

莪术单煎及与三棱合煎后挥发油中有效成分煎出率的比较研究[△]

李文静*, 崔涛, 蔡德富, 樊丽, 张昊, 刘雷, 洪博[#](齐齐哈尔医学院药学院, 黑龙江齐齐哈尔161006)

中图分类号 R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)22-3110-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.22.23

摘要 目的:研究莪术与三棱配伍前后莪术挥发油中4种有效成分的煎出率变化,为揭示莪术与三棱配伍的作用机制提供参考。方法:采用高效液相色谱法同时测定莪术单煎及与三棱合煎后挥发油中4种有效成分(莪术二酮、莪术醇、吉马酮、 β -榄香烯)的含量,并对各成分的煎出率进行比较。结果:与莪术单煎比较,合煎后挥发油中莪术二酮、莪术醇、吉马酮的煎出量差异具有统计学意义($P < 0.05$), β -榄香烯的煎出率差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:莪术与三棱配伍合煎后可有效增加其挥发油中有效成分莪术二酮、莪术醇和吉马酮的溶出,推测此可能为二者配伍后药效增强的原因。

关键词 莪术;三棱;合煎;配伍;高效液相色谱法;煎出率

Comparative Study on Decoction Rates of Active Ingredients in Volatile Oil after *Curcuma phaeocaulis* Single Decoction and Combined Decoction with *Sparganium stoloniferum*

LI Wenjing, CUI Tao, CAI Defu, FAN Li, ZHANG Hao, LIU Lei, HONG Bo (School of Pharmacy, Qiqihar Medical University, Heilongjiang Qiqihar 161006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the decoction rate changes of 4 active ingredients in the volatile oil of *Curcuma phaeocaulis* before and after combined with *Sparganium stoloniferum*, and provide reference for showing the compatibility mechanism of *C. phaeocaulis* and *S. stoloniferum*. METHODS: HPLC was used to simultaneously determine the contents of 4 active ingredients (curdione, curcumol, germacrone and β -elemene) in the volatile oil of *C. phaeocaulis* after *C. phaeocaulis* single decoction and combined decoction with *S. stoloniferum*. And the fried rates of each ingredient were compared. RESULTS: Compared with *C. phaeocaulis* single decoction, there was significant difference in the fried amounts of curdione, curcumol, germacrone in the volatile oil after combined decoction ($P < 0.05$) and no significant difference in fried rate of β -elemene ($P > 0.05$). CONCLUSIONS: The combined decoction of *C. phaeocaulis* and *S. stoloniferum* can effectively improve the dissolution of curdione, curcumol, germacrone in the volatile oil. It may be the reason for the enhancement of efficacy after compatibility.

KEYWORDS *Curcuma phaeocaulis*; *Sparganium stoloniferum*; Combined decoction; Compatibility; HPLC; Fried rate

血瘀是肿瘤发病的重要病因、病理机制或结果,活血化瘀类抗肿瘤药具有改善血液循环、提高机体自身抗病能力、延长肿瘤患者生存期等作用^[1-2]。莪术、三棱配伍用药出自《经验良方》,为中药配伍用于治疗血瘀证频率较高的一个药对^[3-5],具有气血兼顾、活血祛瘀、行气止痛、疗效增强的作用^[6-7]。但其配伍增效的机制目前尚未明了,需要进一步研究。考虑到两药均有行气破血之功效,合用后疗效加强,笔者假设是因为其中主要的有效成分含量发生了变化所致。基于此,设计了比较莪术、三棱配伍前后主要成分含量变化的相关研究。由于莪术的主要成分为挥发油,其占主要成分含量的1%~2.5%^[8-9];挥发油中主要成分为单萜和倍半萜类,如莪术二酮、莪术醇、吉马酮、 β -榄香烯等,这些成分均为莪术活血化瘀、抗菌、抗肿瘤作用的主要活性物质^[10-14]。因

此,本试验以莪术二酮、莪术醇、吉马酮、 β -榄香烯为考察指标,考察莪术、三棱配伍前后这4个主要活性成分的含量变化,以期分析莪术、三棱的配伍作用机制,为二者临床应用提供理论依据。

