

经典名方温经汤中酒当归炮制工艺优化及其指纹图谱的研究

王永春¹, 刘宇心², 孟珈同¹, 王振洲¹, 唐秋竹¹, 董金香¹, 邱智东¹, 李军鸽¹

(1 长春中医药大学, 长春 130117; 2 长春人文学院, 长春 130117)

[摘要] **目的:** 建立经典名方温经汤中酒当归的炮制工艺, 以及酒当归饮片的 HPLC 指纹图谱, 以为后续温经汤的制剂开发研究提供参考。 **方法:** 通过查阅古籍, 结合现代技术方法优选洗、润、切、干燥等炮制工艺, 得生当归片。通过单因素考察优选酒当归黄酒用量及闷润时间, 以“文火炒干”为基本原则, 考察炒制温度、炒制时间和炒锅转速 3 个因素, 进行 $L_9(3^4)$ 正交实验, 以性状、水分(%)、浸出物(%) 和阿魏酸含量(%) 为考察指标, 采用熵权法计算复合评分, 进行酒炙炮制工艺优化。采用 HPLC 法建立酒当归饮片的指纹图谱, 色谱柱为 Techmate C_{18} 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μ m), 以乙腈(A)-0.2% 磷酸水(B) 为流动相体系进行梯度洗脱, 检测波长 280 nm, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 流速 1.0 mL · min⁻¹。 **结果:** 确立了酒当归的最佳炮制工艺, 建立了其 HPLC 指纹图谱, 指出 4 个主要共有峰, 分别为绿原酸、阿魏酸、藁本内酯、洋川芎内酯 I, 建立了 4 种成分的含量测定方法。 **结论:** 本实验建立的酒当归炮制工艺稳定可行, 结合其指纹图谱可为温经汤的制剂开发研究提供实验依据。

[关键词] 温经汤; 炮制工艺; 当归; 酒炙; 阿魏酸

[中图分类号] R943 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)03-0283-11

The optimization of the processing method of Angelicae sinensis Radix by yellow wine in classical famous prescription Wenjing decoction and the studys of its HPLC fingerprint

WANG Yong-chun¹, LIU Yu-xin², MENG Jia-tong¹, WANG Zhen-zhou¹, TANG Qiu-zhu¹,
DONG Jin-xiang¹, QIU Zhi-dong¹, LI Jun-ge¹

(1 Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China;

2 Changchun Humanities and Sciences College, Changchun 130117, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the processing method of the classic wine angelica in Wenjing decoction and the HPLC fingerprint of the decoction pieces of angelica in order to provide reference for the follow-up Wenjing decoction preparation research. **Methods:** By consulting ancient books and combining modern technology and methods, the washing, moisturizing, cutting, drying and other processes were optimized to obtain angelica tablets. The dosage and moistening time of Chinese angelica yellow wine were optimized through single factor investigation. Combining “gentle fire dry” operation key points, three processing parameters, i. e., frying temperature, frying time and frying speed, were observed by $L_9(3^4)$ orthogonal experiment. Taking traits, moisture (%), extract (%) and ferulic acid content (%) as the inspection indicators, the entropy weight method is used to calculate the composite score, and the processing technology of distilled angelica is optimized. The fingerprint of Danggui decoction pieces was established by HPLC using Techmate C_{18} column (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m), and acetonitrile

[基金项目] 经典名方温经汤合作开发资助项目: 半夏泻心汤等 2 个中药经典名方新产品开发(2020220001000007)

[作者简介] 王永春, 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药制剂与炮制研究。联系电话: (0431)86763972, E-mail: 1605382903@qq.com。

[通讯作者] 李军鸽, 女, 助理实验师, 研究方向: 中药制剂与炮制研究。联系电话: (0431)86763972, E-mail: 407332695@qq.com。

(A)-0.2% phosphoric acid water (B) was used as the mobile phase system for gradient elution. The detection wavelength was set at 280 nm, the column temperature was 30 °C, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **Results:** The best processing method of *Angelicae sinensis Radix* processed with yellow wine and the HPLC fingerprint of decoction pieces of *Angelicae sinensis Radix* processed with yellow wine were established, and 4 main common peaks were identified, namely chlorogenic acid, ferulic acid, ligustilide, and ligustalide I. The content determination methods of the four components were established. **Conclusion:** The established processing method of *Angelicae sinensis Radix* using yellow wine is stable and feasible, and its fingerprint can provide a reference for the development and research of Wenjing decoction.

[**Key words**] Wenjing decoction; processing technology; *Angelicae sinensis Radix*; yellow wine firing; ferulic acid

温经汤,中医经典名方之理血剂,出自宋代陈明明的《妇人大全良方》,具有温经散寒,养血祛瘀之功效^[1]。2018年4月16日,国家中医药管理局会同国家药品监督管理局发布了《古代经典名方目录(第一批)》(简称《目录》),其中的第39首为温经汤^[2],原文记载“当归、川芎、芍药、桂心、莪术、牡丹皮半两,人参、牛膝、甘草各一两,右咬咀,每服无钱水一盏,煎至八分”^[2],其功效为温经补虚,止痛化瘀,主治经脉不通,血凝不行,绕脐寒疝,近年来温经汤的临床应用多为治疗女性妇科疾病,主要以痛经、月经不调为主,其对子宫内膜异位症、盆腔炎亦有一定的疗效。方中记载了“当归半两”,并没有明确炮制要求。2020年6月国家药品监督管理局公开征求《古代经典名方关键信息考证原则》和《古代经典名方关键信息表(7首方剂)征求意见稿》中,专家认为当归经酒炙后药性温和,活血化瘀功效可能更佳,更贴切温经汤功效,故给予意见温经汤中当归为酒当归入方^[3]。《妇人大全良方》“辨识修制药物法度”中记载道:“当归(拣如马尾重半两以上,气香味甜者为上,微炒)去芦,酒浸半日,不可太过,久则失味。洗净,慢火焙干,切,方秤分两。”其酒制方法与今之酒炙法相似^[4],因此建议参考酒当归炮制规格。目前很少有文献从炮制角度出发,针对具体经典名方中某味中药的炮制方法及质量控制进行研究。本文以经典名方-《妇人大全良方》温经汤为例,参考古代炮制方法的同时与现代工艺结合,建立当归酒炙炮制工艺。中药指纹图谱广泛应用于中药材的质量控制中,是一种综合的、可量化的鉴别手段,其具有整体性和模糊性的显著特征,可以从整体上对中药材及饮片进行评价,体现中药材的特异性和专属性。通过对酒当归饮片进行指纹图谱的研究,

