

## 硫熏山药对六味地黄丸中有效成分的影响

郑玉忠<sup>1,2</sup>, 张振霞<sup>1</sup>, 张勇<sup>3</sup>, 刘亚群<sup>3</sup>, 谢丽玲<sup>3</sup>, 乐智勇<sup>2</sup>, 贺震旦<sup>4</sup>, 詹华强<sup>5</sup>, 曹晖<sup>6\*</sup>

(1. 韩山师范学院, 广东 潮州 521041; 2. 康美药业股份有限公司, 广东 普宁 515300;  
3. 汕头大学, 广东 汕头 515063; 4. 深圳大学, 广东 深圳 518060;  
5. 香港科技大学, 香港; 6. 国家中药现代化工程技术研究中心, 广东 珠海 519020)

**[摘要]** 目的:优化马钱苷、丹皮酚和毛蕊花糖苷的 HPLC 方法,检测山药硫熏前后的六味地黄丸中 3 种成分含量的差异,研究硫熏对复方的影响。**方法:**采用 Thermo Hypersil BDS C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。马钱苷,流动相乙腈-0.1% 磷酸梯度洗脱,检测波长 236 nm;丹皮酚,流动相乙腈-0.1% 磷酸(50:50),检测波长 274 nm;毛蕊花糖苷,流动相乙腈-0.1% 乙酸梯度洗脱,检测波长 334 nm。柱温 30 ℃,流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 10 μL。**结果:**随 SO<sub>2</sub> 量的增加,六味地黄丸中丹皮酚、马钱苷和毛蕊花糖苷均有明显的下降趋势,亚硫酸钠组的 3 种成分含量最低,分别为 0.022 6, 0.691 2, 0.036 2 mg·g<sup>-1</sup>。**结论:**该研究优化的 HPLC 方法准确灵敏、重复性好,适用于六味地黄丸的含量测定。结果证实硫熏山药对六味地黄丸会有不利影响,其根源在于 SO<sub>2</sub> 残留。

**[关键词]** 山药; 硫熏; 六味地黄丸; 马钱苷; 丹皮酚; 毛蕊花糖苷

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)18-0048-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015180048

## Effects of Sulfur-fumigated Dioscoreae Rhizoma on Active Ingredients of Liuwei Dihuang Wan

ZHENG Yu-zhong<sup>1,2</sup>, ZHANG Zhen-xia<sup>1</sup>, ZHANG Yong<sup>3</sup>, LIU Ya-qun<sup>3</sup>, XIE Li-ling<sup>3</sup>, LE Zhi-yong<sup>2</sup>, HE Zhen-dan<sup>4</sup>, TSIM Wah-keung<sup>5</sup>, CAO Hui<sup>6\*</sup> (1. Hanshan Normal University, Chaozhou 521041, China; 2. Kangmei Pharmaceutical Co. Ltd., Puning 510006, China; 3. Shantou University, Shantou 515063, China; 4. Shenzhen University, Shenzhen 518060, China; 5. The Hong Kong University of Science and Technology, Hong Kong, China; 6. National Engineering Research Center for Modernization of Traditional Chinese Medicine, Zhuhai 519020, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize HPLC methods of loganin, paeonol and verbascoside, we detected the content of three components in Liuwei Dihuang Wan that prepared by sulfur-fumigated Dioscoreae Rhizoma, in order to reveal the effect of sulfur-fumigation on Traditional Chinese Medicine formulae. **Method:** The column was a Thermo Hypersil BDS C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). Loganin was gradiently eluted by acetonitrile-0.1% phosphoric acid with water system as mobile phase, and 236 nm as the detection wavelength. Paeonol was isocratically eluted by acetonitrile-0.1% phosphoric acid with water (50:50), and 274 nm as the wavelength. Verbascoside was gradiently eluted by acetonitrile-0.1% phosphoric acid with water system as mobile phase, and 236 nm as the wavelength. The column temperature was 30 ℃, the flow rate was 1 mL·min<sup>-1</sup>, the injection volume was 10 μL. **Result:** With the increase of SO<sub>2</sub> amount, loganin, paeonol and verbascoside derived from Liuwei Dihuang Wan were obviously decreased. In the sodium sulfite group, the content of the three components was the lowest, which to 0.022 6, 0.691 2 and 0.036 2 mg·g<sup>-1</sup>. **Conclusion:** The optimized HPLC methods had good accuracy, sensitivity and repeatability, which was suitable for determining in Liuwei Dihuang Wan. The

