

• 实验研究 •

饮片粒度对大黄药材蒽醌及鞣质类成分煎出量的影响

周灿平^{1,2} 王伽伯¹ 肖小河¹ 夏新华² 张学儒^{1,2} 赵海平¹

中药剂量—效应关系 (Dose-effect relationship) 研究是保证中医药临床疗效的基础和前提。然而, 中药剂量不仅仅是一个药材用量问题, 药材品质 (品种^[1]、产地^[2]、商品规格等级等)、调剂学处理 (饮片粒度大小、煎煮时间等) 均可能影响中药剂量的准确性, 进而影响临床疗效的发挥。饮片是中药临床应用的主要形式, 随着中药现代化的推进, 各种新型饮片逐渐出现, 如日本药店几乎全为黄豆至花生米样大小的颗粒饮片, 我国南方也开始广泛应用颗粒清洁饮片, 湖南还研制开发了超微饮片。新型饮片的大小规格与传统饮片往往不同, 相同煎煮条件下, 疗效可能不尽相同。为此, 本文以药效物质基本清楚的大黄为研究对象, 考察 8 种不同粒度规格大黄饮片水提后总蒽醌、总结合蒽醌、总鞣质及其 5 种蒽醌衍生物的煎出量差异, 从饮片粒度规格角度探讨影响中药量-效关系的可能因素, 同时为实际应用中饮片加工适宜粒度的选择提供依据。

1 试药与仪器

1.1 试药

大黄饮片由解放军第三〇二医院中药房提供, 为药用大黄, 产地四川。超微粉由北京环亚天园有限责任公司协助加工。对照品大黄素、大黄酚、大黄酸、大黄素甲醚、芦荟大黄素、没食子酸购自中国药品生物制品检定所 (批号分别为 110795-200505、110796-200716、110757-200206、110758-200610、110799-200806、110725-200608), 甲醇 (分析纯及色谱纯, 由北京泰博昌生物技术有限公司提供)。其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器

Waters Acquity UPLCTM 超高效液相色谱仪 (Waters, Milford, MA, USA), Cary50 Bio 紫外分光光度计 (Varian Australia PTY LTD), LD4-2 离心机 (北京医用离心机厂)。

2 方法

2.1 药材粉碎

取等量大黄饮片 8 份粉碎, 分别控制粒度为: 3.0~4.0cm (市售大块饮片: 3)、1.5~2.5cm (约蚕豆大: 1.5)、0.8~1.2cm (约黄豆大: 0.8)、850 μm (粗粉: c)、250 μm (中粉: z)、150 μm (细粉: x)、 $D_{90}<35\mu\text{m}$ (过 500 目: 500)、 $D_{90}<15\mu\text{m}$ (过 1000 目: 1000), 备用。500 和 1000 目超微粉由北京环亚天园有限公司协助加工。

2.2 大黄水提样品制备

分别准确称取上述 8 种粒度的大黄饮片各 50 g, 加去离子水回流提取两次, 每次 500ml, 回流 30min, 两次提取液分别浓缩, 真空干燥成粉末, 密封保存。

2.3 大黄水提样品总蒽醌、结合蒽醌、鞣质含量测定

2.3.1 大黄素对照品制备、标准曲线测定 精密称取 60℃减压干燥至恒重的大黄素对照品 12.5mg, 置 100ml 量瓶中, 加 0.8%醋酸镁甲醇溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得大黄素对照品溶液 (125 $\mu\text{g/ml}$)。取 0.4ml 加 0.8%醋酸镁甲醇溶液至 10ml 容量瓶, 以 0.8%醋酸镁甲醇溶液稀释至刻度, 摇匀, 以 0.8%醋酸镁甲醇

溶液为空白, 从 200~800nm 扫描, 结果表明 510nm 特征峰为样品测定峰。标准曲线测定: 准确量取上述对照品溶液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 10ml, 分别置 25ml 量瓶中, 以 0.8%醋酸镁甲醇溶液稀释至刻度, 得到系列浓度 C 的标准溶液。以 0.8%醋酸镁甲醇溶液为空白, 510nm 波长处测定吸收度 A, 计算回归方程为: $C=22.543A-0.1715$, $r=0.9999$ 。结果表明, 大黄素在 5~50.00 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度范围内具有良好的线性关系。

