

苍术黄柏药配伍规律对药效物质的影响

朱培霞¹ 易成文² 周 翠¹

(1 信阳市中医院药剂科, 信阳, 464000; 2 信阳市中心医院药学科, 信阳, 464000)

摘要 目的:探讨苍术黄柏药的配伍规律对药效物质的影响,阐释中药合理配伍的科学内涵。方法:采用高效液相色谱法(HPLC)指纹图谱分析进行线性关系分析以及加样回收率试验考察 HPLC 的严谨性。HPLC 指纹图谱:取小檗碱和黄柏碱对照品溶液和苍术黄柏 1:1、1:2、1:3、0:1、2:1、3:1、1:0 等不同配伍供试品溶液进行 HPLC 指纹图谱分析。结果:以苍术黄柏供试品溶液获取的 HPLC 色谱图中小檗碱和黄柏碱的保留时间与对照品外标法一致。1.024 ~ 10.24 μg 范围内线性关系良好。加样回收率试验结果中平均回收率为 99.80%, RSD 为 2.0%, 显示加样回收率试验良好, HPLC 严谨性高。苍术黄柏不同配伍规律中非共有峰面积以 3:1 配伍比例为最高为 10.62%, 其次是 1:1 配伍比例为 8.06%。结论:苍术黄柏配伍不同配伍规律中 3:1 配伍比例对小檗碱的影响最小, 临床组方中发挥的黄柏作用药效就较好; 从而说明中药配伍和药物剂量对于充分发挥药物疗效至关重要。

关键词 高效液相色谱法, 苍术, 黄柏, 配伍规律, 药效物质

Study on Effects of Compatibility Regularity of Rhizoma Atractylodis and Cortex Phellodendri on Pharmacodynamic Substance

Zhu Peixia¹, Yi Chengwen², Zhou Cui¹

(1 Department of Pharmacy, Xinyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Henan 464000, China;

2 Department of Pharmacy, Xinyang Central Hospital, Henan 464000, China)

Abstract Objective: To explain the scientific connotation of the rational compatibility of Chinese herbal medicine based on the HPLC analysis, and discuss the effects of compatibility regularity of Rhizoma Atractylodis and Cortex Phellodendri herbs on pharmacodynamic substance. **Methods:** The linear relationship was analyzed by HPLC and the sample recovery test was used to investigate the preciseness of HPLC. HPLC finger-print: berberine and phellodendrine comparison liquor, and Atractylodes rhizome and Cortex Phellodendri were used to make the test solution by the proportion of 1:1, 1:2, 1:3, 0:1, 2:1, 3:1, 1:0, which were analyzed by HPLC finger-print. **Results:** 1) The retention time of berberine and phellodendrine in Atractylodes rhizome and Cortex Phellodendri test solution was consistent with external standard method of control products by HPLC chromatogram. 2) The linear relationship was good in the range of 1.024 to 10.24 μg. 3) The average recovery rate of sample recovery teste was 99.80%, and RSD was 2%, which showed that the sample recovery rate was good, and HPLC had a high conscientiousness. 4) In the different compatibility rules of Rhizoma Atractylodis and Cortex Phellodendri, the non common peak area was the highest with the ratio of 3:1 compatibility to 10.62%, followed by 1:1, the proportion of compatibility was 8.06%. **Conclusion:** The effect of 3:1 compatibility proportion of Atractylodes rhizome and Cortex Phellodendri has the minimum effect on berberine, and Cortex Phellodendri has a good pharmaceutical effect, indicating the compatibility and drug dose play an important role in giving full play to the effects of the drugs.

Key Words HPLC; Rhizoma Atractylodis; Cortex Phellodendri; Compatible regularity; Pharmacodynamic substance

中图分类号: R282 文献标识码: A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.07.051

复方配伍是根据中医辨证论治理论的一种中医药用药特色,而药对配伍是临床上常用的相对固定的 2 味药或 3 味药的配伍形式。药对配伍组成多具有一定规律,研究药对配伍有助于揭示中医学流传下来的方剂配伍的科学内涵,帮助临床医师和药师从具有引导价值和点面结合的科学意义^[1-3]。苍术为菊科苍术属多年生草本植物苍术的干燥根茎,具

