

芫花甘草不同配伍比例的 HPLC 指纹图谱探讨

王亮, 张振秋, 邓仕任, 夏林波*
(辽宁中医药大学, 辽宁 大连 110066)

[摘要] 目的:通过研究芫花甘草不同配伍比例的 HPLC 指纹图谱,探讨其化学成分的相互作用及变化趋势。方法:采用 HPLC 对芫花甘草不同配伍比例的指纹图谱进行比较,并用 HPLC-ESI-MS 对共有峰进行初步归属。结果:芫花甘草不同比例配伍对其中化学成分的溶出具有一定的规律性。随甘草比例升高,芹糖甘草苷、芹菜素 5-*O*- β -D 葡萄糖苷、芹糖异甘草苷、羟基芫花素、甘草酸的溶出降低;芹菜素-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷,在 1:1 配伍比例中溶出最多。结论:芫花甘草配伍后成分的溶出降低,从而可能降低其药理作用,从化学成分角度研究评价中药配伍禁忌提供思路和方法。

[关键词] 十八反; 芫花; 甘草; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)02-0080-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015020080

Research About HPLC Fingerprints of Genkwa Flos and Glycyrrhizae Radix with Different Compatibility Proportion WANG Liang, ZHANG Zhen-qiu, DENG Shi-ren, XIA Lin-bo* (Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 110066, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the interaction and changing trend of chemical composition in eighteen incompatible medicaments, Genkwa Flos and Glycyrrhizae Radix, with different compatibility using HPLC fingerprints. **Method:** The fingerprints of Genkwa Flos and Glycyrrhizae Radix with different compatibility proportion were analyzed by HPLC. Characteristic peaks were identified preliminarily based on the MS spectra and literature data. **Result:** The dissolution of liquiritin apioside, apigenin-5-*O*- β -D-glucoside, isoliquiritin apioside, hydroxy-genkwanin and glycyrrhizic acid were reduced with increase the proportion of Glycyrrhizae Radix. The dissolution of apigenin-7-*O*- β -D-glucuronide was reached the maximum value at 1:1 compatibility proportion. **Conclusion:** The dissolution of Genkwa Flos and Glycyrrhizae Radix reduced, thus may reduce its pharmacological action, provide the mentality and the method of evaluation of traditional Chinese medicine incompatibility from chemical angle.

[Key words] Genkwa Flos; Glycyrrhizae Radix; eighteen incompatible medicaments; HPLC

中药“十八反”是传统中药配伍禁忌理论的重要内容之一,是中药七情中“相反”配伍关系的具体体现,即两药合用后能产生毒性反应或副作用。现代认为,药物相反不仅包括产生毒性反应,也包括疗效的降低、消除或发生某些改变^[1]。《中国药典》从 1963 年开始在各版中均记载了中药“十八反”的内容,对反药规定为“不宜同用”^[2]。

中药“十八反”中芫花甘草反药组合主要是对药效的影响、导致毒性及药物代谢等药理毒理方面的研究^[3-5],对其化学成分方面的研究较少^[6-7],然而化学成分是药物发挥药效或产生毒性的关键。故本文从化学成分变化的角度对芫花甘草 6 个不同比

例配伍的指纹图谱进行研究,以期为进一步阐明十八反的科学性、合理性和必要性提供参考。

1 材料

1.1 仪器 1100 系列液相色谱-质谱联用仪(LC-DAD-MS 系统,电喷雾接口,HP Chemstation System 色谱工作站,美国 Agilent),AR2140 型电子分析天平(上海奥豪斯公司),AB135-S 型 1/10 万电子天平(瑞士 Mettler)。

1.2 试药 芫花饮片、甘草饮片均购于安徽亳州,经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定分别为芫花 *Daphne genkwa* 的干燥花蕾、甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 的干燥根及根茎;醋芫花按照《中国药典》

[收稿日期] 20140320(016)

