

## • 药剂与工艺 •

## 基于相态变化探究煎煮方法与纯化工艺对经典名方吴茱萸汤药性传递的影响

张则宽<sup>1,2</sup>, 王琪<sup>1,2</sup>, 郭小萌<sup>1,2</sup>, 张楠<sup>1,2</sup>, 王柯舒<sup>1,2</sup>, 贺蕊<sup>1,2</sup>, 龚慕辛<sup>1,2\*</sup>

1. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069

2. 中医络病研究北京市重点实验室, 北京 100069

**摘要:** **目的** 探究不同煎煮方法与纯化工艺对吴茱萸汤相态以及成分的影响, 力争在经典名方开发中还原“一碗汤”的药性。**方法** 通过文献考证与实验确定吴茱萸汤传统煎煮方法, 以《医疗机构中药煎药室管理规范》中的中药汤剂煎煮方法作为现代煎煮方法, 煎煮吴茱萸汤; 采用醇沉法、澄清剂法精制 2 种煎煮方法的吴茱萸汤; 采用差速离心结合透析法分离吴茱萸汤中的纳米相态和沉淀相态, 对汤剂中纳米相态的形貌、粒径、 $\zeta$  电位、颗粒浓度及纯度、多糖含量、蛋白浓度等进行测定和比较, 测定原汤及 2 种相态的冻干粉得率, 并利用 UPLC-UV 法测定 6-O-反式咖啡酰葡萄糖酸、绿原酸、金丝桃苷、去氢吴茱萸碱、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、柠檬苦素、6-姜辣素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱 10 种指标成分含量。**结果** 2 种煎煮方法所得吴茱萸汤中均存在 200 nm 左右、表面呈现介孔状的球形颗粒 (纳米相态); 2 种纯化工艺减少了纳米相态中的颗粒数量, 破坏颗粒结构并降低其蛋白质及多糖含量; 现代煎煮吴茱萸汤及其纳米相态冻干粉得率均显著高于传统煎法; 现代煎煮吴茱萸汤中除吴茱萸碱、吴茱萸次碱外的其他 8 种成分均显著高于传统煎法; 澄清剂处理后纳米相态中多数成分含量降低或有降低的趋势, 醇沉处理后多数成分含量升高或有升高的趋势, 各成分分布比例也异于原汤纳米相态。**结论** 不同的煎煮与纯化方法均会显著改变经典名方吴茱萸汤成分与相态等理化性质, 影响药性传递, 在经典名方及其他中药复方制剂的研发过程中应予以重视。

**关键词:** 经典名方; 吴茱萸汤; 煎煮方法; 纯化; 相态理论; 纳米颗粒; 理化特征; 6-O-反式咖啡酰葡萄糖酸; 绿原酸; 金丝桃苷; 去氢吴茱萸碱; 人参皂苷 Rg<sub>1</sub>; 人参皂苷 Rb<sub>1</sub>; 柠檬苦素; 6-姜辣素; 吴茱萸碱; 吴茱萸次碱

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)02-0430-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.02.007

## Investigation of the effects of decoction methods and purification processes on medicinal property transfer of classic prescription Wuzhuyu Decoction based on phase transition

ZHANG Zekuan<sup>1,2</sup>, WANG Qi<sup>1,2</sup>, GUO Xiaomeng<sup>1,2</sup>, ZHANG Nan<sup>1,2</sup>, WANG Keshu<sup>1,2</sup>, HE Rui<sup>1,2</sup>, GONG Muxin<sup>1,2</sup>

1. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China

2. Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Collateral Disease Theory Research, Beijing 100069, China

**Abstract: Objective** To explore the impact of different decoction methods and purification processes on physical phase and chemical composition of Wuzhuyu Decoction (吴茱萸汤, WD), ensuring the medicinal properties of “a bowl of decoction” in the development of classic prescriptions. **Methods** The traditional decoction method of WD was determined through literature review and experimentation, with the decoction method recorded in *Management Specifications for the Decoction Room of Traditional Chinese Medicine in Medical Institutions* serving as the modern decoction method. The two types of WD were refined using aqueous extraction and alcohol precipitation, and a clarifying agent method. Differential centrifugation combined with dialysis was used to separate

收稿日期: 2024-08-30

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2023YFC3504003)

作者简介: 张则宽, 硕士研究生, 主要从事中药复方药效物质基础研究。E-mail: 2101813135@qq.com

\*通信作者: 龚慕辛, 教授, 博士生导师, 主要从事中药复方药效物质基础研究。Tel: (010)83911624 E-mail: gongmuxin@ccmu.edu.cn

different phases of WD. The morphology, particle size,  $\zeta$  potential, particle concentration, polysaccharide and protein concentration of the nanophase in the decoction were measured and compared. The yield of the original WD and different phases were measured, and the contents of ten compounds, including 6-*O*-caffeoylglucopyranose, chlorogenic acid, hyperoside, dehydroevodiamine, ginsenoside Rg<sub>1</sub>, ginsenoside Rb<sub>1</sub>, limonin, 6-gingerol, evodiamine and rutecarpine, were determined by UPLC-UV. **Results** Spherical nanoparticles with a diameter of about 200 nm and a mesoporous surface were found in the nanophase of WD. Both purification processes reduce the number of particles in the nanophase, disrupt the structure of the particles, and decrease the content of protein and polysaccharides. The yield rate of modern decoction of WD and its freeze-dried powder of the nanophase were both significantly higher than those of the traditional decoction of WD, the content of the eight components other than evodiamine and rutecarpine in modern decoction of WD are all significantly higher than those of the traditional decoction of WD. After treatment with the clarifying agent, the content of most components decreases or shows a decreasing trend in nanophase, while after treatment with alcohol precipitation, the content of most components increases or shows an increasing trend in nanophase. The distribution ratio of each component also differs from that in the nanophase of the original decoction. **Conclusion** Different decoction methods and purification processes significantly affect both the chemical composition and structural properties of the classic prescription WD, which should be considered in the research and development process of classic prescriptions and other Chinese herbal compound preparations.

**Keywords:** classic prescription; Wuzhuyu Decoction; decoction method; purification; phase theory; nanoparticles; physicochemical properties; 6-*O*-caffeoylglucopyranose; chlorogenic acid; hyperoside; dehydroevodiamine; ginsenoside Rg<sub>1</sub>; ginsenoside Rb<sub>1</sub>; limonin; 6-gingerol; evodiamine; rutecarpine

吴茱萸汤首载于东汉张仲景的《伤寒论》，由吴茱萸、人参、生姜、大枣 4 味中药组成，主治“干呕吐涎沫，头痛者”，是后世医家治疗肝胃虚寒、浊阴上逆型偏头痛的代表方剂<sup>[1-2]</sup>，位列《古代经典名方目录（第一批）》中的第 5 首，属于中药注册分类 3.1 类。经典名方开发的关键是实现原方复方药性的稳定传递，在制剂过程后仍可以还原“一碗汤”。目前认为，中药复方的“药性传递”具体包括将传统汤剂的药物用量和配比、多成分化学体系、药物吸收或递送过程、多靶点作用途径等忠实体现到现代制剂中。

随着对汤剂研究的不断深入，关注点已从化学成分扩展到化学、物理层面。汤液相态<sup>[3]</sup>理论认为汤液中真溶液、胶体、沉淀等不同相态的化学成分含量及结构、吸收分布特性、药理作用存在一定差异<sup>[4]</sup>。结构中药学<sup>[5]</sup>理论关注中药汤剂中成分间相互作用形成的物理结构如纳米颗粒、天然的功能性囊泡等，对从汤剂中提取的热稳定、具有外泌体样结构的“汤剂体”<sup>[6]</sup>的研究也日益增多。近期《中草药来源囊泡研究专家共识》的出台，同样体现了对此领域的重视<sup>[7]</sup>。由此，中药复方药性传递的内涵得到了极大丰富。实现复方药性的传递，不仅要使化学成分的含量得到最大限度地传递，更需要维持中药汤液中具有特殊性质、药理活性的结构稳定存在。因此开发经典名方为代表的传统中药复方药物时，对上述结构的研究需要更加深入。