有燥湿、化浊、止痛等功效,其主要有效成分为挥发油、苍术醇化合物。黄柏为菊科植物黄柏的干燥树皮,具有清热、解毒、燥湿功效,黄柏又名黄檗,其药用部分为芸香科黄檗属落叶乔木的树皮内层入药,其中主要含小檗碱和黄柏碱化合物等。临床常用苍术黄柏配伍,经典的方剂有二妙散,为治疗湿热下注之基础方,方中以苍术黄柏配伍共奏清热燥湿,

标本兼顾之效^[4]。本实验以苍术黄柏配伍不同比例配伍,采用高效液相色谱法(HPLC)以黄柏碱和小檗碱作为对照品,探讨苍术黄柏配伍变化规律对药效物质的影响,为该方在临床上的合理应用及进一步开发奠定基础。

1 材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪;250 mm × 4.6 mm, 5 μm 的色谱柱(Waters C₁₈柱);购于中国药品生物制品鉴定所盐酸小檗碱对照品(批号:110713-200911);购于北京世纪奥科生物技术有限公司黄柏碱对照品(批号:must-11062401)。

2 方法

2.1 色谱条件 精密量取 10 μL 的样品进样量或对照品溶液,采用 250 mm × 4.6 mm, 5 μm 的色谱柱(Waters C₁₈柱),在乙腈和 0.1% 磷酸的流动相中,流速为 1 mL/min,柱温为 30 °C,根据高效液相色谱法(HPLC)(Agilent 1100 型高效液相色谱仪)指纹图谱的梯度洗脱程序进行试验。见表 1。

表 1 高效液相色谱指纹图谱梯度洗脱程序
(检测波长 285 nm)

时间 (min)	流量 (mL/min)	流动相乙腈 (%)	流动相 0.1% 磷酸水 (%)	曲线
0	1	9	11	
25	1	22	78	6
45	1	55	45	6
55	1	100	0	6

2.2 供试品溶液制备 苍术为菊科苍术属多年生草本植物的干燥根茎,黄柏为菊科植物黄柏的干燥树皮,苍术黄柏采用 1:1、1:2、1:3、0:1、2:1、3:1、1:0 等不同配伍规律,采用回流法煎煮,于敞口药盆中称取黄柏始终未 3 g,根据不同配伍规律,配伍苍术黄柏加 200 mL 水,浸泡 30 min,煮沸后文火 45 min,取 100 mL 药液,在 60 °C 下减压浓缩,定容至 50 mL,折合柴胡黄芩药物水煎液浓度未 0.2 g/mL。取 5 mL 柴胡黄芩浓缩液用 100% 甲醇定容 10 mL,混合均匀,取 2 mL 离心取上清液在 0.45 μm 超微膜滤过即可制备苍术黄柏配伍供试品溶液。

2.3 对照品溶液制备 精密称取购于中国药品生物制品鉴定所盐酸小檗碱对照品(批号:110713-200911)、购于北京世纪奥科生物技术有限公司黄柏碱对照品(批号:must-11062401)置于容量瓶中,甲醇溶解,制成 0.422 mg/mL 小檗碱对照品溶液和 0.411 mg/mL 黄柏碱对照品溶液。

2.4 高效液相色谱法(HPLC)指纹图谱分析

2.4.1 HPLC 方法学严谨性考察 1) 线性范围试

验^[5]:根据 1.1 制备的小檗碱对照品溶液,精密取 0 μL、2 μL、6 μL、8 μL、16 μL、20 μL,分别编号 1~6 并连续进样,以峰面积为 Y 轴,5 μL 进样浓度为 X 轴,绘制标准曲线,并根据对照品的回归方程计算各有效成分在各自浓度范围内的线性关系。2) 加样回收率试验:取 6 份同一配伍比例 1:1 苍术黄柏供试品溶液,根据 1.1 制备的供试品溶液,编号 A-F 并分别加入 2 mL 对照品溶液,计算供试品在 HPLC 中的加样回收率。

2.4.4 指纹图谱 取苍术黄柏配伍供试品溶液、对照品溶液和缺苍术的阴性对照溶液,分别精密吸取 5 μL 根据色谱条件依次测定并记录色谱图。

2.5 数据处理 根据国家药典委员会提出的中药指纹图谱相似度评价系统 2004A 进行相似度分析,采用 MATLAB 软件进行数据处理和统计。

3 结果

3.1 对照品溶液 HPLC 色谱图 采用对照品溶液获得 HPLC 色谱图得小檗碱和黄柏碱的保留时间分别为 39.6 min 和 19.1 min,并且与其他组分分离良好。见图 1。以苍术黄柏供试品溶液获取的 HPLC 色谱图中小檗碱和黄柏碱的保留时间与对照品外标法一致。见图 2。

