

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

黄育生^{1*},唐洪梅^{2#},招远明²,王 婷¹,柴玉娜¹,刘 媛¹,钟如帆¹(1.广州中医药大学第一临床医学院,广州 510006;2.广州中医药大学第一附属医院,广州 510405)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)24-3440-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.24.40

摘要 目的:建立四逆汤的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,对比传统煎法与现代煎药机制备的四逆汤的主要化学成分组成的差异。方法:采用HPLC法。色谱柱为Kromasil C₁₈,流动相为乙腈-0.1%磷酸(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为235 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μl。以甘草苷色谱峰为参照峰,测定10批四逆汤的HPLC图谱,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004年A版)进行共有峰鉴定和相似度评价。结果:10批四逆汤有18个共有峰,相似度均≥0.982。经验证,10批四逆汤指纹图谱与对照指纹图谱具有较好的一致性,两种方法制备的10批四逆汤相似度较高。结论:所建指纹图谱专属性强、结果稳定。可为四逆汤的质量评价和控制提供依据;传统煎法与现代煎药机制备的四逆汤在主要化学成分组成上无明显差异。

关键词 传统煎法;煎药机;四逆汤;指纹图谱

Comparative Study on the HPLC Fingerprint of Sini Decoction Prepared by Traditional Decoction and Modern Machine Decoction

HUANG Yusheng¹, TANG Hongmei², ZHAO Yuanming², WANG Ting¹, CHAI Yu¹, LIU Yuan¹, ZHONG Rufan¹
(1.The First Clinical Medical College of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510006, China; 2.The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the HPLC fingerprints for Sini decoction and compare the differences of compositions of Sini decoction prepared by traditional decoction and modern machine decoction. METHODS: HPLC was performed on the column of Kromasil C₁₈ with mobile phase of acetonitrile -0.1% phosphoric acid (gradient elution) at a flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 235 nm, column temperature was 30 ℃, and injection volume was 10 μl. The HPLC fingerprints of 10 batches of Sini decoction were determined with reference peak of liquiritin peaks, and common peak identification and similarity evaluation were conducted by using Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System (2004 A edition). RESULTS: There were 18 common peaks and the similarity was no less than 0.982. According to the verification, the fingerprint of 10 batches of Sini decoction showed good similarity with reference fingerprint, and the similarity of 10 batches of Sini decoction was high, which was prepared by the 2 methods. CONCLUSIONS: The established fingerprint is specific and stable, and can provide reference for quality evaluation and control for Sini decoction; and there are no obvious differences in the main chemical compositions of Sini decoction prepared by traditional decoction and modern machine decoction.

KEYWORDS Traditional decoction; Decoction machine; Sini decoction; Fingerprint

中药煎剂是我国医疗史上历史最久,至今仍被广泛应用的一种剂型,其符合中医辨证施治、随症加减、全面兼顾的要求,具有服用方便、疗效快的特点。但是,中药煎剂传统煎法耗时长、操作不便,难以适应现代生活的快节奏,而煎药机煎药具有节能省时、卫生方便等特点,并被应用到医疗机构中为患者服务。在提高煎药效率、方便大众的同时,这种现代煎药模式的安全性和有效性也一直是医生和患者关注的问题。笔者以经典名方四逆汤为研究对象,采用高效液相色谱法(HPLC),建立指纹图谱,比较传统煎法与现代煎药机制备的煎剂的主要化学成分组成的差异,从物质基础上探讨煎药机煎药的安全性和有效性,对指导临床上中药的煎煮具有一定参考作用。

1 材料

1.1 仪器

* 博士研究生。研究方向:中药新药开发与安全性评价。E-mail: huangsheng87@163.com

通信作者:主任中药师,教授,博士生导师。研究方向:中药新药开发与安全性评价。E-mail: tanghongmei2000@163.com

1260型HPLC仪,包括G1314F VWD检测器(美国Agilent公司);中药煎药机(北京东华原医疗设备有限公司);RE-2000型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);KQ-400KDE型高功率超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);BP211D型电子分析天平(德国Sartorius公司)。

1.2 试剂

甘草苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111610-201106,纯度:93.7%);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

1.3 饮片

淡附片(批号:150306821)、炙甘草(批号:150304481)、干姜(批号:150309921)均购自广东康美药业股份有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸(B),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.0 ml/min;检测波长:235 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μl。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间, min	A, %	B, %
0	5	95
18	20	80
40	34	66
55	60	40
65	65	35
70	100	0
75	100	0
80	5	95

