

泻心汤不同配伍中蒽醌类成分的变化研究

石荣¹, 马越鸣^{1*}, 叶福媛², 张宁², 王天明¹

(1. 上海中医药大学 中药药代动力学实验室, 上海 201203; 2. 上海中医药大学 科技实验中心, 上海 201203)

摘要:目的 建立测定泻心汤中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚游离与结合型的方法, 并探索配伍对各成分的影响。方法 采用 Agilent Hypersil ODS 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.1%磷酸(75:25); 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 30℃; 检测波长: 440 nm; 进样量: 50 μL。不同配伍中蒽醌类成分的差异采用 SPSS 软件进行方差分析。结果 建立了同时测定 5 种蒽醌类成分的方法, 这 5 个成分线性关系良好, 加样回收率稳定。与单味大黄相比, 大黄-黄芩中 5 种蒽醌类成分增加, 黄连-大黄中芦荟大黄素、大黄素、大黄酚的总量增加, 而大黄酸和大黄素甲醚总量减少; 泻心汤中大黄酸总量减少, 大黄素、大黄酚和大黄素甲醚总量增加, 5 种蒽醌类成分总和增加。结论 本法准确可靠, 重现性好, 结果稳定, 适合于泻心汤中蒽醌类成分的分析。并且不同配伍对泻心汤中蒽醌类成分有影响。

关键词: 泻心汤; 配伍; 蒽醌; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)09-1327-04

Change of anthraquinones in Xiexin Decoction with different compatibilities

SHI Rong¹, MA Yue-ming¹, YE Fu-yuan², ZHANG Ning², WANG Tian-ming¹

(1. Laboratory of Pharmacokinetics for Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Experiment Center of Science and Technology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Abstract: **Objective** To determine the contents of free and glycoside-combined anthraquinones namely aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol, and physcion in Xiexin Decoction, and to study the influence of compatibility on the contents of the above-mentioned five anthraquinones in the decoctions. **Methods** The Agilent Hypersil ODS column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used with the mobile phase being methanol-0.1% phosphoric acid (75:25), flow rate 1.0 mL/min, the column temperature at 30℃, detecting wavelength at 440 nm, and sampling 50 μL. The differences of the anthraquinones among all combinations were tested by one-way analysis of variance using SPSS software. **Results** The concentrations of free and glycoside-combined anthraquinones in different decoctions were determined with HPLC. The linear equations of five anthraquinones were established and their recoveries were stable. Compared to *Radix et Rhizoma Rhei* alone, the contents of five anthraquinones were increased by adding *Radix Scutellariae* to the decoction. The contents of aloe-emodin, emodin, chrysophanol were increased and rhein, physcion were reduced by adding *Rhizoma Coptidis* to the decoction. The contents of rhein were reduced and emodin, chrysophanol, physcion, and total five anthraquinones were increased in Xiexin Decoction. **Conclusion** The methods are accurate and suitable to determine the contents of five anthraquinones in Xiexin Decoction with a desirable repeatability. The contents of the five anthraquinones are influenced by different compatibilities.

Key words: Xiexin Decoction; compatibility; anthraquinones; HPLC

泻心汤由大黄、黄连、黄芩组成, 为出自《金匮要略》的清热经典名方, 具泻火解毒、清热燥湿、除痞止血之功效。大黄为泻心汤中的主药, 其主要成分为蒽醌类。泻心汤及其制剂中蒽醌类成分的测定常是针对其中一种或两种成分进行^[1,2]。为了有效控制该方

质量, 本实验采用 HPLC 法测定了泻心汤中 5 种蒽醌类成分, 并对泻心汤的不同配伍组合中 5 种蒽醌类成分的变化进行了研究, 为发掘中医药传统方剂配伍科学内涵提供实验依据, 并为泻心汤药效学、药动学研究提供基础。

收稿日期: 2006-12-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(90409008); 上海市科委基金资助项目(04DZ19844); 上海市重点学科建设项目资助(T0301)