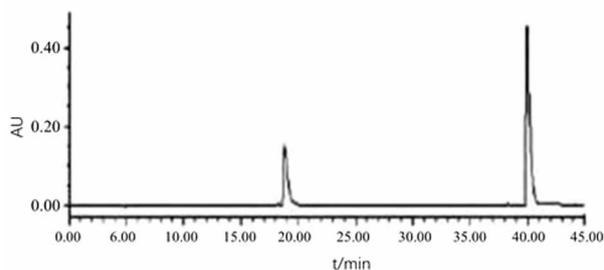


图 1 小檗碱和黄柏碱高效液相色谱图

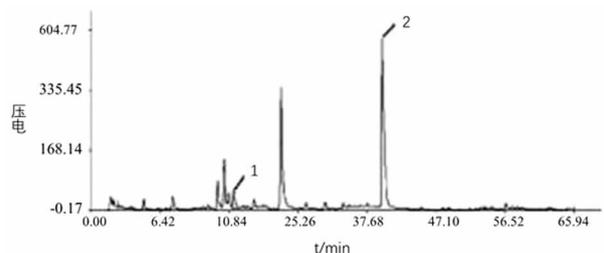


图 2 苍术黄柏 1:1 配伍高效液相色谱图

3.2 线性关系考察结果 在线性关系考察中以苍术甲苷进样量的自然对数为横坐标($\lg X$),峰面积的自然对数为纵坐标($\ln Y$)进行回归,得回归方程 $\ln Y = 1.508 2 \lg X + 13.918$ ($r = 0.999 7$),因此在 1.024 ~ 10.24 μg 范围内线性关系良好。

3.3 加样回收率试验结果 加样回收率试验结果中平均回收率为 99.80%,RSD 为 2.0%,显示加样

回收率试验良好, HPLC 严谨性高。见表 2。

表 2 加样回收率试验结果

编号	取样量 (g)	原有量 (g)	加入量 (g)	测得量 (g)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
A	3.014	1.037	1.42	2.359	101.33	99.80	2.0
B	3.022	1.041	1.42	2.376	99.10		
C	3.015	1.038	1.42	2.408	99.57		
D	3.008	1.035	1.42	2.400	99.42		
E	3.017	1.038	1.42	2.431	100.09		
F	3.025	1.042	1.42	2.430	101.81		

3.4 苍术黄柏不同规律配伍前后指纹图谱 苍术黄柏采用 1:1、1:2、1:3、0:1、2:1、3:1、1:0 等不同配伍规律,以 1:1 苍术黄柏配伍样品供试品溶液为参照图谱,生成图 3 共有峰模式。

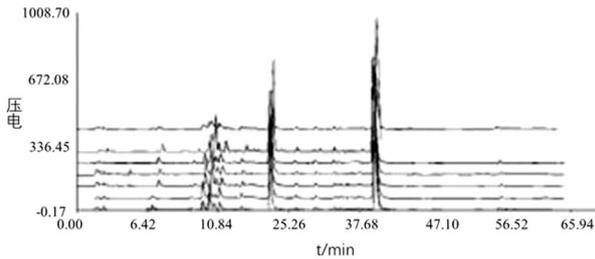


图 3 苍术黄柏不同配伍规律的 HPLC 指纹图谱图

3.5 苍术黄柏不同规律配伍非共有峰面积 苍术黄柏不同配伍规律中非共有峰面积以 3:1 配伍比例为最高为 10.62%,其次是 1:1 配伍比例为 8.06%。

表 2 苍术黄柏不同规律配伍非共有峰面积百分比

配伍比例	总峰面积	非共有峰面积	非共有峰面积百分比 (%)
1:1	30 666.98	2 471.49	8.06
1:2	36 510.68	2 050.52	5.62
1:3	41 528.79	3 201.37	7.71
0:1	41 902.87	1 260.48	3.01
2:1	27 652.63	1 259.66	4.56
3:1	32 016.49	3 401.46	10.62
1:0	34 987.94	2 368.03	6.77

