

分离度和适当分离时间的色谱分离方法;在此基础上,通过复方共煎与各味药单煎及单煎混合的 HPLC 图谱比较分析,可以得出复方中的化学成分因相互作用而出现量的变化情况,同时还可以得出中药复方指纹峰与单味药的相关信息、化学成分结构信息、量变信息等。在上述总体思路和策略的指导下,本实验采用 HPLC-DAD 及其指纹图谱方法,对大黄、黄芩配伍前后活性成分的变化情况进行了考察。实验确定了在反相色谱模式和梯度洗脱条件下,乙腈-0.01 mol/L 戊烷磺酸钠溶液为流动相系统的分离条件,并利用保留时间和紫外光谱归属配伍后合煎液中主要峰的来源。结果表明,泻心汤中的大黄、黄芩相配伍,既表现出了增溶协同作用(峰 2、4、10),又表现出明显的溶出抑制作用(峰 6、9)。

大黄能抑制血中肿瘤坏死因子(TNF)和白细胞介素-1(IL-1)浓度的升高,从而降低内毒素血症的毒性及炎症反应,并通过影响中枢介质 cAMP 水平来抑制内毒素性发热^[2]。前期药效筛选研究的结果证实了大黄蒽醌和黄芩黄酮均为活性成分。活性成分之间的相互作用往往能够影响疗效。实验中发现,大黄、黄芩配伍的水煎液中没有出现明显的沉淀,这可能由于大黄蒽醌类成分和黄芩苷均为酸性成分,成盐的机会少,故沉淀不明显。配伍后,黄芩苷的煎出量明显降低,可能是由于大黄蒽醌类成分的

酸性较强,混煎液由其所致的酸性因素,不利于其他酸性成分溶入汤液。而大黄蒽醌类成分大黄酸、大黄素、大黄酚在配伍后较配伍前有显著升高,可能受黄芩和大黄蒽醌类大部分成分的增溶效应影响。研究结果既是对大黄、黄芩配伍的活性成分相互作用的一般规律的探讨,也为进一步开展泻心汤抗内毒素作用的药效物质基础研究奠定基础。

实验结果提示,中药复方配伍并非是单味药的简单加合,而中药复方研究的重要任务之一就是寻找能够提升复方疗效、使多个药效指标达到综合最优的配伍比例。大黄与黄芩相配伍,未发现新的成分,但使大黄中大部分蒽醌类成分的煎出量升高,使黄芩苷的煎出量有所降低,而其作为整体抗内毒素作用得到加强。说明在泻心汤抗内毒素作用的研究中,大黄蒽醌与黄芩黄酮存在一个最佳配伍比例。至于这个最佳配伍比例是什么,是否为原方以药材配伍合煎提取所得的配比,这是一个值得研究的问题。

References:

- [1] Xiong Y H, Meng X L, Zhang Y, et al. *Traditional Chinese Medicine Development and Modern Science & Technology* (中医药发展与现代科学技术) [M]. Chengdu: Sichuan Science and Technology Press, 2005.
- [2] Liu B H. The inhibition of rhein on LPS-stimulated Mφ and its mechanism [A]. *Dissertation of Master Degree of Nankai University* (南开大学硕士论文) [D]. Tianjin: Nankai University, 2002.

人参白虎汤不同配伍条件下人参皂苷 Rg₁ 和 Re 变化的研究

丁选胜, 安娜芹, 姚 丹, 赵一鸣

(中国药科大学 药理研究室, 江苏 南京 210009)

摘 要:目的 通过研究不同配伍条件下人参皂苷 Rg₁、Re 的变化,探讨人参白虎汤配伍规律。方法 采用 HPLC 法测定人参白虎汤中各单味药物及不同配伍组别和全方中人参皂苷 Rg₁、Re。结果 各配伍组别在原方配伍比例条件下,人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Re 的量有了很大的提高。结论 人参与方中其他药物配伍后,人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Re 的溶出量有一定程度的增加,表明原方配伍比例是合理的。

关键词:人参白虎汤; 配伍; 人参皂苷 Rg₁; 人参皂苷 Re

中图分类号:R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2007)05-0702-03

Change of ginsenoside Rg₁ and ginsenoside Re in different compatibilities of Renshen Baihu Decoction

DING Xuan-sheng, AN Na-qin, YAO Dan, ZHAO Yi-ming

(Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Key words: Renshen Baihu Decoction; compatibility; ginsenoside Rg₁; ginsenoside Re

收稿日期:2006-09-19

作者简介:丁选胜(1962—),男,安徽广德人,副教授,硕士生导师,主要研究方向为心血管药理与临床药学。E-mail: dxs0162@sina.com

前期研究结果表明,人参白虎汤中人参总皂苷有显著降低糖尿病模型大鼠血糖、升高胰岛素水平作用,同时能够降低心脏指数和心室指数,上调糖尿病心肌病大鼠心肌中Glu T₄基因表达^[1]。还能够抑制内皮细胞损伤,改善血管内皮细胞功能,可用于治疗糖尿病血管并发症^[2]。基于此,本实验采用RP-HPLC法对人参白虎汤方中单味人参以及人参与方中其他药物不同配伍合煎后其中人参皂苷Rg₁、Re的变化进行系统的研究,以进一步揭示人参白虎汤的配伍规律。

