

RP-HPLC 法测定栀子大黄汤中多种成分的含量及其在方剂配伍研究中的应用

尧爱珉¹, 黄金秋¹, 徐大星¹, 黄雪丽¹, 冯芳^{1,2*}

(中国药科大学¹药物分析教研室;²质量与安全预警教育部重点实验室, 南京 210009)

摘要 在前期对经方栀子大黄汤中的化学成分进行定性研究基础上, 本研究首次对栀子大黄汤中的 9 种特征成分进行定量测定, 并将方法应用于分析该经方配伍前后成分的变化。试验采用 HPLC-UV 方法, 同时测定栀子大黄汤水煎液中栀子苷、柚皮苷、橙皮苷及新橙皮苷的含量; 并建立 HPLC-FLD 方法, 针对该汤剂中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚的含量进行测定, 使检测更为灵敏准确。最终所采用的方法经考察可以准确测定栀子大黄汤中上述 9 种特征成分的含量。对汤剂的测定结果显示, 不同配伍组中各成分的含量发生了不同程度的变化, 其中栀子大黄汤全方配伍能够增加栀子苷、柚皮苷、橙皮苷及新橙皮苷的含量, 枳实-大黄配伍可以增加芦荟大黄素、大黄酸、大黄素和大黄素甲醚的含量, 各配伍组大黄酸的含量均比单味大黄有明显增加。

关键词 栀子大黄汤; 反相高效液相色谱法; 栀子苷; 黄酮苷; 蒽醌; 含量测定; 配伍

中图分类号 R917 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2013)06-0531-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20130608

Quantitation of multiple constituents in *Zhi-Zi-Da-Huang* decoction by RP-HPLC and its application in the study of chemical components in herb compatibility

YAO Aimin¹, HUANG Jinqiu¹, XU Daxing¹, HUANG Xueli¹, FENG Fang^{1,2*}

¹Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; ²Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance (Ministry of Education), China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Nine representative compounds in *Zhi-Zi-Da-Huang* decoction (ZZDHD) was quantitatively determined for the first time and their changes in herb compatibility was investigated on the basis of the authors' previous qualitative researches of ZZDHD. Geniposide, naringin, hesperidin and neohesperidin were simultaneously determined by an HPLC-UV method. While an HPLC-FLD method was applied for the determination of aloe emodin, rhein, emodin, chrysophanol and physcion, in order to obtain better sensitivity and accuracy. The final methods were validated for the accurate determination of the 9 components. The results showed that the dissolution of geniposide, naringin, hesperidin and neohesperidin was promoted by the compatibility of ZZDHD, that the dissolution of anthraquinones was increased by the compatibility of *Aurantii Fructus* and *Rhei Radix et Rhizoma*, and that the contents of rhein all increased in ZZDHD and related drug pairs.

Key words *Zhi-Zi-Da-Huang* decoction; RP-HPLC; geniposide; flavonoid glycosides; anthraquinones; determination of content; compatibility

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81274063)

栀子大黄汤 (*Zhi-Zi-Da-Huang* decoction, ZZDHD) 出自《金匱要略》, 由栀子、大黄、枳实、淡豆豉组成, 是仲景方剂中治疗湿热黄疸的主方之一^[1],

临床报道主要用于酒精性肝病、病毒性肝炎等疾病的治疗^[2-3]。本课题组前期鉴定出栀子大黄汤中的 20 个化学成分^[4], 而对于该经方中有关成分定量分

析的文献尚未见报道。本文选取其中9个文献报道具有护肝作用的成分^[5-9](梔子苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚)为指标,首次对梔子大黄汤进行定量分析;并进一步对该方剂的相关单味药材及药对的水煎液进行测定,探讨该经方配伍前后组分含量的变化。另外,在建立蒽醌类成分 HPLC-FLD 测定方法的过程中发现,空白溶剂的拉曼散射会造成成分紫外-可见吸收峰带的最大波长与其荧光最大激发波长不一致。本研究采用的方法可用于梔子大黄汤的质量评价、物质基础研究及其复方配伍机制的探讨。

