

三拗汤不同配伍中麻黄碱、甘草酸和苦杏仁苷的变化

杨 翀^{1,2}, 梁光义^{1,3*}, 曹佩雪¹, 贺祝英³

(1. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵州 贵阳 550002; 2. 贵阳医学院, 贵州 贵阳 550004;

3. 贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550002)

摘要: 目的 比较三拗汤不同配伍和不同煎煮条件下麻黄碱、甘草酸和苦杏仁苷量的变化。方法 采用高效液相色谱外标法。选用 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 分别以甲醇-0.1% 磷酸(8 92)为流动相, 体积流量为 1 mL/min, 在 207 nm 波长测定盐酸麻黄碱; 以乙腈-0.2% 乙酸(35 65)为流动相, 体积流量为 1 mL/min, 在 254 nm 波长测定甘草酸; 选用大连依利特 Hypersil-C₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-乙腈-水(16 4 80)为流动相, 体积流量为 0.6 mL/min, 柱温 30 ℃, 在 208 nm 波长测定苦杏仁苷。结果 盐酸麻黄碱的量合煎液均大于分煎液; 甘草酸的量三药合煎时合煎液大于分煎液, 两药合煎时合煎液小于分煎液; 苦杏仁苷的量合煎液均小于分煎液。结论 中药复方煎煮过程中存在动态变化, 应根据不同的目的对样品进行适宜的处理。

关键词: 三拗汤; 配伍; 麻黄碱; 甘草酸; 苦杏仁苷

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)03-0372-04

三拗汤是我国传统中医方剂学中记录的临床常用方, 原名还魂汤, 出自张仲景《金匱要略》, 由麻黄、杏仁和甘草3味药组成, 宣肺解表, 主治感冒风邪, 鼻塞声重, 语音不出, 咳嗽胸闷^[1]。中药复方汤剂在煎煮过程中, 各药味的成分相互影响, 产生助溶或沉淀等现象, 使中药复方汤剂中有效成分的提取率产生变化, 直接影响中药复方汤剂在临床上的疗效。因此本实验将三拗汤中3味药进行不同组合后, 采用分煎与合煎的方法考察麻黄碱、甘草酸和苦杏仁苷的变化。

1 仪器、药材与试剂

美国惠普 HP1100 型高效液相色谱仪, DAD 检测器, HP1100/WIND3D 化学工作站, Eyela Fdu-1100 冷冻干燥机。

草麻黄 *Ephedra sinica* Stapf (产于河北), 杏仁 *Prunus armeniaca* L. (产于贵州), 甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. (产于内蒙古) 药材饮片经贵阳中医学院何顺志教授鉴定。

盐酸麻黄碱(批号 171241-200303)、甘草酸单铵盐(批号 0731-9704)和苦杏仁苷(批号 820-200002)对照品由中国药品生物制品检定所提供; 甲醇、乙腈为色谱纯, 水为重蒸水, 磷酸、乙酸为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 盐酸麻黄碱^[2-4]: 色谱柱为 Agilent

Zorbax SB-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.1% 磷酸(8 92); 体积流量: 1 mL/min; 柱温: 25 ℃; 检测波长: 207 nm。甘草酸^[5,6]: 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.2% 乙酸(35 65); 体积流量: 1 mL/min; 柱温: 25 ℃; 检测波长: 254 nm。苦杏仁苷^[7]: 色谱柱为 Hypersil-C₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)(大连依利特科学仪器有限公司), 流动相: 甲醇-乙腈-水(16 4 80); 体积流量: 0.6 mL/min; 柱温: 30 ℃; 检测波长: 208 nm。溶液的色谱图见图 1~3。

2.2 药材样品供试品溶液的制备

2.2.1 合煎液供试品溶液的制备(传统煎煮法): 称取药材饮片麻黄 9.0 g、杏仁 9.0 g、甘草 3.0 g, 加 8 倍量的水浸泡 1 h, 煎煮保持微沸 1 h, 倒出煎液; 药渣再加 6 倍量的水煎煮 1 h, 合并两次煎液, 冷冻干燥成干粉。分别精密称取 0.2 g 干粉 3 份, 置 25 mL 量瓶中, 按照以下方法制备样品供试品溶液。

加甲醇适量, 超声提取 45 min, 超声后加一滴磷酸, 并加甲醇至刻度, 摇匀, 4 000 r/min 离心 5 min, 过 0.45 μm 滤膜, 滤液即为合煎液测定盐酸麻黄碱样品供试品溶液。