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取甘草苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成甘草苷质量浓度为125 μg/ml的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密量取样品25 ml,在旋转蒸发器上减压蒸干,加甲醇5 ml,超声(功率:250 W,频率:40 kHz)处理30 min,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 四逆汤(样品) (1)传统煎法 按处方取3剂药材饮片,分别同时煎煮,每剂附子加水600 ml浸泡30 min后煎1 h,干姜和甘草加水400 ml浸泡30 min后,与先煎的附子一起煎煮,武火煮沸后改用文火煎煮30 min将药液滤出;药渣再加水400 ml,武火煮沸后用文火煎煮20 min,药液滤出。合并所有滤液,浓缩至900 ml(编号:A-1~A-5)。(2)现代煎药机法 按处方取3剂药材饮片,附子加水1 200 ml浸泡30 min后煎1 h,干姜和甘草加水800 ml浸泡30 min后与先煎的附子一起煎煮,武火煮沸后改用文火煎煮30 min,将药液滤出;药渣再加水800 ml,武火煮沸后用文火煎煮20 min,药液滤出。合并所有滤液,浓缩至900 ml(编号B-1~B-5)。

2.2.4 单味药材溶液 分取3味药材饮片,各按“2.2.3”项下传统煎法制备单一样品,再按“2.2.2”项下方法制备单味药材溶液。

2.3 方法学验证

2.3.1 精密度的试验 取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,以甘草苷的保留时间和峰面积为参照峰,记录各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果,各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均<3%(n=6),表明仪器精密性良好。

2.3.2 稳定性试验 取“2.2.2”项下供试品溶液适量,分别于室温下放置0、3、6、12、24 h时进样测定,记录峰面积。以甘草苷的保留时间和峰面积为参照峰,记录各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果,各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均<3%(n=5),表明供试品溶液在24 h内基本稳定。

2.3.3 重复性试验 取同一批样品适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共5份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,以甘草苷的保留时间和峰面积为参照峰,记录各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果,各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均<3%,表明本方法的重复性良好。

2.4 指纹图谱的建立及共有峰的指认

2.4.1 指纹图谱的建立 取10批样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,得特征指纹图谱,详见图1。

2.4.2 对照图谱的生成 采用国家药典委员会颁布的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004年A版)对10批样品进行对照图谱拟合。结果表明,两种方法制备的10批样品有18个共有峰,以7号峰(甘草苷)为参照峰,详见图2。

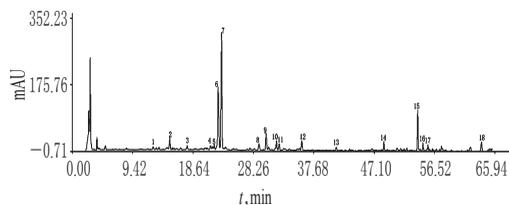


图1 10批样品的高效液相色谱图

Fig 1 Overlay plot of HPLC fingerprint of 10 batches of samples

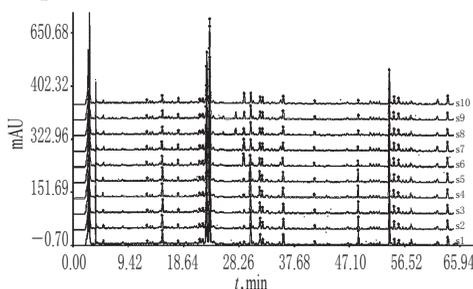


图2 10批样品的共有峰高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of common peaks of 10 batches of samples

2.4.3 指纹图谱中特征峰的鉴定及药材归属 取“2.2”项下对照品溶液、四逆汤和单味药材溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,得四逆汤和甘草苷、单味药材特征指纹图谱(见图3)。结果表明,7号峰为甘草苷,源于炙甘草;2、5、6、9、10、11、12、14、16、17号峰均源于炙甘草;1、3、8号峰源于附子;4、10、13、15、18号峰源于干姜。

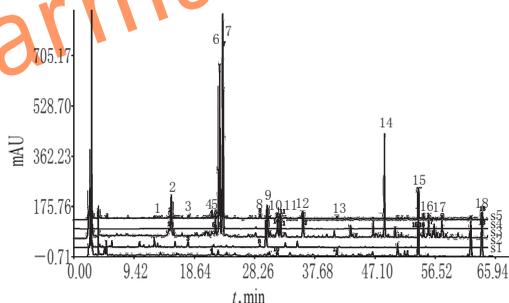


图3 四逆汤对照图谱与甘草苷、单味药材图谱

Fig 3 Control HPLC fingerprint of sini decoction and HPLC fingerprint of liquiritin and each herbs

