

双波长切换 HPLC 同时测定桂枝甘草汤中 4 种成分的含量

陈新阳, 毕开顺, 易丽昕, 黄文芳, 陈晓辉* (沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

摘要: 目的 建立桂枝甘草汤中 4 种成分同时含量测定的方法。方法 采用高效液相色谱法, Kromasil C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 双波长切换时间序列采样: 0~29.5 min 为 276 nm; 29.5~32.0 min 为 370 nm。结果 甘草苷、肉桂酸、桂皮醛、异甘草素分别在 10.0~160, 2.50~40.0, 16.0~256, 0.050~0.8 μg·mL⁻¹ 内, 线性关系良好。结论 该方法准确、简便、专属性好, 可用于桂枝甘草汤中甘草苷、肉桂酸、桂皮醛和异甘草素 4 种成分的含量测定, 为桂枝甘草汤的质量控制提供依据。

关键词: 高效液相色谱法; 桂枝甘草汤; 甘草苷; 肉桂酸; 桂皮醛; 异甘草素

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2011)03-0265-03

Simultaneous Determination of Four Components in Guizhi-Gancao Decoction by HPLC with Double-wavelength Switch

CHEN Xinyang, BI Kaishun, YI Lixin, HUANG Wenfang, CHEN Xiaohui* (School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an HPLC method for determination of liquiritin, cinnamic acid, cinnamaldehyde and isoliquiritigenin in Guizhi-Gancao decoction with gradient elution and double-wavelength switch. **METHODS** The analysis was carried out on a Kromasil C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column. The mobile phase was composed of acetonitrile and 0.1% formic acid aqueous with gradient elution and the flow rate was set at 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelengths were set at 276 nm for liquiritin, cinnamic acid and cinnamaldehyde (0~29.5 min) and 370 nm for isoliquiritigenin (29.5~32.0 min). The column temperature was 35 °C. **RESULTS** The linear ranges of liquiritin, cinnamic acid, cinnamaldehyde and isoliquiritigenin were 10.0~160, 2.50~40.0, 16.0~256, 0.050~0.8 μg·mL⁻¹, respectively. **CONCLUSION** This method can be used to determine the above 4 components with satisfied accuracy and repeatability.

KEY WORDS: HPLC; Guizhi-Gancao decoction; liquiritin; cinnamic acid; cinnamaldehyde; isoliquiritigenin

桂枝甘草汤收载于汉代张仲景名著《伤寒论》, 由桂枝、炙甘草两味药材组成。其中, 桂皮醛和肉桂酸为桂枝的主要化学成分, 甘草苷与异甘草素为炙甘草的主要化学成分, 均有多种药理活性^[1-4]。桂枝甘草汤主要应用于临床心血管疾病的治疗。

桂枝甘草汤的质量控制尚无文献报道。本试验以桂枝甘草汤作为研究对象, 同时测定了桂枝甘草汤中桂皮醛、肉桂酸、甘草苷和异甘草素的含量, 为本制剂的质量控制提供更全面有效的方法。

1 仪器与材料

高效液相色谱仪(日本日立公司), L-2130 四元梯度泵, L-2400 紫外检测器, D-2000 Elite 色谱工作站。乙腈、甲醇和甲酸均为色谱纯, 重蒸水为自制。

甘草苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 111610-200604, 纯度>98.0%), 桂皮醛对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110710-00915, 纯度>98.0%), 肉桂酸对照品与异甘草素对照品均为本实验室自制(纯度均>98%)。桂枝、炙甘草药材(北京同仁堂药店, 均经沈阳药科大学中药学院孙启时教授鉴定)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Kromasil C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)。流动相: 乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B), 梯度洗脱: 0~7.0 min, 25%A; 7.0~32.0 min, 25%A~47%A; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 双波长切换时间序列采样: 0~29.5 min 为 276 nm; 29.5~32.0 min 为 370 nm; 柱温: 35 °C; 进样量: 20 μL。在上述色谱条件下, 甘草苷、肉桂酸、桂皮醛和异甘草素的分离度

作者简介: 陈新阳, 男, 硕士生 Tel: (024)23986296
Tel: (024)23986259 E-mail: cxh_syphu@yahoo.com.cn