加甲醇适量, 超声提取 30 min, 超声后加甲醇至刻度, 摇匀, 4 000 r/min 离心 5 min, 过 0.45 μm

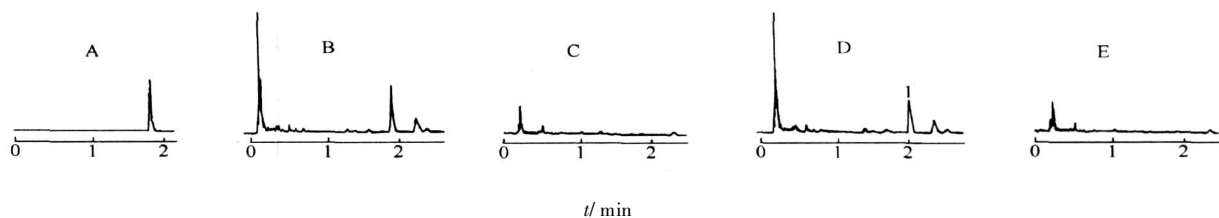
* 收稿日期: 2007-05-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30460154)

作者简介: 杨 (1976—), 男, 四川人, 讲师, 硕士, 主要从事中药及复方化学成分研究及新药研制。

E-mail: chongyang72000@yahoo.com.cn

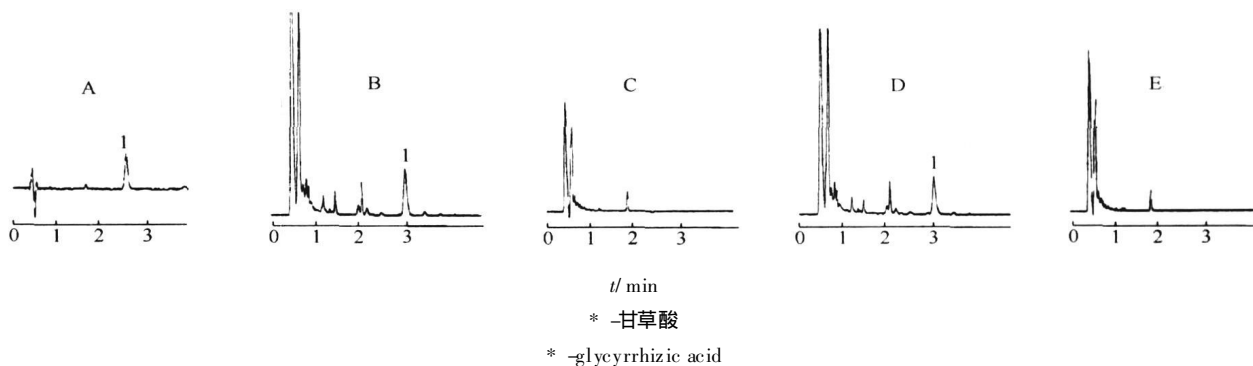
* 通讯作者 梁光义 Tel: (0851)5652109 E-mail: guangyi_liang@21cn.com



t/min
1-盐酸麻黄碱
1-ephedrine hydrochloride

图1 盐酸麻黄碱对照品(A)、合煎液样品(B)、合煎液阴性对照液(C)、分煎液样品(D)和分煎液阴性对照液(E)的HPLC图谱

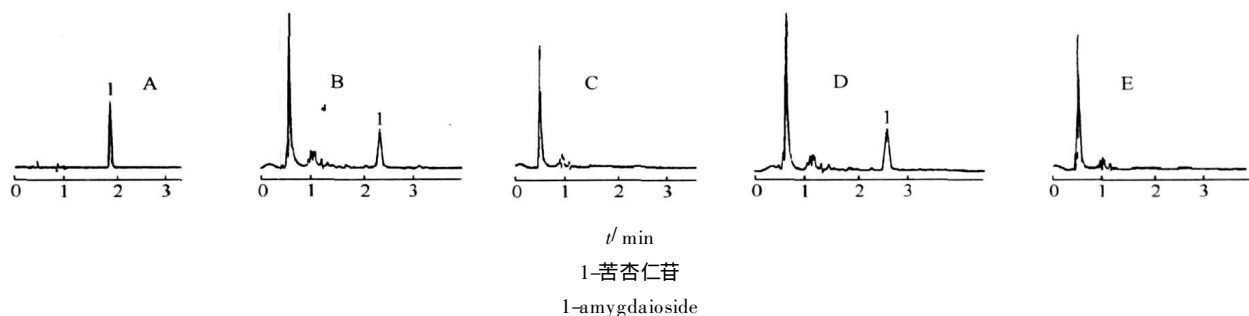
Fig. 1 HPLC Chromatograms of ephedrine hydrochloride reference substance (A), mixed decoction (B), blank of mixed decoction (C), separated decoction (D), and blank of separated decoction (E)



