

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 (55~95 min), 柱温 30 ℃。结果 在所观察的白芍-甘草的 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, 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》芍甘汤中配伍比例 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; 配伍比例; 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)03-0291-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.03.011

Principle of active component dissolution in extract of different compatibility proportions of *Paeoniae Radix Alba* and *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*

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

Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

Abstract: Objective To establish the RP-HPLC method for the determination of twelve active components in the combination of *Paeoniae Radix Alba* (PRA) and *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* (GRR) and to further analyze the principle of the active component dissolution with the proportion changing. **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 using acetonitrile (A)-water of 0.1% phosphoric acid (B) 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), and 250 nm (55—95 min); The column temperature was 30 ℃. **Results** Among the observed nine compatibility proportions (PRA-GRR as 0:1, 0.3:1, 0.6:1, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, and 1:0), the active component dissolution amounts in 1:1 and 3:1 groups were the highest, and 0.6:1 group also showed higher dissolution amount. **Conclusion** The scientificity of 1:1 combination of PRA and GRR in *Treatise on Cold Damage Diseases* by ZHANG Zhong-jing has been proved using modern research method and also the rationality of the modern classical 3:1 ratio has been further confirmed in clinic from the active components aspect.

Key words: compatibility of *Paeoniae Radix Alba* and *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; compatibility proportion; principle of dissolution; HPLC; wavelength switching

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

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

网络出版时间: 2012-11-27 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20121127.0954.006.html>

中药复方配伍是中医药文化的精髓,白芍常与甘草配伍,在许多古方及中成药制剂中都有应用,如小建中汤、桂枝汤、真人养脏汤等。其中以张仲景《伤寒论》的芍药汤为代表,方中药虽两味,但结构严谨,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]。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-甘草药对中有有效成分的溶出规律,建立化学成分与药效间的相关性,为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100 g,8倍量水煎煮2次,每次60 min,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2.296 mg/mL、芍药内酯苷1.705 mg/mL、芍药苷1.760 mg/mL、甘草苷1.266 mg/mL、苯甲酸935.0 μg/mL、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖961.0 μg/mL、芹糖异甘草苷2.107 mg/mL、异甘草苷951.8 μg/mL、苯甲酰芍药苷659.0 μg/mL、异甘草素489.0 μg/mL、甘草次酸936.5 μg/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、1.00 mL,置同一25 mL量瓶中,加入甘草酸对照品粉末10.26 mg,加甲醇稀释至刻度,制成含没食子酸91.84 μg/mL、芍药内酯苷102.3 μg/mL、芍药苷316.8 μg/mL、甘草苷126.6 μg/mL、苯甲酸3.740 μg/mL、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖19.22 μg/mL、芹糖异甘草苷126.4 μg/mL、异甘草苷38.07 μg/mL、苯甲酰芍药苷26.36 μg/mL、甘草酸410.4 μg/mL、异甘草素1.956 μg/mL、甘草次酸37.44 μg/mL 的混合对照品溶液,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0.1 g,精密称定,分别置50 mL具塞锥形瓶中,各精密加入水25 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率250 W,频率40 kHz)30 min,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10 mL于分液漏斗中,加入乙腈20 mL,氯仿20 mL,静置分层,将水层全部取出至10 mL量瓶中,加水至刻度线,摇匀;0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.4 色谱条件

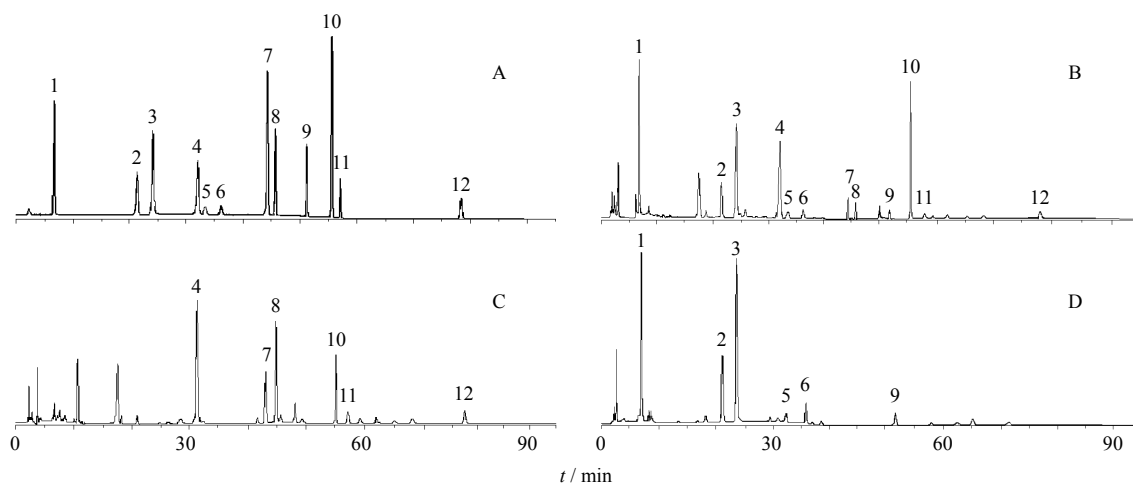
色谱柱为Dikma Technologies-C₁₈柱(200 mm×4.6 mm,5 μm);流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱:0~5 min,5%~10% A;5~10 min,10%~12% A;10~15 min,12%~14% A;15~20 min,14%~16% A;20~25 min,16%~18% A;25~30 min,18%~20% A;30~40 min,20%~

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 (27~42 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。

2.5 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 HPLC 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



