

· 中药工业 ·

大黄-积雪草不同比例配伍对大黄游离蒽醌溶出率的影响[△]

韩怡, 柳春娣*

南京中医药大学附属张家港医院 药学部, 江苏 张家港 215600

[摘要] 目的: 研究大黄-积雪草不同比例配伍对大黄5个游离蒽醌(芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚)溶出率的影响。方法: 采用高效液相色谱法分析大黄单提液及大黄-积雪草不同比例配伍混提液中5个游离蒽醌的含量。色谱条件: Thermo Hypersil BDS C₁₈色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相甲醇-0.1%磷酸溶液(85:15), 流速1 mL·min⁻¹, 柱温30℃, 检测波长254 nm。结果: 6种比例大黄-积雪草混提液游离蒽醌含量均小于大黄单提液, 积雪草对大黄5个游离蒽醌的溶出影响明显。结论: 综合考虑大黄单提液及各配伍比例游离蒽醌含量, 认为大黄-积雪草临床最佳配伍比例为1:5。

[关键词] 大黄-积雪草; 配伍比例; 游离蒽醌; 高效液相色谱法

[中图分类号] R282.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2020)01-0094-04

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190513003

**Effect of Different Proportion Compatibility of Rhei Rhizoma et Radix-Centellae Herba on
Dissolution Rate of Rree Anthraquinone**

HAN Yi, LIU Chun-di^{1*}

Pharmacy Department of Zhangjiagang Hospital Affiliated to Nanjing University of TCM, Zhangjiagang 215600, China

[Abstract] **Objective:** To study the effects of different proportions of Rhei Rhizoma et Radix and Centellae Herba on the dissolution rate of 5 free anthraquinone (aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol, physcion). **Methods:** The content of 5 free anthraquinones in Rhei Rhizoma et Radix extract and Rhei Rhizoma et Radix and Centellae Herba were determined by HPLC. The tests were carried out by Thermo C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) by isocratic elution with methanol and 0.1% phosphoric acid water solution as mobile phase at a flow rate of 1 mL·min⁻¹, the column temperature was 30℃ and the detection wavelength was 254 nm. **Results:** The content of free anthraquinone in 6 kinds of Rhei Rhizoma et Radix and Centellae Herba mixture was lower than Rhei Rhizoma et Radix extract. The effect of Centellae Herba on the dissolution of 5 free anthraquinones from Rhubarb was obvious. **Conclusion:** The best compatibility ratio of Rhei Rhizoma et Radix and Centellae Herba is 1:5 by comprehensive consideration of the content of free anthraquinone in Rhubarb single extract and each compatibility ratio.

[Keywords] Rhei Rhizoma et Radix and Centellae Herba; compatibility ratio; free anthraquinone; HPLC

现代中药重要的研究内容之一是中药复方的配伍规律和药效物质基础研究^[1], 而复方配伍规律研究的基础和重要切入点之一则为药对^[2]。大黄为临床治疗慢性肾衰竭的良药, 循证医学研究表明, 在慢性肾衰竭各期, 大黄在单方、复方、内服、外用等方面均具有不可替代的作用^[3-4]。积雪草-大黄药对配伍是众多医家临床常用于延缓肾功能衰竭(CRF)的经验配伍^[5-7]。近年来, 以积雪草-大黄为主要成分的中药复方, 如复方积雪草胶囊、固本泄浊饮、九味肾清颗

粒等, 临床应用疗效确切, 广受好评^[8-10]。

现代研究表明, 药对按照不同比例配伍时, 对指标性成分的溶出率有很大影响。基于此, 本实验以大黄中5个指标性成分溶出率为指标, 通过制定适宜的HPLC色谱条件, 研究大黄单提液、大黄-积雪草6个不同比例配伍混提液中指标性成分溶出率变化规律。从化学成分角度探讨药对的最佳配伍比例, 为中药复方药效物质基础研究及临床合理应用提供参考。

[△] [基金项目] 江苏省苏州市产业技术创新专项项目(SYSD2016161)