2.3.2 大黄水提样品总蒽醌 (Total anthraquinones, Ta) 测定 参照文献[3], 精密称取大黄水提物约 20mg, 加 8%盐酸溶液 10ml, 超声处理 2min, 再加三氯甲烷 15ml, 加热回流 1h, 放冷, 置分液漏斗中, 用少量三氯甲烷洗涤容器, 并入分液漏斗中, 分取三氯甲烷层, 酸液再用三氯甲烷提取 3 次, 至三氯甲烷无色, 每次 10ml, 合并三氯甲烷液, 减压回收溶剂至干, 残渣加适量 0.5%醋酸镁甲醇溶液使溶解, 转移至 50ml 量瓶中, 稀释至刻度, 摇匀, 以 0.8%醋酸镁甲醇溶液为空白, 采用 UV-VIS 分光光度法于 510nm 波长处测定吸收度。

2.3.3 大黄水提样品总结合蒽醌 (Total anthraquinone glycosides, Tg) 测定 精密称取大黄水提物约 20mg, 加蒸馏水 10ml, 其余按 2.3.2 项下“再加三氯甲烷 15ml, 加热回流 1h”起同法操作, 测得游离型蒽醌的含量。以总蒽醌含量减去游离型蒽醌含量即得结合型蒽醌的含量。

2.3.3 大黄水提样品总鞣质 (Tannins, Ts) 测定 精密称取大黄水提物约 15mg, 加蒸馏水 15ml, 超声 30min, 放冷, 用水稀释至刻度, 摇匀, 静置 (使固体物沉淀), 过滤, 初滤液 5ml 弃去, 收集续滤液即得。总酚: 精密量取供试品溶液 2ml, 置 25ml 棕色量瓶中, 其余按药典操作^[4]。不被吸附的多酚: 精密量取供试品溶液 12.5ml, 加至已有干酪素 0.3g 的 50ml 具塞锥形瓶中, 其余按药典操作。鞣质含量=总酚量-不被吸附的多酚量。

2.4 大黄 5 种蒽醌衍生物的 UPLC 含量测定

2.4.1 对照品溶液的制备 分别精密称取大黄素等 5 种对照品适量, 加甲醇分别制成每 1ml 含芦荟大黄素、大黄素、大黄酚各 80 μg , 大黄酸、大黄素甲醚 20 μg 的储备液, 该储备液在 4℃避光冷藏可稳定保存 2 个月以上。分别精密量取上述对照品储备液适量, 置于同一量瓶中, 加入甲醇溶解并稀释至刻度, 混匀, 即得 (1ml 中含芦荟大黄素 Aloe-emodin、大黄酸 Rhein、大黄素 Emodin、大黄酚 Chrysophanol、大黄素甲醚 Physcin 各 3 μg)。

2.4.2 供试品溶液的制备 取大黄样品粉末适量, 精密称定, 加 8%盐酸溶液 15ml, 超声处理 2min, 再加三氯甲烷 15ml, 加热回流 1h, 放冷, 置分液漏斗中, 用少量三氯甲烷洗涤容器, 并入分液漏斗中, 分取三氯甲烷层, 酸液再用三氯甲烷提取 3 次, 每次 10ml, 合并三氯甲烷液, 减压回收溶剂至干, 残渣加甲醇使溶解, 转移至 10ml 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 过 0.22 μm 滤膜, 即得。

2.4.3 色谱条件及测定法 Waters Acquity BEH C18 色谱柱

(50mm×2.1mm,1.7μm), 流速 0.75ml/min; 检测波长 254nm^[5]; 进样量 5μl; 柱温 35℃。以甲醇-0.1%磷酸水溶液 (62: 38) 为流动相。

2.5 统计学处理

应用 SPSS13.0 统计软件建立数据库并进行总蒽醌、结合蒽醌、游离蒽醌、总鞣质、得膏率、五种蒽醌衍生物总量与粒度规格多元相关分析, 考察各观测指标与粒度规格是否具有线性相关关系; 再对总蒽醌、结合蒽醌、总鞣质及五种蒽醌单体 8 个指标做主成分分析, 提取主成分, 从多指标角度对不同粒度规格大黄进行综合评价。

