

大黄黄连泻心汤不同配伍浸渍剂中 主要化学成分变化研究*

□ 邹佳丽 黄 萍 袁月梅 姚美村** (中山大学药学院 广州 510006)

Francis C.P. Law

(Department of Biological Sciences, Simon Fraser University, Burnaby, B.C. Canada V5A 1S6)

摘 要:目的:建立大黄黄连泻心汤浸渍剂中主要化学成分同时测定的 HPLC 方法,并分析在配伍黄芩前后这些主要化学成分的变化。方法:采用 HPLC-UV 法,色谱柱为苯基柱(250mm×4.6mm, 5 μ m),柱温为室温,流动相为乙腈-0.5%三乙胺(磷酸调节 pH 至 3.5),梯度洗脱,流速为 1mL/min;紫外检测波长为 254nm、270nm,进样量为 20 μ L。结果:本研究建立的 HPLC 方法准确、可靠,可同时测定大黄黄连泻心汤的主要化学成分;在大黄和黄连配伍黄芩前后浸渍剂中的主要化学成分发生了明显变化,大黄蒽醌类成分明显增加,黄连生物碱中小檗碱含量明显减少。结论:大黄黄连泻心汤的组方中是否配伍有黄芩将对该方主要化学成分含量变化产生明显影响。

关键词:大黄黄连泻心汤 浸渍剂 配伍 HPLC

大黄黄连泻心汤是中国汉朝著名医学家张仲景在《伤寒杂病论》中收录的复方,由大黄、黄连二味药组成,《伤寒论 辨太阳病脉证并治下第七》中注“心下痞,按之濡,其脉关上浮者,大黄黄连泻心汤主之。大黄二两,黄连一两,右二味,以麻沸汤渍之,须臾,绞去滓,分温再服^[1-2]”。由于《伤寒杂病论》早已失传,在后世重新整理成书时,对于该方的配伍组成产生了争议^[3],争议的核心是“该方除由大黄和黄连组成之外,是否还配伍有黄芩”,该争议已持续 1500 余年,至今仍没有确切结论。众所周知,中药起治疗作用的药效物质基础是其所含的化学成分,在大黄黄连泻心汤的组方争议中,

是否配伍有黄芩将有可能导致化学成分发生明显变化,最终将影响到复方的疗效。因此,有必要详细分析大黄和黄连的主要化学成分在配伍黄芩前后所发生的变化。此外,在大黄黄连泻心汤的制法中,张仲景采用滚烫热水浸泡药物,然后去渣服用,这种浸渍法不同于中药复方的传统煎煮法,而目前有关此制法对大黄黄连泻心汤化学成分变化影响的研究较少^[4]。为了分析在浸渍法制备下大黄黄连泻心汤在配伍黄芩前后的化学成分变化,本研究采用 HPLC 法测定了不同配伍的大黄蒽醌类、黄芩黄酮类和黄连生物碱类等的主要成分,用以考察由于配伍不同而导致的这三类化学成分的变化,以提供协助解决大黄黄连泻心汤复方配伍争议的实验依据。

收稿日期:2009-02-24

修回日期:2009-03-06

* 国家自然科学基金项目(30873428):大黄黄连泻心汤主要化学成分分析与生理药动学研究,负责人:姚美村。

** 联系人:姚美村,副教授,硕士生导师,主要研究方向:中药药动学和药物分析学,E-mail:Lssymc@mail.sysu.edu.cn。

一、仪器、试剂与样品

1. 仪 器

Waters 1525 型高压泵, Waters 2996 PDA 检测器, Waters 717 plus 自动进样器(美国 Waters 公司), Mettler Toledo 电子天平(瑞士梅特勒托利多公司), Anke TGL-16B 离心机(上海安亭科学仪器厂)。

2. 试 剂

甲醇(色谱纯, Burdick & Jackson, USA), 乙腈(色谱纯, Burdick & Jackson, USA), 超纯水, 磷酸(分析纯, 天津市福晨化学试剂厂), 三乙胺(分析纯, 天津市富宇精细化工有限公司)。

3. 对照品

芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚, 批号分别为 110795-20060, 0757-200206, 110756-200110, 110796-100615, 110758-200610; 黄芩苷, 黄芩素, 批号分别为 110715-200413, 111595-200604; 盐酸小檗碱, 盐酸巴马汀碱, 批号分别为 110713-200609, 0732-200005。(均购于中国药品生物制品检定所)。

