

中药研究

麻黄汤不同配伍对苦杏仁和甘草有效成分的影响

麦荣国 郭晓奎 招丽娟 林家寿 刘少文 张建伟

(广东省佛山市中医院制剂中心,佛山,528216)

摘要 目的:评价麻黄汤不同配伍对苦杏仁和甘草有效成分的影响。方法:制备苦杏仁苷对照品溶液和甘草酸单铵盐对照品溶液和不同配伍方式的麻黄汤水煎液供试品溶液,以正交设计8中不同配伍的麻黄汤组方,苦杏仁有效成分研究中以A-H进行标识;甘草有效成分研究中以A1-H1对8中不同配伍方式进行标示。最终结果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。结果:苦杏仁和甘草色谱条件能够分别将苦杏仁苷和甘草酸清晰的分离出来,无其他杂质峰,基线稳定,具有可比性。麻黄汤不同配伍方式中对苦杏仁有效成分苦杏仁苷每剂含量未见明显差异,进行方差分析后结果显示,麻黄汤不同配伍中麻黄、桂枝、甘草对苦杏仁苷的影响差异无统计学意义($P>0.05$)。麻黄汤不同配伍方式中以H1单纯甘草中甘草酸含量为最高,而麻黄汤全方A1中的甘草酸含量为最低;不同配伍中麻黄、桂枝和苦杏仁均降低麻黄汤中甘草酸的含量($P<0.05$)。结论:麻黄汤不同配伍中麻黄、桂枝、甘草对苦杏仁中有效成分苦杏仁苷未见明显影响;而不同配伍中麻黄、桂枝和苦杏仁均降低麻黄汤中甘草有效成分甘草酸的含量。

关键词 指纹图谱;麻黄汤;不同配伍;苦杏仁;甘草;苦杏仁苷;甘草酸单铵盐;高效液相色谱法

Study on the Effects of Different Compatibility of Mahuang Decoction on the Active Ingredients of Semen Armeniacae Amarum and Radix Glycyrrhizae Based on Fingerprint

Mai Guorong, Guo Xiaoluan, Zhao Lijuan, Lin Jiashou, Liu Shaowen, Zhang Jianwei

(Preparation Center of Foshan Chinese Medicine Hospital, Foshan 528216, China)

Abstract Objective: To evaluate the effects of different compatibility of Mahuang decoction on the effective components of Semen Armeniacae Amarum and Radix Glycyrrhizae based on the fingerprint of Chinese herbal medicine. **Methods:** Amygdalin reference solution and glycyrrhizic acid standard solution and the different combination of Mahuang decoction test solution were prepared. 8 types of different combinations of Mahuang decoction were orthogonally designed, and A-H mark was used to effective ingredients of Semen Armeniacae Amarum; A1-H1 was marked to active ingredients of Radix Glycyrrhizae in different combinations Mahuang Decoction. Finally, the similarity analysis was carried out, according to the similarity evaluation system 2004A of traditional Chinese medicine fingerprints proposed by the national pharmacopoeia committee, and the MATLAB software was used for data processing and statistics. **Results:** 1) The chromatographic conditions of Semen Armeniacae Amarum and Radix Glycyrrhizae could separate the amygdalin and glycyrrhizic acid respectively. There was no other impurity peak, and the baseline was stable and comparable. 2) There was no significant difference in amygdalin of Semen Armeniacae Amarum in each different Mahuang decoction. The variance analysis showed that there was no significant difference ($P>0.05$) in Herba Ephedrae, Ramulus Cinnamomi, Radix Glycyrrhizae in Mahuang decoction with different compatibilities. 3) H1 with pure glycyrrhizin content was the highest in different combination of Mahuang Decoction, while the contents of A1 with glycyrrhizic acid in Mahuang decoction were the lowest. Herba Ephedrae, Ramulus Cinnamomi, Radix Glycyrrhizae in different combination of Mahuang Decoction decreased the content of glycyrrhizic acid in Mahuang decoction ($P<0.05$). **Conclusion:** Herba Ephedrae, Ramulus Cinnamomi and Radix Glycyrrhizae in different compatibility of Mahuang decoction had little significant effects on almond amygdalin; and they all decreased the contents of effective components of licorice of glycyrrhizic acid.