1 材料

1.1 药材、对照品和试剂

梔子、大黄、麸炒枳实、淡豆豉均购自南京先声药店,经中国药科大学中药学院秦民坚教授鉴定:梔子为茜草科植物梔子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥果实;大黄为蓼科植物药用大黄 *Rheum officinale* Baill. 的干燥根和根茎;枳实为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 的干燥幼果;淡豆豉为豆科植物大豆 *Glycine max* (L.) Merr. 的成熟种子的发酵加工品。梔子苷(批号:12041808),柚皮苷(批号:12030612),橙皮苷(批号:12020304),新橙皮苷(批号:12030701),芦荟大黄素(批号:12030701),大黄酸(批号:12031210),大黄素(批号:12022715),大黄酚(批号:12021803)及大黄素甲醚(批号:12022005)均购自成都曼斯特生物科技有限公司,纯度均大于98%。

甲醇(特级纯,江苏汉邦科技有限公司);纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司);其余试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

LC 2010C 高效液相色谱仪、RF-10AxI 荧光检测器、LC-Solution 色谱工作站(日本岛津公司);AB135-S 分析天平(美国梅特勒-托利多仪器有限公司)。

2 方法

2.1 色谱条件

2.1.1 梔子苷及黄酮苷类成分的测定 引用本课题组前期定性分析的条件^[4]。流速:0.8 mL/min;检测波长 258 nm。

2.1.2 蒽醌类成分的测定 色谱柱:Phecda C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm)。流动相:甲醇(A)-0.2% 乙酸水(B),梯度洗脱程序如下:0 min, 5% A; 10~20 min, 63% A; 23~33 min, 90% A; 34~44 min, 5% A。流速:1.0 mL/min;进样量:20 μL;柱温:25 °C;激发波长:430 nm,发射波长:525 nm。

2.2 标准溶液的配制

2.2.1 梔子苷及黄酮苷类成分 取梔子苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷适量,以甲醇制成质量浓度分别为 580, 1 307, 523, 812 μg/mL 的混合对照品储备液,于 4 °C 冷藏备用。取混合对照品储备液适量,以甲醇稀释成系列浓度的混合标准溶液,稀释倍数分别为 2、4、10、25、62.5 倍。

2.2.2 蒽醌类成分 取大黄酸、大黄素、大黄酚、芦荟大黄素及大黄素甲醚适量,以甲醇分别溶解后制得各对照品储备液,质量浓度分别为 97, 92, 94, 20, 96.80, 93.40 μg/mL,于 4 °C 储存备用。分别吸取各对照品储备液适量,混合均匀后再以甲醇稀释成系列浓度的混合标准溶液,稀释倍数分别为 2、4、8、16 倍。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 梔子大黄汤水煎液 取梔子 9 g、大黄 3 g、枳实 12 g 以及淡豆豉 24 g,加水 480 mL 浸泡 30 min,武火煮沸后,文火煎煮 30 min,4 层纱布过滤。滤渣同法重复煎煮两次,合并 3 次滤液,旋转蒸发仪适当浓缩后,定容至 600 mL,制得梔子大黄汤水煎液 ZZDHD。

2.3.2 单味药材及相关药对水煎液 ZZDHD 中涉及的药对有^[10]:梔子-大黄、梔子-枳实、梔子-淡豆豉和枳实-大黄。将各药对及 4 种单味药材按 ZZDHD 相同取用量及制备方法分别制成水煎液,药对梔子-大黄、梔子-枳实、梔子-淡豆豉和枳实-大黄的水煎液分别以 ZZ-DH、ZZ-ZS、ZZ-DDC 和 ZS-DH 表示,单味药材梔子、大黄、枳实及淡豆豉水煎液分别以 ZZ、DH、ZS 及 DDC 表示。

2.3.3 样品预处理

2.3.3.1 测定梔子苷及黄酮苷类成分 分别取全方、各药对及单味药材水煎液 1 mL,各加 95% 乙醇 2.8 mL,得约含 70% 乙醇的水提醇沉液,5~10 °C 下放置 12 h 后,16 000 r/min 离心 10 min,取上清液,按“2.1.1”项下色谱条件进行分析。

