

芍药与甘草配伍协同增效作用的物质基础研究

王君¹, 戴丽¹, 李鹏跃², 霍海如², 隋峰^{2*}, 张春风^{1*}, 李兰芳², 郭淑英², 李沧海², 姜廷良²
(1. 中国药科大学, 南京 211198; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:**探讨芍药与甘草配伍增效的化学物质基础。**方法:**芍药和甘草中主要活性成分采用 HPLC 检测;对方法学进行了专属性、线性范围、精密性、稳定性、重复性、加样回收率等考察。**结果:**芍药单味药单煎后芍药苷检测到的含量为 2.19 mg·g⁻¹;甘草单味药单煎后甘草酸检测到的含量为 17.13 mg·g⁻¹;芍药和甘草分别单煎再按 1:1 混合,芍药苷检测到的含量为 5.45 mg·g⁻¹,甘草酸检测到的含量为 17.69 mg·g⁻¹;芍药和甘草按 1:1 混合煎煮,芍药苷检测到的含量为 2.58 mg·g⁻¹,甘草酸检测到的含量为 18.14 mg·g⁻¹。**结论:**芍药与甘草配伍,两药单煎混合芍药苷和甘草酸的含量均显著提高,但前者增高更为明显;两药混合煎煮,芍药苷和甘草酸的含量均明显提高,但以后者更为显著;芍药与甘草配伍止痛的科学基础可能与两药合用后的芍药苷和甘草酸的含量增高有关。

[关键词] 芍药; 甘草; 配伍; 物质基础

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)11-0083-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014110083

Study on Active Ingredients for Increased Efficacy of Compatibility of Peony and Licorice

WANG Jun¹, DAI Li¹, LI Peng-yue², HUO Hai-ru², SUI Feng^{2*}, ZHANG Chun-feng^{1*},
LI Lan-fang², GUO Shu-ying², LI Cang-hai², JIANG Ting-liang²

(1. College of Traditional Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China;
2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the chemical basis for co-application of *Paeonia lactiflora* and *Glycyrrhizae uralensis*. **Method:** The contents of peoniflorin and glycyrrhizin were detected by using the method of high-performance liquid chromatography (HPLC) and the test methods in terms of specificity, linear range, precision, stability, repeatability and sample recovery were performed to determine the optimum chromatographic conditions. **Result:** The content of peoniflorin in *P. lactiflora* decoction was 2.19 mg·g⁻¹; the content of glycyrrhizin in *G. uralensis* was 17.13 mg·g⁻¹; the contents of peoniflorin and glycyrrhizin were 5.45, 17.69 mg·g⁻¹ respectively when *P. lactiflora* and *G. uralensis* were mixed together after decocting the component herbs singly; the contents of peoniflorin and glycyrrhizin were 2.58, 18.14 mg·g⁻¹ respectively when *P. lactiflora* and *G. Uralensis* were decocted together. **Conclusion:** The contents of peoniflorin and glycyrrhizin were promoted significantly with the former more significant when the component herbs were decocted singly and the contents of peoniflorin and glycyrrhizin was elevated greatly with the latter more significant when the component herbs were decocted together; the increase in contents of peoniflorin and glycyrrhizin may compose one of important reasons behind the synegetic analgesic potency when *P. lactiflora* and *G. uralensis* are used together.

[收稿日期] 20131215(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30873393, 81274112);北京市自然科学基金项目(7112098);中国中医科学院传承项目(CM20123002)

[第一作者] 王君,在读硕士,从事中药药剂和药理研究, Tel:010-64041008, E-mail:wangjun9949@126.com

[通讯作者] *隋峰,研究员,从事中药药性研究与新药开发, Tel:010-64041008, E-mail:suifeng2136@126.com

*张春风,副教授,从事中药制剂研究, Tel:025-86185129, E-mail:zhangchunfeng67@163.com

[Key words] *Paeonia lactiflora*; *Glycyrrhizae uralensis*; compatibility; material basis

芍药,性微寒,味苦、酸、甘;甘草,味甘,性平,二者均出于《神农本草经》,为临床疗效确切的常用中药。以往有关中药复方配伍疗效优势的研究多集中在两味药或多味药之间所含的活性成分之间的协同作用,对药味配伍合煎或合用后所致的与疗效相关的活性化学成分的变化重视不够。本研究是在本课题组前期对芍药甘草汤止痛生物效应评价和分子机制研究工作的基础上^[1],又以这一经典药对小复方为范例,关注方中两味药中的主要止痛活性成分——芍药苷和甘草酸^[2-3],从物质基础的角度探讨芍药与甘草配伍的科学内涵和优效机制。

