不同煎煮时间下六味地黄方粉末饮片与传统饮片的指纹图谱和多成分含量比较Δ

吴　磊[1*]，刘玉平[2]，陆　超[1]，束雅春[1#]（1.南京中医药大学附属医院药学部，南京　210029；2.中国药科大学中药学院，南京　211198）

中图分类号　R917　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）01-0067-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.01.13

摘　要　目的　比较六味地黄方粉末饮片与传统饮片（后文称为“粉末饮片”和“传统饮片”）提取过程中多成分的变化规律，为六味地黄方的现代工艺研究提供科学依据。**方法**　以粉末饮片和传统饮片为样品，分别在浸泡60 min时，头煎0、5、10、15、20、25、30、40、50、60 min时和二煎5、10、20、30、40 min时取样。采用高效液相色谱法建立不同煎煮时间下2种饮片的指纹图谱，进行相似度评价和色谱峰的指认，并测定其中5-羟基糠醛、儿茶素、莫诺苷、马钱苷、獐芽菜苷、二氢槲皮素、丹皮酚和苯甲酰芍药苷8个指标成分的含量。**结果**　不同煎煮时间下，2种饮片与各自对照指纹图谱R的相似度均大于0.98。在传统饮片指纹图谱中，共指认出5个色谱峰，分别为5-羟基糠醛、莫诺苷、獐芽菜苷、二氢槲皮素、丹皮酚；在粉末饮片指纹图谱中，共指认出6个色谱峰，分别为5-羟基糠醛、莫诺苷、獐芽菜苷、二氢槲皮素、丹皮酚、苯甲酰芍药苷。含量测定结果显示，在头煎过程中，前5 min内粉末饮片中几乎所有成分的煎出速率均较传统饮片快；40 min后，除5-羟基糠醛和丹皮酚外，其余活性成分的含量均低于传统饮片。在二煎过程中，除丹皮酚和马钱苷外，其余成分的含量均是粉末饮片高于传统饮片；传统饮片中儿茶素在头煎中被完全煎出，而粉末饮片中儿茶素在二煎中依然可被检测到。2种饮片中8种成分的总煎出量差异不大。**结论**　六味地黄方粉末饮片化学成分与传统饮片相比无明显优势，无法节省煎煮时间和药材用量。

关键词　六味地黄方；粉末饮片；传统饮片；提取过程；指纹图谱；含量测定

Comparison of the fingerprint and multi-component contents between Liuwei dihuang powder decoction pieces and traditional decoction pieces with different decocting time

WU Lei[1], LIU Yuping[2], LU Chao[1], SHU Yachun[1] (1. Dept. of Pharmacy, the Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 2. School of TCM, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To compare the change law of multi-components in the extraction process between Liuwei dihuang powder decoction pieces and traditional decoction pieces (hereinafter referred to as powder decoction pieces and traditional decoction pieces), and to provide scientific basis for the modern technology research of Liuwei dihuang formula. **METHODS** Taking powder decoction pieces and traditional decoction pieces as samples, the samples were taken when soaking for 60 min, at 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 min of the first decocting and at 5, 10, 20, 30, 40 min of the second decocting, respectively. HPLC method was used to establish the fingerprints of 2 kinds of decoction pieces with different decocting time. The similarity evaluation and peak identification were performed. The contents of 8 components including 5-hydroxyfurfural, catechin, monoglycoside, loganin, swertin glycoside, dihydroquercetin, paeonol and benzoyl paeoniflorin were all determined. **RESULTS** With different decocting time, the similarties between 2 kinds of decoction pieces and their respective control fingerprints R were all greater than 0.98. In the fingerprints of traditional decoction pieces, five chromatographic peaks were identified, namely, 5-hydroxyfurfural, monetin, swertiaoside, dihydroquercetin and paeonol; in the fingerprints of powder decoction pieces, six chromatographic peaks were identified, namely, 5-hydroxyfurfural, monoglycoside, swertiamarin, dihydroquercetin, paeonol and benzoyl paeoniflorin. The results of content determination showed that in the first 5 minutes of the first decocting, the decocting rate of almost all the ingredients in the powder decoction pieces was faster than that of the traditional decoction pieces; after 40 min, the contents of other active ingredients were lower than those of traditional decoction pieces except for 5-hydroxyfurfural and paeonol. In the process of second decocting, except for paeonol and loganin, the contents of other ingredients in powder decoction pieces were higher than that in traditional decoction pieces; catechin was completely decocted from the traditional decoction pieces in the first decocting, while it could still be detected in the powder decoction pieces in the

