不同煎煮时间桑白皮汤煮散与汤剂的特征图谱及多指标成分含量比较Δ

蒋近近[1,2*]，吴　磊[1]，朱育凤[1]，孙　思[1]，邱明鸣[1]，陆　超[1#]（1.南京中医药大学附属医院/江苏省中医院药学部，南京　210029；2.南京中医药大学第一临床医学院，南京　210029）

中图分类号　R917　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）05-0565-05
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.05.10

摘　要　目的　比较不同煎煮时间桑白皮汤煮散与汤剂（后文简称为“煮散”和“汤剂”）物质基准的特征图谱与多指标成分含量变化，为桑白皮汤的制剂开发提供实验基础。**方法**　以不同煎煮时间的煮散与汤剂样品为研究对象。利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012版）》软件建立2种样品的高效液相色谱（HPLC）特征图谱，并进行相似度评价；采用HPLC法测定煮散与汤剂样品中桑皮苷A、栀子苷、小檗碱、黄芩苷、槲皮素和木犀草素含量，以各指标成分含量及总含量变化为评价指标比较二者煎煮过程的差异。**结果**　不同煎煮时间煮散和汤剂特征图谱的相似度分别为0.943～1.000、0.975～0.998。煮散中6种指标成分的溶出速率较快且含量较高；煎煮20 min时，煮散中各指标成分含量分别为汤剂煎煮50 min时的1.1～1.5倍，煮散中各指标成分的总含量为汤剂的1.2倍。**结论**　与汤剂相比，桑白皮汤煮散具有缩短煎煮时间、节约中药资源的优势。本研究结果为“遵古”开发本方剂奠定了基础。

关键词　桑白皮汤；物质基准；煮散；汤剂；特征图谱；含量测定

Comparison of characteristic chromatogram and the contents of multiple indicator components of *Morus alba* decoction powder and decoction at different decoction time

JIANG Jinjin[1,2], WU Lei[1], ZHU Yufeng[1], SUN Si[1], QIU Mingming[1], LU Chao[1] (1. Dept. of Pharmacy, the Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine/Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 2. First School of Clinical Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To compare characteristic chromatogram and the contents of multiple indicator components of *Morus alba* decoction powder and decoction at different decoction time, and to provide experimental basis for the development of *M. alba* decoction. **METHODS** Taking decoction powder and decoction at different decoction time as subject, HPLC characteristic chromatogram of 2 kinds of samples were established with *Similarity Evaluation Software System of TCM Chromatographic Fingerprint* (2012 version), and similarity evaluation was performed. The contents of mulberroside A, geniposide, berberine, baicalin, quercetin and luteolin in decoction powder and decoction were determined by HPLC. The contents of each indicator component and the change of total content were as the evaluation indexes to compare the difference between the two substances during decoction. **RESULTS** The similarities of characteristic chromatogram of the two substances ranged from 0.943 to 1.000 and 0.975 to 0.998 at different decoction time, respectively. Six indicator components of the decoction powder dissolved faster and had higher contents. The contents of each indicator component in the decoction powder when decocting at 20 minutes was 1.1-1.5 times of the decoction when decocting at 50 min, and the total content in the decoction powder was 1.2 times of the decoction. **CONCLUSIONS** Compared with decoction, *M. alba* decoction powder has the advantages of shortening the decoction time and saving traditional Chinese medicine resources. The results of this study lay a research foundation for “Zungu” to develop its preparation.

KEYWORDS　*Morus alba* decoction; material basis; decoction powder; decoction; characteristic chromatogram; content determination

桑白皮汤源自明代张景岳所著的《景岳全书》，书中记载“治肺气有余，火炎痰盛作喘”[1]，现收载于《古代经典名方目录（第一批）》。桑白皮汤全方由桑白皮、黄芩、黄连、浙贝母、炒栀子、法半夏、炒紫苏子、焯苦杏仁组成，具有清热化痰、降肺平喘的功效，主治痰热郁肺之喘证，在治疗慢性阻塞性肺疾病、支气管炎和哮喘等疾病方面临床疗效确切[2]。

Δ **基金项目**　江苏省中医药科技发展计划项目（No.YB2020014）；江苏省中医院创新发展基金专项课题（No.Y2020CX27）；江苏省药学会-天晴医院药学基金立项课题（No.Q202009）

