

中药六味地黄汤与单味颗粒剂混合液成分比较研究

胡耶芳 林 玲 易春霞 颜 剑 黎 剑

(广西桂林市中医医院药剂科, 桂林, 541002)

摘要 目的:比较中药六味地黄汤与单味颗粒混合液有效成分的含量。方法:采用高效液相色谱法,以乙腈-磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱,流速为 1.0 mL/min,检测波长 238 nm。定量分析 2 种溶液中的已知有效活性成分马钱苷、丹皮酚、没食子酸、芍药苷的含量变化。结果:3 批六味地黄汤传统汤剂种马钱苷、丹皮酚、没食子酸、芍药苷的含量明显高于同批的单味颗粒剂混合液中成分的含量,分别为 3 批单味颗粒的 1.45、1.36、1.43 倍。结论:中药六味地黄汤单味颗粒剂混合液低于六味地黄汤有效成分含量,存在明显差异,本研究为临床中药汤剂、单味颗粒剂合理应用提供科学依据。

关键词 中药;六味地黄汤;单味颗粒剂;混合液;高效液相色谱法;马钱苷;丹皮酚;没食子酸;芍药苷

Comparison Study on the Components of Liuwei Dihuang Decoction and Single Ingredient Mixture

Hu Yefang, Lin Ling, Yi Chunxia, Yan Jian, Li Jian

(Pharmacy Department, Guilin Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guilin 541002, China)

Abstract Objective: To compare the content of the effective components in the mixture of Liuwei Dihuang Decoction and single ingredient mixture. **Methods:** The gradient elution was carried out by using high performance liquid chromatography with acetonitrile phosphoric acid aqueous solution as mobile phase. The flow rate was 1.0 mL/min and the detection wave length was 238 nm. Quantitative analysis of changes in the content of two kinds of solution of known active ingredients loganin, paeonol, gallic acid, and paeoniflorin. **Results:** The 3 batch of Liuwei Dihuang Decoction, loganin, paeonol, gallic acid, and paeoniflorin content was significantly higher than that of the single component content of the same batch of granules in a mixed solution, respectively, for the 3 batch of single granule 1.45, 1.36, 1.43 times. **Conclusion** The traditional Chinese medicine Liuwei Dihuang Decoction mixture of single ingredient is lower than the effective ingredient content of Liuwei Dihuang Decoction, with significant differences. This study provides a scientific basis for the clinical application of traditional Chinese medicine decoction and single granule.

Key Words Liuwei Dihuang Decoction; Single ingredient granules; Mixed liquor; HPLC; Loganin; Paeonol; Gallic acid; Paeoniflorin

中图分类号:R289.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.07.048

汤剂是中医治疗疾病的主要剂型之一,以其随证加减、组方灵活、吸收快的优点,从古到今深受广大患者的欢迎^[1-2]。但因调配、煎煮、携带的不方便使其发展受到一定的影响。单味中药颗粒剂的出现是对中药饮片改革的一种尝试,但中药颗粒剂是否符合中医辨治的需要,其与汤剂在化学组分及临床疗效方面是否一致,目前尚未得到肯定^[3]。中药六味地黄汤出自宋代名医钱乙《小儿药证直诀》是治疗肝肾阴虚的经典方,由熟地黄、山茱萸、山药、茯苓、泽泻、牡丹皮六味药组成,临床常用于滋阴补肾,用于治疗头晕耳鸣,腰膝酸软,遗精盗汗等症^[4-5]。中医认为肾精滋养髓海,肾精亏容易导致脑髓失养神智失常,肺肾金水相生,一为气之主,一为气之根,故六味地黄汤可以用于肝肾不足的神经精神疾病。本课题采用高效液相色谱法(HPLC)分析方法拟对传统方剂六味地黄汤、单味颗粒剂混合液的指标性

