

白芍-甘草药对不同配伍比例提取物中有效成分溶出规律的研究

李 妍, 杨燕云, 张振秋*, 谢剑琳, 王 美

辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600

摘要: **目的** 通过建立 RP-HPLC 法测定白芍-甘草药对中 12 种有效成分, 并用此方法探讨有效成分随白芍-甘草配比变化的溶出规律。**方法** 采用 Dikma Technologies-C₁₈ 色谱柱 (200 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 (A)-0.1%磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱: 0~5 min, 5%~10% A; 5~10 min, 10%~12% A; 10~15 min, 12%~14% A; 15~20 min, 14%~16% A; 20~25 min, 16%~18% A; 25~30 min, 18%~20% A; 30~40 min, 20%~25% A; 40~50 min, 25%~40% A; 50~62 min, 40%~55% A; 62~72 min, 55%~70% A; 72~85 min, 70%~55% A; 85~95 min, 55%~5% A, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长为 267 nm (0~13 min)、258 nm (13~17 min)、230 nm (17~27 min)、276 nm (27~32 min)、230 nm (32~42 min)、360 nm (42~46 min)、276 nm (46~50 min)、230 nm (50~53 min)、275 nm (53~55 min)、250 nm (55~90 min), 柱温 30 °C。**结果** 在所观察的的 9 个配伍比例 (0:1、0.3:1、0.6:1、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、1:0) 中 (白芍-炙甘草), 以 1:1、3:1 组有效成分溶出量最高, 另外 0.6:1 组也较高。**结论** 以现代研究方法证实了张仲景《伤寒论》芍药汤中配伍比例 1:1 的科学性, 也进一步从有效成分上证实了现代临床经典比例 3:1 配伍的合理性。

关键词: 白芍-甘草药对; 溶出规律; HPLC; 波长切换

中图分类号: R283.1; R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)04-0000-00

The research about the effective component dissolution rule in the extraction of white peony root and processed licorice with different compatibility proportion

LI Yan, YANG Yan-yun, ZHANG Zhen-qi, XIE Jian-lin, WANG Mei

Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

Abstract: Objective Through the establishment of the reverse HPLC method for determinating the twelve active ingredients of white peony root and processed licorice, then use this method research the changed dissolution rule of effective composition with the ratio of white peony root and processed licorice. **Methods** The separation was performed on a Dikma Technologies-C₁₈ BDS (200 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with the gradient elution (0→5 min, 5%→10% A; 5→10 min, 10%→12% A; 10→15 min, 12%→14% A; 15→20 min, 14%→16% A; 20→25 min, 16%→18% A; 25→30 min, 18%→20% A; 30→40 min, 20%→25% A; 40→50 min, 25%→40% A; 50→62 min, 40%→55% A; 62→72 min, 55%→70% A; 72→85 min, 70%→55% A; 85→95 min, 55%→5% A) of acetonitrile-water of 0.1% phosphoric acid at the flow rate of 1.0 mL/min. Detection wavelength was 267 nm (0~13 min), 258 nm (13~17 min), 230 nm (17~27 min), 276 nm (27~32 min), 230 nm (32~42 min), 360 nm (42~46 min), 276 nm (46~50 min), 230 nm (50~53 min), 275 nm (53~55 min), 250 nm (55~59 min), 230 nm (59~70 min), 250 nm (70~95 min), The column temperature was set at 30 °C. **Results** In the observed nine compatibility proportions (white peony root-processed licorice), in 1:1 and 3:1 groups the effective component dissolution amount is the highest, another 0.6:1 group has also higher. **Conclusion** use modern research method proved the scientificity of ZHANG Zhong-jing 'Treatise on Exogenous Febrile Diseases' the decoction of white peony root and licorice compatibility proportion 1:1, also further confirmed the rationality of the modern classical clinical 3:1 ratio from effective components degree.

