

敦煌古医方大补肾汤标准煎液 HPLC 指纹图谱及多指标成分测定研究

王继龙^{1,2}, 冯晓莉^{1,2}, 魏舒畅^{1,2*}, 陈方圆³, 蔺兴遥², 刘晓霞¹

1. 甘肃中医药大学 甘肃省中药制药工艺工程研究中心, 甘肃 兰州 730000

2. 敦煌医学与转化教育部重点实验室, 甘肃 兰州 730000

3. 甘肃卫生职业学院, 甘肃 兰州 730207

摘要: **目的** 建立敦煌古医方大补肾汤(Dabushen Decoction, DD)标准煎液的 HPLC 指纹图谱及指标成分含量测定方法, 并探寻其量值传递规律。**方法** 制备 15 批 DD 标准煎液, 建立其 HPLC 指纹图谱, 明确相似度及峰归属, 测定指标成分 5-羟甲基糠醛、甘草苷、肉桂酸、甘草酸、五味子醇甲的含量、全方出膏率及其转移率, 分析饮片-标准煎液间的量值传递关系。**结果** 15 批 DD 标准煎液指纹图谱的相似度均大于 0.9, 标定了 28 个共有峰, 并指认 5 个色谱峰(5-羟甲基糠醛、甘草苷、肉桂酸、甘草酸、五味子醇甲)。指标成分 5-羟甲基糠醛为 1.173~1.404 mg/g, 转移率为 36.09%~40.79%; 甘草苷为 2.159~3.413 mg/g, 转移率为 31.91%~37.41%; 肉桂酸为 0.317~0.614 mg/g, 转移率为 32.74%~40.64%; 甘草酸为 4.175~6.559 mg/g, 转移率为 20.95%~28.48%; 五味子醇甲为 0.225~0.275 mg/g, 转移率为 3.52%~4.29%; 出膏率为 22.24%~26.75%, 转移率为 93.14%~111.01%。**结论** 采用指纹图谱、多指标含量及出膏率相结合的评价模式对 DD 标准煎液进行量值传递分析, 科学合理, 系统全面, 可为后续 DD 的制剂开发和质量控制提供参考。

关键词: 大补肾汤; 标准煎液; HPLC; 指纹图谱; 量值传递; 敦煌古医方; 5-羟甲基糠醛; 甘草苷; 肉桂酸; 甘草酸; 五味子醇甲; 出膏率; 转移率

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2021)23-7176-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.23.011

Study on HPLC fingerprint and multi-component determination of Dabushen standard decoction

WANG Ji-long^{1,2}, FENG Xiao-li^{1,2}, WEI Shu-chang^{1,2}, CHEN Fang-yuan³, LIN Xing-yao², LIU Xiao-xia¹

1. Gansu Engineering Research Center for Chinese Medicine Pharmaceutical Technology, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

2. Key Laboratory of Dunhuang Medicine, Ministry of Education, Lanzhou 730000, China

3. Gansu Health Vocational College, Lanzhou 730207, China

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint and multi-component determination for standard decoction of Dabushen Decoction (大补肾汤, DD), explore the law of its quality value transfer. **Methods** By preparing 15 batches of standard decoction of DD based on ancient medical records, the HPLC fingerprints were established, the similarity and attribution of common peaks were defined. The index components content and transfer rate of liquiritin, cinnamic acid, glycyrrhizic acid and schisandrin were measured, the ointment rate of the whole prescription were determined, and the transfer analysis of decoction pieces to substance benchmark was performed. **Results** In the 15 batches of standard decoction of DD, the similarity of fingerprints was greater than 0.9, 28 common peaks were identified and five chromatographic peaks were identified (5-hydroxymethylfurfural, liquiritin, cinnamic acid, glycyrrhizic acid and schisandrin). The content of 5-hydroxymethylfurfural was 1.173—1.404 mg/g, the transfer rate was 36.09%—40.79%. The content of liquiritin was 2.159—3.413 mg/g, the transfer rate was 31.91%—37.41%. The content of cinnamic acid was 0.317—0.614 mg/g, the transfer rate was 32.74%—40.64%. The content of glycyrrhizic acid was 4.175—6.559 mg/g, the transfer rate was 20.95%—

收稿日期: 2021-06-22

基金项目: 甘肃省基础研究创新群体项目(1506RJIA034); 甘肃省科技计划资助项目(21JR1RA273); 甘肃省高等学校创新能力提升项目(2019A-079); 甘肃省高等学校创新基金项目(2021A-320); 敦煌医学与转化教育部重点实验室开放课题(DHYX19-15)

作者简介: 王继龙, 男, 讲师, 博士研究生, 从事中药新剂型、新制剂及制药新技术研究。E-mail: wjl8013@163.com

*通信作者: 魏舒畅, 教授, 博士生导师, 从事中药新剂型、新制剂及制药新技术研究。

28.48%。The content of schisandrin was 0.225—0.275 mg/g, the transfer rate was 3.52%—4.29%。The creaming rate was 22.24%—26.75%, the transfer rate was 93.14%—111.01%。Conclusion The evaluation model of fingerprint combined with multi-index content determination and creaming rate was used to analyze the quantity value transfer of standard decoction, which was scientific, reasonable and systematic, and could provide reference for the subsequent development and quality control of DD。

Key words: Dabushen Decoction; standard decoction; HPLC; fingerprint; quality value transmitting; Dunhuang ancient medical prescription; 5-hydroxymethylfurfural; liquiritin; cinnamic acid; glycyrrhizic acid; schisandrin; creaming rate; transfer rate

