

HPLC同时测定桂枝芍药知母汤中7个有效成分的含量

董运茁¹, 宋志前¹, 刘振丽¹, 刘元艳², 杜智勇¹, 宁张弛², 王淳^{1*}

(1. 中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700;

2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] **目的:**建立多波长同时测定桂枝芍药知母汤中芒果苷、芍药苷、升麻素苷、甘草苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、异甘草苷和甘草酸铵含量的方法。**方法:**采用HPLC法,Zorbax SB-C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.01%甲酸水梯度洗脱,流速1.0 mL·min⁻¹,检测波长250 nm(芒果苷),237 nm(芍药苷、升麻素苷、甘草酸铵),280 nm(甘草苷,5-*O*-甲基维斯阿米醇苷),355 nm(异甘草苷),柱温30℃。**结果:**芒果苷、芍药苷、升麻素苷、甘草苷和5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、异甘草苷、甘草酸铵进样量分别在0.264 8~2.648($r=0.999\ 9$),0.81~8.10($r=0.999\ 8$),0.230 4~2.304($r=0.999\ 9$),0.173~1.73($r=0.999\ 9$),0.115~1.15($r=0.999\ 8$),0.028 4~0.284($r=0.999\ 8$),0.252 4~2.524 μg($r=0.999\ 9$)与色谱峰面积呈良好的线性关系;加样回收率均在97.41%~102.0%,RSD均<3.0%。**结论:**该方法简单、准确,重复性好,为桂枝芍药知母汤物质基础研究提供了基础。

[关键词] 桂枝芍药知母汤; 芒果苷; 芍药苷; 升麻素苷; 甘草苷; 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷; 异甘草苷; 甘草酸铵

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)17-0028-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015170028

Simultaneous Determination of Seven Effective Components in Guizhi Shaoyao Zhimu Tang by HPLC

DONG Yun-zhuo¹, SONG Zhi-qian¹, LIU Zhen-li¹, LIU Yuan-yan², DU Zhi-yong¹, NING Zhang-chi², WANG Chun^{1*} (1. Institute of Basic Theory, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. School of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC multi-wavelength method for determination of mangiferin, paeoniflorin, prim-*O*-glucosylcimifugin, iquiritin, 5-*O*-methylvisamminol, isoliquiritoside and glycyrrhizic acid in Guizhi Shaoyao Zhimu Tang. **Method:** Zorbax SB-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was eluted with the mobile phase of acetonitrile-0.01% formic acid water in a gradient mode. The flow rate was 1 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 250 nm (mangiferin), 237 nm (paeoniflorin, prim-*O*-glucosylcimifugin, glycyrrhizic acid), 280 nm (iquiritin, 4'-*O*-β-glucopyranosyl-5-*O*-methylvisamminol), and 355 nm (isoliquiritoside). The column temperature was maintained at 30℃. **Result:** Mangiferin, paeoniflorin, prim-*O*-glucosylcimifugin, iquiritin, 5-*O*-methylvisamminol, isoliquiritoside and glycyrrhizic acid had a good linearity within the ranges of 0.264 8-2.648 ($r=0.999\ 9$), 0.81-8.10 ($r=0.999\ 8$), 0.230 4-2.304 ($r=0.999\ 9$), 0.173-1.73 ($r=0.999\ 9$), 0.115-1.15 ($r=0.999\ 8$), 0.028 4-0.284 ($r=0.999\ 8$), 0.252 4-2.524 μg ($r=0.999\ 9$), with the recoveries between 97.41%-102.0% and RSD < 3.0%. **Conclusion:** This method is simple, accurate and highly reproducible and can provide basis for studying material base of Guizhi Shaoyao Zhimu Tang.