＊ **第一作者**　硕士研究生。研究方向：中药学。E-mail：jin2021fighting@163.com

通信作者　副主任中药师，硕士。研究方向：中药学。E-mail：sinkly228@126.com

目前，针对桑白皮汤的研究主要集中于临床疗效和作用机制方面[3]，而有利于新药制剂研发的物质基准涉及甚少。国家药品监督管理局发布的《古代经典名方中药复方制剂简化注册审批管理规定》明确了“经典名方物质基准”研制为经典名方制剂申报和研制的必经阶段[4]，但目前对于物质基准的制备并没有统一的标准，因此针对具体的经典名方物质基准还需具体研究。鉴于此，本研究依据《按古代经典名方目录管理的中药复方制剂药学研究技术指导原则（试行）》以及《医疗机构中药煎药室管理规范》制备桑白皮汤煮散和汤剂2种物质基准[5—6]，采用高效液相色谱（HPLC）法建立上述2种物质基准的特征图谱和含量测定方法，比较二者煎煮过程中桑皮苷A、栀子苷、小檗碱、黄芩苷、槲皮素、木犀草素6种指标成分含量的变化趋势，为桑白皮汤的制剂开发提供实验基础。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有Agilent 1260型HPLC仪（美国Agilent公司，配置二极管阵列检测器），GL224型万分之一电子分析天平（德国Sartorius公司），KQ-1000型医用超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司），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

桑白皮（产地安徽，批号22020831A）饮片购自扬子江药业集团江苏龙凤堂中药有限公司，法半夏（产地甘肃，批号D2022011）、黄芩（产地甘肃，批号202201）、焯苦杏仁（产地河北，批号202201-1）饮片均购自四川新荷花中药饮片股份有限公司，浙贝母（产地浙江，批号202201）、炒栀子（产地江西，批号202201）、炒紫苏子（产地安徽，批号22020731A）、黄连（产地重庆，批号20220101-01）饮片均购自马鞍山井泉中药饮片有限公司，上述饮片经江苏省中医院药学部副主任中药师吴磊鉴定均为真品；黄芩苷对照品（批号JZ21042102，纯度≥98%）购自南京景竹生物科技有限公司；桑皮苷A、小檗碱、木犀草素、槲皮素、栀子苷对照品（批号分别为210717、210514、210711、210706、211008，纯度均不低于98%）均购自南京聚康医药化工有限公司；甲醇、磷酸均为色谱纯，水为纯净水，其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 不同煎煮时间桑白皮汤煮散供试品溶液的制备 参考文献[7—8]方法并进行优化后制备。称取处方量饮片（桑白皮、法半夏、黄芩、焯苦杏仁、浙贝母、炒栀子、炒紫苏子、黄连各3 g）共6份，分别捣成颗粒（过4目筛不过10目筛），置于陶瓷药罐中，加水400 mL，浸泡60 min后取样1 mL（记为T1），武火沸腾后取样1 mL（记为T2），调节电陶炉功率至文火保持微沸，分别于煮沸5、10、15、20 min时取样各1 mL（记为T3～T6）。将T1～T6样品分别用甲醇定容至5 mL容量瓶中，涡旋混匀，用0.45 μm微孔滤膜滤过，收集滤液，即得。

2.1.2 不同煎煮时间桑白皮汤汤剂供试品溶液的制备 参考文献[7—8]方法并进行优化后制备。称取处方量饮片（桑白皮、法半夏、黄芩、焯苦杏仁、浙贝母、炒栀子、炒紫苏子、黄连各3 g）共11份，分别置于陶瓷药罐中，加水350 mL，浸泡60 min后取样1 mL（记为S1），武火沸腾后取样1 mL（记为S2），调节电陶炉功率至文火保持微沸，分别于头煎煮沸5、10、15、20、25、30 min时取样各1 mL（记为S3～S8）；过滤，滤渣加水300 mL再次煎煮，分别于二煎煮沸5、10、20 min后过滤，滤液与各头煎液合并，混匀后取样各1 mL（记为S9～S11）。将S1～S11样品分别用甲醇定容至5 mL容量瓶中，涡旋混匀，用0.45 μm微孔滤膜滤过，收集滤液，即得。