成分进行分析,探讨指标性成分的含量变化。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 高效液相色谱仪(1260 Agilent);十万分之一电子天平(AB265-S,梅特勒-托利多仪器有限公司);万分之一电子天平(ALB-224,梅特勒-托利多仪器有限公司)。

1.2 试剂 对照品马钱苷(111640-201502)、丹皮酚(110708-201506)、没食子酸(110831-201405)、芍药苷(110736-201509)均购买于中国食品药品检定研究院。

乙腈为色谱纯(美国 Fisher 公司);磷酸(北京化工厂);纯化水(杭州娃哈哈有限公司)。

1.3 分析样品 熟地黄、山茱萸、山药、茯苓、泽泻、牡丹皮六种药材均购买于广州致信药业有限公司,并经桂林市中医院药剂科老师鉴定为正品。

基金项目:广西壮族自治区卫生和计划生育项目(Z2016007)

作者简介:胡耶芳(1982.01—),男,硕士,副主任药师,硕士研究生导师,研究方向:药学方向的研究,E-mail:jmqf11@163.com

通信作者:易春霞(1978.02—),女,硕士研究生,副主任药师,研究方向:药学方向的研究,E-mail:yulu0027@126.com

2 方法与结果

2.1 色谱条件 流动相:乙腈(A)~0.1%磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~5 min,5% A;5~15 min,5% A→15% A;15~20 min,15% A;20~45 min,15% A→45% A;45~50 min,45% A;50~55 min,45% A→100% A;55~60 min,100% A)流速:1.0 mL/min;波长:238 nm;柱温 35 ℃;进样量:10 μL。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密吸取对照品马钱苷、丹皮酚、没食子酸、芍药苷适量至 10 mL 容量瓶中,加 50% 甲醇溶解并定容,制得马钱苷、丹皮酚、没食子酸、芍药苷浓度分别为 0.205 mg/mL、0.045 2 mg/mL、0.142 8 mg/mL、0.131 2 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 汤剂制备:取熟地黄、山茱萸、山药、茯苓、泽泻、牡丹皮六种药材按配方比例(24:12:12:9:9:9)煎煮 3 次,8 倍溶媒量,首次煎煮 60 min,第 2,3 次煎煮 30 min,合并水煎液,浓缩至 250 mL,精密量取 25 mL 溶液,至 50 mL 容量瓶中,加入甲醇超声溶解,微孔滤膜过滤,取续滤液,即得^[6]。

2.4 配方颗粒溶液制备 本研究所需配方颗粒严格按照生产工艺进行生产,经水煎、提取、浓缩、干燥、制粒,成品备用,准确称取相当量的配方颗粒加入一定量水溶解,制得单味颗粒剂混合液,量取 25 mL 按照上述方法处理,即得单味颗粒剂混合液供试液^[7]。

2.5 专属性试验 取六味地黄药材,按供试品溶液制备的方法制备不含熟地黄、山茱萸和牡丹皮的阴性对照品溶液,按以上色谱的条件得样品、对照品以及阴性对照品比较,结果显示,无其他成分干扰目标成分的测定。

2.6 线性关系考察 分别精密取混合对照品溶液 2、4、8、10、15、20 μL,按 2.1 项下色谱条件进行测定,以马钱苷、丹皮酚、没食子酸、芍药苷对照品峰面积为纵坐标,浓度为横坐标,绘制标准曲线分别为 $Y = 1\,723.5X - 12.5$ ($r = 0.999\,8$,线性范围为 0.41~4.10 μg)、 $Y = 1\,621.7X - 12.5$ ($r = 0.999\,7$,线性范围为 0.090 4~0.904 μg)、 $Y = 1\,543.7X - 12.5$ ($r = 0.999\,7$,线性范围为 0.285 6~2.856 0 μg)、 $Y = 1\,478.7X - 12.5$ ($r = 0.999\,7$,线性范围为 0.264~2.64 μg)。