Key Words Fingerprint; Mahuang decoction; Different compatibility; Semen Armeniacae Amarum; Radix Glycyrrhizae; Amygdalin; Mono ammonium salt of glycyrrhizic acid; HPLC

中图分类号:R284 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.03.048

基金项目:佛山市卫生局(2012155)

作者简介:麦荣国(1974.09—),男,大专,副主任药师,研究方向:中药成份含量测定,E-mail:MRG740928@126.com

通信作者:覃彪民(1971.06—),男,本科,副主任中医师,研究方向:中药含量测定,E-mail:13702564857@qq.com

麻黄汤这一出自医圣张仲景的著名经典方剂,仅由四味药组成,分别为麻黄、桂枝、苦杏仁、甘草;原文《伤寒论》中显示麻黄汤用于太阳伤寒表实证,从现代医学的角度来说麻黄汤可用于治疗上呼吸道感染、流感、急性支气管炎、支气管哮喘等疾病^[1-4]。麻黄汤四味药物共奏发汗解表的功效,其中麻黄的药性属辛温,通过发汗将外邪驱逐出肌表卫分;桂枝药性辛温,其色赤善发散可入营分散寒入卫分,而入卫分的外邪再随麻黄而出卫分,邪祛疾病自愈;苦杏仁药性属苦温,通过肃降肺气,宣肺止咳;同时佐麻黄辛散;甘草调和诸药,使诸药合用邪气祛解而正气不伤^[5-7]。而对于经方的研究,研究学者多通过拆方研究配伍关系对中药配伍的药理研究探索其配伍的后药物有效成分的变化,探讨配伍意义^[8]。目前麻黄汤中药指纹图谱的研究较少,我们基于指纹图谱研究麻黄汤不同配伍对苦杏仁、甘草有效成分的影响。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 高效液相色谱仪(型号:HP1100,美国惠普公司);甲醇(分析纯)、乙醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯)等均购自天津市康科德科技有限公司。

1.2 试剂 购自中国药品生物制品检定所的苦杏仁苷对照品(820-200002)和甘草酸单铵盐(0731-9704)。

1.3 分析样品 我院中药房提供的麻黄科植物草麻黄的麻黄干燥草质茎,樟科植物肉桂的桂枝干燥嫩枝,蔷薇科植物山杏的苦杏仁干燥成熟种子,豆科植物甘草的甘草干燥根及根茎。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

2.1.1 苦杏仁有效成分指纹图谱色谱条件 本研究选择 Hypersil ODS-C₁₈ 柱(4.0 mm × 250 mm, 5 μm)为色谱柱;流动相:甲醇-水(15:85)作为流动相溶剂条件进行梯度洗脱,进样体积为 10 μL 控制 35 ℃ 柱温,并以 0.5 mL/min 为流速;以 210 nm 为目标检测波长。

2.1.2 甘草有效成分指纹图谱色谱条件 本研究选择 Zorbax S_B-C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)为色谱柱;流动相:乙腈-1.5% 醋酸水溶液梯度洗脱,进样体积 2 μL 维持和室温相同的柱温,并以 0.8 mL/min 为流速;以 254 nm 为目标检测波长。

2.2 对照品溶液的制备

2.2.1 苦杏仁苷对照品溶液制备 精密称取 12.5 mg 苦杏仁苷对照品并加入 50% 甲醇将其定容与 25

mL 的容量瓶中,获得 0.503 mg/mL 的苦杏仁苷对照品溶液。

2.2.2 甘草酸单铵盐对照品溶液制备 精密称取 20 mg 甘草酸单铵盐对照品并加入 40% 甲醇将其定容与 25 mL 容量瓶中,获得 1.01 mg/mL 甘草酸单铵盐对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 苦杏仁含量测定供试品溶液制备 根据表 1 中麻黄汤的不同配伍方式 A-H 组成含苦杏仁的 8 个配伍组方,先根据 A-H 组方分别称量麻黄汤药材(剂量同《伤寒论》所记载),由于苦杏仁后下,先将 8 个组方中的其他药物先置于含有 1 000 mL 水的烧瓶中浸泡 30 min,加热煮沸 30 min 后加热苦杏仁,继续加热回流 20 min,摇匀过滤即得各不同配伍麻黄汤 A-H 的麻黄汤水煎液;精密量取 0.5 mL 上述麻黄汤水煎液加入甲醇定容于 25 mL 量瓶,静置 2 h 后离心取上清液,即得各不同配伍含苦杏仁的 A-H 的麻黄汤供试品溶液。

2.3.2 甘草含量测定供试品溶液制备 根据表 2 中麻黄汤的不同配伍方式 A1-H1 组成含甘草的 8 个配伍组方,方法同 1.4.1 制备各不同配伍含甘草的 A1-H1 的麻黄汤供试品溶液。

