

传统煎法和现代煎药机制备补阳还五汤的 HPLC 指纹图谱对比研究

王 璐^{1,2} 黄一平²

(1 南京中医药大学第三临床医学院,南京,210023; 2 江苏省中医药研究院,南京,210028)

摘要 目的:采用高效液相(HPLC)对比研究补阳还五汤传统煎法和现代煎药机法的指纹图谱差异。方法:首先采用随机数字表法随机选取不同产地的药材配出 10 个不同批次的补阳还五汤配方,配制传统煎法补阳还五汤供试品溶液和现代煎药机补阳还五汤供试品溶液后,以优化的色谱条件进行 HPLC 指纹图谱对比研究。结果:1)采用 HPLC 色谱法对补阳还五汤进行专属性试验,结果显示补阳还五汤专属性良好。2)线性关系考察显示阿魏酸回归方程 $y = 259.33X + 48.708$, $r = 0.999\ 9 (n = 5)$,结果表明阿魏酸对照品范围 $0.997 \sim 9.97\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$,线性考察结果显示线性关系良好。3)精密度试验结果最终取大于总峰面积 5% 的色谱峰相对峰面积的 RSD 平均值 2.014%,色谱峰相对保留时间 RSD 平均值 0.29%,研究结果显示补阳还五汤供试品溶液精密度良好。4)稳定性试验结果最终取大于总峰面积 5% 的色谱峰相对峰面积的 RSD 平均值 1.839%,色谱峰相对保留时间 RSD 平均值 0.02%,研究结果显示补阳还五汤供试品溶液 24 h 内稳定性良好。5)重复性试验结果最终取大于总峰面积 5% 的色谱峰相对峰面积的 RSD 平均值 1.901%,色谱峰相对保留时间 RSD 平均值 0.72%,结果显示补阳还五汤的重复性良好。6)回收率试验结果显示平均回收率 99.76%,RSD 2.14%,表明这一色谱条件下的 HPLC 方法检测加样回收率结果可靠。7)样品测定结果显示传统煎法的补阳还五汤指纹图谱 131.88 min 即完成检测,而现代煎药机法制备的补阳还五汤指纹图谱在 140 min 才完成检测;另外从图谱中可见现代煎药机制备的补阳还五汤中色谱峰更多。从各自的指纹图谱相似度中可得,其中传统煎法平均相似度为 0.956,现代煎药机法平均相似度为 0.974,略高于传统煎法。结论:传统煎法和现代煎药机法制备的补阳还五汤的 HPLC 指纹图谱存在一定差异。

关键词 高效液相;指纹图谱;补阳还五汤;传统煎法;现代煎药机;高压;精密度;重复性

Comparative Study on HPLC Fingerprint of Buyang Huanwu Decoction Prepared by Traditional Decocting Method and Modern Decocting Mechanism

Wang Rong^{1,2}, Huang Yiping²

(1 The Third Clinical Medicine College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;

2 Jiangsu Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

Abstract Objective: To compare the fingerprint difference of Buyang Huanwu Decoction between traditional decoction and modern decoction machine by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods:** Firstly, random number table method was used to randomly select the prescription of 10 different batches of Buyang Huanwu Decoction of different batches, prepared the traditional decoction of Buyang Huanwu Decoction, and the modern decocting machine Buyang Huanwu Decoction. After the optimized chromatographic conditions, the HPLC fingerprint was compared. **Results:** 1) HPLC chromatography was used to make a specific test of Buyang Huanwu Decoction, the results showed that the Buyang Huanwu decoction had good specificity. 2) The linear relationship showed the regression equation of ferulic acid $y = 259.33X + 48.708$, $r = 0.999\ 9 (n = 5)$. The results showed that the range of ferulic acid control was in $0.997 \sim 9.97\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$, and the linear investigation showed that the linear relationship was good. 3) The results of the precision test were 5% of the total peak area of the peak area of 5%, the average value of the relative peak area of the peak area was 2.014%, and the relative retention time of the chromatographic peak was 0.29% of the average value of RSD. The results showed that the precision of the solution of Buyang Huanwu decoction was good. 4) Finally, the results of the stability test were 5% of the total peak area and the RSD average 1.839%. The chromatographic peak relative retention time RSD average value was 0.02%, and the research results showed that Buyang Huanwu decoction solution 24 h stability. 5) The results of repeatability test were 5% of the total peak area, and the average value of the peak area was 1.901%, and the relative retention time of the chromatographic peak was 0.72%. The results of this study showed that the repeatability of Buyang Huanwu decoction was good. 6) The average recovery was 99.76% and RSD was 2.14%. The results showed that the HPLC method under this chromatographic condi-