1 材料

KQ-250E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),TB-25 型 1/10 万电子天平(DENVER,北京丹佛仪器有限公司);1200 型高效液相色谱系统(美国 Agilent 公司),DAD SL(G1315C)型检测器,Bin PumpSL(G1312B)型泵,色谱柱(Kromasil,4.6 mm×250 mm,5 μm,Boston Analyticas,Inc.)。芍药(安徽产)、甘草(内蒙产),均购于北京人卫饮片厂,经中国中医科学院中药研究所陈明副研究员鉴定为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的根和豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的根及根茎。甘草酸对照品(上海市丰生物科技有限公司,批号 121109),芍药苷对照品(上海中药标准化研究中心,批号 12-1001);乙腈、甲醇(色谱纯,赛默飞世尔科技有限公司,批号 120516),磷酸(色谱纯,北京化学试剂公司),纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司,批号 20131024121600);其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备 分 4 组,分别是①芍药组,②甘草组,③芍药-甘草分煎混合组,④芍药-甘草混煎组。各组药量及配比见表 1。

表 1 芍药与甘草的量及配比关系

组别	芍药/g	甘草/g	配比关系
①	10	0	-
②	0	10	-
③	10	10	1:1
④	10	10	1:1

各组按表 1 所示取药,分别加 10,8 倍量水煎煮 2 次,每次 40 min,过滤,合并水煎液,水浴浓缩至 100 mL,4 ℃ 保存备用。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取芍药苷对照品 2.17 mg,置于 5 mL 量瓶里,甲醇定容至刻度,得浓度为 0.434 g·L⁻¹ 的芍药苷对照品储备液。精密称取甘草酸对照品 5.18 mg,置于 10 mL 量瓶中,甲醇定容至刻度,得浓度为 0.518 g·L⁻¹ 的甘草酸对照品储备液。分别精密吸取 2 mL 芍药苷和 4 mL 甘草酸对照品储备液于 25 mL 量瓶中,甲醇稀释至刻度,混匀,得混合对照品储备液。

2.3 阴性对照溶液的制备 表 1 中①组和②组分别作为阴性对照液。

2.4 方法学考察

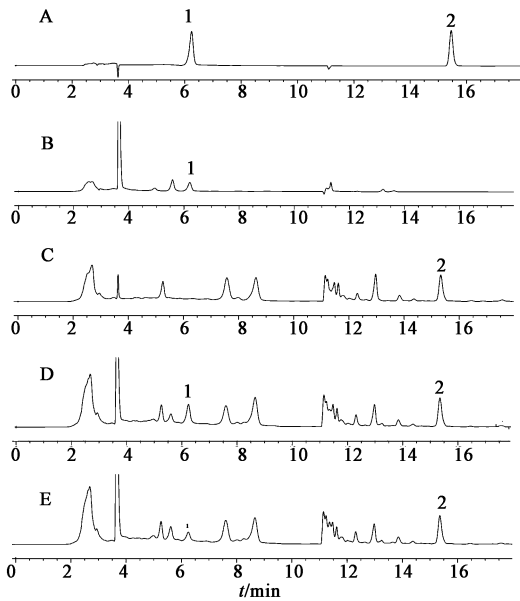
2.4.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),检测波长 232 nm,流动相乙腈-0.01% 磷酸水梯度洗脱(0~7 min,0~21% 乙腈,7~7.1 min,21%~42% 乙腈,7.1~14.9 min,42%~43% 乙腈,14.9~15.5 min,43%~90% 乙腈,15.5~17 min,90%~21% 乙腈,17~20 min 21% 乙腈),流速 1 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,进样量 20 μL。

2.4.2 专属性试验 精密吸取芍药苷与甘草酸的混合对照品溶液、芍药水煎液供试品、甘草水煎液供试品、芍药-甘草分煎混合供试品溶液、芍药-甘草混煎供试品溶液各 20 μL,按 2.4.1 项下方法进样分析,记录色谱图,考察供试品溶液中有无成分对芍药苷、甘草酸含量测定造成干扰情况。见图 1。

2.4.3 线性范围考察 精密吸取混合对照品储备液 0.5,1,2,4,6,8 mL 至 10 mL 量瓶中,甲醇定容,按 2.4.1 项下方法进样分析。以对照品溶液的质量浓度为横坐标,色谱峰的峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,芍药苷标准曲线 $Y = 15.41X + 6.2792$ ($r = 0.9991$),线性范围 1.736~27.776 mg·L⁻¹,甘草酸标准曲线 $Y = 12.296X - 9.0979$ ($r = 0.9995$),线性范围 4.144~66.304 mg·L⁻¹。