* [通信作者] 柳春娣, 主任中药师, 研究方向: 质量分级及药事管理; Tel: (0512)56380625; E-mail: liucd0723@163.com

1 材料

1.1 仪器

Mettler MS105 电子天平、Waters e2695 高效液相色谱仪、Waters PDA2998 检测器；SCQ-250 超声波清洗器(上海声彦超声仪器有限公司)；Thermo ST16R 低温离心机(美国赛默飞公司)。

1.2 试剂

对照品芦荟大黄素(批号: PRF9022841, 纯度: 97.72%)、大黄酸(批号: PRF9083142, 纯度: 98.36%)、大黄素(批号: PRF8070501, 纯度: 99.44%)、大黄酚(批号: PRF8022726, 纯度: 99.67%)、大黄素甲醚(批号: PRF9031428, 纯度: 97.24%)均购于成都普瑞法科技开发有限公司; 甲醇为色谱纯; 磷酸为分析纯(上海展云化工); 水为娃哈哈纯净水。

1.3 药材

大黄(生)(苏州天灵中药饮片有限公司, 批号: 181006010)为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 的干燥根和根茎^{[11]23}; 积雪草(苏州天灵中药饮片有限公司, 批号: 181112015)为伞形科植物积雪草 *Centella asiatica* (L.) Urb. 的干燥全草^{[11]283}。2种药材均经张家港市中医医院余辉主任中药师鉴定为正品。

2 方法

2.1 色谱条件

Thermo Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 美国赛默飞公司); 流动相甲醇-0.1% 磷酸溶液(85:15), 检测波长 254 nm, 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备

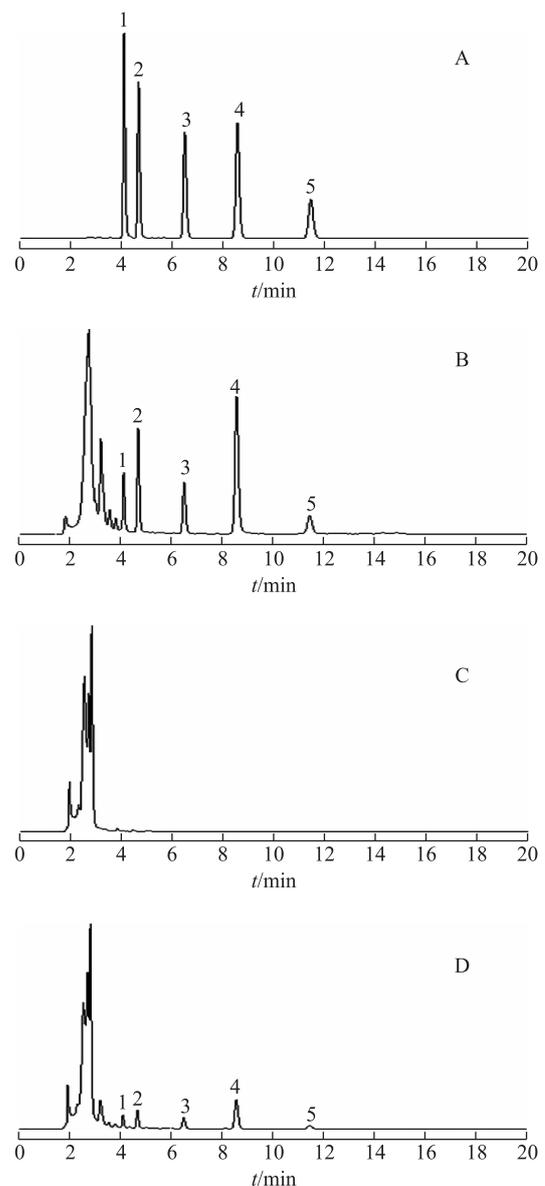
精密称取各对照品适量, 加甲醇制成储备液。精密吸取各储备液适量, 用甲醇稀释制成每 1 mL 含芦荟大黄素 92.72 μg、大黄酸 89.72 μg、大黄素 79.44 μg、大黄酚 72.24 μg、大黄素甲醚 40.40 μg 的溶液, 作为混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 大黄、积雪草单提液的制备 取大黄、积雪草样品粉末适量, 过 4 号筛, 分别精密称取 0.5 g, 置具塞锥形瓶中, 加入精密量取的甲醇 25 mL, 摇