4. 药 材

大黄、黄连(产地四川), 黄芩(产地河北), 均购于广州中医药大学大药房有限公司中药饮片厂。

二、方法与结果

1. 色谱条件

固定相: Luna 苯基柱(250mm×4.6mm, 5 μ m, 美国菲罗门), 流动相: A-乙腈, B-0.5%三乙胺溶液(磷酸调节 pH 至 3.5), 梯度洗脱, 洗脱程序为: 0~10min: 20% A→35% A, 80% B→65% B; 10~20min: 35% A→50% A, 65% B→50% B; 17~23min: 50% A→70% A, 50% B→30% B; 23~30min: 70% A-30% B; 30~35min: 70% A→20% A, 30% B→80% B; 温度为室温, 流速为 1mL/min; 紫外检测波长为 254、270nm, 进样量为 20 μ L。

2. 对照品溶液的制备

取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、黄芩苷、黄芩素、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀碱等对照品适量, 精密称定, 加甲醇分别制成 0.079mg/mL, 0.080mg/mL, 0.078mg/mL, 0.078mg/mL,

0.042mg/mL, 0.114mg/mL, 0.187mg/mL, 0.086mg/mL, 0.119mg/mL 的储备溶液。分别精密量取上述溶液各 1mL, 盐酸小檗碱 2 mL, 混匀, 即得混合对照品溶液。

3. 样品溶液的制备

(1) 浸渍药液的制备。

取大黄粉末(过 100 目筛)3.0g, 精密称定, 置烧杯中用 100 mL 热水浸泡, 迅速搅拌均匀, 分别于 2、5、10、20、30、50 min 时取药液各 0.5 mL, 5000 r/m 离心 5 min, 取上清液备用。对于黄连, 黄芩, 大黄与黄连, 大黄与黄芩以及三味药配伍样品的制备, 则分别精密称取黄连或(和)黄芩粉末(过 100 目筛)1.5g, 大黄粉末 3.0 g, 按不同配伍情况混合后加入 100 mL 沸水, 迅速搅拌均匀, 取样及处理与大黄样品制备方法一致。

(2) 供试品的制备。

精密量取上述的上清药液 0.1mL, 加入 0.9mL 的甲醇萃取, 12000r/m 离心 5min, 取上清液过滤, 置 4℃ 冰箱保存备用。

4. 标准曲线的建立

精密吸取上述混合对照品溶液适量, 用甲醇配制成标准品系列, 各取 20 μ L 进样分析。以 9 种对照品的浓度(μ g/mL)为横坐标 X, 相应的峰面积为纵坐标 Y, 得回归方程, 见表 1。

5. 精密度试验

取混合对照品混合液连续进样 6 次, 记录峰面积, 用峰面积计算本方法的精密度, 结果黄芩苷的 RSD 为 1.19%, 巴马汀碱为 1.73%, 小檗碱为 1.46%, 黄芩素为 0.68%, 芦荟大黄素为 1.28%, 大黄酸为 1.21%, 大黄素为 1.27%, 大黄酚为 1.44%, 大黄素甲醚为 1.63%, 表明精密度良好。

表 1 主要化学成分的线性范围与标准曲线

化合物	回归方程	相关系数 (r)	线性范围 (μ g/mL)	定量限 (μ g/mL)	检测限 (μ g/mL)
黄芩苷	Y=65144X-2576.6	0.9999	0.186-18.6	0.392	0.093
巴马汀碱	Y=54863X-908.5	0.9999	0.187-18.7	0.374	0.136
小檗碱	Y=96530X-983.7	1	0.171-17.12	0.181	0.065
黄芩素	Y=142404X-8968.1	1	0.119-11.90	0.228	0.104
芦荟大黄素	Y=88241X-3380.3	1	0.079-7.86	0.289	0.085
大黄酸	Y=104675X+1080.9	0.9999	0.080-8.00	0.148	0.039
大黄素	Y=71256X+361.5	0.9999	0.078-7.80	0.146	0.039
大黄酚	Y=119201X+1738.5	1	0.078-7.80	0.140	0.038
大黄素甲醚	Y=48727X+630.8	1	0.085-4.24	1.066	0.085

