

经典名方易黄汤古代煎煮方法与现代煎煮方法的差异性分析

吴艳秋^{1,2}, 刘宇灵¹, 王秀清^{1,3}, 林龙飞¹, 杨安辉^{1,2}, 周莹莹^{2,4}, 李慧^{1,2*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 江西中医药大学 药学院, 南昌 330004;
3. 华润双鹤药业股份有限公司, 北京 100102; 4. 中国中医科学院 中药资源中心, 北京 100700)

[摘要] 目的:以出膏率、有效成分含量及指纹图谱信息为考察指标,探索经典名方易黄汤古代煎煮方法与现代煎煮方法的差异性,为该经典名方的基准样品制备及复方制剂研发提供参考。方法:按照《炮炙大法》《简明医彙》及《医疗机构中药煎药室管理规范》记载的煎煮方法分别对易黄汤进行煎煮,利用紫外分光光度法于488 nm处测定样品中的多糖含量,使用高效液相色谱法(HPLC)测定样品中的生物碱(盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、木兰花碱)含量及其指纹图谱,结合出膏率进行易黄汤3种煎煮方法的差异性分析。指纹图谱检测条件为以乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~10 min, 5%~8%A; 10~35 min, 8%A; 35~45 min, 8%~12%A; 45~75 min, 12%~17%A; 75~105 min, 17%~35%A; 105~110 min, 35%~100%A; 110~112 min, 100%~5%A; 112~122 min, 5%A),检测波长230 nm。结果:按《炮炙大法》记载方法进行煎煮时,易黄汤中的多糖含量高于现代煎煮方法及《简明医彙》记载方法;上述3种生物碱类成分的含量均以现代煎煮方法为最高。3种煎煮方法所制备样品的指纹图谱色谱峰数目基本一致,匹配出13个共有峰,并指出盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、木兰花碱3个共有峰;但这3种方法所制备样品的指纹图谱中共有峰的相对峰面积差异较大,提示不同煎煮方法对易黄汤中多数成分的提取效果存在差异。此外,3种煎煮方法所制备样品的出膏率也存在差异,其中以按《炮炙大法》记载方法煎煮样品的出膏率为最高。结论:不同煎煮方法会影响易黄汤的出膏率、指纹图谱信息、有效成分含量,其中现代煎煮方法有利于该经典名方的生物碱类成分提取及制剂转化,建议通过优化现代煎煮方法确定其制备工艺。

[关键词] 经典名方; 易黄汤; 煎煮方法; 出膏率; 多糖; 生物碱; 高效液相色谱法(HPLC)指纹图谱

[中图分类号] R22;R28;R94;O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)03-0152-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220649 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220616.1426.004.html>

[网络出版日期] 2022-06-17 11:49:52

Analysis on Difference Between Ancient Decocting Methods and Modern Decocting Methods of Yihuangtang

WU Yanqiu^{1,2}, LIU Yuling¹, WANG Xiuqing^{1,3}, LIN Longfei¹, YANG Anhui^{1,2},
ZHOU Yingying^{2,4}, LI Hui^{1,2*}

(1. *Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;*
2. *School of Pharmacy, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;*
3. *China Resources Double-crane Pharmaceutical Co. Ltd., Beijing 100102, China;*
4. *National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China*)

[Abstract] **Objective:** To explore the differences between the ancient decocting methods and modern decocting method of Yihuangtang by taking the dry extract rate, the content of active ingredients and the

[收稿日期] 2022-03-28

[基金项目] 中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021A04301);云南省重点研发计划项目(202003AC100006-2);中央本级重大增减支项目(2060302);中央级公益性科研院所基本科研业务专项(ZZ13-035-08)