4个有效成分的化学结构见图1。

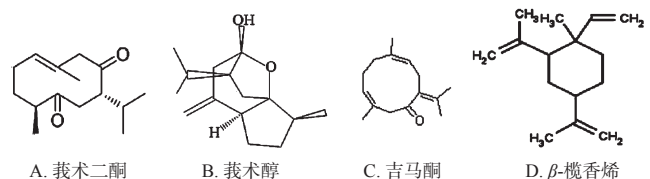


图1 莪术中4个有效成分的结构式

Fig 1 Structures of 4 active ingredients in *C. phaeocaulis*

1 材料

1.1 仪器

LC-1000D 高效液相色谱系统,包括四元梯度泵、在线脱气机、柱温箱、紫外检测器等(山东鲁能瑞虹化工仪器有限公司);TC-C₁₈ 色谱柱(美国 Agilent 公司);

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81403173)

* 讲师,博士。研究方向:中药质量标准。电话:0452-2663159。

E-mail:lwj022325@163.com

[#] 通信作者:讲师,博士。研究方向:中药配伍机制。电话:0452-2663159。E-mail:bohong200630174@163.com

BS124S 电子分析天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司);SB-3200D 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 药材、药品与试剂

莪术(批号:20150329)、三棱(批号:20151104)均购自亳州市国峰药业销售有限公司,产地为安徽亳州,经齐齐哈尔医学院中药研究室郭丽娜教授鉴定为姜科植物蓬莪术(*Curcuma phaeocaulis* Val.)的干燥根茎和黑三棱科植物黑三棱或细叶黑三棱(*Sparganium stoloniferum* Buch.-Ham.)的块茎;莪术二酮对照品(批号:111800-201001,纯度:99.2%)、莪术醇对照品(批号:100185-200506,纯度:99.5%)、吉马酮对照品(批号:111665-201204,纯度:99.8%)、 β -榄香烯对照品(批号:100268-200401,纯度:99.4%)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈均为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

2.1.1 合煎挥发油样品溶液的制备 本课题组前期已经做了莪术配伍三棱提取物的药效学研究,所以本试验采用前期的样品制备方法。取莪术、三棱粉碎,过20目筛,各取20 g置于1 000 mL烧瓶中,加入600 mL水,加热回流4 h;采用挥发油提取器提取挥发油。将提取的挥发油收集至5 mL量瓶中,加入甲醇超声(功率:250 W,频率:25 kHz)30 min、溶解并定容,得样品母液。取100 μ L母液置于10 mL量瓶中加甲醇定容,即将母液稀释100倍得待测样品溶液。

2.1.2 单煎挥发油样品溶液的制备 称取莪术粉末20 g,依照上法提取单味药材的挥发油,制备成一定体积溶液,待测。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取经40 $^{\circ}$ C减压干燥后的莪术二酮、莪术醇、吉马酮、 β -榄香烯对照品适量,分别加入甲醇溶解、稀释,制备成莪术二酮、莪术醇、吉马酮、 β -榄香烯质量浓度分别为1.28、0.53、0.68、2.694 mg/mL的4种对照品溶液及其混合溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱:Agilent TC-C₁₈(250 mm \times 4.6 mm,5 μ m);流动相:乙腈(A)-水(B)溶液梯度洗脱(洗脱程序如下:0~15 min,80% A;15~20 min,80%~100% A;20~25 min,100%~80% A),每次进样间隔用80%乙腈平衡;流速:1.0 mL/min;检测波长:216 nm;柱温:25 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L。