6. 重复性试验

按本文“浸渍药液的制备”方法,分别制备三味药配伍浸渍相同时间的药液 6 份,再按“供试品的制备方法”制备供试品溶液,各取 20 μ L 进样分析,记录峰面积,分别计算 9 个成分的含量,结果黄芩苷的 RSD 为 2.18%,巴马汀碱为 4.50%,小檗碱为 2.35%,黄芩素为 2.21%,芦荟大黄素为 2.31%,大黄酸为 2.35%,大黄素为 2.19%,大黄酚为 1.81%,大黄素甲醚为 3.64%。

7. 加样回收率试验

精密吸取三药味配伍浸渍药液适量,分别加入高、中、低三个浓度的混合对照品溶液,按“供试品的制备方法”制备供备溶液,各取 20 μ L 进样分析,测定含量并计算回收率,结果黄芩苷的平均回收率为 104.47% (RSD=3.63),巴马汀碱为 94.93% (RSD=1.08),小檗碱为 98.06% (RSD=5.09),黄芩素为 102.43% (RSD=4.05),芦荟大黄素为 98.46% (RSD=1.98),大黄酸为 95.52% (RSD=3.78),大黄素为 95.34% (RSD=2.74),大黄酚为 98.25% (RSD=4.68),大黄素甲醚为 98.58% (RSD=2.11)。

8. 样品测定

按所建立的方法对大黄、黄芩、黄连、大黄黄连、大黄黄芩、黄连黄芩,三味药配伍浸渍剂不同时间点的样品溶液进行含量测定,结果见图 1、表 2。

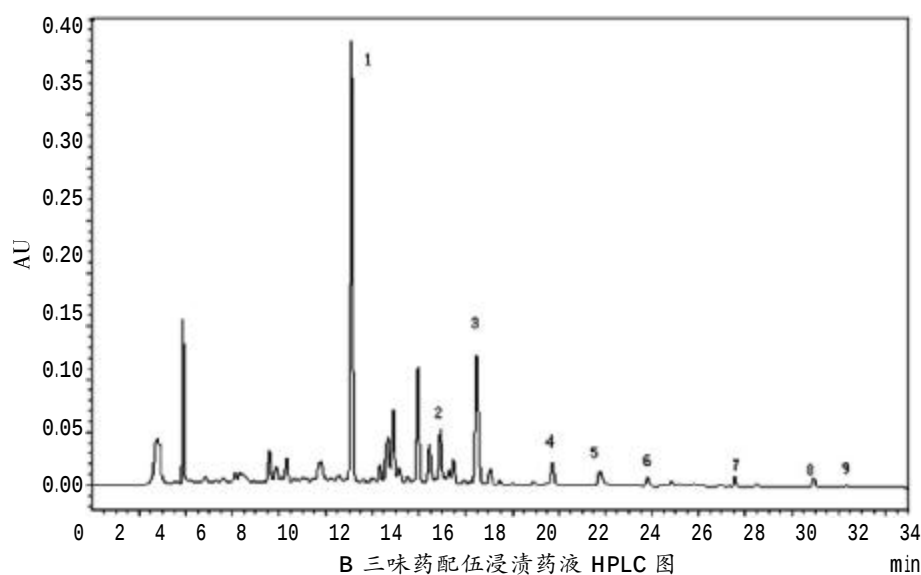
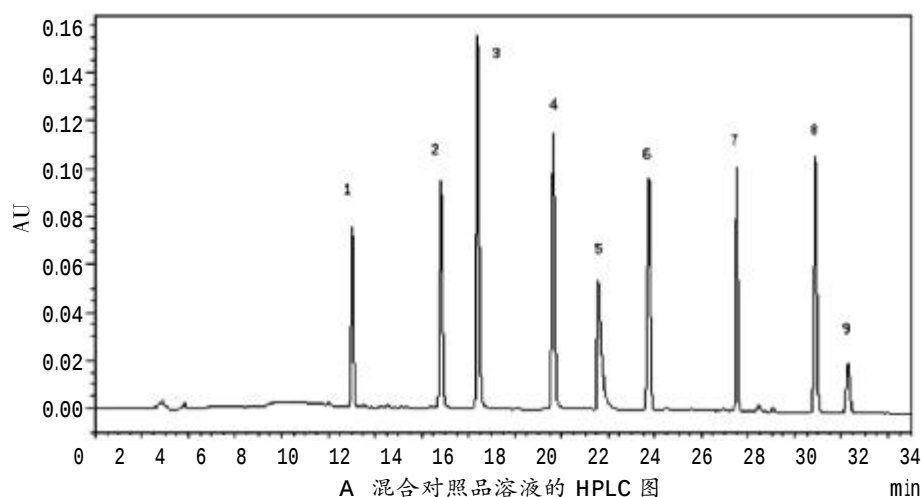
三、结果