敦煌古医方大补肾汤 (Dabushen Decoction, DD) 出自敦煌遗卷《辅行诀脏腑用药法要》, 由熟地黄、淡竹叶、盐泽泻、醋五味子、桂枝、干姜、炙甘草 7 味中药组成。熟地黄滋阴降火, 淡竹叶清心泻火, 盐泽泻淡渗利湿, 醋五味子益金生水, 桂枝温通经脉、散寒止痛, 干姜温脾益气, 炙甘草调和诸药, 全方“治精气虚少, 腰痛, 骨痠, 不可行走, 虚热冲逆, 头目眩, 小便不利, 脉软而快者”^[1]。现代临床将其广泛用于治疗肾阴虚型糖尿病、慢性泄泻及眩晕患者 (“脑动脉供血不足” “后循环缺血” “脑梗死” “高血压病” 等疾病) 的眩晕症状等, 疗效显著, 服用安全, 开发前景良好^[2-9]。

目前, 关于大补肾汤的研究多集中于临床应用疗效评价方面, 主要以传统汤剂给药, 尚未被开发成现代制剂, 且未见其质量控制方面的文献报道。本研究借鉴中药经典名方复方制剂研制中 “标准煎液” “量值传递” 等概念^[10-14], 通过对敦煌古医方大补肾汤标准煎液的指纹图谱、多指标成分的含量及出膏率进行研究, 并对其饮片-标准煎液的量值传递关系进行分析, 以期为后续大补肾汤的制剂开发和质量控制提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent1100 高效液相色谱仪, 包括 G1312A 泵, G1313A 自动进样器, G1315B DAD 检测器, G1316A 柱温箱, 美国 Agilent 公司; BT125D 型十万分之一分析天平, 赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司; PX5202ZH 型百分之一电子天平, 上海奥豪斯仪器有限公司; Elix Essential 5 超纯水系统, 美国默克密理博公司; SONOREX DIGITEC DT1028H 超声波清洗机, 德国班德林电子有限公司; HH-S28S 型数显恒温水浴锅, 金坛市大地自动化仪器厂。

1.2 试药

对照品 5-羟甲基糠醛 (批号 111626-202013, 质量分数 99.5%)、甘草苷 (批号 111610-201908, 质量分数 95.0%)、甘草酸铵 (批号 110731-202021, 质量分数 96.2%)、23-乙酰泽泻醇 B (批号 111846-

202006, 质量分数 98.3%)、桂皮醛 (批号 110710-202022, 质量分数 99.5%)、肉桂酸 (批号 110786-200503, 质量分数 100%)、五味子醇甲 (批号 110857-201815, 质量分数 99.7%), 中国食品药品检定研究院; 地黄苷 D (批号 040005-202101, 质量分数 98%), 上海鸿永生物科技有限公司; 色谱纯乙腈, Sigma-Aldrich 公司; 色谱纯甲醇、磷酸, 天津市大茂化学试剂厂; 水为自制超纯水。

熟地黄 (厚片)、盐泽泻、炙甘草、醋五味子、淡竹叶、桂枝、干姜 (厚片) 饮片各 10 批均由企业提供, 具体信息见表 1。经甘肃中医药大学附属医院杨锡仓主任药师鉴定为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的干燥块根、泽泻科植物东方泽泻 *Alisma orientate* (Sam.) Juzep. 的干燥块茎、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根、木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实的炮制加工品, 禾本科植物淡竹叶 *Lophatherum gracile* Brongn. 的干燥茎叶、樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥嫩枝、姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rose. 的干燥根茎, 均符合《中国药典》2020 年版一部要求。

2 方法与结果

2.1 大补肾汤标准煎液的制备

《辅行诀脏腑用药法要》记载的大补肾汤处方及制法为 “地黄、竹叶、甘草各三两, 泽泻、桂枝、干姜、五味子各一两, 上七味以长流水一斗, 煮取四升, 温分四服, 日三、夜一服”。经文献考证^[15], 东汉时期 1 两相当于今之 15.4 g, 1 斗相当于 2000 mL, 1 升相当于 200 mL。取处方量各饮片共 200.2 g, 加纯水 2000 mL 浸泡 1 h, 回流提取 1 h 后 300 目药筛趁热滤过, 药液常压水浴浓缩至体积为 800 mL, 即得大补肾汤标准煎液, 标准煎液饮片随机组合, 见表 2。同法制备各单味药及其阴性煎煮液。

2.2 标准煎液指纹图谱的建立

2.2.1 供试品溶液的制备 精密量取大补肾汤标准煎液 5 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加入甲醇 5 mL 使甲醇体积分数达到 50%, 密塞, 称定质量, 超声处理

表 1 大补肾汤饮片信息
Table 1 Origin information of DD pieces

饮片	产地	批号
熟地黄	河南焦作	202007001、202009002、210522、20210501
	河南温县	2005030、2005031、2005032
	河南武陟	2012006、2103016、20100802
盐泽泻	四川彭山	20041801、210425
	福建建安	202007001~202007003、202008004、202012005、210121、210325、2012080
炙甘草	甘肃民勤	2020041、2020110、2021020、2021060、2012003
	甘肃凉州	202003002、202005003、202009004
	甘肃永昌	20092201、20210526
醋五味子	辽宁海城	210227、2101001、20111401、210123、210327、210531、200401CP034
	吉林集安	20051901、20071308
	黑龙江尚志	20091801
淡竹叶	安徽霍山	200901、200202、200201、2019031、21020602、JZ2101012
	浙江杭州	20201101
	湖南黔阳	20080430
	广西灌阳	1908019
桂枝	四川宜宾	20052402
	广西玉林	202009004、202010005、202011006、202011007
	广西荔浦	200816、201005、201127、201226
干姜	广西金秀	2010006、2101008
	云南罗平	20081809、20102001、20070101、20110101、210608
	云南板桥	20081501、20122801、2102003
	四川犍为	202011002、202104001