表 1 麻黄汤不同配伍研究苦杏仁有效成分的正交设计(1 = 用药,2 = 不用药)

不同配伍	苦杏仁	麻黄	桂枝	甘草
A 麻黄汤全方	1	1	1	1
B 苦杏仁麻黄桂枝	1	1	1	2
C 苦杏仁麻黄甘草	1	1	2	1
D 苦杏仁麻黄	1	1	2	2
E 苦杏仁桂枝甘草	1	2	1	1
F 苦杏仁桂枝	1	2	1	2
G 苦杏仁甘草	1	2	2	1
H 苦杏仁	1	2	2	2

表 2 麻黄汤不同配伍研究甘草有效成分的正交设计(1 = 用药,2 = 不用药)

不同配伍	甘草	麻黄	桂枝	苦杏仁
A1 麻黄汤全方	1	1	1	1
B1 甘草麻黄桂枝	1	1	1	2
C1 甘草麻黄苦杏仁	1	1	2	1
D1 甘草麻黄	1	1	2	2
E1 甘草桂枝苦杏仁	1	2	1	1
F1 甘草桂枝	1	2	1	2
G1 甘草苦杏仁	1	2	2	1
H1 甘草	1	2	2	2

2.4 专属性试验 取同一供试品溶液根据 2.3 制备的供试品溶液,采用薄层层析的方法对麻黄汤进

行专属性试验,结果显示麻黄汤专属性良好。

2.5 线性关系考察 精密量取混合对照品的甲醇溶液 3.0、6.0、12.0、18.0、24.0 mL,分别置 50 mL 量瓶中。加甲醇稀释至刻度,摇匀,分别精密吸取 10 μ L,注入液相色谱仪,记录峰面积;以混合对照品进样量(μ g)为横坐标(X),峰面积积分值为纵坐标(Y),绘制标准曲线,结果表明,混合对照品在 0.064 32~0.145 6 μ g 范围内线性关系良好。

2.6 中间精密度试验 精密吸取 10 μ L 同一供试品溶液,连续进样 5 次,结果显示相对标注偏差 RSD 为 0.82%,精密度良好。

2.7 供试品溶液稳定性试验 取麻黄汤全方的供试品溶液,分别根据苦杏仁的色谱条件和甘草的色谱条件进行指纹图谱研究,在供试品溶液制备后 0 h,2 h,4 h,8 h,12 h,24 h 进行测定,最终获得苦杏仁色谱条件的 RSD 为 1.88%;而甘草色谱条件的 RSD 为 0.89%,表明 24 h 内样品稳定以及各色谱条件的稳定性高。

2.8 重复性试验 精密吸取 10 μ L 同一供试品溶液,在相同色谱条件,相同液相分析仪上检测 5 次,结果显示标准偏差 RSD 为 0.88%,重复性良好。

2.9 回收率试验 采用加样回收法,精密称取 5 份已知含量的同一批号样品各约 0.5 g,分别精密加入 20 mL 混合对照品甲醇溶液(0.005 36 mg/mL),进行回收率试验测定,计算结果显示平均回收率为 98.54%,RSD 为 0.76%。

2.10 样品测定结果

2.10.1 麻黄汤中苦杏仁色谱条件的指纹图谱 如图 1 所示,苦杏仁色谱条件能够将苦杏仁苷清晰的分离出来,无论是苦杏仁苷对照品溶液、缺苦杏仁阴性对照溶液还是麻黄汤全方供试品溶液均获得清晰的分离,无其他杂质峰,基线稳定,具有可比性。

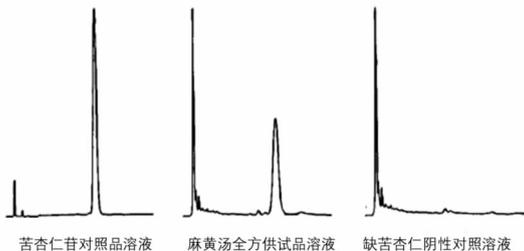


图 1 麻黄汤中苦杏仁色谱条件的指纹图谱

2.10.2 甘草指纹图谱 甘草色谱条件能够将苦杏仁苷清晰的分离出来,无论是苦杏仁苷对照品溶液、缺苦杏仁阴性对照溶液还是麻黄汤全方供试品溶液均获得清晰的分离,无其他杂质峰,基线稳定,具有