基金项目:江苏省中医药局课题(LZ10368)

作者简介:王璐(1987.12—),女,本科,助理研究员,教学管理员,研究方向:中药制剂,E-mail:mhsfccq@163.com

通信作者:黄一平(1964.02—),男,研究生,研究员,研究方向:中药质量标准与制剂工艺研究,E-mail:yiping@163.com

tion was reliable. 7) The test results showed that the traditional decoction of Buyang Huanwu decoction fingerprint 131.88 min was completed, while the Buyang Huanwu decoction fingerprint made by the modern decocting machine was detected in 140 min, and the chromatogram peak of Buyang Huanwu decoction prepared by the modern decocting mechanism could be seen from the atlas. The average similarity of the traditional decocting method was 0.956 and the average similarity of the modern decocting machine method was 0.974, which is slightly higher than the traditional decocting method. **Conclusion:** The HPLC fingerprint of Buyang Huanwu decoction prepared by traditional decocting method and modern decocting machine is different.

Key Words High performance liquid chromatography; Fingerprint; Buyang Huanwu decoction; Traditional decoction; Modern decoction machine; High pressure; Precision; Repeatability

中图分类号: R284 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2019.07.008

中药煎剂是中药临床制备使用的传统剂型之一,在中医学中使用历史悠久,应用最为广泛。在使用过程中,临床医师可根据中医辨证论治对组方进行随症加减来治疗疾病,具有组成灵活、使用方便、疗效显著的特点,是中医临床诊疗的重要手段之一^[1]。在中医发展过程中,中药煎剂的制备是以手工煎煮中药饮片为主。但传统的中药煎煮方法用时过长,患者对先煎、后入等操作不明,甚至影响到药物疗效^[2-3]。故随着社会的发展,生活节奏的加快,临床患者越来越不倾向于使用传统煎剂,中药煎药机的出现则为患者提供了一个全新的选择,与传统煎药方法比较,煎药机具有省时、安全、方便的特点,特别是其中药煎煮后使用简便,而得到越来越广泛的认同^[4]。但是现代煎药机煎药模式下的中药方剂的有效性仍是一个值得关注的问题。由于临床研究中传统煎煮法和现代煎药机煎药造成的药物质量上的差异,一直缺乏一个系统的、全面的、有效的评价,故现代煎药机的效用常常受到部分医生或患者的质疑。本研究以传统名方补阳还五汤为研究对象,通过使用分析高效液相色谱法(HPLC)指纹图谱的方法,以比较传统煎煮法和现代煎药机煎药所制备的煎剂之间是否存在化学成分差异,从而对现代煎药机煎药有效性进行探讨,以期对临床上不同的煎煮方法所造成的质量差异进行全面评价,为临床使用提供一定的参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器 购于日本岛津公司的高效液相色谱仪(型号: LC-20AT)、四元泵(型号: LC-20AT 泵)和自动进样器(型号: SIL-20AC)等;购于美国罗门有限公司的 Phenomenex Gemini C₁₈ 柱(规格: 5 μm, 4.6 mm × 250 mm)。

1.2 试剂 购于苏州市永迈物资有限公司色谱 HPLC 乙腈和色谱 HPLC 甲醇;中国食品药品检定研究院提供的超纯水、蒸馏水和阿魏酸对照品(批号: 110773-9910)。

1.3 分析样品 补阳还五汤的药方根据古方剂量,黄芪 120 g、当归 6 g、赤芍 4.5 g、川芎 3 g、桃仁 3 g、红花 3 g、地龙 3 g。补阳还五汤采用药材来源见表 1。

表 1 补阳还五汤药材来源信息

药名	编号	批号	饮片来源	编号	批号	饮片来源
黄芪	A1	200150829	甘肃	A2	101915102	内蒙古
当归	B1	20159120	甘肃	B2	2015050	四川
赤芍	C1	20150902	甘肃	C2	140818001	内蒙古
川芎	D1	20150809	四川	D2	20151006	四川
桃仁	E1	130510371	四川	E2	209415103	山东
红花	F1	Z92575355	云南	F2	400315102	新疆
地龙	G1	150620005	广西	G2	808115101	广东

