

四君子汤合煎和分煎提取物的指纹图谱比较

吴林菁, 钱海兵, 王祥培*, 魏家强, 汤容
(贵阳中医学院, 贵阳 550002)

[摘要] **目的:**以指纹图谱方式,探讨四君子汤传统合煎与分煎的化学成分差异。**方法:**以 Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 为色谱柱,乙腈-水为流动相,梯度洗脱,流速 0.6 mL·min⁻¹,检测波长 203 nm,柱温 25 °C。**结果:**四君子汤合煎和分煎提取物中化学成分组成存在差异。合煎液与分煎液有 20 个共有峰,共有峰中合煎的提取率大于分煎。**结论:**四君子汤传统合煎与分煎的化学组成及其含量存在差异,为四君子汤临床应用提供了一定的科学参考依据。

[关键词] 四君子汤; 高效液相色谱指纹图谱; 合煎与分煎; 比较

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0094-04

Fingerprint Comparison of Extracts of Sijunzi Tang Made by Decocting Single and Together

WU Lin-jing, QIAN Hai-bing, WANG Xiang-pei*, WEI Jia-qiang, TANG Rong
(Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the differences of chemical composition between extracts of Sijunzi Tang prepared by traditional decocting together and single, with fingerprint technology. **Method:** The analysis was carried out on a Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with a mobile phase consisting of acetonitrile-water with gradient elution; the flow rate was 0.6 mL · min⁻¹. The column temperature was set at 25 °C and UV detection wavelength was set at 203 nm. **Result:** The ratio of the compositions and its main chemical substances was different between the two extracts. There were 20 peaks in the fingerprint of compatible granules of Sijunzi Tang, and the extract rate of the main chemical substances was higher in extract decocted together than in extract decocted single. **Conclusion:** There are some differences in chemical substances and compositions, ratio being different in the extracts traditional of Sijunzi Tang made by decocting together and single, which is provide some scientific reference for the clinical application Sijunzi Tang.

[Key words] Sijunzi Tang; HPLC fingerprint; decoction together and decoction single; comparison

四君子汤出自宋代《太平惠民和剂局方》,由人参、白术、茯苓、炙甘草组成,具有益气健脾之功效,主治脾胃气虚证。四君子汤水煎剂是历代医家治疗脾胃气虚证的常用方剂,本课题前期基于中医“气

血”理论,对四君子汤抗心肌缺血进行了相关研究,发现其具有减轻缺血心肌损伤、改善心功能的作用^[1-2]。但是传统合煎与分煎对全方的化学成分差异以及治疗作用的不同影响,目前尚未有研究报道。本文在采用高效液相色谱法建立四君子汤水煎液指纹图谱的基础上,通过比较合煎提取物与分煎提取物指纹图谱,从整体角度探讨化学成分的差异,为四君子汤临床用药的煎煮方法提供一定参考依据。

1 材料

1.1 仪器 Agilent-1100 型高效液相色谱仪(DAD检测器、自动进样器、在线脱气、四元泵),AG135 型电子天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司),《中药色谱指

[收稿日期] 20120118(006)

[基金项目] 贵州省科学技术基金项目(黔科合[J]字 20882289)

[第一作者] 吴林菁,硕士研究生,从事中药资源鉴定与质量控制研究, Tel: 13765819312, E-mail: wljzxy @ 126.com

[通讯作者] * 王祥培,博士,教授,从事中药及民族药品品质与资源开发研究, E-mail: wxp0123@126.com

纹图谱相似度评价系统 A 版》(国家药典委员会)。

1.2 试药 中药饮片人参、炙甘草、炒白术、茯苓均购于贵阳同仁堂药店,经贵阳中医学院王祥培教授鉴定均符合药典标准。人参皂苷 Rg₁ 对照品(批号 110703-200726),人参皂苷 Re 对照品(批号 110754-200320),人参皂苷 Rb₁(批号 110704-200318),以上对照品均购于中国药品生物制品检定所。甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱 Diamonsil C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水,采用梯度洗脱,流速 0.6 mL·min⁻¹,检测波长 203 nm,柱温 25 ℃,进样量 10 μL。流动相浓度梯度见表 1。

表 1 流动相比梯度洗脱变化

t/min	水/%	乙腈/%
0	99	1
20	90	10
40	81	19
75	81	19
95	71	29
110	71	29
140	60	40

2.2 对照品溶液的制备 精密称取人参皂苷 Rg₁ 对照品 10.1 mg,人参皂苷 Re 对照品 9.65 mg,人参皂苷 Rb₁ 对照品 16.8 mg,置 50 mL 的量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,作为参照物溶液。

