

玉屏风配伍剂量变化与有效成分的相关性研究

刘焕蓉,秦雪梅,王利平,王 虹
(山西大学化学化工学院,山西 太原 030006)

摘 要:目的 研究玉屏风处方中黄芪、白术、防风配伍剂量变化与有效成分的相关性。方法 对玉屏风配伍剂量变化的 4 组整方和 3 组拆方分别先用水回流提取,然后将药渣再用 80%乙醇回流提取,并采用分光光度法对水醇提取液中总黄酮、总皂苷、总多糖及总氨基酸进行测定。结果 有效成分的量是总多糖>总氨基酸>总黄酮>总皂苷;在整方组中,总皂苷的量是黄芪、白术、防风配伍 1:1:1>2:2:1>4:4:1>3:1:1,总多糖、总氨基酸及总有效成分的量是黄芪、白术、防风配伍 2:2:1>1:1:1>3:1:1>4:4:1;在拆方组中,总皂苷的量是防风:黄芪>黄芪:白术>防风:白术,总多糖、总黄酮、总氨基酸及总有效成分的量是黄芪:白术>防风:白术>防风:黄芪。结论 随着玉屏风药材剂量的变化,水醇提取液总有效成分明显改变,但是,这种改变并不是药材中相应成分量的线性增减。

关键词:玉屏风;总黄酮;总皂苷;总多糖;总氨基酸;配伍

中图分类号:R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2009)12-1922-03

玉屏风是补气固表的经典名方,由黄芪、白术、防风组成,用于治疗气虚感冒、咳嗽、呼吸道感染、过敏性鼻炎等疾病。经文献统计,三药比例有 12 种之多^[1]。为了探讨配伍比例变化所致有效成分差异与临床用药的相关性,本实验在药理研究配比^[2]的基础上增加了《中国药典》2005 年版收录的黄芪、白术、防风 3:1:1 组,对各组先进行水提取,然后将药渣再用 80%乙醇回流提取,并采用分光光度法分别测定了水醇提取液中总黄酮、总皂苷、总多糖及总氨基酸的量。

1 仪器、药材及试剂

UV-7502 型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司),Multiskan MK3 酶标仪(Thermo Labsystems,全波长),RE52-99 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),TDL-408B 台式离心机(上海安亭科学仪器厂),Sartorius BS210S 型电子天平。

黄芪(产地:山西浑源)、防风(产地:内蒙古乌兰浩特)、白术(产地:浙江磐安)药材均由山西大学化学化工学院秦雪梅教授鉴定。芦丁(国药集团化学试剂有限公司)、黄芪甲苷(中国药品生物制品检定所)试剂均为分析纯,总氨基酸测定试剂盒(包括反应液、显色剂、甘氨酸标准液,南京建成生物工程研究所)。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备:按比例准确称取总量为 50 g 而配伍剂量不同的玉屏风整方和拆方药材,分别置于 500 mL 圆底烧瓶中,加入 8 倍量蒸馏水浸泡过夜,保持微沸回流提取 2 次,每次 2 h,合并滤液,浓缩至适量,加 95%乙醇至乙醇体积分数达 40%,静置过夜,离心,上清液浓缩蒸干,得水提固形物,称定质量。然后用蒸馏水溶解定容于 50 mL 量瓶中,得水提液;沉淀及壁上的固体用无水乙醇洗涤 3 次,水浴干燥,称定质量,得粗多糖固形物;水提后的药渣再用 80%乙醇回流提取 2 次,每次 2 h,合并滤液,趁热用 4 层纱布滤过,收集滤液,浓缩,蒸干,称定质量,得药渣醇提固形物,然后用蒸馏水溶解定容于 50 mL 量瓶中,得药渣醇提液。见表 1。

表 1 玉屏风的提取固形物(n=3)

Table 1 Total solid components in Yupingfeng (n=3)

玉屏风整方及拆方	水提醇沉 固形物/g	药渣醇提 固形物/g	粗多糖固 形物/g
黄芪:白术:防风(1:1:1)	8.129 9	3.280 4	10.356 1
黄芪:白术:防风(2:2:1)	8.479 9	2.921 5	12.570 6
黄芪:白术:防风(3:1:1)	8.859 6	3.118 5	9.266 7
黄芪:白术:防风(4:4:1)	9.742 5	2.542 1	11.741 7
防风:黄芪(1:2)	9.521 4	2.545 1	6.207 0
防风:白术(1:2)	11.635 1	3.435 6	13.445 2
黄芪:白术(1:1)	8.843 6	2.709 7	12.648 5

