

· 工艺与制剂 ·

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

刘瑞新¹, 施钧瀚¹, 张璐¹, 高晓洁², 李学林^{1*}

(1. 河南中医学院第一附属医院药学部, 国家中医药管理局中药制剂三级实验室, 河南省病毒性疾病中医药防治重点实验室, 郑州 450000; 2. 河南中医学院, 郑州 450008)

[摘要] 目的:比较芍药甘草汤传统汤剂与配方颗粒汤剂的成分差异。方法:制备传统汤剂(TD)、自制配方颗粒汤剂(DGD-S)、市售A厂和B厂配方颗粒汤剂(DGD-A, DGD-B)共4类11批芍药甘草汤,采用HPLC建立指纹图谱,流动相乙腈(A)-0.05%磷酸水溶液(B, pH 2.42)梯度洗脱(0~8 min, 16% A; 8~35 min, 16%~50% A; 35~36 min, 50%~100% A; 36~38 min, 100%~16% A; 38~40 min, 16% A),检测波长250 nm。以3批TD的平均信息为标准汤剂信息,从成分的出现或消失、指标性成分含量、共有峰面积、主成分分析及指纹图谱相似度共5个方面全面对比芍药甘草汤不同剂型的差异信息。结果:DGD与TD比较,未见有紫外吸收的化学成分的出现与消失。指标性成分含量差别较大,其中DGD中甘草酸铵含量均与TD存在极显著差异。DGD-A中23个共有峰峰面积的总和与TD无显著差异,而DGD-S, DGD-B的共有峰面积之和与TD存在极显著差异,二者分别相当于TD的2.5, 3.2倍。在PCA中, DGD-A更接近于TD,表明其各单体成分的绝对量更接近于TD,而DGD-S, DGD-B的绝对量远大于TD。DGD-A与标准汤剂的相似度最小,表明DGD-A中各成分间的比例与标准汤剂相差较大。结论:芍药甘草汤DGD与TD间仅有成分比例的明显差异,并无成分本身的明显差异;应按比例调整某些DGD的用量以使其与汤剂等效。

[关键词] 芍药甘草汤; 传统汤剂; 配方颗粒汤剂; 主成分分析; 相似度分析; 甘草酸铵; 芍药苷
[中图分类号] R283.6; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)24-0001-05
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014240001
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141106.1351.001.html>
[网络出版时间] 2014-11-06 13:51

Differential Regularity Analysis Between Traditional Decoctions and Dispensing Granules of Shaoyao Gancao Decoctions Based on HPLC, PCA and Similarity Evaluation

LIU Rui-xin¹, SHI Jun-han¹, ZHANG Lu¹, GAO Xiao-jie², LI Xue-lin^{1*}

(1. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Level Three Laboratory of Chinese Traditional Medical Preparation of State Administration of TCM, Key Laboratory of Viral Diseases Prevention and Treatment of TCM of Henan Province, Zhengzhou 450000, China; 2. Henan University of TCM, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To compare difference of chemical components between traditional decoctions and dispensing granules decoctions of Shaoyao Gancao decoctions. **Method:** Four types of 11 kinds of Shaoyao Gancao decoctions were prepared, including traditional decoctions (TD), dispensing granules decoctions made by self

[收稿日期] 20140710(019)
[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81001646)
[第一作者] 刘瑞新, 博士, 副主任药师, 从事中药制剂及其质控分析研究, Tel:0371-66233639, E-mail:liuruixin7@163.com
[通讯作者] *李学林, 博士生导师, 主任药师, 从事中药应用形式研究, Tel:0371-66245142, E-mail:xuelinli450000@163.com