既可以鉴别其内在质量,又可以确定其关键信息。为经典名方温经汤的开发研究提供参考依据。

当归,又名干归、岷归等,为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根。其入药始载于《神农本草经》:“当归味温,主呃逆上气”,被列为中品,但书中却并未记载其炮制方法。当归炮制首载于南北朝时期的《刘涓子鬼遗方》“炒”^[5],并未进行详细说明。总结历代有关当归炮制记载的方法,主要有“炒”、“酒炒”、“米炒”、“土炒”、“醋炒”、“酒浸”、“酒蒸”、“酒煮”等几十种炮制规格的记载。当归炮制的传统理论认为经炮制后改变药性,扩大治疗范围,因而区分为酒当归、炒当归、当归炭等不同炮制规格。其中酒当归辛温,取其散性,以增强活血散瘀之功,与温经汤的功效更加贴合,因此选用酒制法作为温经汤中当归的炮制方法。

酒当归在《中华人民共和国药典》2020年版一部收录的炮制方法为:取净当归片,加黄酒拌匀,闷透,置炒制容器内,用文火炒干^[6]。饮片性状:形如当归片。切面深黄色或浅棕黄色,略有焦斑。香气浓郁,并略有酒香气。

全国炮制规范和各地方炮制规范都收录了酒当归饮片,多对其入药规格有所规定,对全国各地酒当归饮片的炮制方法、饮片规格进行收集整理并归纳总结。通过酒当归古代用药方式考证和目前全国各地加工炮制情况调研及现代实验研究^[7-10],对当归药材酒炙做如下选择:“净当归片,加酒拌匀,闷透,文火炒干”。

材料与方法

1 仪器

LC2030 高效液相色谱仪(日本岛津公司);7008

切药机(NEWONE 公司);MS-5 多功能电热炒药机(温州顶历医疗器械有限公司);DHG-9030A 鼓风干燥箱(成都壹科医疗器械有限公司);KQ-250B 超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司);XS105DU 万分之一电子天平(德国梅特勒-托利多公司)。

2 试药

阿魏酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110773-201915,纯度 $\geq 99.4\%$);绿原酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110753-202018,纯度 $\geq 96.1\%$);藜本内酯(上海源叶生物科技有限公司,批号:B20492,纯度 $\geq 98\%$);洋川芎内酯 I(上海源叶生物科技有限公司,批号:B21463,纯度 $\geq 98\%$);乙腈(Fisher 公司,色谱纯);黄酒(绍兴吴越酿酒有限公司酿造);水为超纯水;其他试剂均为分析纯。

10 批当归药材的详细信息见表 1,经长春中医药大学中药鉴定教研室翁丽丽教授鉴定,均为伞形科植物当归的干燥根。

表 1 10 批当归药材详细信息

编号	药材批号	产地
1	DG202001	甘肃省渭源县会川镇
2	DG202002	甘肃省渭源县会川镇
3	DG202003	甘肃省渭源县会川镇
4	DG202004	甘肃省岷县岷阳镇瓦窑沟村三社
5	DG202005	甘肃省岷县茶阜镇
6	DG202006	甘肃省岷县蒲麻镇
7	DG202007	甘肃省岷县当归城
8	DG202008	山西省稷山县清河镇三交村
9	DG202009	山西省稷山县清河镇三交村
10	DG202010	山西省稷山县清河镇三交村

方法与结果

1 酒当归炮制工艺优化

1.1 净制方法研究

当归的历代净制方法以“洗”、“去芦”为主。当归净制的记载较早见于唐朝,《理伤续断方》^[11]就有“去芦头”的记载。宋朝有关当归净制的记载较多,《证类——雷公》记载道:“凡使,先去尘并头尖一分以来”;《博济方》、《三因极一病证方论》^[12]有云:“去芦,洗净沙土”;《洪氏集验方》^[13]:“温水洗”。直至明代《普济方》仍有“去芦尾”的记载。与古代

相比,当归的现代净制方法并不复杂,《中华人民共和国药典》2020 年版明确了当归的净制方法:“除去杂质,洗净”。

根据当归古代净制方法的考证,结合现代炮制工艺,设计如下实验:取当归药材(DG202001),除去杂质、非药用部位及虫蛀发霉变质药材,称重,抢水洗。记录用水量和洗涤次数。以水洗后颜色浑浊程度和净制后药材性状作为指标,最后确定抢水洗 2 次,每次用水量约为 3~4 倍药材量。

1.2 软化方法研究

古代有关当归的软化方法多为“酒浸”,如《雷公炮炙论》、《圣济总录》等均记载“酒浸一宿”。而现代其软化方法以润制为主,如《中华人民共和国药典》2020 年版明确了当归的软化方法:“润透”。考虑到当归中含有挥发油,故采用常温闷润的方法,将洗净的药材用湿布包裹放于容器内,待内外软硬一致,记录闷润的时间,含水率。常温闷润时间需 10~40 h,含水率 20%~25%。

1.3 切制方法研究

当归的切制方法初见于唐朝的《千金翼方》^[14]“净洗去土切细”,宋朝的《博济方》也有相同的记载;宋朝的《太平圣惠方》^[15]、《全生指迷方》^[16]记载道:“去芦头剉”;宋朝《苏沈良方》^[17]云:“去芦了薄切片”;宋朝《洪氏集验方》^[13]云:“温水洗,薄切”。可见,当归的古代切制较为简单,主要为“切细”或“薄切”。当归现代切制规格多以薄片为主,例如:《中华人民共和国药典》2020 年版明确了当归片的切制规格为薄片。地方炮制规范中也有切厚片的规定,例如:《天津市中药饮片炮制规范》2018 年版中有当归头切厚片,当归尾切薄片的规定。按照《中华人民共和国药典》2020 年版四部通则 0213 规定,片的规格有极薄片(0.5 mm 以下)、薄片(1~2 mm)和厚片(2~4 mm),考虑到温经汤原文记载“右咬咀,每五钱。水一盞半,煎至八分”,因药材最终的煮散粒度为经过“咬咀”得到的粒度大小,通过考证得知,“咬咀”以口咬如麻豆大小^[18],即粒度为现代 4 mm 左右,故选择当归切厚片。