4 讨论

4.1 流动相的选择 本研究前期工作中通过对乙腈-甲醇、四氢呋喃-水、乙腈-磷酸的 HPLC 严谨性进行考察,筛选出了乙腈-磷酸系统流动相的分离效果较好,但在以乙腈-磷酸不同的比例条件下等度洗脱的摸索中,发现乙腈-磷酸水的条件下小檗碱和黄柏碱的分离度相对较好,根据查阅大量文献^[6-8]发现采用梯度洗脱后,发现以乙腈-水梯度洗脱,在 55 min 内将小檗碱和黄柏碱完全分离,基线噪声较低;为了进一步降低基线噪声,获得最好的共有峰形,本团队进一步对磷酸水的浓度进行了考察,分别用 0.1%、0.2%、0.3% 的磷酸水溶液进行比较,发现乙腈-

0.1% 磷酸水溶液为流动相的分离效果最好,能够分离出最低基线噪声且峰形最好^[9-12]。

4.2 HPLC 严谨性考察意义 线性考查在某一个浓度或峰高(面积)情况下进行样品分析是否是准确的,而准确的概念就是要成线性,换句话说,在这个范围内,待测样品面积要与浓度成正比,即符合紫外检测器的朗伯比尔定律因为只有这样,在这个范围内浓度与面积成正比,分析结果才是准确的^[13-15]。而加样回收率包括绝对回收率和相对回收率,本研究涉及的是相对回收率。相对回收率严格来说有 2 种,一种是回收试验法,一种是加样回收试验法^[16]。而本研究的目的主要是为了考察 HPLC 的严谨性,因此选用加样回收试验法,也就是是在已知浓度样品中加入药物,来和标准曲线比,标准曲线也是在基质中加药物。

4.3 苍术黄柏配伍规律对药效物质的影响 本实验结果发现,配伍前后指纹图谱在保留时间方面变化不大,RSD 均小于 3%;在此测定条件下,峰的个数无明显差异,说明黄柏配伍苍术之后可能没有新成分产生;相似性评价在黄柏、苍术不同配伍比例水煎液 HPLC 指纹图谱的重叠图中,以小檗碱为参照峰,可以确定 10 个共有峰。由苍术和黄柏二药配伍后品共有峰面积的变化可以看出,配伍之后化学成分的含量存在变化,其平均 RSD 值为 17.87%。并且可以看出其生物碱的含量随苍术质量的增加而减少,黄柏、苍术 3:1 的配伍比例中,小檗碱的含量最大。其他峰形也随配伍剂量的改变也有所变化,提示该配伍比例对小檗碱的影响最小,临床组方中发挥的黄柏作用药效就较好;从而说明中药配伍和药物剂量对于充分发挥药物疗效至关重要。

参考文献

[1] 中药复方配伍研究现状与思考[J]. 中草药,2009,40(12):1998-2000.

[2] 张宇燕,盖玉权,何昱,等. 基于结构方程模型的中药复方配伍机制研究[J]. 中华中医药杂志,2012,27(6):1702-1705.

[3] 麦蓝尹,李怡萱,陈勇,等. 基于数理统计方法学的中药复方配伍研究进展[J]. 中国中药杂志,2014,39(10):1749-1756.

[4] 熊延熙,丁舸. 试论二妙散组方配伍意义[J]. 江西中医药,2016,47(2):15-16.

[5] 郭建平,李国栋,赵彤英,等. HPLC 对人血浆中葛根素及葛根黄酮的线性考察[J]. 药学实践杂志,2003,21(4):219-221.

[6] 何佳佳,廉莲. HPLC 同时测定关黄柏中多组分化学成分含量的方法研究[J]. 辽宁科技学院学报,2015,17(4):33-35.

[7] 李红玲,莫炫永. HPLC 法同时测定川黄柏中盐酸黄柏碱和盐酸小檗碱的含量[J]. 中国药房,2014,25(27):2562-2564.