[第一作者] 吴艳秋, 硕士, 从事中药新剂型与新药开发研究, E-mail: wyq1689926339@163.com

[通信作者] * 李慧, 博士生导师, 研究员, 从事中药新剂型与新药开发研究, E-mail: lihuiyiren@163.com

fingerprint information as indicators, so as to provide reference for the preparation of benchmark samples and the development of compound preparations of this famous classical formula. **Method:** According to the three decocting methods recorded in *Paozhi Dafa* and *Jianming Yigou* and Management Specifications of Traditional Chinese Medicine Decoction Chambers in Medical Institutions, the Yihuangtang was decocted respectively. The polysaccharide content in the samples was determined by ultraviolet spectrophotometer (UV) at 488 nm, and the contents of alkaloids (berberine hydrochloride, phellodendrine chloride and magnoflorine) in the samples and their fingerprint profiles were determined by high performance liquid chromatography (HPLC), and the dry extract rate was combined to compare the differences of the three decocting methods of Yihuangtang. Among them, the fingerprint was gradient eluted with acetonitrile (A) -0.1% phosphoric acid aqueous solution (B) as mobile phase (0-10 min, 5%-8%A; 10-35 min, 8%A; 35-45 min, 8%-12% A; 45-75 min, 12%-17%A; 75-105 min, 17%-35%A; 105-110 min, 35%-100%A; 110-112 min, 100%-5%A; 112-122 min, 5%A), and the detection wavelength was 230 nm. **Result:** When the decoction was carried out according to the method described in *Paozhi Dafa*, the content of polysaccharides was higher than that of the modern decocting method and the method described in *Jianming Yigou*. However, the contents of berberine hydrochloride, phellodendrine chloride and magnoflorine were the highest in the modern decocting method. Meanwhile, the number of peaks in fingerprint of the samples prepared by the three decocting methods was basically the same, and 13 common peaks were matched, and the three common peaks of berberine hydrochloride, phellodendrine chloride and magnoflorine were identified. However, the relative peak areas of the common peaks in the fingerprint of the samples prepared by the three decocting methods varied greatly, suggesting that there were differences in the extracting effects of different decocting methods. In addition, there were also differences in the dry extract rate among the three decocting methods of Yihuangtang, and the highest value was obtained by decocting the samples according to the method recorded in *Paozhi Dafa*. **Conclusion:** Decocting method can affect the dry extract rate, fingerprint information and active ingredient content of Yihuangtang, among which the modern decocting method is conducive to the extraction of alkaloids and the preparation transformation of this famous classical formula, and it is recommended to determine its preparation process by optimizing the modern decocting method.

[Keywords] famous classical formulas; Yihuangtang; decocting methods; dry extract rate; polysaccharides; alkaloids; high performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint

经典名方传承至今仍广泛应用、疗效确切,具有明显的特色与优势^[1]。为了推进经典名方复方制剂的开发,国家有关部门相继出台了《古代经典名方中药复方制剂简化注册审批管理规定》^[2]和《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)》^[3](以下简称《指导原则》),但在实际推进过程中仍存在一些问題。例如,某些经典名方的煎煮方法仅注明为“水煎服”,无详细制备工艺的记载;而《指导原则》指出,应参照《医疗机构中药煎药室管理规范》并结合具体情况,合理制定工艺,故亟需对经典名方煎煮工艺进行研究,为其复方制剂开发提供依据。

易黄汤源于清代《傅青主女科》^[4],是用于治疗妇科带下病的特色方剂,尤善于治疗黄带,现代临床上常用于治疗宫颈人乳头瘤病毒(HPV)感染^[5-6]、老年阴道炎^[7-8]、慢性前列腺炎^[9-10]等。其组方为

山药(一两,炒)、芡实(一两,炒)、黄柏(二钱,盐水炒)、车前子(一钱,酒炒)、白果(十枚,碎)。经考证^[11],清代1两为37.30 g,1两等于10钱,1钱为3.73 g;白果十枚在古籍资料中虽未记载具体质量,但通过多批白果大量实测数据及参考《方剂学》^[12]中易黄汤的白果用量,确定白果十枚为12.00 g,故最终确定易黄汤的处方组成为山药(37.30 g,炒)、芡实(37.30 g,炒)、黄柏(7.46 g,盐水炒)、车前子(3.73 g,酒炒)、白果(12.00 g,碎)。

易黄汤在原文中的煎煮方法仅标注为“水煎”,并未明确记载煎煮工艺,结合《傅青主女科》成书于1673年,推测该方的煎煮方法可参考1607年(傅山出生年份)至1673年期间《炮炙大法》^[13](1622年)和《简明医彙》^[14](1629年)记载的煎煮方法。这2本古籍中记载的煎煮方法与《医疗机构中药煎药室管理规范》^[15]的制备工艺存在较大差异,因而有必要对

易黄汤的上述3种煎煮方法进行差异研究。目前,易黄汤的研究多集中在临床疗效方面,关于其定量分析方面的文献报道极少^[16-17],且未涉及多糖、木兰花碱等成分。易黄汤中的生物碱如盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、木兰花碱等具有抗炎抑菌、抗氧化、降血糖等功效^[18];同时,处方中山药、芡实等含有的多糖具有抗氧化、抑菌、降血糖等作用^[19],均与该经典名方的药效相一致。因此,基于中药复方多成分、多靶点协同作用的特点,本研究拟从出膏率、多糖、生物碱含量及指纹图谱对易黄汤3种煎煮方法进行差异性分析,以期为该经典名方的基准样品制备及制剂研发提供参考。

1 材料

e2695型高效液相色谱仪[美国 Waters公司,配置光电二极管阵列检测器(PDA)],T6型新世纪紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),XP105型1/10万电子天平和ML3002T/02型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],H22-X3型电陶炉(杭州九阳生活电器有限公司),陶瓷壶(江西省华冠瓷业有限公司,规格2.4 L),DHG-9030A型鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司),PFR-1000型冷阱(上海爱朗仪器有限公司),LGJ-10E型冷冻干燥机[四环福瑞科仪科技发展(北京)有限公司]。

盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、D-无水葡萄糖对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110713-201613、111895-201805、110833-201908,纯度分别为86.8%、94.9%、99.8%),木兰花碱对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号MUST-17071711,纯度99.02%),水为娃哈哈纯净水,乙腈、苯酚为色谱纯,其他试剂为分析纯。山药、芡实、白果、黄柏、车前子分别来源于河南焦作、山东济宁、山东文登、四川德阳、江西吉安,经中国中医科学院中药资源中心詹志来研究员鉴定,基原分别为薯蓣科植物薯蓣 *Dioscorea opposita* 的干燥根茎、睡莲科植物芡 *Euryale ferox* 的干燥成熟种仁、银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* 的干燥成熟种子、芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* 的干燥树皮、车前科植物车前 *Plantago asiatica* 的干燥成熟种子,符合2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)的相关规定。

2 方法与结果

2.1 易黄汤的制备

2.1.1 《炮炙大法》记载方法 《炮炙大法》^[13]记载:

“凡煎汤剂,必先以主治之为君药,先煮数沸,然后下余药文火缓缓熬之得所……凡煎汤药,初欲微火,令小沸,其水数依方多少,大略药二十两用水一斗,煮四升,以此为准。”经考证^[11],清代一斗为十升,一升为1 035 mL。按以上换算方法,取易黄汤各饮片(参照2020年版《中国药典》及各省中药饮片炮制规范制备),即炒山药37.30 g、炒芡实37.30 g、盐黄柏7.46 g、酒车前子3.73 g、白果12.00 g,先将炒山药、炒芡实加入陶瓷壶中,加入水1 360 mL,于600 W武火煮沸,沸后改文火200 W煎煮30 min,加入其余药味,其中酒车前子包煎,白果捣碎,煎煮至规定量(约2.5 h),200目筛趁热滤过,得提取液。将提取液分为2份,1份备用,1份直接冷冻干燥为冻干粉,备用。

2.1.2 《简明医彙》记载方法 《简明医彙》^[14]记载:“煎药大法:每剂水二钟,煎八分。渣用水钟半,煎七分。如剂大,再水一钟,煎半钟,剂轻水减。”经考证^[20-21],一钟为200 mL,考虑易黄汤煎煮剂量较大,再加水一钟。因而取易黄汤各组方饮片,即炒山药37.30 g、炒芡实37.30 g、盐黄柏7.46 g、酒车前子3.73 g、白果12.00 g,置陶瓷壶中,酒车前子包煎,白果捣碎,一煎加水600 mL,武火600 W开火煮,沸后改为文火200 W,煎煮至规定量(约18 min),200目筛趁热滤过;二煎加水450 mL,武火600 W煮沸,沸后改文火200 W,煎煮至规定量(约18 min),200目筛趁热滤过,合并滤液,得提取液。将提取液分为2份,1份备用,1份直接冷冻干燥为冻干粉,备用。

2.1.3 现代煎煮方法 参照《医疗机构中药煎药室管理规范》^[15]。用水量一般以浸过药面2~5 cm为宜,每剂药煎煮2次,药物煮沸后再煎煮20~30 min,第2煎的煎煮时间应比第1煎的时间略缩短。即取易黄汤各饮片,即炒山药37.30 g、炒芡实37.30 g、盐黄柏7.46 g、酒车前子3.73 g、白果12.00 g,酒车前子包煎,白果捣碎,加入陶瓷壶中,加8倍量水,浸泡30 min,600 W武火煎煮至沸,沸后改为文火200 W,煎煮30 min,200目筛趁热滤过。二煎加入6倍量水,用武火600 W煎煮,沸后改为文火200 W,煎煮20 min,200目筛趁热滤过,合并滤液,得提取液。提取液分为2份,1份备用,1份直接冷冻干燥为冻干粉,备用。

2.2 多糖的含量测定^[22-23]

2.2.1 供试品溶液制备 取2.1项下各提取液加水至相同体积(折合成相同生药质量浓度),精密移取5 mL,加入无水乙醇20 mL,再加80%乙醇75 mL,

加热回流1 h,趁热用滤纸过滤,并使用热80%乙醇30 mL分数次洗涤滤渣。滤渣及滤纸移至锥形瓶中,加水100 mL,加热回流2 h,趁热用滤纸滤过,滤液备用;滤渣与滤纸再移至锥形瓶中,加水100 mL,加热回流2 h,趁热用滤纸滤过,合并2次滤液,冷却至室温,移至250 mL量瓶中,加水定容至刻度,摇匀。精密移取4 mL至10 mL量瓶中,加水定容至刻度,摇匀,即得多糖母液。精密量取多糖母液1 mL至具塞试管中,加水至2 mL,摇匀,以2 mL水为空白对照。试管中依次加入5%苯酚溶液1 mL和浓硫酸5 mL,迅速摇匀,静置10 min,移置40 °C水浴锅中加热15 min,水浴冷却至室温,即得。

2.2.2 标准曲线测定 取D-无水葡萄糖对照品适量,精密称定,置50 mL量瓶中,加水溶解并定容至刻度,摇匀,配制成 $0.10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 对照品溶液。精密移取0.10、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00、1.20 mL至具塞试管中,分别按2.2.1项下自“加水至2 mL”开始操作,水浴冷却至室温后于488 nm处测定吸光度A,以质量浓度为横坐标,A为纵坐标轴,得到回归方程 $Y=58.512X+0.0268$ ($R^2=0.9985$),线性范围1.27~15.24 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.2.3 精密度考察 精密移取D-无水葡萄糖对照品溶液0.40 mL至具塞试管中,按2.2.1项下自“加水至2 mL”开始操作,于488 nm处连续测定6次A,计算相对标准偏差(RSD)<0.2%,表明仪器精密度良好。