2.3.3.2 测定蒽醌类成分 分别取全方、各药对及

单味药材水煎液 4 mL,以水稀释定容至 10 mL,再取各稀释液 1 mL,分别加 95% 乙醇 2.8 mL,于 5 ~ 10 °C 下放置 12 h 后,16 000 r/min 离心 10 min,取上清液,按“2.1.2”项下色谱条件进样分析。

3 结果与讨论

3.1 色谱条件的确定

本研究首先沿用了本课题组前期试验用于定性分析的色谱条件^[4],对 ZZDHD 中的 9 种特征成分进行分离测定。在该 HPLC-UV 条件下,如图 1 所示,栀子苷、柚皮苷、橙皮苷及新橙皮苷峰形良好(峰 1~4),并与其共存成分均能达到基线分离。

同时,ZZDHD 中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚与大黄素甲醚含量较低,色谱峰面积偏小(峰 5~9),尤其是芦荟大黄素(峰 5)和大黄素甲醚(峰 9),难以进行准确积分,定量分析的误差较大。因此,本试验根据蒽醌类物质的荧光特性,建立 HPLC-FLD 方法,针对 ZZDHD 中的芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚进行定量测定,以提高检测的灵敏度和准确性。

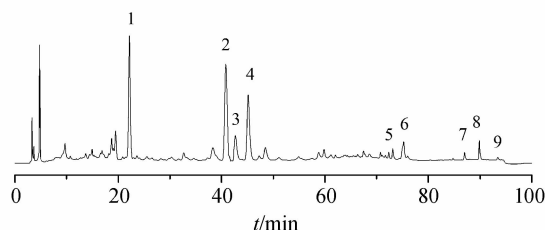


Figure 1 HPLC-UV chromatogram of Zhi-Zi-Da-Huang decoction (ZZDHD)

1: Geniposide; 2: Naringin; 3: Hesperidin; 4: Neohesperidin; 5: Aloe emodin; 6: Rhein; 7: Emodin; 8: Chrysophanol; 9: Physcion

为确定适宜的荧光检测波长,试验中对 5 种蒽醌对照品的吸收光谱和荧光光谱进行了扫描,并且以各成分出峰时相近似的流动相组成溶剂。在扫描过程中发现,芦荟大黄素、大黄酸、大黄酚的最大激发波长为 430 nm,与它们紫外可见吸收峰带的波长一致。而大黄素、大黄素甲醚紫外可见吸收峰的波长约为 440 nm,与其荧光最大激发波长 455 nm 有明显差异。究其原因,发现空白溶剂具有拉曼散射光,其波长仅会随着激发/发射波长的增减而增减;当溶剂的拉曼光与样品的光谱曲线叠加后,样品的激发/发射峰可能会受到干扰,导

致大黄素(以图 2 为例)和大黄素甲醚的表现最大激发波长发生改变。而 5 种成分的荧光峰都位于 525 nm 附近,在 525 nm 左右有较大荧光强度且强度值变化平缓。因此,最终选择激发/发射波长为 430 nm/525 nm,使样品的光谱曲线在这两个波长处均能够避开溶剂的拉曼干扰,确保样品定量测定的准确性。

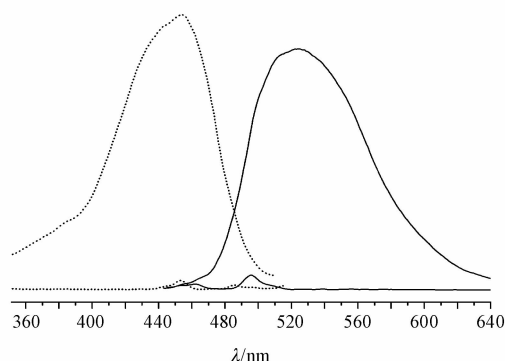


Figure 2 Excitation spectrum (dash line) and fluorescence spectrum (solid line) of emodin (0.96 µg/mL) and its blank solvent (methanol-0.2% HOAc, 95:5), $E_x/E_m = 430 \text{ nm}/525 \text{ nm}$