**[收稿日期]** 20140922(008)

**[基金项目]** 深港创新圈联合研发项目(SGLH20120926161415784);香港创新及科技支持计划及粤港科技合作计划项目(GHP/059/12SZ-P0096);广东省公益研究与能力建设专项(2014A020221058);韩山师范学院博士启动项目(QD20120626)

**[第一作者]** 郑玉忠, 博士, 副研究员, 从事中药学工作, Tel:13652825852, E-mail:zhengyuzhong@gmail.com

**[通讯作者]** \*曹晖, 博士, 研究员, 从事中药学工作, Tel:0756-8135675, E-mail:kovhuicao@aliyun.com

results indicated that sulfur-fumigated *Dioscoreae Rhizoma* would have an adverse effect on Liuwei Dihuang Wan; the possible reason came from SO<sub>2</sub> residue.

[Key words] *Dioscoreae Rhizoma*; Sulfur-fumigation; Liuwei Dihuang Wan; loganin; paeonol; verbascoside

山药具有补脾养胃、生津益肺、补肾涩精的功效。具备药食兼用的价值,市场需求量很大。硫熏山药在市场上占有相当比例,硫熏后的山药便于干燥、片形美观以及防蛀防霉,但硫熏会导致山药残留 SO<sub>2</sub>,它以亚硫酸盐的形式残留在山药中,同时还会破坏山药的某些化学成分,如尿囊素和多糖等<sup>[1-2]</sup>。

中医在复方中一般采用怀山药,而且是没有经过硫磺熏蒸的山药。用硫磺熏制山药的最早文字记载始见于温县县志,说明硫熏山药最早出现于 1900 年前后<sup>[3]</sup>。一般情况下很难区分硫熏山药和无硫山药,未见有研究硫熏山药是否会影响中药复方的效果的文献,为了弄清硫熏在复方中的影响,本文用高效液相色谱法研究用硫熏山药制得的六味地黄丸对复方中其他中药的活性成分含量的影响。六味地黄丸出自宋朝钱乙《小儿药证直诀》,是滋阴补肾之首方,该方由熟地黄、酒茱萸、山药、牡丹皮、茯苓、泽泻 6 味药组成,其用药比例为 8:4:4:3:3:3。通过本实验可在一定程度上获知硫熏山药在复方中的影响,这有利于人们正确地对待和使用硫熏山药。

## 1 材料

**1.1 仪器** 1100 系列高效液相色谱仪(包括 VWD 检测器,美国 Agilent),FA2004B 型电子天平(上海精科天美科学仪器有限公司),GenPure UV/UF 型超纯水器(Thermo),氮气(潮州市大丰气体站),雷磁 pH(上海仪电科学仪器股份有限公司),自制玻璃熏箱。

**1.2 试药** 新鲜山药购于河南温县农科所(批号 2013112001),并以此自制无硫山药饮片。熟地黄(批号 131202151),山茱萸(批号 131010931),茯苓(批号 131201201),牡丹皮(批号 131201304),泽泻(批号 130906301)购买于康美药业股份有限公司。实验药材经曹晖研究员鉴定均为合格药材。

尿囊素(批号 120712,纯度 98%),马钱苷(批号 120111,纯度 98%),丹皮酚(批号 110402,纯度 98%),毛蕊花糖苷(批号 111207,纯度 98%)对照品,均购自四川省维克奇生物科技有限公司。乙腈,甲醇(色谱纯),超纯水。其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 硫熏山药的制备方法<sup>[1]</sup>** 自制玻璃熏箱(约

0.013 m<sup>3</sup>)内设有网状隔板,熏箱顶部安装一小型排风扇。实验时,取新鲜的去皮山药约 30 g 均匀摆放在网状隔板上,称取规定量的硫磺置于坩锅中,并放入熏箱底部,加少许乙醇点燃硫磺,待硫磺形成明显蓝色火焰时,关闭熏箱门及排风扇,用胶带将熏箱门封闭。熏至规定时间后,打开排风扇抽气 1 h,撕去胶带,开启熏箱门,取出山药于 60 ℃烘箱中烘干。

**2.2 二氧化硫残留测定法<sup>[4]</sup>** 按照 2010 年版《中国药典》附录 IX U 中的方法测定药材中 SO<sub>2</sub> 残留量。

**2.3 六味地黄丸的制备** 称取熟地黄 16 g,山萸肉 8 g,山药 8 g,泽泻 6 g,牡丹皮 6 g,白茯苓 6 g,加水 500 mL,加热,煮沸 2 h 后用纱布过滤;滤渣于烧杯中加 400 mL 蒸馏水重沸 2 h,纱布过滤,合并滤液;滤液蒸发浓缩,待剩余溶液浓缩至约 200 mL,停止加热,冷却后定容至 250 mL。

