

UPLC 研究白虎汤不同配伍对芒果苷含量的影响

卢林¹, 吴君金¹, 马强¹, 李晓晶², 顾丽², 盛振华¹, 葛尔宁¹, 苏燕^{2*}

(1. 浙江中医药大学 分析测试中心 杭州 310053;

2. 内蒙古科技大学包头医学院 基础学院, 内蒙古 包头 014060)

[摘要] 目的:建立超高效液相色谱(UPLC)测定白虎汤中芒果苷含量的方法,研究不同配伍对汤剂中芒果苷含量的影响。方法:采用 $L_8(2^7)$ 正交设计,以 UPLC 测定白虎汤中芒果苷含量。结果:配伍降低了药液中芒果苷含量,粳米对芒果苷含量的影响存在显著性($P < 0.05$),石膏、甘草降低了芒果苷含量,但影响不显著,两两交互作用对芒果苷含量影响不显著。结论:采用 UPLC 测定白虎汤中芒果苷的含量,简单快捷,结果可靠,可作为白虎汤中芒果苷含量的检测方法;粳米降低了复方药液中芒果苷的含量。

[关键词] 超高效液相色谱;芒果苷;白虎汤;配伍

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)09-0035-03

Effects of Compatibility on Content of Mangiferin in Baihu Decoction by UPLC

LU Lin¹, WU Jun-jin¹, MA Qiang¹, LI Xiao-jing², GU Li², SHENG Zhen-hua¹, GE Er-ning¹, SU Yan^{2*}

(1. Analytical Testing Center, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

2. Basic Medical College, Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science & Technology, Baotou 014060, China)

[Abstract] **Objective:** To set up the quantitative method of mangiferin in decoctions prepared from various combinations of Baihu decoction by UPLC and to study the changes of mangiferin in eight decoctions. **Method:** Different decoctions were prepared and analyzed by $L_8(2^7)$ orthogonal design, the content of mangiferin in each decoction was determined by UPLC. **Result:** The mangiferin content was decreased when Rhizoma Anemarrhenae compatible with other herbs. For rice, the difference of mangiferin was significant ($P < 0.05$), for Gypsum, Licorice, the influence was insignificant, and the interactions between two of three were insignificant too. **Conclusion:** The mangiferin in Baihu decoction could be determined by UPLC. The methods were simple and rapid, and suitable for the quality control of Baihu decoction. The content of mangiferin in decoction was reduced by rice.

[Key words] UPLC; mangiferin; Baihu decoction; compatibility

白虎汤出自汉代医圣张仲景的《伤寒论》,由石膏、知母、甘草、粳米 4 味药组成,主治阳明、气分热盛证,具有清热生津的功效^[1]。目前对白虎汤的药

理作用研究较多^[2-6],但对配伍引起的主要化学成分的变化报道较少,主要集中在不同配伍对君药石膏中钙离子(Ca^{2+})溶出量影响的研究上^[7-8]。中药汤剂在煎煮过程中,各药味的成分相互影响,产生助溶或沉淀等现象,使中药汤剂中有效成分的煎出率产生变化,直接影响中药汤剂在临床上的疗效。因此本实验将白虎汤中 4 味药进行不同配伍后,采用分煎与合煎的方法考察芒果苷的含量变化。

超高效液相色谱(UPLC)是以 $1.7 \mu m$ 填料作为

[收稿日期] 20101214(004)

[基金项目] 教育部科学技术研究重点项目(210039);内蒙古自然科学基金(200711020913)

[通讯作者] * 苏燕,教授,医学博士,从事中药药理研究,Tel: 0472-7167841, E-mail: synmg@126.com

固定相,使色谱柱获得了更高的柱效,而且在较宽的流速范围内柱效保持恒定,通过提高流动相的流速而缩短分析时间,提高分析通量,有利于复杂样品的分离。相对于普通 HPLC 而言,UPLC 有更好的分离效率、峰容量以及灵敏度^[9-11]。本实验通过使用 UPLC 研究不同配伍对芒果苷含量的影响,为深入研究白虎汤的配伍规律、作用机制及今后开发此方等提供参考。

1 材料

Waters Acquity™ Ultra performance LC 色谱仪,Acquity™ TUV 检测器,Empower 工作站,AB135-S 型电子分析天平(瑞士 Mettler 公司),5702 型离心机(德国 Eppendorf 公司)。芒果苷对照品购自美国 SIGMA 公司(批号 89K1150),色谱纯乙腈,超纯水,分析纯磷酸。