同时,试验考察了不同酸度(水相乙酸浓度分别为 0.1%、0.2%、1%)的溶剂对 5 种蒽醌类成分荧光光谱的影响。结果发现,所考察的酸度条件仅对大黄酸的荧光响应有一定影响,其荧光强度会随着溶剂乙酸浓度的减小而增加。因为当溶剂的酸度减小,大黄酸羧基质子解离作用增加,羧酸根电子与芳环共轭作用增强,使荧光强度增大。另外,试验考察了水相酸度(乙酸浓度分别为 0.05%、0.1%、0.2%、1%)对 5 种蒽醌色谱保留行为的影响。结果仅大黄酸的保留时间受乙酸浓度的影响。根据 5 种成分的分离度和水相的 pH,选择了 0.2% 乙酸(pH 3.1)为水相。

在最终确立的 HPLC-FLD 条件下,如图 3 所示,芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚均达到基线分离(峰 5~9),且峰形尖锐,易于准确定量。同时,阴性样品(组方中除去大黄外其他 3 味药材,按“2.3”项下方法制备供试液)中在与对照品相同保留时间处没有检出色谱峰,证明其他组分不干扰蒽醌类成分的测定。

3.2 方法学考察

3.2.1 重复性 按“2.3”项下平行制备的 6 份 ZZDHD,样品预处理后,按照“2.1”项下色谱条件进行分析,记录 9 种指标成分的峰面积值,计算

RSD 均小于 3%,表明方法重复性良好。

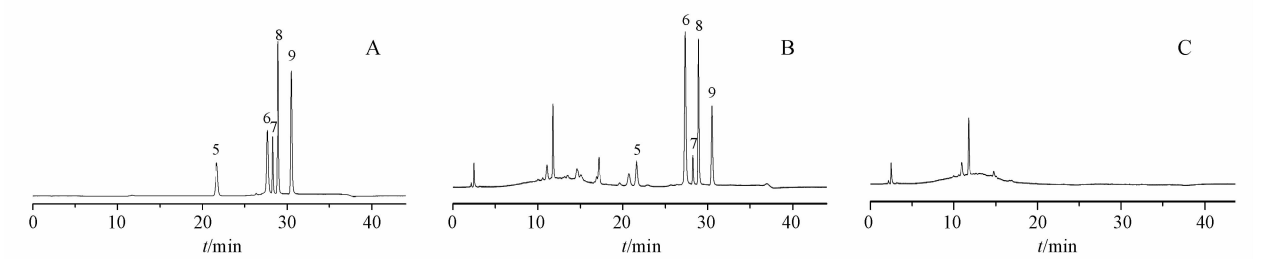


Figure 3 HPLC-FLD chromatograms of mixed standards (A), decoction of ZZDHD (B) and negative sample (C)
5: Aloe emodin; 6: Rhein; 7: Emodin; 8: Chrysophanol; 9: Physcion

3.2.2 稳定性 取同一 ZZDHD 样品预处理后,按照“2.1”项下色谱条件,置 4 ℃ 进样器中,于 0,4,8,16,24 h 进样分析,记录 9 种指标成分的峰面积,计算 RSD 均小于 2.5%,表明供试品溶液在 4 ℃ 进样器中放置 24 h 基本稳定。

3.2.3 线性范围 取“2.2”项下配制的系列混合

标准溶液,按照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱峰面积(*A*)。以峰面积(*A*)对质量浓度(*c*, μg/mL)进行线性回归,结果如表 1 所示,在测定范围内 9 种成分的质量浓度与峰面积均呈良好的线性关系($r > 0.999\ 2$)。