取配伍剂量不同的水提液和药渣醇提液各 10 mL,分别置于 60 mL 分液漏斗中,用无水乙醚萃取脱脂 3 次,每次用量 7mL,弃去醚液,脱脂后的提取

收稿日期:2008-04-12

基金项目:山西省自然科学基金资助项目(2007011026);山西省教育厅高校科技研究开发项目(2007106)

作者简介:刘焕蓉(1956—),女,山西大同人,副教授,1979 年毕业于山西大学化学专业,主要从事现代色谱及分离科学的教学,生药及其制品的品质评价与质量标准化。Tel:(0351)7011534 Fax:(0351)7011688 E-mail:liuhr@sxu.edu.cn

液用水饱和正丁醇萃取 4 次,每次 10 mL,合并正丁醇液,再用质量浓度为 1%NaOH 溶液洗涤 3 次,每次 10 mL,弃去下层,正丁醇液用正丁醇饱和水洗至中性,80 ℃水浴挥干正丁醇,所留固体用甲醇溶解定容至 10 mL 量瓶中,得皂苷提取液。

2.2 对照品溶液的制备:精密称取芦丁对照品 25.3 mg,黄芪甲苷对照品 12.0 mg,分别加甲醇超声溶解,定容于 25 mL 量瓶中,备用。精密称取葡萄糖对照品 7.54 mg,置 50 mL 量瓶中,加适量蒸馏水使其溶解至刻度,摇匀,备用。

2.3 标准曲线的绘制:总黄酮以芦丁为对照品,采用薛梅等^[3]测定方法;总皂苷以黄芪甲苷为对照品,采用赵复中等^[4]测定方法;总多糖以葡萄糖为对照品,采用苯酚-硫酸法^[5],分别于 505、550、490 nm 处测定吸光度,以质量浓度为横坐标吸光度为纵坐标,绘制工作曲线。结果见表 2

表 2 线性回归方程及线性范围 (n=3)

Table 2 Linear regression equation and linear range (n=3)		相关系数(r)	线性范围/(mg·mL ⁻¹)
组 分	线性回归方程		
芦丁	Y=12.158 X+0.008 3	0.999 6	0.007 6~0.045 6
黄芪甲苷	Y=27.399 X-0.023	0.999 7	0.004 0~0.040 0
葡萄糖	Y=11.032 X+0.137 7	0.999 3	0.003 8~0.033 9

2.4 整方和拆方中总黄酮、总皂苷、总多糖及总氨基酸的测定

表 3 玉屏风配伍剂量变化中总皂苷、总黄酮、总氨基酸和总多糖的测定结果 (n=3)

Table 3 Determination of total saponins, flavonoids, amino acid, and polysaccharide in Yupingfeng by different compatibility (n=3)

配伍剂量	水提液			药渣醇提液			总黄酮/ (mg·g ⁻¹)	总皂苷/ (mg·g ⁻¹)	总氨基酸/ (mg·g ⁻¹)	总多糖/ (mg·g ⁻¹)
	黄酮/ (mg·g ⁻¹)	皂苷/ (mg·g ⁻¹)	氨基酸/ (mg·g ⁻¹)	黄酮/ (mg·g ⁻¹)	皂苷/ (mg·g ⁻¹)	氨基酸/ (mg·g ⁻¹)				
黄芪:白术:防风(1:1:1)	5.58	1.32	4.04	2.73	1.14	10.64	8.31	2.46	14.68	123.95
黄芪:白术:防风(2:2:1)	5.81	1.17	3.97	2.85	0.39	17.19	8.66	1.56	21.16	124.88
黄芪:白术:防风(3:1:1)	4.60	0.31	4.07	3.33	0.26	9.56	7.39	0.57	13.63	97.21
黄芪:白术:防风(4:4:1)	6.20	0.37	3.93	2.58	0.27	7.57	8.78	0.64	11.50	55.93
防风:黄芪(1:2)	3.59	1.53	3.53	3.31	0.72	10.03	6.90	2.25	13.53	12.83
防风:白术(1:2)	6.74	0.44	3.28	2.55	0.33	5.00	9.29	0.77	8.28	109.53
黄芪:白术(1:1)	7.42	1.17	5.03	2.59	0.68	11.23	10.01	1.85	16.26	142.89

