

基于 HPLC 指纹图谱评价的当归补血汤传统汤剂与配方颗粒汤剂的成分差异分析

姚 静^{1,4}, 施钧瀚^{1,4}, 桂新景¹, 王青晓³, 王艳丽², 张 璐¹, 康 欢², 田亮玉², 李学林^{1,2,4}, 刘瑞新^{1,2,4*}

1. 河南中医药大学第一附属医院, 河南 郑州 450000

2. 河南中医药大学, 河南 郑州 450008

3. 河南省食品药品检验所, 河南 郑州 450000

4. 呼吸疾病诊疗与新药研发河南省协同创新中心, 河南 郑州 450000

摘要: 目的 以当归补血汤为研究对象, 比较其传统汤剂、自制配方颗粒汤剂与市售配方颗粒剂化学成分种类和含量的差异, 为中药配方颗粒的临床应用提供科学依据。方法 采用 HPLC 建立指纹图谱, 从化学成分的种类、指标性成分含量、共有峰峰面积总和、指纹图谱的相似度 4 个方面进行评价。结果 色谱峰数目由传统汤剂的 15 个共有色谱峰到配方颗粒的 13 个 (A 厂)、12 个 (自制)、11 个 (B 厂)、9 个 (C 厂)。指标成分的含量上, 配方颗粒中阿魏酸含量与传统汤剂存在显著性差异 ($P < 0.05$), 其中阿魏酸含量: 传统汤剂 > A 厂配方颗粒汤剂 > 自制配方颗粒汤剂 > B 厂配方颗粒汤剂 > C 厂配方颗粒汤剂; 毛蕊异黄酮苷含量: 自制配方颗粒汤剂 > 传统汤剂 > A 厂配方颗粒汤剂 > B 厂配方颗粒汤剂 > C 厂配方颗粒汤剂。配方颗粒汤剂中共有峰峰面积的总和均低于传统汤剂, 若传统汤剂为 1, 其他 (自制和 A、B、C 3 厂家) 分别相当于 0.95、0.66、0.40、0.47。自制配方颗粒汤剂以及 A、B 厂配方颗粒与传统汤剂相比相似度较高 (0.97、0.96、0.98), C 厂家稍低 (0.85)。通过对当归补血汤主要色谱峰进行归属发现, 其色谱峰基本均来自各单味药材, 在本实验条件下, 未见明显的新化学成分的产生, 配方颗粒汤剂较传统汤剂有成分的消失。结论 当归补血汤传统汤剂与配方颗粒汤剂相比, 传统汤剂无论在指标成分的含量还是特征图谱中色谱峰的数量上均高于配方颗粒汤剂, 两者存在一定的差异。这表明配方颗粒标识的临床当量与汤剂实际不符, 应对中药配方颗粒的临床推荐当量进行校正, 促进临床合理应用; 同时也为国家中药配方颗粒质量的统一化管理提供科学的研究思路。

关键词: 当归补血汤; 传统汤剂; 配方颗粒汤剂; 指纹图谱; 相似度; HPLC; 阿魏酸; 毛蕊异黄酮苷; 当归; 黄芪

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)11-2567-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.11.010

Analysis of ingredients difference between Danggui Buxue Decoction and formula granule decoction based on HPLC fingerprint evaluation

YAO jing^{1,4}, SHI Jun-han^{1,4}, GUI Xin-jing¹, WANG Qing-xiao³, WANG Yan-li², ZHANG Lu¹, KANG Huan², TIAN Liang-yu², LI Xue-lin^{1,2}, LIU Rui-xin^{1,2,4}

1. The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China

2. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China

3. Henan Province Food and Drug Inspection Institute, Zhengzhou 450000, China

4. Collaborative Innovation Center for Respiratory Disease Diagnosis and Treatment & Chinese Medicine Development of Henan Province, Zhengzhou 450000, China

收稿日期: 2019-01-25

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81773892); 河南省高等学校重点科研项目 (16A360021); 河南省中医药科学研究专项课题 (2016ZY2055); 河南省首批自然科学基金面上项目 (162300410187); 河南省中医管理局国家中医临床研究基地科研专项 (2018JDZX039); 河南省中医管理局首届河南省中医药传承与创新人才工程 (仲景工程) “河南省中医药拔尖人才培养项目资助” (豫中医科教 [2018] 35 号)

作者简介: 姚 静 (1975—), 女, 硕士, 副主任药师, 从事中药制剂研发和质量分析研究。Tel: (0371)66233639 E-mail: enjing2004@126.com