表 2 15批标准煎液饮片组合信息
Table 2 Information of 15 batches of standard decoction

标准煎液	批号						
	熟地黄	盐泽泻	炙甘草	醋五味子	淡竹叶	桂枝	干姜
S1	210522	210325	20210526	2101001	20080430	2010006	202104001
S2	2012006	202007002	20092201	20091801	200201	201226	20110101
S3	202009002	20041801	2020041	20051901	20201101	2101008	2102003
S4	2005032	202012005	202003002	210123	200901	202011007	20081501
S5	2005030	202007001	202005003	210227	1908019	202010005	210608
S6	202007001	2012080	202009004	20071308	21020602	202009004	20102001
S7	20100802	210121	2021020	210327	2019031	202011006	20070101
S8	2103016	210425	2012003	20111401	20052402	200816	20081809
S9	20210501	202008004	2021060	210531	200202	201005	202011002
S10	2005031	202007003	2020110	200401CP034	JZ2101012	201127	20122801
S11	20210501	210425	20210526	210227	200901	202011006	2102003
S12	2103016	210325	20092201	20071308	21020602	201226	210608
S13	202009002	210121	20210526	210531	20080430	2010006	20102001
S14	2005031	202007003	20092201	210123	200202	202011007	20081501
S15	2012006	2012080	20210526	2101001	20201101	201005	20110101

10 min, 放冷, 用 50% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 冷藏 24 h, 上清液用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得大补肾汤标准煎液供试品溶液。同法制备各单味药供试品溶液和各阴性对照溶液。

2.2.2 混合对照品溶液的制备 精密称取各对照品适量, 加 50% 甲醇制成含 5-羟甲基糠醛 116.55 μg/mL、甘草苷 147.61 μg/mL、肉桂酸 20.24 μg/mL、甘草酸铵 223.57 μg/mL、五味子醇甲 6.93 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.3 色谱条件 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~5 min, 5% 乙腈; 5~45 min, 5%~47% 乙腈; 45~65 min, 47%~73% 乙腈; 65~70 min, 73%~5% 乙腈; 检测波长 210 nm; 柱温 35 °C; 体积流量 0.8 mL/min; 进样量 10 μL。

2.2.4 精密度试验 取同一标准煎液供试品溶液, 按“2.2.3”项下色谱条件连续进样 6 次, 以甘草酸为参照峰, 测得各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别小于 0.5%、1.8%, 表明仪器精密度良好。

2.2.5 重复性试验 取同一标准煎液按“2.2.1”项下方法平行制备供试品溶液 6 份, 按“2.2.3”项下色谱条件分别进样测定, 以甘草酸为参照峰, 测得各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别小于 1.0%、3.0%, 表明该方法重复性良好。

2.2.6 稳定性试验 取同一标准煎液供试品溶液, 按“2.2.3”项下色谱条件分别于 0、6、12、18、24、48 h 进样测定, 以甘草酸为参照峰, 测得各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别小于 1.0%、3.0%, 表明标准煎液供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.2.7 指纹图谱的建立及相似度评价 取 15 批大补肾汤标准煎液供试品溶液, 分别按“2.2.3”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 依次导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012.130723 版本)”, 以 S15 为参照图谱, 时间窗宽度为 0.1 min, 平均数法生成对照图谱, 采用多点校正和 Mark 峰匹配计算相似度。结果 15 批大补肾汤标准煎液 (S1~S15) 指纹图谱与对照图谱 (R) 的相似度分别为 0.990、0.989、0.988、0.987、0.992、0.994、0.992、0.991、0.979、0.981、0.988、0.987、0.989、0.987、0.990, 均大于 0.9, 表明 15 批标准煎液整体相似性均较好, 其指纹图谱叠加图见图 1。

2.2.8 色谱峰指认与归属 标准煎液在 210 nm 波长下有 28 个共有峰, 通过与各单味药供试品溶液、阴性对照溶液和混合对照品溶液图谱的比较, 峰 7、8、13、14 (甘草苷)~16、18、23 (甘草酸)、25 归属于甘草, 峰 2、10、11 归属于淡竹叶, 峰 17、20 (肉桂酸)、21 归属于桂枝, 峰 26 归属于干姜, 峰 27 (五味子醇甲) 归属于五味子, 峰 3 (5-羟甲

