

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.17.002

黄芪桂枝五物汤中黄芪、桂枝和白芍的煎煮动力学研究*

林美^{1,2}, 余爱明¹, 沈晓¹, 孟英姣¹, 郑华珠¹, 王利胜^{1△}

(1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006; 2. 广州市医药职业学校, 广东 广州 510430)

摘要:目的 建立黄芪桂枝五物汤中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芍药苷和桂皮醛的煎煮动力学模型。方法 定时取黄芪桂枝五物汤煎煮液, 采用高效液相色谱法测定煎煮液中各成分的含量, 作溶出率-时间曲线, 采用 Datafit 9.1 软件进行模型拟合, 以不同取样时间点测得的溶出率验证模型。结果 建立了第1次煎煮及复煎过程中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、桂皮醛和芍药苷溶出率与时间的动力学方程, 相关系数(r)均大于0.95; 预测值和实测值的相对偏差在10.00%以内。结论 该模型能较好地反映黄芪桂枝五物汤煎煮过程中各有效成分溶出率-时间的关系, 可为临床用药煎煮时间提供参考。

关键词: 黄芪桂枝五物汤; 动力学模型; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 桂皮醛; 芍药苷

中图分类号: R283.3; R282.71

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2018)17-0007-04

Study on Decocting Kinetics of *Astragalus Mongholicus*, *Cinnamomum Cassia* and *Paeonia Lactiflora* in Huangqi Guizhi Wuwu Decoction

Lin Mei^{1,2}, Yu Aiming¹, Shen Xiao¹, Meng Yingjiao¹, Zheng Huazhu¹, Wang Lisheng¹

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, China 510006; 2. Guangzhou Medical Vocational School, Guangzhou, Guangdong, China 510430)

Abstract: Objective To establish a decocting kinetic model for calycosin glycoside, innamaldehyde and paeoniflorin of Huangqi Guizhi Wuwu Decoction. **Methods** Part of the decoction was taken out regularly when extracting Huangqi Guizhi Wuwu Decoction and various components in the decoction was determined by HPLC. Dissolution rate-time curve was taken and Datafit 9.1 software was used for model fitting. The model was verified by the dissolution rate measured at different sampling time points. **Results** The kinetic equations of the dissolution rate and time of calycosin glycoside, innamaldehyde and paeoniflorin in the first and second decoction process were established. The correlation coefficient(r) were all greater than 0.95 and the relative deviations between the predicted value and the measured value were within 10.00%. **Conclusion** The established model can better reflect the relationship between the dissolution rate of each active ingredient and the time during the boiling process of Huangqi Guizhi Wuwu Decoction, which can provide a reference for decocting time in clinical use.

Key words: Huangqi Guizhi Wuwu Decoction; kinetic model; calycosin glycoside; innamaldehyde; paeoniflorin

黄芪桂枝五物汤出自张仲景《金匮要略》,由黄芪、桂枝、芍药、生姜和大枣组方,在中医辨证的基础上可加减运用于风湿骨病、糖尿病并发症、中风后遗症、冠状动脉粥样硬化性心脏病、胃病、皮肤病,以及妇科、儿科等疾病^[1-2]。方中黄芪为君药,桂枝、白芍为臣药,主要有效成分有毛蕊异黄酮葡萄糖苷^[3]、桂皮醛^[4]和芍药苷^[5]。临床多用水煎剂,影响有效成分煎出的是煎煮时间,但临床关于煎煮时间长短的说法较笼统。各成分协调作用保证疗效,但各成分的化学性质不同,故煎煮时间会影响有效成分的含量及比例,从而影响疗效^[6-7]。本研究中探讨了第1次煎煮和复煎过程黄芪桂枝五物汤中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、桂皮醛和芍药苷溶出率-时间的关系,同时建立了动力学方程,为临床用药和制剂工艺研究提供了依据。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