石膏为单斜晶系含水硫酸钙($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)的矿石,甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根茎,知母为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bge. 的干燥根茎,粳米为禾本科植物稻 *Oryza sativa* L. 的种仁。石膏、知母、炙甘草购自浙江中医药大学中药饮片厂,粳米购于市场,经浙江中医药大学葛尔宁研究员鉴定。

2 方法与结果

2.1 白虎汤中芒果苷含量的测定

2.1.1 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸(15:85),检测波长 258 nm,流速 0.3 mL·min⁻¹,柱温 35 °C。

2.1.2 标准曲线 精密称定芒果苷对照品 11.3 mg,置 100 mL 量瓶中,用 50% 甲醇溶解定容即得标准品溶液。依次进样 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 μL 标准品溶液,以进样量(X)为横坐标,含量(Y)为纵坐标,求得回归方程 $Y = 1.26 \times 10^7 X - 2.29 \times 10^3$ ($r = 0.9999$),表明进样量在 0.022 6 ~ 0.135 6 μg 线性关系良好。

2.1.3 供试品溶液及阴性溶液的制备 按处方剂量(石膏 50 g,知母 18 g,甘草 6 g,粳米 9 g)称取各配伍组及阴性对照组所需药材各 3 份,加水 500 mL,于烧杯中浸泡 30 min,然后煮沸 20 min,纱布过滤,定容至 500 mL,精密移取 1 mL 药液定容至 10 mL,取适量药液,3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,0.22 μm 微孔滤膜过滤后加入进样瓶中,依次进样 1 μL ,

计算白虎汤复方汤剂药液中芒果苷平均含量为 103.53 mg/剂,RSD 1.34% ($n = 3$),色谱图见图 1。

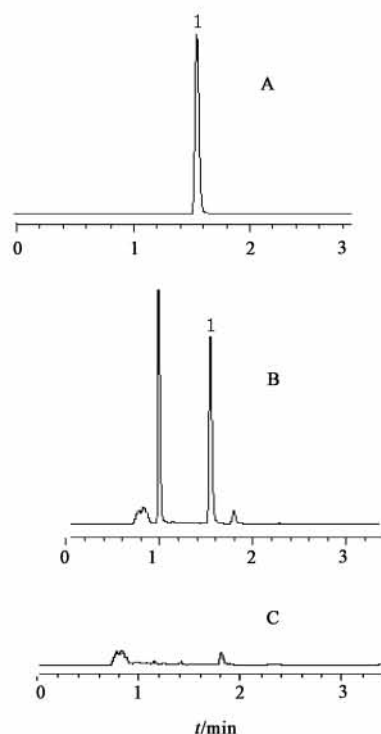


图 1 白虎汤 UPLC

A. 对照品;B. 样品;C. 缺知母阴性对照;1. 芒果苷

2.1.4 精密度试验 取同一含量测定白虎汤复方药液,重复进样 6 次,测定芒果苷峰面积 RSD 0.41%。

2.1.5 稳定性试验 取同一含量测定白虎汤复方药液,在配制后 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样,测定芒果苷峰面积 RSD 0.37%,表明 24 h 内溶液稳定。

2.1.6 重现性试验 取同一批号药品饮片平行制备 5 份白虎汤复方药液,按 2.1.3 项下方法制备供试品,测定芒果苷峰面积 RSD 2.58%。

2.1.7 加样回收率 从上文 2.1.3 项定容至 500 mL 白虎汤复方药液(其中芒果苷含量为 0.214 g·L⁻¹)中平行精密吸取白虎汤复方药液 1 mL,分别加入 1.044 g·L⁻¹ 的芒果苷对照品溶液 0.20 mL,按照上文 2.1.3 项下“定容至 10 mL……”起同法操作,测定,结果平均回收率为 98.23%,RSD 1.87% ($n = 6$)。

2.2 配伍对白虎汤中芒果苷含量的影响

2.2.1 $L_9(2^7)$ 配伍的正交设计 选石膏、甘草、粳米作为 3 个因素,选用药和不用药为 2 个水平,同时考虑两两交互作用,因素水平见表 1。

表1 配伍正交设计因素水平

水平	A 石膏	B 甘草	C 粳米
1	+	+	+
2	-	-	-

注:“+”表示组成中有该项,“-”表示组成中无该项。

2.2.2 试验安排及结果分析 按照 $L_8(2^7)$ 正交设计安排试验,实验安排见表2,得到8组药液,方差分析见表3。

表2 处方配伍 $L_8(2^7)$ 正交试验设计

No.	配伍	芒果苷/mg/剂
1	白虎汤复方	103.53
2	知母+石膏+甘草	119.32
3	知母+石膏+粳米	92.28
4	知母+石膏	95.37
5	知母+甘草+粳米	96.24
6	知母+甘草	124.65
7	知母+粳米	91.57
8	知母	140.36