经典名方开发原则上要求依据传统方法制备，

以煎煮方法而论，现代煎煮与传统煎煮在加水量、煎煮时间、煎煮次数等方面都存在差异；且现代制剂开发多会采用纯化工艺（水提醇沉法、澄清剂法等）去除汤液中一些大分子水溶性杂质、降低出膏率，经典名方开发则不能使用水提醇沉、澄清剂等纯化工艺。那么，煎煮方法、纯化工艺的差异是否对复方药性的传递产生了影响，产生了怎样的影响需要搞清。以往研究虽然关注了煎煮、醇沉、澄清剂精制等工艺对中药汤剂出膏率、化学成分含量的影响<sup>[8-9]</sup>，但对这些工艺引起的化学成分存在形式、汤液相态及其活性变化的涉猎极少。本研究拟进一步从汤液相态、结构中药学角度，探究煎煮方法和纯化工艺对经典名方吴茱萸汤药性传递的影响（具体研究路线见图 1），希望为上述经典名方开发策略提供科学依据，也为其他中药复方制剂开发实现稳定的药性传递提供参考。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

DCL-002 型陶瓷锅，锅高 12 cm，口径 16.5 cm，底径 16 cm，潮州市康特耐家用陶瓷有限公司；C22-CS01 型电陶炉，浙江绍兴苏泊尔家居用品有限公司；3K-15 型台式冷冻离心机，美国 Sigma 公司；TP-402 型电子天平，丹佛仪器（北京）有限公司；MCA3.6P-2CCN-M 型百万分之一电子天平，德国 Sartorius 公司；TC6KA 型电子天平，常熟市双杰测试仪器厂；SP131320-33Q 型磁力搅拌器，美国 Thermo 公司；Spectra Max iD3 型多功能酶标仪，美

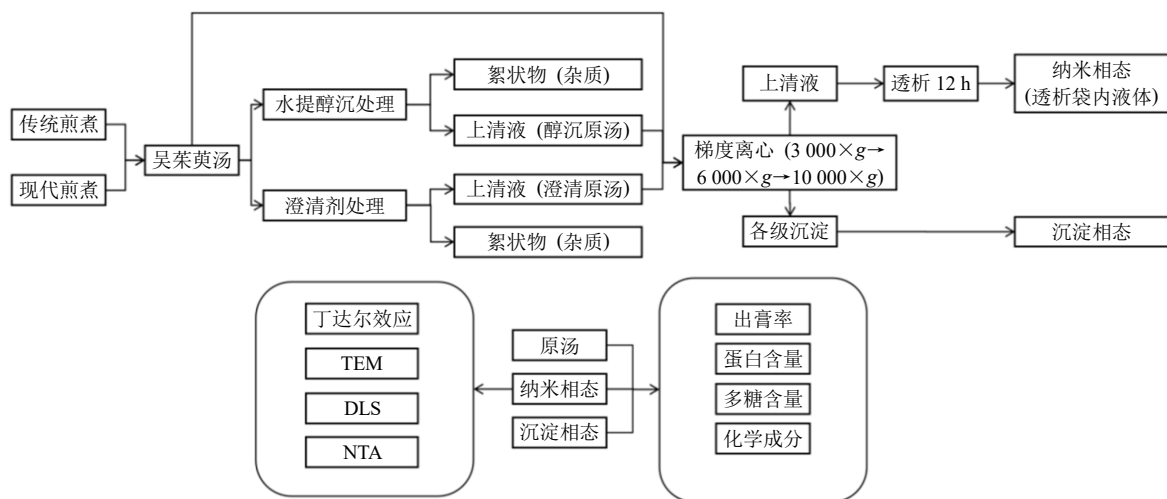


图1 实验流程图

Fig. 1 Experimental procedure diagram

谷分子仪器(上海)有限公司; Christ Alpha 1-2 Ldplus 型冷冻干燥机, 德国 Christ 公司; NanoBrook 90Plus Zeta 型激光纳米粒度仪, 美国布鲁克海文仪器公司; ZetaView 型纳米颗粒跟踪分析仪, 德国 Particle Metrix 公司; JEM-2100 型透射电子显微镜(TEM), 日本电子公司; Agilent 1260 Infinity II 型高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; SP-180 型激光笔, 北京国誉荣丰贸易有限公司。

### 1.2 药品、试剂与耗材

药材饮片吴茱萸(批号 20220901)、人参(批号 20230316)、大枣(批号 20221011)购自河北安国药材市场, 生姜购于北京某超市, 经首都中医药大学中医药学院中药资源教研室罗容教授鉴定, 吴茱萸为芸香科吴茱萸属植物吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. 的干燥近成熟果实, 人参为五加科人参属植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根和根茎, 生姜为姜科姜属植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的新鲜根茎, 大枣为鼠李科枣属植物枣 *Ziziphus jujuba* Mill. 的干燥成熟果实。

娃哈哈饮用纯净水, 596 mL, 高碑店娃哈哈启力饮料有限公司; 屈臣氏蒸馏水, 500 mL, 广州屈臣氏食品饮料有限公司; 乙腈, 色谱纯, 批号 A998-4, 美国 Fisher 公司; 甲醇, 分析纯, 批号 20231130, 天津市富宇精细化工有限公司; 磷酸(批号 20171026)、硫酸(批号 20231218), 分析纯, 北京化工厂; HH-TZCM 200 目碳支持膜, 中镜科仪(北京)膜科技有限公司; 苯酚(批号 C11327927)、葡萄糖(批号 C10103318), 上海麦克林生化科技有限公司; 透析袋, 截留相对分子质量 3 500, 美国 MYM

生物技术公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 批号 060723231027, 上海碧云天生物技术股份有限公司; PBS 缓冲液, 批号 GA21110061335, 武汉赛维尔生物科技有限公司; ZTC 1+1 天然澄清剂, 批号 20090218, 天津正天成澄清技术有限公司。

对照品金丝桃苷(批号 P12S11F124379)、绿原酸(批号 Y20A11K111541)、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>(批号 C27N11Q132589), 质量分数均≥98.0%, 均购自上海源叶生物科技有限公司; 对照品去氢吴茱萸碱(批号 PS020589)、吴茱萸碱(批号 AF71101-07)、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>(批号 PS010379)、6-姜辣素(批号 PS011678), 质量分数均≥98.0%, 均购自成都普思生物科技股份有限公司; 对照品吴茱萸次碱(批号 PS11011101, 质量分数≥99.7%)、柠檬苦素(批号 PS010363, 质量分数≥99.0%), 均购自成都普思生物科技股份有限公司; 对照品 6-O-反式咖啡酰葡萄糖酸, 批号 23060222, 质量分数 89.85%, 购自北京倍特康仁生物医药科技有限公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 吴茱萸汤传统与现代煎煮方法

2.1.1 吴茱萸汤药味剂量、炮制、煎煮方法考证《伤寒论》原文记载:“吴茱萸一升(洗), 人参三两, 生姜六两(切), 大枣十二枚(擘)。上四味, 以水七升, 煮取二升, 去滓, 温服七合, 日三服”<sup>[10]</sup>。经考证, 吴茱萸历代主流炮制方法为“汤洗”, 即用热水浸泡或冲洗, 与《古代经典名方目录(第一批)》记录的炮制方法基本一致。结合已有研究<sup>[11]</sup>, 暂定其炮制方法为“10 倍量开水冲洗 7 次, 每次 30 s”。人参、生姜、大枣可采用《中国药典》2020 年版中

收录的方法进行炮制,人参“润透,切薄片,干燥”,生姜“切厚片”,大枣“用时破开”。《本草经集注》等历代本草均记载有“吴茱萸一升,五两为正”,汉唐时期1两约为如今13.8 g,换算得到吴茱萸1升约为69 g,大枣1枚按3 g计,得出处方剂量为“吴茱萸69 g,人参41.4 g,生姜82.8 g,大枣36 g”。汉代“一升”对应现代200 mL,因此其传统煎煮方法为4味中药饮片,加水1 400 mL,煎煮到400 mL。

