

HPLC 法测定桂枝芍药知母汤中 5 种有效成分

王 淳¹, 宋志前¹, 夏 磊², 董运茁¹, 杜智勇¹, 宁张弛³, 张琳琳¹, 刘振丽^{1*}

1. 中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700

2. 天津药业研究院有限公司, 天津 300457

3. 北京中医药大学中药学院, 北京 100029

摘要: 目的 建立 HPLC 法同时测定桂枝芍药知母汤中没食子酸、芒果苷、芍药苷、苯甲酸和肉桂酸的量。方法 采用 Zorbax Extend-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-水梯度洗脱, 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长为 230 nm, 柱温为 25 °C。结果 没食子酸、芒果苷、芍药苷、苯甲酸和肉桂酸进样量分别在 0.052~0.52 ($r=0.999\ 8$)、0.078~0.78 ($r=0.999\ 8$)、0.336~3.36 ($r=0.999\ 9$)、0.029 6~0.296 ($r=0.999\ 8$)、0.020 6~0.206 ($r=0.999\ 9$) μg 线性关系良好; 平均回收率 (RSD) 分别为 99.73% (1.63%)、99.33% (1.02%)、100.2% (1.79%)、98.96% (1.02%) 和 99.64% (1.62%)。结论 本方法简便、可靠、重复性好, 为桂枝芍药知母汤物质基础研究提供了依据。

关键词: 高效液相色谱法; 桂枝芍药知母汤; 定量测定; 没食子酸; 芒果苷; 芍药苷; 苯甲酸; 肉桂酸

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)21-3105-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.21.013

Determination of five components in Guizhi Shaoyao Zhimu Decotion by HPLC method

WANG Chun¹, SONG Zhi-qian¹, XIA Lei², DONG Yun-zhuo¹, DU Zhi-yong¹, NING Zhang-chi³, ZHANG Lin-lin¹, LIU Zhen-li¹

1. Institute of Basic Theory, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

2. Tianjin Pharmaceuticals Research Organization Co., Ltd., Tianjin 300457, China

3. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the determination of gallic acid, mangiferin, paeoniflorin, benzoic acid, and cinnamic acid in Guizhi Shaoyao Zhimu Decotion (GSZD). **Methods** The separation was performed on a Zorbax Extend-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with the gradient elution of acetonitrile-water; The volumn flow was 1.0 mL/min; The detection wavelength was set at 230 nm. The column temperature was maintained at 25 °C. **Results** Gallic acid, mangiferin, paeoniflorin, benzoic acid, and cinnamic acid had good linearity in the ranges of 0.052—0.52 ($r = 0.999\ 8$), 0.078—0.78 ($r = 0.999\ 8$), 0.336—3.36 ($r = 0.999\ 9$), 0.029 6—0.296 ($r = 0.999\ 8$), and 0.020 6—0.206 ($r = 0.999\ 9$) μg, respectively. The average recoveries of gallic acid, mangiferin, paeoniflorin, benzoic acid, and cinnamic acid were 99.73% (1.63%), 99.33% (1.02%), 100.2% (1.79%), 98.9% (1.02%), and 99.64% (1.62%), respectively. **Conclusion** This method is simple, reliable, and accurate, and can provide the reference for study on GSZD material basis.

Key words: HPLC; Guizhi Shaoyao Zhimu Decotion; quantitative determination; gallic acid; mangiferin; paeoniflorin; benzoic acid; cinnamic acid

桂枝芍药知母汤始见于《金匱要略》, 由桂枝、白芍和知母等 9 味中药组成, 具有祛风除湿、温经散寒、滋阴清热功效, 是治疗类风湿性关节炎的经典方剂^[1]。药理学研究表明, 桂枝芍药知母汤可明

显减轻类风湿性关节炎大鼠滑膜增殖的病理改变^[2], 对 II 型胶原蛋白诱导大鼠类风湿性关节炎具有一定的治疗作用^[3]。其主要成分如芍药苷能抑制佐剂性关节炎大鼠滑膜细胞的异常增殖^[4], 降低 II 型胶原

收稿日期: 2014-04-30

基金项目: 中央级科研院所自主选题 (YZ-1323)

作者简介: 王 淳 (1981—), 女, 博士, 中药化学专业。E-mail: chuner-2006@hotmail.com

*通信作者 刘振丽, 研究员, 博士生导师, 中药质量标准研究。Tel: (010)64014411-2503 E-mail: zhenli_liu@sina.com