1.4 干燥方法研究

古代文献中当归的干燥方式多为“焙干”“晒干”,如《汤液本草》^[19]“火干、日干”;《药性会元》^[20]“焙干”;《药品化义》^[21]“晒干”;《握灵本草》^[22]“或日干,或火焙用”。其现代干燥方式以晒

干或低温干燥为主。虽古今都有当归干燥方式的记载,却未记录具体的干燥温度。考虑到当归中含有挥发油,干燥温度过高可能会导致挥发油成分的损失,故取3份闷润好的药材切厚片后,分别置鼓风机干燥箱内分别在40℃、50℃及室温条件下干燥,以外

观性状、阿魏酸的含量、水分含量、干燥时间为指标考察干燥温度对饮片的影响,实验结果见表2。根据实验结果,自然晾干和低温干燥对当归饮片性状及阿魏酸含量影响并不大,结合实际生产情况和经济成本,可选择自然晾干法或低温干燥。

表2 干燥温度考察结果

序号	干燥温度/℃	干燥时间/h	阿魏酸含量/%	水分含量/%	饮片性状
1	自然晾干	24	0.087	8.6	呈类圆形、椭圆形或不规则薄片。外表皮浅棕色至棕褐色。
2	40	5	0.080	8.1	切面浅棕黄色或黄白色,平坦,有裂隙,中间有浅棕色的形成层环,并有多数棕色的油点,香气浓郁,味甘、辛、微苦
3	50	3	0.085	7.2	

1.5 黄酒拌匀、闷润及文火炒干方法研究

古代关于当归酒炙的记载有“酒拌炒”“酒拌蒸”“酒浸,微炒”,其中以酒炒最为常见,例如:宋《圣济总录》中“当归(酒浸一宿切焙)、当归(酒酒切焙)”；宋《苏沈良方》^[17]中“无灰酒浸一宿,去芦了薄切片,焙”；明《药性会元》^[20]中“制法:酒浸。冬浸一宿,春、秋浸半日,夏酒洗;切,焙干用”等。根据前文所述,酒当归辛温,取其散性,以增强活血散瘀之功,与温经汤的功效更加贴合,因此在本研究中当归的炒制方法选用酒炒法。

1.5.1 黄酒用量及闷润时间考察 按照《中华人

民共和国药典》2020年版四部通则0213规定“酒炙时,除另有规定外一般用黄酒,每100kg待炮炙品用黄酒10~20kg”。故考虑黄酒用量,①取5份当归片(直径<10mm)每份100g,分别加10g黄酒、15g黄酒、20g黄酒、10g黄酒(兑水10g)、15g黄酒(兑水5g),拌匀,闷润。②6份当归片(直径>10mm),分别加10g黄酒、15g黄酒、20g黄酒、10g黄酒(兑水20g)、15g黄酒(兑水15g)、20(兑水10g)拌匀,闷润。记录闷润状态、闷润时间,在130℃下炒25min后测定阿魏酸含量,选出黄酒用量,结果见表3。

表3 当归片黄酒用量及闷润时间确定

序号	饮片量/g	饮片直径/mm	黄酒量/g	加水量/g	状态描述	闷润时间/h	阿魏酸含量/%
1	100	<10	10	—	未拌匀,黄酒量不够,未能使药材闷透	—	—
2	100	<10	15	—	拌匀,黄酒量不够,未能使药材闷透	—	—
3	100	<10	20	—	拌匀,能使药材闷透	3	0.096
4	100	<10	10	10	拌匀,能使药材闷透	3	0.089
5	100	<10	15	5	拌匀,能使药材闷透	3	0.091
6	100	>10	10	—	未拌匀,黄酒量不够,未能使药材闷透	—	—
7	100	>10	15	—	拌匀,黄酒量不够,未能使药材闷透	—	—
8	100	>10	20	—	拌匀,黄酒量不够,未能使药材闷透	—	—
9	100	>10	10	20	拌匀,能使药材闷透	4	0.088
10	100	>10	15	15	拌匀,能使药材闷透	4	0.079
11	100	>10	20	10	拌匀,能使药材闷透	4	0.084

从结果看,100g当归片(直径<10mm)至少要20g的溶液去拌匀,润透;100g当归片(直径>10mm)至少要30g的溶液去拌匀,通过相同条件下文火炒干后,阿魏酸含量几乎无差别。故说明黄酒用量对酒当归含量影响不大,从节约经济成本考

虑,100g当归片(直径<10mm)可选黄酒10g(兑水10g)量闷3h,100g当归片(直径>10mm)可选黄酒10g(兑水20g)量闷4h。

1.5.2 文火炒干工艺研究 结合炙法“文火炒干”操作要点,炒制温度3个水平选择110℃、130℃,

150 ℃;炒制时间三水平选取 20,25 和 30 min;实际生产情况调研炒锅转数选择 20,25,30 r·min⁻¹,对三因素三水平进行整理,利用正交 L₉(3⁴)实验表设计正交实验。因素水平表见表 4。

表 4 因素水平表

水平	因素		
	炒制温度(A) /℃	炒制时间(B) /min	炒锅转数(C) /r·min ⁻¹
1	110	20	20
2	130	25	25
3	150	30	30

1.5.3 炮制品的制备 取净当归片(直径 < 10 mm)每 100 g 加黄酒 10 g(兑水 10 g)拌匀,闷 3 h。净当归片(直径 > 10 mm)每 100 g 加黄酒 10 g(兑水 20 g)拌匀,闷 4 h,混合均匀,取 9 份,置于预热炒锅内,按炒制规定温度、炒锅转数、炒制规定时间得到样品,取出,放凉。