**2.1.2 吴茱萸汤传统煎煮方法确定** 考察饮片浸泡时间与吸水量的关系时,发现前10 min为高速吸水期,20 min后速度逐渐放缓,待煎药物浸泡时间一般不少于30 min,因此确定本方煎煮前浸泡时间为40 min。武火煮沸选择最大功率2 200 W。考察了不同功率(100、400、600、800 W)下水分蒸发速率与所需煎煮时间,确定文火功率为800 W。最后确定传统煎煮方法为4味中药饮片共计229 g,加水1 400 mL,浸泡40 min,盖盖,武火(2 200 W)煎煮22 min煮沸,文火(800 W)煎煮110 min,纱布滤过得到药液400 mL。

**2.1.3 吴茱萸汤现代煎煮方法确定** 根据《医疗机构中药煎药室管理规范》规定,煎煮用水量一般以浸过药面2~5 cm为宜。一般中药煮沸后再煎煮20~30 min,滋补中药用文火慢煎40~60 min,第二煎的煎煮时间应当比第一煎的时间略缩短。因含有人参,所以吴茱萸汤的现代煎煮方法为4味中药饮片共计229 g,一煎加水800 mL,浸泡40 min,盖盖,武火(2 200 W)煎煮13 min煮沸,文火(800 W)煎煮40 min,纱布滤过;二煎加水800 mL,武火(2 200 W)煎煮13 min煮沸,文火(800 W)煎煮20 min,纱布滤过;2次煎煮共得药液800 mL。

## 2.2 吴茱萸汤纯化工艺

**2.2.1 醇沉处理** 取200 mL现代煎煮吴茱萸汤,浓缩到与传统煎煮吴茱萸汤相同的生药质量浓度,冷却至室温。分别向汤液中搅拌加入95%乙醇,使含醇量达到75%<sup>[12]</sup>,4℃静置过夜,滤过除杂,分离澄清液体,减压回收乙醇至无醇味,即得醇沉处理后药液。

**2.2.2 ZTC 1+1天然澄清剂处理** ZTC 1+1(II)型澄清剂是以天然多糖等为原料制作而成的纯天然碳水化合物类复合澄清剂,可有效除去蛋白质、鞣质、树胶等大分子物质,保留氨基酸、多肽、多糖类成分,为造粒提供方便,主要适用于固体制剂和颗粒制剂。

按说明书配制澄清剂A、B液,将传统煎煮和现代煎煮吴茱萸汤加水稀释,使汤液浓度达到生药-水1:5,60℃水浴,搅拌分散加入4%B液,隔30 min搅拌1次。2 h后,同样方法加入2%A液,30 min后搅拌1次,可见明显絮状物,纱布滤过分离,即得澄清剂处理后药液。

## 2.3 吴茱萸汤相态分离及纳米相态表征

**2.3.1 相态分离** 分别取吴茱萸汤原液、醇沉处理与澄清剂处理后的吴茱萸汤药液,以 $3\ 000\times g\rightarrow 6\ 000\times g\rightarrow 10\ 000\times g$ 离心力差速离心各30 min后,将上清液转移到透析袋中,置于5 L烧杯中,磁力搅拌透析,2 h换水1次,共透析12 h,透析袋内保留液即为纳米相态;各级差速离心后的沉淀即为沉淀相态;将两者在-20℃冷冻4 h以上,冷冻干燥[0.5 MPa(5 bar),-60℃,48 h],即得。

**2.3.2 纳米相态丁达尔效应** 丁达尔效应是胶体溶液中的微粒对光线产生的散射现象<sup>[13]</sup>。结果如图2所示,传统煎煮与现代煎煮吴茱萸汤纳米相态都具有明显的丁达尔效应,说明均存在较多的纳米颗粒。澄清剂处理后,丁达尔效应变化不明显;醇沉处理后,丁达尔效应明显减弱,可能与纳米颗粒的减少有关。

**2.3.3 纳米相态形貌观察** 将各纳米相态用纯净水稀释60倍,取5 μL滴于TEM铜网上,37℃烘干,TEM下观察纳米相态的形貌,结果如图3所示。纳米相态中存在一种表面呈现介孔状的圆球体,大小在200 nm左右。等浓度下,原汤组中存在大量圆球体的纳米颗粒,醇沉组中数量极少,澄清

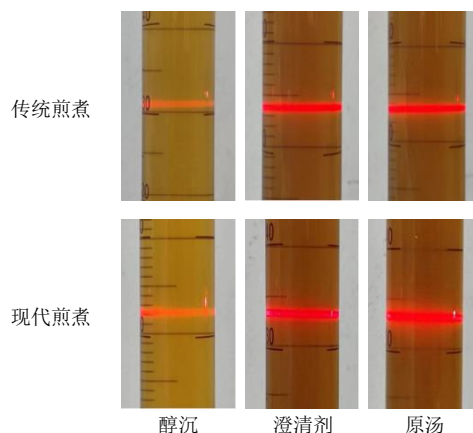


图2 传统煎煮和现代煎煮吴茱萸汤经过不同纯化处理后纳米相态的丁达尔效应

Fig. 2 Tyndall effect images of nanophase in traditional and modern Wuzhuyu Decoction after different purification treatments

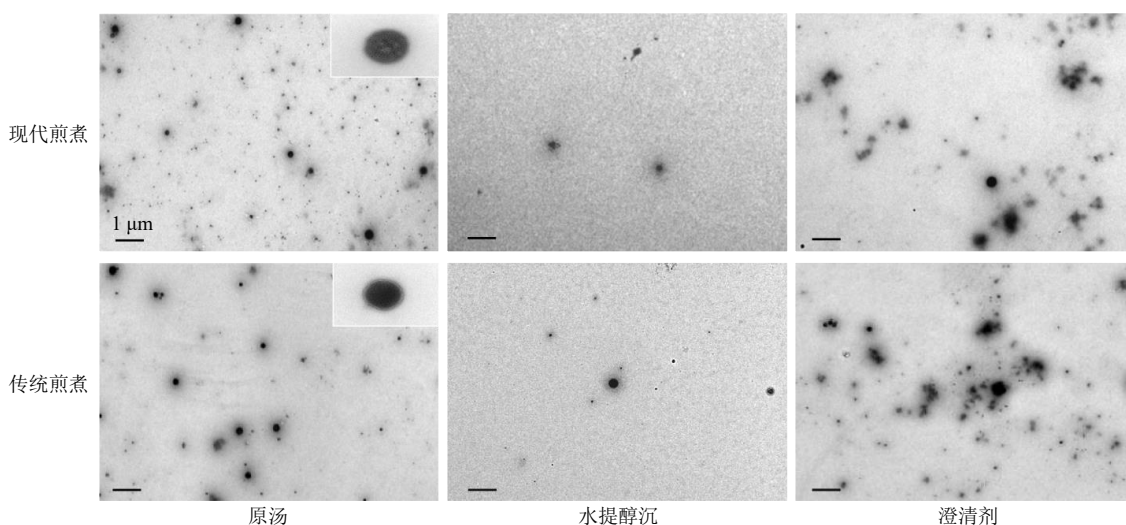


图3 传统煎煮和现代煎煮吴茱萸汤纳米相态的 TEM 图

Fig. 3 TEM images of nanophase of traditional and modern Wuzhuyu Decoction

剂组虽然也存在大量的纳米颗粒样物质，但结构已经被破坏，圆球形结构变得松散。说明吴茱萸汤中存在的大分子物质对其纳米相态的形成具有重要作用。

**2.3.4 纳米相态的粒径、多分散指数 (polymer dispersity index, PDI)、ζ 电位、颗粒浓度、颗粒纯度测定** 目前，测定纳米颗粒粒径的技术主要有动态光散射 (dynamic light scattering, DLS) 法和纳米颗粒跟踪分析 (nanoparticle tracking analysis, NTA) 技术，后者能够提供更为精确的粒径数据<sup>[14]</sup>。本研究采用 DLS 法测定各纳米相态的 ζ 电位与 PDI；采用 NTA 技术测定各纳米相态的粒径大小与颗粒浓度，并结合蛋白质浓度计算纳米相态的颗粒纯度 (每毫克蛋白质含粒子数)，结果见表 1 和图 4。2 种煎煮方法吴茱萸汤纳米相态的粒径在 200 nm 左右，与 TEM 观察结果吻合，澄清剂处理后粒径增大，醇沉处理后粒径变小；PDI 在 0.234~0.323，说明各纳米相态中颗粒大小分布较为均匀；ζ 电位在 -57.31~-58.01 mV，说明各纳米相态均具有较好的稳定性，