E-mail: chenxinyang1985@hotmail.com

*通信作者: 陈晓辉, 女, 博士, 教授

均>1.5; 理论板数按甘草苷计算不低于 7 000; 各成分色谱峰对称因子均在 0.95~1.05 之间。样品中

其他成分对甘草苷、肉桂酸、桂皮醛和异甘草素的测定无干扰, 见图 1。

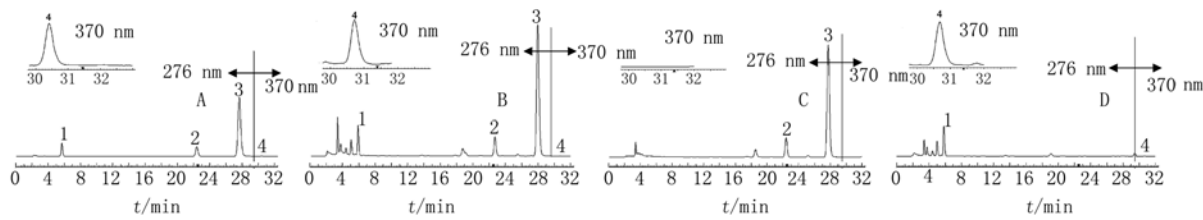


图 1 高效液相色谱图

A-对照品; B-样品; C-桂枝单煎液; D-甘草单煎液; 1-甘草苷; 2-肉桂酸; 3-桂皮醛; 4-异甘草素

Fig 1 HPLC chromatograms

A-control; B-mixed decoction; C-single decoction of Cinnamomi Ramulus; D-single decoction of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Praeparata Cum Melle; 1-liquiritin; 2-cinnamic acid; 3-cinnamaldehyde; 4-isoliquiritigenin

2.2 溶液的配制

2.2.1 桂枝甘草汤的制备 按处方比例(桂枝:甘草=2:1)称取桂枝、甘草药材共 9 g, 置于 250 mL 圆底烧瓶中, 加 10 倍量体积水浸泡 30 min, 煎煮至沸并维持沸腾 20 min, 放冷, 滤过, 重复提取一次, 合并两次滤液, 加水定容于 250 mL 量瓶, 得桂枝甘草汤, 4 °C 下保存待用。

2.2.2 混合对照品储备溶液的配制 取甘草苷、肉桂酸、桂皮醛和异甘草素各对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 分别含有甘草苷 0.80 mg、肉桂酸 0.20 mg、桂皮醛 1.28 mg 和异甘草素 4 µg 的混合对照品储备溶液, 4 °C 下保存待用。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密吸取“2.2.1”项下制得的桂枝甘草汤约 1 mL, 15 000 r·min⁻¹ 高速离心 5 min, 取上清液经 0.22 µm 微孔滤膜滤过后, 进样分析。

2.3 方法学验证

2.3.1 线性关系考察 分别精密吸取混合对照品储备溶液 0.125, 0.250, 0.500, 1.00, 2.00 mL 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。精密量取各浓度系列标准溶液 20 µL, 注入高效液相色谱仪, 记录色谱图。以对照品峰面积为纵坐标, 浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 结果见表 1。

表 1 4 种成分的线性范围和回归方程

Tab 1 The linear ranges and regression equations of 4 components

组分	线性范围/µg·mL ⁻¹	回归方程	r
甘草苷	10.0~160	$Y=3.470 \times 10^4 X + 3.135 \times 10^4$	1.000 0
肉桂酸	2.50~40.0	$Y=1.614 \times 10^5 X - 1.178 \times 10^4$	0.999 9
桂皮醛	16.0~256	$Y=1.714 \times 10^5 X + 2.973 \times 10^5$	0.999 9
异甘草素	0.050~0.8	$Y=2.324 \times 10^5 X + 4.058 \times 10^3$	0.999 9

2.3.2 仪器精密度考察 精密量取混合对照品溶液, 重复进样 6 次, 测得甘草苷、肉桂酸、桂皮醛和异甘草素峰面积的 RSD 分别为 1.0%, 1.1%, 1.3% 和 1.8%。结果表明该方法仪器精密度良好。

2.3.3 重复性考察 取“2.2.1”项下制备的桂枝甘草汤 6 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下测定, 计算甘草苷、肉桂酸、桂皮醛和异甘草素含量的 RSD 分别为 1.6%, 1.6%, 1.8% 和 1.4%。结果表明该方法重复性良好。

2.3.4 稳定性考察 取供试品溶液, 室温下放置, 于 0, 2, 4, 6, 8 h 进样分析。测得甘草苷, 肉桂酸, 桂皮醛和异甘草素峰面积的 RSD 分别为 1.6%, 1.3%, 1.5% 和 1.4%。结果表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.3.5 加样回收率 按处方量减半制备桂枝甘草汤, 精密加入混合对照品溶液适量, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 计算甘草苷、肉桂酸、桂皮醛和异甘草素的平均加样回收率, 结果见表 2。

