

## 中药研究

## 煎煮时间对栀子柏皮汤药效组分的影响

王佳琳<sup>1</sup> 张贵君<sup>1</sup> 郭亚芳<sup>1</sup> 彭 慧<sup>2</sup> 孙启玉<sup>2</sup> 刘 亮<sup>2</sup> 王 月<sup>1</sup> 刘傲雪<sup>1</sup>

(1 北京中医药大学中药学院, 北京, 102488; 2 淄博万杰中医药研究所, 淄博, 255213)

**摘要** 目的:研究煎煮时间对栀子柏皮汤药效组分的影响,为栀子柏皮汤的质量控制与临床实际应用提供理论依据。方法:采用高效液相色谱-二极管阵列检测器(HPLC-DAD)法同时测定不同煎煮时间(10, 20, 30, 40, 50, 60 min)栀子柏皮汤药效组分栀子苷-京尼平龙胆双糖苷-木兰花碱-甘草苷( $\lambda = 238$  nm)、盐酸小檗碱-盐酸巴马汀-甘草酸( $\lambda = 265$  nm)、异甘草苷( $\lambda = 360$  nm)、西红花苷 I -西红花苷 II ( $\lambda = 440$  nm)的含量。结果:当煎煮时间改变时,各成分的变化趋势不尽相同;栀子、黄柏、炙甘草药效组分及药效组分总量不同煎煮时间下变化显著,栀子、黄柏、炙甘草药效组分以及药效组分总量在10~20 min均有大幅度上升,20 min后出现不同程度的减少后含量增加,最终含量与20 min时大致相近。结论:不同煎煮时间影响栀子柏皮汤药效组分的溶出,从而影响疗效;当煎煮时间为20 min,各组分含量较高,且避免了因受热时间过长对西红花苷类成分的破坏,验证了传统煎煮时间的合理性。

**关键词** 栀子柏皮汤;栀子苷;盐酸小檗碱;甘草酸;煎煮时间;药效组分;HPLC-DAD 多波长切换法;含量测定

## Effect of Decocting Time on the Active Components of Zhizi Baipei Decoction

Wang Jialin<sup>1</sup>, Zhang Guijun<sup>1</sup>, Guo Yafang<sup>1</sup>, Peng Hui<sup>2</sup>, Sun Qiyu<sup>2</sup>, Liu Liang<sup>2</sup>, Wang Yue<sup>1</sup>, Liu Aoxue<sup>1</sup>

(1 School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China;

2 Zibo Wanjie Institute of Chinese Medicine, Zibo 255213, Beijing)

**Abstract Objective:** To study the effect of decocting time on the active components of Zhizi Baipei decoction, and provide the scientific basis for quality control and clinical application of Zhizi Baipei decoction. **Methods:** HPLC-DAD was employed to determine the content of geniposide-genipin, gentiobioside-magnoflorine-liquiritin ( $\lambda = 238$  nm), glycyrrhizic acid-berberine hydrochloride-palmatine hydrochloride ( $\lambda = 265$  nm), isiquiritin ( $\lambda = 360$  nm), crocin I -crocin II ( $\lambda = 440$  nm) in Zhizi Baipei decoction at various decocting time. **Results:** When the decocting time changes, each ingredient has different variation trend; Fructus gardeniae, Phellodendron amurense, Glycyrrhiza uralensis and the total active components have significant difference; Fructus gardeniae, Phellodendron amurense, Glycyrrhiza uralensis and the total active components have significant rise during 10~20 min, then decrease in certain extent and increase later. The final content approach the content at 20 min. **Conclusion:** Different decocting time changed the active components of Zhizi Baipei decoction, thus changed its efficacy; when the decocting time for 20 min, each active component has higher content and it avoids the destruction of crocin by long time heat, which proved the rationality of traditional decocting time.

