

# 高效液相色谱法测定枳实-白芍配伍的化学成分变化

陈稚<sup>1,2</sup>, 陈家仪<sup>1</sup>, 贾薇<sup>1</sup>, 崔妙仪<sup>1</sup>, 陈楚源<sup>1</sup>, 关锦涛<sup>1</sup>, 曾元儿<sup>1</sup>, 江滨<sup>1\*</sup>

(1. 广州中医药大学中药学院, 广州 510006; 2. 广东医学院分析中心, 广东 东莞 523808)

**[摘要]** 目的: 研究枳实和白芍配伍后化学成分在质和量上的变化。方法: 采用 HPLC 比较枳实-白芍单煎液与合煎液中各成分的变化, 色谱柱为 Synchronis-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温 25 °C, 流动相乙腈-0.3% 磷酸水溶液, 检测波长 230 nm。结果: 方法学考察表明, 所用色谱条件符合定性和定量研究要求, 确定了 19 个共有峰, 并初步对各共有峰进行归属判断, 其中 8 个成分含量增加, 而 9 个成分含量降低。枳实-白芍配伍后化学成分没有发生质的改变, 但含量上发生了显著变化。结论: 中药复方的配伍并不是单味中药的简单相加, 而是有一定科学依据的。

**[关键词]** 高效液相色谱法; 枳实; 白芍; 配伍; 化学成分

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0138-04

## Changes of Chemical Components in Compatibility of Citrus Aurantium with Paeoniae Radix Alba

CHEN Zhi<sup>1,2</sup>, CHEN Jia-yi<sup>1</sup>, JIA Wei<sup>1</sup>, CUI Miao-yi<sup>1</sup>, CHEN Chu-yuan<sup>1</sup>,  
GUAN Jin-tao<sup>1</sup>, ZENG Yuan-er<sup>1</sup>, JIANG Bin<sup>1\*</sup>

(1. School of Chinese Herbal Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;  
2. Center of Analysis, Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the changes of quality and quantity of chemical components in compatibility of Zhishi Shaoyao Powder. **Method:** HPLC was used to determine and analyze the peaks change of chemical components of single and co-decoction. The determination of Fructus Aurantii Immaturus and Radix Paeoniae Alba was performed on Synchronis-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.3% phosphoric-water at detection wavelength of 230 nm. **Result:** Nineteen peaks were selected as the fingerprint peaks. It was found that eight ingredients were increased and nine were decreased. This indicated that some changed more in all chemical components of co-decoction than single decoction. **Conclusion:** The compatibility of traditional Chinese medicine is not the simple adding of single herbs, but it includes some scientific base.

**[Key words]** HPLC; Fructus Aurantii Immaturus; Radix Paeoniae Alba; compatibility; chemical component

中药复方配伍理论是历代医家临床遣方用药的经验凝结, 并升华成为中医药独特的理论<sup>[1]</sup>。近年来, 随着现代科学技术的发展, 人们多从分析中药复方的作用机制和药效物质基础方面入手<sup>[2-4]</sup>, 探索中药复方配伍理论, 并取得一定的成绩和进展, 但人

们对复方化学成分的研究较少<sup>[5-7]</sup>。通过探讨复方制剂配伍后化学成分的变化规律, 对指导处方优化, 提高制剂的质量具有重要的意义<sup>[8-11]</sup>。

枳芍散来自《金匱要略》的一首经方<sup>[12]</sup>, 枳实-白芍是方中主要的药对, 本方药虽两味, 却立法森严, 寓意深刻。本实验选用枳实和白芍这一常用药对作为研究对象, 取药材等分(古方比例 1:1), 用水煎煮的方法, 对枳芍散及两种单味药的比较分析建立一种统一的高效液相色谱分析方法, 并采用峰面积比值法来研究中药复方及其单味药全成分变化,

**[收稿日期]** 20120423(017)

**[第一作者]** 陈稚, 讲师, 在职博士, 从事中药质量分析研究, Tel: 13560257266, E-mail: cz122@126.com

**[通讯作者]** \* 江滨, 教授, 博士生导师, E-mail: gzjiangbin@hotmail.com

尝试从化学的角度阐明复方的配伍规律和指标性成分的变化。

## 1 材料

**1.1 试药** 枳实药材(批号 110220)和白芍药材(批号 110601)(购于广州致信中药饮片有限公司)均由广州中医药大学中药鉴定教研室黄海波副教授鉴定。新橙皮苷对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号 201004);橙皮苷对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号 201105);柚皮苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110722-200610);芍药苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110736-201035);乙腈(一级色谱纯,天津市四友精细化工品有限公司)。其他试剂均为分析纯;超纯水(由 AQUAPRO 高端超纯水系统制得)。