2.7 中间精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 10 μL,连续进样 6 次,记录 4 种对照品的峰面积,并计算 RSD 值,结果显示马钱苷、丹皮酚、没食子酸、

芍药苷 4 种对照品 RSD 值分别为 0.5%、0.32%、0.48%、0.56%,均小于 1.0%,结果表明仪器精密度良好。

2.8 供试品溶液稳定性试验 取同一供试品溶液分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定,记录马钱苷、丹皮酚、没食子酸、芍药苷 4 种成分峰面积,并计算 RSD 值分别为 0.72%、0.67%、0.23%、0.65%,结果显示供试品溶液 24 h 内稳定。

2.9 重复性试验 精密吸取六味地黄汤样品溶液 6 份,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行测定,记录并计算马钱苷、丹皮酚、没食子酸、芍药苷 4 种成分含量及 RSD 值,结果显示 4 种成分含量分别为 0.328、0.056、0.132 3、0.248 mg/g,RSD 值分别为 0.58%、0.67%、0.28%、0.45% 均小于 1.0%,结果表明该方法重复性良好。

表 1 样品中指标性成分加样回收率测定结果(n=6)

名称	样品中含量	加标量(mg)	实际测得量	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
马钱苷	0.812	0.615	1.407	96.75	98.43	1.22
	0.812	0.615	1.417	98.37		
	0.812	0.615	1.412	97.56		
	0.812	0.615	1.422	99.19		
	0.812	0.615	1.428	100.16		
	0.812	0.615	1.418	98.54		
丹皮酚	0.142 3	0.135 6	0.276 9	99.26	98.59	1.44
	0.142 3	0.135 6	0.273 2	96.53		
	0.142 3	0.135 6	0.274 5	97.49		
	0.142 3	0.135 6	0.278 2	100.22		
	0.142 3	0.135 6	0.277 6	99.78		
	0.142 3	0.135 6	0.275 5	98.23		
没食子酸	0.354 2	0.428 4	0.780 6	99.53	99.78	0.21
	0.354 2	0.428 4	0.781 2	99.67		
	0.354 2	0.428 4	0.783 2	100.14		
	0.354 2	0.428 4	0.781 9	99.84		
	0.354 2	0.428 4	0.782 0	99.86		
	0.354 2	0.428 4	0.781 1	99.65		
芍药苷	0.564 2	0.393 6	0.953 4	98.88	99.28	0.53
	0.564 2	0.393 6	0.955 5	99.42		
	0.564 2	0.393 6	0.952 8	98.73		
	0.564 2	0.393 6	0.953 6	98.93		
	0.564 2	0.393 6	0.958 2	100.10		
	0.564 2	0.393 6	0.956 3	99.62		

2.10 回收率试验 精密吸取六味地黄汤样品溶液 6 份置 100 mL 容量瓶中,分别加入制备好的混合对照品溶液(马钱苷、丹皮酚、没食子酸、芍药苷浓度分别为 0.205 mg/mL、0.0452 mg/mL、0.142 8 mg/mL、0.131 2 mg/mL)3 mL,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,计算 4 种对照品回收率及 RSD 值。结果显示,4 种对照品加样回收率分别为:1.22%、1.44%、

0.21%、0.53%。结果表明,该方法可行。见表1。

2.11 样品测定结果 分别取3批传统六味地黄汤样品溶液及配方颗粒样品溶液,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进行测定,测定4种对照品马钱苷、丹皮酚、没食子酸、芍药苷峰面积,并计算含量,结果3批六味地黄传统汤剂种马钱苷、丹皮酚、没食子酸、芍药苷的含量明显高于同批的单味颗粒剂混合液中成分的含量,分别为3批单味颗粒的1.45、1.36、1.43倍。见表2。