2.2.4 重复性考察 取按现代煎煮方法制备的提取液适量,共6份,按2.2.1项下方法制备供试品溶液,于488 nm测定A,计算总多糖平均质量分数0.5%,RSD 2.5%,表明该方法重复性良好。

2.2.5 稳定性考察 取按现代煎煮方法制备的多糖供试品溶液适量,分别于制备后0、2、4、6、8、10、12、24 h于488 nm处测定A,计算RSD 0.6%,表明供试品溶液在24 h内具有良好的稳定性。

2.2.6 加样回收率 取按现代煎煮方法制备的提取液,平行制备多糖母液6份,精密移取0.5 mL至具塞试管中,按比例1:1精密加入D-无水葡萄糖对照品溶液,按2.2.1项下自“加水至2 mL”开始操作,于488 nm处测定A,见表1,计算平均加样回收率100.08%,RSD 1.8%,表明该方法准确度良好。

2.2.7 样品测定 取2.2.1项下各多糖供试品溶液适量,于488 nm处测定A,参照标准曲线计算处方中多糖含量,结果按《炮炙大法》记载方法、现代煎煮方法及《简明医彙》记载方法煎煮的处方中含有

表1 易黄汤中多糖含量测定的加样回收试验

Table 1 Recovery test for determination of polysaccharides in Yihuangtang

测得量/ μg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
43.37	102.97	100.08	1.8
42.69	99.76		
42.41	98.48		
42.82	100.40		
42.96	101.04		
42.28	97.84		

注:样品中量均为21.4 μg ,加入量均为21.34 μg

多糖质量分别为5.62、4.73、4.05 g,说明3种煎煮方法会影响处方中的多糖含量。

2.3 生物碱的含量测定

2.3.1 供试品溶液制备 取2.1项下冻干粉适量,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入盐酸-甲醇(1:100)50 mL,称定质量,超声处理40 min(250 W, 40 kHz),称定质量,用盐酸-甲醇(1:100)补足减失的质量,摇匀,用0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,得盐酸小檗碱含量测定的供试品溶液。取2.1项下冻干粉适量,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇-0.1%磷酸水溶液(50:50)25 mL,称定质量,加热回流30 min,放冷,称定质量,用甲醇-0.1%磷酸水溶液(50:50)补足减失的质量,摇匀,用0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,得盐酸黄柏碱、木兰花碱含量测定的供试品溶液。

2.3.2 对照品溶液制备 取盐酸小檗碱对照品适量,精密称定,加流动相制成 $0.12\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 对照品溶液。取盐酸黄柏碱、木兰花碱对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度分别为0.14、0.03 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.3.3 色谱条件 盐酸小檗碱含量测定的色谱条件为Diamonsil C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),以乙腈-0.1%磷酸水溶液(50:50)(每100 mL加十二烷基磺酸钠0.1 g)为流动相,检测波长265 nm,流速 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温30 °C,进样量5 μL 。盐酸黄柏碱、木兰花碱含量测定的色谱条件为Diamonsil C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),以乙腈-0.1%磷酸水溶液(每100 mL加十二烷基磺酸钠0.2 g)(32:68)为流动相,盐酸黄柏碱、木兰花碱检测波长分别为284、265 nm,流速 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温30 °C,进样量10 μL 。

2.3.4 线性关系考察 取盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱及木兰花碱对照品适量,按2.3.2项下方法制成质量

浓度分别为0.29、1.47、0.30 g·L⁻¹的对照品溶液,按倍半稀释法稀释,按2.3.3项下色谱条件测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、木兰花碱回归方程分别为 $Y=20\ 237X+22\ 977(R^2=0.999\ 9)$ 、 $Y=12\ 020X+18\ 765(R^2=0.999\ 9)$ 、 $Y=17\ 961X+18\ 542(R^2=0.999\ 9)$,线性范围分别为9.09~290.78、46.03~1 472.85、9.50~303.99 mg·L⁻¹。

2.3.5 精密度考察 取盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱及木兰花碱对照品溶液适量,按2.3.3项下色谱条件连续测定6针,计算三者峰面积的RSD分别为0.2%、0.7%、1.5%,表明仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性考察 取2.1项下按现代煎煮方法制备的冻干粉适量,按2.3.1项下方法制备供试品溶液,分别于制备后0、3、6、9、12、24、36、48 h按2.3.3项下色谱条件测定,计算盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、木兰花碱峰面积的RSD分别为2.2%、1.7%、2.5%,表明供试品溶液在48 h内稳定性良好。

2.3.7 重复性考察 取2.1项下按现代煎煮方法制备的冻干粉适量,按2.3.1项下方法平行制备6份供试品溶液,按2.3.3项下色谱条件测定,计算盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、木兰花碱平均质量分数分别为1.0%、0.2%、0.03%,RSD分别为0.3%、2.7%、1.9%,表明该方法重复性良好。