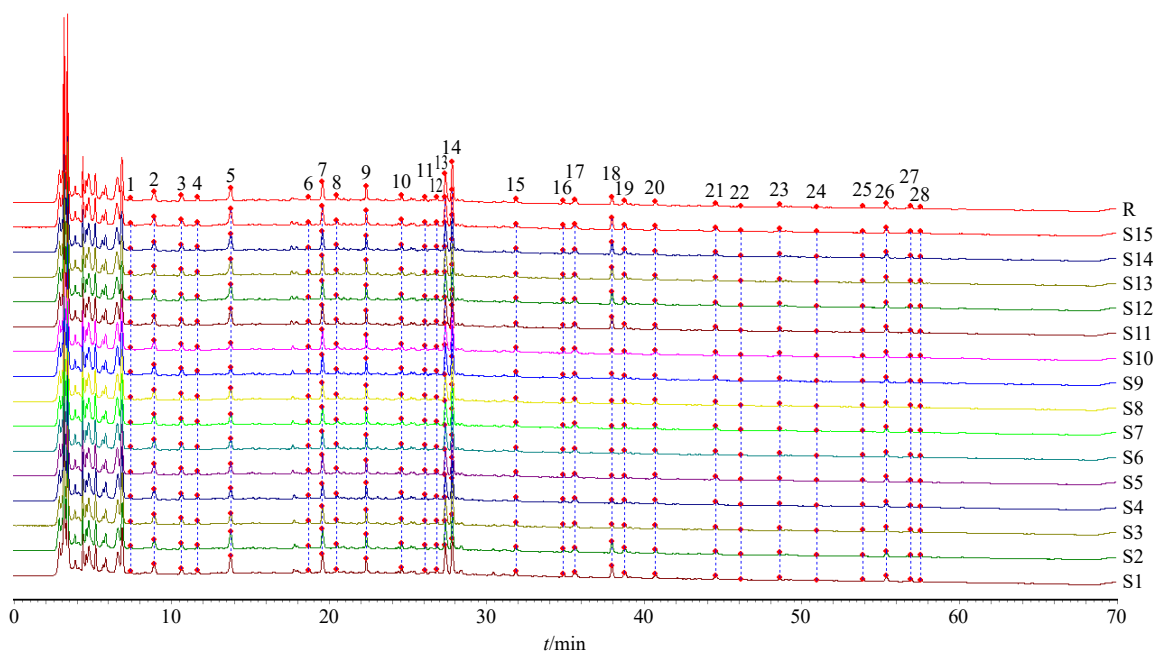


图 1 15 批大补肾汤标准煎液 HPLC 指纹图谱 (S1~S15) 与对照图谱 (R)

Fig. 1 HPLC fingerprint of 15 batches of DD standard decoction (S1—S15) and its reference fingerprint (R)

基糠醛)为地黄和五味子所共有,见图2、3。可见采用“2.1”项下工艺制备大补肾汤标准煎液时其主要成分从饮片-标准煎液形成较为完整的传递,且归属关系较为清晰。

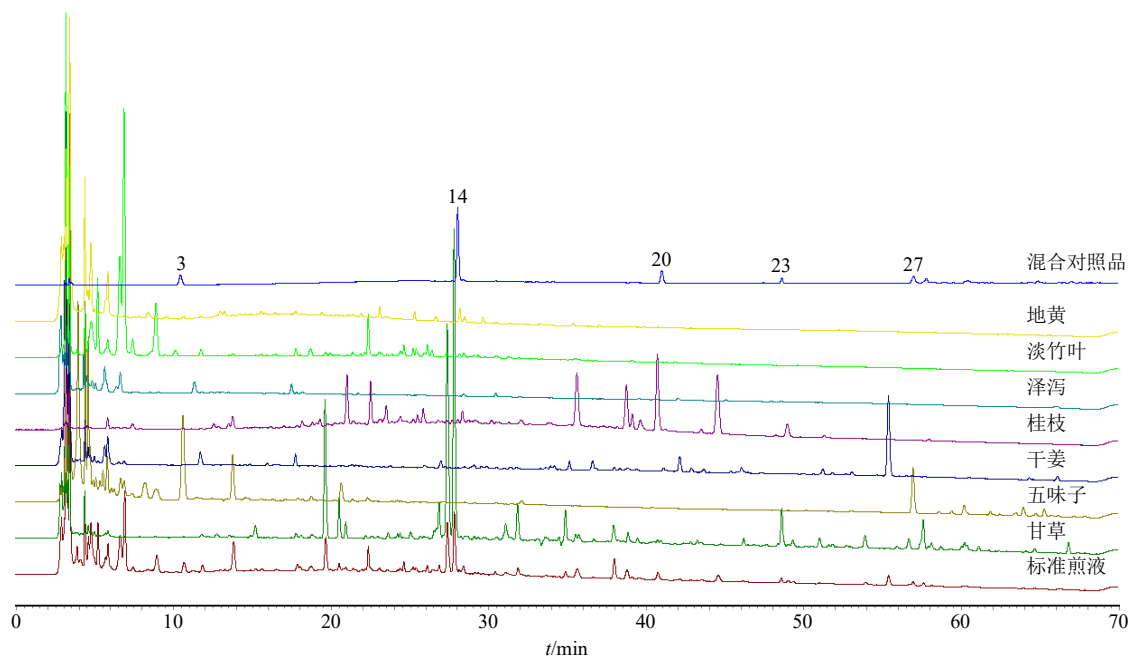
2.3 指标性成分含量测定方法的建立

2.3.1 色谱条件 检测波长采用 280 nm (5-羟甲基

糠醛、甘草苷、肉桂酸)和 250 nm (甘草酸、五味子醇甲)双波长切换法,其他条件同“2.2.3”项。

2.3.2 系统适用性及专属性

分别取混合对照品溶液、标准煎液供试品溶液和各阴性对照溶液按“2.3.1”项下色谱条件进样分析,结果 5-羟甲基糠醛、甘草苷、肉桂酸、甘草酸、五味子醇甲与其相



3-5-羟甲基糠醛 14-甘草苷 20-肉桂酸 23-甘草酸 27-五味子醇甲, 图3同

3-5-hydroxymethylfurfural 14-liquiritin 20-cinnamic acid 23-glycyrrhizic acid 27-schisandrins, same as figure 3