(DGD-S), dispensing granule decoctions made by factory A and B (DGD-A, DGD-B), fingerprint was established by HPLC, mobile phase consisted of acetonitrile (A) -0.05% phosphoric acid solution (B, pH of 2.42) with gradient elution (0-8 min, 16% A; 8-35 min, 16%-50% A; 35-36 min, 50%-100% A; 36-38 min, 100%-16% A; 38-40 min, 16% A), detection wavelength was set at 250 nm. Taking average information of three batchese of TD for stabdard decoction information, difference informations of Shaoyao Gancao decoctions preparations were compared by five aspects, including appear or disappear of components, contents of index components, common peak area, principal component analysis and fingerprint similarity. **Result:** Compared with TD, composition of chemical components in DGDs did not change. The content of index components between three kinds of DGD and TD had great difference, especially difference of ammonium glycyrrhizinate were very notable. Total peak area comparison showed that sum of 23 total peak area between TD and DGD-A had no significant difference, but it had significant difference between TD and DGD-S, DGD-B, they were equivalent to 2.5 and 3.2 times of TD, respectively. In PCA plot, DGD-A was closer to TD which showed that the absolute amount of monomer composition was closer to TD, while the absolute amount of DGD-S, DGD-B were far more than TD. Similarity between DGD-A and standard decoctions was minimum, which showed that difference of components proportion between DGD-A and standard decoctions was maximum. **Conclusion:** Significant difference between TD and DGD only exists in proportion of ingredients, not related to components themselves, suggesting that more experiments should be done to validate whether its drug properties are changed and in clinical application, dosage must be reduced proportionally, so that curative effect is similar to TD.

[Key words] Shaoyao Gancao decoctions; traditional decotions; dispensing granules decoctions; principal component analysis; similarity analysis; ammonium glycyrrhizinate; paeoniflorin

传统汤剂是中医治病应用最早的主要剂型之一,但因其制备不便等弊端致使应用受到严重制约^[1]。中药配方颗粒改进了汤剂的诸多弊端,但长期未能有效推广,根本原因之一是配方颗粒汤剂与传统汤剂的差异规律等基础研究薄弱^[2]。这些基础研究内容包括化学成分差异、药理活性差异及临床疗效差异等。近年关于两者对比的研究非常之多^[3-5],但总体上存在缺少多种类、多批次、多层次的综合对比分析,偏向工艺优化或临床应用研究而基础研究薄弱等问题。为了深入研究传统汤剂与配方颗粒汤剂的差异性,宜化繁为简,将最简单的药对比作为研究切入点。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。

芍药甘草汤源于张仲景的《伤寒论·辨太阳病脉证并治上》,由芍药、炙甘草组成,主营阴不足、肝脾不和,具有抗炎、镇痛、镇静等药理作用,被广泛用于神经、呼吸、消化系统及妇科病症的治疗^[6]。白芍和炙甘草在临床上极为常用,芍药甘草汤的传统汤剂和配方颗粒汤剂临床应用亦极为广泛,具有一定的代表性。故本实验选择芍药甘草汤为研究载体,通过比较其传统汤剂与配方颗粒汤剂 HPLC 指纹图谱的差异,获取二者在化学成分方面的差异信

息,为全面研究这两种剂型的差异规律提供参考。

1 材料

2998 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), CP225D 型 1/10 万电子天平(德国赛多利斯集团), PHS-3C 型数字酸度计(上海精密科学仪器有限公司), JXJ-IIIB 型离心机(上海安亭科学仪器厂)。

白芍、炙甘草饮片分别购自于郑州市三家中医院,经本单位陈天朝主任药师鉴定为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* 的根的炮制品、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 根的蜜炙炮制品;5 批白芍配方颗粒(A 厂 2 批,浓缩比 1:21,批号 12120007,13010089;B 厂 3 批,浓缩比 1:10,批号 1305012,1212024,1302031),5 批炙甘草配方颗粒(A 厂 2 批,浓缩比 1:7,批号 12120270,13060026;B 厂 3 批,浓缩比 1:3,批号 1306096,1211041,1301116),芍药苷、甘草酸铵对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110736-201337,110731-201116),乙腈、甲醇为色谱纯,水为超纯水,其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 汤剂的制备

2.1.1 传统汤剂 取白芍 180 g,炙甘草 60 g,加水 900 mL 浸泡 30 min,武火煮沸后转为文火,煎煮 25 min,得药液;药渣加水 500 mL 煎煮 15 min,得药液,