Δ **基金项目**　2020年度院级创新发展基金专项课题（No.Y2020CX27）；江苏省药学会-天晴医院药学基金项目（No.Q202009）

＊**第一作者**　副主任中药师，博士。研究方向：中药制剂与分析。E-mail：xiaoleiyaoshi@163.com

＃ **通信作者**　主任中药师，博士。研究方向：中药制剂与分析。E-mail：yfy0093@njucm.edu.cn

second decocting. There was little difference in the total decocted amount of the 8 ingredients in the two decoction pieces. **CONCLUSIONS** The chemical composition of powder decoction pieces of Liuwei dihuang formula has no obvious advantages compared with traditional decoction pieces, and can not save the decocting time and the amount of medicinal materials.
KEYWORDS Liuwei dihuang decoction; powder decoction pieces; traditional decoction pieces; extraction process; fingerprint; content determination

随着现代科学技术的不断进步和发展，中药饮片也出现了多种有别于传统饮片的用药形式，诸如配方颗粒[1]、精制饮片[2]、粉末饮片[3]等，这些新出现的饮片用药形式具有一定积极的临床意义，是对中药传统饮片的有益补充。中药粉末饮片因具有节省药材资源、配伍灵活、防止处方外泄等特点被广泛应用。《中国药典》以及各省级中药饮片炮制规范中收载的中药粉末饮片日益增多[4]，部分省份的炮制规范中甚至还收载了中药超微粉末饮片、中药破壁粉末饮片等新规格[4]。然而，我国并未对中药粉末饮片的适用范围、适宜粒径、制备工艺、质量控制等内容作出详细的规定，也未制定统一的标准，难以保障中药粉末饮片的质量[5]。临床以粉末饮片替代传统饮片使用时，该如何调整剂量、如何选择适宜粒径和稳定煎煮工艺从而保证其生物等效性和安全性，是迫切需要研究的问题，也是创新中药饮片用药形式的关键科学问题[6]。

六味地黄方为中医经典的“滋补肾阴”方，由熟地黄、酒萸肉、山药、牡丹皮、泽泻和茯苓组成，具有滋阴补肾、抗衰老的作用[7]。在临床使用中，六味地黄方有多种剂型，传统的有饮片煎煮的六味地黄汤和全方打粉或部分饮片煎煮制成的水丸和浓缩丸。不同剂型的用药形式差异较大，这是否会影响该方的安全性和有效性尚不明确。鉴于此，本研究基于“成分反映活性，活性指向功效”的中药质量控制研究思路，比较不同煎煮时间下六味地黄方粉末饮片和传统饮片（后文简称为“粉末饮片”“传统饮片”）提取液的指纹图谱以及8个指标成分的变化规律，为合理制定其现代煎煮工艺提供科学依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有Agilent 1260型高效液相色谱仪（美国Agilent公司）、AR2140型万分之一天平（上海奥豪斯仪器有限公司）、YF-103B型高速中药粉碎机（瑞安市永历制药机械有限公司）、XH-C型旋涡混合器（金坛区西城新瑞仪器厂）。

