甘草素、6-姜酚、8-姜酚、6-姜烯酚 8 个药效组分峰面积的 RSD 值,结果分别为 0.51%、0.79%、1.32%、0.33%、0.95%、1.32%、1.46%、0.72%,表明 24 h 内供试品溶液稳定性良好。

2.7 重复性实验

取炙甘草:干姜(12 g ~ 6 g)配伍药材,平行制备 6 份供试品溶液,按确定的色谱条件测定并计算

甘草苷、异甘草苷、甘草素、甘草酸、异甘草素、6-姜酚、8-姜酚、6-姜烯酚 8 个药效组分峰面积的 RSD 值,结果分别为 1.02%、0.79%、1.32%、1.13%、0.95%、1.87%、1.46%、0.92%,表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率实验

精密吸取已知含量的样品 I 水煎液 1 mL,平行 6 份,分别精密加入等量对照品溶液,制备成供试品溶液,按确定的色谱条件进样,甘草苷、异甘草苷、甘草素、甘草酸、异甘草素、6-姜酚、8-姜酚、6-姜烯酚 8 个组分的平均回收率依次为 99.89%、101.67%、98.93%、100.87%、101.26%、99.94%、100.74%、98.75%,RSD 值分别为 1.58%、1.28%、1.33%、0.97%、2.17%、1.45%、1.76%、2.83%。

2.9 药效组分含量测定

3 种不同配伍的甘草干姜汤分别制备 3 批供试品,每批供试品连续进样 3 次,测定峰面积,根据外标法计算各组分含量,结果见表 3。

表 3 甘草干姜汤中 8 种药效组分的 HPLC 分析

Table 3 Determination results of 8 compounds in Gancao-Ganjiang-Tang by HPLC

药效组分 Compounds	浓度 Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)					
	样品 I Sample I		样品 II Sample II		样品 III Sample III	
	含量 Contents	比例 Ratio	含量 Contents	比例 Ratio	含量 Contents	比例 Ratio
甘草苷 Liquiritin	175.68	88	243.14	77	151.42	180
异甘草苷 Isoliquiritin	20.23	10	29.87	10	17.45	21
甘草素 Liquiritigenin	10.87	5	14.97	5	8.92	11
甘草酸 Glycyrrhizic acid	367.79	184	624.53	199	344.03	410
异甘草素 Isoliquiritigenin	1.99	1	3.29	1	1.52	2
6-姜酚 6-Gingerol	29.48	15	22.42	7	24.21	29
8-姜酚 8-Gingerol	9.93	5	14.97	5	7.17	9
6-姜烯酚 6-Shogaol	4.88	3	3.14	1	0.84	1
药效组分总量 Total content	620.85		956.33		555.56	

3 讨论与结论

中药复方是中医临床治疗疾病的主要形式与手

段,多药配伍,药味在组方中既分工,又合作,既协同,又制约,共同对如表里同病、寒热夹杂、虚中带实等复杂的病症给予全面照顾。其中发挥疗效的是中

药饮片配伍后各有效成分遵循自然规律结合成的个体,即药效组分,这个组分是有机的结合而非随机的搭配,存在着质和量的必然规律。当复方的配伍改变后,其所对应的病症也发生改变,这是由于药效组分的不同。如炙甘草-干姜(12 g~6 g)药效组分为175.68、20.23、10.87、367.79、1.99、29.48、9.93、4.88 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (甘草苷-异甘草苷-甘草素-甘草酸-异甘草素-6-姜酚-8-姜酚-6-姜烯酚),主治病势较重的阳虚厥逆症;炙甘草-炮干姜(12 g~6 g)药效组分为243.14、29.87、14.97、624.53、3.29、22.42、14.97、3.14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (甘草苷-异甘草苷-甘草素-甘草酸-异甘草素-6-姜酚-8-姜酚-6-姜烯酚),主治病势较缓的肺虚寒证;炙甘草-炮干姜(9 g~9 g)药效组分为151.42、17.45、8.92、344.03、1.52、24.21、7.17、0.84 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (甘草苷-异甘草苷-甘草素-甘草酸-异甘草素-6-姜酚-8-姜酚-6-姜烯酚),主治男女诸虚出血,胃寒不能引气归元。