2.4.4 精密度考察 取混合对照品溶液,过 0.45 μm 微孔滤膜滤过,按 2.4.1 项下方法进样分析,重复进样 6 次,记录色谱图,测定芍药苷和甘草酸的峰面积,计算芍药苷、甘草酸峰面积的 RSD 分别为 1.96%,0.58%。

2.4.5 稳定性考察 取 4 组供试品溶液,过 0.45 μm 微孔滤膜,分别在 0,4,8,12,24 h 注入液相色谱仪,按 4.1.1 项下色谱条件进样分析,记录色谱图,测定芍药苷和甘草酸的峰面积。计算各组芍药



1. 芍药苷;2. 甘草酸;A. 混合对照品;B. 芍药水煎液;
C. 甘草水煎液;D. 芍药-甘草分煎混合液;E. 芍药-甘草混煎液

图1 芍药-甘草 HPLC

苷峰面积 RSD 值分别为 1.97%, 1.94%, 1.38%, 各组甘草酸峰面积 RSD 值分别为 0.61%, 1.71%, 0.53%。

2.4.6 重复性考察 取 6 份混合对照品溶液,过 0.45 μm 微孔滤膜滤过,按 2.4.1 项下方法进样分析,记录色谱图,测定芍药苷和甘草酸的峰面积,计算芍药苷、甘草酸峰面积的 RSD 分别为 0.71%, 1.02%。

2.4.7 加样回收率考察 取 2.1 项下的各组供试品溶液 0.8 mL,置 25 mL 量瓶中,各加入 1.3 mL 混合对照品溶液,纯净水稀释至刻度,混匀,同法配制 6 份样品。过 0.45 μm 微孔滤膜,依照 2.4.1 项下色谱条件,进行测定,记录色谱图,测得峰面积并计算提取率。计算各组芍药苷的平均回收率 102.21% (RSD 1.13%), 99.14% (RSD 1.80%), 99.07% (RSD 0.87%), 甘草酸平均回收率分别为 99.85% (RSD 1.64%), 104.37% (RSD 1.86%), 98.34% (RSD 1.82%)。

2.5 样品煎煮提取率测定 按照供试品溶液制备方法和色谱条件对 4 组溶液进行测定,计算每克芍药及甘草的平均煎出量。见表 2。

3 讨论

芍药甘草汤出自东汉张仲景的《伤寒论》。该方配伍严谨,用药精简,芍药味酸、甘草味甘,酸甘相伍,化阴缓急止痛。临床上芍药甘草汤单用或加減配伍广泛用于治疗关节炎、胃脘痛、腰腿痛、足跟痛、

表 2 芍药苷及甘草酸煎出量

组别	芍药苷煎出量 /mg·g ⁻¹	甘草酸煎出量 /mg·g ⁻¹	芍药苷煎出量 RSD/%	甘草酸煎出量 RSD/%
①	2.19		1.83	
②		17.13		0.87
③	5.45	17.69	1.06	0.01
④	2.58	18.14	1.39	0.49

小儿腹痛等炎症或神经源性疼痛^[4-6]。已有的实验研究报道,芍药甘草汤具有抗炎止痛作用^[7-8]。我们课题组前期分别建立了两种疼痛模型:类风湿性关节炎疼痛模型和坐骨神经痛模型,研究发现,芍药甘草汤对上述两种疼痛模型均具有显著的止痛作用^[9-10]。并且芍药甘草汤的止痛起效时间和止痛效力均明显优于单味芍药和甘草。

研究结果发现,芍药甘草汤水煎液中芍药苷的含量显著高于单味芍药中芍药苷的含量,而其甘草酸的含量明显高于单味甘草中甘草酸的含量,鉴于芍药苷和甘草酸分别是芍药和甘草的主要活性成分,且均具有一定的止痛作用^[11-13],提示芍药甘草汤复方止痛作用优于方中的芍药和甘草单味药,与复方水煎液中的芍药苷和甘草酸的含量增高密切相关,这一研究发现进一步体现出组成复方的中药所含的活性成分在人体前产生的含量变化可能是中药复方生物效应增强的模式之一。同时,本研究尚发现,芍药和甘草混煎与单煎后混合所含的芍药苷及甘草酸的含量亦有明显差异,单煎芍药苷的含量较高,而混煎甘草酸的含量相对较高,其确切的化学机制尚有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 李从越,隋峰,霍海如,等. TRPV1 通道蛋白介导的芍药甘草汤止痛配伍机制研究[J]. 中药药理与临床, 2013,29(3):2.
- [2] 郑世存,李晓宇,欧阳兵,等. 芍药苷药理作用研究新进展[J]. 中国药物警戒, 2012, 9(2):100.
- [3] YAikawa, T Yoshiike, H Ogawa. Effect of glycyrrhizin on pain and HLA-DR antigen expression on CD8-positive cells in peripheral blood of herpes zoster patients in comparison with other antiviral agents [J]. Skin Pharmacol, 1990, 3(4):268.
- [4] 葛平玉,常青,许灌成. 芍药甘草汤治疗慢性骨盆疼痛综合征疗效观察[J]. 新中医,2011,43(12):70.
- [5] 吕发明,程国杰. 加味芍药甘草汤治疗慢性腰肌劳损临床拆方研究[J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(7):1380.