1.2 主要药品与试剂

熟地黄（产地河南，批号220102）、酒萸肉（产地河南，批号220101）、山药（产地河南，批号211102）、牡丹皮（产地安徽，批号211202）均购于马鞍山井泉中药饮片有限公司，茯苓（产地云南，批号20211201-02）、泽泻（产地四川，批号20211201-01）均购于贵州同德药业股份有限公司，以上饮片由江苏省中医院主任中药师周继发鉴定均为真品。对照品5-羟甲基糠醛（批号210511，纯度98%）、苯甲酰芍药苷（批号201207，纯度98%）、马钱苷（批号210513，纯度98%）、獐芽菜苷（批号211211，纯度98%）、丹皮酚（批号201110，纯度98%）、莫诺苷（批号210822，纯度98%）、二氢槲皮素（批号210310，纯度98%）、儿茶素（批号210416，纯度98%）均购于南京聚康医药化工有限公司；磷酸为分析纯，甲醇为色谱纯，水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用Supersil C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）色谱柱，以甲醇（A）-0.1%磷酸溶液（B）为流动相进行梯度洗脱（0～5 min，5%A→7%A；5～15 min，7%A→10%A；15～25 min，10%A→20%A；25～50 min，20%A→23%A；50～80 min，23%A→32%A；80～120 min，32%A→54%A）；检测波长为230 nm；柱温为35 ℃；流速为1.0 mL/min；进样量为10 μL。

2.2 混合对照品溶液的制备

分别取5-羟甲基糠醛、儿茶素、莫诺苷、马钱苷、獐芽菜苷、二氢槲皮素、丹皮酚、苯甲酰芍药苷对照品各适量，置于同一25 mL容量瓶中，加甲醇制成各对照品质量浓度分别为200.000、11.750、247.000、29.380、93.600、25.080、96.100、25.000 μg/mL的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 不同煎煮时间传统饮片供试品溶液的制备 称取六味地黄方1日剂量（熟地黄20 g、酒萸肉10 g、牡丹皮10 g、山药10 g、茯苓7.5 g、泽泻7.5 g），置于陶瓷药罐中，加入8倍量水（mL/g，下同），浸泡60 min后取样（S1）；用电磁炉武火加热煎煮，沸腾后（即煮沸0 min）立即取样（S2）；调节电陶炉功率保持微沸，于头煎煮沸5、10、15、20、25、30、40、50、60 min时取样2 mL，分别记为S3～S11；于二煎（头煎后的滤渣继续加7倍量水煎煮）5、10、20、30、40 min时分别取样2 mL，分别记为S12～S16。每次取样后，于陶瓷药罐中加水补足减失的体积。将取样液在蒸发皿中水浴蒸干，再用甲醇溶解，定容至2 mL，以0.45 μm微孔滤膜滤过，收集滤液，即得传统饮片供试品溶液。

2.3.2 不同煎煮时间粉末饮片供试品溶液的制备 称取六味地黄方1日剂量（同“2.3.1”项下），用高速中药粉

碎机粉碎成最粗粉（粉末饮片并未对粉碎的粒径进行规定，但前期本课题组研究发现六味地黄方中粉及以下粒径粉末在煎煮过程中会形成黏稠的胶状物，难以过滤），置于陶瓷药罐中煎煮，按照“2.3.1”项下的方法取样（样品依次记为T1～T16）并制备成粉末饮片供试品溶液。

2.4 不同煎煮时间传统饮片和粉末饮片的化学特征指纹图谱分析

2.4.1 精密度试验 精密量取同一供试品溶液（样品S9）10 μL，按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次，记录峰面积。以獐芽菜苷为参照峰计算得各共有峰相对保留时间的RSD＜1.2%（n=6），相对峰面积的RSD＜1.5%（n=6），表明方法精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 精密量取同一供试品溶液（样品S9）10 μL，分别在室温下放置0、4、8、12、16、20、24 h时，按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。以獐芽菜苷为参照峰计算得各共有峰相对保留时间的RSD＜0.2%（n=6），相对峰面积的RSD＜1.4%（n=6），表明供试品溶液于室温放置24 h内稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 取同一样品（样品S9）6份，按“2.3.1”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，记录峰面积。以獐芽菜苷为参照峰计算得各共有峰相对保留时间的RSD＜0.6%（n=6），相对峰面积的RSD＜1.6%（n=6），表明该方法重复性良好。