2.1.3 对照品溶液的制备 分别精密称取桑皮苷A、栀子苷、小檗碱、黄芩苷、槲皮素、木犀草素对照品适量，置于不同具塞锥形瓶中，分别加甲醇溶解并定容至10 mL容量瓶中，密塞，称定质量，超声（功率200 W，频率40 kHz）处理10 min，放置至室温，再次称定质量，加甲醇补足减失的质量，制备成质量浓度分别为506.00、1 089.00、499.00、1 010.00、522.00、510.00 μg/mL的单个对照品溶液。精密吸取单个对照品溶液各1 mL至10 mL容量瓶中，加甲醇至刻度线，用0.45 μm微孔滤膜滤过，收集滤液，即得混合对照品溶液。

2.2 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%磷酸水溶液（B）为流动相进行梯度洗脱（0～10 min，5%A→20%A；10～50 min，20%A→30%A；50～85 min，30%A→40%A；85～120 min，40%A→50%A；120～140 min，50%A→60%A；140～150 min，60%A→90%A；150～155 min，90%A→95%A；155～160 min，95%A→5%A）；流速为1.0 mL/min；检测波长为254 nm；柱温为35 ℃；进样量为5 μL。

2.3 桑白皮汤物质基准特征图谱的建立

2.3.1 精密度试验 精密吸取“2.1.2”项下供试品溶液（S8），按“2.2”项下色谱条件连续进样测定6次，记录色谱图。以黄芩苷为参照峰，计算得各共有峰相对峰面积的RSD＜3.36%、相对保留时间的RSD＜1.06%（n=6），表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取“2.1.2”项下供试品溶液（S8），室温放置0、4、8、16、20、24 h后，分别按“2.2”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。以黄芩苷为参照峰，计算得各共有峰相对峰面积的RSD＜3.82%、相对保留时间的RSD＜1.27%（n=6），表明该供试品溶液在室温放置24 h内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 按“2.1.2”项下方法平行制备6份供试品溶液（S8），分别按“2.2”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。以黄芩苷为参照峰，计算得各共有峰相对峰面积的RSD＜4.24%、相对保留时间的RSD＜1.53%（n=6），表明该方法重复性好。

2.3.4　特征图谱的建立及相似度评价　取不同煎煮时间的桑白皮汤煮散与汤剂样品（T1～T6和S1～S11），分别按“2.2”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版）》软件进行分析，分别选取样品T6、S8的图谱为参照图谱，时间宽度设定为0.1 min，采用中位数法，经多点校正，以Mark峰匹配得到桑白皮汤2种物质基准的特征图谱（图1、图2），系统分别生成对照指纹图谱R-T、R-S及相似度结果。结果显示，在桑白皮汤煮散样品T1～T6中共确定了21个共有峰，相似度分别为0.943、0.986、0.991、0.999、0.997、1.000；在桑白皮汤汤剂样品S1～S11中共确定了18个共有峰，相似度分别为0.983、0.984、0.982、0.975、0.996、0.994、0.996、0.994、0.998、0.998、0.994。

