

双参平肺方中药味配伍对知母芒果苷提取率的影响与成分作用探讨

姜苏¹, 陈亚军¹, 郑云枫^{1,2}, 李存玉^{1,2}, 范欣生^{2,3}, 彭国平^{1,2*}

(1.南京中医药大学药学院,江苏 南京 210023;2.江苏省中药资源产业化过程协同创新中心,江苏 南京 210023;3.南京中医药大学基础医学院,江苏 南京 210023;)

摘要:目的 探究双参平肺方中不同配伍对知母芒果苷提取率的影响,并以成分配伍研究影响复方提取率的作用机理。方法

根据处方中药含有成分的种类进行处方拆方、配伍,分为知母单煎组、处方合煎组、知母-皂苷类中药复方组、知母-酚酸类中药复方组、知母-碱基类中药复方组。以知母中芒果苷提取率为指标,分析配伍对芒果苷提取率的影响;根据拆方结果,对显著影响芒果苷提取率的桑白皮,以其所含的生物碱成分 1-脱氧野尻霉素(1-Deoxynojirimycin, DNJ)、氨基酸等代表性成分进行不同配伍,考察桑白皮中成分对知母中芒果苷的影响,探讨芒果苷提取率的影响机理。**结果** 知母单煎、处方合煎、知母-皂苷类中药复方、知母-酚酸类中药复方、知母-碱基类中药复方的提取率分别为 97.33%、47.03%、94.08%、57.53%、34.31%;进一步拆分表明,处方中桑白皮与知母配伍时对芒果苷的提取率影响最为明显,其中桑白皮生物碱部位、DNJ、甘氨酸、 β -丙氨酸溶液分别与知母合煎,芒果苷的提取率分别为 16.64%、28.13%、40.75%、48.56%。**结论** 双参平肺方煎煮提取时主要是桑白皮、地骨皮影响了芒果苷的提取率,推测桑白皮中生物碱及氨基酸与芒果苷形成缔合物,团聚分子量增大,影响了芒果苷煎出时的成分溶出。

关键词:双参平肺方;知母;芒果苷

中图分类号:R289.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-0482(2016)06-0581-04

DOI:10.14148/j.issn.1672-0482.2016.0581

Study on Different Compatibility of Shuangshen Pingfei Decoction Influence on Decocting Rate of Mangiferin in *Anemarrhena asphodeloides*

JIANG Su¹, CHEN Ya-jun¹, ZHENG Yun-feng^{1,2}, LI Cun-yu^{1,2}, FAN Xin-sheng^{2,3}, PENG Guo-ping^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China; 2. Collaborative Innovation Center of Chinese Medicine Resources Industrialization, Nanjing, 210023, China; 3. The Basic Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China;)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the influence of different compatibility of Shuangshen Pingfei decoction on the decocting rate of mangiferin in *Anemarrhena asphodeloides*, and ingredients to research influence on the mechanism of the solution rate.

METHODS To disassemble formulas on the basis of the prescription of traditional Chinese medicine containing categories of ingredients. With decocting rate of mangiferin in *Anemarrhena asphodeloides* Bge as indexes, analyse different compatibility influence on mangiferin decocting rate. Based on these results of disassembled formulas, the representative alkaloid 1-Deoxynojirimycin and amino acid in different compatibility are used to research the influence of compositions of white mulberry on the decocting rate of mangiferin in *Anemarrhena asphodeloides* Bge and discuss the influence of the decocting rate mechanism with Anion and cation exchange resin processing of samples. **RESULTS** Research findings shows that the decocting rates of mangiferin in *Anemarrhena asphodeloides* Bge decoction, prescription combined decoction, *Anemarrhena asphodeloides* Bge-saponins from Chinese herbal compound, *Anemarrhena asphodeloides* Bge-phenolic acid from Chinese herbal compound are 97.33%, 47.03%, 94.08%, 57.53%, 34.31%, respectively; Further study shows that *Morus alba* L. combined with *Anemarrhena asphodeloides* Bge have the most obvious effect on extraction yield of mangiferin. *Anemarrhena asphodeloides* Bge decocting with total alkaloids of *Morus alba* L, DNJ, glycine, β -alanine, respectively. The decocting rate of mangiferin in each group was 16.64%, 28.13%, 40.75% and 48.56%, respectively. **CONCLUSION** Our results suggest that the decocting rates of mangiferin are mainly influenced by *Morus alba* L. We also conjectured that alkaloids and amino acids of *Morus alba* L. form complexes with mangiferin.