SKM 型数显恒温电热套(山东鄞城光明仪器有限

公司);高效液相色谱仪,包括 P680 型二元泵,ASI-100 型自动进样器,DAD-3000 型检测器,变色龙色谱工作站(美国戴安公司);AMW120D 型电子天平(十万分之一,日本岛津公司)。

1.2 试药

黄芪 *Astragalus mongholicus* Bunge., 桂枝 *Cinnamomum cassia* Presl, 白芍 *Paeonia lactiflora* Pall., 生姜 *Zingiber officinale* Rosc., 大枣 *Ziziphus jujuba* Mill., 均为市售品,经广州中医药大学中药学院张丹雁教授鉴定为正品;毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品(成都普菲德生物技术有限公司,纯度 $\geq 98\%$,批号为 170502);芍药苷对照品(成都克洛玛生物技术有限公司,纯度 $\geq 98\%$,批号为 CHB161227);桂皮醛对照品(成都克洛玛生物技术有限公司,纯度 $\geq 98\%$,批号为 CHB171009)。乙腈(迪马科技有限公司,色谱纯);甲酸(科密欧化学试剂有限公司,色谱纯);超纯水(广州中医药大学自制);其他试剂均为分析纯。

*基金项目:国家自然科学基金面上项目[81573872]。

第一作者:林美,硕士研究生在读,研究方向为药物制剂新剂型与新技术,(电子信箱)564722921@qq.com。

△通信作者:王利胜,博士研究生,教授,研究方向为药物制剂新剂型与新技术,(电子信箱)wlis68@126.com。

2 方法与结果

2.1 各有效成分的总含量测定

按照 2015 年版《中国药典(一部)》黄芪、桂枝和白芍的有效成分毛蕊异黄酮葡萄糖苷、桂皮醛和芍药苷规定方法进行提取和含量测定,结果 3 种成分的含量分别为 0.45%, 2.68%, 7.19%, 均符合药典要求。

2.2 煎煮过程各有效成分含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱: Uranus C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 柱温: 室温; 流动相: 乙腈(A) - 0.2% 甲酸(B), 梯度洗脱(0 ~ 20 min 时 20% A → 40% A, 20 ~ 30 min 时 40% A); 流速: 1 mL/min; 检测波长: 285 nm; 进样量: 10 μL。

2.2.2 方法学考察

标准曲线制备: 取毛蕊异黄酮葡萄糖苷、桂皮醛和芍药苷对照品适量, 精密称取, 加甲醇溶解定容至 2 mL 容量瓶中, 得质量浓度分别为 0.580, 2.665, 1.070 g/L 的贮备液, 分别精密吸取系列贮备液适量, 置 10 mL 容量瓶中, 甲醇定容, 得系列梯度溶液。按拟订色谱条件进行测定, 以峰面积(Y)为纵坐标、质量浓度(X)为横坐标绘制标准曲线, 得毛蕊异黄酮葡萄糖苷、桂皮醛、芍药苷回归方程分别为 $Y = 0.281X + 0.1395$ ($r = 0.9999$),

$Y = 0.6491X + 48.818$ ($r = 0.9990$), $Y = 0.009X + 0.0298$ ($r = 0.9999$); 线性范围分别为 5.02 ~ 150.51 μg/mL, 53.30 ~ 1066.00 μg/mL, 26.48 ~ 794.48 μg/mL。

精密密度试验: 取中间质量浓度的混合对照品溶液, 按拟订色谱条件连续测定 6 次。结果毛蕊异黄酮葡萄糖苷、桂皮醛和芍药苷峰面积的 RSD 分别为 1.10%, 1.08%, 1.25% ($n = 6$), 表明仪器精密密度良好。

重复性试验: 取同一批样品, 煎煮过程中于同一时间平行取样 6 份, 制备供试品溶液, 依法测定。结果毛蕊异黄酮葡萄糖苷、桂皮醛和芍药苷含量的 RSD 分别为 4.64%, 0.40%, 4.14% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