不容易发生聚集与沉淀。现代煎煮吴茱萸汤纳米相态的颗粒浓度与纯度均大于传统煎煮；经过不同纯化工艺处理后，颗粒浓度与纯度均减小，醇沉处理后更为明显。

**2.4 多糖、蛋白质及冻干粉得率测定**

**2.4.1 多糖含量测定<sup>[15]</sup>** 配制质量浓度分别为 625.0、500.0、250.0、125.0、62.5 μg/mL 的葡萄糖对照品溶液，各取 200 μL，分别精密加入 200 μL 5% 苯酚、1 mL 浓硫酸。摇匀后 80 °C 沸水浴加热 30 min，放置室温，测定 490 nm 处吸光度 (A) 值，绘制标准曲线，进行线性回归，得回归方程为  $Y = 4.6666X + 0.0651$ ， $R^2 = 0.9989$ ，线性范围为 62.5~625.0 μg/mL。同法处理吴茱萸汤及各相态样品 (原液已用水稀释适当倍数，使 A 值落在标准曲线范围之内)，测定 A 值，计算多糖含量，结果见表 2。等生药量下，现代煎煮吴茱萸汤原汤、纳米相态、沉淀相态中多糖含量均显著高于传统煎煮吴茱萸汤 ( $P < 0.05$ 、0.01)，且纳米相态高于沉淀相态 ( $P < 0.05$ 、0.01)；经过澄清剂、醇沉纯化处理后，原汤、

表 1 传统煎煮和现代煎煮吴茱萸汤原汤及纯化处理后药液中纳米相态的粒径、PDI、ζ 电位、颗粒浓度和颗粒纯度

Table 1 Particle size, PDI, ζ potential, particle concentration and particle purity of nanophase in traditional and modern Wuzhuyu Decoction and purified Wuzhuyu Decoction after purification treatment

煎煮方法	纳米相态来源	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV	颗粒浓度/(颗粒·mL <sup>-1</sup> )	颗粒纯度/(颗粒·mg <sup>-1</sup> )
传统煎煮	原汤	200.3	0.278	-57.70	$5.78 \times 10^{10}$	$2.35 \times 10^9$
	原汤澄清剂处理后药液	242.2	0.307	-57.97	$4.13 \times 10^{10}$	$2.05 \times 10^9$
	原汤醇沉处理后药液	157.2	0.234	-57.31	$9.97 \times 10^8$	$5.88 \times 10^7$
现代煎煮	原汤	178.9	0.308	-58.01	$1.16 \times 10^{11}$	$3.07 \times 10^9$
	原汤澄清剂处理后药液	234.0	0.250	-57.48	$6.26 \times 10^{10}$	$1.85 \times 10^9$
	原汤醇沉处理后药液	150.4	0.323	-57.57	$1.57 \times 10^9$	$5.53 \times 10^7$

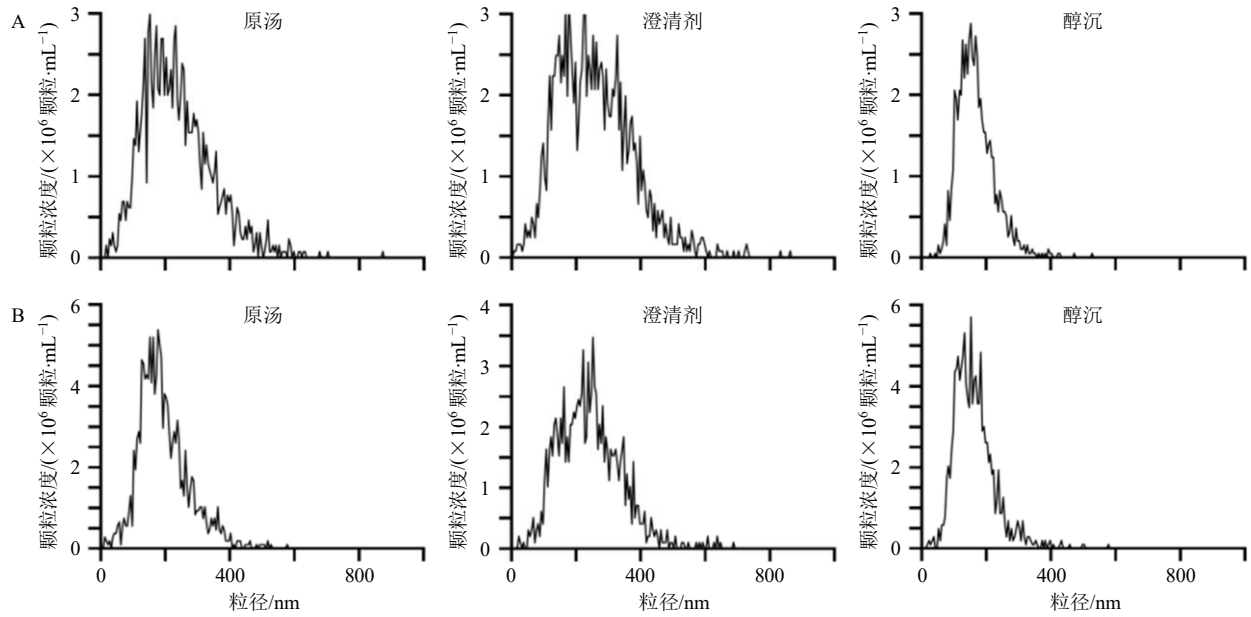


图4 传统煎煮(A)与现代煎煮(B)吴茱萸汤原汤及纯化处理后纳米相态的粒径分布

Fig. 4 Particle size distribution of nanophase in traditional (A) and modern (B) Wuzhuyu Decoction and purified Wuzhuyu Decoction after purification treatment

表2 传统煎煮和现代煎煮吴茱萸汤经过不同纯化处理后原汤、纳米相态和沉淀相态中多糖、蛋白质含量及冻干粉得率 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Polysaccharide and protein content and yield rate of freeze-dried powder of original decoction, nanophase and precipitation phase in traditional and modern Wuzhuyu Decoction after undergoing different purification treatments ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

煎煮方法	纯化工艺	多糖/(mg·g <sup>-1</sup> )			蛋白质/(mg·g <sup>-1</sup> )			冻干粉得率/%		
		原汤	纳米相态	沉淀相态	原汤	纳米相态	沉淀相态	原汤	纳米相态	沉淀相态
传统煎煮	-	77.57±2.62	24.56±0.25	12.17±0.27	67.79±1.65	35.32±1.94	1.71±0.11	13.05±0.40	4.06±0.01	1.72±0.02
	澄清剂处理	64.76±1.47**	20.12±0.20**	8.60±0.21**	58.51±1.30**	30.04±0.38**	1.25±0.01**	12.62±0.12	3.33±0.01**	1.36±0.03**
	醇沉处理	59.03±1.07***	16.97±0.30***	0.63±0.01***	49.43±2.69***	28.19±1.31**	0.67±0.03***	11.24±0.06***	2.47±0.03***	0.21±0.01***
现代煎煮	-	97.64±0.18	37.83±1.32	17.58±0.85	123.16±5.04	45.16±0.38	2.03±0.09	17.15±0.06**	4.42±0.10	1.70±0.03
	澄清剂处理	90.13±0.96**	33.91±0.66**	14.70±0.38**	106.67±3.99**	37.02±3.81*	1.44±0.04**	14.52±0.43**	3.85±0.03**	1.41±0.01**
	醇沉处理	81.74±2.35***	28.39±0.76***	0.76±0.02***	91.94±0.96***	37.34±1.79*	0.73±0.03***	11.65±0.17***	2.79±0.04***	0.32±0.02***

现代原汤与传统原汤比较: \*\* $P < 0.01$ ; 不同纯化处理与其原汤比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ ; 不同纯化处理组之间比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$ ; 表4同。

The modern original decoction group compared with the traditional original decoction group, \*\* $P < 0.01$ ; Different purification treatment groups compared with the original decoction group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; In comparisons among different purification treatment groups, # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$ ; same as table 4.