图2 大补肾汤标准煎液、单味药对照、混合对照品 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC fingerprint of DD standard decoction and single-flavor drugs, HPLC of mixed reference substance

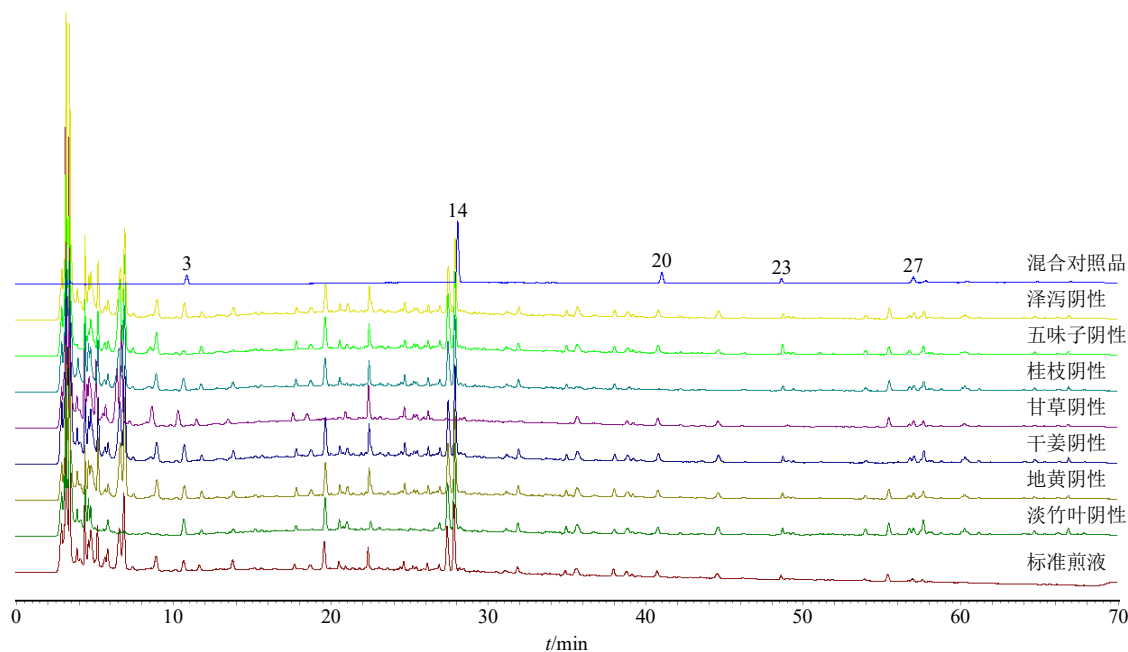


图3 大补肾汤标准煎液与各单味药阴性样品对照图谱

Fig. 3 Comparison of standard decoction of DD and negative samples of each single-flavor drugs

邻成分之间的分离度均大于 1.5, 理论塔板数以甘草酸计不低于 740 000, 阴性对照溶液在测定成分出峰时间处均无干扰, 表明该方法系统适应性及专属性良好。

2.3.3 线性关系考察 取“2.2.2”项下混合对照品溶液, 用 50% 甲醇稀释成不同质量浓度的系列混合对照品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 以质量浓度为横坐标 (x), 峰面积为纵坐标 (y), 进行线性回归, 得回归方程, 结果分别为 5-羟甲基糠醛 $y=96\ 417x-127.23$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 11.65~116.55 $\mu\text{g/mL}$; 甘草苷 $y=17\ 995x-29.92$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 14.76~147.61 $\mu\text{g/mL}$; 肉桂酸 $y=103\ 845x-24.547$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 2.02~20.24 $\mu\text{g/mL}$; 甘草酸 $y=7\ 875.3x-17.513$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 22.36~223.57 $\mu\text{g/mL}$; 五味子醇甲 $y=32\ 079x-3.873\ 3$, $r=0.999\ 8$, 线性范围 0.69~6.93 $\mu\text{g/mL}$; 结果表明, 5-羟甲基糠醛、甘草苷、肉桂酸、甘草酸、五味子醇甲在各自的线性范围内线性关系良好。

2.3.4 精密度试验 取“2.2.2”项下混合对照品溶液按“2.3.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 计算 5-羟甲基糠醛、甘草苷、肉桂酸、甘草酸、五味子醇甲峰面积的 RSD, 结果分别为 1.19%、1.15%、1.29%、1.72%、1.28%, RSD 均小于 2.0%, 表明仪器精密度良好。

2.3.5 稳定性试验 取标准煎液 S4 的供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件分别于制备后室温放置 0、6、12、18、24、48 h 进样测定, 计算 5-羟甲基糠醛、甘草苷、肉桂酸、甘草酸、五味子醇甲峰面积的 RSD, 结果分别为 1.56%、1.81%、2.34%、2.06%、2.79%, RSD 均小于 3.0%, 表明标准煎液供试品溶液在室温下 48 h 内稳定性良好。

