

经典名方泻白散物质基准 HPLC 指纹图谱的建立及 3 种指标成分含量测定

王彦帅¹, 丁浩强¹, 郑鑫杰¹, 李 想¹, 张静泽^{1,2*}, 王 苹¹, 刘岱琳^{1,2*}

1. 天津现代创新中药科技有限公司, 天津 300384

2. 武警后勤学院 军事药学教研室, 天津 300309

摘要: 目的 建立经典名方泻白散物质基准 HPLC 指纹图谱以及 3 种指标成分桑皮苷 A、甘草苷、甘草酸含量测定方法。方法 指纹图谱色谱条件: 检测波长 254 nm/325 nm, 柱温 35 ℃; 体积流量 0.8 mL/min; 进样量 25 μL; 流动相为 0.1% 甲酸水溶液-乙腈, 二元梯度洗脱: 0~20 min, 5%~10% 乙腈; 20~33 min, 10%~15% 乙腈; 33~50 min, 15%~20% 乙腈; 50~95 min, 20%~58% 乙腈。采集 10 批次泻白散物质基准指纹图谱, 采用中国药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012 版”软件对其进行评价。含量测定色谱条件: 检测波长 237 nm, 柱温 30 ℃; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 5 μL; 流动相为 0.1% 磷酸水溶液-乙腈, 二元梯度洗脱: 0~10 min, 5%~20% 乙腈; 10~18 min, 20%~60% 乙腈; 18~26 min, 60%~100% 乙腈; 26~38 min, 100% 乙腈; 38~41 min, 100%~5% 乙腈; 41~45 min, 5% 乙腈。结果 根据匹配结果, 在 254 nm 波长下确定了 55 个共有峰, 在 325 nm 波长下确定了 57 个共有峰。在共有峰中共指认桑皮苷 A (S)、甘草苷、甘草酸 3 种物质。经过方法学研究, 其精密度、稳定性、重现性良好。对 10 批次泻白散物质基准指纹图谱进行评价, 结果与对照指纹图谱之间相似度均大于 0.9。桑皮苷 A、甘草苷、甘草酸含量测定方法的平均加样回收率分别为 97.82%、97.40%、105.81%, RSD 分别为 4.41%、2.51%、1.19%, 均满足《中国药典》2015 年版要求, 3 种成分分别在 25.25~2525、25~2 500、8.5~850 ng 线性关系良好, 精密度、稳定性、重复性良好。对 10 批次泻白散物质基准进行含量测定, 其中桑皮苷 A 质量分数为 11.6~35.5 mg/g, 甘草苷质量分数为 0.1~1.6 mg/g, 甘草酸质量分数为 0.3~2.5 mg/g, 3 种成分含量差异较大, 说明不同产地的桑白皮、甘草药材质量差异较大。结论 建立经典名方泻白散物质基准 HPLC 指纹图谱及多指标成分含量测定的方法, 为泻白散物质基准质量标准研究提供依据。

关键词: 经典名方; 泻白散; 物质基准; HPLC; 指纹图谱; 质量标准; 桑皮苷 A; 甘草苷; 甘草酸

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)11-2946-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.11.013

Establishment of HPLC fingerprint and determination method of three index components of classical herbal formula substance benchmarks of Xiebai Powder

WANG Yan-shuai¹, DING Hao-qiang¹, ZHENG Xin-jie¹, LI Xiang¹, ZHANG Jing-ze^{1,2}, WANG Ping¹, LIU Dai-lin^{1,2}

1. Tianjin Modern Innovation Chinese Medicine Technology Co., Ltd., Tianjin 300380, China

2. Department of Military Pharmacy, Logistics University of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300309, China

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint and the determination method of three index components of the classical herbal formula substance benchmarks of Xiebai Powder. **Methods** Fingerprint chromatographic conditions were as following: detection wavelength 254 nm/325 nm, column temperature 35 ℃; flow rate 0.8 mL/min; injection volume 25 μL; mobile phase consisting of 0.1% aqueous formic acid (A) and acetonitrile (B); binary gradient elution: 0—20 min, 5%—10% B; 20—33 min, 10%—15% B; 33—50 min, 15%—20% B; 50—95 min, 20%—58% B. Ten batches of substance benchmarks of Xiebai Powder fingerprints were collected and evaluated by the Chinese Pharmacopoeia Committee “Chinese Medicine Chromatographic Fingerprint

收稿日期: 2019-12-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81673693); 天津市科技重大专项与工程 (18ZXXYSY00090); 武警后勤学院创新团队项目 (WHTD201904)

作者简介: 王彦帅 (1991—), 男, 山西大同人, 初级工程师, 硕士研究生, 从事中药质量标准研究。

Tel: 15222496990 E-mail: 18260620759@163.com

*通信作者 张静泽 (1977—), 女, 天津人, 博士, 副教授, 主要从事中药作用物质基础研究工作。E-mail: zhangjingze1977@163.com