KEY WORDS:Shuangshen Pingfei Decoction; *Anemarrhena asphodeloides* Bge; Mangiferin

收稿日期:2016-07-11;修稿日期:2016-09-19

基金项目:国家自然科学基金(81373980);江苏省中药资源产业化过程协同创新中心开放课题(ZDXM-4)

作者简介:姜苏(1991-),男,江苏连云港人,南京中医药大学 2014 级硕士研究生。* 通信作者:guopingpeng@sohu.com

中药复方配伍是中医用药的特色之一,以发挥复方内单味中药间的协同或拮抗作用,合理的复方配伍合煎可以有效提高单味中药的疗效,降低某些中药的毒副作用。但是,中药复方配伍在煎煮提取过程中药效成分含量是否降低、原有成分种类是否增减目前尚未完全阐明,复方合煎时有些配伍仍然会影响部分单味中药药效成分的提取。双参平肺方源于古方及项目组临床经验总结^[1],由人参、知母、丹参、桑白皮、地骨皮、甘草、橘红、天冬组成,用治于气阴不足、痰瘀交阻之肺纤维化。芒果苷是知母中主要药效成分,具有抗病原微生物、解热、抗炎、对交感神经和 β 受体功能的影响等作用^[2]。作者在研究双参平肺方提取工艺时发现,无论怎样调整加水量、煎煮次数、煎煮时间等因素,知母中芒果苷的提取率很低,不足单煎时提取率的一半。由此推测在整方煎煮提取过程中,处方中其他类药材的某些成分在提取时影响了芒果苷向溶剂中迁移。本研究希望通过双参平肺方中芒果苷的成分煎出规律研究,探讨成分存在状态对成分从药材组织向溶剂中迁移的影响,为中药复方配伍效应的研究提供理论依据。

1 材料

Agilent 1100 型 HPLC(美国 Agilent Technologies 公司);JCS-1000 型电子天平;分析天平(十万分之一,赛多利斯科学仪器北京有限公司);KH-250B 超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司)。201 $\times$ 4 型大孔阴离子交换树脂(河北沧州宝恩化工有限公司)、D101 型大孔阳离子交换树脂(河北沧州宝恩化工有限公司)、芒果苷对照品(111607-200402)、知母、人参、丹参、桑白皮、地骨皮、甘草、橘红和天冬饮片均购自安徽亳州,经南京中医药大学刘圣金副教授鉴定符合《中国药典》2015 年版项下标准。甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Kromasil C₁₈ 色谱柱(5 μ m, 250 mm $\times$ 4.6 mm),检测器 VWDG1314A;流动相乙腈-0.1%磷酸(15:85);检测波长:258 nm;流速 1.0 mL/min;柱温 30 $^{\circ}$ C;进样量 10 μ L。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品的制备 精密称取芒果苷对照品 3.05 mg 置 50 mL 量瓶中,加稀乙醇溶解并定容至刻度线,制得浓度为 61.0 μ g/mL 的对照品储备液。

2.2.2 供试品的制备

2.2.2.1 拆方组供试品溶液的制备 全方中药组成为人参 18 g,知母 30 g,丹参 30 g,桑白皮 30 g,地骨皮 30 g,甘草 15 g,橘红 30 g,天冬 30 g,称取各拆方组中药组成所需复方用量药材,加 10 倍量水,加热回流提取 2 次,每次 1.5 h,滤过,分别量取样品溶液 5 mL 离心 15 min,10 000 r/s,取上清液,即得拆方组供试品溶液。