***通信作者** 刘瑞新 (1980—), 男, 博士, 研究生导师, 副主任药师, 从事中药药剂及其质控分析研究。

Tel: (0371)66233562 E-mail: liuruixin7@163.com

Abstract: Objective Taking Danggui Buxue Decoction (DBD) as the research object, the differences of chemical composition types and content among traditional decoction, self-made granule decoction and marketable granule decoction were compared, in order to provide scientific basis for clinical application of Chinese medicine formul granules. **Methods** The fingerprint was established by HPLC. The value of the chemical composition, the content of the index components, the area of the common peak area, and the similarity of the fingerprint were evaluated, and the different dosage forms of the decoction of DBD were investigated. The effect of chemical composition on the chemical equivalence of traditional decoction and formula granules was compared. **Results** The number of chromatographic peaks ranged from 15 peaks of traditional decoction to 13 (factory A), 12 (self-made), 11 (factory B), and 9 (factory C). The content of ferulic acid in formula granules was significantly different from that in traditional decoction ($P < 0.05$). Among them, ferulic acid content was in order: traditional decoction > formula granule decoction of factory A > self-made formula granule decoction > formula granule decoction of factory B > formula granule decoction of factory C. Content of campanulin was in order: self-made formula granule decoction > traditional decoction > formula granule decoction of factory A > formula granule decoction of factory B > formula granule decoction of factory C. The total peak area of formula granule decoction was lower than that of traditional decoction. If the traditional decoction was 1, the others (self-made and factories A, B, C) were equivalent to 0.95, 0.66, 0.40 and 0.47, respectively. Comparing with traditional decoction, self-made formula granule decoction and formula granules from factories A and B had higher similarity (0.97, 0.96, 0.98), while that from factory C was slightly lower (0.85). The main chromatographic peaks of DBD were found to be from the single herbs and no new chemical components were found. The disappearance of ingredients in formula granule Decoction was found. **Conclusion** The content of index components and the number of chromatographic peaks of traditional decoction of DBD is higher than those in the formula granule decoction. There are some differences between them. This indicates that the clinical equivalence of formula granules is not consistent with the reality of decoction, so the recommended clinical equivalence of formula granules of traditional Chinese medicine should be corrected to promote rational clinical application, which can provide scientific research ideas for the unified management of the quality of formula granules of Chinese materia medica.

Key words: Danggui Buxue Decoction; traditional decoction; formulated granule decoction; fingerprint; similarity; HPLC; ferulic acid; campanulin; *Angelicae Sinensis Radix*; *Astragali Radix*

中药配方颗粒 (Dispensing Granule of Chinese Medicine, DGCM) 是由单味中药饮片经提取、浓缩、制粒、分装等现代制药技术制成, 用于临方调配成汤剂, 即配方颗粒汤剂 (Dispensing Granule Decoction, DGD)。其在保持传统汤剂 (Traditional Decoction, TD) 随证加减优势的前提下, 改进了 TD 的绝大多数弊端, 是对 TD 的一次突破^[1-2]。但自其试点二十多年以来, 并未得到业界共识和有效推广, 根本原因就是 DGCM 汤剂和 TD 的等效性问题未获根本解决; 此外, 配方颗粒自身也存在一些问题^[3], 比如目前中药配方颗粒尚无统一的质量标准, 造成其质量参差不齐, 同样限制了配方颗粒剂的发展。

近年来关于二者对比的研究非常多^[4-7], 也取得了很多成绩, 但总体上存在没有多种类、多批次、多层次的综合系统分析和比较^[8]。另外, 对于 DGCM 的工艺优化^[9]、临床应用等应用研究较多, 而基础研究比较薄弱。特别是, 大多研究目的倾向于得出一个孰优孰劣、非此即彼的结论, 而不是总结规律。DGCM 和中药注射剂、组分中药等新事物一样, 都处在不断地探索和实践之中。研究需要从基础入手, 多层次全面地掌握规律, 不断改进。本实验根据中

医药理论, 化繁为简, 以相须药对研究为切入点, 对 TD 和 DGD 的差异进行研究。药对既是复方的一种特殊形式, 又是复方的组方基础, 基于药对的研究在方法学上具有突出的代表意义。

当归补血汤 (Danggui Buxue Decoction, DBD), 方出《内外伤辨惑论》, 由当归、黄芪组成, 补气生血, 用于血虚阳浮发热证, 为补气生血代表方, 也是体现李东垣“甘温除热”治法的代表方^[10]。当归和黄芪在临床上极为常用, DBD 的 TD 和 DGD 临床应用亦很广泛, 具有一定的代表性。故本实验以相须药对当归和黄芪及其二味药组成的经典方剂 DBD 为药物研究载体, 通过获取其 TD 与 DGD HPLC 特征图谱及相关信息, 比较二者在化学成分方面的差异, 为 TD 的改革及配方颗粒的科学合理应用奠定基础。

1 仪器与材料

Waters e2695 型高效液相色谱仪、Waters2998 型紫外检测器、EmPower 色谱工作站, 美国 Waters 公司; CF225D 型电子天平, 德国赛多利斯集团; HK250 型科导台式超声波清洗器, 上海汉克科学仪器有限公司; JXJ-IIB 型离心机, 上海安亭科学仪器厂; 微型喷雾干燥机, 瑞士步琪实验仪器公司。