诱导的关节炎大鼠模型的细胞因子水平^[5], 芒果苷具有拮抗脂多糖(LPS)诱导的慢性炎症作用^[6], 没食子酸对实验性关节肿胀有显著的抗炎作用^[7], 并能诱导类风湿性关节炎患者成纤维样滑膜细胞凋亡^[8]。

目前未见对桂枝芍药知母汤化学成分进行定量分析的报道。肉桂酸为君药桂枝的主要有效成分^[9], 在含桂枝的复方中多选取肉桂酸作为定量指标^[10-12]。芍药苷为白芍的主要有效成分^[9], 其酯键水解后能产生苯甲酸^[13]; 没食子酸也是白芍的活性成分之一^[14]。芒果苷为知母的主要有效成分^[9]。基于桂枝芍药知母汤良好的临床疗效, 为研究其发挥作用的物质基础, 本实验采用HPLC法对用于药效实验研究的提取物中桂皮酸、芍药苷、苯甲酸、没食子酸和芒果苷5种成分进行定量测定。

1 仪器与材料

Agilent1100型高效液相色谱仪, 包括G1322A脱气机, G1311A四元泵, G1313A自动进样器, G1315B DAD检测器, G1316A恒温箱, HP化学工作站; TCQ-250型超声波清洗器, 北京医疗设备二厂; Sartorius CP225D电子天平, 德国赛多利斯公司。

对照品没食子酸(批号110831-200302, 质量分数 $\geq 98\%$)、芒果苷(批号111607-200402, 质量分数 $\geq 98\%$)、芍药苷(批号110736-200424, 质量分数94.9%)、苯甲酸(批号100419-201302, 质量分数 $\geq 98\%$)和肉桂酸(批号110786-200503, 质量分数 $\geq 98\%$), 均购于中国食品药品检定研究院。药材饮片均购自北京仟草中药饮片有限公司, 生姜购自北京天泽祥菜市场, 各药材均经北京中医药大学刘春生教授鉴定, 桂枝(批号130706008, 产地广西)为樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥嫩枝, 白芍(批号121101009, 产地安徽)为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根, 知母(批号130918003, 产地河北)为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bge. 的干燥根茎, 甘草(批号130101012, 产地新疆)为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎, 蜜麻黄(批号130531002, 产地内蒙古)为麻黄科植物草麻黄 *Ephedra sinica* Stapf 的干燥草质茎, 炒白术(批号131026001, 产地浙江)为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎, 防风(批号130704003, 产地内蒙古)为伞形科植物防风

Saposhnikovia divaricata (Turcz.) Schischk. 的干燥根, 黑顺片(批号120103, 产地四川)为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的子根的加工品, 生姜(批号131101, 产地山东)为姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的新鲜根茎。按照《中国药典》2010年版方法检测, 药材均为符合《中国药典》2010年版的品种规定。乙腈为色谱纯, 美国Fisher公司, 水为纯净水; 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 提取物制备

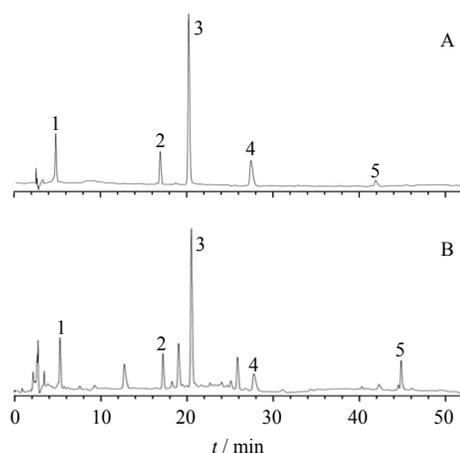
按处方比例, 称取桂枝、白芍、甘草、麻黄、生姜、白术、知母、防风、黑顺片适量, 混合, 加入8倍量水提取3次, 每次1h, 合并提取液, 滤过, 滤液于60℃减压浓缩, 放至室温, 边搅拌边缓慢加入95%乙醇使含醇量为60%, 冷藏静置12h, 取上清液, 减压回收乙醇, 并浓缩成稠膏, 于60℃真空干燥后, 称定质量, 粉碎成细粉, 得提取物。平行3次, 提取物得率平均值为20.60%。