2.2.2.2 桑白皮组分溶液组供试品溶液的制备 桑白皮水煎液组:称取桑白皮 50 g,加 10 倍量水回流提取 2 次,合并提取液,混匀,备用;减除有机酸(氨基酸)组:称取桑白皮 50 g,加 10 倍量水回流提取 2 次,合并提取液,混匀,经 120 mL 201 $\times$ 4 型大孔阴离子交换树脂,收集流出液,混匀,备用;减除生物碱(氨基酸)组:称取桑白皮 50 g,加 10 倍量水回流提取 2 次,合并提取液,混匀,经 120 mL D101 型大孔阳离子交换树脂,收集流出液,混匀,备用;生物碱(氨基酸)溶液组:将减除生物碱(氨基酸)组中吸附后的阳离子交换树脂,用 4%氨水 360 mL 洗脱,收集氨水洗脱液,混匀,醋酸调 pH=7,混匀,备用;溶剂对照组:蒸馏水配制 4%氨水,用醋酸调 pH=7,混匀,备用;生物碱成分 DNJ 组:蒸馏水配制 0.1% DNJ 溶液,混匀,备用; α -氨基酸组:蒸馏水配制 1%甘氨酸溶液,混匀,备用; β -氨基酸组:蒸馏水配制 1% β -丙氨酸溶液,混匀,备用;各取知母药材 30 g,分别加入上述各组提取溶剂 10 倍量,按“2.2.2.1”项下提取方法操作,即得桑白皮组分溶液组供试品溶液。

2.2.3 阴性样品溶液 按处方比例制备不含知母的阴性样品,按“2.2.2.1”项下方法操作,即得。

2.2.4 提取率计算

$$E = \frac{VC}{0.0072} \times 100\%。$$

式中 E 为提取率(%),V 为滤液体积,C 为实测所得芒果苷浓度;0.007 2(即 0.72%)为本次实验用知母中芒果苷的平均含量。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 分别精密吸取标准品溶液、供试品溶液与阴性样品溶液按“2.1”项下色谱条件进行检测,结果见图 1。供试品溶液中待测成分色谱峰的分离度大于 1.5,阴性对照溶液在相应位置处未见色谱峰,方法专属性良好。

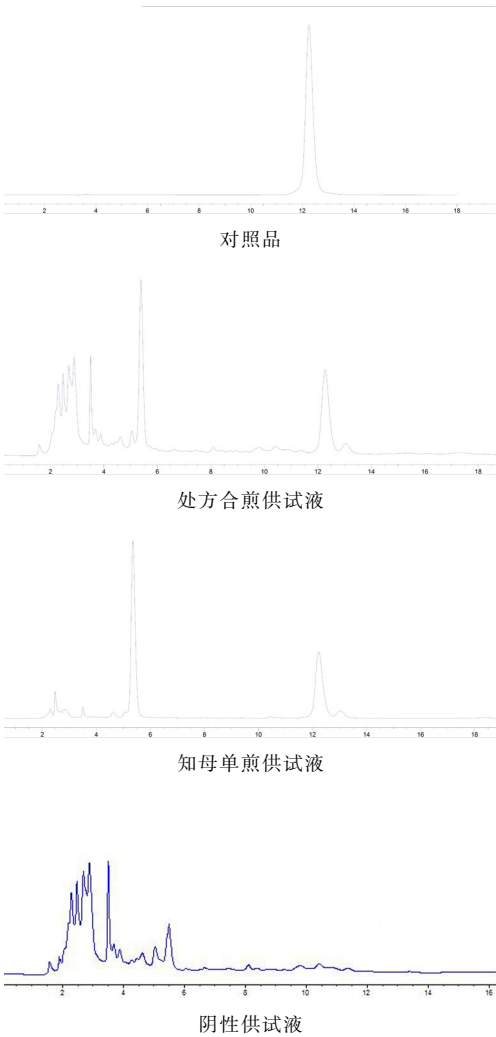


图1 芒果苷 HPLC 图

2.3.2 线性关系考察 芒果苷标准曲线绘制:精密吸取“2.2.1”项下芒果苷对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、2.5 mL 至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,分别吸取上述溶液 10 μ L,注入液相色谱仪,测定,以色谱峰面积(Y)为纵坐标,溶液浓度(X)为横坐标,得芒果苷回归方程 $Y=2\,115.5X-3.5$, $r=0.999\,6$,结果表明芒果苷在 1.22~61.0 μ g/mL 范围内呈良好的线性关系。