近红外透射光谱法快速测定枳壳提取液中 柚皮苷和新橙皮苷含量

许崇瑶^{1,2}, 叶正良^{2*}, 李德坤², 周大铮², 刘君动^{1,2}

(1. 天津中医药大学研究生院, 天津 300193; 2. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300410)

[摘要] 目的:采用近红外光谱仪透射光谱技术对枳壳碱性提取液中柚皮苷和新橙皮苷的含量进行检测分析。方法:针对柚皮苷和新橙皮苷两种成分,将44份样品的原始光谱分别经矢量归一化和多元散射校正预处理,选取不同波段;柚皮苷选取3个波段11 995.6~7 498.2, 6 101.9~5 446.2, 4 601.5~4 246.7 cm^{-1} ;新橙皮苷选取11 995.6~5 446.2, 4 601.5~4 246.7 cm^{-1} 两个波段,运用偏最小二乘法(PLS)分别建立定量校正模型并分析。结果:柚皮苷和新橙皮苷校正模型的结果分别为:校正均方差(RMSEC)为0.024 7, 0.036, 模型的决定因子 $R^2 = 0.997 4$, $R^2 = 0.996 6$, 内部交叉验证均方差(RMSECV)为0.07, 0.065 2, 最佳维数均为9。用建立的校正模型对12份提取液样品中的柚皮苷和新橙皮苷进行预测,预测误差均方差(RMSEP)分别为0.046 2, 0.082 7。结论:该方法分析能同时快速检测枳壳提取液中柚皮苷和新橙皮苷的含量,结果准确可靠,对中药提取工艺优化和生产工艺过程的质量控制具有很好的应用前景。

[关键词] 近红外透射光谱; 枳壳; 柚皮苷; 新橙皮苷; 矢量归一化; 多元散射校正

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)11-0086-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014110086

Rapid Analysis of Naringin and Neohesperidin by Near Infrared Transmittance Spectroscopy in Extract of Aurantii Fructus

XU Chong-yao^{1,2}, YE Zheng-liang^{2*}, LI De-kun², ZHOU Da-zheng², LIU Jun-dong^{1,2}

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

2. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co Ltd, Tianjin 300410, China)

[收稿日期] 20130413(012)

[第一作者] 许崇瑶,在读硕士,从事新药研发和工艺优化方面的研究, E-mail: xcy.20.life@163.com

[通讯作者] *叶正良,研究员, Tel: 022-86342066, E-mail: yezl@tasly.com

- [6] 郝桂锋,温成平,赵天喜. 芍药甘草汤治疗运动性肌肉痉挛初探[J]. 中国中医急症, 2010, 19(3): 455.
- [7] 刘剑,宁小菊. 芍药甘草汤配合西医治疗三叉神经痛26例[J]. 湖南中医药大学学报, 2009, 29(8): 27.
- [8] 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.
- [9] 陈蕊,林大勇,付勇强. 芍药甘草附子汤对类风湿性关节炎大鼠的免疫调节作用[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(5): 1081.
- [10] 隋峰,李兰芳,李珊,等. 转化理念指导下的芍药甘草汤抗炎镇痛实验研究[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2011, 13(1): 188.
- [11] Akasaka Y, Sakai A, Takasu K, et al. Suppressive effects of glycyrrhetic acid derivatives on tachykinin receptor activation and hyperalgesia [J]. J Pharmacol Sci, 2011, 117(3): 180.
- [12] Yu HY, Mu DG, Chen J, et al. Suppressive effects of intrathecal paeoniflorin on bee venom-induced pain-related behaviors and spinal neuronal activation [J]. Pharmacology, 2011, 88(3/4): 159.
- [13] Lee K K, Omiya Y, Yuzurihara M, et al. Antinociceptive effect of paeoniflorin via spinal α_2 -adrenoceptor activation in diabetic mice [J]. Eur J Pain, 2011, 15(10): 1035.

[责任编辑 顾雪竹]