[Key words] Guizhi Shaoyao Zhimu Tang; mangiferin; paeoniflorin; prim-*O*-glucosylcimifugin; iquiritin; 5-*O*-methylvisamminol; isoliquiritoside; glycyrrhizic acid

[收稿日期] 20140822(012)

[基金项目] 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(YZ-1323)

[第一作者] 董运茁,在读硕士,从事中药质量分析研究,Tel:15210690201,E-mail:dongyunzhuo@126.com

[通讯作者] *王淳,博士,助理研究员,从事中药药效物质基础和质量标准研究,Tel:010-64014411-2565,E-mail:chuner-2006@hotmail.com

桂枝芍药知母汤由桂枝、白芍、甘草、麻黄、生姜、白术、知母、防风、附子组成,始见于《金匮要略》,具有祛风除湿、温经散寒、滋阴清热之功效,是张仲景治疗风湿历节病的代表方剂,历来备受中医推崇^[1]。临床试验观察表明,其治疗活动期类风湿关节炎疗效快、副作用小,相比对照组甲氨蝶呤联合柳氮磺吡啶引起的恶心、上腹不适等消化道副作用,其治疗过程更易于被患者接受^[2]。同时,其化裁治疗能明显改善患者晨僵时间、关节压痛、血沉(ESR)和 C 反应蛋白(CRP)等临床症状和实验室指标,3 个月临床治疗后有效率为 96%,明显高于甲氨蝶呤联合扶他林对照组的有效率 76%^[1]。现代药理研究表明,桂枝芍药知母汤能显著抑制胶原诱导性关节炎(CIA)大鼠组织病理改变^[3],减轻 CIA 大鼠踝关节肿胀程度和关节炎指数,降低血清中异常升高的肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-1(IL-1)水平^[4]。基因水平上,桂枝芍药知母汤能调节 CIA 大鼠关节 RANKLmRNA 和 OPGmRNA 的表达水平,从而可能缓解或阻止关节的损伤^[5]。

目前未见有关桂枝芍药知母汤的物质基础研究相关报道。文献报道,白芍中主要有效成分芍药苷有抗炎作用和免疫调节作用^[6],抑制 CIA 大鼠成纤维滑膜细胞异常增殖,从而改善病情^[7-8]。防风中色原酮类成分升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷^[9]可通过降低核转录因子- κ B(NF- κ B)蛋白质水平来控制类风湿关节炎病情发展^[10]。芒果苷为知母的主要有效成分^[11],可通过调控白细胞 MAPK 通路中基因表达以及 ERK 蛋白磷酸化,降低慢性炎症大鼠血清趋化细胞因子水平,发挥抗脂多糖诱导的慢性炎症作用^[12]。甘草中总皂苷和总黄酮均有明显的抗炎活性^[13-14],主要包括甘草酸、甘草苷、异甘草苷、甘草素。本文建立了这些有效成分 HPLC 含量测定方法,从而为进一步深入研究本方物质基础提供依据。

1 材料

1.1 仪器 1100 系列高效液相色谱仪(包括 G1322A 型脱气机, G1311A 型四元泵, G1313A 型自动进样器, G1315B DAD 型检测器, G1316A 型恒温箱, HP 化学工作站, 美国 Agilent)。TCQ-250 型超声波清洗器(北京医疗设备二厂), CP225D 型电子天平(德国赛多利斯公司)。

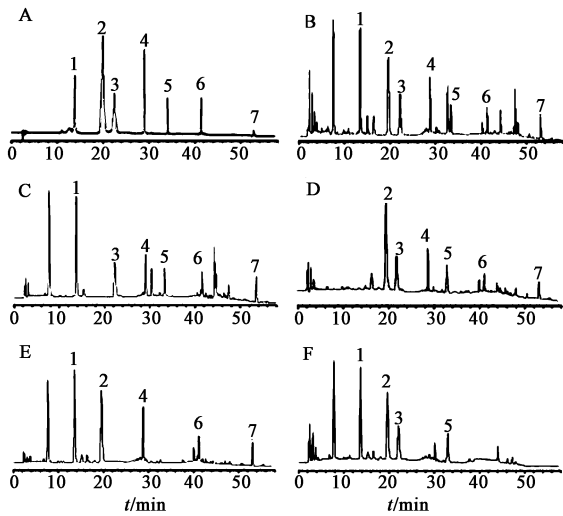
1.2 试药 芍药苷(批号 110736-200424), 甘草苷(批号 111610-200402), 甘草酸铵(批号 0731-9704), 芒果苷(批号 111607-200402)对照品购自于