结果表明,在整方及拆方中保持玉屏风配伍药材总量不变的条件下,随着剂量的变化,水溶固形物、醇溶固形物和粗多糖的收率有差异,但这些差异与总有效成分的量的相关性不大。而总黄酮、总皂苷、总氨基酸及总多糖的量在水提液和药渣醇提液中的提取率差异较明显,其中总黄酮、总皂苷在水提液中的提取率是醇提液的 1.3~2.3 倍,总氨基酸在醇提液中的提取率是水提液的 2.7~4.3 倍。在整方组中,总皂苷的量是 1:1:1>2:2:1>4:4:

基酸的测定

2.4.1 总黄酮的测定:取玉屏风配伍剂量变化的水提液和药渣醇提液各 1.0 mL 分别置于 10 mL 量瓶中,加适量甲醇超声 30 min,冷却至室温后定容至刻度,摇匀,再分别取 3 mL 置 25 mL 量瓶中,处理,测定吸光度,通过回归方程计算总黄酮的质量分数,结果见表 3。

2.4.2 总皂苷的测定:取玉屏风配伍剂量变化的水提液和药渣醇提的皂苷液各 0.1 mL,分别处理,测定吸光度,通过回归方程计算总皂苷的质量分数,结果见表 3。

2.4.3 总多糖的测定:将玉屏风配伍剂量变化的整方及拆方粗多糖分别稀释到 0.4 mg/mL,分别精密移取 2 mL,依法处理,测定吸光度,通过回归方程计算总多糖的质量分数,结果见表 3。

2.4.4 总氨基酸的测定^[6,7]:取玉屏风配伍剂量变化的水提液和药渣醇提液各 0.5 mL,依次加于 96 孔酶标板上,空白孔加蒸馏水 0.5 mL,标准孔加 50 μmol/L 氨基酸标准溶液 0.5 mL,各加氨基酸反应液 1.0 mL,漩涡混匀,然后加氨基酸显色剂 0.5 mL,混匀,3 500 r/min 离心 10 min,取上清液于 650 nm 处,以蒸馏水、甲醇分别调零比色,测定各管吸光度值,计算样品中总氨基酸的质量分数,结果见表 3。

1>3:1:1,总多糖、总氨基酸及总有效成分的量是 2:2:1>1:1:1>3:1:1>4:4:1,在拆方组中,总皂苷的量是防风:黄芪>黄芪:白术>防风:白术,总多糖、总黄酮、总氨基酸及总有效成分的量是黄芪:白术>防风:白术>防风:黄芪。

2.5 玉屏风配伍剂量变化整方及拆方有效成分含量与药理机制的相关性:依据表 3 结果,将玉屏风配伍剂量变化整方及拆方不同提取液中各有效成分的最高量进行比较,结果见表 4。

表 4 玉屏风配伍剂量变化整方及拆方中有效成分
Table 4 Effective components in Yupingfeng by different compatibility and splitting use

有效成分	提取液	范围/(mg·g ⁻¹)	整方配伍 黄芪：白术：防风	最高量/(mg·g ⁻¹)	拆方配伍	最高量/(mg·g ⁻¹)
总皂苷	水提液	0.31~1.53	1：1：1	1.32	防风：黄芪(1：2)	1.53
	水提+醇提液	0.57~2.46	1：1：1	2.46	防风：黄芪(1：2)	2.25
总氨基酸	水提液	3.28~5.03	2：2：1	3.97	黄芪：白术(1：1)	5.03
	水提+醇提液	8.28~21.16	2：2：1	21.16	黄芪：白术(1：1)	16.26
总黄酮	水提液	3.59~7.42	4：4：1	6.20	黄芪：白术(1：1)	7.42
	水提+醇提液	6.90~10.01	4：4：1	8.78	黄芪：白术(1：1)	10.01
总多糖	水提液	12.83~124.88	2：2：1	124.88	黄芪：白术(1：1)	142.89