2.3.8 加样回收率考察 精密称定已知指标成分含量的按现代煎煮方法制备的冻干粉适量,按1:1比例分别精密加入盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、木兰花碱对照品溶液,按2.3.1项下方法平行制备6份供试品溶液,按2.3.3项下色谱条件测定,计算盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、木兰花碱的平均加样回收率分别为96.06%、96.70%、95.19%,RSD分别为0.7%、0.8%、2.4%,表明该方法准确度良好。相关数据见增强出版附加材料。

2.3.9 样品测定 取2.1项下冻干粉适量,按2.3.1项下方法制备供试品溶液,按2.3.3项下色谱条件测定,采用外标一点法计算易黄汤中3种生物碱成分的含量,见表2。结果发现盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱及木兰花碱含量均以现代煎煮方法为最高;同时,按《简明医彙》和《炮炙大法》记载方法煎煮时,处方中3种生物碱的含量差异较小。说明现代煎煮方法的饮片利用率明显高于古法煎煮方法。

2.4 高效液相色谱法(HPLC)指纹图谱的测定

2.4.1 供试品溶液制备 取2.1项下冻干粉适量(折合相同生药量),精密称定,置具塞锥形瓶中,加入甲醇25 mL,密塞,称定质量,加热回流30 min,放

表2 易黄汤不同样品中生物碱类成分的含量测定($\bar{x}\pm s, n=2$)

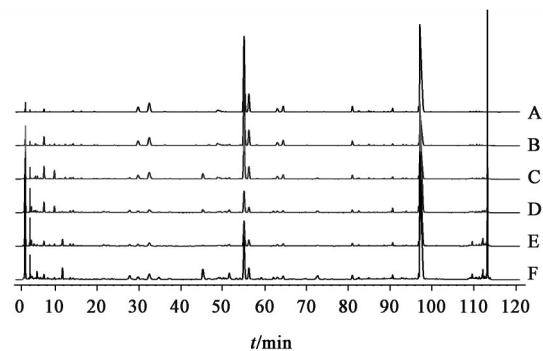
Table 2 Determination of alkaloids in Yihuangtang by different decocting methods ($\bar{x}\pm s, n=2$) mg

煎煮方法	盐酸小檗碱	盐酸黄柏碱	木兰花碱
现代煎煮方法	67.74±0.34	11.99±0.05	2.35±0.01
《简明医彙》记载方法	56.34±0.15	10.52±0.18	1.65±0.04
《炮炙大法》记载方法	54.79±0.05	10.30±0.02	1.73±0.00

冷,称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,用0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.4.2 色谱条件 Waters XSelect HSS T3 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),以乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~10 min, 5%~8%A; 10~35 min, 8%A; 35~45 min, 8%~12%A; 45~75 min, 12%~17%A; 75~105 min, 17%~35%A; 105~110 min, 35%~100%A; 110~112 min, 100%~5%A; 112~122 min, 5%A),检测波长230 nm,柱温30 °C,流速1 mL·min⁻¹,进样量10 μL。

2.4.3 波长选择 取2.1项下按现代煎煮方法制备的冻干粉适量,按2.4.1项下方法制备供试品溶液,照2.4.2项下色谱条件进行全波长检测,不同波长下的易黄汤指纹图谱见图1,根据色谱峰数目、峰高、峰形等,最终选择指纹图谱检测波长230 nm。



注:A.330 nm;B.310 nm;C.290 nm;D.270 nm;E.254 nm;F.230 nm

图1 易黄汤HPLC指纹谱的检测波长考察

Fig. 1 Wavelength investigation of HPLC fingerprint of Yihuangtang

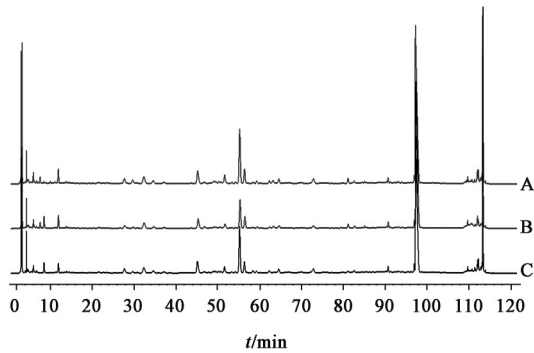
2.4.4 精密度考察 取2.1项下按现代煎煮方法制备的冻干粉适量,按2.4.1项下方法制备供试品溶液,照2.4.2项下条件连续进样6次,将HPLC图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012版),以其中1个样品的HPLC图谱为参照图谱,采用平均数法,时间窗宽度0.1 min,生成对照指纹图谱,结果相似度均>0.90,表明仪器精密度良好。

2.4.5 重复性考察 取2.1项下按现代煎煮方法制备的冻干粉适量,按2.4.1项下方法制备6份供试品

溶液,照 2.4.2 项下条件测定,将 HPLC 图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版),以其中 1 个样品的 HPLC 图谱为参照图谱,采用平均数法,时间窗宽度 0.1 min,生成对照指纹图谱,结果相似度均>0.90,表明该方法重复性良好。