t/min
* -甘草酸
* -glycyrrhizic acid

图2 甘草酸单铵盐对照品(A)、合煎液样品(B)、合煎液阴性对照液(C)、分煎液样品(D)和分煎液阴性对照液(E)的HPLC图谱

Fig. 2 HPLC Chromatograms of glycyrrhizic acid reference substance (A), mixed decoction (B), blank of mixed decoction (C), separated decoction (D), and blank of separated decoction (E)



t/min
1-苦杏仁苷
1-amygdalioside

图3 苦杏仁苷对照品(A)、合煎液样品(B)、合煎液阴性对照液(C)、分煎液样品(D)和分煎液阴性对照液(E)的HPLC图谱

Fig. 3 HPLC Chromatograms of amygdalioside reference substance (A), mixed decoction (B), blank of mixed decoction (C), separated decoction (D), and blank of separated decoction (E)

滤膜, 滤液即为合煎液测定甘草酸样品供试品溶液。

加甲醇适量, 超声提取 30 min 后加甲醇至刻度, 摇匀, 取 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 4 000 r/min 离心 5 min, 过 0.45 μm 滤膜, 滤液即为合煎液测定苦杏仁苷样品供试品溶液。

2.2.2 分煎液供试品溶液的制备(煎煮方法由贵州宏宇药业有限公司提供): 分别称取药材饮片麻黄 9.0 g、杏仁 9.0 g、甘草 3.0 g, 杏仁和甘草分别加 8 倍量的水浸泡 1 h, 煎煮保持微沸 1 h, 倒出煎液; 药

渣再加 6 倍量的水煎煮 1 h, 合并两次煎液, 制备各药材的煎液, 冷冻干燥成干粉; 麻黄加 10 倍量的水浸泡 1 h, 煎煮保持微沸 40 min, 倒出煎液, 药渣再加 6 倍量的水煎煮 40 min, 合并两次煎液, 冷冻干燥成干粉。将各药材干粉混合均匀, 精密称取 0.2 g, 制备分煎液样品供试品溶液。其他配伍情况的煎液制备也按此法。

2.2.3 阴性对照液的制备: 再按上法制备分别不含麻黄、甘草、杏仁的合煎液、分煎液的阴性对照液。

2.3 对照品溶液的制备: 精密称取盐酸麻黄碱对照品适量, 用甲醇溶解, 制成1 546 μg/mL 的溶液, 备用。精密称取甘草酸对照品适量, 用甲醇溶解, 制成124 μg/mL 的溶液, 备用。精密称取苦杏仁苷对照品适量, 用甲醇溶解, 制成216 μg/mL 的溶液, 备用。

2.4 标准曲线的绘制: 精密吸取盐酸麻黄碱、甘草酸、苦杏仁苷对照品溶液适量, 分别置于10 mL 量瓶中, 加入甲醇至刻度, 使麻黄碱质量浓度分别为38.65、77.30、154.60、309.20、463.80 mg/L, 甘草

酸质量浓度分别为49.59、123.97、198.35、272.73、347.12 mg/L, 苦杏仁苷质量浓度分别为21.60、43.20、64.80、86.40、108.00 mg/L。精密吸取相应量进样, 测定峰面积。以峰面积积分值(Y)对进样量(X)进行线性回归, 结果见表1。

2.5 精密度试验: 分别精密吸取麻黄碱对照品溶液2 μL、甘草酸对照品溶液5 μL、苦杏仁苷对照品溶液5 μL, 连续进样5次, 测定相应峰面积, 计算得其RSD分别为1.38%、1.10%、1.10%。

表1 盐酸麻黄碱、甘草酸、苦杏仁苷的标准曲线

Table 1 Standard curve of ephedrine hydrochloride, glycyrrhizic acid, and amygdalioside

对照品	进样体积/μL	回归方程	r	线性范围/μg
盐酸麻黄碱	2	Y = 2304.2 X + 7.4	0.999 92	0.077 3 ~ 0.927 6
甘草酸	5	Y = 618.4 X + 5.6	0.999 81	0.247 9 ~ 1.735 6
苦杏仁苷	5	Y = 1849.4 X + 9.2	0.999 50	0.108 0 ~ 0.540 0