[第一作者] 王亮,在读硕士,从事中药分析研究,Tel:15040638528,E-mail:15040638528@163.com

[通讯作者] *夏林波,博士,副教授,从事中药分析研究,Tel:0411-87586006,E-mail:xlbw@163.com

2010年版附录ⅡD项下醋炙法炮制。

芹糖甘草苷(批号20101108)、芹糖异甘草苷(批号20101108)对照品购自上海永恒生物科技有限公司,甘草酸对照品(批号20100730)购于上海融禾科技有限公司,甘草苷对照品(批号111610-200604)购自中国食品药品检定研究院;羟基芫花素对照品自制,经HPLC归一化法测定,纯度均>95%。乙腈(色谱纯,天津协和),冰乙酸(色谱纯,天津大茂),水为娃哈哈纯净水,醋(棒槌岛米醋,总酸含量 $\geq 4.0 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.8%冰乙酸(B)梯度洗脱(0~25 min, 13%~28% A, 25~30 min, 28%~39% A, 30~40 min, 39%~50% A),检测波长248 nm,流速1 mL \cdot min $^{-1}$,柱温25 $^{\circ}\text{C}$,进样量20 μL 。

2.2 质谱条件 电离源ESI,检测方式负离子模式,扫描范围 m/z 100~1 500,干燥气 N_2 ,流量9 L \cdot min $^{-1}$,干燥气温度320 $^{\circ}\text{C}$,毛细管电压3 500 V。

2.3 混合对照品及供试品溶液制备

2.3.1 混合对照品溶液 精密称取芹糖甘草苷、甘草苷、芹糖异甘草苷、甘草酸、羟基芫花素对照品适量,分别加甲醇制成996.3, 433.6, 145.0, 791.0, 135.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的单一对照品储备液,备用。依次精密量取上述对照品储备液0.080, 0.250, 0.300, 0.010, 0.300 mL置同一10 mL量瓶中,加甲醇制成含芹糖甘草苷、甘草苷、芹糖异甘草苷、甘草酸、羟基芫花素79.70, 108.4, 43.50, 7.910, 40.50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.3.2 芫花甘草合煎液 按以下配伍比例(芫花/醋芫花-甘草3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4),取芫花/醋芫花药材粉末(60目)1 g,甘草药材粉末分别为0.333, 0.5, 1, 2, 3, 4 g,精密称定,2种粉末混合均匀,置圆底烧瓶中,精密加入水50 mL,称定质量,加热回流提取1 h,放冷,再称定质量,加水补足缺失的质量,摇匀,离心5 min(10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$),取上清液经微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。

2.3.3 芫花、醋芫花、甘草单煎液 取芫花、醋芫花、甘草药材粉末各1 g,精密称定,按2.3.2项下同法制备,分别制得芫花、醋芫花、甘草各单煎液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一比例药对(芫花-甘草1:1)供试品溶液,按2.1项下色谱条件,连续进样6

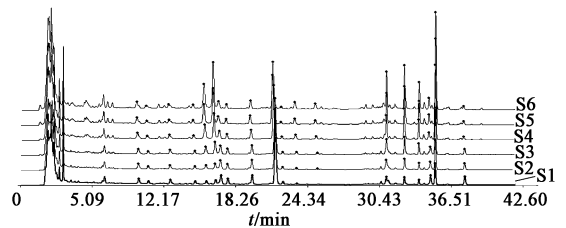
次,结果各主要色谱峰保留时间的RSD在0.1%~0.3%,各主要色谱峰峰面积的RSD在1.1%~2.5%。表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取同一比例药对(芫花-甘草1:1)供试品溶液,按2.1项下色谱条件分别在提取后0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h进行测定,结果各主要色谱峰保留时间的RSD在0.3%~0.5%,各主要色谱峰峰面积的RSD在1.4%~2.1%,表明供试液在24 h内稳定。

2.4.3 重复性试验 取同一批药对(芫花-甘草1:1)6份,按2.3.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件测定,结果各主要色谱峰保留时间的RSD在0.4%~0.9%,各主要色谱峰峰面积的RSD在1.1%~2.6%,表明方法重复性良好。