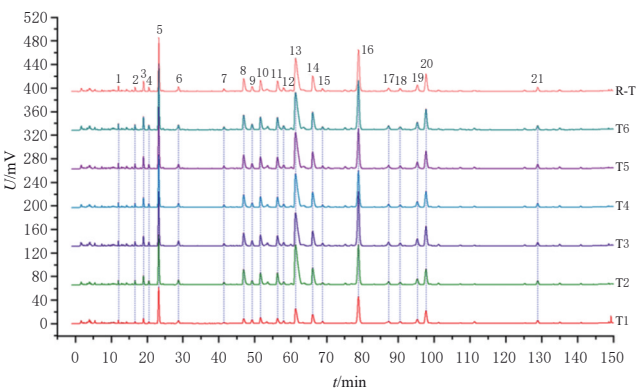


图1　桑白皮汤煮散物质基准的特征图谱与对照指纹图谱R-T

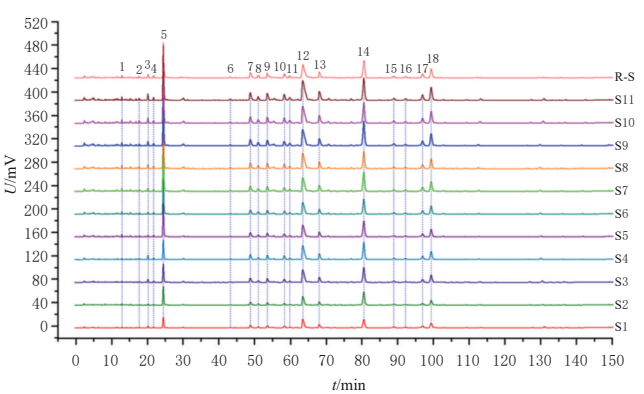


图2　桑白皮汤汤剂物质基准的特征图谱与对照指纹图谱R-S

2.3.5　共有峰的指认　取“2.1.3”项下混合对照品溶液，稀释32倍，按“2.2”项下色谱条件进样测定，记录色谱图，并与“2.3.4”项下对照指纹图谱R-T、R-S比对进行色谱峰的指认，结果见图3。结果，指认出桑白皮汤煮散物质基准特征图谱中2、5、13、16、17、19号峰和汤剂物质基准特征图谱中2、5、12、14、15、17号峰分别为桑皮苷A、栀子苷、小檗碱、黄芩苷、槲皮素、木犀草素。

2.4　桑白皮汤物质基准的含量测定

2.4.1　线性关系考察　精密吸取“2.1.3”项下单个对照品溶液各适量，分别稀释2、4、8、32、64倍作为线性工作液。精密吸取上述线性工作液和单个对照品溶液各5 μL，按“2.2”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。以被测成分的峰面积为纵坐标（*Y*）、进样质量浓度为横坐标（*X*）进行线性回归，得到各指标成分的回归方程以及线性范围（表1）。结果显示，各待测成分在其质量浓度范围内线性关系均良好（*r*均大于0.999 0）。

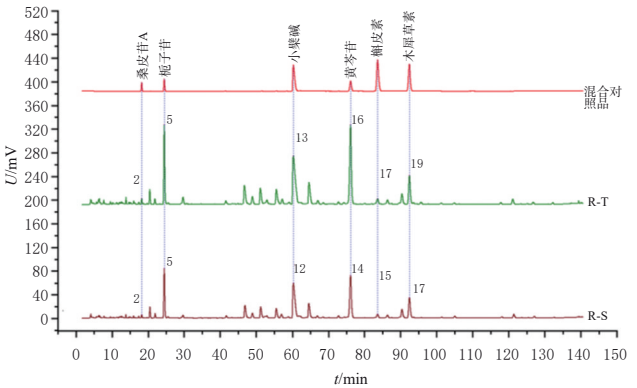


图3　混合对照品色谱图和2种基准物质对照指纹图谱的叠加图

表1　各指标成分的回归方程、线性范围和相关系数

指标成分	回归方程	*r*	线性范围/(μg/mL)
桑皮苷A	*Y*=5 298.2*X*−46.48	0.999 2	7.91～506.00
栀子苷	*Y*=8 289.9*X*−10.034	0.999 9	17.02～1 089.00
小檗碱	*Y*=33 680*X*−57.565	0.999 7	7.80～499.00
黄芩苷	*Y*=14 059*X*−246.85	0.999 5	15.78～1 010.00
槲皮素	*Y*=41 243*X*−536.09	0.999 3	8.16～522.00
木犀草素	*Y*=32 159*X*−157.36	0.999 2	7.97～510.00

2.4.2　精密度试验　精密吸取“2.1.3”项下混合对照品溶液，按“2.2”项下色谱条件连续进样测定6次，记录峰面积。结果显示，桑皮苷A、栀子苷、小檗碱、黄芩苷、槲皮素、木犀草素峰面积的RSD分别为1.15%、1.11%、1.17%、0.72%、1.76%、1.44%（*n*=6），表明仪器精密度良好。

2.4.3　稳定性试验　取“2.1.2”项下供试品溶液（S8），分别在室温放置0、4、8、16、20、24 h，然后按“2.2”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果显示，桑皮苷A、栀子苷、小檗碱、黄芩苷、槲皮素、木犀草素峰面积的RSD分别为1.69%、0.16%、0.81%、1.21%、0.60%、0.91%（*n*=6），表明该供试品溶液在室温放置24 h内稳定性良好。