**Key Words** Zhizi Baipei Decoction; Geniposide; Berberine hydrochloride; Glycyrrhizinate; Decocting time; Active components alignment; HPLC-DAD with changing; Determination of content

中图分类号:R283 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.09.050

汤剂煎煮时间的长短是影响其质量的重要因素<sup>[1]</sup>。一般认为,复方的煎煮时间由其药味组成特点和疗效决定,如含质地坚硬的矿石类方剂、滋补类方剂的煎煮时间宜长,而解表剂、清热剂的煎煮时间宜短,应控制在20 min以内<sup>[2]</sup>。栀子柏皮汤始载于汉代张仲景《伤寒论》,由栀子、黄柏、炙甘草三味药组成,有清热利湿之功效,是治疗湿热黄疸的经典方

剂<sup>[3,4]</sup>。有研究根据《伤寒论》中药量、加水量、煮取量等记载,推算其传统煎煮时间20 min左右<sup>[2]</sup>,但对其物质基础的解释未见报道。

目前对汤剂煎煮时间的研究多停留于单味药,且往往局限于少数几种成分或某类成分,忽略了中药复方的复杂性和整体性。中药药效组分理论认为,复方的疗效是由一组具有相关药理作用的有效

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:王佳琳(1993.10—),女,硕士,研究方向:中药药效组分及药效组分质量评价体系, E-mail:1334779940@qq.com

通信作者:张贵君(1954.09—),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, E-mail:guijunzhang@163.com

成分按一定含量及比例(即药效组分)决定的,复方的药效组分应与其功效相对应,并溶于水,符合汤剂的制备特点<sup>[5-7]</sup>。故筛选栀子中具利胆作用<sup>[8-10]</sup>的栀子苷、京尼平龙胆双糖苷、西红花苷Ⅰ、西红花苷Ⅱ,黄柏中具抑菌抗炎作用<sup>[11-14]</sup>的盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、木兰花碱,甘草中具利胆、抗炎抗病毒等作用<sup>[15-17]</sup>的甘草苷、异甘草苷、甘草酸,共 10 种成分作为与栀子柏皮汤清热利湿功效对应的药效组分,通过研究煎煮时间对栀子柏皮汤药效组分的影响,探讨煎煮时间与中药疗效的相关性,解释传统煎煮时间的合理性,为栀子柏皮汤的质量控制与临床应用提供理论依据。

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 试剂 甲醇、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);哇哈哈饮用纯净水(杭州哇哈哈集团有限公司)。

1.3 分析样品 栀子苷(批号 151204)、京尼平龙胆双糖苷(批号 16072002)、西红花苷Ⅰ(批号 151116)、西红花苷Ⅱ(批号 16051805)、木兰花碱(批号 151029)、盐酸巴马汀(批号 151120)、甘草苷(批号 141029)、异甘草苷(批号 150714)、甘草酸(批号 150407),以上对照品购自成都普菲德生物技术有限公司,纯度均≥98%;盐酸小檗碱(批号 110713-201212,纯度≥98%)购自中国食品药品检定研究所。栀子、黄柏、炙甘草购自河北省安国市万联中药饮片有限公司,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茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis. 的干燥成熟果实;芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮;豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎的蜜炙品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Synchronis C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)—0.2% 磷酸(B);梯度洗脱:0~20 min,12%~20% A;20~40 min,20%~23% A;40~70 min,23%~25% A;70~100 min,25%~55% A;100~105 min,55%~12% A;流速 0.8 mL/min;柱温 30 ℃;进样量 5 μL;检测波长 238 nm(栀子苷、京尼平龙胆双糖苷、木兰花碱、甘草苷);265 nm(盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、甘草酸);

360 nm(异甘草苷);440 nm(西红花苷Ⅰ、西红花苷Ⅱ)。在上述色谱条件下,样品中 10 种成分的保留时间与对照品一致,10 种成分的色谱峰均能达到较好的分离,且样品其他成分对欲测成分的测定无干扰。色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取栀子苷、京尼平龙胆双糖苷、西红花苷Ⅰ、西红花苷Ⅱ、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、木兰花碱、甘草酸、甘草苷、异甘草苷适量,加 70% 甲醇溶解制成质量浓度分别为 16.2、25、24、18、32.5、26.5、17、33、28.5、13 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取栀子 10 g、黄柏 6 g、炙甘草 3 g,共 6 份,分别加 10 倍量水,浸泡 30 min,先用武火加热至沸后,以文火分别煎煮 10、20、30、40、50、60 min,共煎 2 次,合并滤液,浓缩至 0.1 g/mL。精密量取 3 mL 滤液至 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,离心 5 min,上清液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。按上述操作平行制备三批样品,并制备缺栀子、缺黄柏、缺甘草的阴性样品溶液。