* 通讯作者 马越鸣 Tel: (021)51322386 Fax: (021)51322386 E-mail: mayueming_117@126.com

1 仪器与试剂

Agilent HP1100 高效液相色谱仪系统:配有 G1312A 二元泵、DAD 检测器、自动进样器和色谱工作站;USC-502 超声波清洗器(上海波龙电子设备有限公司);FA2004N 分析天平(上海精密科学有限公司)。

芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品购于中国药品生物制品检定所;甲醇为色谱纯,其余试剂为分析纯,实验用水为超纯水。

泻心汤组成药味大黄、黄芩、黄连均购自上海康桥中药饮片有限公司,经本校生药教研室赵志礼教授鉴定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:Agilent Hypersil ODS 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.1%磷酸(75:25);体积流量:1.0 mL/min;柱温:30℃;检测波长:440 nm,进样量:50 μL。

2.2 对照品溶液的制备:精密称取芦荟大黄素 1.30 mg、大黄酸 2.08 mg、大黄素 1.50 mg、大黄酚 1.20 mg 和大黄素甲醚 1.50 mg,置于 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,得混合对照品储备液。

2.3 供试品溶液的制备^[3]:取大黄、黄芩、黄连药材

按质量比 2:1:1 配伍,传统方法煎煮,制得泻心汤提取物,得率为 27.1%。同法制备大黄、大黄-黄芩(质量比 2:1)、大黄-黄连(质量比 2:1)、黄芩-黄连(质量比 1:1)提取物,得率分别为 28.8%、32.6%、26.7%、26.4%。

取不同配伍提取物 0.050 g,精密称定,加水 5 mL,超声处理 30 min 后,加入 50 μL 2 mol/L H₂SO₄,使之成为酸性后,将药液转移至分液漏斗,用 5 mL 水洗涤试管残渣,加入氯仿振荡提取 3 次,每次 10 mL,合并氯仿提取液并蒸干,用甲醇定容至 10 mL 量瓶中,即为游离型蒽醌供试品溶液。

上述水层加浓硫酸 0.6 mL 和氯仿 10 mL,水浴加热回流水解 2 h,冷却后取氯仿层,水层用氯仿振荡提取 3 次,每次 10 mL,将氯仿提取液合并后蒸干,用甲醇定容至 10 mL 量瓶中,即为结合型蒽醌供试品溶液。

2.4 方法专属性考察:取阴性溶液(由黄芩和黄连提取物制备)、5 种成分混合对照品溶液、游离及结合型蒽醌供试品溶液,进样测定,色谱图见图 1。可见,阴性样品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,方法专属性高,选择性好。

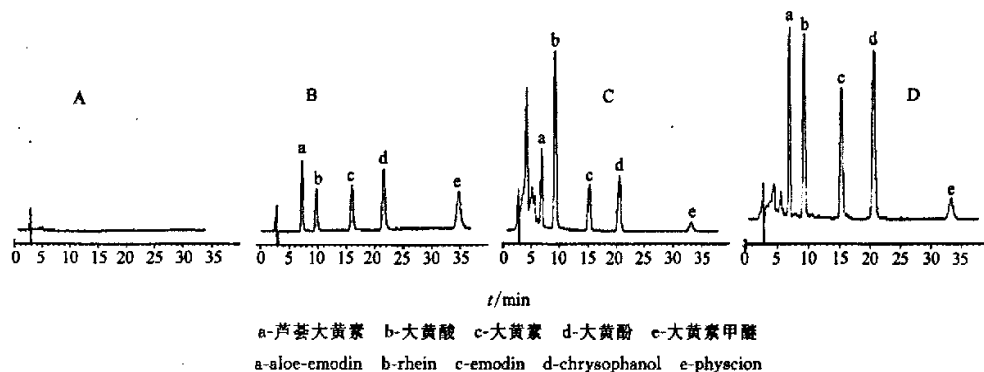


图1 阴性对照(A)、混合对照品(B)、游离(C)及结合型(D)供试品的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of negative sample (A), mixed reference substances (B), free (C), and glycoside-combined (D) Xilexin Decoction