2.3.6 重复性试验 取标准煎液 S4, 按“2.2.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件分别进样测定, 计算 5-羟甲基糠醛、甘草苷、肉桂酸、甘草酸、五味子醇甲质量分数的 RSD, 结果分别为 2.12%、0.83%、2.05%、1.87%、2.36%。RSD 均小于 2.5%, 表明本方法重复性良好。

2.3.7 加样回收率试验 取 9 份已测定各指标成分含量的标准煎液 (S4) 2.5 mL 置于 10 mL 量瓶中, 各补加超纯水 2.5 mL, 分别以指标成分含量的 50%、100%、150% 加入对照品, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 各质量浓度平行制备 3 份。按“2.3.1”

项下色谱条件分别进样测定, 计算 5-羟甲基糠醛、甘草苷、肉桂酸、甘草酸、五味子醇甲的加样回收率, 结果 5 种成分的平均加样回收率分别为 99.25%、98.34%、103.77%、102.15%、96.55%, RSD 分别为 1.70%、2.02%、2.55%、2.27%、2.97%, 各指标的平均加样回收率在 96.0%~104.0%, RSD 均小于 3.0%, 表明该方法准确度良好。

2.4 标准煎液指标成分含量测定及量值传递关系研究

按“2.3.1”项下色谱条件测定 15 批大补肾汤标准煎液中 5 个指标成分的含量, 各饮片按《中国药典》2020 年版进行含量测定^[6], 根据公式转移率 = 标准煎液对应饮片中指标成分实际提取量 / 对应批次饮片中指标成分含量, 计算各指标成分转移率, 结果见表 3。结果表明, 15 批标准煎液中指标成分 5-羟甲基糠醛质量分数为 1.173~1.404 mg/g, 平均为 1.265 mg/g, 转移率为 36.09%~40.79%, 平均转移率为 38.53%; 甘草苷质量分数为 2.159~3.413 mg/g, 平均为 2.943 mg/g, 转移率为 31.91%~37.41%, 平均转移率为 34.96%; 肉桂酸质量分数为 0.317~0.614 mg/g, 平均为 0.436 mg/g, 转移率为 32.74%~40.64%, 平均转移率为 36.59%; 甘草酸质量分数为 4.175~6.559 mg/g, 平均为 5.498 mg/g, 转移率为 20.95%~28.48%, 平均转移率为 25.17%; 五味子醇甲质量分数为 0.225~0.275 mg/g, 平均为 0.248 mg/g, 转移率为 3.52%~4.29%, 平均转移率为 3.93%。15 批标准煎液中 5 个指标成分的转移率均在均值的 70%~130%, 说明在大补肾汤标准煎液的制备过程中, 其指标成分从饮片到标准煎液的传递较为稳定, 前期把控好投料饮片的质量, 可保证标准煎液中指标成分含量的小的批间波动, 满足批间质量基本一致的要求。

2.5 出膏率及其传递关系

分别取“2.1”项下大补肾汤标准煎液及对应各单味药煎液, 水浴浓缩至稠膏, 60 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥, 测得全方标准煎液实际出膏率和单味饮片出膏率。按公式 (理论出膏率 = Σ 单味饮片出膏率 \times 单味饮片投料量 / 全方总投料量) 计算标准煎液理论出膏率, 以实际出膏率与理论出膏率的比值作为标准煎液的实际出膏转移率, 见表 4。结果 15 批大补肾汤标准煎液的实际出膏率整体上略高于理论出膏率, 出膏率为 22.24%~26.75%, 均值为 24.22%, RSD 为 4.41%; 出膏率的转移率为 93.14%~111.01%, 均值为

表3 饮片-标准煎液中指标成分的含量和转移率

Table 3 Content and transfer rate of index components of decoction pieces-standard decoction

批号	5-羟甲基糠醛/(mg·g ⁻¹)		转移率/%	甘草苷/(mg·g ⁻¹)		转移率/%	肉桂酸/(mg·g ⁻¹)		转移率/%	甘草酸/(mg·g ⁻¹)		转移率/%	五味子醇甲/(mg·g ⁻¹)		转移率/%
	标准煎液	饮片		标准煎液	饮片		标准煎液	饮片		标准煎液	饮片		标准煎液	饮片	
S1	1.287	3.155	40.79	3.413	9.123	37.41	0.404	0.994	40.64	6.559	23.033	28.48	0.256	5.969	4.29
S2	1.173	2.989	39.24	3.161	8.871	35.63	0.398	1.023	38.91	5.898	22.661	26.03	0.244	5.763	4.23
S3	1.205	3.216	37.46	2.925	8.550	34.21	0.421	1.101	38.24	5.608	21.949	25.55	0.230	6.051	3.80
S4	1.213	3.362	36.09	2.159	6.765	31.91	0.555	1.695	32.74	4.175	19.925	20.95	0.225	6.384	3.52
S5	1.221	3.238	37.72	2.452	7.048	34.79	0.501	1.358	36.89	4.727	19.604	24.11	0.261	6.705	3.89
S6	1.263	3.264	38.70	2.596	7.412	35.02	0.478	1.291	37.03	4.999	20.262	24.67	0.234	5.882	3.98
S7	1.254	3.179	39.46	2.969	8.370	35.47	0.568	1.525	37.25	5.241	20.885	25.09	0.270	6.590	4.10
S8	1.315	3.556	36.98	2.771	8.163	33.95	0.317	0.926	34.23	4.586	21.091	21.74	0.258	7.002	3.68
S9	1.243	3.291	37.78	2.902	8.506	34.12	0.319	0.902	35.37	5.298	21.818	24.28	0.262	6.925	3.78
S10	1.404	3.474	40.41	2.738	8.054	34.00	0.341	0.970	35.15	4.956	20.806	23.82	0.249	6.697	3.72
S11	1.301	3.393	38.34	3.285	9.123	36.01	0.565	1.525	37.05	6.224	23.033	27.02	0.230	6.051	3.80
S12	1.292	3.303	39.12	3.173	8.871	35.77	0.372	1.023	36.36	6.042	22.661	26.66	0.275	6.705	4.10
S13	1.235	3.182	38.81	3.319	9.123	36.38	0.353	0.994	35.51	6.315	23.033	27.42	0.238	5.882	4.05
S14	1.336	3.516	38.00	3.082	8.871	34.74	0.614	1.695	36.22	5.848	22.661	25.81	0.242	6.384	3.79
S15	1.240	3.177	39.03	3.196	9.123	35.03	0.336	0.902	37.25	5.987	23.033	25.99	0.239	5.763	4.15