2.2 色谱条件

Zorbax Extend-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱, 洗脱程序为0~15 min, 5%乙腈; 15~20 min, 15%乙腈; 20~28 min, 20%乙腈; 28~48 min, 38%乙腈。体积流量1.0 mL/min, 检测波长230 nm, 柱温25℃。HPLC图谱见图1。

2.3 混合对照品溶液的制备

分别取没食子酸、芒果苷、芍药苷、苯甲酸和



1-没食子酸 2-芒果苷 3-芍药苷 4-苯甲酸 5-肉桂酸
1-galic acid 2-mangiferin 3-paeoniflorin 4-benzoic acid 5-cinnamic acid

图1 混合对照品(A)和桂枝芍药知母汤(B)的HPLC图
Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A) and GSZD (B)

肉桂酸对照品适量,精密称定,加甲醇分别制成各含0.260、0.390、0.840、0.148、0.103 mg/mL的溶液,作为对照品储备液。分别精密量取上述5个对照品储备液适量,混合,加甲醇制成质量浓度分别为26.0、39.0、168.0、14.8、10.3 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备

取提取物约0.20 g,精密称定,精密加入70%的甲醇25 mL,称定质量,超声提取(功率254 W,频率40 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用70%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.5 线性范围考察

分别精密吸取“2.3”项下混合对照品溶液2、4、8、12、16、20 μL 进样测定。以峰面积(Y)为纵坐标,进样量(X , μg)为横坐标,绘制标准曲线,得没食子酸、芒果苷、芍药苷、苯甲酸和肉桂酸的回归方程分别为 $Y=1\ 697.4 X+12.46$ ($r=0.999\ 8$), $Y=1\ 300.2 X-2.334\ 2$ ($r=0.999\ 8$), $Y=1\ 276.5 X-11.395$ ($r=0.999\ 9$), $Y=4\ 706.5 X+13.386$ ($r=0.999\ 8$), $Y=2\ 048.9 X+2.257\ 5$ ($r=0.999\ 9$);线性范围分别为0.052~0.52、0.078~0.78、0.336~3.36、0.029 6~0.296、0.020 6~0.206 μg 。

2.6 精密度考察

精密吸取同一供试品溶液10 μL ,连续进样6次,测得没食子酸、芒果苷、芍药苷、苯甲酸和肉桂酸峰面积积分值的RSD分别为0.59%、0.58%、0.59%、0.71%和0.84%,表明精密度良好。

2.7 重复性试验

取同一供试品粉末约0.20 g,6份,精密称定,按“2.4”项下方法平行制备成供试品溶液,分别进样10 μL 进行测定,计算质量分数。没食子酸、芒果苷、芍药苷、苯甲酸和肉桂酸的平均质量分数分别为3.355、4.203、18.15、1.201、0.674 4 mg/g;RSD分别为1.13%、2.07%、1.34%、2.28%、1.78%,符合要求。

2.8 稳定性试验

取同一供试品粉末约0.20 g,精密称定,按“2.4”项下方法制备成供试品溶液,在制备后0、2、4、6、8、10、12、24 h进样,测得没食子酸、芒果苷、芍药苷、苯甲酸和肉桂酸峰面积积分值的RSD分别为2.46%、2.65%、2.10%、2.67%和2.00%,符合要求,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.9 回收率试验

取已知质量分数的提取物约0.10 g,6份,精密称定,分别精密加入没食子酸、芒果苷、芍药苷、苯甲酸和肉桂酸对照品适量,按“2.4”项下方法制备成供试品溶液,在上述色谱条件下进行测定,计算回收率,结果平均回收率分别为99.73%、99.33%、100.2%、98.96%、99.64%,RSD分别为1.63%、1.02%、1.79%、1.02%、1.62%。

2.10 样品测定

取桂枝芍药知母汤提取物3批,按“2.4”项下方法制备,测定5种成分的量,结果见表1。

表1 桂枝芍药知母汤中5种成分质量分数
Table 1 Contents of five components in GSZD

样品	质量分数 / ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)				
	没食子酸	芒果苷	芍药苷	苯甲酸	肉桂酸
提取物1	3.355	4.203	18.15	1.201	0.674 4
提取物2	3.416	4.210	18.42	1.176	0.706 2
提取物3	3.316	4.328	18.68	1.062	0.654 4