2.4 专属性试验 将各阴性溶液注入高效液相色谱仪,结果在与对照品色谱峰相应的位置无色谱峰,说明其他药味不影响测定,色谱图见图 1。

2.5 线性关系考察 精密称取京尼平龙胆双糖苷、甘草苷、西红花苷Ⅰ、木兰花碱、甘草酸、异甘草苷、西红花苷Ⅱ、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀适量,加 70% 甲醇制成质量浓度分别为 376、207.5、180、165、198、24、19.6、78、47.7 μg/mL 的混合对照品溶液;另精密称取栀子苷适量,加 70% 甲醇制成浓度为 1.49 mg/mL 的栀子苷对照品溶液;分别精密量取混合对照品溶液及栀子苷对照品溶液 4、2、1、0.5、0.25 mL 于 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,进样 5 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,线性范围及相关系数见表 1。

表 1 10 个药效组分的标准曲线方程、相关系数和线性范围

| 成分       | 回归方程               | r       | 线性范围(μg)      |
|----------|--------------------|---------|---------------|
| 栀子苷      | Y = 30.03X + 1.145 | 0.999 4 | 0.373 ~ 5.960 |
| 京尼平龙胆双糖苷 | Y = 16.66X - 0.203 | 0.999 5 | 0.094 ~ 1.504 |
| 西红花苷Ⅰ    | Y = 123.0X - 1.002 | 0.999 2 | 0.045 ~ 0.720 |
| 西红花苷Ⅱ    | Y = 145.1X - 0.004 | 0.999 6 | 0.005 ~ 0.080 |
| 木兰花碱     | Y = 65.40X - 0.086 | 0.999 9 | 0.041 ~ 0.656 |
| 盐酸小檗碱    | Y = 82.70X - 0.016 | 0.999 2 | 0.020 ~ 0.320 |
| 盐酸巴马汀    | Y = 84.42X - 0.121 | 0.999 8 | 0.012 ~ 0.192 |
| 甘草酸      | Y = 10.82X - 0.471 | 0.999 6 | 0.050 ~ 0.800 |
| 甘草苷      | Y = 39.36X - 0.232 | 0.999 3 | 0.052 ~ 0.832 |
| 异甘草苷     | Y = 91.03X + 0.015 | 0.999 2 | 0.006 ~ 0.096 |