Table 1 Calibration curves of the 9 compounds of ZZDHD

Compd.	Regression equation	<i>r</i>	Linear range/(μg/mL)
Geniposide	$A = 1.606 \times 10^4 c - 4.803 \times 10^4$	0.999 6	9.28-580
Naringin	$A = 8.567 \times 10^3 c + 7.245 \times 10^4$	0.999 7	20.91-1 307
Hesperidin	$A = 8.751 \times 10^3 c + 4.963 \times 10^4$	0.999 2	8.37-523
Neohesperidin	$A = 9.134 \times 10^3 c + 6.031 \times 10^4$	0.999 7	12.99-812
Aloe emodin	$A = 1.776 \times 10^6 c - 1.153 \times 10^4$	0.999 9	0.15-2.32
Rhein	$A = 9.295 \times 10^5 c + 1.101 \times 10^4$	0.999 8	0.39-6.21
Emodin	$A = 6.513 \times 10^5 c - 4.700 \times 10^3$	0.999 9	0.25-4.05
Chrysophanol	$A = 2.442 \times 10^6 c - 2.345 \times 10^4$	0.999 9	0.21-3.39
Physcion	$A = 4.493 \times 10^6 c + 1.179 \times 10^5$	0.999 7	0.12-1.87

3.2.4 精密度 按“2.2”项下方法配制中浓度的混合标准溶液,分别按照“2.1”项下色谱条件,同一批内各连续测定 6 份,计算批内精密度,结果显示各成分峰面积的 RSD 均小于 1.5%;连续 3 d 分别平行制备上述混合标准溶液,进样测定,计算批间精密度,结果显示各成分峰面积的 RSD 均小于 2.5%,表明该方法精密度良好。

3.2.5 加样回收率 取已测知 9 种指标成分含量的 ZZDHD 6 份,分别准确加入各组分对照品适量,使各对照品的加入量约为样品中相应成分含量的 100%,按“2.3”项下方法分别制备供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件进样分析,计算各成分含量和加样回收率。结果得 9 种成分的加样回收率均在 98% ~ 105% 之间, RSD 均小于 5%,表明 ZZDHD 基质对 9 种指标成分的测定无

显著影响。

3.3 样品分析

按“2.3”项下制备的全方、各药对及单味药材水煎液,样品预处理后,分别按照“2.1”项下色谱条件进行分析,记录色谱图,并代入相应的线性回归方程计算样品含量。

表 2 和表 3 给出了各单味药材水煎剂、全方及 4 种药对水煎液中 9 种指标成分的含量测定结果,按公式计算:含量 = 检测浓度/各单味药材的生药浓度 × 100%。以各单味药材中各组分含量为基准,按公式:含量变化(%) = |药对或全方水煎液中指标成分含量 - 单味药材水煎液中相应指标成分含量|/单味药材中相应指标成分含量 × 100,计算各组分的溶出变化,以此来表征配伍对各组分溶出的影响。

Table 2 Contents and content changes of four glycosides in different decoctions (*n* = 2)

Decoction	Content/% (change, %)			
	Geniposide	Naringin	Hesperidin	Neohesperidin
ZZ	4. 06			
ZS		7. 66	1. 74	3. 98
ZZDHD	4. 55(↑ 12. 00)	8. 53(↑ 11. 36)	1. 96(↑ 12. 64)	4. 91(↑ 23. 37)
ZZ-DH	2. 94(↓ 27. 71)			
ZZ-ZS	3. 73(↓ 8. 10)	9. 33(↑ 21. 80)	1. 20(↓ 31. 03)	2. 64(↓ 33. 67)
ZZ-DDC	4. 01(↓ 1. 13)			
ZS-DH		7. 77(↑ 1. 44)	1. 72(↓ 1. 15)	3. 46(↓ 13. 07)

ZZ:Decoction of *Gardeniae Fructus* (*Zhi-Zi*) ;ZS:Decoction of *Aurantii Fructus Immaturus* (*Zhi-Shi*) ;ZZ-DH:Decoction of (*Zhi-Zi*) and *Rhei Radix et Rhizoma* (*Da-Huang*) ;ZZ-ZS:Decoction of (*Zhi-Zi*) and (*Zhi-Shi*) ;ZZ-DDC:Decoction of (*Zhi-Zi*) and *Sojae Semen Praeparatum* (*Dan-Dou-Chi*) ;ZS-DH:Decoction of (*Zhi-Shi*) and (*Da-Huang*)

Table 3 Contents and content changes of five anthraquinones in different decoctions (*n* = 2)