稳定性试验: 取同一供试品溶液适量, 于 4 ℃ 保存, 分别于 0, 1, 2, 4, 6, 8 h 时测定。结果毛蕊异黄酮葡萄糖苷、桂皮醛和芍药苷含量的 RSD 分别为 4.07%, 0.17%, 1.28% ($n = 6$), 表明供试品溶液在 4 ℃ 保存 8 h 内稳定。

加样回收试验: 取已知含量有效成分的供试品 0.5 mL, 共 6 份, 分别精密加入适量毛蕊异黄酮葡萄糖苷、桂皮醛、芍药苷对照品溶液, 纯水定容至 2 mL, 进样分析, 计算回收率。结果见表 1。

表 1 黄芪桂枝五物汤中 3 种有效成分的加样回收试验结果 ($n = 6$)

样品含量(μg)			加入量(μg)			测得量(μg)			回收率(%)			$\bar{X}$ (%)			RSD(%)		
A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
2.686	140.802	203.317	2.668	141.245	203.300	5.303	278.771	403.892	98.09	97.68	98.66						
2.686	140.802	203.317	2.668	141.245	203.300	5.291	277.018	399.908	97.65	96.44	96.70						
2.686	140.802	203.317	2.668	141.245	203.300	5.310	279.730	402.225	98.34	98.36	97.84	98.77	97.95	97.77	1.23	1.49	1.11
2.686	140.802	203.317	2.668	141.245	203.300	5.383	278.106	403.201	101.02	97.21	98.32						
2.686	140.802	203.317	2.668	141.245	203.300	5.316	282.950	404.299	98.57	100.64	98.86						
2.686	140.802	203.317	2.668	141.245	203.300	5.324	278.304	398.912	98.89	97.35	96.21						

注: A 为毛蕊异黄酮葡萄糖苷, B 为桂皮醛, C 为芍药苷。表 2、表 3 及图 1 同。

2.3 煎煮过程各有效成分的动力学模型研究

2.3.1 绘制溶出度曲线

称取处方量药材(组方: 黄芪 9 g, 桂枝 9 g, 白芍 9 g, 生姜 18 g, 大枣 4 枚), 置 1 000 mL 三口烧瓶中, 加入 10 倍量纯水, 浸泡 2 h, 回流提取, 从沸腾开始计时, 煎煮 2 h, 过滤, 滤渣加入 8 倍量纯水, 复煎 2 h。2 次煎煮过程中, 定时取煎煮液 1 mL, 分别于 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120 min 时取样, 取样后补加等量同温度的纯水, 继续煎煮。煎煮液于 3 000 r/min 转速下离心 10 min, 取上清液, 过 0.22 μm 滤膜, 按拟订色谱条件测定含量, 计算溶出率[溶出率 = (煎煮液中有效成分的量/有效成分总量) × 100%]。平行重复试验 3 次, 以平均溶出率绘制溶出率曲线, 详见图 1。

可见, 2 次煎煮过程中, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芍

药苷的累积溶出率总体随时间增加而增加, 煎煮时间越长, 溶出越多。毛蕊异黄酮葡萄糖苷最大溶出率分别为 15.18% 和 1.41%, 2 次煎煮最大累积溶出率为 16.59%, 说明毛蕊异黄酮葡萄糖苷在水中不易溶出; 芍药苷最大溶出率分别为 51.94% 和 5.55%, 其溶出规律与毛蕊异黄酮葡萄糖苷相似, 煎煮过程中含量不断波动, 可能是由于苷类物质在加热过程中分解成苷元, 导致含量减少, 之后成分溶出的增加占主导作用, 含量增大, 提示苷类物质需要较长的煎煮时间, 以保证有效成分的溶出。2 次煎煮过程中, 桂皮醛的溶出率随着时间的增加, 先增大后减少。第 1 次煎煮时, 30 min 内桂皮醛含量增加了近 30%, 达到 82.46%, 提示桂皮醛在水煎煮过程中能迅速溶出, 且溶出较充分, 30 min 后含量开始不断降低, 提示桂枝不适宜长时间煎煮。