2.5 指纹图谱的分析

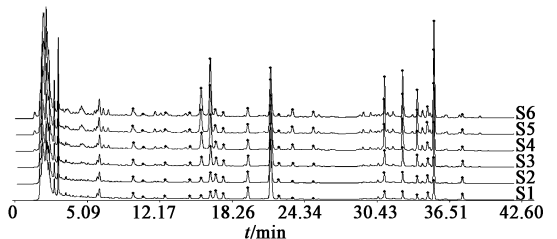
2.5.1 共有峰标定 分别取芫花/醋芫花-甘草6个比例的合煎液,按2.1项下色谱条件进样20 μL ,记录40 min色谱图。通过对6个比例的合煎液特征图谱的测定,比较其色谱图,确定了19个共有峰,见图1,2。



S1~S6. 芫花-甘草不同比例样品

图1 芫花甘草不同配伍比例的HPLC色谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of Genkwa Flos and Glycyrrhizae Radix with different compatibility proportion



S1~S6. 醋芫花-甘草不同比例样品

图2 醋芫花甘草不同配伍比例的HPLC

Fig. 2 HPLC fingerprints of Genkwa Flos processed and Glycyrrhizae Radix with different compatibility proportion

2.5.2 指纹峰的归属及认定 以芫花-甘草1:1为例,对指纹图谱峰进行归属,1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 17, 19号峰来自芫花,5, 6, 12, 13, 14, 15, 16, 18号峰来自甘草。其中5号峰为芹糖甘草苷,6号峰

为甘草苷,12 号峰为芹糖异甘草苷,18 号峰为甘草酸,19 号峰为羟基芫花素。根据本实验室前期研究^[10],得知 7 号峰为芹菜素-5-*O*- β -D-葡萄糖苷,9 号峰为芫花素-5-*O*- β -D-樱草糖苷,10 号峰为芹菜素-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷,11 号峰为芫花素-5-*O*- β -D-葡萄糖苷,17 号峰为芹菜素。

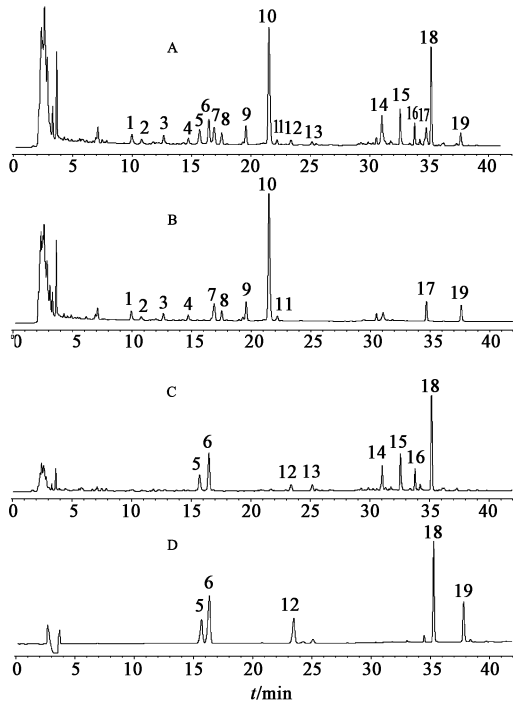


图 3 芫花甘草 1:1 (A)、芫花药材 (B)、甘草药材 (C)、混合对照品 (D) 指纹图谱

Fig. 3 HPLC fingerprints of Genkwa Flos and Glycyrrhizae Radix at 1:1 compatibility proportion (A), Genkwa Flos (B), Glycyrrhizae Radix (C), Hybrid reference substance (D)

3 小结与讨论

3.1 流动相及波长的选择 本实验对指纹图谱的流动相、波长进行了选择。分别考察了^[8]甲醇-水、乙腈-水、甲醇-水-冰乙酸和乙腈-水-冰乙酸,梯度洗脱,结果乙腈-水-冰乙酸对苷类成分的分离效果较好;本试验分别在 210,248,280,320 nm 波长下进行测定,结果表明检测波长 248 nm,色谱所包含的信息量大,各色谱峰分离较好,基线平稳。