2.4 专属性考察

分别吸取各对照品溶液及对照品混合溶液、样品溶液,进样测定。结果4个活性成分出峰位置处未见干扰,表明本条件下专属性良好,色谱图详见图2。

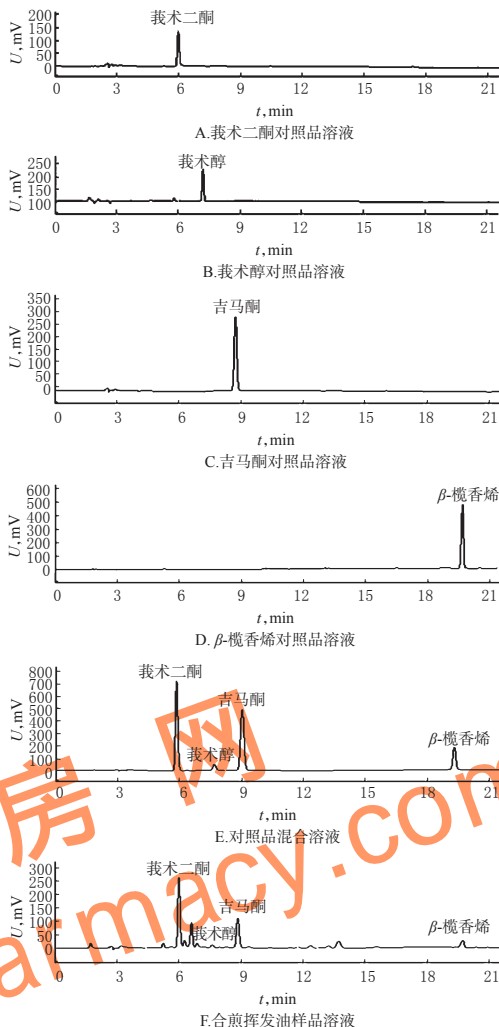


图2 高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms

2.5 线性关系考察

精密量取对照品混合溶液,逐级稀释,制备成6个不同质量浓度的稀释溶液,进样10 μ L(各溶液连续进样3次,取峰面积平均值)。以质量浓度为横坐标(x)、峰面积值为纵坐标(y)进行线性回归,得回归方程:莪术二酮 $y=6.0 \times 10^6 x + 2.5 \times 10^4$ ($r=0.9998$)、莪术醇 $y=1.0 \times 10^6 x + 309.9$ ($r=0.9997$)、吉马酮 $y=1.0 \times 10^7 x + 1.713 \times 10^4$ ($r=0.9999$)、 β -榄香烯 $y=9.64 \times 10^5 x + 7.766 \times 10^4$ ($r=0.9987$)。结果表明,莪术二酮、莪术醇、吉马酮、 β -榄香烯的检测质量浓度线性范围分别为0.04~1.28、0.017~0.530、0.021~0.680、0.084~2.694 mg/mL。

2.6 精密度试验

精密量取对照品混合溶液,连续进样测定6次,结果莪术二酮、莪术醇、吉马酮、 β -榄香烯峰面积的RSD分别为1.3%、1.9%、1.8%、0.57% ($n=6$)。

2.7 稳定性试验

精密吸取合煎挥发油样品溶液,分别于室温下放置0、2、4、8、12、16 h时进样分析。结果,莪术二酮、莪术醇、吉马酮、 β -榄香烯峰面积的RSD分别为2.2%、

1.1%、2.4%、3.2% ($n=6$), 表明样品溶液在 16 h 内稳定。

2.8 重复性试验

平行制备莪术、三棱合煎挥发油样品溶液 6 份, 进样、测定, 记录峰面积。结果, 莪术二酮、莪术醇、吉马酮、 β -榄香烯峰面积的 RSD 分别为 2.9%、2.1%、3.1%、4.3% ($n=6$)。

2.9 加样回收率试验

精密吸取已知含量的莪术、三棱合煎挥发油样品溶液 6 份, 每份 500 μ L, 分别加入相等量的对照品混合溶液, 进样、测定并计算待测成分的平均加样回收率。结果, 莪术二酮、莪术醇、吉马酮、 β -榄香烯的平均回收率分别为 98.22% (RSD=2.1%, $n=6$)、96.89% (RSD=1.2%, $n=6$)、99.78% (RSD=1.8%, $n=6$)、97.34% (RSD=2.2%, $n=6$)。

2.10 样品测定

取莪术单煎及与三棱合煎后挥发油样品溶液, 平行制备 3 份, 进样测定, 计算各成分含量并计算煎出率(提取液中有效成分的质量/总药材质量 $\times 100\%$), 结果见表 1。

表 1 莪术单煎及与三棱合煎后有效成分煎出率 ($n=3$, %)

Tab 1 Decoction rate of active ingredients in *C. phaeocaulis* single decoction and combined decoction mixedly with *S. stoloniferum* ($n=3$, %)

| 批号 | 合煎 | | | | 单煎 | | | |
|--------|-------|---------|---------|--------------|----------|----------|----------|--------------|
| | 莪术二酮 | 莪术醇 | 吉马酮 | β -榄香烯 | 莪术二酮 | 莪术醇 | 吉马酮 | β -榄香烯 |
| 1 | 1.010 | 0.208 9 | 0.309 8 | 0.672 9 | 0.525 3 | 0.128 7 | 0.207 8 | 0.667 5 |
| 2 | 1.009 | 0.199 8 | 0.303 4 | 0.647 8 | 0.559 8 | 0.120 9 | 0.198 8 | 0.628 7 |
| 3 | 0.993 | 0.202 1 | 0.317 4 | 0.683 6 | 0.556 8 | 0.124 2 | 0.196 7 | 0.654 7 |
| 均值 | 1.004 | 0.203 6 | 0.310 2 | 0.668 1 | 0.547 3* | 0.124 6* | 0.201 1* | 0.650 3 |
| RSD, % | 0.95 | 2.3 | 2.2 | 2.7 | 3.5 | 3.1 | 2.9 | 3.0 |