表2 六味地黄汤溶液及单味颗粒剂混合液有效成分含量测定结果(mg/g)				
样品	马钱苷	丹皮酚	没食子酸	芍药苷
六味地黄汤				
批号1	0.823 0	0.156 2	0.357 6	0.572 1
批号2	0.800 8	0.152 3	0.357 8	0.564 3
批号3	0.870 9	0.154 2	0.352 1	0.510 9
单味颗粒剂				
批号1	0.567 1	0.112 9	0.193 2	0.398 1
批号2	0.532 7	0.109 8	0.189 0	0.380 9
批号3	0.537 8	0.119 3	0.175 6	0.392 3

3 讨论

六味地黄方剂味传统滋补肝肾药方,其方剂中主要由山茱萸、泽泻、熟地黄、山药、茯苓和牡丹皮等6味药材组成^[8-11]。现代药理学研究表明,该方具有增强免疫力、抗氧化、降血脂、抑制肿瘤扩散等功效^[12-16]。临床上多用于治疗慢性前列腺炎、肾病、高血压、女性更年期综合征等疾病^[17-22]。随着中药剂型的不断改变,新剂型、新技术的不断改进,六味地黄制剂已呈现多样化,但传统汤剂有很多不足,如携带不便、贮存不便、饮用不便,配方颗粒的出现,避免了上述的不足,但配方颗粒与传统汤剂的指标性成分的含量还存在差异性。

本研究制备六味地黄汤剂与单味颗粒剂混合液所需药材均为相同批次中药饮片制备而成,且单味颗粒需要量均由汤剂混合液药材折算而成,综合以上两点,该试验结果更具客观性、真实性、可比性。本研究建立了同时测定马钱苷、丹皮酚、没食子酸、芍药苷4种有效成分的含量测定方法,经方法学考察显示该方法稳定、可行。

本研究采用HPLC测定六味地黄汤剂与单味颗粒剂混合液中4种有效成分马钱苷、丹皮酚、没食子酸、芍药苷的含量,结果显示六味地黄传统汤剂中4种有效成分的含量明显高于同批的单味颗粒剂混合液中成分的含量,且分别为3批单味颗粒的1.45、1.36、1.43倍。分析其原因,2种样品中的物质基础

成分存在一定的差异性,2种样品在制备过程中,因其制备工艺不同,以及样品单煎、共煎的差异性;单味颗粒在制备过程中,增加了喷雾干燥这一过程,可能导致有效成分的含量存在较大的差异。本研究为临床配方颗粒的应用提供了依据。但该研究只是针对马钱苷、丹皮酚、没食子酸、芍药苷4种有效成分的含量的差异性进行了测定,六味地黄汤中成分复杂,其他成分是否存在差异性有待进一步研究,另外,该4种有效成分的差异性能否导致药效变化还有待进一步研究。为此六味地黄汤剂与单味颗粒剂混合液的等效性还需要进行更多、更深入的研究。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典2010版.一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2010:X98.

[2] 曾常青,曾宇,赵越,等. 六味地黄汤中4种有效成分的含量测定[J]. 中国医院药学杂志,2007,27(8):1034-1036.

[3] 谭家华,罗君,贺祝英,等. 不同煎煮方法对六味地黄汤浸出物及主成分含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(11):85-87.

[4] 王杰,刘冰,周军,等. 六味地黄配方颗粒与传统汤剂中6种有效成分的比较研究[J]. 中草药,2015,46(19):2887-2891.

[5] 罗云,郝伟伟,王洁,等. 高效液相色谱法测定六味地黄浓缩丸特征图谱及4种主要成分的含量[J]. 中国医院药学杂志,2012,32(10):748-751.

[6] 王灵霞,朱东亮,柴逸峰. 高效液相色谱法同时测定3种不同剂型六味地黄丸中4种成分的含量[J]. 药学实践杂志,2013,31(4):296-299.

[7] 郭小红,樊敏,魏春婉,等. 紫外分光光度法测定六味地黄丸中丹皮酚的含量[J]. 甘肃医药,2012,31(4):304-306.