乙腈、甲醇、磷酸为色谱纯,美国 Sigma 公司;超纯水 (MilliPoreQ, 18.2 MQ·cm), 其他试剂均为分析纯。

黄芪 (产地内蒙古, 10 批批号分别为 160301、160401、160909、161001、161101、161111、161112、161002、161007、161015)、当归 (产地甘肃, 10 批批号分别为 160501、160706、160905、160910、161001、161002、161021、161110、161111、161126) 饮片分别购自于郑州市几家中医院和药店, 经河南中医药大学第一附属医院陈天朝主任药师鉴定为豆科黄芪属植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根、伞形科当归属植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根; 9 批黄芪配方颗粒 (A 厂 3 批, 批号 1601628、1607633、1605608; B 厂 3 批, 批号 1609001、1612024、1602031; C 厂 3 批, 批号 16030081、16032685、16030402), 9 批当归配方颗粒 (A 厂 3 批, 批号 1601622、1605616、1608636; B 厂 3 批, 批号 16080116、161003w、1511001s; C 厂 3 批 16010013、16101025、16120502); 毛蕊异黄酮苷、阿魏酸对照品, 批号分别为 P13J8F28608、H25M6L1, HPLC 测定质量分数均 $\geq 98\%$, 上海源叶生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent Zorbax SB-Aq 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-0.1 mol/L 磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~10 min, 15%~18%乙腈; 10~20 min, 18%~24%乙腈; 20~35 min, 24%~40%乙腈; 35~40 min, 40%乙腈; 40~45 min, 40%~15%乙腈; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 260 nm; 柱温 25 $^{\circ}$ C; 进样量 10 μ L。

2.2 样品的制备

2.2.1 TD 样品^[1] 按当归-黄芪 1:5 组方, 称取当归饮片 6 g 和黄芪饮片 30 g, 加入 288 mL 的水, 浸泡 30 min; 武火煮沸后转为文火, 煎煮 30 min, 滤过, 滤液备用; 取药渣加水 216 mL, 煎煮 25 min, 合并 2 次滤液, 离心, 取上清液定容至 100 mL 量瓶中, 备用, 同法制备 3 批。

2.2.2 自制 DGD 样品 取当归饮片 60 g, 加入 480 mL 水, 浸泡 30 min, 煎煮 30 min, 得药液; 药渣加水 360 mL, 煎煮 25 min, 得药液, 合并 2 次药液, 喷雾干燥, 湿法制粒, 得当归配方颗粒, 同法制备

3 批。取黄芪饮片 300 g, 加入 2 400 mL 水, 浸泡 30 min, 煎煮 30 min, 得药液; 药渣加水 1 800 mL, 煎煮 25 min, 得药液, 合并 2 次药液, 浓缩至适量, 减压干燥, 粉碎, 湿法制粒, 得黄芪配方颗粒, 同法制备 3 批。取相当于当归饮片 6 g, 黄芪饮片 30 g 的配方颗粒置于 100 mL 量瓶中, 加一定量温水溶解并定容至刻度, 混匀, 得自制 DGD, 同法制备 3 批。

2.2.3 A、B、C 厂 DGD 样品 取相当于当归饮片 6 g, 黄芪饮片 30 g 的 A、B、C 厂配方颗粒 (各 3 批) 置 100 mL 量瓶中, 加温水使溶解并定容至刻度, 混匀, 即得。

2.3 供试品溶液的制备

取“2.2”项下 3 批 TD, 3 批自制 DGD, 3 批 A 厂、3 批 B 厂及 3 批 C 厂 DGD 各 25 mL, 分别置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 超声提取 25 min, 冷却至室温, 补充溶剂至刻度, 摇匀, 静置, 取上清液过 0.45 μ m 微孔滤膜, 即得。TD 3 批与之相对应的 3 批自制配方颗粒以及 3 厂家各 3 批配方颗粒分别标记为 S1~S15。

2.4 对照品溶液的制备

精密称取毛蕊异黄酮苷对照品 6.52 mg 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 混匀, 得 0.652 mg/mL 对照品母液, 精密量取 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 混匀, 得 65.2 μ g/mL 对照品溶液。精密称取阿魏酸对照品 9.38 mg 置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 混匀, 得 187.6 μ g/mL 对照品母液, 精密量取 1 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 混匀, 得 18.76 μ g/mL 对照品溶液。

2.5 阴性供试品溶液的制备

2.5.1 当归阴性供试品溶液 原方去当归, 按 TD 样品溶液的制备方法制备当归阴性样品溶液, 并按“2.3”项下方法制备当归阴性供试品溶液。

2.5.2 黄芪阴性供试品溶液 原方去黄芪, 按 TD 样品溶液的制备方法制备黄芪阴性样品溶液, 并按“2.3”项下方法制备黄芪阴性供试品溶液。

2.6 方法学考察

2.6.1 精密度试验 精密吸取 S2 供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次测定, 记录色谱图。结果各主要共有特征峰的相对保留时间无明显变化, RSD 在 0.06%~0.30%; 相对峰面积 RSD 集中在 0.59%~2.27%; 毛蕊异黄酮苷、阿魏酸峰面积的 RSD 分别为 0.58%和 2.27%, 保留时间的 RSD

分别为 0.19% 和 0.11%，表明仪器精密度良好。

2.6.2 稳定性试验 精密吸取 S2 供试品溶液，分别于 0、4、6、8、12、24 h 按“2.1”项下色谱条件进样，结果各主要共有特征峰的相对保留时间无明显变化，RSD 在 0.17%~0.67%；相对峰面积 RSD 集中在 0.50%~4.41%；毛蕊异黄酮苷、阿魏酸峰面积的 RSD 分别为 1.0% 和 4.41%，保留时间的 RSD 分别为 0.18% 和 0.51%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.6.3 重复性试验 取同一批 TD 样品 (S2)，按“2.3”项下方法制备 6 份供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，结果各主要共有特征峰的相对保留时间无明显变化，RSD 在 0.14%~0.83%；相对峰面积 RSD 集中在 1.55%~4.64%；毛蕊异黄酮苷、阿魏酸峰面积的 RSD 分别为 1.63% 和 4.64%，保留时间的 RSD 分别为 0.29% 和 0.68%，表明该方法重复性良好。