1.5.4 酒当归饮片质量评价指标 外观性状按照《中华人民共和国药典》2020 版一部 75 页“酒当归”【性状】:形如当归片。切面深黄色或浅棕黄色,略有焦斑。香气浓郁,并略有酒香气。结合炙法操作的基本要求“文火炒干”,观察实际操作时不同温度下炒干时外观性状、气味,将炒制适度值规定为 1~10 分,确立评分标准,对 1~9 号正交实验酒当归炮制饮片进行评分。

水分、浸出物及含量测定参考《中华人民共和国药典》2020 年版四部通则 0832 水分测定法(第二法)和 2201“醇溶性浸出物测定法”(热浸法、70%乙醇作溶剂)对生品及 9 个正交实验样品水分和浸出物进行测定。参考《中华人民共和国药典》2020 年版“当归”【含量测定】项下方法,采用高效液相色谱法测定阿魏酸含量(%)。阿魏酸是一类常见的有机酸类成分,有着较强的药理活性,具有改善血液流变学、减少前列腺素 F_{2α}(PGF_{2α})、调节雌二醇(E₂)和孕酮(P)平衡、拮抗缩宫素(OT)、减少血管升压素(AVP)、调节免疫功能、消除自由基、调节微量元素等药理作用^[23-25],与温经汤中当归活血止痛、养血调经的功效相一致,因此将阿魏酸的含量测定作为酒当归质量评价的指标之一。

1.5.5 正交实验结果与方差分析 熵权法是通过熵值来判断某个指标的离散程度,能有效兼顾各指标的变异程度,客观反映其重要性,是一种常用的客观赋权法。本研究采用熵权法对酒当归饮片的性状(X₁)、水分(X₂)、浸出物(X₃)、阿魏酸含量(X₄)4 个指标进行评价,采用极差化方法分别对正向指标如公式(1)和负向指标如公式(2)进行标准化、归一化(X_{ij})处理,得到标准化矩阵[式(3)]。再根据熵权计算公式[式(4)、式(5)、式(6)]进行计算,确定指标权重,式中 H 为信息熵(0ln0 = 0),f 为指标的特征比重。基于熵权构建综合指标[Y,式(7)],经熵权法计算得到的评价结果更加客观真实。

$$\bar{x}_{ij} = \frac{x_{ij} - \min(x_{ij})}{\max(x_{ij}) - \min(x_{ij})} \quad \text{式(1)}$$

$$\bar{x}_{ij} = \frac{\max(x_{ij}) - x_{ij}}{\max(x_{ij}) - \min(x_{ij})} \quad \text{式(2)}$$

$$\bar{X} = \begin{bmatrix} \bar{x}_{11} & \bar{x}_{12} & \cdots & \bar{x}_{1n} \\ \bar{x}_{21} & \bar{x}_{22} & \cdots & \bar{x}_{2n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \bar{x}_{m1} & \bar{x}_{m2} & \cdots & \bar{x}_{mn} \end{bmatrix} \quad \text{式(3)}$$

$$f_{ij} = \frac{\bar{x}_{ij}}{\sum_{i=1}^m \bar{x}_{ij}} \quad \text{式(4)}$$

$$H_i = -\frac{1}{\ln m} \sum_{j=1}^m f_{ij} \ln f_{ij} \quad \text{式(5)}$$

$$w_i = \frac{1 - H_i}{n - \sum_{i=1}^n H_i} \quad \text{式(6)}$$

$$Y = \begin{bmatrix} \bar{x}_{11} & \bar{x}_{12} & \cdots & \bar{x}_{1n} \\ \bar{x}_{21} & \bar{x}_{22} & \cdots & \bar{x}_{2n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \bar{x}_{m1} & \bar{x}_{m2} & \cdots & \bar{x}_{mn} \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} w_1 \\ w_2 \\ \vdots \\ w_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \vdots \\ y_m \end{bmatrix} \quad \text{式(7)}$$

阿魏酸含量、浸出物和外观性状评分指标取值越大越好,水分含量取值越小越好。按照上述公式计算性状(X₁)、水分(X₂)、浸出物(X₃)、阿魏酸含量(X₄)4 项指标组合权重系数分别为 0.298,0.181,0.219,0.302, Y = (X₁/X_{1max} × 0.298 + X₂/X_{2max} × 0.181 + X₃/X_{3max} × 0.219 + X₄/X_{4max} × 0.302) × 100%。正交实验分析结果见表 5。方差分析结果见表 6。

表 5 正交实验结果与分析

实验号	因素			空	性状	水分/%	浸出物/%	阿魏酸/%	综合评分
	炒制温度(A) /℃	炒制时间(B) /min	炒锅转数(C) /r·min ⁻¹						
1	1(110)	1(20)	1(20)	1	1	12.8	61.3	0.100	72.09
2	1	2(25)	2(25)	2	2	10.8	60	0.097	70.90
3	1	3(30)	3(30)	3	4	8.5	61.2	0.101	75.21
4	2(130)	1	2	3	6	9.2	59.1	0.100	81.12
5	2	2	3	1	10	8.1	61.8	0.103	93.32
6	2	3	1	2	9	6.6	58.8	0.098	85.69
7	3(150)	1	3	2	5	8.8	61.9	0.088	75.05
8	3	2	1	3	3	5.0	60.7	0.095	65.34
9	3	3	2	1	3	4.8	60.6	0.090	63.59
K ₁	218.20	228.26	223.12	229.00					
K ₂	260.13	229.56	215.61	231.64					
K ₃	203.98	224.49	243.58	221.67					
R	18.72	1.69	9.32	3.32					

表 6 正交实验方差分析

方差来源(因素)	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	568.128	2	31.937	P < 0.05
B	4.623	2	0.260	
C	139.704	2	7.853	
空(误差)	17.789	2		

根据表 5 分析可知,因素 A(炒制温度)结果为: A₂ > A₁ > A₃; 因素 B(炒制时间)结果为 B₂ > B₁ > B₃; 炒锅转数为 C₃ > C₁ > C₂。根据表 6 方差分析可知,正交实验因素 A(炒制温度)有显著性差异,因素 B(炒制时间)和因素 C(炒锅转数)没有显著性差异,即炒制温度对结果影响最大,炒制时间和炒锅转数对实验结果影响不大。