2.4.4 特征图谱的建立及分析 分别取不同煎煮时间的粉末饮片和传统饮片供试品溶液，按照“2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。将色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012年版）》中，分别以S1、T1的图谱为参照图谱，设置时间窗宽度为0.1 min，采用多点校正法进行色谱峰的自动匹配，分别生成不同煎煮时间传统饮片和粉末饮片样品的指纹图谱（图1、图2）；采用中位数法分别生成传统饮片和粉末饮片的对照指纹图谱R，并以对照指纹图谱R为参照进行相似度评价。结果显示，在16批传统饮片的图谱中共得到5个共有峰，在16批粉末饮片的图谱中共得到6个共有峰，2种饮片的色谱图与各自对照指纹图谱R的相似度均在0.98以上。

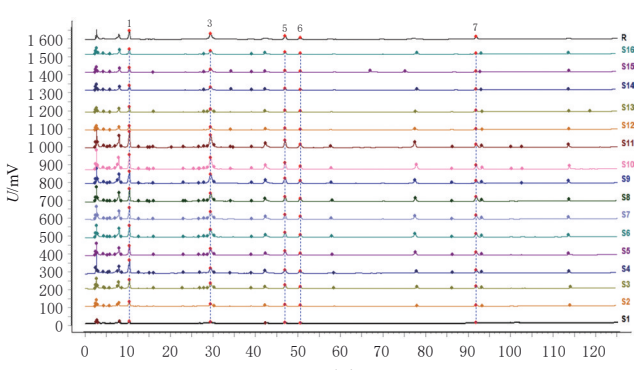


图1 不同煎煮时间传统饮片的指纹图谱及对照指纹图谱R

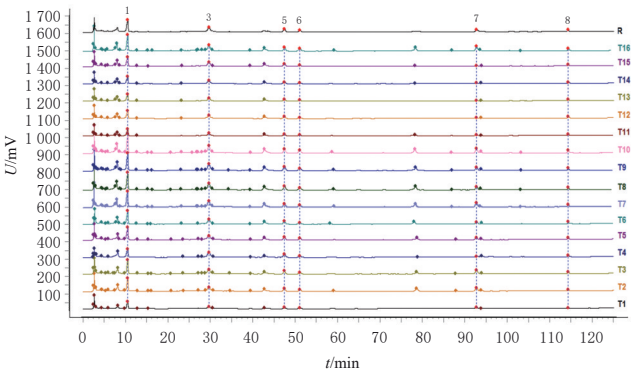


图2 不同煎煮时间粉末饮片的指纹图谱及对照指纹图谱R

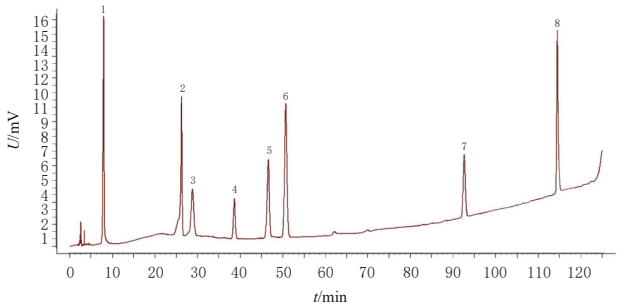
2.4.5 共有峰标定 通过将2种饮片的对照指纹图谱R与混合对照品溶液的色谱图（取“2.2”项下对照品溶液按“2.1”项下色谱条件进样测定所得）进行比对，指认共有峰。结果显示，在传统饮片指纹图谱中，共指认出5个色谱峰，分别为5-羟基糠醛（1号峰）、莫诺苷（3号峰）、獐芽菜苷（5号峰）、二氢槲皮素（6号峰）、丹皮酚（7号峰）；在粉末饮片指纹图谱中，共指认出6个色谱峰，分别为5-羟基糠醛（1号峰）、莫诺苷（3号峰）、獐芽菜苷（5号峰）、二氢槲皮素（6号峰）、丹皮酚（7号峰）、苯甲酰芍药苷（8号峰）。结果见图3。