可比性。见图 2。

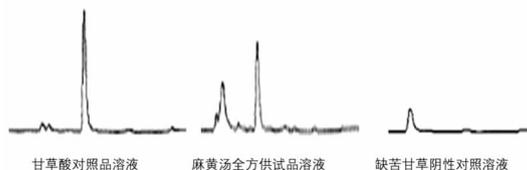


图 2 麻黄汤中甘草色谱条件的指纹图谱

2.10.3 麻黄汤不同配伍方式对苦杏仁有效成分的影响 麻黄汤不同配伍方式中对苦杏仁有效成分苦杏仁苷每剂含量未见明显差异,进行方差分析后结果显示,麻黄汤不同配伍中麻黄、桂枝、甘草对苦杏仁苷的影响差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

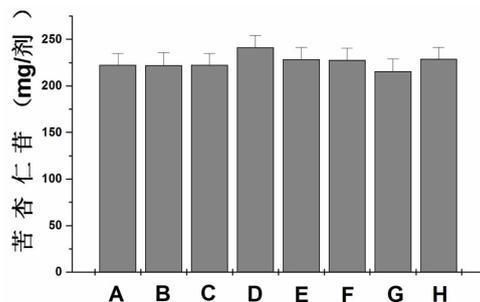


图 3 麻黄汤不同配伍方式对苦杏仁有效成分的影响

表 3 麻黄汤不同配伍方式对苦杏仁有效成分的影响

方差药物来源	偏差平方和	自由度	F	P
麻黄	8.202	1	0.123	0.745
桂枝	7.034	1	0.106	0.762
甘草	120.904	1	1.802	0.251

2.10.4 麻黄汤不同配伍方式对甘草有效成分的影响 麻黄汤不同配伍方式中以 H1 单纯甘草中甘草酸含量为最高,而麻黄汤全方 A1 中的甘草酸含量为最低;不同配伍中麻黄、桂枝和苦杏仁均降低麻黄汤中甘草酸的含量($P < 0.05$)。见图 4 和表 4。

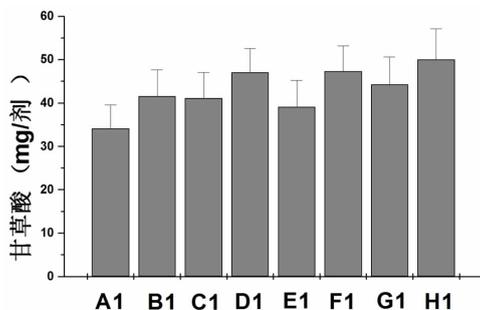


图 4 麻黄汤不同配伍方式对甘草有效成分的影响

表 4 麻黄汤不同配伍方式对甘草有效成分的影响

方差药物来源	偏差平方和	自由度	F	P
麻黄	36.126	1	30.025	0.005
桂枝	52.021	1	43.216	0.003
苦杏仁	95.223	1	79.104	0.001

3 讨论

苦杏仁为蔷薇科樱桃属植物山杏、蔷薇科樱桃属植物西伯利亚杏、蔷薇科樱桃属植物东北杏或蔷薇科樱桃属植物杏的干燥成熟种子,苦杏仁的功效主要是止咳平喘和润肠通便,其药物的主要有效成分分为苦杏仁苷和苦杏仁油,除了这些主要的有效药物成分以外,苦杏仁还有多种成分,诸如苦杏仁酶、多种氨基酸类营养成分、挥发性成分和微量元素等。目前苦杏仁苷含量的测定方法繁多,采用滴定法间接测定苦杏仁苷含量的可见于中国药典中的相关记载;随着现代科技的发达以及中药研究的深入,有学者采用高效液相色谱法、薄层扫描法、应用紫外吸收光谱法、化学发光法、指纹图谱等测定苦杏仁苷的含量^[9-12]。本研究基于指纹图谱对苦杏仁中的有效成分苦杏仁苷进行测定,结果显示,麻黄汤不同配伍方式中对苦杏仁有效成分苦杏仁苷每剂含量未见明显差异,进行方差分析后结果显示,麻黄汤不同配伍中麻黄、桂枝、甘草对苦杏仁苷的影响差异无统计学意义($P > 0.05$)。有研究显示^[13-14]麻黄汤全方配伍对苦杏仁中的苦杏仁苷有效含量没有影响,只有麻黄与苦杏仁配伍时,其水煎液中苦杏仁苷含量亦未见增加,与本研究结果一致。