2.6 稳定性试验: 取供试品溶液分别于0、2、4、6、8 h 测定峰面积值, 计算RSD, 结果见表2, 表明各种供试品溶液在8 h 内稳定。

表2 稳定性试验的结果

Table 2 Results of stability test

麻黄	甘草	杏仁	盐酸麻黄碱 RSD/%		甘草酸 RSD/%		苦杏仁苷 RSD/%	
			合煎	分煎	合煎	分煎	合煎	分煎
+	+	+	1.39	1.10	1.10	0.51	2.08	2.77
+	+	-	2.51	1.27	0.23	0.41	-	-
+	-	+	1.33	1.50	-	-	0.67	1.78
-	+	+	-	-	0.20	2.92	2.26	2.17
+	-	-	2.69	2.69	-	-	-	-
-	+	-	-	-	0.67	0.67	-	-
-	-	+	-	-	-	-	0.20	0.20

“+”表示组成中有该项,“-”表示组成中无该项,表3同

“+”exiting it in composed materials,“-”lacking it in com-

posed materials, Table 3 is same

表3 不同配伍煎液中麻黄碱、甘草酸和苦杏仁苷的测定结果(n=5)

Table 3 Determination of ephedrine hydrochloride, glycyrrhizic acid, and amygdalioside in different decoctions (n=5)

麻黄	甘草	杏仁	盐酸麻黄碱			甘草酸			苦杏仁苷		
			合煎/ (mg·g ⁻¹)	分煎/ (mg·g ⁻¹)	合煎比分煎 增加比例/%	合煎/ (mg·g ⁻¹)	分煎/ (mg·g ⁻¹)	合煎比分煎 增加比例/%	合煎/ (mg·g ⁻¹)	分煎/ (mg·g ⁻¹)	合煎比分煎 增加比例/%
+	+	+	2.75	2.53	8.70	2.59	2.27	14.10	9.65	10.37	-7.46
+	+	-	2.66	2.57	3.50	1.94	2.14	-10.31	-	-	-
+	-	+	2.62	2.35	11.49	-	-	-	9.25	9.63	-4.11
-	+	+	-	-	-	2.73	2.94	-7.69	12.51	14.17	-13.27
+	-	-	-	-	1.58	-	-	-	-	-	-
-	+	-	-	-	-	-	3.44	-	-	-	-
-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	10.96	-

可以看出三拗汤不同配伍煎液中, 无论合煎分煎, 以及药材的不同配伍, 盐酸麻黄碱的量合煎液均大于分煎液; 甘草酸的量3药合煎时, 合煎液大于分煎液, 但两药合煎时, 合煎液小于分煎液; 无论合煎分煎, 以及药材的不同配伍, 苦杏仁苷的量合煎液均

2.7 回收率试验: 精密称取三拗汤样品约0.100 0 g, 分为3组, 每组各9份, 第1组(含盐酸麻黄碱约1.818 mg) 分别加入盐酸麻黄碱对照品2.286、1.946、1.648 mg, 第2组(含甘草酸约1.731 mg) 分别加入甘草酸对照品2.106、1.658、1.306 mg, 第3组(含苦杏仁苷约6.411 mg) 分别加入苦杏仁苷对照品6.717、5.474、4.659 mg, 制备供试品溶液, 进样测定各成分峰面积, 计算回收率, 结果盐酸麻黄碱、甘草酸和苦杏仁苷的平均回收率分别为100.1% (RSD为0.4%)、99.9% (RSD为0.7%) 和100.0% (RSD为1.4%)。

2.8 样品测定: 取药材不同配伍, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算, 结果见表3。

小于分煎液。

盐酸麻黄碱的量在麻黄、杏仁两药合煎时差异最大, 麻黄、甘草两药合煎时差异最小; 甘草酸的量3药合煎时差异最大, 甘草、杏仁两药合煎时差异最小; 苦杏仁苷的量甘草、杏仁两药合煎时差异最大,

麻黄、杏仁两药合煎差异最小。

3药合煎时甘草酸的量变化最大,苦杏仁苷的量变化最小;麻黄、甘草两药合煎时麻黄碱的量比甘草酸的量变化小;麻黄、杏仁两药合煎时麻黄碱的量比苦杏仁苷的量变化大;甘草、杏仁两药合煎时甘草酸的量比苦杏仁苷的量变化小。

3 讨论

三拗汤不同配伍煎液中,盐酸麻黄碱的量合煎液均大于分煎液,说明3味药材在煎煮过程中各药材可能共同发生反应或两两之间发生化学反应,都能促进麻黄碱盐的生成。盐酸麻黄碱的量麻黄、杏仁两药合煎差异最大,麻黄、甘草两药合煎差异最小,反应均能促进麻黄碱的生成。生物碱与甘草皂苷配伍能产生沉淀^[9],有可能麻黄中的麻黄碱与甘草中的甘草酸发生部分沉淀反应,导致麻黄碱的量略有降低。