2.3 供试品溶液的制备 四君子汤合煎液:精密称取人参 3.0 g,炙甘草 2.0 g,炒白术 3.0 g,茯苓 3.0 g,置烧杯中,加入 10 倍水,浸泡 30 min,煎煮 20 min,滤过,收集滤液;再加入 8 倍水,煎煮 2 次,各 20 min,滤过,合并 3 次滤液,定容于 50 mL 量瓶中,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液即得合煎供试品溶液。

四君子汤分煎液:精密称取人参 3.0 g,置烧杯中,加入 10 倍水,浸泡 30 min,煎煮 20 min,滤过,收集滤液;再加入 8 倍水,煎煮 2 次,各 20 min,滤过,合并 3 次滤液,得人参水煎液。再分别精密称取炙甘草 2.0 g,炒白术 3.0 g,茯苓 3.0 g,按上述方法制备炙甘草、炒白术、茯苓的水煎液。将各药材的水煎液合并,定容于 50 mL 量瓶中,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液即得分煎供试品溶液。

2.4 方法学考察^[3-4]

2.4.1 精密度试验 取同一供试品溶液,按上述色谱条件连续进样 6 次,考察色谱峰相似度的一致性,

用相似度软件计算,结果相似度 > 0.9;同时计算各共有色谱峰相对保留时间及相对峰面积的 RSD 均 < 3%,表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取同一批次药材,分别制备 6 份供试品溶液,按上述色谱条件分别进行检测,考察色谱峰相似度的一致性,用相似度软件计算,结果相似度 > 0.9;同时计算各共有色谱峰相对保留时间及相对峰面积的 RSD 均 < 3%,表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一供试品溶液,按上述色谱条件分别在 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36 h 进样,考察色谱峰相似度的一致性,用相似度软件计算,结果相似度 > 0.9;同时计算各共有色谱峰相对保留时间及相对峰面积的 RSD 均 < 3%,表明样品溶液在 36 h 内稳定。

2.5 指纹图谱的建立与分析 精密吸取供试品溶液各 10 μL,注入高效液相色谱仪,按 2.1 项下的色谱条件,进行检测。同一试验条件下,测定所有供试品 HPLC 图。根据不同供试品测定结果所给出的峰数、积分值和相对保留时间等相关参数进行分析、比较,制定优化的指纹图谱(图 1)。四君子汤合煎液共检测出 91 个共有峰,分煎液共检测出 62 个共有峰,经人参皂苷对照品比对确定 16 号峰对应为人参皂苷 Rg₁, 17 号峰对应为人参皂苷 Re, 19 号峰对应为人参皂苷 Rb₁。分别将四君子汤 5 批合煎样品及 4 批分煎样品的色谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004 年 A 版相似度软件,进行相似度的评价,四君子汤合煎液和分煎液的指纹图谱相似度均在 0.90 以上。以保留时间约为 62.35 min 的 14 号峰作为参照峰,对四君子汤 5 批合煎样品及 4 批分煎样品的指纹图谱进行了考察,确定了 20 个共有峰(图 1,表 2~3)。并对各色谱峰的平均峰面积进行了计算(表 3)。

3 讨论

对甲醇-水、甲醇-0.05% 磷酸水、甲醇-0.1% 磷酸水、乙腈-水、乙腈-0.05% 磷酸水、乙腈-0.1% 磷酸水等多种不同浓度和比例等洗脱条件进行了考察,结果发现采用乙腈-水进行梯度洗脱,各色谱峰分离结果良好。

四君子汤中人参为君药,人参中的皂苷成分具有抗肿瘤、抗休克、增强心肌功能等作用^[5],故选取皂苷类成分的吸收波长 203 nm 作为测定波长,在此波长下出峰数目较多,同时各组分也得到了较好的分离。