2.4.6 稳定性考察 取 2.1 项下按现代煎煮方法制备的冻干粉适量,按 2.4.1 项下方法制备供试品溶液,分别于制备后 0、2、4、6、8、12、24、36、48 h 按 2.4.2 项下色谱条件测定,将 HPLC 图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版),以 0 h 样品的 HPLC 图谱为参照图谱,采用平均数法,时间窗宽度 0.1 min,生成对照指纹图谱,结果相似度均>0.90,表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.4.7 易黄汤 3 种煎煮方法的指纹图谱分析 取 2.1 项下各冻干粉适量,分别按 2.4.1 项下方法制备供试品溶液,照 2.4.2 项下色谱条件测定,不同煎煮方法制备的易黄汤的 HPLC 图谱见图 2。结果发现在含相同生药量的前提下,3 种煎煮方法所制备样品中色谱峰的数目基本一致;但对比色谱峰峰面积时,发现现代煎煮方法所制备样品中主要色谱峰的峰面积较大。



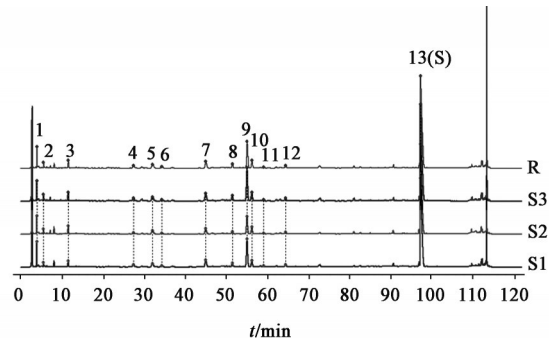
注:A.《简明医彙》记载方法;B.《炮炙大法》记载方法;C.现代煎煮方法

图 2 不同煎煮方法制备的易黄汤的 HPLC 指纹谱

Fig. 2 HPLC fingerprint of Yihuangtang prepared by different decocting methods

2.4.8 指纹图谱的建立与共有峰指认 将 3 种煎煮方法制备的易黄汤样品的 HPLC 图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版),进行多点校正,以按现代煎煮方法所制备样品的 HPLC 图谱为参照图谱,采用平均数法,时间窗宽度 0.1 min,见图 3 和表 3。结果共匹配 13 个共有峰,各样品与对照指纹图谱的相似度均>0.99,说明 3 种煎煮方法所制备样品中 13 个共有峰具有良好的相似性。利用对照品比对法进行指认,结果匹配了 3 个共有峰,即

峰 7 为盐酸黄柏碱、峰 8 为木兰花碱、峰 13 为盐酸小檗碱,见图 4。



注:S1.《简明医彙》记载方法;S2.《炮炙大法》记载方法;S3.现代煎煮方法;R.对照指纹图谱(表 3 同)

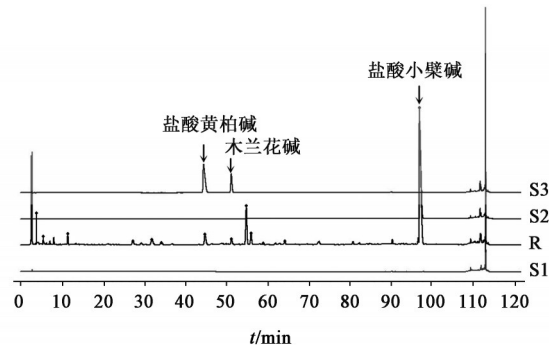
图 3 易黄汤 3 种煎煮方法样品的 HPLC 指纹谱

Fig. 3 HPLC fingerprint of Yihuangtang prepared by three decocting methods

表 3 易黄汤 3 种煎煮方法样品的指纹图谱相似度

Table 3 Similarities of fingerprint of Yihuangtang prepared by three decocting methods

样品	S1	S2	S3	R
S1	1.000	0.996	1.000	1.000
S2	0.996	1.000	0.995	0.998
S3	1.000	0.995	1.000	0.999
R	1.000	0.998	0.999	1.000



注:S1.空白溶剂;R.易黄汤 3 种煎煮方法样品的对照指纹图谱;S2.盐酸小檗碱对照品;S3.盐酸黄柏碱、木兰花碱混合对照品

图 4 易黄汤 HPLC 指纹谱的色谱峰指认

Fig. 4 Identification of chromatographic peak in HPLC fingerprint of Yihuangtang

2.4.9 相对保留时间及相对峰面积分析 以峰 13 为参照峰(S),计算易黄汤 3 种煎煮方法样品中共有峰的相对保留时间及相对峰面积,见表 4。结果发现各共有峰相对保留时间的 RSD 均<2.0%,表明各共有峰有较高相似性。在含相同生药量的前提下,比较现代煎煮方法与《炮炙大法》记载方法样品的相对峰面积,发现现代煎煮方法样品的含量相对较