[8] 崔景朝,赵自明. 中药配方颗粒研究进展(Ⅱ)——中药单煎与合煎对比研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,19(4):240-245.

[9] 邓振雪,赵金鹿,胡容峰,等. RP-HPLC法同时测定六味地黄渗透泵片中没食子酸等7种活性成分的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2013,30(9):686-690,700.

[10] 贾瑞艳,刘影. HPLC法测定六味地黄丸(浓缩丸)中丹皮酚的含量[J]. 黑龙江医药,2009,22(2):120-122.

[11] 宋晓,孙晓慧,李珂. HPLC测定不同厂家六味地黄丸中丹皮酚的含量[J]. 泰山医学院学报,2014,35(3):200-202.

[12] 汪安,程桂林,单永洋,等. 用原子吸收分光光度法测定六味地黄丸中铜、铅含量的效果观察[J]. 当代医药论丛,2014,12(18):61-62.

[13] 邱伊星. 六味地黄丸及其相关制剂的指纹图谱质量控制方法研究[D]. 长沙:湖南中医药大学,2016.

[14] 丘婷. 六味地黄生物制剂片剂成型工艺与质量标准研究[D]. 广州:广东药学院,2013:1-74.

[15] 罗云,郝伟伟,张婧,等. 基于多指标成分同时检测的六味地黄浓缩丸溶出度测定[J]. 中国中药杂志,2014,39(2):240-246.

[16] 张竞,王艳伟. 六味地黄胶囊质量标准提升研究[J]. 中国药业,2016,25(2):61-63.

系有很好的抑制作用,纤溶酶得到提高,有效发挥红花醪液的溶栓、抗栓作用^[13]。

通过分析红花中的有效成分可得,发酵炮制后溶栓作用和 C2-13 产生的糖普水解酶有关系。红花中很多糖普类化合物都是由酚羟基和葡萄糖缩合而成。例如 6-羟基山萘酚-3-O-葡萄糖苷,6-羟基山萘酚-7-O-葡萄糖苷,新红花苷,槲皮苷等^[14]。糖苷键上的葡萄糖被糖苷水解酶水解之后生成的苷元相比未水解的苷元吸收效果更好,同时提高了生物利用率,红花中的有效成分可更好地发挥药理作用。

前期准备工作将 C2-13 和红花共发酵物质的成分采用 HPLC 做了测定,结果发现红花中消失了一个保留时间为 7.624 分的吸收峰,新出现了 2 个保留时间 12.45 分的吸收峰。发酵后血栓能力的提高可能对其造成了影响,最根本的是与 C2-13 的发酵炮制有关系^[15]。深入研究需采用磁共振成像等先进设备。

微生物的分解转化能力极强,能够产生次生代谢产物,利用微生物发酵技术来炮制中药,微生物技术改变药物物理性比物理化学炮制手段提高药性更强,而且还可以降低药物的不良反应,扩大了适应证^[16]。但微生物技术在药物炮制中的潜能并没有彻底发挥出来,所以说深入研究微生物在中药炮制中的物质基础对中药现代化和新的活性产物有着非常重要的意义。

微生物发酵就是利用微生物代谢过程来产生酶,产生的酶能够催化底物,目前的微生物整体细胞能够为反应催化剂的生物催化技术和生物转化提供较好的基础,其专一性强,条件简单,是生物转化技术中发展最为迅猛的分支之一,尤其是提取分离技术的改进,分离技术的改进使微生物发酵技术的应用不在局限于小分子的转化和药物酿造,而是广泛用于天然化合物的生物合成、生物催化物的合成、光学活性化合物的拆分、新药物的开发、药物前体化合物的转化等各种领域^[17]。到目前为止,微生物技术已经应用于 50 多种反应,其中有水解、酯化、水合、酰化、脱水、氨化、芳构化、异构化等有机化学反应,