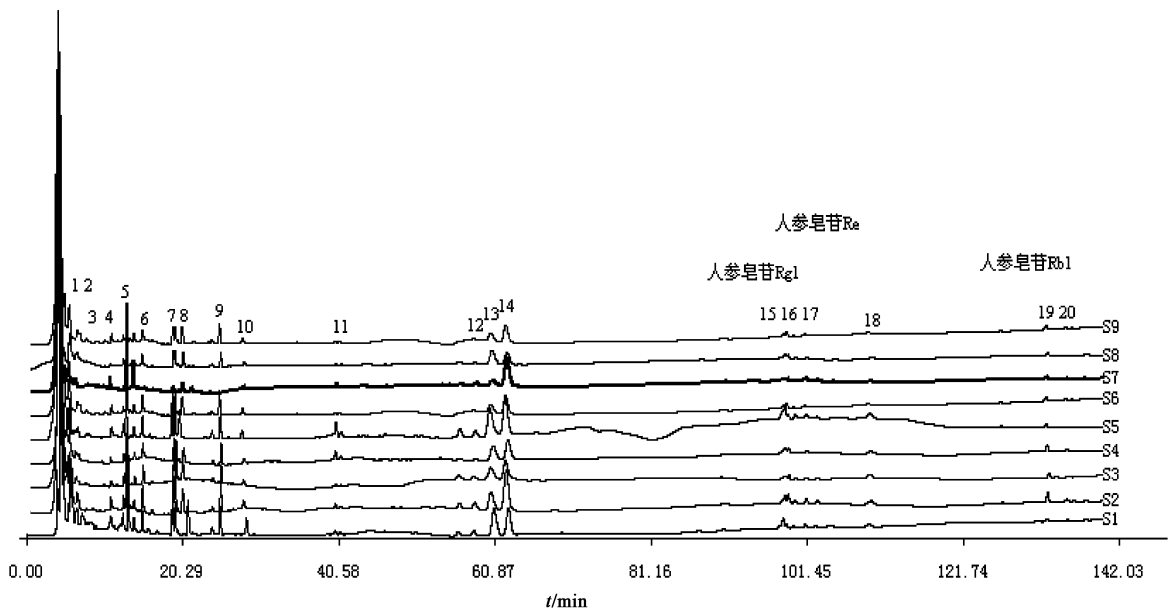


图 1 四君子汤合煎液 (S1 ~ S5) 与分煎液 (S6 ~ S9) 指纹图谱比较

表 2 四君子汤合煎液 (S1 ~ S5) 与分煎液 (S6 ~ S9) 指纹图谱共有峰的相对保留时间

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
1	0.071 6	0.071 3	0.071 5	0.071 2	0.071 4	0.071 5	0.071 6	0.071 7	0.071 5
2	0.078 0	0.078 3	0.078 5	0.078 2	0.078 4	0.077 9	0.078 1	0.077 8	0.078 1
3	0.089 0	0.089 1	0.089 3	0.088 9	0.089 2	0.088 8	0.089 4	0.089 0	0.089 1
4	0.208 0	0.208 1	0.207 9	0.208 0	0.208 3	0.208 2	0.207 8	0.208 4	0.207 7
5	0.223 0	0.223 3	0.223 1	0.222 9	0.223 2	0.222 8	0.223 1	0.229 0	0.223 2
6	0.240 8	0.240 7	0.240 5	0.240 4	0.240 6	0.240 9	0.240 8	0.240 7	0.240 6
7	0.309 1	0.308 9	0.309 2	0.309 0	0.309 4	0.309 1	0.308 8	0.309 3	0.309 4
8	0.315 2	0.315 1	0.315 4	0.315 0	0.315 5	0.314 9	0.315 3	0.314 5	0.315 1
9	0.420 4	0.420 5	0.420 2	0.420 1	0.420 6	0.420 3	0.420 2	0.420 1	0.420 4
10	0.451 5	0.451 2	0.451 3	0.451 4	0.451 7	0.451 3	0.451 6	0.451 5	0.451 8
11	0.654 1	0.654 2	0.653 8	0.654 4	0.654 3	0.654 0	0.653 9	0.654 7	0.654 3
12	0.933 1	0.932 5	0.933 4	0.932 7	0.932 2	0.933 7	0.933 5	0.933 2	0.933 6
13	0.968 7	0.968 9	0.968 0	0.968 2	0.968 5	0.969 3	0.968 8	0.969 1	0.969 4
14(S)	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0
15	1.586 6	1.585 9	1.586 2	1.586 9	1.587 1	1.586 2	1.586 7	1.586 4	1.586 5
16	1.624 4	1.623 8	1.624 9	1.624 7	1.624 8	1.624 0	1.624 2	1.625 0	1.624 3
17	1.646 9	1.647 0	1.646 5	1.647 3	1.647 5	1.646 8	1.646 3	1.647 1	1.646 9
18	1.757 7	1.756 8	1.757 7	1.757 2	1.758 1	1.757 3	1.757 4	1.757 7	1.757 5
19	2.127 2	2.126 5	2.126 9	2.127 4	2.127 3	2.126 7	2.127 2	2.127 7	2.126 8
20	2.168 7	2.168 3	2.168 5	2.169 3	2.169 5	2.168 4	2.168 5	2.168 1	2.168 9