2.6.4 线性关系考察 取 65.2 $\mu\text{g/mL}$ 毛蕊异黄酮苷对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样 2、4、6、8、10、12 μL ，以峰面积积分值为纵坐标 (Y)，进样量为横坐标 (X)，进行线性回归，得回归方程 $Y=4 \times 10^6 X - 53\ 915$ ， $r=0.999\ 9$ ，线性范围为 130.4~782.4 ng。取 18.76 $\mu\text{g/mL}$ 阿魏酸对照品溶液，分别按“2.1”项下色谱条件进样 2、4、6、8、10、12 μL ，以色谱峰面积积分值对进样量线性回归分析，得回归方程 $Y=1 \times 10^6 X - 11\ 513$ ， $r=0.999\ 9$ ，线性范围为 37.52~225.12 ng。

2.6.5 加样回收率试验 精密量取已测定指标成分量的同一批 DBD TD 样品 6 份，每份 12.5 mL，分

别精密加入毛蕊异黄酮苷、阿魏酸对照品混合溶液 (毛蕊异黄酮苷 54.2 $\mu\text{g/mL}$ 、阿魏酸 25.1 $\mu\text{g/mL}$) 1 mL，加甲醇至 25 mL，按照“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下条件进样测定，计算回收率，结果阿魏酸和毛蕊异黄酮苷的平均回收率分别为 103.2%、99.9%，RSD 分别为 3.60%、1.50%。

2.7 指纹图谱的建立及共有峰的确定

2.7.1 建立黄芪、当归单药的标准汤剂信息 分别取 10 批黄芪、当归饮片一定量，按“2.5”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项下色谱条件进行测定，记录色谱图，构建黄芪和当归单药汤剂的 HPLC 指纹图谱。根据测定结果，标示出 10 批黄芪汤剂中有 11 个共有色谱峰，10 批当归汤剂中有 14 个共有色谱峰。色谱图见图 1~2。

2.7.2 建立黄芪、当归药对即 DBD TD 的参比汤剂信息 分别取当归、黄芪饮片共 10 批，按“2.2.1”项 DBD TD 的制备方法制备样品，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项下所建立的色谱条件进样测定，记录色谱图，构建 DBD HPLC 指纹图谱。根据测定结果，标示出 10 批当归、黄芪药对即 DBD TD 供试品 (TD1~TD10) 中有 15 个共有色谱峰。见图 3。

2.7.3 TD、DGD 指纹图谱的采集 分别精密吸取“2.3”和“2.4”项下对照品溶液和各供试品溶液 10 μL ，注入液相色谱仪，按照“2.1”项下所建立的色谱条件进样测定，记录 DBD TD、自制 DGD 和 3 厂家 DGD 的 HPLC 指纹图谱。见图 4。

2.8 指纹图谱的比较

2.8.1 化学成分种类和数目的比较 通过指纹图谱

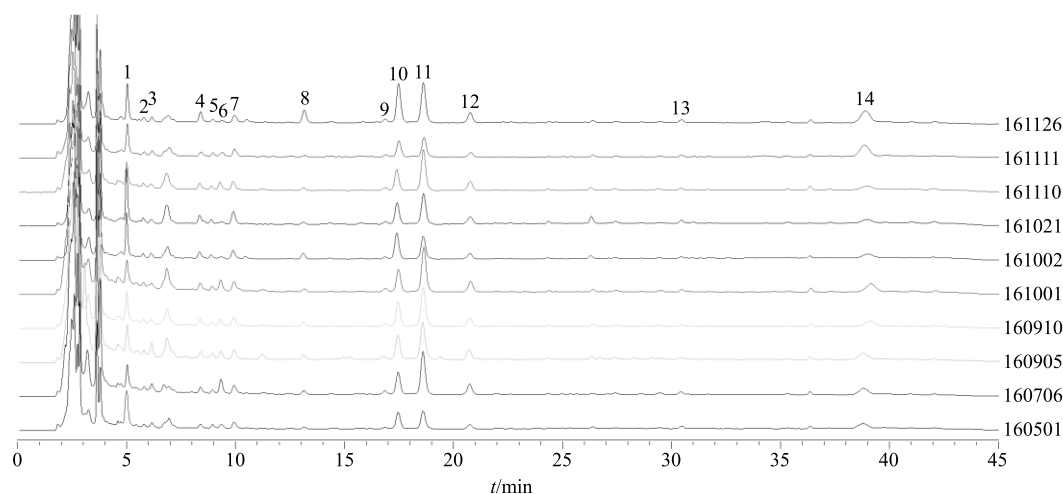


图 1 当归 10 批煎液的 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 Fingerprint of 10 batches of *Angelicae Sinensis Radix* decoction by HPLC