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 4.6 mm × 250 mm 的 Phenomenex Gemini C₁₈ 保护柱(5 μm),以 30 ℃ 为柱温,补阳还五汤供试品溶液或阿魏酸对照品溶液均在进样前以流动相梯度初始条件平衡 30 min,进样量为 15 μL,以乙腈为流动相 A,0.05% 磷酸水为流动相 B,流速 1.0 mL/min,流动相使用前须经减压抽滤脱气,具体梯度洗脱程序见表 2,检测波长为 230 nm。

表 2 流动相梯度洗脱程序

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0	2	98
10	2	98
35	10	90
50	15	85
80	25	75
100	60	40
120	65	35
140	65	35

2.2 对照品溶液的制备 首先将阿魏酸对照品精密称取 12.46 mg 放置于 60 ℃ 真空干燥,后放入广口瓶中并加 70% 甲醇定容至 25 mL,经超声重复溶解均匀,制成阿魏酸对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 传统煎法供试品溶液制备 根据补阳还五汤配伍比例,取全部 7 味药加 10 倍量蒸馏水浸泡 30 min,采用传统煎法加热煮沸 10 min 后,转小火煮 50 min,趁热采用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,过滤液密封保存;剩余药渣再加 8 倍量蒸馏水加热煮沸,采用传统煎法沸后 10 min,转小火煮 50 min,采用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,所取过滤液与第 1 次煎煮获得的过滤液合并,浓缩,定容至 3.60 g/ mL 的补阳还五汤水煎液。精密量取 0.2 mL 补阳还五汤水煎液于 10 mL 量瓶中并以 50% 的甲醇定容,充分混合均匀后 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得传统煎法供试品溶液。

2.3.2 现代药煎机法供试品溶液制备 根据补阳还五汤配伍比例,取全部 7 味药加 10 倍量蒸馏水浸泡 30 min,采用现代煎药机(高压)法加热 60 min 后,趁热采用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,过滤液密封保存;剩余药渣再加 8 倍量蒸馏水,采用现代煎药机(高压)法加热 60 min,采用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,所取过滤液与第一次煎煮获得的过滤液合并,浓缩,定容至 3.60 g/ mL 的补阳还五汤水煎液。精密量取 0.2 mL 补阳还五汤水煎液于 10 mL 量瓶中并以 50% 的甲醇定容,充分混合均匀后 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得现代煎药机法供试品溶液。

补阳还五汤根据随机数字表法,随机抽取药材来源组合成方,共 10 个不同批次。见表 3。

表 3 10 批补阳还五汤药材来源随机分组

传统煎法 编号	现代煎药机 编号	黄芪	当归	赤芍	川芎	桃仁	红花	地龙
S1	SS1	A1	B2	C2	D1	E1	F1	G2
S2	SS2	A2	B2	C1	D1	E2	F1	G1
S3	SS3	A2	B1	C2	D2	E1	F2	G2
S4	SS4	A1	B1	C2	D1	E2	F1	G2
S5	SS5	A1	B1	C1	D2	E2	F1	G1
S6	SS6	A2	B2	C2	D1	E1	F2	G1
S7	SS7	A1	B2	C2	D2	E2	F1	G2
S8	SS8	A2	B1	C1	D1	E2	F2	G2
S9	SS9	A1	B1	C2	D1	E1	F2	G1
S10	SS10	A2	B1	C2	D1	E2	F2	G2

2.4 专属性试验 取同一供试品溶液根据 2.3 制备的供试品溶液,采用 HPLC 色谱法对补阳还五汤进行专属性试验,结果显示补阳还五汤专属性良好。

2.5 线性关系考察 精密量取阿魏酸对照品溶液 2.0、5.0、10.0、15.0、20.0 μL,根据 2.1 色谱条件进行 HPLC 色谱法检测,记录峰面积;以峰面积积分值为纵坐标(Y),对照品进样量(μg)为横坐标(X),绘制标准曲线,阿魏酸回归方程 $y = 259.33X + 48.708$, $r = 0.999\ 9$ ($n = 5$),结果表明,阿魏酸对照

品范围在 0.997 ~ 9.97 μg/μL,线性考察结果显示线性关系良好。

2.6 精密度试验 精密取同一 2.3 制备的供试品溶液,在一组相同的测量程序、相同测试地点和相同的色谱条件等情况下,连续重复测量 5 次 HPLC 检测,各色谱峰相对峰面积的相对标准差(RSD) < 3%,且各色谱峰相对保留时间的 RSD < 1%,精密度结果最终取大于总峰面积 5% 的色谱峰相对峰面积的 RSD 平均值 2.014%,色谱峰相对保留时间 RSD 平均值 0.29%,研究结果显示补阳还五汤供试品溶液精密度良好。