综合上述,最佳工艺条件是 A₂B₂C₃,即将净当归片(直径 < 10 mm)每 100 g 加黄酒 10 g(兑水 10 g)拌匀,闷 3 h。净当归片(直径 > 10 mm)每 100 g

加黄酒 10 g(兑水 20 g)拌匀,闷 4 h,两档混合均匀,置于 130 ℃ 预热炒锅内,炒制 25 min,炒锅转数为 30 r·min⁻¹。

1.6 酒当归最佳炮制工艺确定

综上所述,温经汤中酒当归最佳工艺为:当归药材净制,抢水洗 2 次(用水量约为 3~4 倍药材量)。常温闷润,切厚片,自然晾干后,取 100 g 当归片(直径 < 10 mm)可选黄酒 10 g(兑水 10 g)量闷 3 h,100 g 当归片(直径 > 10 mm)可选黄酒 10 g(兑水 20 g)量闷 4 h。置 130 ℃ 预热炒锅内(转数 30 r·min⁻¹),炒制 25 min,即得。

1.7 工艺验证

取当归药材 3 批,其阿魏酸含量分别为 0.132%, 0.120%, 0.091%,按“1.6”炮制工艺进行洗、润、切制、干燥、酒炙等工序验证。炮制后酒当归饮片质量均符合要求,说明该工艺稳定可靠。结果见表 7 和图 1。

表 7 验证性实验结果

实验号	外观性状	水分/%	浸出物/%	阿魏酸/%	饮片得率/%
DG202002	形如当归片。切面深黄色或浅棕黄色,略有焦斑。	8.5	67.9	0.130	95.34
DG202003	香气浓郁,并略有酒香气	8.7	63.8	0.103	94.88
DG202004		8.3	53.8	0.085	93.25
均值		8.5	61.8	0.108	94.49
偏差 RSD/%		2.4	11.7	21.1	1.2



图1 当归传统饮片和第三批酒当归饮片图

2 酒当归饮片 HPLC 指纹图谱的建立

中药指纹图谱作为一种综合的、量化的技术手段,被广泛应用于中药材的质量控制中,可以从整体上评价中药材的质量,具有体现药材特异性和信息丰富性的作用。通过对酒当归饮片进行指纹图谱的研究,以达到对其内含物质群的整体进行控制的目的。本研究采用 HPLC 对 10 批酒当归饮片进行指纹图谱研究,并将当归传统饮片与酒当归饮片进行对比,以此证明本研究采用的炮制工艺稳定可行,同时也为酒当归饮片的质量控制及其开发利用提供参考依据。

2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液的制备 取酒当归饮片粉末 0.5 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,加入 70% 甲醇 25 mL,称定质量,超声提取 30 min (功率 240 W, 40 KHz),取出放冷,70% 甲醇补足损失的重量,过滤,取续滤液,0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得供试品溶液。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 精密称定对照品阿魏酸、绿原酸、藁本内酯、洋川芎内酯 I 适量,加入甲醇溶解,定容,制得浓度分别为 0.008 1, 0.023 9, 0.021 3, 0.008 4 mg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2 色谱条件

色谱柱: Techmate C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.2% 磷酸水(B); 梯度洗脱 (0~25 min, 5% → 30% A; 25~40 min, 30% → 50% A; 40~60 min, 50% → 80% A; 60~68 min, 80% → 5% A); 检测波长: 280 nm; 柱温: 30 ℃; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 进样体积: 10 μL。

2.3 指纹图谱方法学考察

2.3.1 精密度 取同一批酒当归饮片,按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件连续进样 6 次,以 5 号峰(阿魏酸)为参照峰,计算

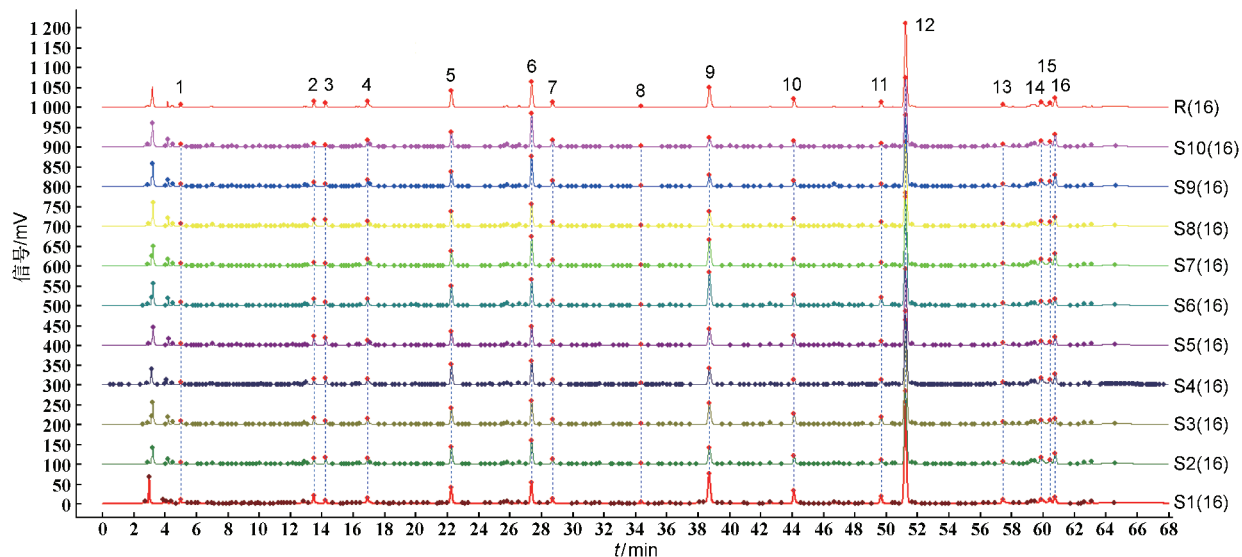
指纹图谱中各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示各特征峰的相对保留时间的 RSD < 1%,其峰面积比值的 RSD < 2%,表明该仪器的精密度良好,符合指纹图谱建立的要求。