高,饮片利用率较高;比较现代煎煮方法与按《简明医彙》记载方法样品的相对峰面积,发现现代煎煮方法优于《简明医彙》记载方法;比较《简明医彙》记载方法与《炮炙大法》记载方法样品的相对峰面积,发现1~4、6~7、9、12号色谱峰的相对峰面积存在较大差距,表明2种古代煎煮方法的提取效果亦存在

差异。综合分析易黄汤3种煎煮方法,其指纹图谱中共有峰1~12相对峰面积的RSD分别为24.4%、27.0%、14.6%、31.2%、6.9%、26.7%、11.3%、28.6%、25.8%、7.7%、14.7%、13.7%,说明12个共有峰的相对峰面积波动较大,表明煎煮方法对该方中组分含量有较大影响,且现代煎煮方法的提取效果最好。

表4 易黄汤3种煎煮方法样品中共有峰的相对保留时间和相对峰面积

Table 4 Relative retention times and relative peak areas of common peaks in Yihuangtang prepared by three decocting methods

指标	煎煮方法	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5	峰6	峰7	峰8	峰9	峰10	峰11	峰12
相对保留时间	现代煎煮方法	0.041	0.058	0.120	0.284	0.332	0.356	0.465	0.531	0.567	0.579	0.609	0.664
	《简明医彙》记载方法	0.041	0.058	0.120	0.283	0.331	0.354	0.463	0.529	0.567	0.578	0.608	0.663
	《炮炙大法》记载方法	0.041	0.058	0.121	0.285	0.332	0.356	0.464	0.530	0.567	0.579	0.609	0.663
相对峰面积	现代煎煮方法	0.018	0.028	0.039	0.026	0.052	0.019	0.076	0.045	0.252	0.063	0.010	0.023
	《简明医彙》记载方法	0.028	0.023	0.030	0.028	0.046	0.017	0.079	0.027	0.245	0.054	0.008	0.021
	《炮炙大法》记载方法	0.020	0.016	0.039	0.015	0.047	0.011	0.064	0.029	0.152	0.057	0.008	0.017

2.5 出膏率测定 取2.1项下各提取液10 mL,置于已干燥至恒重的蒸发皿中,蒸干后于105℃干燥3 h,置干燥器中冷却30 min,迅速精密称定质量,计算出膏率,见表5。结果发现按《炮炙大法》记载方法所制备样品的出膏率明显高于按现代煎煮方法和《简明医彙》记载方法制备样品的,且现代煎煮方法所制备样品的出膏率略高于按《简明医彙》记载方法制备样品的,说明不同煎煮方法会影响易黄汤的出膏率。

表5 易黄汤3种煎煮方法样品的出膏率

Table 5 Dry extract rates of Yihuangtang samples prepared by three decocting methods

煎煮方法	样品	干膏量/g	出膏率/%	平均值/%
现代煎煮方法	1	9.00	9.21	9.12
	2	8.84	9.03	
《炮炙大法》记载方法	1	14.26	14.58	14.57
	2	14.23	14.56	
《简明医彙》记载方法	1	7.00	7.15	7.29
	2	7.25	7.42	

注:处方量均为97.79 g

3 讨论

经典名方易黄汤由山药、芡实、白果、黄柏、车前子5味药配伍而成,化学成分复杂,采用不同方法煎煮可能会影响复方中有效成分含量,进而影响其临床疗效,提示煎煮方法的考察对经典名方的开发具有重要意义。本研究结合《指导原则》,参照《医疗机构中药煎药室管理规范》及易黄汤所处年代,以出膏率、有效成分含量、指纹图谱信息为评价指

标对易黄汤的3种煎煮方法进行比较研究,结果发现易黄汤的现代煎煮方法能较好地提取生物碱等成分,且生物碱的抗炎、抑菌等药理作用有利于带下病的治疗^[24-25]。多糖具有调节机体免疫、调节细菌种群、抗氧化等作用^[26-27]。本文研究发现现代煎煮方法对多糖的提取能力稍弱于《炮炙大法》记载的煎煮方法,但现代煎煮方法更贴近工业生产实际情况,且中药复方具有多成分、多靶点协同作用的特点,综合考虑,提示现代煎煮方法可能更适用于易黄汤的制剂开发。

对易黄汤3种煎煮方法的差异性进行分析后发现,该方以山药、芡实为君药,处方中二者用量较大,且富含淀粉及多糖,粉性强,煎煮时间长更利于易黄汤中多糖、淀粉等物质的提取。按《炮炙大法》记载方法煎煮的样品中多糖含量和出膏率较高,观察该方法煎煮后的药物破碎度、提取液(稀释至相同体积)浑浊度,可在一定程度上说明煎煮时间长有利于淀粉、多糖类成分的提取。生物碱含量及指纹图谱结果显示,现代煎煮方法优于2种古代煎煮方法。推测煎煮时间可能会影响生物碱等多数成分的含量,煎煮时间长,部分生物碱类成分可能会遭到破坏;而煎煮时间短,生物碱又可能存在提取不充分的情况^[28]。因此基于对易黄汤3种煎煮方法的研究,建议易黄汤在现代煎煮工艺的基础上,通过筛选煎煮时间、用水量等影响因素进行制备工艺优化,并进一步考察其安全性、有效性。