2.7 供试品溶液稳定性试验 由于固定相的稳定性都是有限的,因此的 HPLC 试验开始前,需要确定供试品溶液的稳定性,以确保每一次研究之间的结果误差最小,结果数据具有较高的可靠性。本研究采用同一供试品溶液分别室温放置 0、4、8、12、16、21 h 后进行 HPLC 检测,各色谱峰相对峰面积的相对标准差(RSD) < 3%,且各色谱峰相对保留时间的 RSD < 1%,稳定性结果最终取大于总峰面积 5% 的色谱峰相对峰面积的 RSD 平均值 1.839%,色谱峰相对保留时间 RSD 平均值 0.02%,研究结果显示补阳还五汤供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

2.8 重复性试验 采用 6 份同一供试品溶液,连续进样进行短时间内的 HPLC 连续重复性测试,各色谱峰相对峰面积的相对标准差(RSD) < 3%,且各色谱峰相对保留时间的 RSD < 1%。重复性结果最终取大于总峰面积 5% 的色谱峰相对峰面积的 RSD 平均值 1.901%,色谱峰相对保留时间 RSD 平均值 0.72%,本研究结果显示补阳还五汤的重复性良好。

2.9 回收率试验 精密吸取已知含量的补阳还五汤供试品溶液 6 份,分别准确加入 1 mL 已知浓度为 0.25 g/L 阿魏酸对照品溶液,混合均匀后水浴蒸干,加 70% 甲醇到残渣中并定容至 5 mL,作为加样回收试验的测试供试品溶液,根据 2.1 的色谱条件进行 HPLC 测定,计算加样回收率。结果显示平均回收率 99.76%,RSD 2.14%,表明这一色谱条件下的 HPLC 方法检测加样回收率结果可靠。

2.10 样品测定结果 补阳还五汤传统煎法和现代煎药机法的指纹图谱存在一定的差异,在同一色谱洗脱梯度下,传统煎法的补阳还五汤指纹图谱 131.88 min 即完成检测,而现代煎药机法制备的补阳还五汤指纹图谱在 140 min 才完成检测;现代煎药机制备的补阳还五汤中色谱峰更多,可能与现代煎药机的高压煎煮设备能析出更多共有峰有关。见