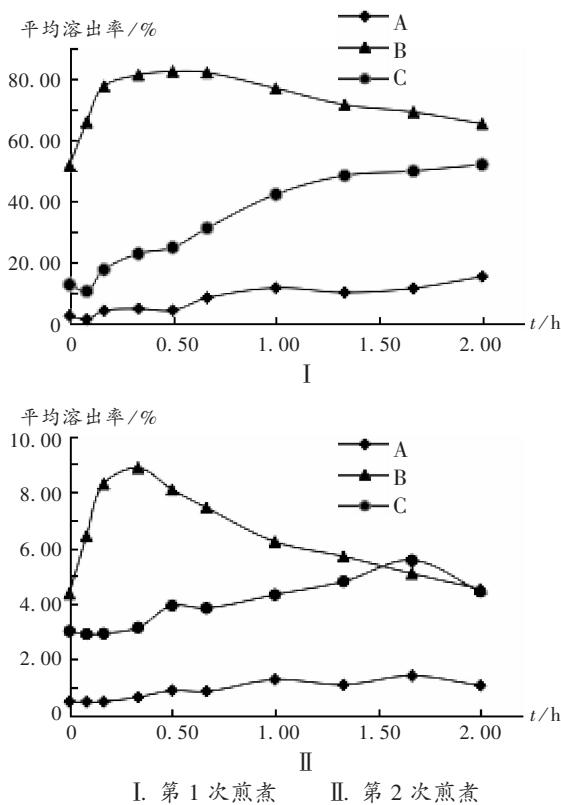


图1 煎煮过程中各有效成分的溶出率变化

2.3.2 建立动力学方程

采用 Datafit 9.1 软件,以时间(t)为自变量、溶出率(Q)为因变量进行拟合,得出溶出率曲线的拟合方程,并采用相关系数(r)和 P 评价方程拟合度。 r 越接近 1, $P < 0.05$ 说明拟合度越好。结果见表 2。可见,各模型的相关系数(r)均大于 0.95,且 $P > 0.05$,说明建立的模型能较好地反映第 1 次煎煮及第 2 次煎煮过程中 3 种有效成分溶出率-时间的关系。

表2 煎煮过程中 3 种有效成分溶出率模型拟合结果

煎煮	成分	拟合方程	r	F 值	P
第 1 次	A	$Q = -8.26 - 8.63 X^{2.5} + 9.71 \exp(X)$	0.965 3	47.846 8	<0.05
	B	$Q = 51.72 - 47.90 X + 75.44 X^{0.5}$	0.968 2	52.535 2	<0.05
	C	$Q = 16.97 + 41.09 X - 6.45 \exp(X)$	0.990 6	293.179 6	<0.05
第 2 次	A	$Q = 0.45 + 1.17 X^{1.5} - 0.47 X^{2.5}$	0.957 3	38.370 8	<0.05
	B	$Q = -2.50 X^6 + 21.97 X^5 - 74.98 X^4 + 125.37 X^3 - 105.18 X^2 + 37.27 X + 4.26$	0.996 5	72.096 1	<0.05
	C	$Q = 2.83 + 2.79 X^{1.5} - 1.07 X^{2.5}$	0.957 0	38.072 3	<0.05

2.3.3 验证动力学模型

称取处方量药材,置 1 000 mL 三口烧瓶中,加入 10 倍量纯水,浸泡 2 h 后回流提取,从沸腾开始计时,煎煮 2 h,过滤,滤渣加入 8 倍量纯水,复煎 2 h。2 次煎煮过程中,定时取煎煮液 1 mL,取样时间分别为 6,12,25,42,60,84,114 min,取样后补加等量同温度的纯水,继续煎煮。煎煮液于 3 000 r/min 转速下离心 10 min,取