2.5 不同煎煮时间传统饮片和粉末饮片中8个指标成分的含量测定

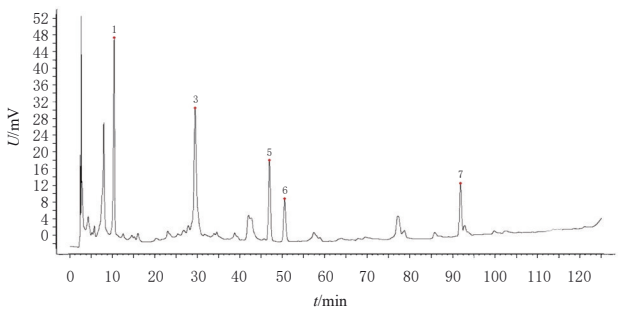
2.5.1 色谱条件与系统适用性试验 分别精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液和“2.3”项下的2种供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。结果显示，各待测成分峰与其相邻峰间的分离度均大于1.5，理论板数以5-羟基糠醛计大于3 000，表明本方法的系统适用性较好。

2.5.2 线性关系及定量限、检测限考察 精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液0.2、0.4、0.8、1.0、1.6、2.0 mL，置于2 mL容量瓶中，加甲醇定容，摇匀，按“2.1”项下色谱条件进行分析，以各待测成分质量浓度为横坐标（X）、峰面积为纵坐标（Y）进行线性回归。同时，精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液适量，倍比稀释后按“2.1”项下色谱条件进行分析，以信噪比3∶1和10∶1时的质量浓度分别作为检测限和定量限。结果表明，8个待测成分均在其考察质量浓度范围内线性关系均良好（r≥0.999 0）。结果见表1。

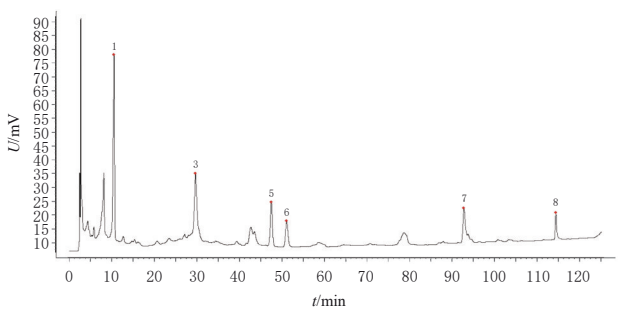
2.5.3 精密度试验 精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件重复进样测定6次，记录峰面积。结果显示，5-羟基糠醛、儿茶素、莫诺苷、马钱苷、獐芽菜苷、二氢槲皮素、丹皮酚、苯甲酰芍药苷峰面积的RSD分别为2.88%、1.16%、0.73%、1.07%、1.00%、1.25%、1.27%、1.23%（n=6），表明仪器的精密度良好。