中国食品药品检定研究院; 异甘草苷(MUST-11052613)对照品购自成都曼斯特有限公司; 升麻素苷(批号 130925), 5-O-甲基维斯阿米醇苷(批号 131015)对照品购自上海田源生物技术有限公司。药材饮片均购自北京仟草中药饮片有限公司, 生姜购自北京市场, 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* 的干燥嫩枝, 白芍(批号 121101009, 产地安徽)为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* 的干燥根, 知母(批号 130918003, 产地河北)为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* 的干燥根茎, 甘草(批号 130101012, 产地新疆)为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 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* 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* 的干燥根茎, 防风(批号 13070404003, 产地内蒙古)为伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata* 的干燥根, 黑顺片(批号 120103, 产地四川)为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* 的子根的加工品, 生姜为姜科植物姜 *Zingiber officinale* 的新鲜根茎; 按照《中国药典》方法检测, 药材均为符合《中国药典》2010 年版的规定品种。乙腈(色谱纯, 美国 Fisher), 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, 分别加入 8, 6, 6 倍量 70% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1 h, 合并提取液, 滤过, 减压浓缩, 于 60 °C 真空干燥后, 称重, 平行提取 3 次。计算浸膏粉平均得率 20.58%。

2.2 色谱条件 Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 0.01% 甲酸水(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 5 min, 10% B; 5 ~ 7 min, 10% ~ 13% B; 7 ~ 22 min, 13% B; 22 ~ 24 min, 13% ~ 19% B; 24 ~ 33 min, 19% ~ 20% B; 33 ~ 45 min, 20% ~ 35% B; 45 ~ 55 min, 35% ~ 42% B; 55 ~ 58 min, 42% B), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 依据各成分保留时间, 选取各成分最大吸收波长作为检测波长 250 nm(0 ~ 16 min, 芒果苷), 237 nm(16 ~ 24 min, 芍药苷、升麻素苷), 280 nm(24 ~ 36 min, 甘草苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷), 355 nm(36 ~ 42 min, 异甘草苷), 237 nm(42 ~ 58 min, 甘草酸铵), 柱温 30 °C。见图 1。



A. 对照品; B. 样品; C. 缺少芍药阴性样品; D. 缺少母阴性样品; E. 缺少防风阴性样品; F. 缺少甘草阴性样品; 1. 芒果苷; 2. 芍药苷; 3. 升麻素苷; 4. 甘草苷; 5. 5-O-甲基维斯阿米醇苷; 6. 异甘草苷; 7. 甘草酸铵
图 1 桂枝芍药知母汤 HPLC

Fig. 1 HPLC Chromatograms of Guizhi Shaoyao Zhimu Tang

2.3 混合对照品溶液的制备 分别取芒果苷、芍药苷、升麻素苷、甘草苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷、异甘草苷和甘草酸铵对照品适量,精密称定,加甲醇分别制成 1.324, 4.050, 1.152, 0.865, 0.575, 0.142, 1.262 g·L⁻¹ 的溶液,作为对照品储备液。分别精密吸取上述 7 个对照品储备液适量,混合,加甲醇制成 0.132 4, 0.405 0, 0.115 2, 0.086 5, 0.057 5, 0.014 2, 0.126 2 g·L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备 取提取物约 0.4 g,精密称定,加水 10 mL,超声处理 2 min,用三氯甲烷振摇提取 3 次,每次 20 mL,弃去三氯甲烷层,水层再用水饱和正丁醇振摇提取 5 次,每次 30 mL,合并正丁醇液,减压浓缩至干,残渣用甲醇溶解,转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.5 线性范围的试验 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,得芒果苷、芍药苷、升麻素苷、甘草苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷、异甘草苷和甘草酸铵的回归方程分别为 $Y = 3\,209.7X - 119.94 (r = 0.999\,9)$, $Y = 1\,139.6X + 141.27 (r = 0.999\,8)$, $Y = 1\,887X + 29.09 (r = 0.999\,9)$, $Y = 1\,615.8X + 8.933\,4 (r = 0.999\,9)$, $Y = 2\,474.2X + 111.37 (r = 0.999\,8)$, $Y = 3\,950X - 6.434\,2 (r = 0.999\,8)$, $Y = 596.87X - 73.363 (r = 0.999\,9)$; 线性范围分别为 0.264 8 ~