2.3.2 重复性 取同一批酒当归饮片,按“2.1.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件进行分析,以 5 号峰(阿魏酸)为参照峰,计算指纹图谱中各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示各特征峰的相对保留时间的 RSD < 1%,其峰面积比值的 RSD < 2%,表明该方法的重复性良好,同样符合指纹图谱建立的要求。

2.3.3 稳定性 取同一批酒当归饮片,按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h,按“2.2”项下色谱条件进行分析,以 5 号峰(阿魏酸)为参照峰,计算指纹图谱中各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示各特征峰的相对保留时间的 RSD < 1%,其峰面积比值的 RSD < 2%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4 指纹图谱建立与共有峰的指认

将 10 批酒当归饮片按“2.1.1”项下方法制备成 10 份供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件进行分析,将 HPLC 检测数据转换为 AIA 格式文件,导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》,得到 10 批酒当归饮片的指纹图谱,参照图谱设置为 S1 样品图谱,采用中位数对照图谱生成方法,时间窗宽度设置为 0.1 min,进行多点校正,手动标识 Mark 峰,进行 Mark 峰匹配,确定了 16 个共有特征峰,其峰面积总和高于总峰面积的 65%。将酒当归饮片与混合对照品溶液的色谱图进行比较,确定了 4 个共有成分,分别是绿原酸(3 号峰)、阿魏酸(5 号峰)、洋川芎内酯 I(6 号峰)、藁本内酯(12 号峰),见图 2。混合对照品溶液、当归传统炮制饮片、酒当归饮片的指纹图谱分别见图 3、图 4 和图 5。