Decoction	Content/% (change, %)				
	Aloe emodin	Rhein	Emodin	Chrysophanol	Physcion
DH	0. 090	0. 43	0. 29	0. 23	0. 085
ZZDHD	0. 076(↓ 15. 56)	0. 57(↑ 32. 56)	0. 094(↓ 67. 59)	0. 14(↓ 39. 13)	0. 051(↓ 40. 00)
ZZ-DH	0. 099(↑ 10. 00)	0. 53(↑ 23. 26)	0. 22(↓ 24. 14)	0. 14(↓ 39. 13)	0. 054(↓ 36. 47)
ZS-DH	0. 12(↑ 33. 33)	0. 66(↑ 53. 49)	0. 31(↑ 6. 90)	0. 23(↓ 0. 00)	0. 095(↑ 11. 76)

DH:Decoction of (*Da-Huang*)

中药水煎液是中医用药的主要方式,汤剂的煎煮过程主要是有效成分的溶出及其可能发生化学反应的过程。在本研究采用的检测条件下,不同组方的药材用量及水煎液最终的体积均相同,比较不同配伍组的色谱图,没有新的色谱峰出现,但一些指标成分的量发生了变化。ZZDHD 全方合煎能增加栀子苷、柚皮苷、橙皮苷及新橙皮苷的溶出,体现了全方配伍的合理性,能够为 ZZDHD 提供有利的物质基础。ZZDHD、ZZ-DH 和 ZS-DH 中大黄酸的溶出量均大于 DH,说明以上配伍有利于大黄酸的溶出。ZS-DH 配伍增加了芦荟大黄素、大黄酸、大黄素及大黄素甲醚的溶出,使蒽醌类成分的溶出基本呈增加趋势,这可能是由于 ZS 中存在的生物碱类成分对蒽醌的增溶作用。ZZDHD 中虽然也有含有 ZS 的生物碱成分,却没有增加芦荟大黄素、大黄素及大黄素甲醚的溶出,体现了复方煎煮过程中成分溶出环境的复杂性。这些现象可为栀子大黄汤配伍机制的探讨提供帮助。

参 考 文 献

[1] Wen XP,Shen KK,Chen DX. Study on the composing rule of the similar formulae of Zhizidahuangtang with method of core-coefficient for Chinese medicine[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志),2008,**14**(8):68 - 71.

[2] Chen JC. Hypothesis and clinical study of modular formulology [J]. *J Chin Med*(中医药杂志),2001,**12**(2):69 - 80.

[3] Lv ZJ. *Zhangzhongjing Formulas of Chinese Medicine*(张仲景方剂学) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2005: 520 - 521.

[4] Wang H, Feng F, Wang XQ. Chemical constituents of *Zhi-zidahuang* decoction detected by HPLC-PDA-ESI-MS/MS[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报),2009,**40**(3):232 - 237.

[5] Fu T,Pu Q,Tan J,*et al.* Protective effects of geniposide on the acute alcoholic liver injury in mice[J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*(中药药理与临床),2007,**23**(3):25 - 27.

[6] Seo HJ,Jeong KS,Lee MK,*et al.* Role of naringin supplement in regulation of lipid and ethanol metabolism in rats[J]. *Life Sci*, 2003,**73**:933 - 946.

[7] Suarez J, Herrera MD, Marhuenda E. *In vitro* scavenger and antioxidant properties of hesperidin and neohesperidin dihydrochalcone[J]. *Phytomedicine*,1998,**5**(6):469 - 473.

[8] Lin YL,Wu CF,Huang YT. Phenols from the roots of *Rheum palmatum* attenuate chemotaxis in rat hepatic stellate cells [J]. *Planta Med*,2008,**74**(10):1 246 - 1 252.

[9] Arosio B,Gagliano N,Fusaro LM,*et al.* Aloe-emodin quinone pretreatment reduces acute liver injury induced by carbon tetrachloride[J]. *Pharmacol Toxicol*,2000,**87**(5):229 - 233.

[10] Xu GL,Chen WH,Zhang MZ,*et al.* *Drug Pairs and Clinic*(药对与临床) [M]. Hefei: Anhui Science & Technology Publishing House,2003: 4 - 6.