刘岱琳 (1973—), 女, 吉林长春人, 博士, 教授, 主要从事中药活性成分研究。E-mail: dailinlch1977@163.com

Similarity Evaluation System 2012 Edition” software. Chromatographic conditions of content determination: detection wavelength 237 nm, column temperature 30 °C; flow rate 1.0 mL/min; injection volume 5 µL; mobile phase consisting of 0.1% aqueous phosphoric acid (A) and acetonitrile (B) for binary gradient elution: 0—10 min, 5%—20% B; 10—18 min, 20%—60% B; 18—26 min, 60%—100% B; 26—38 min, 100% B; 38—41 min, 100%—5% B; 41—45 min, 5% B. **Results** Based on the matching results, 55 common peaks were determined at a wavelength of 254 nm, and 57 common peaks were determined at a wavelength of 325 nm. Three substances, mulberroside A (S), liquiritin and ammonium glycyrrhizinate, were identified in the common peaks. After methodological research, its precision, stability and reproducibility were good. Ten batches of substance benchmarks of Xiebai Powder fingerprints were evaluated with reference fingerprints, and their similarities were greater than 0.9. The average recovery rates of mulberroside A (S), liquiritin and ammonium glycyrrhizinate were 97.82%, 97.40% and 105.81%, respectively. The RSD ($n = 6$) was 4.41%, 2.51% and 1.19%, respectively, which met the require of 2015 edition of the Chinese Pharmacopoeia. The three components had good linearity in the range of 25.25—2525 ng, 25—2 500 ng and 8.5—850 ng, respectively. The method had good precision, stability and repeatability. The contents of 10 batches of substance benchmarks of Xiebai was determined. The content of mulberry A was 11.6—35.5 mg/g, the content of liquiritin was 0.1—1.6 mg/g, and the content of glycyrrhizic acid was 0.3—2.5 mg/g. The range of the contents of these ingredients was large, which indicated that the quality of mulberry husks and licorice herbs from different places was quite different. **Conclusion** The establishment of the HPLC fingerprint and the determination method of three index components of the classical herbal formula substance benchmarks of Xiebai Powder provided some bases for the study of the quality standard of substance benchmarks of Xiebai Powder.

Key words: classical herbal formulae; Xiebai Powder; substance benchmarks; HPLC; fingerprint; quality standard; mulberroside A; liquiritin; glycyrrhizic acid

泻白散为沿用至今的具有明确疗效的经典名方之一，处方来源于宋代钱乙《小儿药证直诀》卷下诸方，原文记载：“又名泻肺散。治小儿肺盛，气急喘嗽”。处方由炒桑白皮、焙地骨皮、炙甘草、粳米 4 味药组成^[1]。方中桑白皮甘寒性降，专入肺经，清泻肺热、止咳平喘，为君药；地骨皮甘寒，清降肺中伏火，为臣药；粳米，炙甘草养胃和中，为佐使药。现代临床中，泻白散原方在临床直接应用较少，主要用于治疗呼吸系统疾病^[2]，但泻白散加减方临床应用报道较多，主要用于治疗小儿肺热咳嗽^[3-5]，除此之外也有报道其可用于治疗皮肤病、鼻病、小儿顽固性厌食症、肺癌等疾病^[6]。

泻白散药理研究报道较少，研究机制大多集中在抗炎方面。王琳琳等^[7]采用整合药理学平台研究该方治疗小儿肺炎的分子机制，研究发现该方对小儿肺炎的干预作用可能与多种化合物相关，涉及过氧化物酶体增殖物激活受体（PPAR）信号通路、能量代谢、炎症介质对瞬时受体电位（TRP）通道的调节等多条相关通路。处方中桑白皮为君药，发挥镇咳平喘作用^[8-10]，国内学者对于桑白皮药理研究较多。在桑白皮药效成分研究方面，林立等^[11]通过泻白散 HPLC 谱效关系筛选发现，桑白皮中有 2 个峰显示与祛痰作用和抗炎作用呈正相关，初步推断为二苯乙烯苷类成分。同样也有研究表明，桑皮苷 A 是桑白皮中一种主要的二苯乙烯苷类活性成分，

具有较强的镇咳作用和一定程度的平喘作用^[12]，与泻白散主治功能相吻合。除此之外，桑白皮中总黄酮类物质同样具有镇咳平喘的药理作用，可以拮抗乙酰胆碱对支气管的收缩作用，可延长组胺、乙酰胆碱引喘潜伏期和卵蛋白性哮喘潜伏期，嗜酸性粒细胞（EOS）的浸润，同时对支气管痉挛显示出解痉作用^[13-16]。因此将桑皮苷 A 与总黄酮作为泻白散关键质量属性。