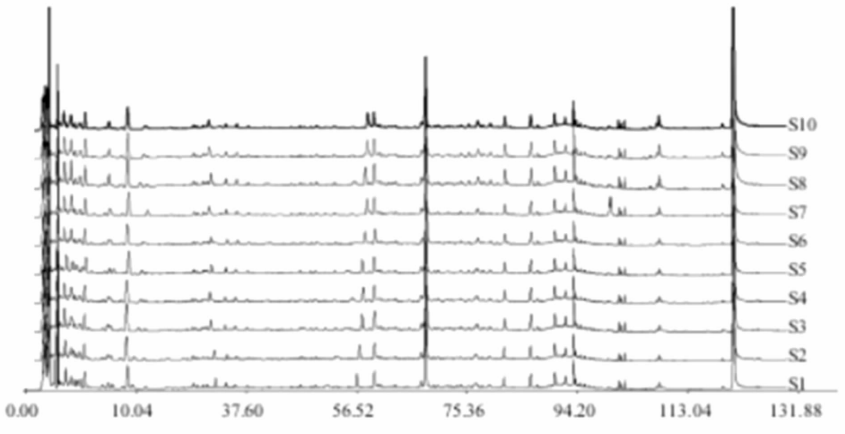


图 1 10 批补阳还五汤传统煎法的 HPLC 指纹图谱叠加图

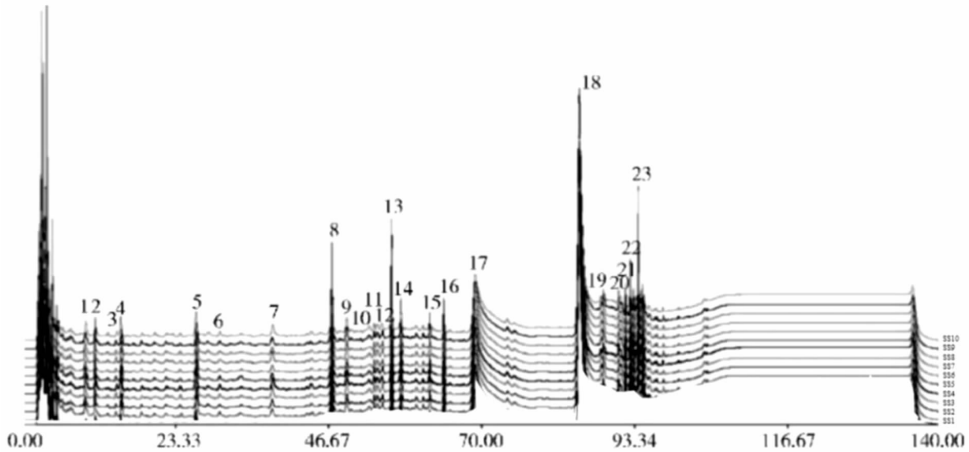


图 2 10 批补阳还五汤现代煎药机的 HPLC 指纹图谱叠加图

图 1 和图 2。从各自的指纹图谱相似度中可得,10 批传统煎法补阳还五汤的相似度和 10 批现代煎药机法补阳还五汤的相似度均高于 0.9,其中传统煎法平均相似度为 0.956,现代煎药机法平均相似度为 0.974,略高于传统煎法。见表 4。

表 4 10 批补阳还五汤相似度结果

传统煎法编号	相似度	现代煎药机编号	相似度
S1	0.945	SS1	0.989
S2	0.940	SS2	0.955
S3	0.944	SS3	0.967
S4	0.953	SS4	0.998
S5	0.937	SS5	0.976
S6	0.976	SS6	0.997
S7	0.949	SS7	0.948
S8	0.978	SS8	0.954
S9	0.971	SS9	0.993
S10	0.963	SS10	0.964
平均值	0.957	平均值	0.974

3 讨论

中药汤剂在我国的使用历史悠久,据史记载最早可追溯到商朝伊尹时期。因相对其他药物制备手段,中药汤剂具有吸收快、疗效确切、制备使用简单

等优势^[5],其从几千年前一直使用至今,倍受历代医家所推崇,现仍在中医临床诊疗中占据最为重要的地位。对于中药的煎煮方法,历代医家均要求较为严格,并认为不同的操作方法将直接影响到临床的疗效。张仲景在其论著《伤寒杂病论》中对不同的药物种类煎煮方法均进行了详细的论述,如矿石类、有毒药物等均需先煎,芳香类、挥发性药物则选后入,贵重的药物应另煎兑服。明代著名医家李时珍认为:“凡服汤药,虽品物专精,修治如法……火候失度,则药亦无功”,同时说“凡煎药并忌铜铁器,宜用银器瓦罐”;清代徐灵胎的《医学源流论》云:“煎药之法,最宜深讲,药之效不效,全在乎此”。由此可见,古人认为不同药物器皿的选择,药物入选的时机、火候等诸多因素都影响着中药汤剂的质量^[6-7],现代学者进行的中药药理研究也多次证实了这点^[8]。然而随着社会的发展,生活节奏的加快,患者对传统煎煮方法的认知不足,越来越多的医院及药房选择使用现代机器煎煮中药的方法。作为中医现代化的一部分,自动煎药机有着其无法忽视的优势,相较于传统的煎煮药物的方法,现代煎药机具