各相态中的多糖含量均降低 ( $P < 0.05, 0.01$ ), 醇沉效果更明显。

**2.4.2 蛋白质含量测定**<sup>[16]</sup> 将蛋白标准品 (1.25 mg/mL) 等比稀释成浓度为 1.250、0.625、0.313、0.156、0.078 mg/mL 的溶液, 分别加 20  $\mu$ L 到 96 孔板的标准品孔中, 各孔加入 200  $\mu$ L BCA 工作液, 37  $^{\circ}$ C 放置 30 min, 用酶标仪测定 562 nm 波长的 A 值。绘制标准曲线, 进行线性回归, 得回归方程  $Y = 0.8083X + 0.152$ ,  $R^2 = 0.9987$ , 线性范围为 0.078~

1.250 mg/mL。吸取吴茱萸汤及各相态样品 (原液已用水稀释适当倍数, 使 A 值落在标准曲线范围之内) 40  $\mu$ L, 加 360  $\mu$ L 含 1% 蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 涡旋混匀, 冰上孵育 30 min。在 12 000 r/min、4  $^{\circ}$ C 条件下离心 (离心半径 8.21 cm) 20 min, 上清液用 PBS 溶液稀释 2 倍, 测定 562 nm 处 A 值, 计算蛋白质含量, 结果见表 2。

等生药量下, 现代煎煮吴茱萸汤原汤、纳米相态、沉淀相态中蛋白质含量显著高于传统煎煮吴茱

莼汤 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 纳米相态显著高于沉淀相态 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); 经过澄清剂、醇沉纯化处理后, 原汤、纳米相态、沉淀相态中的蛋白质含量均降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 醇沉降低沉淀相态蛋白质的效果更明显 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。

**2.4.3 冻干粉得率测定** 将“2.1.2”“2.1.3”“2.3.1”项中的2种煎煮方法吴茱萸汤及纳米相态、沉淀相态样品在  $0.5 \text{ MPa}$  ( $5 \text{ bar}$ )、 $-60 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下冷冻干燥  $48 \text{ h}$ , 并计算冻干粉得率 (得率 = 冻干粉质量/冻干粉对应中药饮片质量), 结果如表 2 所示。现代煎煮吴茱萸汤的冻干粉得率显著高于传统煎煮吴茱萸汤 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); 纯化处理后, 原汤的冻干粉得率均降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 醇沉处理降低更为明显 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。现代煎煮吴茱萸汤纳米相态冻干粉得率大于传统煎煮吴茱萸汤 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 且2种煎煮方法吴茱萸汤纳米相态的冻干粉得率均大于沉淀相态 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。纯化后纳米相态、沉淀相态的冻干粉得率均降低, 可能与去除了大分子杂质有关。

## 2.5 指标成分含量测定

前期研究<sup>[2,17-19]</sup>确定了吴茱萸汤治疗偏头痛的主要成分包括吴茱萸碱、吴茱萸次碱、柠檬苦素、人参皂苷  $\text{Rg}_1$ 、人参皂苷  $\text{Rb}_1$ 、6-姜辣素等, 吴茱萸汤纳米相态中去氢吴茱萸碱、金丝桃苷、绿原酸等含量较高, 通过查阅文献得知, 6-*O*-反式咖啡酰葡萄糖酸可能是吴茱萸有小毒的物质基础<sup>[20]</sup>。因此, 本实验建立测定上述10种指标成分含量的 UPLC-UV 方法。

**2.5.1 色谱条件** 色谱柱为 Waters Acquity UPLC HSS T3 柱 ( $100 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}$ ,  $1.8 \mu\text{m}$ , 美国 Waters 公司); 进样量  $1 \mu\text{L}$ ; 柱温  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

(1) 6-*O*-反式咖啡酰葡萄糖酸、绿原酸、金丝桃苷、去氢吴茱萸碱、人参皂苷  $\text{Rg}_1$  的测定: 流动相为  $0.1\%$  磷酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱:  $0 \sim 10 \text{ min}$ ,  $7\%$  乙腈;  $10 \sim 11 \text{ min}$ ,  $7\% \sim 14\%$  乙腈;  $11 \sim 25 \text{ min}$ ,  $14\% \sim 15\%$  乙腈;  $26 \sim 27 \text{ min}$ ,  $15\% \sim 19\%$  乙腈;  $27 \sim 58 \text{ min}$ ,  $19\%$  乙腈;  $58 \sim 60 \text{ min}$ ,  $19\% \sim 100\%$  乙腈;  $60 \sim 65 \text{ min}$ ,  $100\%$  乙腈; 体积流量  $0.3 \text{ mL/min}$ ; 检测波长:  $0 \sim 48 \text{ min}$ ,  $365 \text{ nm}$  (6-*O*-反式咖啡酰葡萄糖酸、绿原酸、金丝桃苷、去氢吴茱萸碱);  $48 \sim 70 \text{ min}$ ,  $203 \text{ nm}$  (人参皂苷  $\text{Rg}_1$ )。

(2) 人参皂苷  $\text{Rb}_1$ 、柠檬苦素、6-姜辣素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱的测定: 流动相为  $0.05\%$  磷酸水

溶液-乙腈, 梯度洗脱:  $0 \sim 43 \text{ min}$ ,  $29\%$  乙腈;  $43 \sim 44 \text{ min}$ ,  $29\% \sim 34\%$  乙腈;  $44 \sim 58 \text{ min}$ ,  $34\%$  乙腈;  $58 \sim 60 \text{ min}$ ,  $34\% \sim 100\%$  乙腈;  $60 \sim 70 \text{ min}$ ,  $100\%$  乙腈; 进样量  $1 \mu\text{L}$ ; 柱温  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ; 体积流量  $0.2 \text{ mL/min}$ ; 检测波长:  $0 \sim 48 \text{ min}$ ,  $203 \text{ nm}$  (柠檬苦素、人参皂苷  $\text{Rb}_1$ 、6-姜辣素);  $48 \sim 70 \text{ min}$ ,  $254 \text{ nm}$  (吴茱萸碱、吴茱萸次碱)。

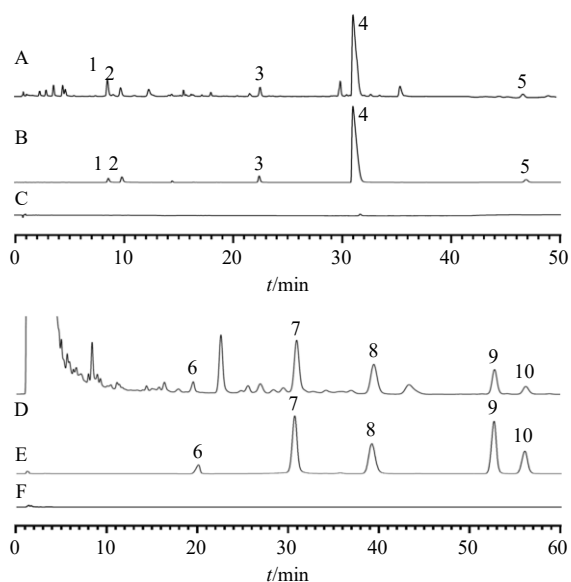
**2.5.2 供试品溶液的制备** 取不同煎煮方法、不同纯化工艺处理所得的吴茱萸汤、纳米相态、沉淀相态冻干粉各  $0.2 \text{ g}$ , 精密称定, 置  $5 \text{ mL}$  离心管中, 加甲醇  $2 \text{ mL}$ , 称定质量, 封口膜封口, 超声  $30 \text{ min}$ , 取出, 放至室温, 补足减失的质量, 过  $0.22 \mu\text{m}$  微孔滤膜, 取续滤液, 即得供试品溶液。