表3 芒果苷方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	223.8728	1	4.55	>0.05
C	1153.9208	1	23.47	<0.05
A×B	267.2672	1	5.438	>0.05
A×C	425.1528	1	8.65	>0.05
误差(B+B×C+A×B×C)	147.4354	3		

注: $F_{0.05}(1,3) = 10.13, F_{0.01}(1,3) = 34.12$ 。

3 结果与分析

本研究首次建立了测定白虎汤中芒果苷含量的UPLC测定方法,并对粳米、甘草、石膏与知母4味药物不同配伍对芒果苷含量的影响进行了研究。结果表明,本研究建立的UPLC方法简便、快速、准确、重复性好,可用于研究白虎汤不同配伍对芒果苷含量影响的定量分析,与HPLC方法相比更加节省时间和试剂。

从表3方差分析可以看出,粳米配伍对芒果苷的含量影响差异具有显著性($P < 0.05$),两两交互作用的影响没有显著性。表2也显示,石膏和甘草降低了芒果苷的含量,但影响不显著。单味知母水煎药液中芒果苷含量最高,其他药材的加入降低了药液中芒果苷的含量,这是否是由于粳米中淀粉吸附了芒果苷或与芒果苷反应生成沉淀,从而导致芒果苷含量降低的,有待进一步研究。

方剂的药效并不是单味药效的简单加和,而是遵循“君臣佐使”原则,使各味药形成“有制之师”,针对相应的证或病,达到“整体综合调节”的效果。据报道^[2],白虎汤复方对疫苗法致热家兔的解热作用,明显优于单用本方中有解热作用的君药石膏和

臣药知母。马强等研究了配伍对白虎汤中 Ca^{2+} 溶出量的影响,发现知母与石膏配伍合煎可明显抑制石膏中解热有效成分 Ca^{2+} 的溶出,而白虎汤复方配伍可明显促进石膏中 Ca^{2+} 的溶出^[7]。而通过表2可以看出,虽然配伍使知母中解热有效成分芒果苷含量降低,但白虎汤复方配伍药液中芒果苷含量在各配伍组中仍处于较高水平。另外知母中解热有效成分芒果苷本身为剧毒化学物质,过量摄入可引起中毒^[12]。白虎汤复方配伍可使 Ca^{2+} 溶出量增加而使芒果苷含量降低,这提示,复方配伍可使一部分药物中有效成分溶出量增加以增强复方药效,还可以通过各药物间相畏、相使的作用,使某些有一定毒性的有效成分含量保持在可发挥药效,但又可避免毒副作用的剂量范围内。可见,复方配伍有其合理性和规律性。但复方配伍是如何通过各药物间相互作用,使知母中芒果苷含量保持在既可发挥疗效而又避免引发毒副作用的范围的,尚有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 谢鸣. 方剂学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002:109.
- [2] 沈映君. 中药药理学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2000:168.
- [3] 刘克欣. 白虎汤加味为主治疗急性虹膜睫状体炎[J]. 中国中医眼科杂志,1994,4(2):90.
- [4] 王爱芳,华卫国,徐永康. 对白虎汤清热原理及知母退热成分的初步研究[J]. 上海中医药杂志,1981,15(6):43.
- [5] 夏怡,李祥,陈建伟,等. 石膏及白虎汤清热泻火功效的实验研究[J]. 现代中药研究与实践,2009,23(2):48.
- [6] 张保国,程铁锋,刘庆芳. 白虎汤药效及现代临床研究[J]. 中成药,2009,31(8):1272.
- [7] 马强,苏琨,盛振华,等. ICP-AES法研究不同配伍条件下白虎汤中钙离子溶出规律[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(5):86.
- [8] 马强,苏琨,苏燕,等. 不同配伍条件下白虎汤中钙离子溶出规律研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(9):2178.
- [9] 金高娃,章飞芳,薛兴亚. 超高速液相色谱在复杂体系中分离分析中的应用[J]. 世界科学技术——中医药现代化,2006,8(3):106.
- [10] Wren S A, Tchelitcheff P. Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development[J]. J Chromatogr A, 2006, 1119(1/2): 140.
- [11] 卢林,吴君金,马强,等. UPLC法测定地黄中梓醇的含量[J]. 中华中医药学刊,2010,28(6):1309.
- [12] Bhattacharya S K, Ghosal S, Chaudhuri R K, et al. Canscora decussata (Gentianaceae) xanthones. 3. Pharmacological studies[J]. J Pharm Sci, 1972, 61(11):1838.

[责任编辑 全燕]