**1.2 仪器** CTO-10AS 柱温箱(日本岛津仪器有限公司),LC-20AT/DGU-20A5 高压四元泵带真空脱气机(日本岛津仪器有限公司),SPD-M20A 可变波长紫外检测器(日本岛津仪器有限公司),LC-solution 色谱工作站(日本岛津仪器有限公司),AEG-220 型分析天平(SHIMADZU),HH.SY21-NI8 型二列八孔电热恒温水浴锅。

## 2 方法

**2.1 色谱条件** Thermo 分析仪器有限公司 Synchronis-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温 25 °C,流动相 A. 乙腈, B. 0.3% 磷酸水溶液,梯度洗脱,洗脱程序见表 1。检测波长 230 nm,流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,色谱柱温度 25 °C,进样量 10 μL。

表 1 梯度洗脱条件

t/min	乙腈/%	0.3% 磷酸水液/%
0.01 ~ 7	8 ~ 8	92 ~ 92
7 ~ 14	8 ~ 15	92 ~ 85
14 ~ 35	15 ~ 20	85 ~ 80
35 ~ 45	20 ~ 22	80 ~ 78
45 ~ 50	22 ~ 8	78 ~ 92
50 ~ 60	8 ~ 8	92 ~ 92

**2.2 对照品溶液的制备** 辛弗林溶液:取辛弗林对照品适量,精密称定,用甲醇稀释至每 1 mL 含辛弗林 7.49 μg,即得。芍药苷溶液:取芍药苷对照品适量,精密称定,用甲醇稀释至每 1 mL 含芍药苷 719.6 μg,即得。柚皮苷溶液:取柚皮苷对照品适量,精密称定,用甲醇稀释至每 1 mL 含柚皮苷 2 103 μg,即得。橙皮苷溶液:取橙皮苷对照品适量,精密称定,用甲醇稀释至每 1 mL 含橙皮苷 320 μg,即得。新橙皮

苷溶液:取新橙皮苷对照品适量,精密称定,用甲醇稀释至每 1 mL 含新橙皮苷 601.6 μg,即得。

**2.3 混合对照品溶液的制备** 分别精密移取辛弗林、芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷对照品溶液 0.09, 0.8, 0.9, 1.0, 6.0 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

**2.4 供试品溶液制备** ①取枳实、芍药粉末各 2.5 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,加入 100 mL 蒸馏水,称重,在 100 °C 下加热回流 1 h,提取 1 次,放冷后称重,并用蒸馏水补重,摇匀,过滤,再取 1 mL 续滤液用蒸馏水定容至 10 mL,过 0.45 μm 的微孔滤膜,即得。②枳实单煎液:取枳实粉末约 2.5 g,精密称定,处理方法同上。③白芍单煎液:取芍药中粉约 2.5 g,精密称定,处理方法同上。

## 2.5 方法学考察

**2.5.1 精密度试验** 取同一供试品溶液按 2.1 项下色谱条件,连续 6 次进样,分别以芍药苷峰的保留时间和峰面积为 1,结果其共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3%,表明仪器精密度良好。

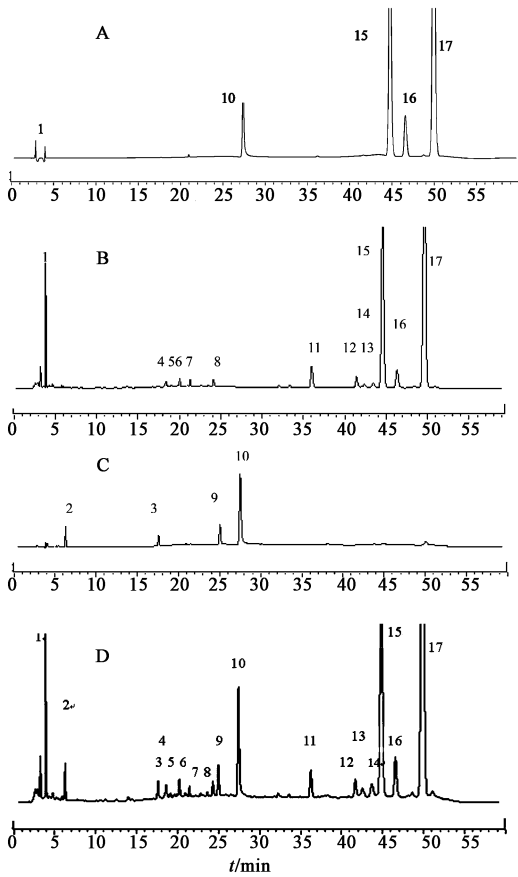
**2.5.2 稳定性试验** 取同一供试品溶液按 2.1 项下色谱条件,分别在 0, 3, 6, 9, 12, 24 h 进行测定,分别以芍药苷峰的保留时间和峰面积为 1,结果其共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3%,表明供试品在 24 h 内稳定。