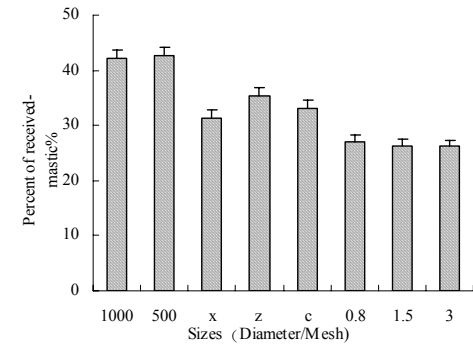


图 1 大黄 8 种饮片粒度得膏率图

3 结果

3.1 得膏率及煎出量变化结果

大黄水提样品得膏率 (Percent of received-mastic) 变化总体趋势是随饮片粒度减少大黄得膏率逐渐增加, 如图 1; 大黄水提样品总蒽醌煎出量变化趋势为从 3~4cm (大饮片) 逐渐减小到 0.8~1.2cm (黄豆大小) 时, 总蒽醌的煎出量逐渐增大, 粗、中、细粉总蒽醌的煎出量相对减少, 当粉碎到超微粉时, 总蒽醌煎出量随粒度减小逐渐增加; 总结合型蒽醌及鞣质煎出量变化规律也与总蒽醌相似, 如图 2。

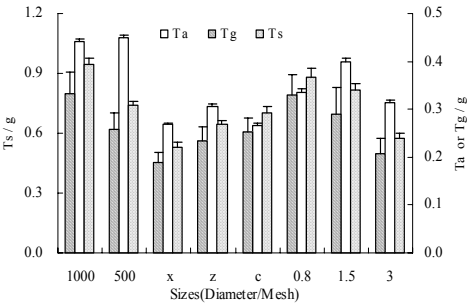


图 2 大黄 8 种饮片粒度总鞣质、总蒽醌、总结合蒽醌煎出量图

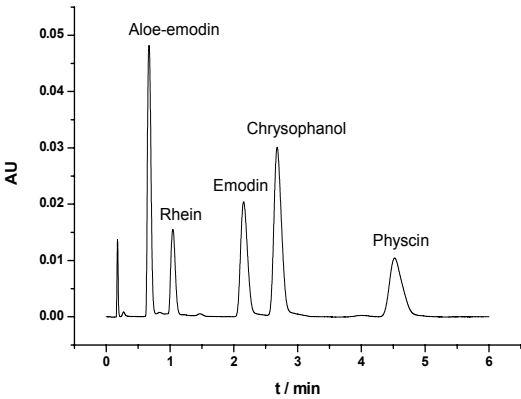


图 3 大黄混标 UPLC 含量测定色谱图

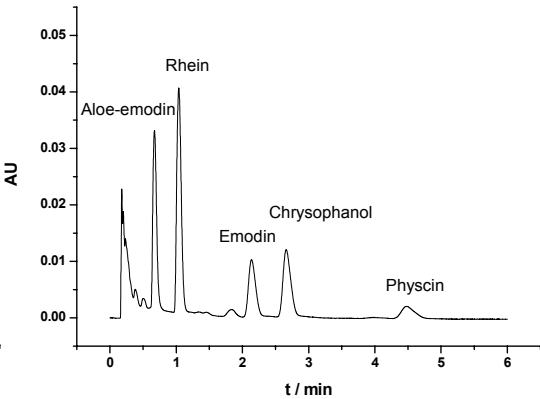


图 4 大黄样品 UPLC 含量测定色谱图

表 1 大黄八种饮片粒度 5 种蒽醌衍生物煎出量表 (mg, $\bar{x} \pm s$)