2.5 线性关系的考察:精密量取对照品储备液适量,配制系列对照品溶液,使芦荟大黄素分别为 0.10、0.26、0.325、1.30、13 μg/mL,大黄酸分别为 0.16、0.416、0.52、2.08、20.80 μg/mL,大黄素分别为 0.12、0.30、0.375、1.50、15 μg/mL,大黄酚分别为 0.096、0.24、0.30、1.20、12 μg/mL,大黄素甲醚分别为 0.12、0.24、0.375、1.50、16 μg/mL,进样测定。以各质量浓度为横坐标,相应的峰面积为纵坐标,得回归方程,分别为芦荟大黄素 $Y = -5.57 +$

$99.098 X$ ($r=0.9999$)、大黄酸 $Y = -12.78 + 48.18 X$ ($r=0.9998$)、大黄素 $Y = -5.83 + 81.37 X$ ($r=0.9999$)、大黄酚 $Y = -10.14 + 152.60 X$ ($r=0.9999$)、大黄素甲醚 $Y = -17.75 + 122.32 X$ ($r=0.9998$)。

2.6 精密度试验:取同一份混合对照品溶液,重复进样 5 次,测定得各峰峰面积值,计算其 RSD 值分别为:芦荟大黄素 0.7%、大黄酸 1.4%、大黄素 1.4%、大黄酚 1.0%、大黄素甲醚 1.9%。

2.7 稳定性试验:取同一份游离型供试品溶液,分别在制备后的0.3、6、12、24 h 进样分析,测定各成分峰面积,计算得其RSD值分别为:芦荟大黄素0.5%、大黄酸0.9%、大黄素1.3%、大黄酚1.3%、大黄素甲醚1.7%。结果表明供试品溶液中5个蒽醌类成分至少在24 h内稳定。

2.8 重现性试验:取同一批样品细粉5份,制备供试品溶液,进样测定,结果芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚游离型质量分数的RSD值分别为2.0%、1.2%、1.7%、0.9%、2.6%;结合型质量分数的RSD值分别为2.9%、3.0%、2.9%、2.5%、2.1%。

2.9 回收率试验:精密称定9份提取物细粉各0.050 g,准确加入5种对照品溶液适量,制备游离

型供试品溶液,进样,测定,计算各成分的加样回收率,结果见表1。

表1 5种成分回收率的测定结果($n=3$)Table 1 Recovery rates of five constituents ($n=3$)

成分	平均回收率/%			RSD/%		
	高	中	低	高	中	低
芦荟大黄素	100.0	99.5	99.3	1.7	4.8	2.2
大黄酸	101.2	100.2	98.6	3.9	3.3	0.8
大黄素	99.5	99.3	96.8	2.3	4.7	0.6
大黄酚	98.8	99.0	97.4	2.1	2.9	2.5
大黄素甲醚	98.5	99.6	96.9	2.2	4.0	4.4

2.10 样品测定:精密称取泻心汤、大黄、大黄-黄芩、大黄-黄连细粉适量,平行5份,制备供试品溶液,进样分析。按每克大黄生药计,泻心汤、大黄、大黄-黄芩、大黄-黄连中游离和结合型蒽醌成分的测定结果见表2。

表2 不同配伍中蒽醌类成分的测定结果($\bar{x} \pm s, n=5$)Table 2 Determination of anthraquinones in different compatibilities of Decoctions ($\bar{x} \pm s, n=5$)

配伍	芦荟大黄素/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	大黄酸/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	大黄素/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	大黄酚/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	大黄素甲醚/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$
泻心汤	126.7 $\pm$ 2.5	757.3 $\pm$ 9.1	136.1 $\pm$ 2.3	77.3 $\pm$ 0.7	23.5 $\pm$ 0.7
结合	319.1 $\pm$ 9.1	977.0 $\pm$ 28.7	421.6 $\pm$ 12.2	375.7 $\pm$ 9.4	105.6 $\pm$ 2.2
大黄	180.2 $\pm$ 6.4	1080.0 $\pm$ 37.6	301.0 $\pm$ 14.0	125.0 $\pm$ 3.9	42.0 $\pm$ 1.2
结合	276.9 $\pm$ 13.8	754.9 $\pm$ 43.4	204.0 $\pm$ 7.1	188.6 $\pm$ 8.3	56.0 $\pm$ 1.9
大黄-黄芩	301.6 $\pm$ 5.7	1461.2 $\pm$ 23.2	459.5 $\pm$ 11.9	257.3 $\pm$ 7.1	74.3 $\pm$ 2.2
结合	413.0 $\pm$ 4.8	777.2 $\pm$ 8.4	574.6 $\pm$ 6.8	464.5 $\pm$ 4.8	103.0 $\pm$ 1.5
大黄-黄连	149.4 $\pm$ 2.9	508.7 $\pm$ 20.9	244.7 $\pm$ 11.7	129.7 $\pm$ 2.7	33.1 $\pm$ 0.6
结合	350.1 $\pm$ 5.2	563.9 $\pm$ 17.0	354.3 $\pm$ 12.4	225.1 $\pm$ 2.3	44.4 $\pm$ 2.0