Key words: the white peony root and processed licorice; dissolution law; HPLC; switching wavelengths

中药复方配伍是中医药文化的精髓, 白芍常与 如小建中汤、桂枝汤、真人养脏汤等。其中以张仲景《伤寒论》芍药汤为代表, 方中药虽两味, 但结

收稿日期: 2012-06-28

基金项目: 辽宁省教育厅课题“中药材品质评价体系研究”(2008S145)

作者简介: 李 妍 (1987—), 女, 辽宁葫芦岛人, 硕士研究生, 研究方向为药物分析。

Tel: (0411)87586110 15698857821 E-mail: 136974196@qq.com

*通讯作者 张振秋 Tel: (0411)87586058 E-mail: zhangzhenqiu@sina.com

构严谨,配伍精当,后世医家极为推崇。大量文献报道显示^[1-5],其主要有效成分为白芍总苷(芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷)、甘草总苷(甘草苷、异甘草苷、芹糖甘草苷、芹糖异甘草苷)、甘草酸、异甘草素等;此外,白芍所含酚类成分(1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖),具有抗病毒、抗肿瘤等药理活性^[6]。

白芍在《伤寒论》中所载白芍-甘草药对的最小配比为0.6:1,张仲景“芍药甘草汤”的配比1:1,现代临床常用配比3:1,以此为基础本实验设计了9个配伍比例,对9个拟定比例(0:1、0.3:1、0.6:1、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、1:0)中上述主要药理活性成分进行了测定。以考察不同比例配伍的白芍-甘草药对中有效成分的溶出规律,建立化学成分与药效间的相关性,为本实验后续的药效学研究提供数据参考。

1 仪器与材料

Agilent—1100型高效液相色谱仪(仪器编号:20041191 DE43607375),配置四元梯度泵、在线脱气机、VWD检测器;AS3120A超声提取器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司);2140型电子分析天平(上海奥豪斯公司)、Mettler AB135—S十万分之一电子天平(瑞士梅特勒-托利多集团公司);U—3010型紫外-可见分光光度计(日立公司)。

对照品:甘草苷(批号111610-200604)购于中国食品药品检定研究院;异甘草素(批号20100603)、苯甲酰芍药苷(批号20100513)均购于天津一方科技有限公司;芹糖基异甘草苷(批号20101108)、异甘草苷(批号20100915)均购于上海永恒生物科技有限公司;甘草酸(批号20100730)、芍药苷(批号20100821)均购于上海融禾科技有限公司;甘草次酸(批号20100524)、芍药内酯苷(批号20100325)、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖(批号20100706)均购于深圳美荷生物科技有限公司;苯甲酸(批号20100819)、没食子酸(批号20100924)购于鼎瑞化工有限公司,质量分数均为98%。

本研究所用的白芍饮片、炙甘草饮片均购于河北安国,经辽宁中医药大学李峰教授鉴定分别为芍药科芍药属植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根、豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎的蜜炙品。

乙腈、甲醇为色谱纯(山东禹王化学试剂公司),

水为重蒸馏水,磷酸、氯仿为分析纯。

2 方法与结果

2.1 药对提取物制备

按上述9个比例分别取白芍、炙甘草中粉共计100g,8倍量水煎煮2次,每次60min,滤过,合并滤液浓缩,于70℃减压干燥至恒定质量,即得。

2.2 混合对照品溶液的制备

精密称取11种对照品适量,分别加甲醇制成含没食子酸2.296mg/mL、芍药内酯苷1.705mg/mL、芍药苷1.760mg/mL、甘草苷1.266mg/mL、苯甲酸935.0μg/mL、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖961.0μg/mL、芹糖异甘草苷2.107mg/mL、异甘草苷951.8μg/mL、苯甲酰芍药苷659.0μg/mL、异甘草素489.0μg/mL、甘草次酸936.5μg/mL的单一对照品储备液,备用。依次精密量取上述11种对照品储备液1.00、1.50、4.50、2.50、0.10、0.50、1.50、1.00、1.00、0.10、1.00mL,置同一25mL量瓶中,加入甘草酸对照品粉末10.26mg,加甲醇稀释至刻度,制成含没食子酸91.84μg/mL、芍药内酯苷102.3μg/mL、芍药苷316.8μg/mL、甘草苷126.6μg/mL、苯甲酸3.740μg/mL、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖19.22μg/mL、芹糖异甘草苷126.4μg/mL、异甘草苷38.07μg/mL、苯甲酰芍药苷26.36μg/mL、甘草酸410.4μg/mL、异甘草素1.956μg/mL、甘草次酸37.44μg/mL的混合溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备