1. HPLC 对不同配伍药液的分析

本研究对不同配伍样品进行了分析,结果如图 1 和表 3 所示。

2. 不同配伍对大黄蒽醌类成分的影响

由表 2 数据可以得出,三药味配伍、大黄黄连配伍、大黄黄芩配伍和大黄在浸渍过程中蒽醌浓度的平均值分别为 45.49、23.12、122.16 和 42.38 μ g/



1-黄芩苷, 2-巴马汀碱, 3-小檗碱, 4-黄芩素, 5-芦荟大黄素, 6-大黄酸, 7-大黄素, 8-大黄酚, 9-大黄素甲醚

图 1 混合对照品溶液(A)和三味药配伍浸渍药液(B)的 HPLC 图

表 2 不同配伍浸渍剂中各成分的含量变化($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/mL}$)

配伍类型	蒽醌总浓度	黄芩苷	巴马汀碱	小檗碱	黄芩素
大黄	42.38 $\pm$ 1.72	-	-	-	-
黄连	-	-	170.19 $\pm$ 4.10	624.53 $\pm$ 8.29	-
黄芩	-	2354.3 $\pm$ 53.07	-	-	242.44 $\pm$ 39.29
大黄黄连	23.12 $\pm$ 4.45	-	40.55 $\pm$ 2.21	135.84 $\pm$ 3.16	-
大黄黄芩	122.16 $\pm$ 6.18	1526.49 $\pm$ 71.23	-	-	362.98 $\pm$ 79.48
黄连黄芩	-	1218.87 $\pm$ 34.56	167.68 $\pm$ 3.96	87.80 $\pm$ 23.66	85.83 $\pm$ 8.32
三药味配伍	45.49 $\pm$ 2.07	1146.54 $\pm$ 44.33	48.85 $\pm$ 2.42	122.89 $\pm$ 5.88	48.76 $\pm$ 4.54

mL, 表明黄芩的存在有利于大黄蒽醌类成分的溶出, 这可能是受黄芩和大黄蒽醌类大部分成分增溶效应影响^[5], 也可能是黄芩中的某种组分将结合型大黄酸加速转变为游离型大黄酸, 或对游离大黄酸有增溶助溶作用^[6]; 而黄连的存在则使得大黄蒽醌类成分减少, 可能是由于这些成分与生物碱产生共沉淀所致^[7]。当三味药配伍时, 由于黄芩苷等酸性成分竞争与生物碱产生沉淀, 减少了蒽醌类的沉淀, 致使黄芩与黄连的作用在一定程度上抵消, 使得药液的蒽醌类成分浓度与大黄单独浸渍时基本相当, 从而提高了蒽醌类成分的浓度。图 2 也直观体现了由于配伍不同而导致的蒽醌类成分的变化。

3. 不同配伍对黄连生物碱的影响

由表 2 数据可以得出, 三药味配伍、大黄黄连配伍、黄芩黄连配伍和黄连在浸渍过程中小檗碱(以及巴马汀碱)浓度的平均值分别为 122.89 (48.85), 135.85 (40.55), 87.80 (167.68), 624.53 (170.19) $\mu\text{g/mL}$, 表明大黄与黄连配伍使小檗碱和巴马汀碱都明显减少, 这可能是酸性的蒽醌类成分和碱性的生物碱产生沉淀所致^[7-9]; 实验过程中发现黄连黄芩浸渍药液中有明显的絮状物沉淀, 实验结果显示黄芩与黄连配伍使小檗碱浓度急剧降低, 但对巴马汀碱的影响却相对较小, 推测可能是由于小檗碱先与酸性黄酮类成分产生沉淀的作用, 使药液中酸性成分迅速减少, 因而与巴马汀碱产生的沉淀少, 其浓度下降幅度较小。此外, 当三味药同时配伍浸渍时, 由于药液中同时存在大黄蒽醌和黄酮类两种酸性物质, 他们都能与生物碱产生沉淀, 从而使小檗碱与巴马汀碱的浓度都明显降低。图 3 和图 4 也直观体现了由于配伍不同而导致的生物碱类成分的变化。