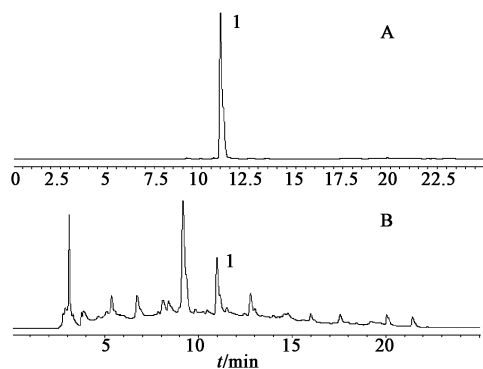
本实验制备了 5 种类型的六味地黄丸,它们的差别在于添加的硫磺不同。对照组是由无硫山药制成的(代号为 WL);实验组分别由硫熏山药制成的,按 SO<sub>2</sub> 残留量分成低、中、高 3 档(代号为 DL, ZL, GL 220.16, 431.68, 923.52 mg·kg<sup>-1</sup>);最后一组也是由无硫山药制成的,但人为添加了亚硫酸钠,以模拟硫熏后的 SO<sub>2</sub> 残留,添加量相当于高硫熏山药(代号为 TL, 1 000 mg·kg<sup>-1</sup>)。

## 2.4 含量测定

**2.4.1 马钱苷含量测定<sup>[5]</sup>** Thermo ODS-2 HYPERSIL C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸(B)梯度洗脱(0~15 min, 5%~30% A; 15~20 min, 30%~75% A; 20~21 min, 75%~95% A; 21~25 min, 95% A);检测波长 236 nm,柱温 30 ℃,流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 10 μL。见图 1。

**2.4.2 丹皮酚含量测定<sup>[6]</sup>** 色谱柱同 2.4.1 项下,流动相乙腈-0.1% 磷酸(50:50),检测波长 274 nm,柱温 30 ℃,流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 10 μL。见图 2。

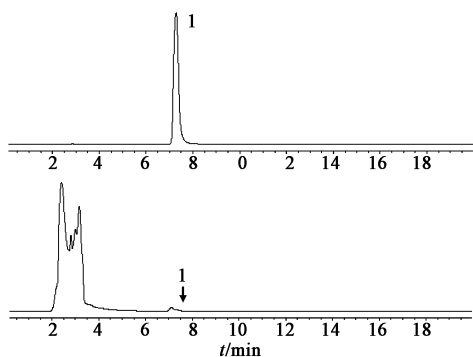
**2.4.3 毛蕊花糖苷含量测定<sup>[7]</sup>** 色谱柱同 2.4.1 项下,流动相乙腈(A)-0.1% 乙酸(B)梯度洗脱(0~40 min, 10%~20% A; 40~60 min, 20%~30% A;



A. 对照品; B. 供试品; 1. 马钱苷

图 1 六味地黄丸样品中马钱苷 HPLC 色谱

Fig. 1 HPLC of loganin in Liuwei Dihuang Wan

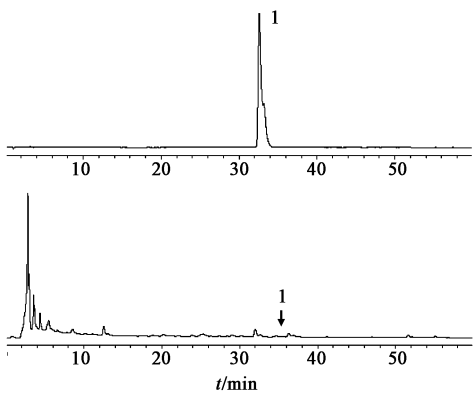


A. 对照品; B. 供试品; 1. 丹皮酚

图 2 六味地黄丸样品中丹皮酚 HPLC 色谱

Fig. 2 HPLC of paeonol in Liuwei Dihuang Wan

60 ~ 65 min, 30% ~ 10% A), 检测波长 334 nm, 柱温 30 °C, 流速 1 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量 10 μL。见图 3。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 毛蕊花糖苷