3 讨论

本实验对桂枝芍药知母汤提取物中5种有效成分的量进行了分析。供试品溶液的制备中考察了提取方式、提取溶剂种类、溶剂加入量和提取时间。结果显示,超声提取与回流提取无显著差异;70%甲醇提取优于甲醇和无水乙醇;70%乙醇加入量10、25、50 mL比较,加入量为25、50 mL时各成分的量没有显著差异,但均优于10 mL;提取时间10、30、60 min比较,超声提取30 min时各成分的量最高。最终确定取供试品0.2 g,70%乙醇25 mL超声提取30 min为最佳供试品溶液制备方法。由于桂枝芍药知母汤组成药味较多,化学组成复杂,提取物色谱分离难度较大,因此采用梯度洗脱。考察了不同流动相甲醇-水和乙腈-水以及柱温的影响,最后确定色谱条件。在该色谱条件下,芍药苷、没食子酸、苯甲酸、肉桂酸、芒果苷5种成分分离效果较好。通过全波长扫描对5种成分的最佳波长进行研究,芍药苷为230 nm、没食子酸为270 nm、苯甲酸为228 nm、肉桂酸为285 nm、芒果苷为258 nm,最终选取230 nm为检测波长。

建立的HPLC方法能同时测定芍药苷、没食子酸、苯甲酸、肉桂酸、芒果苷5种成分的量,可有效控制提取物的质量,为桂枝芍药知母汤物质基础研究提供了科学依据。

参考文献

- [1] 刘鹏霄, 曹 炜, 王清林. 类风湿关节炎的中西医药探索 [J]. 现代中西医结合杂志, 2014, 23(3): 340-342.
- [2] 余 阂, 卿茂盛, 肖 伟. 桂枝芍药知母汤对类风湿性关节炎滑膜细胞凋亡的基因调控的实验研究 [J]. 当代医学, 2010, 16(2): 18-20.
- [3] 姚仁敏, 张 杰. 桂芍知母汤对胶原诱导类风湿性关节炎模型大鼠血清中 TNF- α 、MMP-2 及 MMP-9 的影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(4): 52-54.
- [4] Zheng Y Q, Wei W, Zhu L, *et al.* Effects and mechanisms of Paeoniflorin, a bioactive glucoside from paeony root, on adjuvant arthritis in rats [J]. *Inflamm Res*, 2007, 56(5): 182-188.
- [5] Zhang L L, Wei W, Wang N P, *et al.* Paeoniflorin suppresses inflammatory mediator production and regulates G protein-coupled signaling in fibroblast-like synoviocytes of collagen induced arthritic rats [J]. *Inflamm Res*, 2008, 57(8): 388-395.
- [6] 卫智权, 阎 莉, 邓家刚, 等. 芒果苷对脂多糖诱导的慢性炎症大鼠 MAPK 通路及血清细胞因子的影响 [J]. 中草药, 2013, 44(1): 52-58.
- [7] 刘国卿, 王秋娟, 杨宏健, 等. 野葡萄成分没食子酸的药理研究 [J]. 南京药学院学报, 1983, 14(2): 43-47.
- [8] Yoon C H, Chung S J, Lee S W, *et al.* Gallic acid, a natural polyphenolic acid, induces apoptosis and inhibits proinflammatory gene expressions in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. *Joint Bone Spine*, 2013, 80(3): 274-279.
- [9] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [10] 王福霞, 敖书华, 杨 林, 等. 桂枝汤中桂枝不同配伍对桂皮酸含量的影响 [J]. 中国药房, 2010, 21(27): 2522-2523.
- [11] 李 芳, 张 利, 张静赞, 等. HPLC 同时测定桂枝茯苓丸中的肉桂酸和丹皮酚 [J]. 华西药学杂志, 2008, 23(6): 710-711.
- [12] 柏 冬, 范 斌, 牛晓红, 等. HPLC-系统内标法测定桂枝汤中芍药苷、甘草苷、肉桂酸、桂皮醛和甘草酸 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 387-390.
- [13] 刘鹰翔, 马玉卓. 白芍的化学成分与药理研究进展 [J]. 中草药, 1995, 26(8): 437-440.
- [14] 甘平平, 钟美佐, 黄 熙, 等. 方药配伍对白芍中没食子酸溶出率的影响 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(8): 1843-1845.