合并药液,3 000 r·min⁻¹离心 15 min,取上清液加水定容至 500 mL,即得,同法制备 3 批。

2.1.2 自制配方颗粒汤剂 参照 B 厂白芍配方颗粒的制备工艺,取白芍饮片 450 g,加水 3.6 L 回流提取 1 h,得药液;药渣加水 2.7 L 回流提取 0.5 h,得药液,合并药液,减压浓缩,加入糊精 15 g,减压干燥,粉碎,得白芍配方颗粒,同法制备 3 批。参照 B 厂炙甘草配方颗粒制备工艺,取炙甘草饮片 150 g,加水 1.2 L 回流提取 2 h,得药液;药渣加水 900 mL 回流提取 1 h,得药液,合并药液,减压浓缩,加入糊精 15 g,减压干燥,粉碎,得炙甘草配方颗粒,同法制备 3 批。取相当于白芍饮片 36 g,炙甘草饮片 12 g 的配方颗粒置于 100 mL 量瓶中,加水溶解并定容至刻度,混匀,得自制配方颗粒汤剂,同法制备 3 批。

2.1.3 A, B 厂配方颗粒汤剂 取相当于白芍饮片 36 g,炙甘草饮片 12 g 的 A 厂(2 批)和 B 厂(3 批)的配方颗粒置 100 mL 量瓶中,加水溶解并定容至刻度,混匀,即得。

2.2 色谱条件 ZORBAK Eclipse SB-Aq 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.05% 磷酸水溶液(B, pH 2.42)梯度洗脱(0 ~ 8 min, 16% A; 8 ~ 35 min, 16% ~ 50% A; 35 ~ 36 min, 50% ~ 100% A; 36 ~ 38 min, 100% ~ 16% A; 38 ~ 40 min, 16% A),柱温 30 ℃,检测波长 250 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。

2.3 对照品溶液的配制 精密称取芍药苷对照品 6.83 mg 置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,混匀,得 0.683 g·L⁻¹对照品溶液。精密称取甘草酸铵对照品 5.03 mg 至 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,混匀,精密量取 3 mL 至 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,混匀,得 0.151 g·L⁻¹对照品溶液。精密称取甘草酸铵对照品 3.85 mg 至 5 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,得 0.77 g·L⁻¹对照品溶液;精密称取芍药苷对照品 7.68 mg 至 10 mL 量瓶中,加入 0.77 g·L⁻¹甘草酸铵对照品溶液 3 mL,加甲醇溶解并定容至刻度,混匀,得混合对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备 取 2.1 项下 3 批传统汤剂,3 批自制配方颗粒汤剂,2 批 A 厂及 3 批 B 厂的配方颗粒汤剂各 25 mL,分别置于 100 mL 量瓶中,加甲醇醇沉并定容至刻度,混匀,过滤,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得,分别标记为 S1, S2, …, S11。

2.5 配方颗粒汤剂的方法学考察

2.5.1 精密度试验 精密吸取 S4 供试品溶液,按

2.2 项下色谱条件连续进样 5 次,结果芍药苷、甘草酸铵峰面积的 RSD 分别为 0.5% 和 0.09%,保留时间的 RSD 分别为 0.1% 和 0.05%,表明仪器精密密度良好。

2.5.2 稳定性试验 精密吸取 S4 供试品溶液适量,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 按 2.2 项下色谱条件进样,结果芍药苷、甘草酸铵峰面积的 RSD 分别为 1.6% 和 3.7%,保留时间的 RSD 分别为 0.3% 和 0.6%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.5.3 重复性试验 取同一批配方颗粒汤剂样品,按 2.4 项下方法制备 6 份供试品溶液,按 2.2 项下色谱条件测定,结果芍药苷、甘草酸铵峰面积的 RSD 分别为 0.55% 和 1.35%,保留时间的 RSD 分别为 0.08% 和 0.03%,表明该方法重复性良好。