[8] 朱志明,赖潇潇,苏慕霞. 不同产地黄柏及关黄柏有效成分的含量

- 测定[J]. 临床医学工程, 2011, 18(1): 106-108.
- [9] 傅春升, 王琰, 李玥, 等. 黄柏-苍术药对不同比例配伍中生物碱含量的变化[J]. 中国药房, 2013, 24(27): 2549-2551.
- [10] 李红英, 向极轩, 龙澜, 等. HPLC法测定恩施黄柏药材中黄柏碱与小檗碱的含量[J]. 湖北民族学院学报: 自然科学版, 2013, 31(1): 101-103.
- [11] 李巧如, 张鹏, 陈世虎, 等. 黄柏与甘草及桑寄生共煎对小檗碱提取率影响的研究[J]. 中国药房, 2005, 16(3): 235-236.
- [12] 周敬, 于天浩, 陈平, 等. HPLC法测定黄柏提取液中盐酸小檗碱含量[J]. 江西中医药, 2013, 18(4): 63-64.
- [13] 叶雪兰, 高英, 李卫民, 等. HPLC-UV-ELSD同时测定知母黄柏药对提取物中盐酸小檗碱、黄柏碱、知母皂苷BⅡ[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 122-124.
- [14] 张莉, 潘超. 高效液相色谱法同时测定二妙丸中盐酸小檗碱和黄柏碱的含量[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(22): 2262-2264.
- [15] 赵伟杰, 李伟, 张晶. 超声辅助川黄柏中黄柏碱的提取与含量测定的研究[J]. 化学工程师, 2016, 42(4): 24-26.
- [16] 欧咏, 吴娟, 谢荷, 等. 黄柏生物碱膝关节微透析探针回收率的测定[J]. 沈阳药科大学学报, 2014, 31(9): 697-705.

(2017-06-07 收稿 责任编辑: 杨觉雄)

中西医结合促进肿瘤精准医学研究与创新

2018年6月29日、30日,世界中医药学会联合会肿瘤精准医学专委会第二届学术交流大会在武汉召开。本次大会由武汉大学中南医院承办。世界中医药学会联合会学术部主任潘平、湖北省卫计委、中南医院等领导、世界中联肿瘤精准医学专业委员会会长、上海中医药大学附属曙光医院肿瘤科主任李琦、美国康奈尔大学刘瑞海教授,美国南佛罗里达蔡健峰教授,澳大利亚悉尼大学董其瀚教授等海内外著名肿瘤专家出席大会,聚焦肿瘤精准医学研究与创新,探讨肿瘤精准医学与中医药结合。武汉大学中南医院张莹雯教授主持大会开幕式。

世界中医药学会联合会肿瘤精准医学专业委员会会长李琦会上致辞中表示,要整合国内外优势资源,发挥专委会优势,大力发展青年学者的力量,加强产学研合作,加快肿瘤精准医学成果向临床推广,尤其是发挥青年力量在发扬传统中医药文化中的优势,建立和推广符合中国医疗特色的肿瘤精准医学诊断和治疗的行业标准。

肿瘤精准医学专业委员会秘书长刘焯副教授对肿瘤精准医学专委会一年来的工作做以总结,并提出了建设性的意见。大会现场对于专委会的工作设想展开热烈讨论,理事会成员愿为肿瘤精准专委会的进一步发展做出积极贡献。

“精准医学”一经提出迅速成为覆盖全球的热门话题,随即引发全球医学学术界及产业界的热切关注。随后我国将精准医疗计划纳入“十三五”规划,政策助力资本涌入,精准医疗在我国步入发展快轨。本次大会以“开展肿瘤精准医学研究与创新,促进肿瘤精准医学交流与中医药结合”为宗旨,邀请国内外同行专家进行31场主题演讲,涵盖肿瘤的中西医治疗的基础研究、临床研究,中西医防治肿瘤的技术与创新方法研究等,分享本领域研究成果、实践经验,就国内外精准医疗与中医药结合的发展机遇和战略、临床应用、精准医疗研发等重大议题,研讨精准医学研究与中医药结合创新从科研到产业化开发过程中的关键环节,展示国际、国内精准医疗的最新研究成果及转化的实践,通过跨界交流,展示前沿技术,为中国的各界医疗从业人员搭建一个世界级的资源对接平台。

本次大会特设有经方讨论专场、青年学者讨论专场,进行分会场讨论。同时,确定建立肿瘤精准专委会的多中心临床协作组、专委会建设达成共识,为广泛开展肿瘤精准医学研究与中医药结合的创新,进一步发挥中医药抗肿瘤优势,提高肿瘤精准诊疗、科研、产品的开发,促进本领域的交流与合作做出贡献。