4. 不同配伍对黄芩黄酮类成分的影响

由表 2 数据可以得出, 三药味配伍、大黄黄芩配伍、黄芩黄连配伍和黄芩在浸渍过程中黄芩苷(以及黄芩素)浓度的平均值分别为 1146.54 (48.76), 1526.49 (362.98), 1218.87 (85.83), 2354.35 (242.44) $\mu\text{g/mL}$, 黄芩单独浸渍时黄芩苷浓度最高, 其次是大黄黄芩和黄芩黄连的配伍, 三药味配伍浸渍时的含量最低; 而黄芩素浓度最高的则是大黄黄芩配伍, 其次是黄芩单独浸渍, 三药味配伍的结果最低。结果显示大黄与黄芩配伍使得黄芩苷浓度明显下降, 而黄芩素浓度升高, 推测可能是由于大黄蒽醌类和黄芩苷均为酸性成分, 黄芩苷在酸性条件下不稳定, 水解

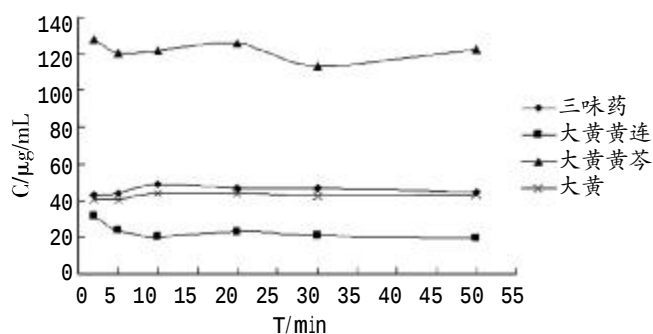


图 2 不同配伍对大黄蒽醌类成分的影响

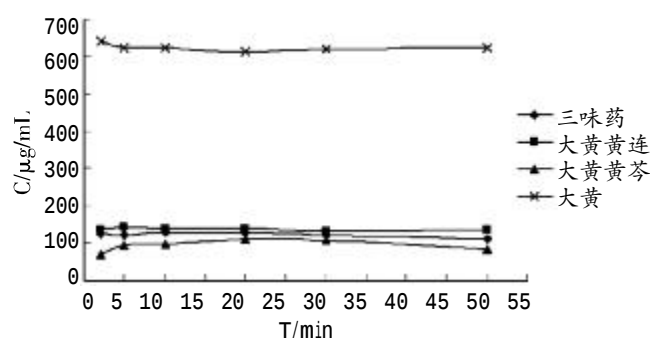


图 3 不同配伍对黄连小檗碱成分的影响

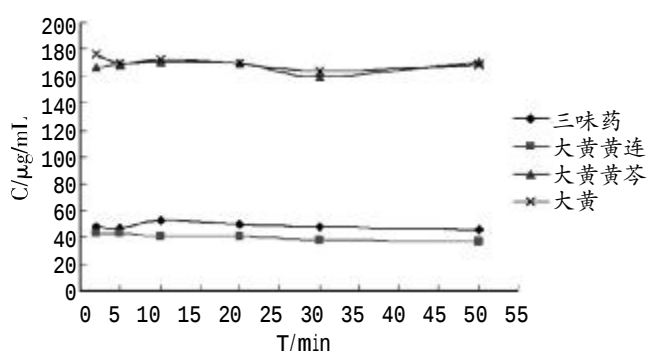


图 4 不同配伍对黄连巴马汀碱成分的影响

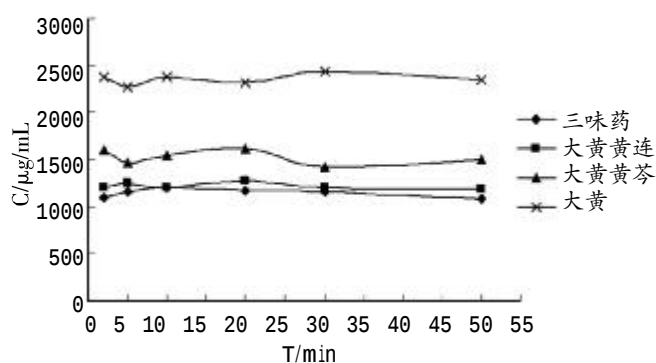


图 5 不同配伍对黄芩苷成分的影响

成黄芩素, 使黄芩素浓度升高。如前所述, 黄连与黄芩共存会产生沉淀, 所以黄连黄芩配伍和三药味配

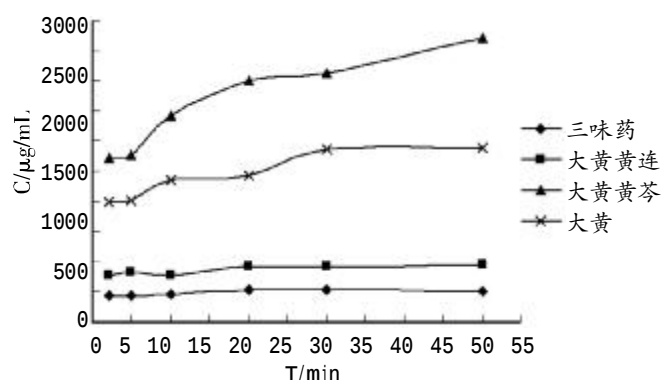


图6 不同配伍对黄芩素成分的影响

伍药液中两种化合物浓度都明显降低。图5和图6也直观体现了由于配伍不同而导致的黄酮类成分的变化。

四、结论与讨论

本研究建立了同时测定大黄黄连泻心汤中蒽醌类、黄酮类和生物碱类主要化学成分的HPLC方法,并对大黄、黄连与黄芩三味药物不同配伍浸渍剂中的主要成分进行了分析。结果表明,本研究建立的HPLC方法准确、可靠,可用于大黄黄连泻心汤中主要化学成分的含量测定。在大黄和黄连配伍黄芩前后,溶液中的主要化学成分发生了明显变化,如君药大黄中的蒽醌类成分明显增加,而黄连生物碱中的小檗碱含量明显减少,这说明大黄黄连泻心汤的组方中是否配伍黄芩将对该方的化学成分产生明显影响。