有时间短、使用数据客观,煎煮过程密闭卫生,有效减轻了医生及患者工作量^[9-10]。然而目前中药传统煎法和机器制备孰优孰劣仍存在较多争议,并且主要集中在 2 种不同的制备方法所导致煎剂中主要的药物有效化学成分的差异上^[11-12]。有研究者^[13-14]对四逆汤、六味地黄丸等对比传统煎法制备及现代煎药机制备的差异,结果显示传统煎法与现代煎药机各有优劣,如现代煎药机制备的煎剂的挥发性成分含量高于传统煎法;而传统煎法的浸出率较高,但在治愈率上两中制备方法的方药未见明显差异。也有部分学者认为^[15-16],现代煎药机煎药制备的中药药液颜色较淡,口感较为清稀,有背与中国人对于中药汤剂的传统认知,并对患者产生一定的心理影响,从而降低自动煎药机制备出的药液的治疗效应^[17-20]。本研究中根据煎煮加水量理论值为饮片吸水量、煎煮过程中蒸发量及煎煮后所需药液量的总和,但实际操作时加水量很难达精确,应根据饮片质地疏密、吸水性能及煎煮时间长短确定,无论是传统煎法还是现代煎药机 2 次煎煮时会形成新的浓度差,增加有效成分的溶出。结合医院煎药室实际情况和临床患者服药习惯,即按每剂药每日服用量 400 mL,补阳还五汤采用现代煎药机高压模式的最佳煎煮工艺调整为加 8~10 倍量水浸泡 30 min,煎煮 2 次,60 min/次,混合 2 次的滤出液,显示煎煮加水量的多少与最终的平衡浓度有关,对阿魏酸浸出的影响不大。本研究中样品测定结果显示传统煎法的补阳还五汤指纹图谱 131.88 min 即完成检测,而现代煎药机法制备的补阳还五汤指纹图谱在 140 min 才完成检测;另外从图谱中可见现代煎药机制备的补阳还五汤中色谱峰更多。从各自的指纹图谱相似度中可得,其中传统煎法平均相似度为 0.956,现代煎药机法平均相似度为 0.974,略高于传统煎法。综上所述,传统煎法和现代煎药机法制备的补阳还五汤的 HPLC 指纹图谱存在一定差异,但是具体成分的差异,有待进一步结合质谱进行深入研究。

参考文献

[1]刘瑞新,李学林,吴子丹,等.论中药煎剂掩味研究的必要性、现

状与对策[J].中国药房,2012,61(27):2497-2500.

- [2]庄延双,蔡皓,刘晓,等.影响中药煎剂质量的因素分析[J].中国药房,2012,28(11):1048-1050.
- [3]赵喜荣,张文玲,申泰生.中药制剂不良反应分析与对策[J].中国医药,2012,7(11):1472-1473.
- [4]王会平,王会生.传统煎药与现代煎药机煎药的区别[J].辽宁中医药大学学报,2009,12(6):217-218.
- [5]张修才.浅谈中药汤剂的制备[J].贵州医药,2013,9(2):180-181.
- [6]梁锦芬.中药汤剂疗效的影响因素探讨[J].临床合理用药杂志,2016,17(4):179-181.
- [7]张立双,江丰,赵晨,等.中药汤剂煎煮法的文献调查分析[J].天津中医药,2017,20(6):422-428.
- [8]王东青,张亚丽.浅议中药汤剂制备过程中存在的问题[J].国医论坛,2013,34(2):57-58.
- [9]戴丽莉,葛朝伦,孙奇,等.中药汤剂煎药机加液量数学模型的初步研究[J].中国药房,2016,11(1):18-22.
- [10]邓德英,贾利利,李雅.中药汤剂煎煮技术研究概况[J].中国中医药现代远程教育,2015,42(10):143-145.
- [11]龚建华.传统煎药与现代自动煎药机煎药的疗效研究[J].临床合理用药杂志,2013,73(36):156-157.
- [12]盛家峰.不同煎药方法对水溶性浸出物浸出率及药效的影响[J].临床医学,2017,32(8):119-120.
- [13]黄育生,唐洪梅,招远明,等.传统煎法与现代煎药机制备四逆汤的 HPLC 指纹图谱对比研究[J].中国药房,2016,55(24):3440-3442.
- [14]齐惠珍,霍炳杰,周霞瑾.两种煎煮法对六味地黄汤煎出率的比较研究[J].河北医药,2016,16(8):1262-1263.
- [15]朱雪莲.煎药机煎法对中药复方汤剂总浸出物及有效成分的影响[J].中国医药导报,2013,21(7):121-122.
- [16]鞠俭奎,姜鸿,贾树娟,等.煎药机不同煎煮方法对 3 种药材有效成分煎出率的影响研究[J].中国药房,2016,49(34):4851-4854.
- [17]陈少芳,梁惠卿.中药汤剂掩味探讨[J].中华中医药杂志,2016,23(6):2348-2350.
- [18]万德华,叶桂存.中药汤剂特点及质量影响探究[J].黄冈职业技术学院学报,2015,31(5):94-96.
- [19]陈彬,赵爱光.中药汤剂及主要新剂型的研究现状[J].世界中医药,2014,28(3):396-399.
- [20]邓德英,贾利利,李雅.中药汤剂煎煮技术研究概况[J].中国中医药现代远程教育,2015,46(10):143-145.

(2018-09-20 收稿 责任编辑:芮莉莉)