A. 混合对照品溶液



B. 传统饮片的对照指纹图谱R



C. 粉末饮片的对照指纹图谱R

1：5-羟基糠醛；2：儿茶素；3：莫诺苷；4：马钱苷；5：獐芽菜苷；6：二氢槲皮素；7：丹皮酚；8：苯甲酰芍药苷

图3　混合对照品溶液和传统饮片、粉末饮片的对照指纹图谱R

表1　8种待测成分的线性关系及定量限、检测限考察结果

待测成分	回归方程	r	线性范围/（μg/mL）	检测限/（μg/mL）	定量限/（μg/mL）
5-羟基糠醛	Y=11 202X+8.554 9	0.999 9	20.000～200.000	1.650	4.800
儿茶素	Y=24 620X−126.01	0.999 5	1.175～11.750	0.590	1.175
莫诺苷	Y=12 117X−29.282	0.999 7	24.700～247.000	1.180	3.600
马钱苷	Y=5 868.3X−4.297 9	0.999 6	2.938～29.380	0.350	1.400
獐芽菜苷	Y=17 423X^2+0.104	0.999 5	9.360～93.600	0.920	2.450
二氢槲皮素	Y=29 566X−1.634 3	0.999 7	2.508～25.080	0.025	0.085
丹皮酚	Y=13 782X−15.461	0.999 2	9.610～96.100	0.450	1.050
苯甲酰芍药苷	Y=21 714X−10.909	0.999 0	2.500～25.000	0.850	2.080

2.5.4　稳定性试验　精密吸取同一供试品溶液（样品S9），分别在室温下放置0、4、8、12、16、24 h时，按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果显示，5-羟基糠醛、儿茶素、莫诺苷、马钱苷、獐芽菜苷、二氢槲皮素、丹皮酚、苯甲酰芍药苷峰面积的RSD分别为0.84%、1.35%、0.62%、1.16%、0.56%、1.04%、0.61%、0.79%（n=6），表明供试品溶液在室温放置24 h内稳定性良好。

2.5.5　重复性试验　精密吸取同一供试品溶液（样品S9），共6份，按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积，并采用外标法计算各成分的含量。结果显示，5-羟基糠醛、儿茶素、莫诺苷、马钱苷、獐芽菜苷、二氢槲皮素、丹皮酚、苯甲酰芍药苷含量的RSD分别为0.70%、1.34%、0.55%、1.40%、0.51%、0.62%、0.25%、1.11%（n=6），表明该方法的重复性良好。