三拗汤不同配伍煎液中,甘草酸的量3药合煎时,合煎液大于分煎液,两药合煎时合煎液小于分煎液,说明3味药材在煎煮过程中各药材共同发生反应,其反应结果能增加甘草酸在汤剂中的量,但两两之间发生化学反应,其反应结果却能降低甘草酸在汤剂中的量。麻黄、甘草两药合煎与杏仁、甘草两药

合煎甘草酸的量降低较多,进一步说明了麻黄中的麻黄碱与甘草中的甘草酸可能发生部分沉淀反应导致甘草酸的量降低更多。

三拗汤不同配伍煎液中,苦杏仁苷的量合煎液均小于分煎液,说明3味药材在煎煮过程中各药材共同发生反应、两两之间发生化学反应,苦杏仁苷水解,其反应结果都能降低苦杏仁苷在汤剂中的量。苦杏仁苷的量甘草、杏仁两药合煎差异最大,麻黄、杏仁两药合煎差异最小,说明在煎煮过程中甘草中甘草酸的酸性可能促进杏仁中苦杏仁苷的水解。

参考文献:

- [1] 段富津. 方剂学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1993.
- [2] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [3] 林朝展, 祝晨旻, 杨金燕, 等. 麻黄药材的质量分析研究[J]. 中药新药与临床药理, 2005, 16(1): 56-58.
- [4] 姜舜尧, 田颂九, 刘琼. 用2种高效液相色谱分离模式分析测定半夏露糖浆中麻黄碱、伪麻黄碱成分[J]. 药物分析杂志, 2003, 23(5): 341-343.
- [5] 白丽, 陈晓辉, 徐新盛, 等. HPLC测定草薢分清丸中甘草酸的含量[J]. 中成药, 2005, 27(8): 981-982.
- [6] 祁大庆, 胡秀波. HPLC法测定痰咳净片中甘草酸的含量[J]. 浙江化工, 2005, 36(7): 33-34.
- [7] 王友兰, 李红兵, 华玉琴. HPLC法测定桃仁中苦杏仁苷的含量[J]. 中国药师, 2002, 5(9): 550-556.
- [8] 野口卫. 汉方制剂分析技术[M]. 北京:人民卫生出版社, 1986.

毛细管电泳法测定半枝莲药材及灯盏花素片中野黄芩苷

王峻梅^{1,2}, 王建伟^{3,4}, 李全文², 陈缙光^{2*}, 蔡沛祥⁴, 莫金垣⁴

(1. 暨南大学分子生物研究中心, 广东 广州 510632; 2. 中山大学药学院, 广东 广州 510080; 3. 佛山市质量计量监督检测中心, 广东 佛山 528000; 4. 中山大学化学与化工学院, 广东 广州 510275)

摘要: 目的 建立半枝莲药材及其制剂灯盏花素片中黄酮类化合物野黄芩苷测定的毛细管电泳高频电导法。方法 探讨了缓冲液的种类、浓度、添加剂、分离电压和进样量对分离和检测的影响,以石英毛细管为分离柱, 1.0 mmol/L HAc-15.0 mmol/L 三乙醇胺(pH 8.6)缓冲液为电泳介质,分离电压20.0 kV,用非接触式高频电导法检测。结果 野黄芩苷的峰形良好,出峰较快,线性范围为0.001~10.0 μg/mL,检出限为0.5 μg/mL,回收率达99.4%以上。结论 为药材及制剂中野黄芩苷的测定提供了一种快速和简便的新方法。

关键词: 半枝莲; 灯盏花素片; 野黄芩苷; 毛细管电泳高频电导法

中图分类号: R 286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)03-0375-04

半枝莲为唇形科植物半枝莲 *Scutellaria barbata* D. Don 的干燥全草,别名通经草、紫连草、并头草、牙刷草、小韩信草等,具有清热解毒、化瘀利尿的功

效,用于治疗疔疮肿毒、咽喉肿痛、毒蛇咬伤、跌扑肿痛、水肿、黄疸等^[1]。半枝莲中主要的有效成分是黄酮类化合物,含野黄芩苷(灯盏花乙素)最多,具有抗

* 收稿日期: 2007-06-23

基金项目: 广东省自然科学基金重点项目(021808); 广东省教育厅科学基金资助项目(Z03055)

作者简介: 王峻梅(1978—),女,江苏宜兴人,研究实习员,硕士,主要从事毛细管电泳、药物分析和功能基因组单核苷酸多态性研究。

Tel: (020) 85560925-808 E-mail: meiger@163.com

* 通讯作者 陈缙光 Tel: (020) 88364586 Fax: (020) 87330558 E-mail: chenzg@gzsums.edu.cn