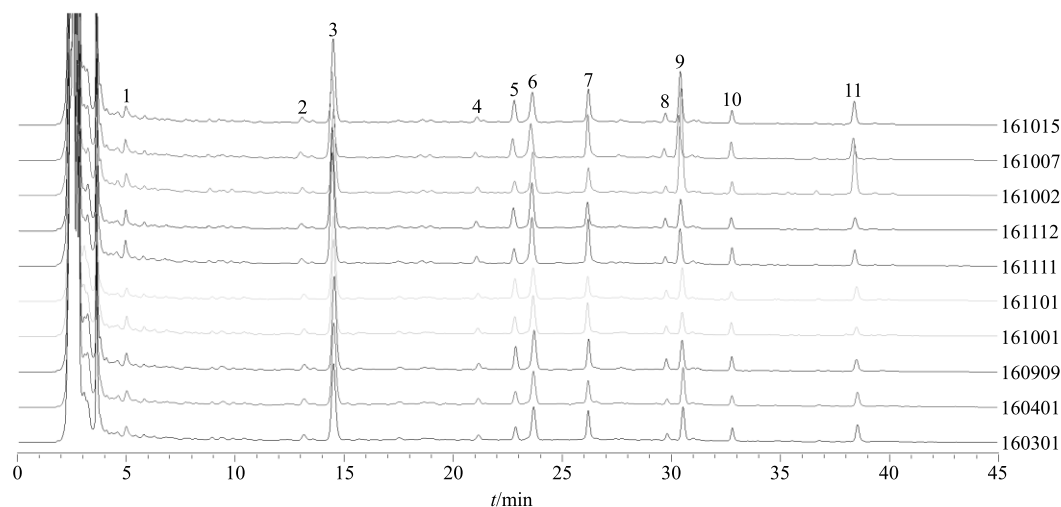


图 2 黄芪 10 批煎液的 HPLC 指纹图谱

Fig. 2 Fingerprint of 10 batches of *Astragali Radix* decoction by HPLC

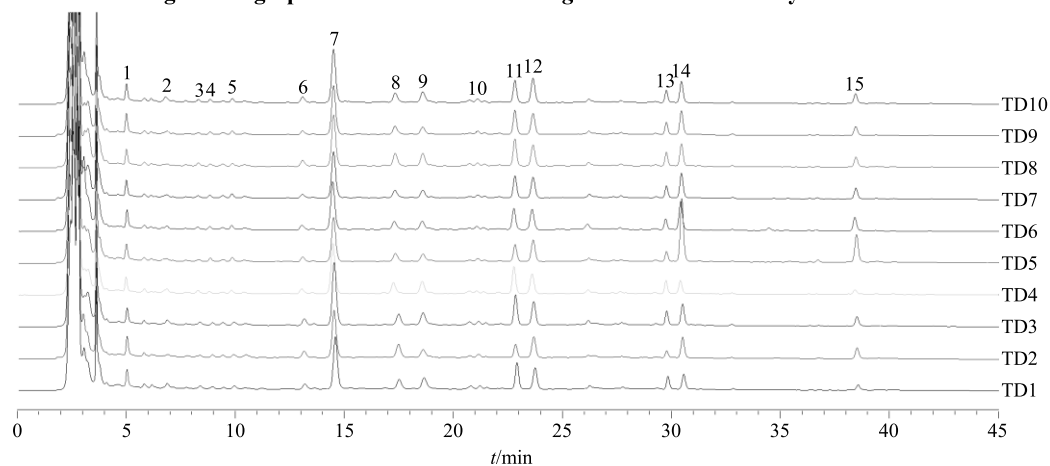
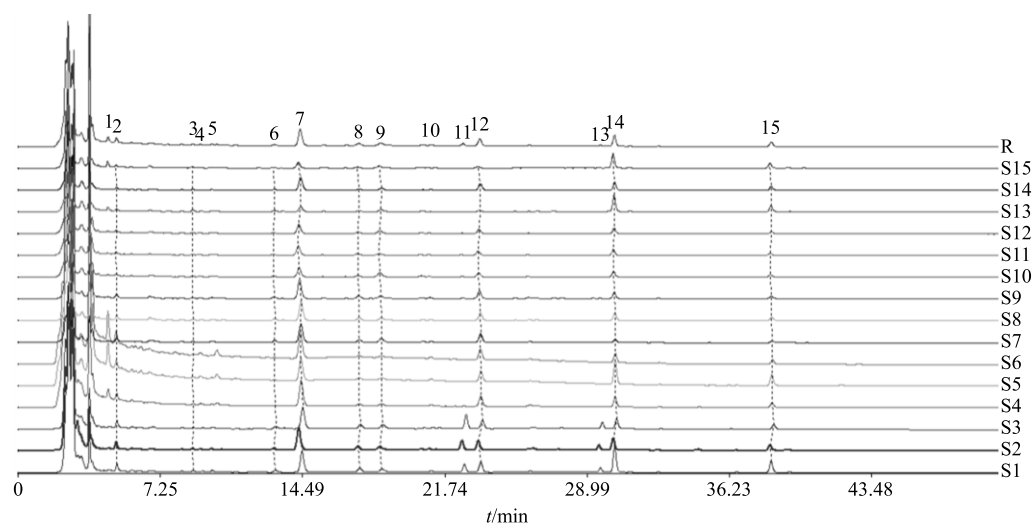