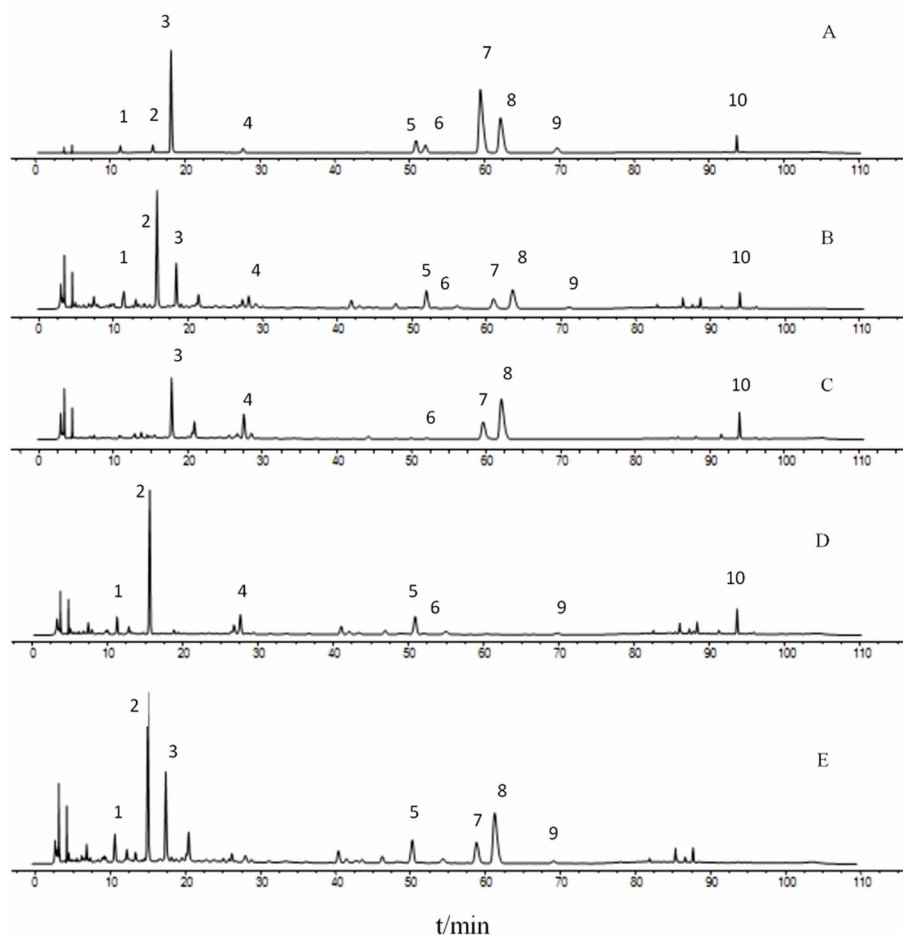


图1 (A)对照品,(B)栀子柏皮汤,(C)缺栀子阴性样品,(D)缺黄柏阴性样品,(E)缺甘草阴性样品的HPLC图谱

注:1. 栀子苷,2. 京尼平龙胆双糖苷,3. 木兰花碱,4. 甘草苷,5. 西红花苷I,6. 异甘草苷,7. 盐酸巴马汀,8. 盐酸小檗碱,9. 西红花苷II,10. 甘草酸

**2.6 中间精密度试验** 精密吸取混合对照品溶液 5  $\mu\text{L}$ ,连续进样六次,测定并计算栀子苷、京尼平龙胆双糖苷、西红花苷 I、西红花苷 II、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、木兰花碱、甘草酸、甘草苷、异甘草苷峰面积的 *RSD* 值,结果分别为 0.23%、0.15%、0.3%、0.21%、0.13%、0.25%、0.18%、0.24%、0.14%、0.16%。

**2.7 供试品溶液稳定性试验** 精密吸取煎煮时间为 20 min 的供试品溶液,分别在制备后 0,2,4,8,12,24 h 进样,测定并计算测定并计算栀子苷、京尼平龙胆双糖苷、西红花苷 I、西红花苷 II、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、木兰花碱、甘草酸、甘草苷、异甘草苷峰面积的 *RSD* 值,结果分别为 0.33%、0.52%、0.47%、0.94%、1.17%、0.75%、1.06%、0.24%、1.63%、1.44%。

**2.8 重复性试验** 精密称取栀子 10 g、黄柏 6 g、甘草 3 g,按 2.3 项下方法制备 6 份煎煮时间为 20 min 的供试品溶液,分别进样 5  $\mu\text{L}$ ,测定并计算栀子苷、京尼平龙胆双糖苷、西红花苷 I、西红花苷 II、盐酸

小檗碱、盐酸巴马汀、木兰花碱、甘草酸、甘草苷、异甘草苷峰面积的 *RSD* 值,结果分别为 1.03%、1.18%、1.24%、0.93%、1.21%、1.58%、1.37%、0.84%、1.73%、0.87%。

**2.9 回收率试验** 精密吸取已知各成分含量的煎煮时间为 20 min 的供试品溶液 3 mL,平行 6 份,分别精密加入等量混合对照品溶液,制备成供试品溶液,按照色谱条件进样,结果栀子苷、京尼平龙胆双糖苷、西红花苷 I、西红花苷 II、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、木兰花碱、甘草酸、甘草苷、异甘草苷的平均回收率分别为 98.61%、97.77%、98.44%、97.05%、96.53%、96.99%、96.96%、97.78%、100.25%、98.69%,*RSD* 分别为 2.26%、1.16%、1.85%、1.43%、1.07%、1.18%、1.63%、1.83%、1.84%、3.29%。