**2.5.3 重复性试验** 取同一批枳实、白芍药材按 2.4 项下方法制备供试品溶液,平行 6 份,按 2.1 项下色谱条件进行测定,记录指纹图谱,分别以芍药苷峰的保留时间和峰面积为 1,结果其共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3%,表明本方法有较好的重复性。

**2.6 峰归属的确定** 通过比较枳实-白芍单煎液和合煎液的色谱图,可分辨出合煎液色谱图中各峰在单煎液色谱图中的归属。利用保留时间可确定全方中的峰 1, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 等共 13 个峰来自枳实,峰 2, 3, 9, 10 等共 4 个峰来自芍药。

**2.7 化学成分含量的变化** 复方能够起疗效主要是由于其所含的化学成分的作用,通过研究枳实-白芍单煎液及合煎液中化学成分含量的变化,有助于阐明其药效作用物质基础的变化规律。

分别取 2.4 项下的供试品溶液,按供试品溶液制备方法,分别得到枳实(ZS)、白芍(BS)和全方配伍(QF)的供试品溶液,分别取 10 μL,进高效液相



1. 辛弗林, 10. 芍药苷, 15. 柚皮苷, 16. 橙皮苷, 17. 新橙皮苷

图 1 混合对照品(A), 枳实(B), 白芍(C), 全方样品(D)的 HPLC 色谱仪, 所得色谱图积分后, 采用峰面积比值法比较枳实、白芍及全方配伍前后化学成分的含量变化。

将枳实(ZS)、白芍(BS)和全方配伍(QF)样品的色谱图分别进行积分, 在 2.6 枳实和白芍在全方中各峰归属项对峰进行归属的基础上, 选择全方配伍样品(QF)为参照, 将枳实(ZS)、白芍(BS)色谱图中的色谱峰的峰面积分别与全方配伍样品(QF)色谱图中的 17 个目标峰中对应的峰面积进行比较, 枳实(ZS)样品对应目标峰与全方配伍样品(QF)对应目标峰的峰面积比值  $A_{ZS}/A_{QF}$  以及白芍(BS)样品目标峰与全方配伍样品(QF)对应目标峰的峰面积比值  $A_{BS}/A_{QF}$  列于表 2。  $A_{ZS}/A_{QF}$  和  $A_{BS}/A_{QF}$  可以分别表示 QF 中源于枳实和源于白芍的化学成分的含量变化。

从表 2 可以看出, 通过峰面积的比较, 表明在配伍前后都是发生了变化的。其中 8 个峰的峰面积增加 ( $A_{ZS}/A_{QF} < 1$  或  $A_{BS}/A_{QF} < 1$ ), 而 9 个峰的峰面积降低 ( $A_{ZS}/A_{QF} > 1$  或  $A_{BS}/A_{QF} > 1$ ), 峰面积增加的峰有峰 2~5, 13~14, 16~17; 峰面积降低的峰有峰 1, 6~12, 15。

表 2 枳实、白芍与全方样品相应峰面积之比

No.	$A_{ZS}/A_{QF}$	$A_{BS}/A_{QF}$
1	1.031	-
2	-	0.690
3	-	0.687
4	0.096	-
5	0.911	-
6	1.037	-
7	1.353	-
8	1.184	-
9	-	2.586
10	-	6.055
11	1.548	-
12	1.087	-
13	0.636	-
14	0.465	-
15	1.213	-
16	0.727	-
17	0.887	-

### 3 讨论

枳芍散配伍前后化学成分分析的结果说明。全方配伍后, 大部分成分的含量都发生了变化, 且含量发生变化的化学成分中有些成分的含量是增加的, 全方配伍可能对药物的溶出度有影响。

通过与混合标准溶液的色谱图的保留时间相比较, 得知峰 1, 10, 15, 16, 17 分别对应的成分为辛弗林、芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷(图 1)。现代药理研究亦证实, 枳实含黄酮类、挥发油、生物碱等主要成分, 其味苦性刚, 主降泄而破气消滞, 调理气机。白芍含芍药苷、挥发油、苯甲酸等成分, 其性柔味酸, 主敛收而养血柔肝, 长于缓急止痛, 故常以白芍配枳实, 一者入血养血, 一者入气行气导滞, 共奏行气和血止痛之功。