上清液,过 0.22 μm 滤膜,按拟订色谱条件测定含量,平行重复试验 3 次,计算平均溶出率。结果见表 3。比较模型预测值与实测值,第 1 次和第 2 次煎煮过程中各取样时间、实测溶出率和预测溶出率的相对偏差不超过 10.00%,表明该模型能较好地反映煎煮过程中 3 种有效成分溶出率的变化过程。

表3 煎煮过程 3 种有效成分溶出率模型实测值和预测值比较结果(%)

成分	时间 (h)	第 1 次煎煮			第 2 次煎煮		
		实测值	预测值	相对偏差	实测值	预测值	相对偏差
A	0.10	2.29	2.44	6.62	0.54	0.49	-8.82
	0.20	3.07	2.82	-8.12	0.61	0.55	-10.18
	0.42	6.11	5.50	-9.90	0.67	0.72	6.37
	0.70	7.23	7.76	7.33	1.01	0.95	-6.38
	1.00	8.88	9.51	7.09	1.21	1.15	-4.42
	1.40	12.32	11.10	-9.86	1.40	1.30	-7.34
	1.90	12.69	13.72	8.07	1.08	1.17	8.15
	1.90	71.90	64.73	-9.97	4.16	4.60	10.77
B	0.10	68.82	70.79	2.86	6.99	7.05	0.89
	0.20	83.07	75.88	-8.66	9.28	8.39	-9.59
	0.42	87.91	80.46	-8.47	9.49	8.60	-9.42
	0.70	83.15	81.32	-2.20	8.01	7.21	-10.06
	1.00	82.08	79.28	-3.42	6.39	6.21	-2.93
	1.40	74.75	73.95	-1.07	5.88	5.60	-4.70
	1.90	71.90	64.73	-9.97	4.16	4.60	10.77
	1.90	47.48	51.95	9.42	5.34	4.82	-9.61
C	0.10	14.92	13.95	-6.51	2.70	2.92	8.27
	0.20	16.43	17.31	5.37	3.40	3.06	-9.98
	0.42	25.18	24.31	-3.43	3.16	3.46	9.59
	0.70	30.93	32.75	5.87	3.70	4.03	9.00
	1.00	38.56	40.54	5.14	4.32	4.55	5.30
	1.40	44.80	48.36	7.94	4.55	4.98	9.43
	1.90	47.48	51.95	9.42	5.34	4.82	-9.61
	1.90	47.48	51.95	9.42	5.34	4.82	-9.61

3 讨论

中药汤剂多为复方,且所含化学成分复杂,在煎煮过程中可能会发生复杂的物理化学变化,不同成分的溶出比例随时间而改变,从而影响疗效或产生毒副作用。黄芪桂枝五物汤有抗炎镇痛、增强免疫、保护脑血管、改善脑代谢、减少脑损伤后遗症等作用^[8],其中的毛蕊异黄酮葡萄糖苷和黄芪甲苷都有增强免疫和改善心脑血管的功能^[9]。本研究中,毛蕊异黄酮葡萄糖苷溶出率较低,黄芪甲苷在黄芪桂枝五物汤煎煮过程中溶出较多^[10],提示黄芪桂枝五物汤中起主要作用的是黄芪甲苷,而非毛蕊异黄酮葡萄糖苷。桂皮醛有抗炎和神经保护作用^[11],由图 1 可知,桂皮醛在水煎液中溶出较多,但煎煮 30 min 后,桂皮醛的含量逐渐减少,可能是煎煮过程中随水蒸气挥发和被空气氧化所致。2 次水煎液同一成分的溶出率相差 10 倍左右,说明汤剂煎煮 2 次,取 2 次煎液混合后服用是有必要的,否则可能会影响血药浓度。