**2.10 样品测定结果** 将不同煎煮时间的栀子柏皮汤分别按 2.3 项下方法平行制备 3 份供试品溶液,每份供试品连续进样测定 3 次,5  $\mu\text{L}$ /次,根据标准曲线计算 10 种成分含量,各成分及组分的变化趋势见图 2。

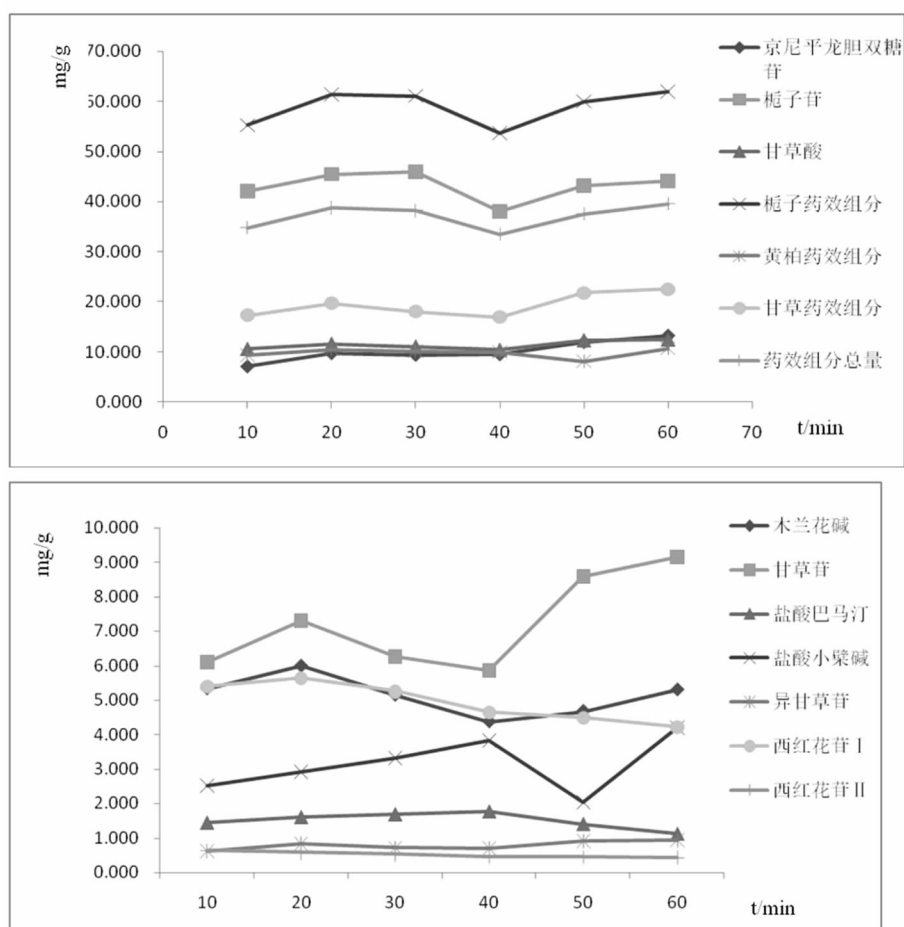


图2 不同煎煮时间各成分及组分的变化趋势

### 3 讨论

3.1 栀子柏皮汤药效组分分析方法的筛选 分别应用乙腈-0.2% 磷酸水溶液、乙腈-0.1% 磷酸水溶液、乙腈-0.05% 磷酸水溶液, 流速 1、0.8、0.6 mL/min, 柱温 30、35、40 °C, 进样量 5、10、20  $\mu$ L 比较研究上述条件下的分离结果。结果显示, 乙腈-0.2% 磷酸水溶液、流速 0.8 mL/min、柱温 30 °C、进样量 5  $\mu$ L 条件下, 分离效果最好。