表 2 桂枝甘草汤中甘草苷、肉桂酸、桂皮醛和异甘草素的加样回收率结果(n=5)

Tab 2 The results of the decoction recoveries of liquiritin, cinnamic acid, cinnamaldehyde, isoliquiritigenin in Guizhi-Gancao decoction(n=5)

组分	已知量/ µg·mL ⁻¹	加入量/ µg·mL ⁻¹	测得量/ µg·mL ⁻¹	平均加样 回收率/%	RSD/%
甘草苷	32.5	25.0	56.7 ± 0.8	96.8	1.4
肉桂酸	7.83	4.50	12.2 ± 0.2	97.1	1.6
桂皮醛	45.0	35.0	78.3 ± 1.6	95.1	2.0
异甘草素	3.25 × 10 ⁻²	3.50 × 10 ⁻²	(6.59 ± 0.2) × 10 ⁻²	95.4	3.0

2.4 样品测定

取桂枝甘草汤 1 mL, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 用外标法计算各成分含量。甘草苷、肉桂酸、桂皮醛和异甘草素的含量分别为 67.0, 17.0, 129, 0.15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

3 讨论

古方中对煎煮时间的记载为“以水三升, 煮取一升”。古代无法准确计算煎煮时间, 故用加水量与煎取量的差值间接反应煎煮时间^[5]。因受煎煮温度、溶液蒸发量等因素影响, 本实验参考相关文献^[6], 确定了以每次 20 min, 煎煮两次共 40 min 为最终煎煮时间。药理实验证明, 在该煎煮条件下得到的药液具有良好的药理活性^[6]。

单味药材桂枝、甘草中相关成分的含量测定已有报道^[7-8]。本研究测定了桂枝与炙甘草配伍煎煮后, 汤液中甘草苷、肉桂酸、桂皮醛与异甘草素的含量。根据 4 种化合物极性的差别与紫外吸收波长的不同(甘草苷、桂皮醛和肉桂酸在 276 nm 下有较大紫外吸收, 异甘草素在 370 nm 下有较大紫外吸收), 本研究采用了梯度洗脱与双波长切换的方法, 结果表明, 该方法简便、准确、灵敏度高, 重复性好。

桂皮醛为桂枝中主要化学成分, 有抗血小板凝集的作用^[9]。测定结果证明, 桂皮醛在汤液中含量最高(129.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。在桂枝甘草汤组方中, 桂枝的量二倍于甘草, 取“温通心阳”的功效。本研究结果为进一步阐明桂枝甘草汤临床疗效的作用机制提供了依据。

REFERENCES

- [1] LIN J, XU L Z, LIU J Y, et al. Study on contents of cinnamaldehyde and cinnamic acid and distribution of *Ramulus Cinnamomi* [J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2005, 40(23): 1784-1787.
- [2] TAO B, LIU X Q, QU Z G. Research progress on the chemical constituents of licorice root [J]. *J Hebei Agricultural Sci*(河北农业科学), 2009, 13(3): 77-79.
- [3] HUANG J Q. Anti-thrombotic and anti-tumoral effects of cinnamaldehyde *in vivo* [D]. Xi'an: Fourth Military Medical University, 2006.
- [4] FENG S T, TANG Q Z, YI F F, et al. Inhibitory effect of isoliquiritigenin on L-type calcium currents in ventricular myocytes of Guinea pigs [J]. *Med J Wuhan Univ*(武汉大学学报: 医学版), 2006, 27(1): 28-31.
- [5] WANG Z L, XIAO X R. Relationship between the amount of water added and the weight of drugs for decoction in treatise on exogenous febrile diseases [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*(辽宁中医杂志), 2010, 37(3): 433-435.
- [6] ZHAO W G. The effect of *Ramuli Cinnamomi* and *Glycyrrhizae* decoction and its extractive composition on experimental arrhythmia [D]. Haerbin: Heilongjiang University of Chinese Medicine, 2006.
- [7] LI W, WANG Y F, WEN H M, et al. Simultaneous analysis of seven active components in *Glycyrrh izaure lensis* Fisch by HPLC-DAD [J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2008, 53(24): 1914-1918.
- [8] LUO J P, ZHANG Z S, TIAN C, et al. Study on contents of cinnamaldehyde and cinnamic acid and distribution of *Ramulus Cinnamomi* [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2000, 25(9): 544-545.
- [9] HUANG J Q, LUO X X, WANG S W, et al. Effects of cinnamaldehyde on platelet aggregation and thrombosis formation [J]. *Chin J Clin Rehabil*(中国临床康复杂志), 2006, 10(31): 34-36.