由于在大黄黄连泻心汤中各类(蒽醌类、生物碱类和黄酮类)成分的性质差别较大,所以用不同溶剂对药液进行萃取将有可能得到不同的结果,因此本研究对萃取溶剂和方法进行了比较和选择。在药液萃取过程中对比了甲醇萃取、先乙醚萃取后再甲醇萃取、乙酸乙酯萃取和药液稀释后进样等四种样品处理方法后各种成分的含量。结果表明,甲醇对药液中的蒽醌类、生物碱和黄酮类成分的提取效果都比较理想,所萃取得到的成分和含量与药液稀释后进样的结果基本相同,说明甲醇提取液基本能反映药液中各主要成分的含量;先乙醚萃再甲醇萃取方法得到的各主要成分的含量则明显减少,这可能是某些极性较大成分在处理过程中由于溶解度较小而造成损失;而用乙酸乙酯萃取则只能萃取到黄酮类成分,其他成分的含量较少;对于药液稀

释后进样的方法,其结果虽然最能反映药液中各成分的含量,但此类溶液在放置一段时间后,其中黄芩苷的含量急剧降低,这说明药液稀释后有可能导致某些成分不够稳定。因此,本研究综合考虑以上方法和结果后,采用了0.1mL的药液加0.9mL的甲醇萃取方法^[6]。

由于不同成分的结构差别较大,所以其紫外吸收波长也有区别。为了更好的获得吸光度数据,本研究对不同化学成分的检测采用了不同的波长,以对应于不同成分的吸收特征。在分析过程中,本研究用二极管阵列检测器对大黄五种蒽醌类成分,盐酸小檗碱,巴马汀碱,黄芩苷和黄芩素对照品分别在200~400nm范围内进行了紫外光谱扫描,结果表明五种蒽醌类成分在254nm处均有较强吸收,盐酸小檗碱和巴马汀碱在227、265、350nm处有最大吸收,而黄芩苷和黄芩素在216、276、320nm处有最大吸收;鉴于220nm波长靠近紫外光谱的末端吸收区,干扰较大,因而确定采用254nm作为蒽醌类成分的测定波长,270nm作为生物碱和黄酮类的测定波长^[10]。