取上述9个比例药对提取物各0.1g,精密称定,分别置50mL具塞锥形瓶中,各精密加入水25mL,密塞,称定质量,超声处理(功率250W,频率40kHz)30min,放冷,再称定质量,用水补足损失的质量,摇匀;精密移取续滤液10mL于分液漏斗中,加入乙腈20mL,氯仿20mL,静置分层,将水层全部取出至10mL量瓶中,加水至刻度线,摇匀;0.45μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.4 色谱条件

色谱柱为Dikma Technologies-C₁₈柱(200mm×4.6mm,5μm);流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱:0~5min,5%~10%A;5~10min,10%~12%A;10~15min,12%~14%A;15~20min,14%~16%A;20~25min,16%~18%A;25~30min,18%~20%A;30~40min,20%~25%A;40~50min,25%~40%A;50~62min,40%~55%A;62~72min,55%~70%A;

72~85 min, 70%~55% A; 85~95 min, 55%~5% A, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长为 267 nm (0~13 min)、258 nm (13~17 min)、230 nm (17~27 min)、276 nm (27~42 min)、230 nm (32~42 min)、360 nm (42~46 min)、276 nm (46~50 min)、230

nm (50~53 min)、275 nm (53~55 min)、250 nm (55~95 min); 柱温 30 °C; 进样量 20 μL。在上述色谱条件下进行检测, 以甘草酸计算理论塔板数大于 300 000, 分离度大于 1.5。对照品、样品以及 2 种药材的阴性对照色谱图见图 1。

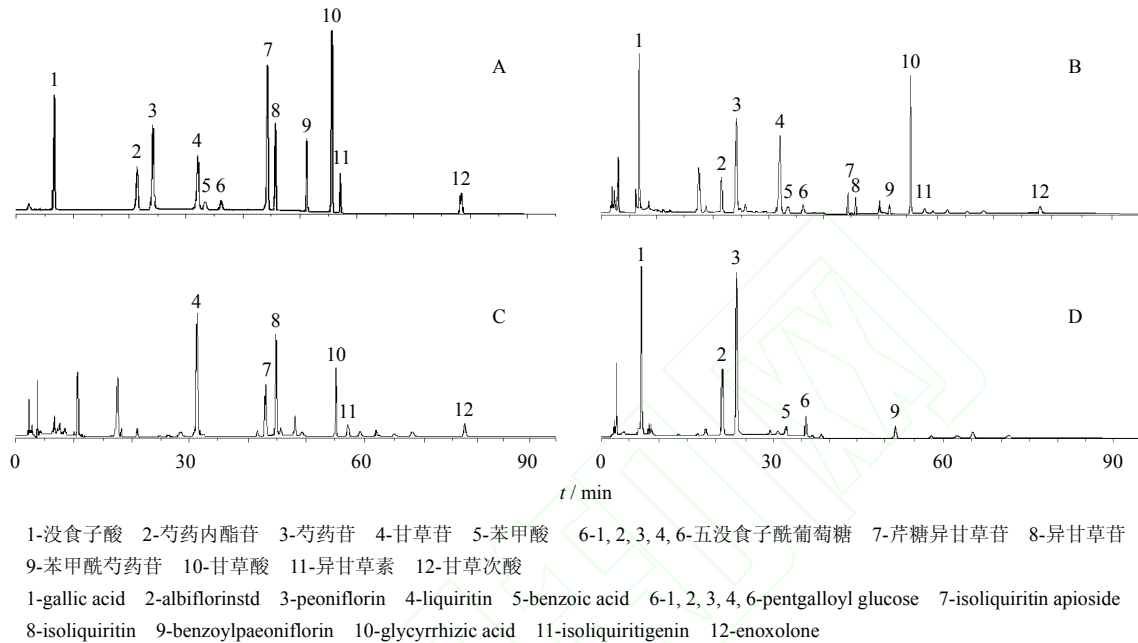


图 1 混合对照品 (A)、样品 (B)、白芍阴性对照液 (C)、炙甘草阴性对照液 (D) 的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference standards (A), sample (B), white peony root negative fluid (C), processed licorice negative fluid (D)