2.4.4 相似度分析 采用国家药典委员会中药指纹图谱相似度软件(2004年A版)对10批样品的相似度进行分析比较(以A-1为对照)。结果,两种煎药方法制备的10批样品的相似度在0.982~0.997之间,表明传统煎法和煎药机制备的四逆汤相似度极高(见表2)。10批样品共有峰的相对保留时间和相对峰面积见表3、表4。

表2 10批样品相似度评价结果

Tab 2 Similarity evaluation results of 10 batches of samples

样品编号	相似度	样品编号	相似度
A-1	1	B-1	0.982
A-2	0.997	B-2	0.983
A-3	0.996	B-3	0.989
A-4	0.996	B-4	0.989
A-5	0.996	B-5	0.983

3 讨论

目前,关于传统煎法和现代煎药机制备的煎剂的主要化

表3 10批样品共有峰的相对保留时间

Tab 3 Relative retention time of common peaks of 10 batches of samples

峰号	样品编号									
	A-1	A-2	A-3	A-4	A-5	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5
1	0.543	0.542	0.544	0.541	0.544	0.541	0.541	0.542	0.542	0.542
2	0.654	0.652	0.655	0.653	0.655	0.653	0.650	0.654	0.654	0.653
3	0.770	0.770	0.771	0.770	0.770	0.771	0.769	0.772	0.771	0.771
4	0.926	0.926	0.927	0.926	0.927	0.927	0.927	0.927	0.927	0.927
5	0.951	0.951	0.951	0.951	0.951	0.951	0.951	0.951	0.952	0.951
6	0.977	0.977	0.977	0.977	0.977	0.978	0.978	0.977	0.978	0.977
7(s)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
8	1.252	1.253	1.251	1.251	1.252	1.251	1.250	1.252	1.251	1.251
9	1.299	1.298	1.296	1.296	1.295	1.301	1.300	1.301	1.300	1.300
10	1.370	1.369	1.367	1.367	1.366	1.368	1.367	1.369	1.369	1.369
11	1.388	1.387	1.385	1.385	1.384	1.386	1.386	1.388	1.387	1.387
12	1.539	1.539	1.537	1.537	1.538	1.538	1.536	1.539	1.538	1.538
13	1.770	1.769	1.766	1.766	1.768	1.770	1.767	1.770	1.769	1.769
14	2.088	2.088	2.085	2.087	2.087	2.092	2.087	2.090	2.088	2.087
15	2.315	2.314	2.311	2.314	2.314	2.319	2.313	2.316	2.313	2.313
16	2.350	2.349	2.347	2.349	2.350	2.354	2.348	2.351	2.347	2.348
17	2.384	2.383	2.380	2.382	2.383	2.387	2.382	2.385	2.381	2.382
18	2.742	2.741	2.738	2.741	2.742	2.746	2.740	2.743	2.740	2.741

表4 10批样品共有峰的相对峰面积

Tab 4 Relative peak area of common peaks of 10 batches of samples

峰号	样品编号									
	A-1	A-2	A-3	A-4	A-5	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5
1	0.027	0.022	0.022	0.024	0.024	0.033	0.033	0.032	0.030	0.034
2	0.125	0.113	0.111	0.118	0.118	0.084	0.077	0.079	0.075	0.079
3	0.030	0.028	0.027	0.030	0.030	0.055	0.053	0.049	0.047	0.054
4	0.036	0.029	0.028	0.030	0.031	0.039	0.034	0.033	0.034	0.035
5	0.026	0.024	0.022	0.024	0.023	0.030	0.031	0.028	0.028	0.030
6	0.668	0.586	0.590	0.583	0.579	0.751	0.740	0.696	0.696	0.739
7(s)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
8	0.027	0.025	0.024	0.025	0.025	0.169	0.162	0.090	0.093	0.162
9	0.212	0.178	0.178	0.183	0.182	0.121	0.123	0.146	0.148	0.124
10	0.111	0.110	0.111	0.113	0.113	0.061	0.062	0.061	0.061	0.062
11	0.049	0.056	0.057	0.057	0.057	0.074	0.074	0.073	0.073	0.074
12	0.114	0.098	0.099	0.102	0.102	0.089	0.092	0.102	0.104	0.093
13	0.032	0.033	0.034	0.036	0.034	0.039	0.037	0.031	0.030	0.035
14	0.097	0.075	0.076	0.078	0.078	0.043	0.031	0.036	0.036	0.031
15	0.254	0.285	0.287	0.292	0.292	0.378	0.357	0.288	0.285	0.353
16	0.042	0.055	0.055	0.057	0.057	0.070	0.068	0.066	0.068	0.068
17	0.031	0.041	0.042	0.043	0.043	0.041	0.041	0.037	0.038	0.042
18	0.095	0.097	0.098	0.100	0.099	0.120	0.129	0.089	0.094	0.130