2.648, 0.81 ~ 8.10, 0.230 4 ~ 2.304, 0.173 ~ 1.73, 0.115 ~ 1.15, 0.028 4 ~ 0.284, 0.252 4 ~ 2.524 μg。

2.6 精密度试验 精密吸取提取物 1 制备的供试品溶液,连续进样 6 次,测得芒果苷、芍药苷、升麻素苷、甘草苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷、异甘草苷和甘草酸铵峰面积积分值的 RSD 分别为 0.8%, 0.2%, 0.6%, 0.9%, 0.9%, 0.7%, 0.7%, 表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验 取提取物 1 约 0.40 g, 6 份,精密称定,按 2.4 项下方法制备成供试品溶液,分别进行测定,计算含量。提取物中芒果苷、芍药苷、升麻素苷、甘草苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷、异甘草苷、甘草酸铵的 RSD 分别为 2.2%, 2.2%, 2.1%, 2.2%, 2.0%, 2.3%, 2.1%, 表明重复性良好。

2.8 稳定性试验 取提取物 1 约 0.40 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,测得芒果苷、芍药苷、升麻素苷、甘草苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷、异甘草苷、甘草酸铵峰面积积分值的 RSD 分别为 1.4%, 1.0%, 1.6%, 1.4%, 1.2%, 1.9%, 1.4%, 符合要求,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.9 回收率试验 取提取物 1 约 0.2 g, 6 份,精密称定,分别精密加入芒果苷、芍药苷、升麻素苷、甘草苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷、异甘草苷和甘草酸铵对照品适量,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,结果见表 1。

2.10 含量测定 分别取桂枝芍药知母汤提取物 3 批,按 2.4 项下方法制备,测定 7 种成分含量,结果见表 2。

3 讨论

3.1 供试品溶液制备 前期研究表明,70% 乙醇是提取桂枝芍药知母汤中有效成分的最佳溶剂。因此,选择 70% 乙醇进行提取,得到提取物。本文测定的提取物中 7 个成分均为极性较大的成分,由于处方组成药味较多,因此在供试品溶液制备中考察了提取物用水超声处理后依次用乙酸乙酯、正丁醇萃取和依次用三氯甲烷、正丁醇萃取的方法,结果显示依次用三氯甲烷、正丁醇萃取效果较好,三氯甲烷层可以去掉脂溶性杂质,而测定的 7 个成分保留在水相,再进一步采用正丁醇提取,待测成分转移到正丁醇层,与水层极性更强的杂质成分分开,可取得良好的液相分离效果,并保护色谱柱,缩短分析时间。对三氯甲烷和正丁醇振摇提取次数进行考察,结果显示三氯甲烷提取 3 次可以除去脂溶性杂质,正丁醇提取 5 次可将待测成分提取完全。

表1 桂枝芍药知母汤中7种成分加样回收率试验 (n=6)

Table 1 Results of recovery tests of seven components in Guizhi Shaoyao Zhimu Tang (n=6)

成分	称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	平均回收率/%	RSD/%
芒果苷	0.217 75	0.985	0.993	1.973	99.55	1.4
芍药苷	0.220 53	3.909	4.050	7.923	99.12	0.8
升麻素苷	0.214 03	0.577	0.576	1.145	99.09	0.9
甘草苷	0.217 51	0.493	0.433	0.920	99.59	2.0
5-O-甲基维斯阿米醇苷	0.216 90	0.204	0.23	0.431 1	99.78	1.2
异甘草苷	0.219 30	0.079 0	0.071	0.151 2	99.66	1.3
甘草酸铵	0.218 20	0.849 5	0.883 4	1.743	98.79	1.2