甘草为豆科植物、胀果甘草、光果甘草的干燥根及根茎,是中药方剂中最常用的药物之一,其功效以补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛、调和诸药为主,其中也因为调和诸药这一功效而应用广泛。现代药理研究证明,甘草中含有甘草酸、黄酮类和生物碱类化合物等,多种化合物各司其职发挥抗炎、抗变态反应和调节细胞免疫功能等功效。目前对甘草的用药评价主要以其有效成分之一甘草酸的含量(定量指标),作为评价甘草的质量标准评价标准之一^[15-16]。目前随着科技的发达,甘草酸的测定方法有很多,其中以高效液相色谱法最为多见,其次毛细管电泳法和薄层扫描法等^[17-18]。本研究基于指纹图谱研究,结果显示麻黄汤不同配伍方式中以 H1 单纯甘草中甘草酸含量为最高,而麻黄汤全方 A1 中的甘草酸含量为最低;不同配伍中麻黄、桂枝和苦杏仁均降低麻黄汤中甘草酸的含量。由此推测可能甘草的有效成分甘草酸与麻黄汤中的其他三味药材发生剧烈的化学反应,无论是有效成分之间的还是药物

毒性之间的,这些反应降低了甘草有效成分在不同麻黄汤配伍方式中甘草酸的含量,帮助甘草在麻黄汤中行使调和诸药的功能。

参考文献

- [1] 李继增. 麻黄汤加减治疗急性喘息型支气管炎疗效观察[J]. 世界最新医学信息文摘(连续型电子期刊), 2016, 16(41): 159, 166.
- [2] 王志雄. 麻黄汤加减运用在治疗急性喘息型支气管炎患者中的价值探讨[J]. 世界最新医学信息文摘(连续型电子期刊), 2017, 17(34): 151.
- [3] 杨正腾, 王力宁, 张明, 等. 麻黄汤其饮片汤剂与煮散剂止咳和抗炎药效比较研究[J]. 中医药导报, 2017, 23(4): 50-52.
- [4] 袁钟瑜, 黄千千, 蒋岚, 等. 麻黄汤类方治规律浅析[J]. 云南中医中药杂志, 2016, 37(4): 32-33.
- [5] 刘要武. 麻黄汤临床应用举隅[J]. 光明中医, 2016, 31(13): 1954-1956.
- [6] 彭明江, 叶品良. 浅议仲景桂枝汤、麻黄汤[J]. 中医药临床杂志, 2016, 12(4): 479-480.
- [7] 徐彦飞, 蔡永敏. 麻黄汤原始剂量应用启悟[J]. 中医杂志, 2015, 56(9): 807, 810.
- [8] 李廷保, 杨鹏斐, 张花治. 基于数据挖掘对敦煌及古代医籍中麻黄汤用药配伍规律研究[J]. 长春中医药大学学报, 2017, 33(3): 365-368.
- [9] 陈玲玲. HPLC 法测定小儿清热止咳口服液中药杏仁苷、甘草苷和甘草酸的含量[J]. 海峡药学, 2017, 27(3): 79-83.
- [10] 胡金铭, 陈晗. 苦杏仁油的提取及其理化性质的检测[J]. 内蒙古石油化工, 2017, 10(4): 28-29.
- [11] 露, 戴婷, 李小龙, 等. 苦杏仁苷药理作用的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2016, 37(1): 63-66.
- [12] 王均秀, 张学兰, 王秋红, 等. 苦杏仁不同炮制品 HPLC 指纹图谱的比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(6): 32-34.
- [13] 梁光义, 曹佩雪, 李霞, 等. 麻黄汤合煎汤剂与颗粒汤剂中苦杏仁苷含量测定[J]. 现代中药研究与实践, 2003, 17(1): 30-32.
- [14] 吴昭晖, 罗佳波, 胡晓添. HPLC 法研究配伍对麻黄汤中苦杏仁苷含量的影响[J]. 中草药, 2004, 35(3): 269-271.
- [15] 曹佩雪, 梁光义, 徐必学, 等. HPLC 法测定麻黄汤分煎及合煎汤剂中甘草酸含量[J]. 中草药, 2001, 32(11): 981-983.
- [16] 顾维彰. 各种生药与甘草配伍对其煎液中甘草酸含量的影响[J]. 中成药, 1981, 15(7): 12-14.
- [17] 豆康宁, 尚新彬, 王飞. HPLC 法测定甘草中甘草酸的含量与分布[J]. 中国食品添加剂, 2017, 34(5): 199-203.
- [18] 赵燕燕, 刘丽艳, 韩媛媛, 等. 不同国家药典对甘草酸单铵盐有关物质及含量测定结果与建立方法的比较[J]. 中国药学杂志, 2013, 48(22): 1944-1950.

(2017-07-17 收稿 责任编辑: 杨觉雄)