中药复方的配伍实质是药效组分的配伍,与配伍饮片、剂量和剂型有关。药效组分是药效物质也是专属物质,可作为标准物质使用^[6]。同时,中药的质量控制应基于临床疗效,而临床疗效又基于中药药效组分。因此以中药药效组分评价中药复方制剂及中药质量是一种可行且科学的新思路。

本实验以经典方剂甘草干姜汤为研究对象,以能够表述中药本质特征的中药药效组分理论为指导,分析测定了甘草干姜汤中8种药效组分的含量并计算其比例关系,用以作为控制甘草干姜汤质量的指标,摒弃了以一种成分的含量为质量控制指标的传统方式,为全面控制甘草干姜汤的质量提供科学依据,也为建立与疗效相对应且安全、有效、稳定的中药质量评价体系提供一个新方向。

参考文献

- Xiong MQ(熊曼琪). The notes of Treatise on Febrile Diseases(《伤寒论》讲义). Beijing: China Traditional Medicine Press, 2003. 120-122.
- Fan YS(范永升). The notes of Synopsis of Golden Chamber(《金匮要略》讲义). Beijing: China Traditional Medicine Press, 2003. 114-115.
- Yang SY(杨士瀛). Ren-Zhai-Zhi-Zhi-Fang-Lun(《仁斋直指方论》). Fuzhou: Fujian Science and Technology Press, 1989.
- Zhang YP(张燕平). The experiences of exerting Gancao-Ganjiang-Tang. *Chin. J Inf TCM* (中国中医药信息杂志), 2011, 9(18): 62.
- Xie YM(谢咏梅). The useful use of Gancao-Ganjiang-Tang. *World Latest Med Inf* (世界最新医学信息文摘), 2016, 16: 283.
- Zhang GJ(张贵君), Luo R(罗容), Wang YJ(王奕洁). The active components alignment theory and traditional Chinese medicine multi-components theory. *J Chin Med Mater* (中药材), 2007, 30: 125-126.
- Ni YF, Kuai JK, Lu ZF, et al. Glycyrrhizin treatment is associated with attenuation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression. *J Surg Res*, 2011, 165: 29-35.
- Sen S, Roy M, Chakraborti AS. Ameliorative effects of glycyrrhizin on streptozotocin-induced diabetes in rats. *J Pharm Pharmacol*, 2011, 63: 287-296.
- Zhai D, Zhao Y, Chen X, et al. Protective effect of glycyrrhizin, glycyrrhetic acid and matrine on acute cholestasis induced by alpha-naphthyl isothiocyanate in rats. *Planta Med*, 2007, 73: 128-133.
- Friis-Moller A, Chen M, Fursted K, et al. *In vitro* antimicrobial and antilegionella activity of licochalcone a from chinese licorice roots. *Planta Med*, 2002, 68: 416-419.
- Haraguchi H, Yoshida N, Ishikawa H, et al. Protection of mitochondrial functions against oxidative stresses by isoflavan from *Glycyrrhiza glabra*. *Am J Clin Nutr*, 2000, 52: 219-223.
- Yoon G, Kang BY, and Cheon SH. Topoisomerase inhibition and cytotoxicity of licochalcones A and E from *Glycyrrhiza inflata*. *Arch Pharmacol Res*, 2007, 30: 313-316.
- Wang Y, Xie S, Liu C, et al. Inhibitory effect of liquiritigenin on migration via downregulation proMMP-2 and PI3K/Akt signaling pathway in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Nutr Cancer*, 2012, 64: 627-634.
- Xie SR, Wang Y, Liu CW, et al. Liquiritigenin inhibits serum-induced HIF-1 α and VEGF expression via the AKT/mTOR-p70S6K signaling pathway in HeLa cells. *Phytother Res*, 2012, 26: 1133-1141.
- Zhu GW, Zhang GJ, Wang M, et al. Simultaneous determination of nine active compounds of the traditional Chinese medicinal Prescription Shaoyao-Gancao-Tang and analysis of the relationship between therapeutical effect and compatibility of medicines. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014: 521038.
- Chrubasik S, Pittler MH, Roufogalis BD. *Zingiberis rhizoma*: A comprehensive review on the ginger effect and efficacy profiles. *Phytomedicine*, 2005, 12: 684-701.