3.2 煎煮时间对栀子柏皮汤药效组分的影响 中药的煎煮过程中, 各组分间会随着煎煮时间的变化产生不同类型的复杂化学反应, 一个时间点不可能保证所有药物有效成分的煎出或不被破坏<sup>[18]</sup>。从本实验结果看, 随着煎煮时间的延长, 各药效组分的变化趋势不尽相同。多数化学结构稳定、受热不易分解的组分随煎煮时间的延长而增加; 部分组分如栀子苷、木兰花碱当某一时间达到一定含量后趋于平稳; 少数组分如西红花苷类由于化学结构不稳定, 达到一定量后继续加热含量降低。因此, 在考察复方的煎煮时间时应选择体现复方整体性的药效组分作为考察指标, 以一类成分或少数几种成分为指标

是不够全面的。

栀子、黄柏、炙甘草药效组分以及药效组分总量均在 10~20 min 有大幅度上升, 20 min 后出现不同程度的减少后含量增加, 最终含量与 20 min 时大致相近。煎煮时间由 10 min 增至 60 min, 栀子药效组分含量 60>20>30>50>10>40, 黄柏药效组分含量 60>20>30>40>10>50, 甘草药效组分含量 60>50>20>30>10>40, 药效组分总量 60>20>30>50>10>40, 药效组分总量与君药栀子的变化情况相同, 可见泻三焦实火的君药栀子在本方中的重要性; 当煎煮时间为 20 min, 各组分含量较高, 且避免了因受热时间过长对西红花苷类成分的破坏, 验证了传统煎煮时间的合理性。

栀子、黄柏、炙甘草药效组分及药效组分总量不同煎煮时间发生显著变化, 说明中药的功效发生了变化。因此, 在实际操作过程中, 应严格规范汤剂的煎煮时间, 切不可随意改变, 否则不但影响疗效, 还有可能产生不良反应。

总之, 在中医药理论和中药药效组分理论的指

(下接第 2307 页)

统汤剂的问题时,应该结合药效学从复方整体分析评价配方颗粒剂与传统汤剂的优劣<sup>[15-18]</sup>;具体差异的化学成分和药效比较,本研究并未展开,后续可配合质谱、红外光谱等进行深入研究。

### 参考文献

- [1] 续畅,钟萌,马致洁,等. 葛根芩连汤的现代研究进展[J]. 吉林中医药,2015,35(6):629-632.
- [2] 徐蓓蕾,张贵君,崔向微,等. 葛根芩连汤药效组分抑菌生物效价测定[J]. 中华中医药杂志,2013,33(1):230-233.
- [3] 胡耶芳,颜剑. 麻黄汤配方颗粒剂与传统汤剂的疗效比较研究[J]. 实用药物与临床,2017,20(12):1365-1367.
- [4] 张志勇,夏定兵,李伟. 临床应用中药配方颗粒的优劣分析[J]. 湖北中医杂志,2011,33(8):75-76.
- [5] 殷佳,潘晔,蔡雪朦,等. 中药传统汤剂、浸膏剂和配方颗粒剂的比较[J]. 中草药,2017,48(18):3871-3875.
- [6] 艾广凤. 中药复方合煎与分煎的差异性研究进展[J]. 中国卫生产业,2013(24):170-171.
- [7] 杨金团,沈国平. 对中药饮片颗粒剂的应用分析与建议[J]. 中国药业,2003,12(3):66.
- [8] 陈彬,赵爱光. 中药汤剂及主要新剂型的研究现状[J]. 世界中医药,2014,9(3):396-399.