2.5.4 线性关系考察 取 0.683 g·L⁻¹芍药苷对照品溶液,按 2.2 项下色谱条件进样 2, 3, 5, 10, 15 μL,以峰面积积分值为纵坐标,进样量为横坐标,得回归方程 $Y = 2.20 \times 10^5 X - 10\,541$ ($R^2 = 0.999\,9$),线性范围 1.366 ~ 10.245 μg。取 0.151 g·L⁻¹甘草酸铵对照品溶液,分别按 2.2 项下色谱条件进样 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 μL,以色谱峰面积积分值对进样量回归分析,得回归方程 $Y = 8.60 \times 10^5 X + 10\,902$ ($R^2 = 0.999\,9$),线性范围 0.302 ~ 4.530 μg。

2.5.5 加样回收率试验 精密量取已知含量的配方颗粒汤剂供试品溶液 1 mL,共 6 份,各加入 2.3 项下混合对照品溶液 1 mL,混匀,按 2.2 项下色谱条件测定,计算回收率,结果见表 1。

表 1 芍药甘草汤配方颗粒汤剂中指标成分含量测定的加样回收率试验

成分	样品中量	加入量	测得量	回收率	平均值	RSD
	/mg	/mg	/mg	/%	/%	/%
芍药苷	0.781	0.768	1.552	100.39	100.17	0.44
	0.781	0.768	1.550	100.13		
	0.781	0.768	1.544	99.34		
	0.781	0.768	1.554	100.65		
	0.781	0.768	1.551	100.26		
	0.781	0.768	1.551	100.26		
甘草酸铵	0.229	0.231	0.458	99.13	98.41	1.61
	0.229	0.231	0.450	95.67		
	0.229	0.231	0.454	97.40		
	0.229	0.231	0.458	99.13		
	0.229	0.231	0.458	99.13		
	0.229	0.231	0.460	100.00		

2.6 传统汤剂 方法同 2.5 项,结果表明该方法准确可行。

2.7 指纹图谱的建立及共有峰的确定 精密吸取 S1 ~ S11 各 10 μL ,按 2.2 项下色谱条件测定,将测得的指纹图谱导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004A 版,自动匹配色谱峰,共标示出 23 个共有峰,见图 1。经与对照品对比,峰 2 为芍药苷,峰 21 为甘草酸铵。

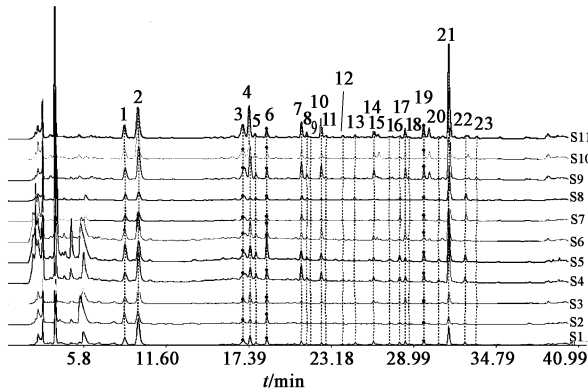
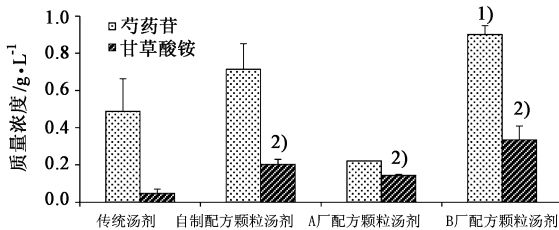


图 1 芍药甘草汤 HPLC 指纹谱

2.8 指纹图谱比较

2.8.1 化学成分出现与消失的比较 由图 1 可知,在各供试品中,相同峰位的色谱峰峰面积不同,但与传统汤剂相比,配方颗粒汤剂中并未有紫外吸收的化学成分的出现与消失。

2.8.2 已知成分含量的比较 采用外标两点法计算芍药苷、甘草酸铵的含量,运用 t 检验评价配方颗粒汤剂供试品中芍药苷、甘草酸铵含量与传统汤剂的差异,见图 2。由图 2 可知,不同供试品中芍药苷含量的排序为 B 厂配方颗粒汤剂 > 自制配方颗粒汤剂 > 传统汤剂 > A 厂配方颗粒汤剂,而甘草酸铵含量的顺序则为 B 厂配方颗粒汤剂 > 自制配方颗粒汤剂 > A 厂配方颗粒汤剂 > 传统汤剂。