1 仪器与材料

PTHW 型电热套(巩义市英峪予华仪器厂), Büchi R114 旋转蒸发仪(美国BüCHI公司),高效液相色谱仪(日本岛津公司)。

生晒参、知母、石膏、炙甘草购自南京市医药股份公司,梗米购于市场,经笔者鉴定知母为百合科多年生草本植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bunge 的干燥根茎,生晒参为五加科多年生植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey 的干燥根,石膏为单斜晶系含水硫酸钙的矿石,炙甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎,梗米为禾本科植物稻(粳稻) *Oryza sativa* L. 的种仁。人参皂苷Rg₁(批号0732-200117)、人参皂苷Re(批号0754-200115)对照品由中国药品生物制品检定所提供。试验所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备:按照各配伍组别剂量称取药物,水煎2次,每次1 h,加水量分别为15和12倍量,滤过,合并2次滤液。分别取各组的水煎液15~30 mL,用等体积的水饱和正丁醇提取4次,合并提取液,减压浓缩至适量,置水浴上蒸干,残渣加甲醇使溶解并转移至5 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,以0.22 μm微孔滤膜滤过,取滤液,即得。

2.2 色谱条件:采用ODS C₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm),以乙腈-水(20:80)洗脱,体积流量为1.0 mL/min,检测波长203 nm,柱温30.0℃。在此条件下,理论塔板数按人参皂苷Rg₁计算为7 707,人参皂苷Rg₁、Re的分离度达到1.6。

2.3 阴性对照试验:按照各配伍组别剂量除人参外分别称取各药物,按照供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液,进样测定,结果在与人参皂苷Rg₁、Re的色谱峰相应的位置未检出色谱峰,表明方中其他药物对人参皂苷Rg₁、Re的测定无干扰,见图1。

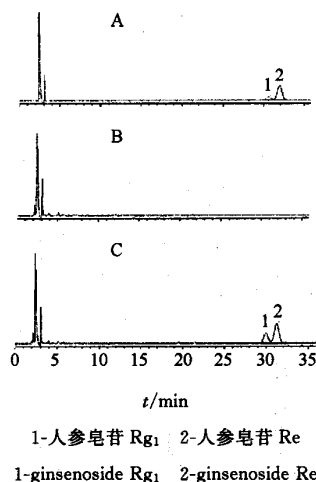


图1 人参皂苷Rg₁和Re混合对照品(A)、阴性对照(B)和6样品(C)的HPLC图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of ginsenoside Rg₁ and Re mixed substances (A), negative sample (B), and No. 6 sample (C)

2.4 线性关系考察:精密称取人参皂苷Rg₁ 3.15 mg、人参皂苷Re 2.02 mg,置10 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得混合对照品溶液。按上述色谱条件分别进样4.0、8.0、12.0、16.0、20.0 μL,各2次,记录峰面积。以峰面积积分值的平均值为纵坐标,人参皂苷Rg₁、Re的质量为横坐标绘制标准曲线,计算回归方程,结果人参皂苷Rg₁: $Y = 207\,521 X - 182\,778$, $r = 0.999\,0$,线性范围1.26~6.31 μg;人参皂苷Re: $Y = 103\,254 X - 51\,789$, $r = 0.999\,1$,线性范围0.80~4.04 μg。

2.5 精密度试验:分别精密吸取质量浓度为0.315、0.202 mg/mL人参皂苷Rg₁、Re混合对照品溶液20 μL,重复进样6次,测定峰面积,计算,结果人参皂苷Rg₁、Re峰面积的RSD分别为1.07%、1.08%。

2.6 重现性试验:称取人参样品5份,每份20 g,制备供试品溶液,平行进样2次,每次进样20 μL,测定峰面积,计算人参皂苷Rg₁、Re的质量分数,结果RSD分别为2.21%、2.52%。

2.7 稳定性试验:取人参单煎液,分别于0、1、2、4、8、12、24 h各测定1次,进样20 μL,记录峰面积,计算,结果人参皂苷Rg₁、Re峰面积的RSD分别为1.20%、1.36%。表明供试品溶液在24 h内基本稳定。

2.8 回收率试验:称取含人参皂苷Rg₁ 0.995 mg/g,人参皂苷Re 0.997 mg/g的人参样品5份,每份20 g,每份样品精密加入人参皂苷Rg₁、Re各10 mg,制

备供试品溶液,平行进样 2 次,每次进样 20 μ L,测定,计算得人参皂苷 R_{g1} 、Re 的平均回收率分别为 97.3% 和 96.7%,RSD 分别为 2.43%、2.60%。