**2.5.3 对照品溶液的制备** 精密称取10种指标成分对照品适量, 置于  $1 \text{ mL}$  量瓶中加甲醇溶解并定容, 配制混合对照品母液, 其中6-*O*-反式咖啡酰葡萄糖酸、绿原酸、金丝桃苷、去氢吴茱萸碱、人参皂苷  $\text{Rg}_1$ 、柠檬苦素、人参皂苷  $\text{Rb}_1$ 、6-姜辣素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱的质量浓度分别为  $435.80$ 、 $446.40$ 、 $77.60$ 、 $628.00$ 、 $581.50$ 、 $2652.60$ 、 $913.00$ 、 $187.80$ 、 $933.00$ 、 $314.40 \mu\text{g/mL}$ 。依次2倍等比稀释混合对照品母液, 制得7个不同质量浓度的系列混合对照品溶液。

**2.5.4 专属性考察** 取“2.5.2”项下吴茱萸汤供试品溶液、“2.5.3”项下混合对照品母液及溶剂, 按“2.5.1”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图(图5)。可见, 吴茱萸汤供试品溶液中被测定成分的保留时间与对照品溶液相同, 被测定成分分离效果良好, 无其他杂质干扰, 表明该方法专属性良好。

**2.5.5 线性关系、检测限、定量限考察** 取“2.5.3”项下系列混合对照品溶液, 按照“2.5.1”项下色谱条件进样测定, 计算10种指标成分的回归方程与相关系数( $r$ )。以各指标成分的信噪比( $S/N$ )约为3计算检测限,  $S/N$ 约为10计算定量限, 结果如表3所示。10种指标成分回归方程线性关系良好,  $r$ 都大于0.999。

**2.5.6 精密度考察** 取“2.5.2”项下制备的吴茱萸汤冻干粉供试品溶液, 按“2.5.1”项下色谱条件连续进样6次, 10种指标成分6-*O*-反式咖啡酰葡萄糖酸、绿原酸、金丝桃苷、去氢吴茱萸碱、人参皂苷  $\text{Rg}_1$ 、柠檬苦素、人参皂苷  $\text{Rb}_1$ 、6-姜辣素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱峰面积的 RSD 分别为  $0.75\%$ 、 $0.97\%$ 、 $1.80\%$ 、 $1.46\%$ 、 $1.19\%$ 、 $2.35\%$ 、 $2.27\%$ 、 $2.79\%$ 、



1-6-*O*-反式咖啡酰葡萄糖酸; 2-绿原酸; 3-金丝桃苷; 4-去氢吴茱萸碱; 5-人参皂苷 Rg<sub>1</sub>; 6-人参皂苷 Rb<sub>1</sub>; 7-柠檬苦素; 8-6-姜辣素; 9-吴茱萸碱; 10-吴茱萸次碱。

1-6-*O*-caffeoylglucopyranose; 2-chlorogenic acid; 3-hyperoside; 4-dehydroevodiamine; 5-ginsenoside Rg<sub>1</sub>; 6-ginsenoside Rb<sub>1</sub>; 7-limonin; 8-6-gingerol; 9-evodiamine; 10-rutecarpine.

图5 吴茱萸汤 (A, D)、混合对照品 (B, E)、溶剂 (C, F) 的 UPLC 图

Fig. 5 UPLC images of Wuzhuyu Decoction (A, D), mixed reference substances (B, E), and solvents (C, F)

表3 10种指标成分 UPLC-UV 定量测定的回归方程、*r*、线性范围、检测限、定量限

Table 3 Regression equations, *r*, linear ranges, detection limits, and quantification limits for UPLC-UV content determination of 10 components

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	检测限/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	定量限/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
6- <i>O</i> -反式咖啡酰葡萄糖酸	$Y=796.05 X-1.50$	1.000 0	27.23~1 743.20	0.43	0.85
绿原酸	$Y=1 140.40 X+1.52$	0.999 7	13.95~892.80	0.44	1.74
金丝桃苷	$Y=6 840.10 X-2.90$	1.000 0	2.43~155.20	0.08	0.15
去氢吴茱萸碱	$Y=22 099.00 X-7.44$	1.000 0	19.63~1 256.00	0.15	0.31
人参皂苷 Rg <sub>1</sub>	$Y=732.82 X-0.04$	1.000 0	18.17~1 163.00	0.14	0.28
柠檬苦素	$Y=4 190.40 X-89.71$	0.999 2	41.45~2 652.60	0.02	0.03
人参皂苷 Rb <sub>1</sub>	$Y=1 614.00 X-5.55$	0.999 9	14.27~913.00	0.11	0.22
6-姜辣素	$Y=40 783.00 X-59.06$	0.999 3	2.93~187.80	0.01	0.02
吴茱萸碱	$Y=10 726.00 X+77.25$	0.999 3	14.58~933.00	0.08	0.16
吴茱萸次碱	$Y=15 933.00 X-43.34$	0.999 1	4.91~314.40	0.02	0.06

的含有量,精密加入等量的10种对照品,按“2.5.2”项方法制备供试品溶液,按“2.5.1”项色谱条件进行检测,测定各指标成分峰面积,计算其加样回收率和RSD值。结果10种成分6-*O*-反式咖啡酰葡萄糖酸、绿原酸、金丝桃苷、去氢吴茱萸碱、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、柠檬苦素、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、6-姜辣素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱的平均加样回收率分别为102.07%、92.58%、92.26%、93.80%、99.53%、

2.25%、1.81%,结果表明该仪器精密度良好。

**2.5.7 稳定性考察** 按“2.5.2”项下方法制备吴茱萸汤冻干粉供试品溶液,分别于制备后0、2、4、8、12、24 h,按“2.5.1”项下色谱条件进样分析,测定峰面积,10种指标成分6-*O*-反式咖啡酰葡萄糖酸、绿原酸、金丝桃苷、去氢吴茱萸碱、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、柠檬苦素、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、6-姜辣素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱峰面积的RSD分别为1.48%、1.48%、2.17%、2.74%、4.41%、2.77%、1.43%、2.23%、1.39%、1.15%,结果表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

**2.5.8 重复性考察** 按“2.5.2”项下方法平行制备6份吴茱萸汤冻干粉供试品溶液,按“2.5.1”项下色谱条件进样分析,测定峰面积,计算各制备成分质量分数,10种指标成分6-*O*-反式咖啡酰葡萄糖酸、绿原酸、金丝桃苷、去氢吴茱萸碱、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、柠檬苦素、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、6-姜辣素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱质量分数的RSD分别为5.86%、4.85%、2.54%、1.97%、2.05%、3.81%、2.62%、2.98%、3.30%、3.00%,结果表明该方法重复性良好。

**2.5.9 加样回收率考察** 取吴茱萸汤冻干粉样品6份,每份约0.1 g,精密称定,按样品中各指标成分

89.31%、93.67%、89.42%、92.99%、86.54%,RSD分别为3.71%、5.34%、3.29%、1.77%、3.99%、1.00%、2.00%、5.55%、5.64%、4.42%,结果表明该方法准确度良好。

**2.5.10 吴茱萸汤、纳米相态、沉淀相态中10种指标成分的含量测定** 采用“2.5.2”项下方法制备不同煎煮方法、不同纯化处理方式得到的吴茱萸汤及其不同相态冻干粉的供试品溶液,并按“2.5.1”项



下色谱条件进行检测, 根据色谱结果计算各样品中 10 种指标成分的质量分数, 结果如表 4 所示。结果显示, 现代煎煮吴茱萸汤中 6-O-反式咖啡酰葡萄糖酸、绿原酸、金丝桃苷、去氢吴茱萸碱、