本文摆脱了近几年来中药复方配伍的化学成分研究主要集中在配伍前后少数几个化学成分的定量分析<sup>[13-15]</sup>的局限, 全面的反映配伍后化学成分的变化, 这对于理解中药复方枳芍散治病原理, 丰富和发展枳芍散的临证应用都有着重要的意义。

### 【参考文献】

[1] 范颖. 中药复方现代化研究的现状与基本思路[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(6):63.  
 [2] 殷文光, 李曼玲, 刘淑芝. 中药复方药动学研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(12):60.  
 [3] 罗芬, 池玉梅, 吴皓. 中药代谢动力学研究概述[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(14):284.  
 [4] 王莉梅, 金向群. 中药血清化学在中药及中药复方研究中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(1):77.

# 王不留行毛状根的诱导及培养

张海弢, 包京姍, 杨世海\*, 付娟, 马玲

(吉林农业大学中药材学院, 长春 130118)

**[摘要]** 目的: 利用4种发根农杆菌 R15834, R1601, R1000, A4 诱导药用植物王不留行产生毛状根, 建立王不留行的毛状根培养体系。方法: 采用共培养法研究不同外植体、菌株、外源激素、侵染时间、预培养时间和共培养时间对王不留行毛状根诱导率的影响。结果: 用王不留行叶片作为外植体, 外植体预培养 60 h, 共培养 48 h, 发根农杆菌 R1601 侵染 10 min, 培养基中添加  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  吲哚丁酸(IBA) 转化率最高。结论: 王不留行毛状根诱导成功, 为其遗传转化提供了依据。

**[关键词]** 王不留行; 发根农杆菌; 毛状根; 诱导率

**[中图分类号]** R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0141-04

## Induction and Culture of Hairy Roots of *Vaccaria segetalis*

ZHANG Hai-tao, BAO Jing-shan, YANG Shi-hai\*, FU Juan, MA Ling

(College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

**[Abstract]** **Objective:** Hairy root of *Vaccaria segetalis* were induced by the infection of four *Agrobacterium rhizogenes* strains R15834, R1601, R1000, A4 and an *in vitro* culture system of the hairy roots was established. **Method:** Hairy roots were induced by co-culture. Effects of explants, *A. rhizogenes*, exogenous phytohormones, infecting time, pre-culture time and co-culture time on growth of hairy root were studied. **Result:** The highest induction frequency was obtained from blade leaves with 60 h pre-culture and 48 h co-culture which were induced by R1601 for 10 mins. The transformation frequency could be raised by culture media with  $0.1$

**[收稿日期]** 20120509(013)

**[基金项目]** 中国博士后科学基金项目(20090461042)

**[第一作者]** 张海弢, 硕士, Tel: 13610730639, E-mail: zht716@126.com

**[通讯作者]** \* 杨世海, 博士, 教授, 博士生导师, E-mail: jlyangs@163.com

- [5] 马悦颖, 李沧海, 李兰芳, 等. 关于中药复方研究的几点思考[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 11(12):68.
- [6] 刘良. 中药复方基础研究的思路与方法探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 6(4):1.
- [7] 马春涛, 雷燕. 中药复方效应物质基础的研究进展及展望[J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(3):46.
- [8] 李雅杰. 关于中药配伍的探讨[J]. 中医中药, 2012, 4:141.
- [9] 陈廷卓, 刘慧君. 论中药配伍与疗效[J]. 陕西中药, 2011, 32(5):616.
- [10] 陈建萍, 吴伟康, 张敏生, 等. 中药复方配伍规律研究的思路与方法[J]. 中国实验方剂学杂志, 2000, 6(1):1.
- [11] 赵琰, 屈会化, 王庆国. 复方配伍实验研究的问题与展望[J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(1):51.
- [12] 叶腾辉. 论《金匱要略》治疗妇人妊娠产后腹痛[J]. 四川中医, 2003, 21(8):8.
- [13] 何俊, 廖茂梁, 郝子博, 等. 配伍对三拗汤煎液中5种成分煎出量及指纹图谱的影响[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(1):86.
- [14] 毛幼儿, 周桂芬. 大黄与芒硝药对不同比例配伍对蒽醌苷含量的影响[J]. 时珍国医国药, 2011, 42(338):60.
- [15] 朱永智, 陈鸿英, 张桂贤, 等. 白芍与柴胡不同比例配伍白芍总苷及苯甲酸水煎出量的比较[J]. 天津中医药, 2011, 28(1):78.

[责任编辑 顾雪竹]