图 3 黄芪当归药对 10 批汤剂的 HPLC 指纹图谱

Fig. 3 Fingerprint of 10 batches of decoction of *Angelicae Sinensis Radix* and *Astragali Radix* by HPLC



S1~S3-TD S4~S6-自制 DGD S7~S15-A、B、C 3 个厂家 DGD

S1—S3-TD S4—S6-self-restraint formula granules S7~S15-formula granules of factories A, B, C

图 4 DBD 不同样品匹配色谱图 (260 nm)

Fig. 4 Matched chromatogram of different samples of DBD (260 nm)

峰数的比较, TD 中的 11、13 号峰在自制 DGD 和 3 厂家 DGD 中均不存在; 10 号峰在 B 厂家和 C 厂家中峰面积比较小, 几乎不见。通过指纹图谱峰面积的比较, 相同峰位的色谱峰峰面积不同, 与 TD 相比均有不同程度的降低。综上所述, 3 种汤剂在化学成分的种类和数目上存在有一定的差异, DGD 的色谱峰数目由 TD 的 15 个共有色谱峰到配方颗粒的 13 个 (A 厂)、12 个 (自制)、11 个 (B 厂)、9 个 (C 厂)。

2.8.2 共有峰总峰面积的比较 以 3 批 TD 色谱图中所有共有峰总峰面积的均值定为 1, 采用归一化法求得其他供试品共有峰总峰面积的相对值。结果

显示 5 类供试品 (TD、自制 DGD 及 A、B、C 厂 DGD) 中各成分含量的相对总和比值分别为 1.00、0.95、0.66、0.40、0.47, 说明 DGD 中各成分含量的总和均低于 TD。

2.8.3 TD、DGD 指纹图谱的相关性 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004A 版)》对 DBD TD、自制 DGD、3 厂家 DGD 3 种供试品的特征图谱相关参数进行评价, 设定参照图谱, 将色谱峰自动匹配, 生成对照图谱 (R, 平均值法), 并进行谱峰差异性评价和整体相似性评价。相似度评价结果表明, TD 和自制 DGD 以及 A、B 厂家与对照图谱的相似度较高, C 厂家稍低。见表 1。

表 1 相似度计算结果
Table 1 Calculation results of similarity

样品	相似度														
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15
S1	1.000														
S2	0.932	1.000													
S3	0.891	0.986	1.000												
S4	0.865	0.938	0.881	1.000											
S5	0.966	0.908	0.837	0.929	1.000										
S6	0.840	0.929	0.874	0.990	0.910	1.000									
S7	0.780	0.915	0.873	0.971	0.842	0.966	1.000								
S8	0.861	0.943	0.890	0.996	0.919	0.986	0.983	1.000							
S9	0.839	0.942	0.894	0.990	0.896	0.982	0.991	0.998	1.000						
S10	0.895	0.937	0.886	0.940	0.915	0.926	0.939	0.952	0.949	1.000					
S11	0.922	0.961	0.905	0.986	0.962	0.975	0.951	0.988	0.980	0.966	1.000				
S12	0.916	0.959	0.907	0.971	0.945	0.960	0.954	0.978	0.973	0.991	0.991	1.000			
S13	0.895	0.684	0.607	0.639	0.864	0.602	0.503	0.629	0.588	0.721	0.730	0.727	1.000		
S14	0.911	0.942	0.879	0.987	0.959	0.97	0.952	0.985	0.975	0.962	0.991	0.983	0.723	1.000	
S15	0.918	0.731	0.655	0.693	0.894	0.657	0.566	0.684	0.646	0.772	0.777	0.777	0.996	0.770	1.000
R	0.948	0.975	0.926	0.976	0.969	0.963	0.935	0.977	0.967	0.967	0.996	0.990	0.758	0.988	0.803

2.8.4 主要色谱峰的鉴定与归属 所构建的 DBD TD 指纹图谱确定了 15 个特征指纹峰, 其中经与对照品对比, 峰 7 为毛蕊异黄酮苷, 峰 8 为阿魏酸。如图 5 所示。将构建的黄芪、当归单味药材指纹图谱分别与 DBD TD 指纹图谱中的相应色谱峰进行对比, 并与缺黄芪、缺当归方比较, 发现 DBD 特征指纹图谱中 3~5、8、9 号峰主要为当归药材特征峰, 7、10~15 号峰主要为黄芪药材特征峰, 1、2、6 号峰在 2 种单味药材中均有。

结合全方与拆方对比, 结果表明, 在本实验条

件下, 2 味药合煎后, 无新化学成分产生, 各单方比全方中大部分同一化学成分的含量高, 少数有所下降, DGD 相比 TD 均有不同程度的降低。

2.8.5 已知成分含量的比较 采用外标两点法计算阿魏酸、毛蕊异黄酮苷的含量, 运用 t 检验评价 DGD 供试品中两者含量与 TD 的差异。由图 6 可知, 不同供试品中阿魏酸含量的排序为 TD>A 厂 DGD>自制 DGD>B 厂 DGD>C 厂 DGD, 而毛蕊异黄酮苷含量的顺序则为自制 DGD>TD>A 厂 DGD>B 厂 DGD>C 厂 DGD。