从试验结果可以看出,对于大黄黄连泻心汤来说,在组方中是否配伍黄芩将会导致复方中的主要化学成分发生非常复杂的化学变化,一方面增加了药液中大黄蒽醌类的含量,另一方面又降低了小檗碱和巴马汀碱的含量,此外还在复方中增加了黄酮类成分,这些化学成分的复杂变化从药效物质基础角度来看,应该会对疗效产生影响,但这种影响到底使得疗效更强,还是有可能产生不必要的副作用,仍需要结合药理药效实验进行观察和比较;至于该复方采用的浸渍法与传统的煎煮法之间的化学成分比较,是否有更明显的优势,本研究将进行更深入探讨。由于复方中不同药物的配伍将会导致化学成分的含量发生明显变化,所以这将会使得对应的疗效也发生变化,因此在临床中将不能依据单一成分的含量来确定药物的剂量和服药方式,有必要对复方配伍后的主要成分进行更深入研究。

参考文献

- 1 彭光超. 麻沸汤渍服大黄黄连泻心汤之我见. 辽宁中医杂志, 1989, 6: 17~18.
- 2 张薛光. 谈谈对《金匱要略》泻心汤出处、方名的理解. 中医文献杂志, 2007, 3: 9~11.
- 3 刘渡舟. 漫谈三黄泻心汤及其临床应用. 中医杂志, 1987, (3): 19~20.

- 4 邹佳丽,谢智勇,姜晓飞,等.大黄黄连泻心汤不同配伍浸渍剂中蒽醌类成分变化研究.世界科学技术-中医药现代化,2008,10(4): 61~65.
- 5 何毓敏,张艺,孟宪丽,等.HPLC法研究泻心汤中大黄和黄芩配伍的活性成分变化.中草药,2007,38(5):699~702.
- 6 李奕,许旭.三黄泻心汤主要药效成分的含量表征.中国中药杂志,2006,31(5):383~385.
- 7 石荣,马越鸣,叶福媛,等.泻心汤不同配伍中蒽醌类成分的变化研究.中草药,2007,38(9):1327~1329.
- 8 石荣,马越鸣,张宁,等.生物碱和黄酮类成分在泻心汤复方配伍中的含量研究.中国药理学杂志,2007,42(23):1770~1773.
- 9 关怀,穆阳,高燕,等.不同配伍剂量对大黄-黄连药对的有效成分及药量作用的影响研究.北京中医,2000,(2):53~55.
- 10 冯有龙,胡浩彬,余伯阳.泻心汤不同配伍情况下黄酮类、蒽醌类和生物碱类成分的含量比较.中国天然药物,2007,5(4):281~284.

The effects of combining different herbal components on the concentrations of chemical markers: an example with the Dahuang Huanglian Decoction

Zou Jiali, Huang Ping, Yuan Yuemei, Yao Meicun

(The School of Pharmaceutical Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510006, China)

Francis C.P. Law

(Department of Biological Sciences, Simon Fraser University, Burnaby, B.C. Canada V5A 1S6)

A HPLC method was developed and validated to quantify 9 major marker chemicals of Dahuang Huanglian Xiexin Decoction (DHXD) after soaking different combinations of the constituent herbs in boiling water for various time periods. The HPLC was equipped with a phenyl column (250mm×4.6mm, 5μm) and a UV detector set at 254 nm and 270 nm. Separation of DHXD chemical markers was achieved using acetonitrile-0.5% triethylamine with pH adjusted to 3.5 by phosphoric acid and gradient elution. The HPLC method was accurate and reliable in quantifying the concentrations of the DHXD chemical markers. In the present study, the effects of *Scutellaria baicalensis* on the marker chemical concentrations were examined closely. When *S. baicalensis* was included in the DHXD formulation, anthraquinones concentrations were found to increase significantly, but berberine concentration was diminished. Result of the study shows that *S. baicalensis* is able to significantly change the concentrations of the DHXD markers.

Key Words: Dahuang Huanglian Xiexin Decoction; HPLC; boiling water soaking; combinations of herbs

(责任编辑:王 瑀,责任译审:邹春申)