饮片规格	Sum of Five anthraquinone derivatives	Aloe-emodin	Rhein	Emodin	Chrysophanol	Physcin
1000 目	120.51±6.03	27.18±1.36	47.02±2.35	16.29±0.81	24.28±1.21	5.73±0.29
500 目	127.56±6.38	25.61±1.28	46.84±1.87	19.39±0.97	28.6±1.43	7.121±0.36
细粉	99.93±3.00	19.94±0.60	34.46±1.03	13.80±0.41	26.10±0.78	5.614±0.17
中粉	131.69±4.61	25.7±0.90	51.00±1.78	16.11±0.56	32.78±1.15	6.097±0.21
粗粉	134.22±6.71	25.59±1.28	44.84±1.57	17.60±0.88	39.15±1.96	7.046±0.35
0.8~1.2cm	156.00±6.24	34.58±1.38	59.9±2.40	22.48±0.94	30.07±1.23	8.972±0.36
1.5~2.5cm	156.21±6.25	32.01±1.28	56.65±2.27	21.20±0.85	38.63±1.55	7.723±0.31
3~4cm	110.86±5.54	21.18±1.06	36.97±1.77	16.98±0.85	29.81±1.49	5.922±0.30

3.2 统计分析结果

3.2.1 多元线性相关分析 运用多元相关分析法得出粒度规格与总蒽醌、总结合蒽醌、游离蒽醌、总鞣质、得膏率的偏相关系数 r 和 P 值如下:

可以看出总蒽醌、总结合蒽醌、游离蒽醌、总鞣质、五种蒽醌衍生物煎出量与饮片粒度间没有明显线性相关关系, 而得膏率 ($P<0.05$) 与粒度呈负相关, 即饮片粒度越小得膏率越大。

表 2 偏相关系数 r 与 P 值

变量	r	P
总蒽醌	-0.213	0.613
总结合蒽醌	-0.152	0.712
游离蒽醌	-0.458	0.254
总鞣质	-0.392	0.337
5 种蒽醌衍生物	-0.268	0.521
得膏率	-0.909	0.002

3.2.2 主成分分析 对变量总蒽醌、总结合蒽醌、总鞣质、五种蒽醌衍生物单体(芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚)煎出量采用主成分分析法提取主成分,共提取两个主成分,累积贡献率达 86.84%,能够代表原 8 个指标大部分信息。主成分(principle factor, PF)表达式为: $PF1=0.165X1(\text{总蒽醌})+0.170X2(\text{结合蒽醌})+0.099X3(\text{总鞣质})+0.186X4(\text{芦荟大黄素})+0.178X5(\text{大黄酸})+0.171X6(\text{大黄素})+0.055X7(\text{大黄酚})+0.160X8(\text{大黄素甲醚})$; $PF2=-0.245X1(\text{总蒽醌})-0.210X2(\text{结合蒽醌})-0.406X3(\text{总鞣质})+0.062X4(\text{芦荟大黄素})+0.087X5(\text{大黄酸})+0.146X6(\text{大黄素})+0.483X7(\text{大黄酚})+0.237X8(\text{大黄素甲醚})$

主成分表达式中各变量前的相关系数正负和大小反映了该指标与主成分之间的相关性方向及大小^[6]。就本实验而言,指标成分的系数越大,说明该指标受粒度规格影响越敏感,对粒度规格的代表性越强。从主成分表达式可看出,PF1 主成分与总蒽醌、结合蒽醌、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄素甲醚关系较密切,其中,芦荟大黄素是受粒度规格变化最敏感的单体成分;PF2 与总鞣质、大黄酚关系较密切。

4 讨论

中药的剂量问题与西药不同,不仅仅是药材用量问题,药材品种、品质因素以及调剂学处理方法等,均会对中药剂量的准确性产生影响,因而影响中药量-效关系的重现性。相关文献已报道了提取工艺对大黄药效成分煎出量的影响,如干燥方式和条件对大黄蒽醌和鞣质成分含量的影响^[7],正交试验法研究水提与醇提对大黄蒽醌提取率的影响^[8],以及煎煮时间对生大黄中五种游离蒽醌的影响等^[9]等,对比不同研究者结果,结论各不相同,如有报道大黄水提 1h 药效成分煎出最高,但有报道为沸腾 20min 后蒽醌类衍生物溶出已达最高;有报道认为大黄醇提 2h 最好,但有报道醇提 2h 后结合型蒽醌已严重破坏;有报道认为 70%乙醇提取率最高^[10],也有报道认为是 80%的乙醇;有报道认为乙醇应用渗漉法提取^[11],但有报道认为回流提取优于渗漉提取等等,究其原因,可能与不同研究者使用不同粒度的大黄原材料有关。因此,考察不同饮片粒度大小对药效成分溶出量的影响,从饮片粒度规格角度探讨影响中药量-效关系的可能因素具有重要理论和现实意义。