2.4.4　重复性试验　按“2.1.2”项下方法平行制成6份供试品溶液（S8），然后按“2.2”项下色谱条件进样测定，记录峰面积，并按外标法计算各成分的含量。结果显示，桑皮苷A、栀子苷、小檗碱、黄芩苷、槲皮素、木犀草素含量的RSD分别为1.39%、0.31%、0.50%、0.92%、0.48%、0.73%（*n*=6），表明该方法的重复性良好。

2.4.5　加样回收率试验　精密量取已知含量的样品（S8）1 mL，共6份，分别按已知成分含量1∶1的质量比加入“2.1.3”项下的单个对照品溶液（桑皮苷A对照品溶液80 μL、栀子苷对照品溶液540 μL、小檗碱对照品溶液290 μL、黄芩苷对照品溶液270 μL、槲皮素对照品溶液45 μL、木犀草素对照品溶液70 μL），混匀，按“2.1.2”项

下方法制备供试品溶液，然后按照“2.2”项下色谱条件进样测定，记录峰面积，按外标法计算各成分的含量，并计其加样回收率。结果显示，桑皮苷A、栀子苷、小檗碱、黄芩苷、槲皮素、木犀草素的平均加样回收率分别为95.96%、96.32%、99.12%、98.48%、93.75%、96.99%，RSD分别为1.57%、1.97%、1.28%、0.44%、2.01%、1.74%（n=6），表明该方法的准确度较好。

2.4.6 含量测定 取“2.1.1”“2.1.2”项下样品T1～T6、S1～S11的供试品溶液，分别按“2.2”项下色谱条件进样测定，记录峰面积，按外标法计算6种指标成分的含量。实验平行3次，取平均值，结果见表2。

表2 桑白皮汤物质基准的含量测定结果（n=3，μg/mL）

样品编号	桑皮苷A	栀子苷	小檗碱	黄芩苷	槲皮素	木犀草素	总含量
T1	21.055	217.962	43.581	192.122	19.591	16.386	510.697
T2	28.374	381.014	88.596	282.718	22.514	21.467	824.683
T3	51.527	453.030	211.417	473.318	28.066	35.603	1 252.961
T4	61.974	610.400	253.686	561.436	36.116	48.431	1 572.043
T5	64.168	851.674	269.430	578.587	39.973	51.545	1 855.377
T6	63.912	853.558	265.977	560.693	40.162	51.304	1 835.606
S1	15.171	197.316	42.568	160.500	16.370	12.920	444.845
S2	21.484	361.816	69.015	194.314	17.905	19.097	683.631
S3	24.470	378.238	67.585	185.777	18.373	20.522	694.965
S4	27.969	438.651	82.362	232.778	19.337	26.403	827.500
S5	30.548	481.099	96.104	209.113	18.980	26.700	862.544
S6	32.821	498.002	106.156	268.938	23.016	33.262	962.195
S7	34.084	528.718	116.071	250.914	22.073	31.896	983.756
S8	39.575	589.208	146.404	273.458	22.912	35.002	1 106.559
S9	46.628	701.208	185.962	362.819	26.106	43.392	1 366.115
S10	53.004	783.295	215.603	435.321	27.859	49.092	1 564.174
S11	53.624	794.861	217.811	429.760	27.453	48.099	1 571.608