在文献玉屏风散配伍对小鼠免疫功能的影响研究^[2]中表明,玉屏风不同配伍对免疫力低下者均有着较好的恢复作用,达到或接近正常水平。从抑制小鼠腹腔巨噬细胞吞噬率和吞噬指数的增加表明,在整方组中,防风高剂量 1：1：1 配伍的吞噬效果最好,在拆方组中,防风黄芪组的最强。提示其药理作用机制与总皂苷的量有关。在整方组中,防风中剂量 2：2：1 配伍对提升溶血素和溶血空斑两项指标以及增强淋巴细胞转化效果的趋势最明显,在各拆方组中,黄芪白术组比较优越。提示其药理作用机制与总有效成分的量有关。从免疫学考虑,整方组 2：2：1 和拆方组黄芪白术 1：1 配伍总有效成分的量高,主治与协同最合适。《中国药典》2005 年版中的 3：1：1、2：2：1 尽管防风剂量相同,但总有效成分的量不具前位。综上所述,四方主治相似,由于防风剂量不同,其功效又有些许差异,临床上遣方用药,应辨证施治。

3 讨论

由于在黄酮苷元分子中引入羟基,羟基经甲基化及糖苷化,使其部分溶于水,部分溶于醇,依黄酮的结构不同,在水和乙醇中的溶解度不同,在水提液中黄酮的提取率与药材的量基本呈一致趋势,而在药渣醇提液中的提取率与药材量的关系是非正比的。提示在乙醇体系中提取过程是比较复杂的,有

待进一步研究。

甾体皂苷元难溶于水,而易溶于常见的有机溶剂,皂苷元与糖结合成为苷类,一般可溶于水和稀醇,所以水提液提取的主要是皂苷,而乙醇提取液中提取的主要是皂苷元。

氨基酸一般溶于水,难溶于有机溶剂,所以水提液溶出的是游离的蛋白质组分氨基酸。而 80%乙醇提取液提取的多为谷蛋白类。另外在水提液中由于多糖及蛋白的存在以及氨基酸和溶剂极性的影响,使氨基酸的溶出率偏低。

中药有效成分的提取一般采用水煎煮,研究表明将水提后的药渣再用乙醇提取,可使总有效成分的量增加 30%~65%,所以对药渣再进行乙醇提取是非常必要的。

参考文献:

[1] 陈霞雪,高晓山. 玉屏风散组成考察及联想[J]. 中成药, 1995,17(4):45-46.
[2] 李晓琳. 玉屏风散配伍对小鼠免疫功能的影响[D]. 哈尔滨, 黑龙江中医药大学,2005.
[3] 薛梅,黄国强,陈宏伟. 木瓜中总黄酮的提取及含量测定[J]. 淮海医药,2004,22(2):156.
[4] 赵复中,庄碧年,钱雯. 生药膜荚黄芪中总皂苷含量测定[J]. 南京医科大学学报,1994,14(2):215-217.
[5] 张惟杰. 糖复合物生化技术研究[M]. 杭州:浙江大学出版社,1994.
[6] 周国兰,刘晓霞,何萍,等. 茛三酮比色法测定茶叶中游离氨基酸总量方法的疑点研究[J]. 贵州茶叶 2007,1:24-29.
[7] 朱瑾,李新霞,陈坚. 茛三酮比色法测定蒜氨酸原料药中总氨基酸的含量[J]. 西北药学杂志,2008,23(3):136-138.

《中草药》杂志列中文核心期刊中国医学类第一位

中国医学类核心期刊表

序号	刊名	序号	刊名
1	中草药	11	针刺研究
2	中国中药杂志	12	中药新药与临床药理
3	中国中西医结合杂志	13	南京中医药大学学报
4	中国针灸	14	中国实验药理学杂志
5	中成药	15	辽宁中医杂志
6	北京中医药大学学报	16	时珍国医国药
7	中药材	17	中医杂志
8	中国中医基础医学杂志	18	新中医
9	中药药理与临床	19	中国中西医结合急救杂志
10	中华中医药杂志	20	中国天然药物

摘自《中文核心期刊要目总览》2008 年版(第五版)