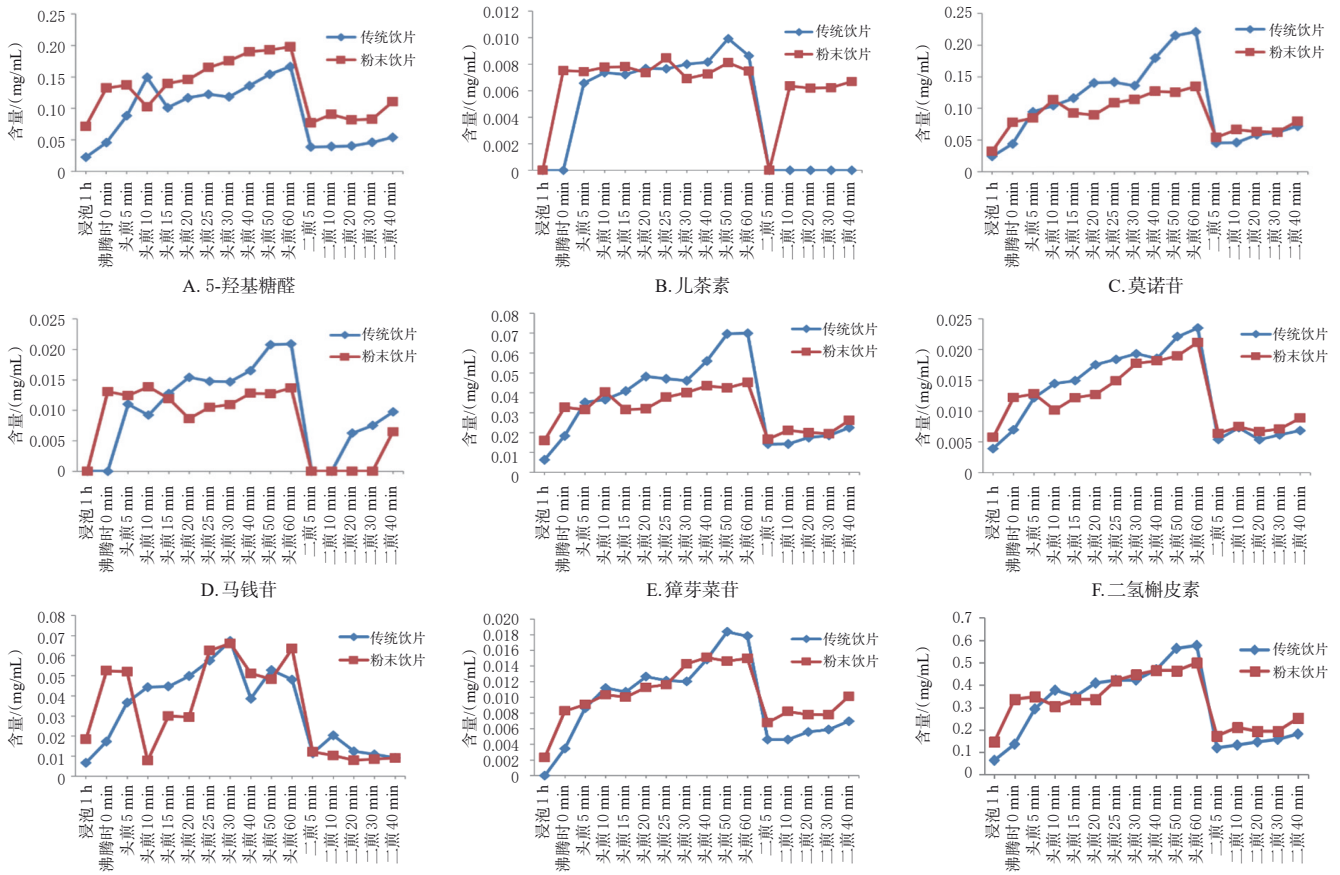
2.5.6　加样回收试验　精密量取已知含量的样品（样品S9）1 mL，共6份，按与已知成分含量1∶1的比例加入混合对照品溶液，按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液，然后按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积，采用外标法计算各成分的含量并计算其加样回收率。结果显示，5-羟基糠醛、儿茶素、莫诺苷、马钱苷、獐芽菜苷、二氢槲皮素、丹皮酚、苯甲酰芍药苷的平均加样回收率分别为99.76%（RSD=0.83%，n=6）、93.03%（RSD=0.65%，n=6）、94.82%（RSD=0.90%，n=6）、95.70%（RSD=0.92%，n=6）、95.73%（RSD=0.65%，n=6）、95.30%（RSD=0.83%，n=6）、107.35%（RSD=0.58%，n=6）、106.13%（RSD=1.45%，n=6），表明该方法的准确度较好。

2.5.7　样品含量测定　取不同煎煮时间的传统饮片与粉末饮片样品，分别按“2.3.1”和“2.3.2”项下方法制备供试品溶液，然后按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积，采用外标法计算样品含量，绘制含量-时间变化折线图（图4）。结果显示，在头煎过程中，前5 min内粉末饮片中几乎所有活性成分的煎出速率均较传统饮片快；40 min后，除5-羟基糠醛和丹皮酚外，其余指标成分的含量均低于传统饮片。二煎过程中，除丹皮酚和马钱苷外，其余指标成分的含量均是粉末饮片高于传统饮片；传统饮片中儿茶素在头煎中被完全煎出，而粉末饮片在二煎中依然可以检测到。粉末饮片中8个指标成分的煎出总量与传统饮片相当。