- [9] 邓轶渊,高文远,陈海霞,等. 中药复方合煎与分煎的差异性研究进展[J]. 中草药,2005,36(12):1909-1911.
- [10] 石维,魏飞,魏睦新. 中药药对半夏生姜分煎、合煎 HPLC 组分分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(3):4-5.
- [11] 梁光义,曹佩雪,徐必学,等. HPLC 测定葛根芩连汤不同煎液中葛根素的含量[J]. 华西药学杂志,2001,16(5):371-373.
- [12] 史万忠,徐德生,刘力,等. 补肾方分煎和合煎提取物的指纹图谱比较[J]. 中成药,2004,26(1):9-11.
- [13] 章军,刘宇政,王跃生,等. HPLC 同时测定葛根芩连汤中 12 个有效成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(15):58-62.
- [14] 张启云,徐良辉,李冰涛,等. HPLC 法同时测定葛根芩连汤中 8 种有效成分的含量[J]. 药物分析杂志,2011,31(7):1425-1429.
- [15] 刘培勋. 中药汤剂制备过程中的化学变化[J]. 中国药房,2000(2):47-48.
- [16] 李艳敏,范颖. 药物的合煎与分煎对方剂治疗作用的影响[J]. 现代中医药,2013,33(5):103-105.
- [17] 李松林,宋景政,徐宏喜. 中药配方颗粒研究浅析[J]. 中草药,2009,40(S1):1-7.
- [18] 黄建平,胡恩. 对免煎中药颗粒临床应用存在问题的探讨[J]. 海峡药学,2008,20(10):207-208.

(2018-05-07 收稿 责任编辑:张雄杰)

(上接第 2303 页)

导下,以经典方剂为研究对象,研究煎煮时间对药效组分的影响,对汤剂的质量控制和临床应用具有重大意义。

### 参考文献

- [1] 梁锦芬. 中药汤剂疗效的影响因素探讨[J]. 临床合理用药杂志,2016,9(4):179-181.
- [2] 王竹兰,肖相如.《伤寒论》中汤剂的煎煮工艺研究[J]. 辽宁中医杂志,2010,37(5):906-908.
- [3] 边艳琴,刘平,孙明瑜. 基于方证相关理论解析肝硬化湿热内蕴病机[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2016,18(9):1477-1482.
- [4] 肖旭,朱继孝,罗光明,等. 栀子柏皮汤及其拆方保肝利胆作用实验研究[J]. 中药材,2013,36(7):1132-1135.
- [5] 罗容,张贵君. 中药药效组分的理论与实践(一)[J]. 天津中医药,2013,30(12):759-760.
- [6] 朱广伟,张贵君,汪萌. 配伍组分、配伍比例对芍药甘草汤抗炎镇痛作用的影响[J]. 药学与临床研究,2014,22(4):323-325.
- [7] 朱广伟,张贵君,王晶娟,等. 单因素配伍剂量对经方芍药甘草汤药效组分的影响[J]. 实用药物与临床,2015,18(2):168-173.
- [8] 王国富. 栀子的化学成份及其药理活性[J]. 广东化工,2016,43(20):141-142,132.
- [9] 王亭. 中药栀子有效成分及药理作用的研究进展[J]. 中国药师,

2015,18(10):1782-1784.

- [10] 兰天,曾志,陈颖华. 栀子苷改善  $\text{CCl}_4$  引起的小鼠肝纤维化损伤的实验研究[J]. 第三军医大学学报,2013,35(16):1752-1755.
- [11] 张博,张婷,王树春. 黄柏的化学成分、质量分析方法及药理作用研究[J]. 现代医药卫生,2013,29(10):1505-1507.
- [12] 孙森凤,张颖颖,褚万春. 黄柏药理作用的研究进展[J]. 山东化工,2017,46(14):99-100.
- [13] 陈兴文. 黄柏的化学成分分析和药理作用研究[J]. 内蒙古中医药,2014,33(31):69-69.
- [14] 姚必瑜,黄智铭. 黄连素对四氯化碳诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国现代应用药学,2016,33(4):424-427.
- [15] 茆玲,冯彩云,刘学燕. 甘草酸制剂治疗病毒性肝炎疗效观察[J]. 湖北中医药大学学报,2016,18(1):67-69.
- [16] 戴应和,龙小琴,张娟,等. 甘草黄酮的抗炎作用及其机制的研究进展[J]. 江西中医药,2017,48(2):68-71.
- [17] 王茅,徐祉君,郑文博. 甘草的临床运用浅析[J]. 光明中医,2017,32(11):1669-1671.
- [18] 卢芳国,张世鹰,吴治谚,等. 中药煎煮的容器、溶媒、时间、火候因素[J]. 中医杂志,2016,57(1):78-80.

(2017-07-03 收稿 责任编辑:杨觉雄)