2.3.3 精密度试验 取上述对照品溶液连续进样 6 次,按“2.1”项下色谱条件进行检测,连续进样 6 次,计算芒果苷的峰面积,芒果苷峰面积的 RSD 为 0.57%,小于 3%,表明仪器精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 取知母样品溶液,分别在 0、2、4、8、16、24 h,按“2.1”项下色谱条件进行检测,进样 10 μ L,测定样品中芒果苷的峰面积,芒果苷峰面积的 RSD 为 0.76%。表明芒果苷峰面积在 24 h 内稳定。

2.3.5 重复性试验 精密称取知母复方用量药材 6 份,按照“2.2.2.1”项下方法,制备供试品溶液,在上述色谱条件下进行测定,并按标准曲线计算得芒果苷的含量,芒果苷含量的 RSD 为 1.34%,表明重复性良好。

2.3.6 加样回收率试验 精密称取知母复方用量药材各 6 份,每份加入相同浓度的对照品溶液,按照“2.2.2.1”项下方法,制备供试品溶液,在上述色谱条件下进行测定,计算加样回收率。芒果苷平均回收率为 100.4%, RSD 为 1.65%。

2.4 复方中成分组成对知母中芒果苷提取率的影响

2.4.1 拆方提取对知母中芒果苷提取率的影响 根据成分类别拆方提取,考察处方拆方配伍提取对芒果苷提取率的影响,具体结果如下表 1。

表 1 拆方提取($n=3$)

分组	中药组成	提取率/%
知母单煎	知母	97.33
整方合煎	知母、人参、丹参、桑白皮、地骨皮、甘草、橘红、天冬	47.03
知母-皂苷类中药	知母、人参、甘草、天冬	94.08
知母-酚酸类中药	知母、橘红、丹参	57.53
知母-碱基类中药	知母、地骨皮、桑白皮	34.31

处方拆方配伍提取芒果苷提取率由大到小顺序为:知母单煎>知母-皂苷类中药>知母-酚酸类中药>复方合煎>知母-碱基类中药。知母-碱基类中药对芒果苷提取率影响最大。

2.4.2 酸碱类药物对芒果苷提取率的影响 根据处方拆方结果,知母-酚酸类中药与知母-碱基类中药对芒果苷提取率影响较大,考察各单味中药对知母中芒果苷提取率的影响。具体结果如下表 2。

表 2 药对合煎提取($n=3$)

分组	中药组成	提取率/%
知母-酚酸类中药	知母、橘红	66.54
	知母、丹参	73.83
知母-碱基类中药	知母、桑白皮	36.51
	知母、地骨皮	50.18

处方药对配伍提取芒果苷提取率由大到小顺序为:知母-丹参>知母-橘红>知母-地骨皮>知母-桑白皮。桑白皮与知母合煎对芒果苷提取率影响最大。

2.4.3 桑白皮对知母中芒果苷提取率的影响 根据药对合煎试验结果,考察桑白皮中生物碱、DNJ、

氨基酸等^[3-4]对芒果苷提取率的影响。具体结果见表 3。

表 3 不同组分溶液对芒果苷提取率的影响($n=3$)

分组	提取率/%
桑白皮水煎液组	38.35
减除有机酸(氨基酸)组	31.44
减除生物碱(氨基酸)组	39.66
生物碱(氨基酸)溶液组	16.64
溶剂对照组	86.7
生物碱成分 DNJ 组	28.13
α -氨基酸组	40.75
β -氨基酸组	48.56

知母中芒果苷成分提取率由大到小顺序为:溶剂对照组> β -氨基酸组> α -氨基酸组>减除生物碱(氨基酸)组>桑白皮水煎液组>减除有机酸(氨基酸)组>生物碱成分 DNJ 组>生物碱(氨基酸)溶液组,桑白皮中总生物碱部位对知母中芒果苷提取率影响最大,其他类成分(如氨基酸类)对芒果苷提取存在一定的影响。