2:绿原酸;5:阿魏酸;6:洋川芎内酯 I;12:藜本内酯

图 2 10 批酒当归饮片 HPLC 指纹图谱

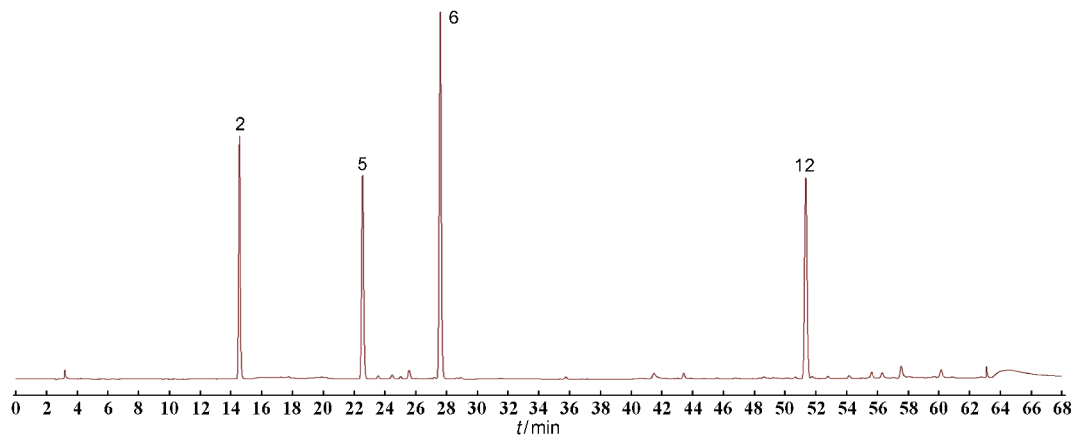


图 3 混合对照品溶液 HPLC 指纹图谱

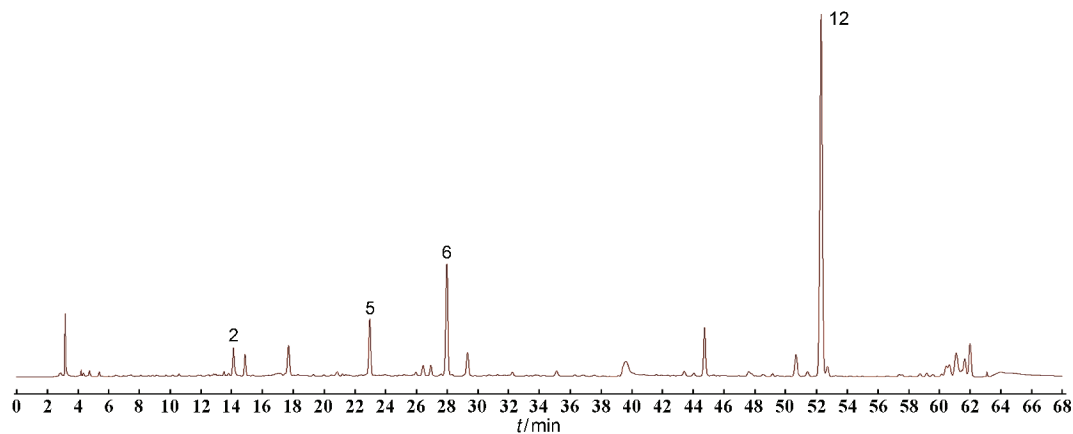


图 4 当归传统炮制饮片 HPLC 指纹图谱

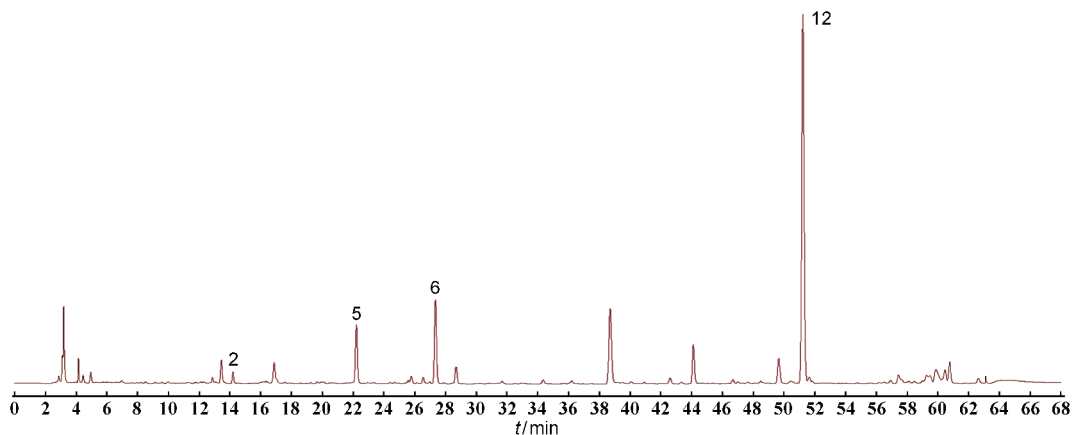


图5 酒当归饮片 HPLC 指纹图谱

2.5 指纹图谱相似度评价

将 10 批酒当归饮片的 HPLC 检测数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》进行相

似度计算,结果显示各指纹图谱的相似度均 > 0.95,见表 8。表明 10 批酒当归饮片具有良好的相似性,证明本研究中建立的酒当归饮片指纹图谱合理可靠。

表 8 10 批酒当归饮片指纹图谱相似度评价

样本编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照指纹图谱
S1	1.000	0.988	0.992	0.982	0.992	0.999	0.980	0.987	0.970	0.954	0.993
S2	0.988	1.000	0.990	0.997	0.996	0.989	0.987	0.995	0.993	0.986	0.999
S3	0.992	0.990	1.000	0.981	0.996	0.996	0.969	0.997	0.981	0.969	0.995
S4	0.982	0.997	0.981	1.000	0.990	0.981	0.984	0.988	0.988	0.981	0.993
S5	0.992	0.996	0.996	0.990	1.000	0.993	0.976	0.999	0.987	0.976	0.998
S6	0.999	0.989	0.996	0.981	0.993	1.000	0.980	0.991	0.974	0.959	0.994
S7	0.980	0.987	0.969	0.984	0.976	0.980	1.000	0.972	0.981	0.972	0.986
S8	0.987	0.995	0.997	0.988	0.999	0.991	0.972	1.000	0.990	0.981	0.997
S9	0.970	0.993	0.981	0.988	0.987	0.974	0.981	0.990	1.000	0.998	0.992
S10	0.954	0.986	0.969	0.981	0.976	0.959	0.972	0.981	0.998	1.000	0.982
对照指纹图谱	0.993	0.999	0.995	0.993	0.998	0.994	0.986	0.997	0.992	0.982	1.000

3 多成分含量测定

3.1 色谱条件

色谱柱、流动相、梯度洗脱时间程序、检测波长、柱温、流速、进样体积均同“2.2”项。

3.2 专属性实验

分别取“2.1”项下混合对照品溶液、供试品溶液(S1)及空白试剂(70% 甲醇),按“3.1”项下色谱条件进样测定,混合对照品色谱图见图 3,供试品色谱图见图 5。结果显示,在绿原酸、阿魏酸、洋川芎

内酯 I 和藁本内酯对照品相应位置上,供试品溶液中均有相同保留时间的色谱峰出现,且分离度良好,空白溶剂无干扰,表明该方法专属性良好。

3.3 线性关系考察

精密吸取“2.1”项下混合对照品溶液,用倍比稀释法配制成系列混合对照品溶液,按“3.1”项下色谱条件进样测定,记录各色谱峰面积,以进样量为横坐标(X),以峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,结果见表 9,表明各成分线性关系良好。

表9 线性关系考察结果

成分	回归方程	r	线性范围/ μg
绿原酸	$Y = 2\ 033\ 153.886\ 3X - 3\ 580.483\ 1$	0.999 6	0.062 2 ~ 1.930 1
阿魏酸	$Y = 6\ 024\ 683.428\ 4X - 1\ 358.198\ 5$	0.999 8	0.016 0 ~ 0.162 7
洋川芎内酯 I	$Y = 9\ 455\ 769.685\ 3X + 75\ 500.652\ 1$	0.999 3	0.022 5 ~ 0.477 5
藁本内酯	$Y = 2\ 713\ 486.826\ 9X + 2\ 723.076\ 6$	0.999 4	0.051 5 ~ 1.301 9

3.4 精密度实验

精密吸取“2.1”项下混合对照品溶液,按“3.1”项下色谱条件连续进样6次,记录各色谱峰面积。结果显示,绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I 和藁本内酯峰面积的 RSD 分别为 0.95%, 0.74%, 1.22%, 1.71%, 表明仪器精密度良好。

3.5 重复性实验

取同一批样品(S1),按“2.1”项下方法平行制备6份,按“3.1”项下色谱条件进样测定,记录各色谱峰面积,计算含量。结果显示,绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I 和藁本内酯的含量分别为 0.339, 0.410, 0.272, 4.025 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 1.83%, 1.31%, 1.29%, 1.44%, 表明该方法重复性良好。

3.6 稳定性实验

取同一批样品(S1),按“2.1”项下方法制备供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h, 按“3.1”项下色谱条件进样测定,记录各色谱峰面积。结果显示,绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I 和藁本内酯峰面积的 RSD 分别为 1.93%, 1.87%, 1.44%, 1.63%, 表明供试品溶液在 24 h 内具有较好的稳定性。

3.7 加样回收率

精密称取已知含量的供试品溶液(S1)6份,每份约 0.25 g, 分别加入与已知成分含量 1:1 比例的混合对照品溶液(“2.1”项下方法制得),按“2.1”项下方法制备供试品溶液,再按“3.1”项下色谱条件进样测定,记录各色谱峰的峰面积,计算加样回收率。结果显示,绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I 和藁本内酯的平均加样回收率分别为 96.87%, 99.41%, 99.79%, 97.33%, RSD 分别为 1.63%, 1.91%, 1.87%, 1.89%, 表明该方法准确度良好。

3.8 供试品含量测定

取 10 批酒当归饮片粉末,分别按“2.1”项下方法制备供试品溶液,然后按“3.1”项下色谱条件进样测定,记录各色谱峰的峰面积,计算含量,结果见表 10。

表10 10批酒当归中4种指标成分的含量

样品编号	测定结果			$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
	绿原酸	阿魏酸	洋川芎内酯 I	
S1	0.338 7	0.407 1	0.270 6	4.021 0
S2	0.318 4	0.355 8	0.270 0	3.998 2
S3	0.156 2	0.350 6	0.275 3	5.695 6
S4	0.152 7	0.318 6	0.262 7	5.890 2
S5	0.361 3	0.291 4	0.220 9	4.156 7
S6	0.172 5	0.403 0	0.297 7	6.120 6
S7	0.126 9	0.310 6	0.341 8	3.755 2
S8	0.309 8	0.313 7	0.258 8	4.611 8
S9	0.115 8	0.305 2	0.350 0	3.895 7
S10	0.101 1	0.296 7	0.385 4	3.744 8