表4 标准煎液的出膏率和转移率

Table 4 Paste-forming rate and transfer rate of standard decoction

批号	单味饮片出膏率/%							标准煎液出膏率/%		转移率/%
	熟地黄	淡竹叶	盐泽泻	醋五味子	桂枝	干姜	炙甘草	理论	实际	
S1	39.91	13.47	14.58	24.30	5.41	15.26	28.62	23.50	24.79	105.47
S2	37.53	15.21	15.36	23.23	6.38	15.80	29.27	23.60	23.91	101.31
S3	37.91	13.02	16.23	23.47	6.49	14.91	28.25	22.97	23.83	103.73
S4	36.26	14.36	16.99	24.85	6.27	15.53	30.11	23.53	24.52	104.23
S5	38.79	14.80	15.72	25.41	5.65	16.15	28.98	23.90	25.36	106.13
S6	39.62	13.93	15.59	23.70	5.94	15.06	29.83	23.88	22.24	93.14
S7	38.19	14.65	14.20	24.98	6.71	15.49	29.46	23.71	24.15	101.84
S8	37.84	13.29	15.91	24.59	6.16	14.62	30.49	23.55	25.19	106.97
S9	38.95	15.08	16.14	24.09	6.80	15.34	29.60	24.10	26.75	111.01
S10	37.13	14.42	15.01	25.12	5.99	15.87	29.15	23.39	23.14	98.92
S11	38.95	14.36	15.91	25.41	6.71	14.91	28.62	23.75	24.38	102.66
S12	37.84	13.93	14.58	23.70	6.38	16.15	29.27	23.38	24.36	104.20
S13	37.91	13.47	14.20	24.09	5.41	15.06	28.62	22.98	23.49	102.21
S14	37.13	15.08	15.01	24.85	6.27	15.53	29.27	23.55	23.23	98.66
S15	37.53	13.02	15.59	24.30	6.80	15.80	28.62	23.08	23.99	103.96

102.96%。出膏率及其转移率均在均值的±30%范围内波动,说明大补肾汤标准煎液的制备工艺较为稳

定,且不同产地、批次来源投料饮片对标准煎液出膏率的影响较小。

3 讨论

3.1 流动相、柱温、体流量的考察

本研究比较了乙腈-水、乙腈-0.05%磷酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液 3 个流动相系统梯度洗脱的情况,发现乙腈-0.1%磷酸水溶液作为流动相进行梯度洗脱时,出峰情况良好,峰形及分离度最好。同时,对柱温 25、30、35 °C 与体积流量 0.8、0.9、1.0 mL/min 进行了优化,发现在 35 °C、体积流量 0.8 mL/min 的条件下各色谱峰分离效果较好。

3.2 检测波长的选择

在大补肾汤标准煎液指纹图谱研究中,依据各单味药主要质控指标的检测波长考察了标准煎液在 210、237、250、280、334 nm 波长下的图谱信息,结果显示,210 nm 波长下色谱图中色谱峰最多,237、250、280 nm 波长下色谱峰相对较少,但是基线稳定,而 334 nm 波长下色谱峰很少。综合考虑为反映大补肾汤标准煎液成分信息的完整概貌,选用 210 nm 作为指纹图谱检测波长。

在标准煎液指标成分的含量测定中,由于指标成分 5-羟甲基糠醛的最佳检测波长为 283 nm、甘草苷为 275 nm、肉桂酸为 280 nm、甘草酸和五味子醇甲为 250 nm,单一波长无法满足 5 个指标同时检测的要求。为提高检测灵敏度和准确性,本研究采用 280、250 nm 双波长切换法进行检测,各指标成分峰强度高、分离度好,基线平稳,其他成分对指标成分的干扰小。

3.3 指标成分的含量测定分析

本研究建立了 5-羟甲基糠醛、甘草苷、肉桂酸、甘草酸和五味子醇甲 5 个指标成分的含量测定方法,初步实现了对大补肾汤标准煎液的多指标质量控制。本研究尚存在不足之处,即在标准煎液中未检出熟地黄、盐泽泻、桂枝的药典质控指标。地黄苷 D 是《中国药典》2020 年版熟地黄的质控指标,但在指纹图谱研究中未指认出该成分。