图 3 六味地黄丸样品中毛蕊花糖苷 HPLC 色谱

Fig. 3 HPLC of paeonol verbascoside in Liuwei Dihuang Wan

**2.4.4 标准曲线的绘制** 分别称取马钱苷、丹皮酚和毛蕊花糖苷适量, 用甲醇溶解并定容, 得到质量浓度为 0.30, 0.66, 0.60 mg·L<sup>-1</sup> 的对照品母液。分别

配制质量浓度为 24.6, 49.2, 73.8, 98.4, 123.0, 147.5 mg·L<sup>-1</sup> 的马钱苷对照品溶液; 质量浓度分别为 20.0, 50.0, 100.0, 150.0, 200.0, 300.0 g·L<sup>-1</sup> 丹皮酚对照品溶液; 质量浓度分别为 2.0, 4.0, 6.0, 12.0, 16.0, 24.0 mg·L<sup>-1</sup> 的毛蕊花糖苷对照品溶液。以峰面积积分 *Y* 为纵坐标, 对照品浓度 *X* (mg·L<sup>-1</sup>) 为横坐标, 绘制标准曲线, 得线性回归方程见表 1。

表 1 3 种成分的标准曲线

Table 1 Linear range of 3 content in Liuwei Dihuang Wan

成分	线性方程	<i>r</i>	线性范围 /mg·L <sup>-1</sup>
马钱苷	$Y = 19\ 954X + 98.87$	0.999 2	24.6 ~ 147.5
丹皮酚	$Y = 63\ 570X + 496.84$	0.999 0	20 ~ 300
毛蕊花糖苷	$Y = 10\ 040X + 29.13$	0.999 4	2.0 ~ 24.0

**2.4.5 方法学考察** ①精密密度试验: 分别取同一浓度的 3 种对照品连续进样 6 次, 记录峰面积, 计算 RSD。②重复性试验: 取同一六味地黄丸样品 6 份, 每一份 5 mL, 按照供试品溶液的制备方法处理, 分别进样 10 μL, 求得马钱苷、丹皮酚和毛蕊花糖苷峰面积的 RSD。③稳定性试验: 取同一六味地黄丸样品分别于 0, 2, 4, 6, 8 h 进样, 记录峰面积, 计算 RSD。④加样回收率试验: 精密称取已知含量的六味地黄丸样品 9 份, 分别按已知含量的 80%, 100%, 120% 3 个水平加入对照品, 按照供试品溶液的制备方法处理后, 记录峰面积, 计算 RSD。结果见表 2。

表 2 3 种成分测定方法学考察试验

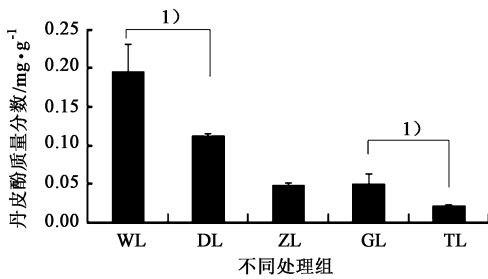
Table 2 Methodological evaluation of 3 content in Liuwei Dihuang Wan

检测成分	精密密度 RSD	重复性 RSD	稳定性 RSD	加样回收率	
				平均值	RSD
马钱苷	2.0	2.2	3.4	99.16	3.0
丹皮酚	1.2	1.0	1.8	98.21	1.9
毛蕊花糖苷	1.3	2.2	2.5	102.48	2.8

**2.5 不同六味地黄丸中 3 种有效成分含量的比较**

图 4 ~ 6 结果显示, 随着山药中 SO<sub>2</sub> 残留量的增加, 六味地黄丸中丹皮酚、马钱苷和毛蕊花糖苷均有明显的下降趋势, 无硫山药 (WL) 组与低硫山药 (DL) 组的差异显著。结果说明硫熏山药会减低六味地黄丸的某些指标成分; 同时也证实了使用硫熏药材组配复方, 会影响复方中其他药味的有效成分。

结果还显示人为添加亚硫酸钠 (TL) 组中的丹



<sup>1)</sup> *t* 检验  $P < 0.05$ , 图 5, 6 同。

图 4 不同 SO<sub>2</sub> 残留山药制得六味地黄丸中丹皮酚的质量分数 ( $\bar{x} \pm s$ )

Fig. 4 Paeonol content in Liuwei Dihuang Wan made by different SO<sub>2</sub> residue in Dioscoreae Rhizoma ( $\bar{x} \pm s$ )