匀后称质量, 静置 45 min 后超声提取 30 min, 冷却, 再次称质量并补足减失质量, 静置后取上清液于离心管中, 5000 r·min⁻¹ 离心(离心半径 3 cm)5 min, 0.45 μm 有机滤膜过滤, 即得。

2.3.2 大黄-积雪草不同配比混提液的制备 以固本泄浊饮临床常用配伍比例为参考, 以大黄质量为 0.5 g 计算, 按照大黄-积雪草质量比分别为 1:15、1:10、1:7、1:5、1:3、1:1 精密称取大黄、积雪草, 按 2.3.1 项下方法进行提取, 作为不同配比供试品溶液。记录色谱图, 见图 1。



注: A. 大黄对照品; B. 大黄单提液; C. 积雪草单提液; D. 大黄-积雪草混提液; 1. 芦荟大黄素; 2. 大黄酸; 3. 大黄素; 4. 大黄酚; 5. 大黄素甲醚。

图 1 大黄 5 种游离蒽醌对照品及供试品 HPLC 图

2.4 线性关系考察

分别精密吸取0.2、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL混合对照品溶液置10 mL容量瓶中，甲醇定容后配制成系列质量浓度的混合对照品溶液。按2.1项下色谱条件进样，记录色谱图。分别以5个成分对照品质量浓度(X , $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)为横坐标，其峰面积(Y)为纵坐标，绘制标准曲线，得到回归方程，结果见表1。

表1 大黄5种游离蒽醌对照品的回归方程、线性范围及 r

对照品	回归方程	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	r
芦荟大黄素	$Y = 49\ 382X + 1315$	1.85 ~ 55.63	0.999 2
大黄酸	$Y = 44\ 191X - 14\ 689$	1.79 ~ 44.86	0.999 4
大黄素	$Y = 43\ 134X + 19\ 394$	1.59 ~ 47.67	0.999 6
大黄酚	$Y = 62\ 017X - 56\ 053$	1.44 ~ 43.34	0.999 1
大黄素甲醚	$Y = 47\ 355X + 12\ 512$	0.81 ~ 24.24	0.999 1

2.5 精密度试验

取2.2项下混合对照品溶液，按2.1项下色谱条件，连续进样6次，结果芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的RSD分别为0.77%、0.81%、0.66%、0.65%、0.72% ($n=6$)，保留时间的RSD分别为0.32%、0.24%、0.21%、0.26%、0.36% ($n=6$)，表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

按2.3.2项下等比供试品溶液制备方法，平行制备6份供试品溶液，按2.1项下色谱条件，分别进样，结果芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的RSD分别为1.48%、1.65%、1.46%、1.51%、1.59%、1.78% ($n=6$)，保留时间的RSD分别为0.20%、0.42%、0.22%、0.23%、0.28%、0.34% ($n=6$)，表明该方法具有良好的重复性。

2.7 稳定性试验

取2.3.2项下等比供试品溶液，按2.1项下色谱条件，分别在0、4、8、12、18、24 h进样，结果芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的RSD分别为0.98%、1.17%、1.26%、1.41%、1.89%、1.76% ($n=6$)，保留时间的RSD分别为0.33%、0.35%、0.35%、0.45%、0.41%、0.40% ($n=6$)，表明在24 h内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验

取大黄、积雪草样品粉末适量，过4号筛，精

密称取大黄、积雪草各约0.25 g为1份，共称取6份，每份分别加入低、中、高3个质量浓度的混合对照品溶液，每一质量浓度取2份，进行测定并计算回收率，结果见表2。

表2 大黄5种游离蒽醌加样回收率试验结果($n=6$)