1-没食子酸 2-芍药内酯苷 3-芍药苷 4-甘草苷 5-苯甲酸 6-1, 2, 3, 4, 6-五没食子酰葡萄糖 7-芹糖异甘草苷 8-异甘草苷 9-苯甲酰芍药苷 10-甘草酸 11-异甘草素 12-甘草次酸
1-gallic acid 2-albiflorinstd 3-peoniflorin 4-liquiritin 5-benzoic acid 6-1, 2, 3, 4, 6-pentgalloyl glucose 7-isoliquiritin apioside 8-isoliquiritin 9-benzoylpeoniflorin 10-glycyrrhizic acid 11-isoliquiritigenin 12-glycyrrhetic acid

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 substances (A), sample (B), negative solution of PRA (C), and negative solution of GRR (D)

归方程, 结果见表 1。

2.6 方法学考察

本实验按“2.2”项下色谱条件, 以白芍-甘草 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。精密度试验中色谱峰 1~12 峰面积的 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。重复性试验中成分 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%、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%、

表 1 12 个成分的标准曲线方程、相关系数和线性范围

Table 1 Standard curve equations, correlation coefficients, and linear ranges of twelve components

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

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% ($n=5$)。

2.7 数据处理与结果

取 9 个拟定比例白芍、炙甘草的提取物 0.1 g，精密称定。按“2.3”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（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），结果见图 2、3，表 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 的结果提示，芍药苷、甘草苷、甘草酸这 3 个成分在 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，苯甲酰芍药苷在 1:1、3:1 组中溶出率高于其他比例组。表 2 和表 3 的结果还显示，上述 4 个成分（芍药苷、苯甲酰芍药苷、甘草苷、甘草酸）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。

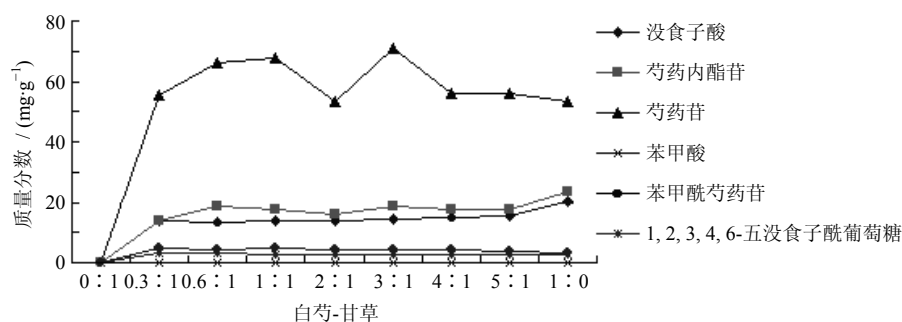


图 2 白芍中 6 种成分溶出率 ($n=3$)

Fig. 2 Dissolution rate of six components in PRA ($n=3$)

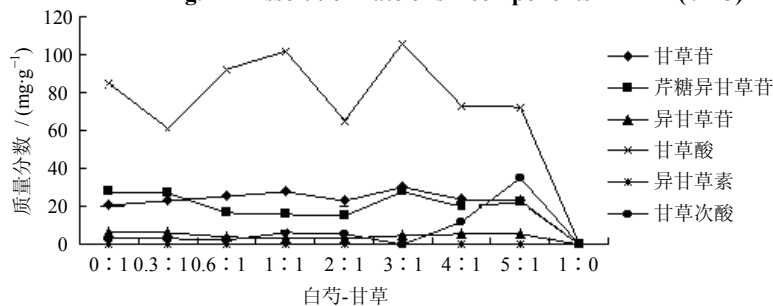


图 3 甘草中 6 种成分溶出率 ($n=3$)

Fig. 3 Dissolution rate of six components in GRR ($n=3$)

表 2 白芍中 6 种成分溶出率 ($n=3$)

Table 2 Dissolution rate of six components in PRA ($n=3$)

白芍-甘草配伍比例	溶出率 / ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)					
	没食子酸	芍药苷内酯	芍药苷	苯甲酸	1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖	苯甲酰芍药苷
0:1	0	0	0	0	0	0
0.3:1	13.68	13.70	55.55	0.507 9	2.954	4.538
0.6:1	13.35	18.71	66.36	0.552 2	2.943	4.078
1:1	13.69	17.51	67.62	0.553 9	2.516	4.687
2:1	13.82	15.81	53.49	0.560 7	2.609	4.369
3:1	14.31	18.48	71.12	0.592 2	2.678	4.526
4:1	15.19	17.57	56.15	0.602 3	2.769	4.453
5:1	15.49	17.38	56.11	0.605 5	2.738	3.995
1:0	20.46	23.47	53.33	0.742 2	2.753	3.104

表3 甘草中6种成分溶出率 (n=3)
Table 3 Dissolution rate of six components in GRR (n=3)

白芍-甘草配伍比例	溶出率 / (mg·g ⁻¹)					
	甘草苷	芹糖异甘草苷	异甘草苷	甘草酸	异甘草素	甘草次酸
0 : 1	20.99	27.74	6.462	85.64	0.439 3	3.034
0.3 : 1	22.93	27.38	6.486	61.23	0.336 8	2.865
0.6 : 1	25.31	16.97	3.746	92.98	0.384 6	2.336
1 : 1	27.89	16.01	3.532	102.77	0.270 7	6.555
2 : 1	23.56	15.08	3.526	65.59	0.233 6	5.462
3 : 1	30.01	28.11	4.623	106.24	0.261 6	16.233
4 : 1	24.19	19.62	5.877	73.66	0.293 1	12.087
5 : 1	22.81	22.03	5.530	72.97	0.341 3	35.407
1 : 0	0	0	0	0	0	0

3 讨论

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, 推测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0.6:1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, 具体机制尚不明确, 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方面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, 这也是伤寒论中芍甘药对的最小配伍比例, 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。从有效成分方面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。

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.