3 讨论

本研究中整方、拆方、药对等煎煮提取率测定时,对饮片采用四分法取样,并且排除药材吸水等因素的影响。拆方配伍煎煮提取率结果表明,知母与含碱基类中药配伍煎煮时对芒果苷的提取率影响最大;与含酚酸类中药配伍合煎时对芒果苷成分提取率影响次之;与含皂苷类中药配伍合煎时对芒果苷提取率没有明显影响。为了探究配方中各单味药对芒果苷提取率的影响,作者通过药对合煎发现桑白皮与知母合煎时芒果苷提取率下降最明显,其他药材与知母合煎对芒果苷提取率有一定的影响。为了进一步探究桑白皮中生物碱类、氨基酸类等成分对芒果苷提取率的影响原因,将桑白皮水煎液、桑白皮煎液经阴离子树脂吸附的流出液、桑白皮煎液经阳离子树脂吸附的流出液、桑白皮煎液经阳离子树脂吸附后氨水洗脱液(桑白皮生物碱部位)、桑白皮生物碱成分 DNJ 溶液、甘氨酸溶液、 β -丙氨酸溶液,分别与知母饮片合煎,检测芒果苷提取率,结果发现桑白皮总生物碱部位对知母中芒果苷的提取率影响最大,其代表性成分 DNJ 影响次之,氨基酸类也有一定影响,其中 α -氨基酸(甘氨酸)较 β -氨基酸(β -丙氨酸)影响更为明显。

缔合是指相同或不同分子之间依靠分子间作用

力(如配位键、氢键等)结合的现象,这一过程不引起共价键的改变,也不引起化学性质的改变^[5]。例如,水溶液中除了单个水分子之外还存在游离态水分子与缔合态水分子。中药溶液的组成远比水溶液复杂,成分与溶剂之间、不同溶质之间均会形成多样化的缔合分子,芒果苷^[6]为弱酸性成分,在一般中药复方水煎液中不能呈现为离子态,因此,其配伍提取率的影响可能与其形成缔合态相关。由于溶液配伍试验表明,DNJ 等溶液与知母煎液混合时并无沉淀析出,因此,DNJ 对芒果苷提取率的降低,不是因为形成的缔合物因沉淀而损失,可能缔合物的形成后影响了成分从植物组织向溶液的迁移,可能与芒果苷的缔合物分子量增大,影响了芒果苷缔合态透过植物组织而影响溶出。

目前在中药复方煎煮影响药效成分提取率的研究中,已经阐明的主要原因是提取过程中酸类成分与碱类成分产生了复盐沉淀,本文中性化合物形成缔合物而影响成分迁移的发现,为中药复方配伍现代研究提出了新的思路与研究方法,因此,中药复方配伍引起的成分增溶、减溶、理化性质变化,与溶液中成分存在状态如缔合物、复合物的相关性或规律性研究,对中药复方的临床汤药单煎、合煎及中药制剂的生产工艺制定具有重要意义。

参考文献:

- [1] 陈非.肺纤维化方剂配伍规律研究[D].南京:南京中医药大学, 2015.
- [2] CHEN F. Research on Pulmonary Fibrosis Herbal Law[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2015.
- [3] 杨海光,方莲花,杜冠华.芒果苷的药理作用研究进展[J].中国药理学通报,2016,32(1):5-8.
- [4] YANG HG, FANG LH, DU GH. Research progress of pharmacological effects of Mangiferin[J]. Chin Pharm Bull, 2016,32(1): 5-8.
- [5] 段志涛,高英,周刚.桑白皮药材的质量标准研究[J].中药材, 2013, 36(4):553-557.
- [6] DUAN ZT, GAO Y, ZHOU G. Study on quality standard for Mori cortex[J]. J Chin Med Mater, 2013, 36(4): 553-557.
- [7] ZHANG M, CHEN M, ZHANG HQ. Studies on the chemical constituents of the root bark of morus alba L[J]. Nat Prod Res Dev, 2010, 22(3): 416-418.
- [8] 彭国平.中药制药化学[M].北京:中国中医药出版社,2016:213.
- [9] PENG GP. Pharmaceutical Chemistry of Traditional[M]. Beijing: China press of traditional Chinese medicine,2016:213.
- [10] LIU R, LIU ZD, ZHANG C, et al. Nanostructured lipid carriers as novel ophthalmic delivery system for mangiferin: Improving in vivo ocular bioavailability[J]. J Pharm Sci, 2012, 101(10): 3833-3844.

(编辑:董宇)