综上所述,本研究以制剂与基准样品的质量基本一致为目标,从出膏率、有效成分含量、指纹图谱

信息等角度对经典名方易黄汤的3种煎煮方法进行
比较,可为煎煮工艺不明确的其他经典名方的基准
样品制备及制剂生产研究提供有益借鉴。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 吴革林,滕菲,杨丹,等. 经典名方温经汤的基准样品特征图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(22): 7-14.
- [2] 国家药品监督管理局. 关于发布古代经典名方中药复方制剂简化注册审批管理规定的公告(2018年第27号)[EB/OL]. (2018-06-01)[2022-03-25]. <http://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/qtggtg/20180601163901361.html>.
- [3] 国家药品监督管理局药品审评中心. 关于发布《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)》的通告(2021年第36号)[EB/OL]. (2021-08-31)[2022-03-25]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/1c18dd163e7c9221786e5469889367d0>.
- [4] 傅山. 傅青主女科[M]. 上海:上海人民出版社, 1978.
- [5] 武雪莲. 加味易黄汤联合自制清毒方对宫颈HPV病毒感染患者病毒载量及TNF- α 、hs-CRP水平的影响[J]. 光明中医, 2021, 36(1): 84-86.
- [6] 刘笑,陈丽敏,杨红燕. 中药内服外用联合临床护理治疗宫颈HPV感染临床研究[J]. 新中医, 2020, 52(22): 169-171.
- [7] 许桢惠. 加减易黄汤联合保妇康栓治疗老年阴道炎临床观察[J]. 光明中医, 2019, 34(7): 984-986.
- [8] 邢素平. 易黄汤加减联合保妇康治疗老年阴道炎的疗效及价值分析[J]. 光明中医, 2019, 34(3): 349-351.
- [9] 邢益涛,张明强,王定国,等. 林天东主任运用易黄汤治疗慢性前列腺炎经验[J]. 云南中医中药杂志, 2018, 39(2): 3-4.
- [10] 温静,杨继红. 易黄汤临床新用的文献研究[J]. 光明中医, 2012, 27(9): 1740-1742.
- [11] 丘光明,邱隆,杨平. 中国科学技术史:度量衡卷[M]. 北京:科学出版社, 2001.
- [12] 邓中甲. 方剂学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2008.
- [13] 缪希雍. 炮炙大法[M]. 北京:人民卫生出版社, 1956.
- [14] 孙志宏. 简明医彙[M]. 余瀛鳌,点校. 北京:人民卫生出版社, 1984.
- [15] 国家中医药管理局,中华人民共和国卫生部. 国家中医药管理局、卫生部关于印发医疗机构中药煎药室管理规范的通知(国中医药发[2009]3号)[J]. 中华人民共和国卫生部公报, 2009(6): 29-31.
- [16] 付媛媛,蒋玉兰,单鸣秋,等. 盐黄柏饮片与易黄汤的特征图谱与主要成分测定研究[J]. 中草药, 2020, 51(10): 2790-2797.
- [17] 毕嘉谣,田湾湾,张翼,等. 经典名方易黄汤物质基准的量值传递分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(16): 24-31.
- [18] 王荣. 川黄柏的化学成分及药理活性研究进展[J]. 临床合理用药杂志, 2020, 13(1): 173-174.
- [19] 林红强,王涵,谭静,等. 药食两用中药-芡实的研究进展[J]. 特产研究, 2019, 41(2): 118-124.
- [20] 倪凤燕,陈莎,郭丛,等. 金水六君煎历史沿革和处方考证[J]. 中国现代中药, 2021, 23(5): 890-898.
- [21] 国家中医药管理局,国家药品监督管理局. 关于发布《古代经典名方关键信息考证原则》《古代经典名方关键信息表(7首方剂)》的通知[EB/OL]. (2020-11-11)[2022-03-25]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/gzwj/gzwjyp/20201111091109170.html>.
- [22] 杨雅蛟,孔维军,李先恩,等. 不同品种山药中多糖及小分子有效成分的含量比较[J]. 食品科技, 2020, 45(9): 181-187.
- [23] 王彦平,娄芳慧,陈月英,等. 苯酚-硫酸法测定紫山药多糖含量的条件优化[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(4): 170-174.
- [24] 代琪,胡宇,雷蕾,等. 黄柏炮制品的考证、化学成分和药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2020, 16(10): 205-208.
- [25] 邓理有. 清热燥湿话黄柏[J]. 家庭中医药, 1998, 5(1): 49.
- [26] 龚凌霄,池静雯,王静,等. 山药中主要功能性成分及其作用机制研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(16): 312-319.
- [27] 东方,王鑫,王伟伟,等. 芡实多糖闪式提取工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 食品科技, 2020, 45(12): 174-181.
- [28] 王佳琳,张贵君,郭亚芳,等. 煎煮时间对栀子柏皮汤药效组分的影响[J]. 世界中医药, 2018, 13(9): 2300-2303, 2307.

[责任编辑 刘德文]