表2 桂枝芍药知母汤中7种成分含量

Table 2 Contents of seven components in Guizhi Shaoyao Zhimu Tang

批次	芒果苷	芍药苷	升麻素苷	甘草苷	5-O-甲基维斯阿米醇苷	异甘草苷	甘草酸铵
提取物1	4.522	17.95	2.615	2.237	0.924 7	0.358 2	3.852
提取物2	4.350	18.23	2.780	2.351	0.977 7	0.352 9	3.790
提取物3	4.674	19.32	2.632	2.150	0.915 4	0.367 7	4.019

3.2 液相色谱条件的优化 考察了乙腈-水、甲醇-水和乙腈-不同浓度甲酸水的流动相体系,选择乙腈-0.01%甲酸水可有效的改善峰形,提高分离度。复方中芍药苷和升麻素苷很难分离,故选择在等度条件下,通过延长保留时间,增加芍药苷的分离度。甘草苷与杂质峰很难分离,故选择在24~33 min内将流动相中乙腈的比例从19%升至20%,使甘草苷得到较好的分离。

3.3 检测波长的选择 本实验测定的桂枝芍药知母汤中7个成分的化合物类型不同,为保证各成分在最大吸收波长处检测,利用二极管阵列检测器波长切换的功能,克服了部分成分在某些波长条件响应值低的缺点。在各物质有较好响应值的基础上,结合各成分出峰保留时间和最大吸收波长,设定不同时间的检测波长。

[参考文献]

[1] 吕安定. 桂芍知母汤化痰辨治类风湿关节炎疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2014, 23(4): 393-394.

[2] 余建华, 张衡. 桂枝芍药知母汤治疗活动期类风湿关节炎72例临床观察[J]. 江苏中医药, 2010, 42(5): 37-39.

[3] 陈华, 何晓瑾, 徐桂华. 桂枝芍药知母汤对II型胶原关节炎大鼠踝关节组织病理改变的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2012, 18(5): 555-556.

[4] 赵慧, 顾立刚, 陈小军, 等. 桂枝芍药知母汤对II型胶原诱导性关节炎大鼠血清肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素 1β 活性的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(11): 27-29.

[5] 虞佳乐, 张杰. 桂枝芍药知母汤对II型胶原蛋白诱导性关节炎大鼠RANKL/OPG水平的影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(6): 24-25.

[6] Cao W, Zhang W, Liu J, et al. Paeoniflorin improves survival in LPS-challenged mice through the suppression of TNF- α and IL-1 β release and augmentation of IL-10 production [J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(2): 172-178.

[7] Jia X, Chang Y, Sun X, et al. Total glucosides of paeony inhibit the proliferation of fibroblast-like synoviocytes through the regulation of G proteins in rats with collagen-induced arthritis [J]. Int Immunopharmacol, 2014, 18(1): 1-6.

[8] Wang Q, Zhang L, Wu H, et al. The expression change of β -arrestins in fibroblast-like synoviocytes from rats with collagen-induced arthritis and the effect of total glucosides of paeony [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 133(2): 511-516.

[9] 赵博, 杨鑫宝, 杨秀伟, 等. 防风化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(12): 1569-1572.

[10] Kong X, Liu C, Zhang C, et al. The suppressive effects of Saposhnikovia divaricata (Fangfeng) chromone extract on rheumatoid arthritis via inhibition of nuclear factor- κ B and mitogen activated protein kinases activation on collagen-induced arthritis model [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 148(3): 842-850.

[11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.

[12] 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.

[13] 杨晓露, 刘朵, 卞卡, 等. 甘草总黄酮及其成分体外抗炎活性及机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(1): 99-104.

[14] 李晓红, 齐云, 蔡润兰, 等. 甘草总皂苷抗炎作用机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5): 110-113.

[责任编辑 顾雪竹]