表 4 传统煎煮和现代煎煮吴茱萸汤经过不同纯化处理后原汤、纳米相态和沉淀相态中 10 种指标成分定量测定结果 (以中药饮片量计,  $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

**Table 4 Content of 10 components of original decoction, nanophase and precipitation phase in traditional and modern Wuzhuyu Decoction after different purification treatments ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )**

煎煮方法	纯化工艺	6-O-反式咖啡酰葡萄糖酸/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )			绿原酸/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )		
		原汤	纳米相态	沉淀相态	原汤	纳米相态	沉淀相态
传统煎煮	-	538.70±25.47	44.55±1.50	33.07±1.21	214.17±10.52	29.48±1.17	13.10±0.57
	澄清剂处理	502.89±6.46	39.39±1.09	23.95±3.61**	211.80±1.39	27.28±0.97	10.29±1.73*
	醇沉处理	483.95±32.25	194.79±13.75***	7.08±0.49***	209.54±38.79*	85.96±5.66***	2.18±0.23***
现代煎煮	-	802.94±62.21**	99.58±15.43**	58.18±6.36**	343.14±24.21**	71.97±6.74**	25.94±2.82**
	澄清剂处理	709.00±38.57	83.20±4.43	43.87±0.64**	320.62±12.87	62.42±4.65	18.13±0.60**
	醇沉处理	793.29±70.19	264.37±25.69***	18.41±1.94***	301.13±43.19	128.98±5.29***	6.93±0.71***
煎煮方法	纯化工艺	金丝桃苷/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )			去氢吴茱萸碱/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )		
		原汤	纳米相态	沉淀相态	原汤	纳米相态	沉淀相态
传统煎煮	-	32.59±2.24	11.51±0.36	4.06±0.22	186.85±10.96	27.13±1.02	57.59±3.11
	澄清剂处理	31.69±0.65	10.69±0.17	2.28±0.21**	181.62±4.03	22.67±0.68	29.67±0.74**
	醇沉处理	30.03±3.79	13.90±0.91***	1.45±0.15***	168.93±23.98	42.04±2.87***	36.26±4.45**
现代煎煮	-	53.78±2.78**	23.06±0.31**	7.38±0.86**	305.62±13.14**	48.30±1.85**	106.08±14.54**
	澄清剂处理	50.41±1.40	20.92±0.80	4.97±0.24**	267.12±6.17**	32.31±1.64**	67.66±6.14**
	醇沉处理	47.25±4.94	22.13±3.59	3.79±0.26**	264.24±23.78	56.00±1.07***	69.26±5.91**
煎煮方法	纯化工艺	人参皂苷 Rg <sub>1</sub> /( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )			柠檬苦素/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )		
		原汤	纳米相态	沉淀相态	原汤	纳米相态	沉淀相态
传统煎煮	-	253.49±14.11	127.12±4.30	17.18±0.95	329.49±11.20	62.22±1.39	129.83±7.71
	澄清剂处理	204.48±1.39**	114.61±1.65	9.87±1.52**	313.19±6.71	57.97±1.69	53.28±6.10**
	醇沉处理	197.33±13.69**	164.51±10.76***	1.45±0.47***	281.43±23.11*	73.04±2.22***	69.40±11.18**
现代煎煮	-	400.06±11.17**	207.48±12.01**	16.27±0.83	514.04±12.94**	83.22±0.73**	232.41±23.78**
	澄清剂处理	249.38±7.58**	226.24±10.19	8.64±0.63**	467.23±17.68*	74.86±0.80**	164.17±11.96**
	醇沉处理	355.29±34.61##	230.01±28.30	2.84±0.33***	403.90±7.09***	75.97±0.48**	141.43±6.46**
煎煮方法	纯化工艺	人参皂苷 Rb <sub>1</sub> /( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )			6-姜辣素/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )		
		原汤	纳米相态	沉淀相态	原汤	纳米相态	沉淀相态
传统煎煮	-	124.14±3.16	48.37±2.06	13.18±1.18	31.13±0.75	6.05±0.12	11.40±0.64
	澄清剂处理	117.02±0.88	45.85±2.70	8.22±0.67**	29.96±0.77**	5.73±0.12	4.02±0.41**
	醇沉处理	108.57±12.59	96.30±3.66***	1.06±0.12***	22.96±1.14##	7.34±0.18***	4.35±0.71**
现代煎煮	-	188.75±8.41**	124.01±2.78**	16.76±1.41**	63.58±0.72**	11.74±0.67**	24.79±2.23**
	澄清剂处理	161.20±7.69**	125.10±8.91	13.64±0.66**	56.84±1.66**	11.04±0.36	14.54±1.10**
	醇沉处理	169.46±2.83*	150.18±6.96***	1.71±0.23***	50.08±0.82***	8.34±2.65	21.84±2.24##
煎煮方法	纯化工艺	吴茱萸碱/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )			吴茱萸次碱/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )		
		原汤	纳米相态	沉淀相态	原汤	纳米相态	沉淀相态
传统煎煮	-	104.88±0.60	-	102.64±1.73	29.59±0.40	1.68±0.12	24.63±1.14
	澄清剂处理	25.87±1.25**	-	20.53±5.47**	15.10±0.47**	1.15±0.02**	6.34±1.20**
	醇沉处理	82.60±11.40***	0.85±0.02***	52.87±10.34***	24.64±2.16***	1.28±0.03**	19.62±3.69##
现代煎煮	-	85.70±1.01**	-	83.35±1.92**	23.39±0.88**	1.69±0.11	17.46±1.50**
	澄清剂处理	22.69±0.43**	-	21.70±0.50**	14.95±0.43**	1.20±0.01**	8.57±0.84**
	醇沉处理	65.10±1.40***	-	63.55±4.89***	18.95±0.48***	1.01±0.04**	15.63±1.88##

人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、柠檬苦素、6-姜辣素 8 种指标成分的质量分数显著高于传统煎煮吴茱萸汤 ( $P<0.01$ )；但吴茱萸碱、吴茱萸次碱的质量分数明显低于传统煎煮吴茱萸汤 ( $P<0.01$ )，可能长时间煎煮才有利于 2 种成分溶出。经过澄清剂、醇沉处理后，吴茱萸汤中 10 种指标成分的质量分数显著降低或有降低的趋势 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )，澄清剂处理后吴茱萸汤中吴茱萸碱、吴茱萸次碱的质量分数显著降低 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )，提示在制剂开发过程中需要选择合适的纯化方式。

2 种煎煮方法吴茱萸汤中的指标成分在 2 种相态中具有相同的分布趋势，纳米相态中分布多的指标成分有人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、金丝桃苷、绿原酸、6-*O*-反式咖啡酰葡萄糖酸，沉淀相态中分布多的指标成分有吴茱萸碱、吴茱萸次碱、去氢吴茱萸碱、柠檬苦素、6-姜辣素。2 种煎煮方法吴茱萸汤在经过澄清剂处理后，纳米相态与沉淀相态中大多数成分质量分数显著降低或有降低的趋势 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )，沉淀相态中指标成分降低更明显 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )；醇沉处理后，纳米颗粒虽然减少，但纳米相态中多数成分含量显著升高或有升高的趋势 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )，沉淀相态中多数成分含量显著降低或有降低的趋势 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )。