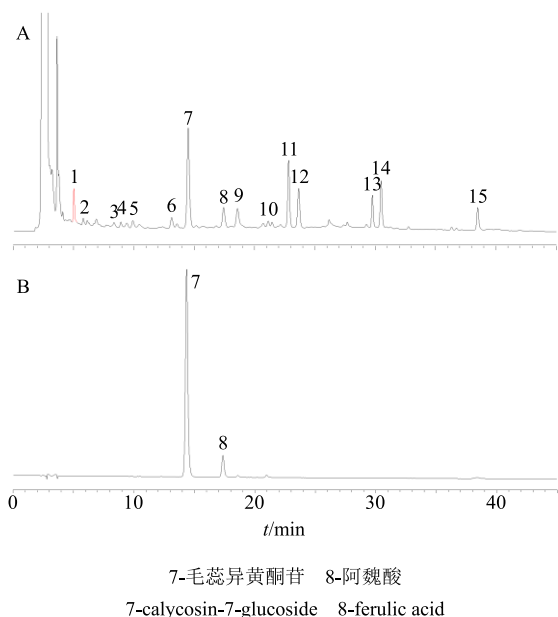


图 5 DBD TD (A) 和混合对照品 (B) 的 HPLC 图
Fig. 5 HPLC of DBD TD (A) and mixed reference substances (B)

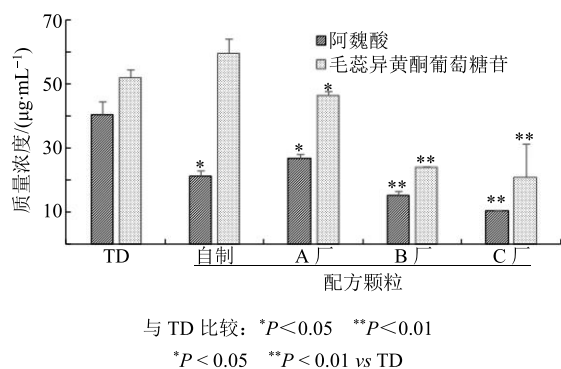


图 6 DBD 不同样品中阿魏酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 6 Comparison of content of ferulic acid and calycosin-7-glucoside in different samples of DBD

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

预试验比较了甲醇-甲酸水溶液、甲醇-磷酸水溶液以及乙腈-甲酸水溶液、乙腈-磷酸水溶液的梯度洗脱系统,结果表明乙腈-0.1%磷酸水溶液洗脱系统中出现的色谱峰较多且分离效果较好,能够满足指纹图谱对色谱峰的要求。分析了 190~400 nm 的指纹图谱,结合色谱峰个数和强度综合考察,结果表明在 260 nm 处可较全面地体现 DBD 各样品的图谱特征。

3.2 指标性成分的确定

当归主要含有挥发油有机酸生物碱酚类等多种

成分^[12],有机酸的阿魏酸为水溶性有效成分,因其可溶于水醇醋酸乙酯等溶剂,在制剂中容易被提取出来,但也易被各种因素(氧化水解)破坏^[13],被认为是当归药理作用的主要物质基础。黄酮类作为黄芪中的主要成分之一,其抗炎抗病毒调节免疫等多方面的药理作用非常显著^[14],毛蕊异黄酮苷作为黄芪药材中黄酮类的主要成分,已被《中国药典》2015 年版作为黄芪药材的指标性成分进行含量控制^[15]。DBD 包含了当归的有机酸、多糖和黄芪的黄酮类、皂苷类、多糖类等^[16]。故选择有机酸的代表阿魏酸、黄酮类的主要成分毛蕊异黄酮苷这 2 种成分作为指标性成分。

3.3 指标性成分含量分析比较

通过对比 TD、自制配方颗粒和 3 厂家 DGD 的指标性成分的含量测定结果发现,阿魏酸在汤剂中的含量明显高于在配方颗粒剂中的含量,而毛蕊异黄酮苷在汤剂中的含量低于在自制配方颗粒剂中的含量而高于 3 厂家 DGD。复方煎煮过程中,常因成分之间增溶、络合、成盐、氧化、水解、还原等反应的发生,导致一些成分的含量发生变化,甚至产生新成分^[17]。TD 中阿魏酸的含量远大于自制 DGD,表明阿魏酸含量随着制备工艺的变化有显著改变;3 厂家配方颗粒中有 2 家毛蕊异黄酮苷的含量明显较低,表明配方颗粒在质量控制方面应有统一标准,否则易影响到临床使用效果。这也进一步提示临床用药时应以 TD 为参考标准,结合各类汤剂的成分特点、药性特点及病患特点等全面权衡,合理确定给药剂量。