成分	样品中含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%			
芦荟大黄素	0.167 1	0.132 6	0.297 8	98.53	99.19	1.20			
	0.167 9	0.132 6	0.302 5	101.54					
	0.166 2	0.165 8	0.330 9	99.31					
	0.164 4	0.165 8	0.327 8	98.56					
	0.168 1	0.199 0	0.363 9	98.39					
	0.161 2	0.199 0	0.357 9	98.83					
	大黄酸	0.295 5	0.234 6	0.528 1			99.14	99.89	1.12
		0.296 0	0.234 6	0.527 2			98.55		
		0.297 5	0.293 3	0.593 9			101.05		
		0.286 9	0.293 3	0.583 8			101.24		
0.296 1		0.352 0	0.648 9	100.22					
0.288 2		0.352 0	0.637 1	99.12					
大黄素		0.180 2	0.142 6	0.321 4	98.99	99.16	0.56		
		0.177 6	0.142 6	0.319 3	99.40				
		0.174 6	0.178 2	0.350 0	98.43				
		0.175 4	0.178 2	0.353 1	99.74				
	0.181 3	0.213 8	0.392 2	98.67					
	0.180 1	0.213 8	0.393 3	99.73					
	大黄酚	0.469 7	0.376 1	0.839 4	98.29			99.35	1.46
		0.461 2	0.376 1	0.838 8	100.40				
		0.479 3	0.470 1	0.957 8	101.78				
		0.463 4	0.470 1	0.929 4	99.12				
0.472 5		0.564 1	1.027 3	98.36					
0.474 3		0.564 1	1.028 0	98.16					
大黄素甲醚		0.093 7	0.075 8	0.170 8	101.70	100.29	1.41		
		0.095 3	0.075 8	0.171 3	100.30				
		0.097 2	0.094 7	0.190 5	98.54				
		0.095 3	0.094 7	0.191 0	101.03				
	0.092 5	0.113 6	0.204 5	98.60					
	0.094 2	0.113 6	0.209 5	101.54					

2.9 供试品含量测定

取2.3项下制备的大黄单提液及不同配比混提液，按2.1项下色谱条件测定，计算各游离蒽醌含量、混提液游离蒽醌含量相对于单提液对应成分含量的百分比($n=3$)，结果见表3~4、图2。

表3 大黄-积雪草不同比例配伍中游离蒽醌的含量($n=3$)mg·g⁻¹

编号	配伍比例	芦荟大黄素质量分数	大黄酸质量分数	大黄素质量分数	大黄酚质量分数	大黄素甲醚质量分数	游离蒽醌总质量分数
0	1:0	0.326 7	0.586 8	0.359 4	0.935 8	0.189 5	2.398 2
1	1:15	0.178 8	0.390 4	0.252 8	0.683 1	0.129 8	1.634 9
2	1:10	0.189 8	0.375 4	0.267 2	0.689 3	0.129 3	1.651 0
3	1:7	0.204 2	0.439 6	0.310 4	0.761 6	0.144 3	1.860 1
4	1:5	0.216 6	0.487 8	0.315 8	0.834 8	0.165 6	2.020 6
5	1:3	0.219 6	0.435 0	0.312 8	0.805 6	0.159 7	1.932 7
6	1:1	0.231 6	0.430 1	0.304 0	0.812 0	0.156 2	1.934 0

表4 大黄-积雪草不同比例配伍中5个游离蒽醌含量相对百分比

编号	配伍比例	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚	游离蒽醌总量
0	1:0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
1	1:15	54.72	66.54	70.32	73.00	68.49	68.17
2	1:10	58.11	63.98	74.33	73.65	68.24	68.84
3	1:7	62.50	74.92	86.35	81.38	76.16	77.56
4	1:5	66.29	83.14	87.85	89.20	87.38	84.25
5	1:3	67.23	74.13	87.02	86.09	84.27	80.59
6	1:1	70.90	73.30	84.59	86.77	82.40	80.64