2.4 线性关系考察

分别精密量取上述混合对照品溶液 2、5、10、15、20 μL 注入高效液相色谱仪, 测定。以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程, 结果见表 1。

2.5 方法学考察

本实验按“2.2”项下色谱条件, 以 1:1 药对提取物进行了精密度、重复性、稳定性及加样回收率考察。结果精密度试验中, 色谱峰 1~12 的 RSD 分别为 1.8%、2.0%、2.6%、1.6%、2.7%、1.6%、1.9%、1.4%、2.8%、1.8%、2.0%、1.4% ($n=5$), 表明仪器精密度较好。重复性试验, 成分 1~12 平均质量分数分别为 6.847、8.755、33.82、13.95、0.277 0、1.258、8.005、1.766、2.344、51.40、0.135 4、3.278 mg/g; RSD 分别为 1.5%、2.2%、2.4%、1.2%、2.6%、1.5%、2.1%、1.6%、2.7%、2.0%、1.7%、1.7% ($n=6$), 表明本方法重复性良好。稳定性试验结果表明, 成分 1~12 在 24 h 内稳定, RSD 分别为 1.4%、2.0%、2.6%、1.6%、2.4%、1.7%、1.9%、1.1%、2.3%、1.9%、

表 1 12 个成分的标准曲线方程、相关系数和线性范围

Table 1 Regression equations, correlation coefficients, and linear ranges of twelve compounds

化合物	标准曲线方程	r	线性范围/ng
没食子酸	$Y=1\ 972 X-4.163$	0.999 1	183.7~1 837.0
芍药内酯苷	$Y=4\ 231 X+15.22$	0.999 5	204.6~2 046.0
芍药苷	$Y=601.9 X-4.560$	0.999 6	633.6~6 336.0
甘草苷	$Y=5\ 314 X+3.66$	0.999 9	253.2~2 532.0
苯甲酸	$Y=3\ 091 X+5.374$	0.999 2	7.480~74.80
1, 2, 3, 4, 6-五没食子酰葡萄糖	$Y=1\ 196 X-21.87$	0.999 5	38.44~384.4
芹糖异甘草苷	$Y=2\ 331 X+8.768$	0.999 5	252.8~2 528.0
异甘草苷	$Y=7\ 202 X-5.87$	0.999 0	76.14~761.4
苯甲酰芍药苷	$Y=5\ 655 X+16.09$	0.999 3	52.72~527.2
甘草酸	$Y=339.8 X+5.069$	0.999 4	820.8~8 208.0
异甘草素	$Y=9\ 843 X+24.84$	0.999 5	3.912~39.12
甘草次酸	$Y=2\ 528 X-2.535$	0.999 8	74.88~748.8

1.7%、1.6% ($n=7$)。进行加样回收率试验, 成分 1~12 的平均回收率分别为 93.29%、98.5%、103.4%、

102.7%、94.0%、98.2%、96.4%、96.3%、102.7%、102.6%、96.4%、106.0%；RSD 分别为 1.2%、2.5%、2.0%、1.1%、2.0%、2.3%、1.3%、1.4%、2.0%、1.7%、1.2%、2.4% ($n=5$)。

2.6 数据处理与结果

取拟定 9 比例白芍、炙甘草的提取物 0.1 g，精密称定。按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，在上述色谱条件下进样测定，精密吸取供试品溶液 20 μL ，分别注入液相色谱仪，记录色谱图并以外标法计算样品中 12 个指标成分的量。以该量计算各成分在各药材中的溶出率，结果见图 2、3。图 2 显示，