还有羟基化、脱氢、氢化、环氧化等各类氧化还原反应以及各类重要药物的合成转化领域^[18]。

参考文献

- [1] 陶建武,姚彩萍,王冀春,等. 绞股蓝在大鼠肝的抗脂质过氧化作用[J]. 中国临床药理学杂志,2001,10(3):160-162.
- [2] 黄夏琴,蒋惠娣,徐庆,等. 紫珠草抗脂质过氧化作用的实验研究[J]. 中草药,1998,29(4):246-249.
- [3] 金鸣,蔡亚欣,李金荣,等. 邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法检测 H_2O_2 - Fe^{2+} 产生的羟自由基[J]. 生物化学与生物物理学进展,1996,23(5):553-555.
- [4] 张均田. 现代药理实验方法[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1998:21.
- [5] 何晨,金钊,冯志华,等. 芽孢杆菌发酵炮制中药红花增强溶血栓药效研究[J]. 中国中药杂志,2005,30(5):340-343.
- [6] 刘国勋,吴铁,陈志东,等. 小鼠体内血栓形成动物模型的建立及在抗血栓药物筛选中的应用[J]. 中国应用生理学杂志,1999,15(3):281-282.
- [7] Liu GX, Wu T, Chen ZD, et al. Establishment of animal model of thrombus formation in mice and its application in screening antithrombotic drugs[J]. Chinese Journal of Applied Physiology, 1999, 15(3): 281-282.
- [8] 邱凯,万昌秀,李天全,等. 应用系统全面反馈试验优化技术提高 RGD 短肽液相合成产率的初步研究[J]. 科技通报,2003,19(1):25-28.
- [9] 段智变,江汉湖,张书霞,等. 纳豆激酶粗制液对家兔溶血栓作用及其机制研究[J]. 营养学报,2003,25(1):46-51.
- [10] 徐叔云,陈修. 药理试验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1982:838.
- [11] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:518.
- [12] ASTRUP T, MULLERTZ S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity[J]. Arch Biochem Biophys, 1952, 40(2):346-351.
- [13] 段智变,江汉湖,张书霞,等. 纳豆激酶粗制液对家兔溶血栓作用及其机制研究[J]. 营养学报,2003,25(1):46-51.
- [14] 邱凯,万昌秀,李天全,等. 应用系统全面反馈试验优化技术提高 RGD 短肽液相合成产率的初步研究[J]. 科技通报,2003,19(1):25-28.
- [15] 张冬青,揭广川. 现代发酵技术在提高中药药用效能方面的作用[J]. 广东轻工职业技术学院学报,2005,4(1):34-37.
- [16] 李羿,刘忠荣,吴洽庆,等. 发酵中药——拓展中药新药研究开发的新空间[J]. 天然产物研究与开发,2004,16(2):179-181,184.
- [17] (2017-08-09 收稿 责任编辑:王明)
- [18] 定量标准商榷[J]. 中国药房,2005,16(22):1756-1757.
- [19] 吴冰. 数字化色谱指纹谱技术在六味地黄滴丸药材鉴定中的应用效果评价[J]. 医药前沿,2015,5(34):362-362.
- [20] 郭泉,胡容峰,高松,等. 六味地黄制剂的研究现状与中药制剂质量标准的构建[J]. 现代中药研究与实践,2014,28(4):78-81.
- [21] (2017-07-26 收稿 责任编辑:杨觉雄)
- [22] (上接第 1758 页)
- [23] [17] 林静,乐卿清,谢荣伟. 高效液相色谱法测定六味地黄丸(浓缩丸)中马钱苷的含量[J]. 海峡药学,2010,22(6):91-92.
- [24] [18] 姜建萍,曹音,李建芳. 六味地黄丸含量测定方法研究进展[J]. 中医药导报,2010,16(6):136-138.
- [25] [20] 刘志辉. 2005 年版《中国药典》中六味地黄丸与六味地黄颗粒