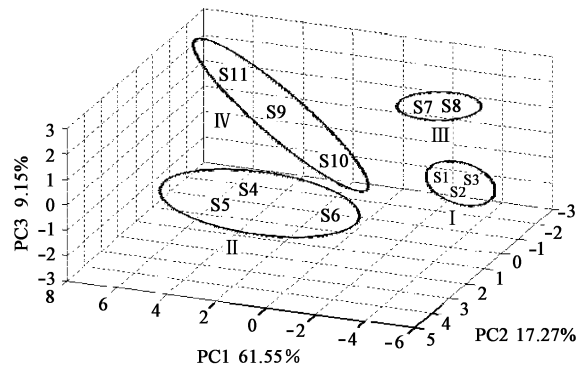
注: 1) 表示芍药苷含量与传统汤剂比较具有极显著性差异 ($P < 0.01$); 2) 表示甘草酸铵含量与传统汤剂相比具有极显著性差异 ($P < 0.01$)。

图 2 芍药甘草汤不同样品中芍药苷、甘草酸铵含量的比较 [$\bar{x} \pm s, n=3$ (A 厂 $n=2$)]

2.8.3 共有峰总峰面积的比较 以 3 批传统汤剂

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 4 类供试品(传统汤剂、自制配方颗粒汤剂及 A、B 厂配方颗粒汤剂)中各成分含量的相对总和比值分别为 1, 2.49, 1.05, 3.15,说明配方颗粒汤剂中各成分含量的总和均高于传统汤剂。

2.8.4 主成分分析法比较 主成分分析法 (PCA) 是对多变量数据进行统计处理的一种数据线性投影方法。从 11 批供试品中 23 个共有峰峰面积的主成分分析得到各主成分的贡献率 (PC1, PC2, PC3 分别为 61.55%, 17.27%, 9.15%), 前 3 个主成分的累积贡献率 87.97%, 其他贡献率较小,见图 3。



I. 传统汤剂; II. 自制配方颗粒汤剂;
III. A 厂配方颗粒汤剂; IV. B 厂配方颗粒汤剂
图 3 芍药甘草汤 11 批供试品的化学信息三维 PCA

2.8.5 相似度比较 采用 MATLAB R2011b 软件,以 S1, S2, S3 的平均值为对照图谱 S0,计算其他供试品指纹图谱与 S0 的相似度,结果传统汤剂、自制配方颗粒汤剂及 A、B 厂配方颗粒汤剂相似度的平均值分别为 0.977, 0.901, 0.710, 0.847。

3 讨论

预试验比较了乙腈-冰乙酸水溶液、乙腈-磷酸水溶液的梯度洗脱系统,结果表明乙腈-0.05% 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 250 nm 处可较全面地体现芍药甘草汤各样品的图谱特征。

白芍的主要成分为单萜及单萜苷类、部分三萜类及鞣质类成分;甘草的主要成分为三萜皂苷类和黄酮类成分,另含香豆素等化合物^[7]。芍药甘草汤总有效部位由芍药总苷、甘草总苷、甘草总黄酮 3 部分组成^[8],其中芍药苷为芍药总苷的主要成分,且芍药苷对免疫、心血管及平滑肌均具有肯定的药理

作用^[9];甘草酸铵为甘草酸的铵盐,而甘草酸是甘草总苷的主要成分,具有抗炎、抗过敏、抗溃疡及解痉的作用^[10]。故选择这两种成分作为指标性成分。

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^[11]。S1 与 S4,S2 与 S5,S3 与 S6 的饮片均相同,在 250 nm 处,与传统汤剂的指纹图谱相比,自制配方颗粒汤剂的图谱无明显色谱峰产生或消失,但相同峰位色谱峰的峰面积却存在差异,说明共煎并未明显导致有紫外吸收的化学成分改变,而化学成分含量发生了变化。

配方颗粒汤剂中甘草酸铵的含量远大于传统汤剂,表明甘草酸铵含量随着制备工艺的变化有显著改变;同时 B 厂配方颗粒汤剂中芍药苷含量远大于传统汤剂。提示临床用药时应以传统汤剂为参考标准,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。