学成分的差异性研究有大量的报道,多是以药液的浸膏率、某个或几个化学成分的含量、临床观察治愈率等单个或多个指标综合评价对比^[1-2]。安小梅等^[3]以生脉饮为代表方剂,选择分光光度计法和HPLC法分别建立多糖、总皂苷、五味子醇甲的含量测定方法,同时计算浸膏率,对于这3个指标,传统煎法与现代煎药机各有优劣。唐进法等^[4]应用HPLC、气相色谱(GC)法对比薄荷、徐长卿、肉桂、丁香、牡丹皮5种饮片在不同时间点、不同煎煮方法下挥发性成分的含量差异,结果表明现代煎药机制备的煎剂的挥发性成分含量高于传统煎法。龚建华^[5]给对照组患者服用传统煎法制备的六味地黄汤,给观察组患者服用现代煎药机制备的六味地黄汤,观察所煎药物浸出物的浸出率和患者的治愈率,结果传统煎法的浸出率较高,但在

治愈率上两者无明显差异。

笔者在研究中,同时选择了甘草苷、乌头碱作为参照物,结果未能测到乌头碱,这是因为乌头碱性质不稳定,在炮制过程和提取过程因加热会降解成毒性较低的单酯型生物碱^[6]。乌头碱毒性较大,使用不当易发生心律失常,甚至中毒死亡^[7-8];2015年版《中国药典》规定生附子的乌头碱等双酯型生物碱的总含量不得过0.020%^[9],临床多用炮制品,常先煎或久煎,以提高用药安全性。本研究所用炮制后的淡附片中乌头碱含量极低,再经过长时间煎煮后,其含量也大大减少,所以本研究建立的指纹图谱未选择乌头碱为对照品。

本研究对乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸、乙腈-0.3%磷酸等不同流动相系统进行筛选,最后确定乙腈-0.1%磷酸为流动相进行梯度洗脱。检测波长参照2015年版《中国药典》中3味药材含量测定的检测波长和参考文献^[9-12],对比了不同波长(235、280、345 nm)指纹图谱峰的个数,结果以235 nm波长出峰最多。供试品溶液的制备中比较了不同溶度甲醇的提取效果,结果甲醇提取效果较优。

10批四逆汤的指纹图谱相似度在0.982~0.997之间,说明煎药机制备的四逆汤的主要化学成分组成与传统煎法基本一致,初步提示现代煎药机煎药可保障临床用药的安全性、有效性,后续研究将继续考察两种四逆汤中双酯型生物碱新乌头碱、次乌头碱以及单酯型生物碱苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱等的含量差异,为现代煎药机煎煮的安全、有效性提供更充足的证据。

参考文献

- [1] 慈慧.煎药机和传统煎药方法的比较及分析[J].中国药事,2011,25(2):155.
- [2] 朱雪莲.煎药机煎法对中药复方煎剂总浸出物及有效成分的影响[J].中国医药导报,2013,10(7):121.
- [3] 安小梅,谈静,宋英.补益类代表方生脉饮煎煮方法的研究[J].中国药房,2012,23(35):3300.
- [4] 唐进法,李学林.中药煎药机对饮片挥发性成分煎出量影响的研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(13):89.
- [5] 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,2013,6(12C):156.
- [6] 张意涵,杨昌林,黄志芳,等.附子煎煮过程中13种生物碱含量的动态变化规律研究[J].药物分析杂志,2015,22(1):16.
- [7] 吕桂玲,张一民,宋兴芳,等.653例含乌头碱类药物致不良反应文献分析[J].中国药房,2007,18(5):374.
- [8] 韩旭,侯娅婕.乌头碱药理作用及毒性研究进展[J].中国处方药,2014(12):149.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:14、87、191.
- [10] 卢苇,梁光义,杨玉琴,等.四逆汤HPLC指纹图谱研究[J].时珍国医国药,2013,24(3):661.
- [11] 刘晓,范林乾,蔡皓,等.RP-HPLC同时测定四逆汤中3种双酯型乌头碱的含量[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(22):105.
- [12] 李莹,章津铭,傅超美,等.不同方法制备四逆汤中化学成分对比研究[J].中成药,2012,34(4):673.

(收稿日期:2015-11-27 修回日期:2016-03-01)

(编辑:张静)