### 3 讨论

研究发现，传统煎煮时吴茱萸碱、吴茱萸次碱的含量高于现代煎煮，这 2 种成分是现代治疗偏头痛模型大鼠的正向成分<sup>[19]</sup>，汤中含量越高对于症状改善越好。同样是正向成分的人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 的含量低于现代煎煮，同时潜在毒性成分 6-*O*-反式咖啡酰葡萄糖酸的煎出量也显著低于现代煎煮。2 种煎煮方法对药效与潜在毒性的影响虽有待证实，但从指标成分含量变化来看，传统煎煮可能体现了药效与毒性的折中。从《古代经典名方关键信息表(25 首方剂)(征求意见稿)》中可见不同经典名方传统煎煮方法各有不同，煎煮方法与中药质量、剂量变迁等因素一样，均影响中药药效，因此应足够重视。不同煎煮方法所得吴茱萸汤纳米相态在冻干粉得率、指标成分含量及比例、蛋白质和多糖含量方面的差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )。尤其是君药吴茱萸中的吴茱萸碱、吴茱萸次碱等成分，主要存在于沉淀相态中，提示在中药煎煮与服用过程中不能忽视沉淀的作用。

纯化工艺在除杂的同时，也显著减少纳米颗粒

的数量或破坏其结构，并改变了主要化学成分在各相态中原来的分布比例。对于人参皂苷类成分，醇沉处理比澄清剂处理更能显著提高其在纳米相态中的含量 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )，更显著降低在沉淀中的含量 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )；对于生物碱类成分，醇沉处理显著升高其在纳米相态中的含量 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )，澄清剂处理比醇沉处理更显著降低其在沉淀相态中的含量 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )；对于有机酸类成分，醇沉处理显著升高其在纳米相态中的含量 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )，并比澄清剂处理更显著降低其在沉淀相态中的含量 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )。总体来说，澄清剂处理后的纳米相态成分分布与原汤接近，而醇沉处理后纳米相态中原本分布较多的成分含量显著增加 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )。分析其原因，首先排除了透析不完全、纳米颗粒被破坏等对结果产生影响的可能性。这些含量增加的成分，原本在纳米相态中分布就较多，说明其在纳米相态形成过程中具有一定的与大分子或者相互间结合的能力。醇沉后纳米相态中蛋白质、多糖等大分子减少，使原本该结合的成分游离出来，理论上应被透析出去而浓度降低，但在透析袋中反而增加，推测这些成分间相互作用形成了不同于单分子形态的分子团。实验所用透析袋截留相对分子质量为 3 500，对应纳米颗粒的粒径为 1~2 nm，分子团因相对分子质量增大而被截留，又因为尺寸较小，在 TEM 下不易被观察。

结构决定功能，纳米相态中成分的存在形式与分散状态发生了改变，其吸收分布特性、药理作用是否发生改变值得深入研究。本课题组前期研究发现，纳米相态与沉淀相态在抗炎、镇痛 2 方面各有优势，吴茱萸汤纳米相态可减少小鼠扭体次数，抑制醋酸引起的疼痛反应，表现出与吴茱萸汤近似的镇痛作用；沉淀相态可降低小鼠腹腔灌洗液 *A* 值，表现出与吴茱萸汤近似的抗炎作用<sup>[21]</sup>。说明中药汤剂中不同相态药理作用各有侧重，因此关注煎煮及制剂过程中中药汤剂的化学成分存在形式的变化具有重要意义。本研究结果说明了煎煮方法、纯化工艺会对原方的药性传递产生显著影响，也从另一个角度为以传统制备方法制备且不采用纯化工艺处理的经典名方开发原则提供了科学依据。

临床上普遍认为，中药传统汤剂药效优于颗粒剂<sup>[22-23]</sup>，其原因是否与制剂工艺破坏或改变了化学成分间形成的结构，值得进一步探讨。吴茱萸汤如后续开发成颗粒剂，颗粒剂溶化后化学成分在溶液

中的存在形式与标准汤剂是否一致需要思考。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 莫夏敏, 陈仁寿. 东汉至民国时期文献的经典名方吴茱萸汤考证 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(8): 33-42.
- [2] 南楠, 许永崧, 李美景, 等. 在体吸收谱效相关研究吴茱萸汤治疗偏头痛活性成分 [J]. 中草药, 2021, 52(19): 5956-5970.
- [3] 何朝, 浦益琼. 中药复方汤液相态差异分析研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(15): 259-266.
- [4] 王琪, 郭小萌, 倪乾坤, 等. 中药水煎液自组装聚集体研究面临的问题初探 [J]. 药学学报, 2024, 59(1): 94-104.
- [5] 乔宏志, 狄留庆, 平其能, 等. 结构中药学: 中药药效物质基础研究的新领域 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(10): 2443-2448.
- [6] Du J C, Liang Z, Xu J T, et al. Plant-derived phosphocholine facilitates cellular uptake of anti-pulmonary fibrotic HJT-sRNA-m7 [J]. *Sci China Life Sci*, 2019, 62(3): 309-320.
- [7] 赵清, 王通, 赵可伟. 中草药囊泡研究与应用专家共识 (2023年版) [J]. 中草药, 2024, 55(1): 12-22.
- [8] 高永坚, 曾杉, 林碧珊, 等. 经典名方芍药甘草汤古代与现代煎煮方法的差异性分析 [J]. 中国现代中药, 2023, 25(10): 2195-2200.
- [9] 张星, 赖文静, 林夏, 等. Box-Behnken 设计-响应面法优化经典名方四妙勇安汤煎煮工艺研究 [J]. 中草药, 2023, 54(10): 3109-3119.
- [10] 国家中医药管理局. 古代经典名方目录 (第一批) [EB/OL]. (2018-04-16) [2024-07-16] <http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2018-04-16/7107.html>.
- [11] 蔡梦如, 尹东阁, 彭胡麟玥, 等. 经典名方吴茱萸汤基准样品特征图谱及含量测定研究 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(15): 4015-4024.
- [12] 杨秀伟, 肖诗鹰, 杨智, 等. 精制吴茱萸胶囊化学成分的研究 [J]. 北京大学学报: 医学版, 2001, 33(3): 280-282.
- [13] 祝其非, 陶日增, 王志恒, 等. 丁达尔效应的应用研究进展 [J]. 激光杂志, 2024, 45(1): 10-18.
- [14] Bachurski D, Schuldner M, Nguyen P H, et al. Extracellular vesicle measurements with nanoparticle tracking analysis - An accuracy and repeatability comparison between NanoSight NS300 and ZetaView [J]. *J Extracell Vesicles*, 2019, 8(1): 1596016.
- [15] 黄秋凌, 雷婷, 何子昕, 等. 苯酚-硫酸法测定消渴丸中多糖含量 [J]. 中西医结合研究, 2023, 15(5): 308-310.
- [16] 高源, 郭琴, 王欢欢, 等. 基于中药大分子探讨芍药甘草汤镇痛的物质基础及作用机制 [J]. 药学学报, 2023, 58(5): 1138-1148.
- [17] 许永崧, 仇峰, 吴莎, 等. UPLC-MS/MS 测定吴茱萸汤活性组分在硝酸甘油致偏头痛大鼠血浆和脑组织的药代动力学 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(3): 645-654.
- [18] 许永崧, 潘学强, 龚慕辛, 等. 吴茱萸汤外翻肠囊吸收成分与原药中各成分相关关系研究 [J]. 中草药, 2014, 45(17): 2490-2498.
- [19] 潘学强, 吴燕川, 龚慕辛, 等. 外翻肠囊吸收成分与药效相关研究吴茱萸汤治疗偏头痛的药效物质 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(1): 126-133.
- [20] 刘舒凌, 王剑, 刘雯, 等. 吴茱萸水提物体外肝毒性的谱-毒关系研究 [J]. 中国药房, 2022, 33(1): 32-37.
- [21] 王琪, 李美景, 郭小萌, 等. 吴茱萸汤 2 种相态成分及抗炎镇痛作用差异的分析 [J]. 中国中药杂志, 2024, 49(21): 5865-5876.
- [22] 李雪莹. 中药配方颗粒与中药传统汤剂治疗湿疹的效果比较 [J]. 吉林医学, 2023, 44(9): 2539-2541.
- [23] 邱辉辉, 韩瑞婷, 盛丽莉, 等. 四妙方颗粒剂与汤剂防治非酒精性脂肪性肝病的对比研究 [J]. 中草药, 2021, 53(4): 1031-1038.

[责任编辑 郑礼胜]