3.2 指纹图谱分析 用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行单因素方差分析的多重比较 (LSD 法),芫花甘草用峰面积除以称样量进行组间比较,以 $P < 0.05$ 表示差异显著。

芫花无论醋炙与否,与甘草配伍后,黄酮类成分 5 号峰 (芹糖甘草苷),7 号峰 (芹菜素-5-*O*- β -D-葡萄糖苷),12 号峰 (芹糖异甘草苷),19 号峰 (羟基芫花素) 和三萜类皂苷 18 号峰 (甘草酸) 的溶出,随甘草

比例的增加,均呈下降趋势;黄酮类成分 10 号峰 (芹菜素-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷) 在 1:1 比例溶出最多。

随甘草比例的增加,芫花甘草中黄酮类成分 6 号峰 (甘草苷),9 号峰 (芫花素-5-*O*- β -D-樱草糖苷) 在 1:1 比例溶出最多;11 号峰 (芫花素-5-*O*- β -D-葡萄糖苷) 各比例间无显著性差异;17 号峰 (芹菜素) 溶出呈无规律变化。醋芫花甘草中除 17 号峰的溶出呈显著性上升趋势,其他成分均呈下降趋势。

芫花无论醋炙与否,与甘草合煎后 6 号峰、7 号峰、10 号峰、11 号峰、12 号峰、19 号峰的溶出显著减少,5 号峰的溶出无显著性差异。

芫花-甘草 1:1 合煎液与醋芫花-甘草 1:1 合煎液之间也存在差异,与甘草合煎后,芫花-甘草 1:1 合煎液中 9 号峰的溶出显著增加,17,18 号峰的溶出无明显变化;醋芫花-甘草 1:1 合煎液中,17,18 号峰的溶出显著减少,9 号峰的溶出无明显变化。

本实验研究发现芫花与甘草配伍后芫花甘草中黄酮类成分的溶出减少,产生这种差异的原因可能是芫花与甘草在煎煮过程中发生了一系列的化学变化,使得某些芫花甘草中成分发生了沉淀、络合等反应,使溶出降低。从而可能降低其药理作用,从化学成分角度研究评价中药配伍禁忌提供思路和方法。

[参考文献]

- [1] 高晓山,陈馥馨,刘源. 中药十八反研究 [M]. 北京: 中医古籍出版社,1991:6.
- [2] 张颖,苗明三. “十八反”文献与临床研究现状、存在问题及研究思路 [J]. 中医学报,2010,25(149):698.
- [3] 黄蓓蓓,李国锋,任非,等. 甘草与芫花对 P-糖蛋白底物罗丹明 123 经空肠黏膜透过性的影响 [J]. 中国中药杂志,2008,33(21):2521-2524.
- [4] 黄文权,罗羽. 甘草与甘遂、大戟、海藻、芫花配伍对大鼠心、肝、肾功能的影响 [J]. 中国临床康复,2004,8(18):3682-3686.
- [5] 徐芝秀,石苏英,金科涛,等. 甘草与海藻大戟芫花配伍对大鼠肝脏 CYP2E1 酶活性及 mRNA 表达的影响 [J]. 中国药物与临床,2007,7(7):493-496.
- [6] 陈艳琰,钱大玮,尚尔鑫,等. 基于化学成分相互作用探讨芫花与甘草配伍禁忌的机制 [J]. 药学学报,2012,47(8):1043-1048.
- [7] 石敏娟,王卫峰,李芳,等. “十八反”中药甘草芫花不同配伍方式的 HPLC 对比分析 [J]. 中华中医药学刊,2011,29(12):2784-2786.
- [8] 邓仕任,夏林波,董倩,等. 芫花药材的 HPLC 指纹图谱及 ESI-MS 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(24):32-35.

[责任编辑 顾雪竹]