随着药对中甘草比例的降低，没食子酸、苯甲酸的溶出率却随之增加；图 3 显示，随着药对中甘草比例的减少，甘草酸和甘草次酸的溶出率均呈无规律变化。表 2 和表 3 的观察结果提示，上述 4 个成分除苯甲酰芍药苷在 1:0.6 组中溶出率较低外，其他各成分在 0.6:1、1:1、3:1 这 3 个配伍比例中的溶出率均高于其他比例组。表 2 和表 3 的结果还显示，上述 4 个成分在上面提到的 3 个配伍比例中溶出率高于白芍 (1:0)、甘草 (0:1) 单味药材。

单一成分溶出率 = 该成分在提取物中的量 \times 提取物取样量 / 提取物中相当于生药材的取样量

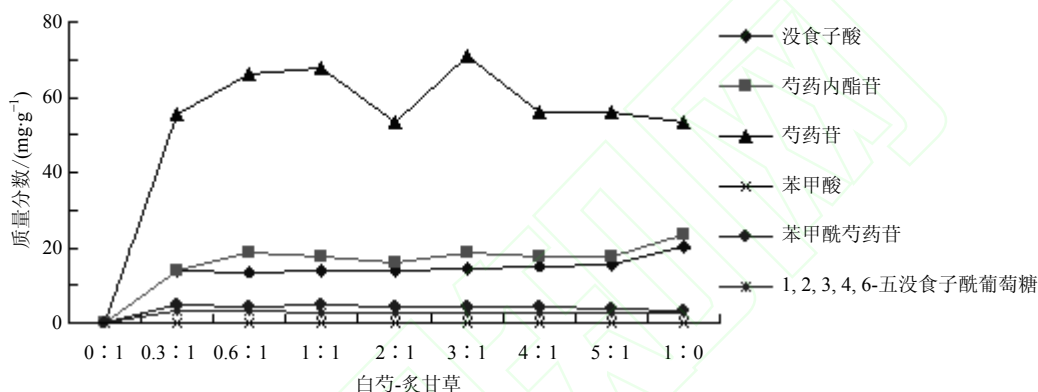


图 2 白芍中 6 种成分溶出率 ($n=3$)

Fig. 2 Dissolution rate of six compounds of white peony root ($n=3$)

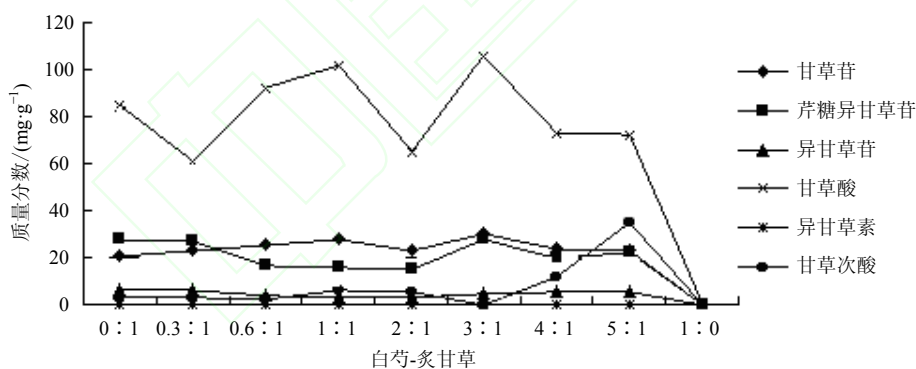


图 3 甘草中 6 种成分溶出率 ($n=3$)

Fig. 3 Dissolution rate of six compounds of processed licorice

3 讨论

3.1 测定结果分析

随着药对中甘草比例的降低，没食子酸、苯甲酸的溶出率却随之增加，分析可能是甘草中的酸性成分，如甘草酸和甘草次酸通过对煎煮液 pH 值的影响，抑制了白芍中这两种酸性成分的溶出；随着药对中甘草比例的减少，甘草酸和甘草次酸的溶出率均呈无规律变化，猜想可能是在煎煮过程中一定的溶液环境促进了甘草酸和甘草次酸的相互转化。