3　讨论

3.1　指标成分的选择

六味地黄方为“滋补肾阴”的经典名方，由熟地黄、酒萸肉、山药、牡丹皮、泽泻和茯苓组成。5-羟基糠醛为熟地黄和山茱萸的活性成分，对肝损伤及血管内皮细胞具有保护作用[8]；儿茶素、二氢槲皮素、丹皮酚和苯甲酰芍药苷为牡丹皮的质量标志物，其可抑制肾脏系膜细胞增殖，对糖尿病肾病模型大鼠的肾脏具有保护作用[9]；莫诺苷、马钱苷和獐芽菜苷为山茱萸的主要活性成分，可通过调节代谢紊乱、改善氧化应激、降低炎症反应等改善糖尿病肾病[10]。本研究基于“成分反映活性，活性指向功效”的中药质量控制研究思路，选择5-羟基糠醛、儿茶素、莫诺苷、马钱苷、獐芽菜苷、二氢槲皮素、丹皮酚、苯甲酰芍药苷作为考察指标，可全面反映粉末饮片与传统饮片在煎煮过程中的差异。此外，据相关文献报道，



A. 5-羟基糖醛　B. 儿茶素　C. 莫诺苷

D. 马钱苷　E. 獐芽菜苷　F. 二氢槲皮素

G. 丹皮酚　H. 苯甲酰芍药苷　I. 8个指标成分总和

注：成分未检出时暂以0 mg/mL表示

图4　8个指标成分的含量-时间变化折线图

茯苓饮片中茯苓酸对肾损伤也具有干预作用[11]。本研究前期拟将茯苓酸作为考察指标，但在预实验中发现，供试品溶液中无法检出该成分。查阅文献后发现，茯苓酸的稳定性差，水煎后其结构易被破坏[12]，故本研究最终未将其纳为考察指标。

3.2　煎煮过程中粉末饮片与传统饮片中各指标成分的含量变化情况

从各指标成分的含量-时间变化折线图中可知，头煎5 min内，粉末饮片中几乎所有活性成分的煎出速率均较传统饮片快；头煎40～60 min内，除5-羟基糠醛和丹皮酚外，其余活性成分的含量均低于传统饮片。粉末饮片的表面积较传统饮片有所增加，理论上前者在水中化学成分的溶出应一直高于后者[13—14]，但本研究实际结果与该理论不符。分析其中原因，笔者认为可能是因为饮片在粉碎后导致部分细胞破裂，煎煮过程中产生了大量的不溶物及较多的树脂和黏液质，使得水煎液的黏度增加；且增加的树脂和黏液质覆盖在饮片表面，影响了药材组织内部与水的接触，使得粉末饮片中的化学成分难以溶出。在二煎过程中，除丹皮酚和马钱苷外，其余成分的含量均是粉末饮片高于传统饮片，这是因为随着渗出的树脂和黏液质被头煎药液带走，没有阻碍粉末饮片中化学成分的溶出，故二煎时大部分活性成分的含量均是粉末饮片高于传统饮片。丹皮酚易挥发，粉碎后会导致该成分有所损失；马钱苷极易溶于水，在粉末饮片中的溶出并无优势[15]。因此，二煎时粉末饮片中上述2个成分的含量均低于传统饮片。儿茶素在中性和碱性条件下结构不稳定，但其在粉末饮片二煎液中依然可以检测到。分析其原因，笔者认为可能是打粉煎煮后，某些伴生物质影响了汤液的pH，或者引起了儿茶素结构的改变，提高了其稳定性[16]。因此，对于处方中含黏液质较多且有效成分不稳定的饮片，在不影响疗效的情况下可以考虑采用单煎法。

综上所述，本研究通过比较六味地黄方粉末饮片与传统饮片提取过程中多成分的变化规律，发现六味地黄方粉末饮片化学成分整体上与传统饮片相比无明显优势，无法节省煎煮时间和药材用量。

参考文献

[1] 董力嘉，傅舒. 中药配方颗粒现状研究[J]. 中药与临床，2021，12(4)：85-89.

[2] 李巾，彭艳梅，陈娟，等. 精制中药饮片酒白芍炮制工艺研究[J]. 实用中西医结合临床，2019，19(11)：175-177.

[3] 成金乐，郑夏生，杨泽锐，等. 中药饮片粉末的历史与应用[J]. 世界科学技术-中医药现代化，2016，18(9)：1539-1545.

（下转第77页）