讨 论

酒当归有补血活血、调经止痛、润肠通便的功效,用于血虚萎黄、眩晕心悸、月经不调、经闭痛经、虚寒腹痛、风湿痹痛、跌扑损伤、痈疽疮疡、肠燥便秘。酒当归辛温,取其散性,又增强活血散瘀之功^[26]。温经汤中当归虽不是以君药入药,但其活血止痛、养血调经之功效却不容小觑^[27-28],研究表明,当归酒制后可以增强其活血化瘀、通经活络以及引药上行等作用,因此温经汤中当归采用酒制入药。本研究酒当归在“遵古炮制”和保证疗效的前提下,主要分为两部分进行酒当归炮制工艺的研究:①为洗、润、切、干燥环节得到符合温经汤入药要求的当归片。②为酒炙工艺的研究,确定黄酒用量,把握“文火炒干”要点,利用正交实验结合熵权法,确定了酒当归饮片最佳炮制工艺的参数,工艺可靠可行。探索简单、可控、稳定的酒当归炮制工艺,是保证临床应用有效性的关键,也是经典名方温经汤后续开发最重要的基础和必不可少的环节之一,课题组计划在未来短期内将进行酒当归药效学评价,以证明温经汤中酒当归入药的合理性。

本研究对酒当归饮片指纹图谱的色谱条件进行

了考察,首先考察了流动相的选择,对比乙腈-磷酸水、乙腈-水、甲醇-磷酸水、甲醇-水作为流动相时的洗脱效果,同时对不同酸水浓度也进行了考察,确定采用乙腈-0.2%磷酸为流动相时各色谱峰分离度较高、峰形较好。通过采用安捷伦 1260 DAD 检测器对供试品溶液进行全波长扫描,检测到最大吸收波长为 280 nm。将酒当归饮片与混合对照品溶液色谱图进行比对和指认,确定其共有成分,10 批酒当归饮片指纹图谱相似度均 > 0.95,表明不同批次间的样品相似度良好,本研究所建立的指纹图谱可表征出酒当归饮片的整体关键化学信息。

[参 考 文 献]

- [1] 辛智科. 陈自明和《妇人大全良方》[J]. 陕西中医, 1983, 4(2): 45-46.
- [2] 国家中医药管理局. 古代经典名方目录[S]. 2018.
- [3] 国家中医药管理局. 古代经典名方关键信息考证原则[S]. 2020.
- [4] 陈自明. 妇人大全良方[M]. 田代华, 宋咏梅, 何永, 点校. 天津: 天津科学技术出版社, 2003.
- [5] 龚庆宣. 刘涓子鬼遗方[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986; 11.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [7] 张景珍, 王新杰, 高慧, 等. 正交设计结合体外抗凝血实验优选酒当归炮制工艺[J]. 中南药学, 2020, 18(5): 765-769.
- [8] 陈方. 当归及酒当归质量标准提升研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2019.
- [9] 张静, 杨平荣, 王燕萍, 等. 当归产地加工与饮片炮制一体化工艺研究[J]. 兰州大学学报(医学版), 2019, 45(3): 13-20.
- [10] 叶喜德, 李旭冉, 念凤鸿, 等. 不同炮制方法对当归中阿魏酸含量的影响[J]. 今日药学, 2018, 28(1): 28-30, 38.
- [11] 兰道人. 仙授理伤续断秘方[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1957.
- [12] 陈言. 三因极一病证方论: 十八卷[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1957.
- [13] 洪遵. 洪氏集验方[M]. 北京: 商务印书馆铅印, 1956.
- [14] 孙思邈. 千金翼方[M]. 鲁兆麟, 点校. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1997; 139.
- [15] 王怀隐. 太平圣惠方[M]. 北京: 人民卫生出版社铅印, 1958.
- [16] 王颉. 全生指迷方[M]. 北京: 商务印书馆铅印, 1956.
- [17] 苏轼, 沈括. 苏沈良方[M]. 北京: 人民卫生出版社影印, 1956.
- [18] 张小会, 李彦玲, 刘艳, 等. 经典名方温经汤的处方考证和临床应用研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(23): 44-55.
- [19] 王好古. 汤液本草[M]. 竹剑平, 主校. 北京: 中国中医药出版社, 2018.
- [20] 于永铎, 于永敏, 尹玲慧. 药性会元[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2018; 78.
- [21] 贾所学. 药品化义[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2015; 76.
- [22] 王翊. 握灵本草[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012; 231.
- [23] YANG CC, HAN Y, ZHANG AR, et al. Effect of Huangqi, Danggui and ligustrazine as medicines activating blood and eliminating stasis on the expression of plasminogen activator inhibitor 1 in HepG2 hepatocarcinoma cell strain[J]. Chin J Clin Rehabilitation, 2005, 9: 210-212.
- [24] COCO A. Primary dysmenorrhea[J]. Am Fam Physician, 1999, 60(2): 489-496.
- [25] 孙玉阳, 纪宏宇, 陈博, 等. 原发性痛经的发病机制及中医药治疗的研究进展[J]. 中国药师, 2017, 20(1): 144-147.
- [26] 钟立甲. 基于代谢组学的生当归、当归炭、酒当归活血化瘀作用机制研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2016.
- [27] 郝莉雨, 李宗源, 孙建辉, 等. 当归水提取物补血、调节肠道菌群作用研究[J]. 世界中医药, 2022, 17(7): 900-905, 911.
- [28] 马霞, 丁军霞, 袁菊丽, 等. 当归茎叶与根对小鼠溶血性贫血模型的影响[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(3): 297-302.

编辑:刘卓越/接受日期:2022-08-01