研究表明白芍中的芍药苷、苯甲酰芍药苷，甘草中的甘草苷、甘草酸为芍甘汤的主要药理活性成分^[1,3-5]。上述 4 个成分除苯甲酰芍药苷在 1:0.6 组中溶出率较低外，其他各成分在 0.6:1、1:1、3:1 这 3 个配伍比例中的溶出率均高于其他比例组。可能是白芍与炙甘草以上述 3 个比例配伍，更有利于药对中成分的溶出，具体机理尚不明确，有待进一步探讨及深入研究。质量比 1:1 是张仲景“芍甘汤”的经典配伍比例，由此看来古方的经典配比确

实包含着内在的科学道理。现代研究则认为,质量比 3:1 的镇痛作用也较优^[7-8],本实验结果在有效成分上进一步证实了这一说法的合理性。另外质量比 0.6:1 各有效成分溶出率也较高,这也是伤寒论中芍药甘草对的最小配伍比例,而对该比例的研究却未见文献报道,可做进一步探讨研究。

上述 4 个成分在上面提到的 3 个配伍比例中的溶出率高于白芍(1:0)、甘草(0:1)单味药材。从有效成分上证实了临床经典配比和古方经典配比确实比单味用药合理,可见中医讲究组方配伍极具科学性。

3.2 方法学考察结果分析

本次实验对方法的精密度、重复性、稳定性以及线性范围和回收率均做了考察,结果表明精密度、重复性、稳定性及线性范围均符合方法学规定要求。没食子酸和苯甲酸的回收率低于 95%,可能是由于甘草中的酸性成分对其溶出的抑制所致,这与表 2 中,它在各比例药对中的溶出率低于白芍单味药材的结果也是吻合的。甘草次酸的回收率高于 105%,结合图 3,这与它在各比例溶出率结果中显示出的无规律、不稳定的特点也是符合的。可能是煎煮的溶液环境导致了甘草酸向甘草次酸的转化,干扰了其结果的测定。以上 3 种物质的回收率分别为 93.29%、94.0%、106.0%,虽稍稍偏离了回收率规

定范围的 95%~105%,但由于本次测定成分较多,物质间相互作用复杂,所以认为本实验采用的方法是可行的,可以用来探讨不同配伍比例对白芍炙甘草药对提取物溶出率的影响。

参考文献

- [1] 中国医学科学院药物研究所. 中药志(第 1 册)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993.
- [2] 柴田承二, 原田正敏. 汉药成分的研究 [J]. 药学杂志, 1965, 80(5): 620-622.
- [3] 高木敬次郎, 原田正敏. 芍药的药理学研究 [J]. 药学杂志, 1969, 89(7): 879-880.
- [4] 乔海灵, 马统勋. 甘草 Lx 对青霉噻唑蛋白致敏豚鼠过敏性休克的保护作用及机理的研究 [J]. 中药药理与临床, 1990, 6(1): 27-28.
- [5] 魏伟, 梁君山, 周爱武, 等. 白芍总甙对白细胞介素-2 产生的影响 [J]. 中国药理学通报, 1989, 5(3): 176-177.
- [6] Lee S J, Lee H M, Ji S T, *et al.* 1, 2, 3, 4, 6-Penta-O-galloyl-beta-D-glucose blocks endothelial cell growth and tube formation through inhibition of VEGF binding to VEGF receptor [J]. *Cancer Lett*, 2004, 208(1): 89-94.
- [7] 徐晓娟, 金沈锐. 芍药甘草汤不同配伍比例对痛经大鼠 β -内啡肽的影响研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2004, 10(6): 40-41.
- [8] 郑富超, 郑秀丽, 郭玉成, 等. 芍药甘草汤不同配伍比例镇痛作用的实验研究 [J]. 承德医学院学报, 2008, 25(2): 213-214.