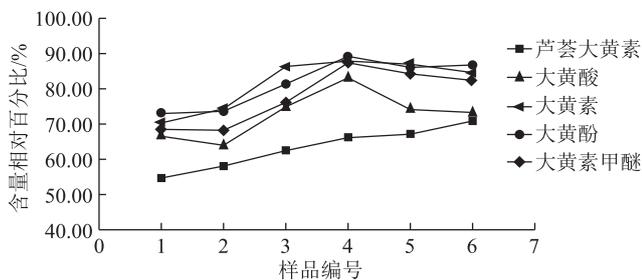


图2 大黄-积雪草不同比例配伍中5个游离蒽醌含量相对百分比

3 讨论

依据固本泄浊饮对慢性肾衰竭患者的临床遣药经验^[9-10],大黄的常用剂量为3~20g,积雪草的常用剂量为20~45g,据此本实验选取大黄-积雪草临床较多使用的6种配伍比例(质量比1:15、1:10、1:7、1:5、1:3、1:1),研究大黄游离蒽醌溶出率变化规律。

由实验结果及表4、图2可知,在与积雪草配伍后,大黄5个游离蒽醌溶出率均明显下降。5个指标性成分在混提液中溶出变化规律并不一致。芦荟大黄素溶出率下降最为明显,相对于大黄单提液的含量百分比在70.90%~54.72%,其中积雪草配伍占比越大,芦荟大黄素溶出率越小。大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的溶出率变化趋势较为一致,相对于大黄单提液的含量百分比在89.20%~

63.98%,随着积雪草配伍占比变小,3个游离蒽醌溶出率变大,且均在大黄-积雪草配伍比例为1:5时溶出率最大,后有所下降。当大黄-积雪草配伍比例为1:5时,5个游离蒽醌的总质量分数最高,为2.02 mg·g⁻¹,可认为是临床最佳配伍比例。

本研究通过比较大黄-积雪草配伍前后大黄中5个指标性成分含量变化,可为大黄-积雪草配伍药效物质基础变化的进一步研究提供基础,为临床使用大黄-积雪草配伍为主的中药复方提供参考。

参考文献

- [1] 周斌,张铁军,高文远,等.中药复方配伍规律及药效物质基础研究进展[J].中草药,2006,37(11):1601-1606.
- [2] 袁海建,李国银,姜俊,等.半夏-厚朴药对抗肿瘤药效物质基础及作用机制研究新思路[J].中草药,2018,49(8):1924-1931.
- [3] 李孜,卿平,冀玲,等.大黄治疗慢性肾功能衰竭的系统评价[J].中国循证医学杂志,2004,4(7):468-473.
- [4] 林半夏,雷彩云,丁陈陈,等.中医治疗慢性肾衰竭用药规律探析[J].上海中医药杂志,2015,49(5):8-14.
- [5] 邹燕勤,孔薇.慢性肾衰竭中医辨治思路[J].江苏中医药,2018,50(12):1-5.
- [6] 钱璐,李伟明,傅晓骏.基于中医传承辅助平台(V2.5)分析傅晓骏治疗早中期慢性肾功能衰竭用药规律[J].新中医,2018,50(9):116-120.
- [7] 孙响波,于妮娜,张法荣.中药治疗慢性肾衰竭微炎症研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2014,16(2):172-174.
- [8] 朱晓玲,王永钧,王军,等.复方积雪草胶囊对肾小球硬化症大鼠肾组织细胞外基质的影响[J].中国中医药科技,2005,12(5):274-276.
- [9] 强胜,杜珍芳,黄敏,等.固本泄浊饮延缓5/6肾切除大鼠慢性肾功能衰竭的机制研究[J].解放军医药杂志,2017,29(1):35-39.
- [10] 强胜,杜珍芳,黄敏,等.固本泄浊饮对5/6肾切除肾衰竭大鼠TGF-β1、BMP-7表达的影响研究[J].解放军医药杂志,2016,28(12):11-15.
- [11] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[M].北京:中国医药科技出版社,2015.

(收稿日期:2019-05-13 编辑:王笑辉)