由于 5-羟甲基糠醛是熟地黄和醋五味子的潜在质量标志物^[17-18],因此建立其定量测定方法用于控制标准煎液中 5-羟甲基糠醛的总含量。桂皮醛是《中国药典》2020 年版桂枝的质控指标,但由于其难溶于水、易挥发且不稳定,加之桂枝在处方中占比低,在标准煎液指纹图谱研究中未指认出,这与文献报道^[19]的桂枝水煎液中桂皮醛的量极低相一致。

23-乙酰泽泻醇 B 是《中国药典》2020 年版泽泻的质控指标之一,但由于 23-乙酰泽泻醇 B 为脂

溶性成分,水溶性较差且不稳定,遇热易转化成泽泻醇 B 和 24-乙酰泽泻醇 A,最终转化成泽泻醇 A^[20],因此在指纹图谱研究中亦未指认出该成分。对于未检出的成分,课题组今后将进一步深入研究,力求各药味均有质控指标。

3.4 标准煎液量值传递研究

15 批大补肾汤标准煎液中五味子醇甲的转移率较低,为 3.9%左右,而 5-羟甲基糠醛、甘草苷和肉桂酸的转移率相对较高,其原因在于 5-羟甲基糠醛、甘草苷和肉桂酸为水溶性物质,转移率较高,而五味子醇甲的极性较小,在水中的溶解度差,用水煎煮的方法对其提取能力较低,故转移率低。

出膏率及其传递结果中,大多批次标准煎液的实际出膏率略高于理论出膏率,仅少批次略有降低,其原因可能为:合煎与单煎相比较,合煎时处方中各单味药所处环境的水量远大于其单煎时的加水倍量,物质溶出更充分。同时,合煎时药物化学成分更加复杂,成分之间的助溶、增溶效果可能更明显。因此,实际出膏率偏高。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王淑民. 敦煌石窟秘藏医方 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1999: 12.
- [2] 李爱国, 李应存, 孙超. 李应存运用《辅行诀》大补肾汤验案举隅 [J]. 湖南中医杂志, 2015, 31(2): 83-84.
- [3] 梁永瑞, 李应存, 李鑫浩, 等. 李应存教授运用敦煌大补肾汤治疗肾虚型糖尿病经验介绍 [J]. 亚太传统医药, 2018, 14(8): 132-133.
- [4] 刘玲, 李应存, 李鑫浩, 等. 李应存运用敦煌大补肾汤治疗慢性泄泻经验 [J]. 亚太传统医药, 2018, 14(7): 116-117.
- [5] 于晓雯, 李国强, 王中琳. 《辅行诀》大补肾汤加减方治疗眩晕临床观察 [J]. 成都中医药大学学报, 2017, 40(2): 50-52.
- [6] 王兴鸿, 何淑明, 殷世鹏, 等. 基于“肾藏精主骨”理论运用敦煌医方大补肾汤治疗糖尿病性骨质疏松症经验 [J]. 中医研究, 2021, 34(5): 75-77.
- [7] 李万云, 殷世鹏, 王兴鸿. 运用敦煌医方大补肾汤治疗肝肾亏虚型腰椎间盘突出症的经验总结 [J]. 中西医结合研究, 2020, 12(6): 416-417.
- [8] 康开彪, 颜春鲁, 姚贞宇, 等. 敦煌医方大补肾汤对镉染毒模型大鼠肝组织细胞因子和氧化应激的影响 [J]. 西部中医药, 2018, 31(3): 12-15.
- [9] 颜春鲁, 刘永琦, 李盛华, 等. 敦煌医方大补肾汤对镉染毒大鼠骨和肾功能的影响 [J]. 时珍国医国药, 2017,

- 28(5): 1077-1078.
- [10] 葛威, 刘小康, 王康宇, 等. 经典名方竹叶石膏汤的物质基准量值传递分析 [J]. 中草药, 2021, 52(11): 3239-3248.
- [11] 齐琪, 赵玥瑛, 张晴, 等. 经典名方小承气汤的物质基准量值传递研究 [J]. 中草药, 2021, 52(10): 2927-2937.
- [12] 洪婷婷, 张钰明, 杨琳洁, 等. 经典名方半夏泻心汤水煎液的 HPLC 指纹图谱及黄芩、黄连量值传递研究 [J]. 中草药, 2020, 51(20): 5166-5176.
- [13] 许金国, 梅茜, 夏金鑫, 等. 经典名方当归四逆汤物质基准量值传递分析 [J]. 中草药, 2021, 52(21): 6501-6509.
- [14] 汪莉, 贾妙婷, 孙天雄, 等. 忘忧安神方标准煎液 HPLC 指纹图谱建立及 4 种成分含量测定 [J]. 中国现代中药, 2021, 23(3): 536-541.
- [15] 邱隆. 中国历代度量衡单位量值表及说明 [J]. 中国计量, 2006(10): 46-48,76.
- [16] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 69, 90, 293.
- [17] 陈素娟, 聂静, 张旗, 等. 熟地黄饮片标准汤剂的质量标准研究 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(9): 2173-2177.
- [18] 苏联麟, 李昱, 徐祯, 等. 基于多元统计分析和网络药理学的五味子醋制前后质量标志物预测分析 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4643-4653.
- [19] 刘冲, 刘荫贞, 乐智勇, 等. 桂枝饮片标准汤剂质量标准研究 [J]. 中草药, 2017, 48(8): 1577-1583.
- [20] 刘德文, 邓哲, 陈莎, 等. 泽泻饮片标准汤剂的制备及质量评价 [J]. 中草药, 2019, 50(4): 860-867.

[责任编辑 郑礼胜]