2.9 样品的测定:精密吸取各样品液 20 μ L 注入液相色谱仪,每份样品进样 2 次,测定,计算各样品中人参皂苷 R_{g1} 和 Re 的质量分数,结果见表 1。

表 1 不同配伍中人参皂苷 R_{g1} 和 Re 的测定结果 ($n=2$)

Table 1 Determination of ginsenoside R_{g1} and Re in different compatibilities ($n=2$)

样品号	配伍	人参皂苷/($mg \cdot g^{-1}$)	
		R_{g1}	Re
1	人参单煎 20 g	0.995	0.997
2	石膏单煎 20 g	—	—
3	炙甘草单煎 20 g	—	—
4	粳米单煎 20 g	—	—
5	知母单煎 20 g	—	—
6	知母 9 g, 人参 4.5 g	0.861	12.389
7	知母 9 g, 人参 9 g	1.662	11.300
8	知母 18 g, 人参 4.5 g	2.320	11.947
9	知母 9 g, 人参 4.5 g, 炙甘草 3 g	0.977	13.191
10	知母 9 g, 人参 4.5 g, 粳米 28.8 g	2.387	16.644
11	知母 9 g, 人参 4.5 g, 石膏 24 g	2.985	16.631
12	知母 9 g, 人参 4.5 g, 石膏 48 g	2.540	13.864
13	知母 9 g, 人参 4.5 g, 石膏 12 g	2.055	19.611
14	知母 9 g, 人参 4.5 g, 石膏 24 g, 炙甘草 3 g	4.196	16.472
15	知母 9 g, 人参 4.5 g, 石膏 24 g, 炙甘草 6 g	3.771	3.907
16	知母 9 g, 人参 4.5 g, 石膏 24 g, 炙甘草 1.5 g	3.393	2.261
17	知母 9 g, 人参 4.5 g, 石膏 24 g, 炙甘草 3 g, 粳米 28.8 g	5.779	5.576
18	知母 9 g, 人参 4.5 g, 石膏 24 g, 炙甘草 3 g, 粳米 57.6 g	6.010	5.263
19	知母 9 g, 人参 4.5 g, 石膏 24 g, 炙甘草 3 g, 粳米 14.4 g	2.697	2.352
20	石膏 24 g, 炙甘草 3 g, 粳米 28.8 g	—	—

3 讨论

原方比例条件下,全方中人参皂苷 R_{g1} 的量为人参单煎液的 5.8 倍,且高于其他按原方比例配伍的组别。知母、人参在原方比例配伍条件下,人参皂

苷 R_{g1} 的量略低于人参单煎液,当增加人参或知母的比例,人参皂苷 R_{g1} 的量均有所提高。在知母、人参原方比例配伍基础上,加入石膏后,人参皂苷 R_{g1} 的量提高,当增加或降低石膏的比例时,人参皂苷 R_{g1} 的量均有所降低。知母、人参、石膏在原方比例配伍的基础上,再加入炙甘草,人参皂苷 R_{g1} 的量提高,当增加或降低炙甘草的量时,人参皂苷 R_{g1} 的量均降低。知母、人参、石膏、炙甘草在原方比例配伍的基础上,再加入粳米(全方),人参皂苷 R_{g1} 的量提高,当增加粳米比例 1 倍时,人参皂苷 R_{g1} 的量略有提高,而粳米比例减少 1 倍时,人参皂苷 R_{g1} 的量降低约 1 倍。

原方比例条件下,各配伍组别中人参皂苷 Re 的量大大提高。其中,知母、人参组在原方比例配伍条件下,人参皂苷 Re 的量最高,当增加人参或知母的比例,人参皂苷 Re 的量均有所降低。知母、人参、石膏组,增加石膏的比例时,人参皂苷 Re 的量反而降低,而降低石膏的比例,人参皂苷 Re 的量反而有所提高。知母、人参、石膏、炙甘草组在原方比例配伍条件下,人参皂苷 Re 的量最高,无论增加或减少炙甘草比例,人参皂苷 Re 的量均降低。全方组,增加粳米的比例是 1 倍时,人参皂苷 Re 的量略有降低,当降低粳米的比例是 1 倍时,人参皂苷 Re 的量降低约 2.5 倍。

人参皂苷为人参白虎汤治疗糖尿病(中医之消渴症)有效成分之一。各配伍组别在原方配伍比例条件下,其中人参皂苷 R_{g1} 和人参皂苷 Re 的量有了很大的提高。说明原方配伍比例合理,且方剂配伍存在规律性。有关本方不同配伍条件下其他化学成分的动态变化,目前正在研究中。

References:

- [1] Ding X S, Dai D Z, Ye B P, *et al.* Influence of Renshenbaihu Decoction on the level of mRNA expression of Glu T4 in streptozotocin induced diabetic rats' hypertrophic myocardium [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2004, 35(5): 460-465.
- [2] Shi Y P, Ding X S, Dai D Z. Effect of combined active parts from Renshenbaihu Decoction on aortic rings of diabetic rat induced by streptozotocin [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2004, 35(4): 344-348.