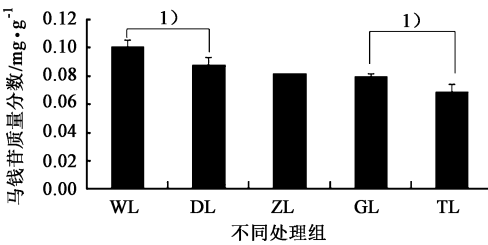


图 5 不同 SO<sub>2</sub> 残留山药制得六味地黄丸中马钱苷的质量分数 ( $\bar{x} \pm s$ )

Fig. 5 Loganin content in Liuwei Dihuang Wan made by different SO<sub>2</sub> residue in Dioscoreae Rhizoma ( $\bar{x} \pm s$ )

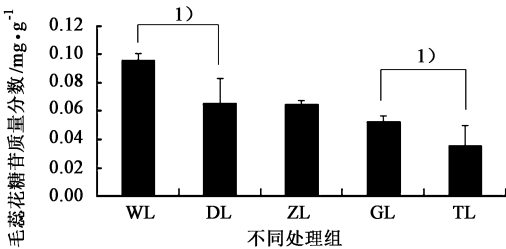


图 6 不同 SO<sub>2</sub> 残留山药制得六味地黄丸中毛蕊花糖苷的质量分数 ( $\bar{x} \pm s$ )

Fig. 6 Acteoside content in Liuwei Dihuang Wan made by different SO<sub>2</sub> residue in Dioscoreae Rhizoma ( $\bar{x} \pm s$ )

皮酚、马钱苷和毛蕊花糖苷质量分数均最低,分别为 0.022 6, 0.691 2, 0.036 2 mg·g<sup>-1</sup>。可见即使没有使用硫熏山药,但在配制复方过程中存在亚硫酸盐,也会造成指标成分的下降。说明硫熏山药对复方的影响主要来源于 SO<sub>2</sub> 的残留。

### 3 讨论

2010 年版《中国药典》中规定六味地黄丸中的

检测指标是山茱萸的马钱苷和牡丹皮的丹皮酚。为了显示更多成分的变化,我们还选择了熟地黄的毛蕊花糖苷,泽泻的 23-乙酰泽泻醇 B 进行研究;但是由于泽泻在此方中用量较少,很难检测到 23-乙酰泽泻醇 B;而茯苓在药典中还未规定指标成分。因此,在本研究中最终选择了马钱苷、丹皮酚和毛蕊花糖苷进行研究。

在 2010 年版《中国药典》中,除六味地黄丸是以药粉加入蜂蜜搓丸而成;其他包括六味地黄丸(浓缩丸)、六味地黄软胶囊、六味地黄胶囊和六味地黄颗粒均需要以水煎煮。因此,在本研究中选择了以水煎煮的方式研究硫熏对六味地黄丸的影响。

本结果显示了硫熏山药会减低六味地黄丸的某些指标成分;证实了使用硫熏药材组配方,会影响复方中其他药味的有效成分。

本研究还证实了硫熏山药对复方的影响主要来源于 SO<sub>2</sub> 的残留。这可能来至两个原因,一是 SO<sub>2</sub> 残留在溶液中是以亚硫酸存在,它会导致 pH 的下降;二是 SO<sub>2</sub> 具有很强的还原作用;这两个原因共同作用下,使得六味地黄丸中有效成分被转化成其他物质或降解。但是,具体的原因还有待于进一步研究和分析。

### [参考文献]

- [1] 赵海霞, 刘伟. 硫磺熏蒸对山药中尿囊素的影响[J]. 中草药, 2009, 40(6):903-904.
- [2] 崔援军, 辛爱玲. 硫磺熏制对山药多糖含量的影响[J]. 安徽医药, 2007, 11(12):1101-1102.
- [3] 蒋以号, 刘伟, 曹晖, 等. 中药硫磺熏蒸研究概况[J]. 中国医药指南, 2010, 8(33):38-40.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010.
- [5] 李娟, 王本杰, 袁桂艳, 等. 六味地黄丸中四种活性成分的 HPLC 法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2010, 41(2):126-128.
- [6] 张留记, 屠万倩, 屈凌波, 等. 不同产地牡丹皮中丹皮酚和芍药甙含量的 HPLC 法测定[J]. 信阳师范学院学报:自然科学版, 2007, 20(2):223-226.
- [7] 李军, 俞桂新, 张丽萍, 等. 不同产地清蒸熟地黄饮片高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中医学报, 2011, 26(162):1338-1340.

[责任编辑 顾雪竹]