3 讨论

3.1 桑白皮汤物质基准的制备

在经典名方的新药研发中，物质基准的研制是保障其质量的关键环节，与药物的安全性和有效性密切相关。根据《中国科学技术史：度量衡卷》中的单位量值“1分为0.373 g”[9]，方中8味药，折算剂量为每味药各3 g，处方总量为24 g。依据刘默等[10]对桑白皮汤的成方考证“水二盅，姜三片，煎八分，温服”，其制法为“粗捣筛，一剂一煎一服，加水量为400 mL煎至320 mL”。参考仝小林等[11]将饮片捣成粗粉颗粒（过4目筛不过10目筛）煎煮1次制备煮散，主要有效成分的溶出在10～20 min达到平衡；将饮片直接入药煎煮2次制备汤剂时，加水量一般为药材质量的12～20倍，主要有效成分的溶出在50～60 min达到平衡。因此，本研究桑白皮汤煮散的制备工艺确定为：煎煮1次，时间为20 min，加水量为400 mL；汤剂的制备工艺确定为：煎煮2次，时间分别为30、20 min，加水量分别为350、300 mL。由于本方中质地坚硬的药材较多，浸泡时间理应不少于30 min，为完全浸透药材，本研究最终将浸泡时间定为60 min。此外，基于临床应用一致性原则，本研究统一选用2 100 mL的陶瓷药罐作为单剂处方的煎煮容器，先武火（功率1 700 W）煮沸再文火（功率300 W）继续加热保持微沸。

3.2 定量分析指标成分的选择

《古代经典名方中药复方制剂简化注册审批管理规定》第十五条明确指出：经典名方制剂药品标准的制定要加强多成分、整体质量控制[4]。目前，关于经典名方桑白皮汤指标成分的研究，仅有桑皮苷A的报道[12]，有必要进行重新定位。

笔者通过查阅资料[12—14]，筛选出槲皮素、木犀草素、桑皮苷A、小檗碱、黄芩苷和栀子苷6种主要指标成分。桑白皮汤方中桑白皮为君药，可泻肺火、祛痰平喘，笔者选取其中具有镇痛抗炎、抗氧化的成分桑皮苷A作为指标成分；黄芩可泻肺火、消痰热，浙贝母可清热、化痰、降气，炒栀子、黄连可清肺热、泻肺火，四者共为臣药，笔者选取其中具有抗炎、抑菌作用的成分黄芩苷、栀子苷、小檗碱作为指标成分；法半夏可燥湿、化痰、止咳，炒紫苏子可降气、化痰、平喘，焯苦杏仁可降气、止咳、平喘，三者共为佐药，笔者选取炒紫苏子中具有抗炎、镇咳、祛痰作用的成分木犀草素作为指标成分。此外，笔者还选取桑白皮、栀子、黄连的共有成分槲皮素作为指标成分，兼顾了方中君臣佐使药。

3.3 色谱条件的选择

在前期研究中，笔者比较了在238、254、280和345 nm这4个波长下样品的出峰情况，结果在254 nm波长下样品的出峰数目较多、分离度较高，故本研究最终选择测定波长为254 nm。此外，本研究还比较了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸水溶液作为流动相的出峰情况，优选出甲醇-磷酸水溶液作为流动相体系，并在此基础上又考察了不同体积分数的磷酸水溶液（甲醇-0.05%磷酸水溶液和甲醇-0.1%磷酸水溶液）对分离效果的影响。结果显示，以甲醇-0.1%磷酸水溶液为流动相时，所测各成分峰形和分离效果均较好，且基线平稳、无拖尾现象，故本研究最终选用甲醇-0.1%磷酸水溶液作为流动相。

3.4 含量测定结果分析

本研究结果显示，同等质量桑白皮汤煮散和汤剂在煎煮过程中桑皮苷A、栀子苷、小檗碱、黄芩苷、槲皮素、木犀草素的含量随着煎煮时间的延长基本呈上升趋势。相比于煮散，汤剂在煎煮过程中指标成分的溶出速度较慢，且共有峰也较少；煎煮5 min之前，2种物质基准指标成分含量相差不大；但煎煮5 min之后，煮散中指标成分含量快速上升，汤剂中指标成分含量则缓慢上升；煮散煎煮20 min时，指标成分含量为汤剂煎煮50 min时的1.1～1.5倍，总含量为汤剂的1.2倍。单从总含量来看，煮散煎煮10 min时指标成分含量与汤剂煎煮40 min相当。在煎煮15～20 min时，煮散中指标成分黄芩苷的含量有减少趋势。这可能是随着煎煮时间的延长，水量因蒸发逐渐减少所致；或者是因为溶液的吸附作用逐渐强于扩散作用，指标成分溶出量减少所致[7]。总体来看，桑白皮汤煮散比汤剂更具缩短煎煮时间、节约中药资源的优势，在后续桑白皮汤制剂的开发中更具有研究价值。

（下转第574页）