配方颗粒汤剂中各种化学成分的和高于传统汤剂,这可能是由于配方颗粒汤剂的煎煮时间较长,加水量较大,更有利于各种成分的煎出。比较 3 类配方颗粒汤剂供试品,其中自制配方颗粒汤剂是参照 B 厂配方颗粒汤剂的工艺制得,二者化学成分的和均高于 A 厂配方颗粒汤剂,且存在极显著性差异,表明制备工艺、饮片来源等均对配方颗粒汤剂中各化学成分的含量存在影响。

在 PCA 三维图中,同类别供试品的分布离散度较小,不同类别供试品间无交叉,表明各类供试品间存在差异。区域 I 与区域 III 分布较近,而与区域 II,IV 的距离较远,表明传统汤剂与 A 厂配方颗粒汤剂的各化学成分绝对量较自制配方颗粒汤剂和 B 厂配方颗粒汤剂接近,与共有峰峰面积比较结果一致。

由于标准汤剂的图谱来源于 3 批传统汤剂,故传统汤剂与标准汤剂的相似度最高;自制配方颗粒汤剂次之,因为尽管工艺过程不同,但原料来源统一;A 厂配方颗粒汤剂与标准汤剂的相似度较小,说明其所含化学成分间的比例与传统汤剂差异较大;相反,对于自制配方颗粒汤剂和 B 厂配方颗粒汤剂,虽然二者共有峰峰面积的相对比值远大于传统汤剂,且二者在三维主成分投影中与传统汤剂相距较远,但二者与标准汤剂的相似度却高于 A 厂配方颗粒汤剂,表明二者中化学成分间的比例与传统汤剂较相近。在临床应用中,与标准汤剂相似度较高的剂型,服用量可乘以差异的倍率,等量替代;对于相似度低的,如果 PCA 三维图上接近,说明相对而

言有可能各个成分峰面积值且总峰面积接近传统汤剂,此时若代表性成分接近,且 PCA 置信区间有较大交叉,仍可替代,否则亦不可替代。综上分析,若以传统汤剂为标准,则本文中 B 厂配方颗粒汤剂和自制配方颗粒确定的剂量偏高。

传统汤剂与配方颗粒汤剂相比,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。本文通过全面对比二者的成分差异,表明二者间的化学成分仅有含量的明显差异,并无成分种类的明显差异,同时提示应进一步探索配方颗粒汤剂相比于传统汤剂的药性变化;某些配方颗粒的用量应按比例调整以使其与汤剂等效。

[参考文献]

- [1] 刘瑞新,李学林,吴子丹,等.论中药煎剂掩味研究的必要性、现状与对策[J].中国药房,2012,23(27):2497.
- [2] 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.
- [3] 曹俊岭,杨蓉,郑虎占,等.大承气汤传统汤剂与配方颗粒指标性成分的含量比较[J].世界中西医结合杂志,2014,9(2):162.
- [4] 杨蓉,曹俊岭,郑虎占,等.大承气汤传统汤剂与配方颗粒的药效比较研究[J].世界中西医结合杂志,2013,8(11):1111.
- [5] 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.
- [6] 杨书良,王华,杨波. HPLC 法测定芍甘合剂中芍药苷及甘草苷含量[J]. 黑龙江医药,2008,21(6):2.
- [7] 吴芳,杜伟锋,徐姗姗,等. 白芍化学成分及质量评价方法研究进展[J]. 浙江中医药大学学报,2012,36(5):613.
- [8] 杨玲娟,赵晓莉,狄留庆,等. HPLC 法测定芍药甘草汤总有效部位中 4 个活性成分的含量[J]. 中华中医药学刊,2007,25(3):522.
- [9] 胡南,许惠玉,陈志伟,等. 芍药苷的药理学研究进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2007,28(9):1093.
- [10] 高雪岩,王文全,魏胜利,等. 甘草及其活性成分的药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志,2009,34(21):2695.
- [11] 孙艳清,马冯飞,朱杰,等. 栀子厚朴汤及相关药对和单味药材的指纹图谱研究及多指标定量分析[J]. 药学进展,2011,35(8):373.

[责任编辑 刘德文]