2.11 配伍对各成分的影响:采用方差分析和 q 检验分析不同配伍间差异的统计学意义,用SPSS软件进行统计分析。大黄-黄芩、大黄-黄连、泻心汤分别与单味大黄进行比较,大黄-黄芩中5种蒽醌类成分游离和结合型总量显著增加($P<0.01$)。大黄-黄连中芦荟大黄素、大黄素、大黄酚的游离和结合型总量增加($P<0.01$),大黄酸和大黄素甲醚总量减少($P<0.01$);5种蒽醌类成分总和减小($P<0.01$)。泻心汤中芦荟大黄素游离和结合型总量与单味药相差不大($P>0.05$),大黄酸总量减少($P<0.01$),其余3种成分总量增加($P<0.01$);5种蒽醌类成分的总和增加($P<0.05$)。

3 讨论

为了控制泻心汤的质量,研究过程中采用了标准化程序制备泻心汤及不同配伍的提取物,测定了同一配伍不同批次中各成分的量。结果表明,制备过程质量稳定可控。

在供试品溶液制备时,曾以甲醇、50%甲醇为提取溶剂,但由于蒽醌类成分的极性较小,不易被提取出来,最后采用氯仿先提取出游离型蒽醌类成分,再加入浓硫酸加热水解后用氯仿提取出结合型成分,结果稳定,重现性好。该方法能全面的反映出供试品

中的游离型和结合型蒽醌类成分,适合蒽醌类成分的提取测定。

蒽醌类成分的检测波长通常用254 nm^[4,5],三维结果显示蒽醌类在228、254、440 nm附近皆有较大吸收,但在228、254 nm波长时,杂质对芦荟大黄素干扰较大,而在440 nm时杂质干扰较小,响应稍小但能满足测定要求,故选用440 nm为检测波长。

中药中所含的苷类成分在肠道菌群的作用下,通常会转变为相应的苷元。蒽醌类糖苷在肠菌作用下亦可转化为其相应的苷元^[4]。泻心汤及不同配伍灌胃给药后,结合型蒽醌可被肠菌转化成游离型蒽醌吸收进入体内,因而,体内所测定到的游离型蒽醌类成分质量浓度应该是中药中游离和结合型蒽醌之和。因此本研究中以结合型和游离型的总量为指标,分析泻心汤不同配伍中蒽醌类成分量的差异。结果表明,黄连的存在,使大黄酸和大黄素甲醚减少,5种成分的总和也减少,可能是由于这些成分与黄连中的生物碱发生共沉淀所致^[7,8]。黄芩的存在使各成分均增加,提示黄芩的存在有利于提高蒽醌类成分的量。泻心汤(黄芩和黄连同时存在时)中大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的总量增加,5种蒽醌类成分的总和也增加。本研究结果说明泻心汤配伍提高了蒽醌

类成分的量,提示该复方配伍的合理性之一在于提高了有效成分的量。配伍后游离和结合型蒽醌的量变化比较复杂,其原因有待进一步研究阐述。

References:

- [1] Li Y, Xu X. Determination of baicalin, rhein and berberine in Yiqing Capsule by HPLC [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2005, 27(2): 155-157.
- [2] Fu X J, Zhu C W, Wang X G. Determination of dissociation emodin and chrysophanol in Xiedusan by RP-HPLC [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2002, 37(4): 304-306.
- [3] Wang K, Tong Y Y. The analysis of anthraquinones in *Polygonum multiflorum* by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1996, 16(4): 219-222.
- [4] Li X R, Tong Y, Ma Z S, et al. Study on qualitative and quantitative methods for Yinhuang Liangxiao Granule [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2004, 39(5): 426-428.
- [5] Bao W F, Yang S, Dong E, et al. Simultaneous determination of the contents of rhein, emodin and chrysophanol in Weitongxin Granules by HPLC [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2003, 20(2): 124-126.
- [6] Xie H, Ma Y M, Wang T M, et al. Pharmacokinetics of rhein in Taohe Chengqi Decoction and rhubarb in rabbits [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2005, 21(2): 1-3.
- [7] Zhang J R, Zhang G P, Wu L S, et al. Pharmacodynamic study on the sediments that produced by matching of herbs in Xiexintang [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2004, 10(5): 27-30.
- [8] Xu X, Dong X W, Mao P. Precipitation reaction between berberine and rheinic acid by capillary electrophoresis [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学学报), 2003, 38(10): 779-782.

山柰的超临界 CO₂ 萃取工艺研究

刘文龙¹, 贺福元¹, 张喜利², 刘平安¹, 穆书平², 李荣东¹

(1. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410004; 2. 湖南九芝堂制药有限公司, 湖南 长沙 410007)

摘要:目的 优化山柰的超临界 CO₂ 萃取工艺。方法 通过正交试验, 采用气相色谱法测定其中苯甲醛的量, 采用极差、方差对试验数据进行分析。结果 最佳工艺为萃取温度 55 ℃、萃取压力 20 MPa、分离压力 9 MPa, 在分离釜 I 中收集主要提取物。结论 萃取温度、分离压力对山柰的超临界 CO₂ 萃取工艺有显著性影响。

关键词:山柰; 超临界 CO₂ 萃取; 正交试验

中图分类号: R286.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)09-1330-03

Technologic optimization of *Kaempferia galanga* by supercritical CO₂ extraction

LIU Wen-long¹, HE Fu-yuan¹, ZHANG Xi-li², LIU Ping-an¹, MU Shu-ping², LI Rong-dong¹

(1. School of Pharmacy, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410004, China;

2. Jiuzhitang Pharmaceutical Co., Ltd., Changsha 410007, China)

Abstract: **Objective** To optimize the extracting process for *Kaempferia galanga* by supercritical CO₂ extraction. **Methods** GC was used to determine the contents of benzaldehyde. Orthogonal design was used to optimize supercritical CO₂ extraction process. Range and variance analysis were used to deal with the test data. **Results** The optimum process was established as following: the extracting technique was dealt with under 20 MPa as extracting pressure; 55 ℃ as extracting temperature and 9 MPa as separating pressure. The main extracts were collected in separated kettle I. **Conclusion** The extracting temperature and separating pressure would make remarkably effects on CO₂ extracting results of *K. galanga*.

Key words: *Kaempferia galanga* L.; supercritical CO₂ extraction; orthogonal test

山柰为姜科植物山柰 *Kaempferia galanga* L. 的干燥根茎, 性温, 味辛, 有行气温中、消食、止痛等功效, 对于胸膈胀满、脘腹冷痛, 饮食不消等均有作用^[1]。山柰含 2% 的挥发油, 油中的化学成分主要有对-甲氧基桂皮酸乙酯、桂皮酸乙酯、龙脑、苧烯、对-

甲氧基苏合香烯等。天然苯甲醛类小分子芳香化合物与其抗癌活性密切相关, 可能是其芳环结构阻止了癌细胞蛋白质的合成^[2]。因此本实验采用正交试验设计, 以超临界 CO₂ 萃取工艺对山柰中脂溶物质进行提取研究, 并采用毛细管气相色谱测定其中的

收稿日期: 2006-10-20

基金项目: 湖南省中医药管理局中医药科研基金资助项目(204128)

作者简介: 刘文龙(1977-), 男, 湖南邵阳人, 讲师, 中药药剂学硕士, 主要从事分析、药物分析的教学工作, 中药药剂的科研工作, 研究方向为中药新工艺、新剂型、新技术, 共发表论文 10 余篇。Tel: (0731)5552623 E-mail: dragon5240@126.com