注: 与合煎比较, * $P<0.05$

Note: vs. combined decoction, * $P<0.05$

表 1 结果表明, 合煎后莪术二酮、莪术醇、吉马酮的煎出率明显高于单煎, 而 β -榄香烯的煎出率差别不大。采用 SPSS 17.0 软件对数据进行单因素方差分析, 结果与合煎比较, 单煎后莪术二酮、莪术醇和吉马酮煎出率差异均有统计学意义 ($P<0.05$), β -榄香烯的煎出率差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

3 讨论

中药药对发挥药效作用的物质基础是方中的化学成分, 对药对进行化学成分的研究, 有助于阐明中医方剂理论, 揭示中药配伍规律和作用机制。中药复方的作用基础从化学成分上分析, 可能存在同一中药共存成分之间及与配伍中药成分之间的复合作用, 这些有效成分可共同发挥复合及协同作用, 治疗及改善多种症状。因此, 加强中药复方化学成分研究, 在开发研制创新药物上有重要意义。

笔者在本试验中以莪术、三棱药对为研究对象, 首

先建立了乙腈-水梯度洗脱同时检测莪术二酮、莪术醇、吉马酮和 β -榄香烯 4 种成分含量的方法。采用该方法时, 上述 4 个成分均可在 20 min 内完成检测, 方法学考察结果也显示方法准确、可靠, 可用于测定药材中莪术二酮、莪术醇、吉马酮和 β -榄香烯的含量。之后的试验发现, 莪术单煎及其与三棱合煎后挥发油中莪术二酮、莪术醇和吉马酮的煎出率差异均有统计学意义 ($P<0.01$), 并据此推测两药合煎有助于这 3 种主要有效成分的溶出, 从而导致 3 种有效成分含量的增加。后续工作拟通过化学成分分离研究与图谱研究来进一步揭示莪术与三棱的配伍作用机制, 为二者配伍提供更多的科学依据。

参考文献

- [1] 汤芷妮, 骆云鹏, 葛菲, 等. 活血化瘀抗肿瘤中草药作用机制的研究进展[J]. 中国药房, 2016, 27(8): 1146-1150.
- [2] 铁明慧, 张颖. 活血化瘀促进肿瘤血管正常化的机制探讨[J]. 华西医学, 2014, 29(12): 2379-2381.
- [3] 廖华军. 莪术-三棱药对配伍挥发油成分 GC-MS 分析[J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(8): 74-78.
- [4] 干祖望. 我最喜欢的四味药: 三棱与莪术[J]. 中医药通报, 2002, 1(5): 7.
- [5] 任常瑜, 李晋奇, 童荣生. 配伍在含莪术复方临床功效发挥中的作用[J]. 中国药房, 2016, 27(17): 2428-2430.
- [6] 张恩树. 任达然应用三棱及莪术经验[J]. 实用中医药杂志, 2000, 16(8): 35.
- [7] 彭怀仁, 项平. 中医方剂大辞典精选本: 上册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 167.
- [8] Lu DY, Cao Y, Li L, et al. Comparative analysis of essential oils found in Rhizomes Curcumae and Radix Curcumae by gas chromatography-mass spectrometry[J]. *J Pharm Anal*, 2011, 1(3): 203-207.
- [9] 李林, 殷放宙, 陆兔林, 等. 莪术与三棱配伍前后姜黄素煎出率变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13): 28-30.
- [10] 余成浩, 彭腾, 杜洁, 等. “三棱-莪术”组分配伍对大鼠子宫肌瘤的影响[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(3): 104-107.
- [11] Lu JJ, Dang YY, Huang M, et al. Anti-cancer properties of terpenoids isolated from Rhizoma Curcumae: a review[J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 143(2): 406-411.
- [12] Tao W, Xu X, Wang X, et al. Network pharmacology-based prediction of the active ingredients and potential targets of Chinese herbal Radix Curcumae formula for application to cardiovascular disease[J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 145(1): 1-10.
- [13] 朱福良, 刘金洋, 黄凤香. 莪术油对骨肉瘤 saos-2 细胞 IGF-1R, Akt 及 Bcl-2 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(17): 126-130.
- [14] 徐燕萍, 胡小庆, 湛学军, 等. 莪术对免疫抑制小鼠免疫功能的影响[J]. 山东医药, 2012, 52(4): 51-55.

(收稿日期: 2016-11-21 修回日期: 2017-01-13)

(编辑: 刘萍)