3.4 指纹图谱的分析比较

指纹图谱技术能全面反映中药饮片或制剂的内在化学特征,具有“整体性”和“模糊性”特点,适用于评价中药配方颗粒的质量^[18]。本实验通过比较 DBD TD、自制 DGD 与 3 厂家 DGD 的指纹图谱,结果 3 种复方在化学成分的种类、数目和含量上均有一定的差异,汤剂的化学成分种类稍多,其含量因化学成分不同而有升有降。并对其相关性进行分析,结果汤剂、自制颗粒剂、3 厂家配方颗粒剂与标准汤剂的相似度为 0.85 以上,因为 TD 和 DGD 制备工艺过程不同,但原料来源基本是统一的,所以相似度较高。特别是自制 DGD 与 3 批 TD 的饮片相同,其指标性成分含量以及共有峰面积和与 TD 相比差异较小,但在 260 nm 处,与 TD 的指纹图谱相比,自制 DGD 和 3 厂家 DGD 的图谱均有明显的

色谱峰消失,并且相同峰位色谱峰的峰面积也存在差异;3个特征图谱比较后说明TD的化学成分种类稍多,配方颗粒相对较少,而共有成分的含量有升有降;表明中药单煎混合与复方合煎在化学成分方面还是存有一定的差异。

与此同时,在建立指纹图谱的同时,本实验对全方中的各个峰进行了归属。就目前色谱条件来看,DBD的各指纹峰均来自各单味药材;从色谱峰数目来看,指认的复方15个特征峰中,来自黄芪药材的居多,当归较少。

综合分析,TD与DGD相比,其化学成分的含量可随着中药饮片、制备工艺等不同而有所差异。TD无论在指标成分的含量还是特征图谱的数量上均高于DGD,这在某种程度上论证了TD相比配方颗粒的优越性。本实验通过全面对比二者的成分差异,以及特征图谱的比较,说明TD的化学成分种类稍多,配方颗粒相对较少,而共有成分的含量有升有降。因此,TD在配伍方面具有明显的优势,充分体现了中医处方的理论机制,同时提示应对中药配方颗粒的临床推荐当量进行校正,促进临床合理应用;也为国家制定中药配方颗粒统一质量标准提供新思路。

本实验仅从体外化学成分层面对其进行对比,其入血成分及相应药效层面的对比,课题组后续将进行深入探讨,以获取更全面的二者差异规律。

参考文献

- [1] 刘瑞新,施钧瀚,张璐,等.中药汤剂改革和中药配方颗粒研究的新思路[J].中医学报,2014,29(2): 239-241.
- [2] 何军,朱旭江,杨平荣,等.中药配方颗粒的现状与发展新思路[J].中草药,2018,49(20): 4717-4725.
- [3] 韩振蕴,蔡舒婷,张斐妹,等.中药配方颗粒临床使用中存在问题的调研与分析[J].中华中医药杂志,2017,32(7): 2862-2864.
- [4] 吴潍,李秋菊.归脾汤中药配方颗粒剂与传统饮片煎剂治疗女性缺铁性贫血临床疗效对比[J].中华中医药学刊,2016,34(3): 750-753.
- [5] 王晓琳,张平.黄芪饮片与黄芪配方颗粒有效成分含量比较[J].西部中医药,2017,30(2): 25-27.
- [6] 杨群,胡晓莉,张锴,等.基于粉体学表征技术的浙贝母配方颗粒处方和工艺研究[J].中草药,2018,49(15): 3632-3638.
- [7] Chen L, Tang Y P, Chen M J, *et al.* Chemical correlation between Gegen Qinlian dispensing granule and its four raw herbs by LC fingerprint[J]. *Phytomedicine*, 2010, 17(2): 100-107.
- [8] 刘瑞新.中药剂型选择及制剂等效性研究概况[J].中医杂志,2007,48(1): 83-85.
- [9] 鄢星,魏惠珍,林苗苗,等.基于正交试验优选益母草配方颗粒提取工艺[J].中国医院药学杂志,2018,38(2): 126-130.
- [10] 曾宇,张三印,胡冠英,等.当归补血汤的研究进展[J].时珍国医国药,2016,27(2): 422-424.
- [11] 周向明,李毅民,谢瑞芳,等.正交试验法优选当归补血汤传统煎煮方法[J].时珍国医国药,2014,25(7): 1624-1626.
- [12] 吴志成,张泽国,徐福菊,等.当归配方颗粒质量分析研究[J].西部中医药,2014,27(4): 13-17.
- [13] 刘伟,王洋.HPLC法测定当归片中阿魏酸的含量[J].黑龙江医药,2011,20(1): 78-80.
- [14] 滕红梅,咎亚玲,贾鹏,等.不同产地黄芪药材中毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量的比较[J].江苏农业科学,2016,44(4): 226-228.
- [15] 中国药典[S].一部.2015.
- [16] 潘自皓,崔梦迪,潘立群,等.当归补血汤中三种指标性成分的HPLC-DAD/ELSD法同时测定[J].时珍国医国药,2016,27(3): 547-550.
- [17] 刘瑞新,施钧瀚,张璐,等.基于HPLC、PCA与相似度评价的芍药甘草汤传统汤剂与配方颗粒汤剂的差异规律分析[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(24): 1-5.
- [18] 徐玉玲,贾裕杰,张文文,等.基于标准汤剂的三颗针配方颗粒质量评价研究(I)[J].中草药,2018,49(19): 4535-4543.
- [19] 张慧,陈燕,汪佳楠,等.指纹图谱技术在中药配方颗粒质量评价及过程控制中的应用[J].中国中药杂志,2018,43(19): 3822-3827.