表3 四君子汤合煎液(S1~S5)与分煎液(S6~S9)指纹图谱共有峰的峰面积

峰号	t/min	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	合煎平均峰面积	分煎平均峰面积
1	4.463	13 665.450	5 269.092	3 291.646	2 620.955	6 252.591	3 036.853	2 283.540	3 622.899	3 346.439	6 219.947	3 072.431
2	4.861	3 755.656	1 152.426	1 840.105	978.990	2 316.042	2 216.433	452.739	367.752	2 098.093	2 008.644	1 283.754
3	5.545	2 184.917	1 941.146	1 215.223	1 968.724	1 125.852	1 253.922	1 234.990	1 289.592	1 353.945	1 687.172	1 283.112
4	12.969	2 714.696	2 096.732	1 166.525	1 013.922	1 493.412	1 623.059	882.480	855.229	1 599.043	1 697.057	1 239.953
5	13.906	1 015.584	727.288	294.344	435.209	529.516	519.146	1 063.037	113.716	524.432	600.388	555.082
6	15.017	1 050.697	1 098.011	752.988	1 219.014	1 064.058	998.722	439.140	389.349	1 001.521	1 036.954	707.180
7	19.273	968.504	1 207.269	798.960	604.073	900.201	663.674	78.456	451.049	586.654	895.801	444.958
8	19.659	199.451	230.097	235.629	87.345	1 309.478	141.337	115.461	129.868	143.235	412.400	132.475
9	26.212	93.087	66.211	32.646	22.622	84.570	20.362	127.054	24.053	25.879	59.827	49.337
10	28.154	779.878	1 244.345	266.176	207.059	370.657	280.093	816.197	188.775	285.743	573.623	392.702
11	40.786	138.136	160.314	82.864	140.551	293.870	157.656	34.192	41.239	161.890	163.147	98.744
12	58.178	521.633	645.916	236.804	167.511	493.495	235.318	300.423	103.286	104.432	413.071	185.865
13	60.399	2 868.624	2 241.694	1 437.075	1 867.427	3 478.361	1 485.303	778.795	1 621.117	1 569.098	2 378.636	1 363.578
14	62.351	2 596.141	4 550.716	2 046.838	2 354.423	4 291.941	1 982.174	3 284.814	1 315.580	1 879.756	3 168.012	2 115.581
15	98.926	146.758	446.651	190.040	250.540	210.024	196.767	145.552	201.802	187.767	248.802	182.972
16	101.281	233.586	330.091	160.288	258.520	407.231	131.522	336.129	158.474	134.512	277.943	190.159
17	102.686	176.181	242.606	93.864	148.987	157.28	55.875	189.814	68.918	71.431	163.786	96.509
18	109.597	241.115	405.679	515.433	289.529	659.299	194.306	266.943	270.186	455.306	422.211	296.685
19	132.632	131.189	478.549	227.37	331.745	157.159	226.108	161.191	141.377	223.345	265.202	188.005
20	135.221	84.900	132.132	75.884	84.457	72.184	66.781	54.699	36.381	54.543	89.911	53.101

通过比较四君子汤合煎液和分煎液的指纹图谱发现,合煎液检测出的峰数比分煎液多,另合煎液与分煎液 20 个共有峰中合煎液的平均峰面积均大于分煎液。可能由于在合煎过程中促进了各种药材中化学成分的反应,也利于成分间的增溶作用。因此,从化学成分的组成及其含量方面考虑,四君子汤的临床以传统的合煎用药具有一定的科学依据。

通过比较四君子汤指纹图谱的差异,对分析该中药方剂的应用原理具有积极的意义,在临床使用上是否应将合煎与分煎两种提取方法进行区别对待,还需要通过结合药效和临床效果等来确定。

死大鼠心肌 NO 系统及 Caspase-3 的影响[J]. 时珍国医国药,2011,22(10):2428.

- [2] 钱海兵,王毅,黄国钧. 四君子汤预处理抗氧化改善梗死大鼠心功能的实验研究[J]. 时珍国医国药,2011,22(9):2239.
- [3] 王祥培,孙宜春,靳风云,等. 芭蕉根 HPLC 指纹图谱鉴别研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(12):30.
- [4] 方丽,祝明,郑成,等. 温莪术药材指纹图谱的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(12):37.
- [5] 张凤普. 人参皂苷的作用机理研究[J]. 临床合理用药,2010,3(21):158.

[责任编辑 顾雪竹]

[参考文献]

- [1] 钱海兵,黄勇其,王毅. 四君子汤预处理对急性心肌梗