本研究发现,大黄饮片粒度从 3~4cm(市售大块饮片)逐渐减小到超微粉时,煎出的化学成分量呈先增后减再增加的变化趋势。从理论上分析,不同饮片粒度大黄在提取时,化学成分的煎出量受扩散和吸附两个作用的相互影响,当扩散作用大于吸附作用时,各成分煎出量增加,而当吸附作用大于扩散作用时,各成分煎出量减少。

多元相关分析结果表明,煎出量与饮片粒度间没有明显线性相关关系,但得膏率与粒度规格成负相关,即饮片粒度越小,得膏率越高;主成分分析结果表明,PF1 与总蒽醌、结合蒽醌、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄素甲醚均有关,其中芦荟大黄素与 PF1 的相关性最大,是最敏感的单体成分;PF2 与总鞣质、大黄酚有关。

根据本文结果,超微粉碎后大黄药材有效成分的煎出量最高,但超微粉碎工艺复杂成本昂贵,粉末收率偏低,且由于粉末过细可能存在易吸潮不易保存^[12-13]等缺点;从经济性角度考虑,大黄饮片粉碎至 1cm 左右较为合适,有效成分煎出量和药材利用率均较高,其用量只需要市售传统饮片的 70%即可达到相当的煎出量,有效节约药材资源,同时加工简单易行。与传统大块饮片相比,小颗粒饮片还具有均一性好的优势,有利于保证临床调剂的准确性。

参考文献

- [1]Katsuko KOMATSU, Yoriobu,et al.Comparative Study of Chemical Constituents of Rhubarb from Different Origins Chem. Pharm[J]. Bull, 54(11), 1491-1499.
- [2] Katsuko KOMATSU, Yoriobu,et al.Development of a High Performance Liquid Chromatographic Method for Systematic Quantitative Analysis of Chemical Constituents in Rhubarb. Chem. Pharm[J]. Bull, 54(7): 941-947 .
- [3]孙玉琦.大黄炮制与配伍的化学变化及生物活性表征[D].中国人民解放军军事医学科学院,2006:5-18.
- [4]国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:化学工业出版社,2005.
- [5] JiaboWang,Huifang Li.Cheng Jin et al. Development and validation of a UPLC method for quality control of rhubarb-based medicine: Fast simultaneous determination of five anthraquinone derivatives[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008,47:765 - 770.
- [6]姚魁武,王阶,武继涛,等.血瘀证量化诊断流行病学调查数据的主成分分析[J]. 辽宁中医杂志,2009,36(1):30-32.
- [7]王强,罗云,金城,等.干燥方式和条件对大黄水提液蒽醌和鞣质成分含量的影响[J].中国中药杂志,200,338(8): 893-896.
- [8]黄园,徐雄良,张志荣,等.正交试验法研究水提与醇提对大黄蒽醌提取率的影响[J].中成药,2003,25(4):273-276.
- [9]刘永涛,张红,葛尔宁.煎煮时间对生大黄中五种游离蒽醌的影响[J].浙江中医药大学学报,2008,32(5):670-672.
- [10]彭红英,周晓源.单因素试验法优选大黄醇提工艺研究[J].农垦医学,2006,28(3):180-182.
- [11]杨金玲.大黄主要成分提取工艺研究[J]. 2008,27(2): 124-126.
- [12]李雅,杨永华,蔡光先.超微粉碎技术对黄芩药材主要化学成分提取率的影响[J].中成药,2008,30(2):229-231.
- [13]应杏秋,朱心强.超微颗粒毒性研究进展[J].国外医学卫生学分册,2005,32(1):6-10.
- 1 中国人民解放军第三〇二医院全军中药研究所(100039);
- 2 湖南中医药大学药学院