物质基准一词最早是在国家药品监督管理局颁布的《古代经典名方中药复方制剂简化注册审批管理规定》中提出，是衡量制剂与中医临床所使用的药用物质是否一致的标准^[17]，为制剂的“标准对照物质”，在经典名方制剂研发过程中起到至关重要的作用。泻白散物质基准在遵古提取工艺基础上，由其煎煮液经冷冻干燥制备而得。由于中药材成分的复杂性及药材的不均匀性，使得物质基准质量控制变得十分困难，指纹图谱结合多指标成分含量测定是一种重要的质控手段，两者结合，既能反映处方整体基础物质情况，又能反映处方质量情况^[18-22]。目前针对泻白散处方及其物质基准质量标准的研究甚少，没有法规标准，而且《中国药典》2015 年版针对泻白散君药桑白皮质量标准只有性状、鉴别描述^[23]，因此本研究旨在开发泻白散物质基准 HPLC 指纹图谱及 3 种指标成分含量测定的检测方法，以期泻白散质量研究提供数据参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Ultimate 3000 型高效液相色谱仪, 配有 DAD 检测器、四元梯度泵、温度控制型自动进样器、Chromeleon 7 色谱工作站, 色谱柱 Synchronis C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 赛默飞世尔科技有限公司; SQP 分析天平, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司; CASCADA III-L-2 超纯水仪, 美国颇尔公司; AS20500BT 超声波清洗仪, 天津奥特赛恩斯仪器有限公司; CHB902 滚筒炒药机, 南京海善制药机械有限公司; 美味世家系列电子煎药锅, 永达基电器厂。

1.2 试剂

对照品桑皮苷 A (批号 3224, 质量分数 98%), 购自上海诗丹德标准技术服务有限公司; 对照品甘草苷 (批号 111610-201607, 质量分数 93.1%)、甘

草酸铵 (批号 110731-201720, 质量分数 97.7%), 购自中国食品药品检定研究院; 乙腈, 批号 JA080230, 德国默克集团; 甲醇, 批号 2019MG001, 康科德科技有限公司; 甲酸, 批号 2019-1-2, 上海市试剂一厂; 磷酸, 批号 20180606, 天津市华东试剂厂; 各试剂均为色谱纯。超纯水由纯水仪制得。

炙甘草辅料蜂蜜购自上海冠生园峰制品有限公司 (批号 20181218); 处方药材桑白皮、地骨皮、甘草、粳米购自主产区或道地产区, 由中国医学科学院药用植物研究所郭宝林研究员鉴定分别为桑科桑属植物桑 *Morus alba* L. 的干燥根皮、茄科枸杞属植物枸杞 *Lycium chinense* Mill. 的干燥根皮、豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎、禾本科植物稻的亚种粳稻 *Oryza sativa* L. subsp. *japonica* S. Kato 去壳的种仁。泻白散物质基准 10 批次, 批号及所用药材产地信息见表 1。

表 1 10 批次泻白散物质基准药材产地信息

Table 1 Origin information of 10 batches of substance benchmarks of Xiebai Powder

物质基准批号	产地			
	桑白皮	地骨皮	甘草	粳米
S1	重庆市垫江县	山西省闻喜县	甘肃省民勤县	吉林省榆树县
S2	四川省金堂县	山西省闻喜县	内蒙古杭锦旗	吉林省榆树县
S3	重庆市垫江县	山西省闻喜县	甘肃省民勤县	吉林省榆树县
S4	广西省横县	山西省闻喜县	内蒙古杭锦旗	江苏省南通市
S5	重庆市垫江县	山西省闻喜县	甘肃省民勤县	吉林省榆树县
S6	重庆市垫江县	山西省闻喜县	甘肃省民勤县	山东省东营市
S7	广西省横县	陕西省澄城县	甘肃省榆中县	吉林省榆树县
S8	广西省横县	山西省闻喜县	甘肃省民勤县	天津市黄庄洼
S9	重庆市垫江县	山西省闻喜县	甘肃省民勤县	江苏省南通市
S10	重庆市垫江县	河南省尉氏县	内蒙古杭锦旗	山东省东营市

2 方法与结果

2.1 炮制方法

泻白散处方涉及的炮制药材有炒桑白皮、焙地骨皮、炙甘草、粳米。依据相关法规及实验研究, 确定各饮片炮制工艺。

2.1.1 炒桑白皮 《古代经典名方目录》泻白散方中对桑白皮描述为“细锉炒黄”, 但在传统中药炮制做法中, 通常先进行炮制再粉碎药材^[24], 同时参考《浙江省中药炮制规范》2015 年版桑白皮项下炮制描述, 最终确定炒桑白皮工艺为取桑白皮饮片, 照清炒法炒至表面微黄色, 微具焦斑时, 取出摊凉。

2.1.2 焙地骨皮 《古代经典名方目录》泻白散方

中对地骨皮描述为“洗去土, 焙”, 理解为产地加工工艺的步骤之一, 确定地骨皮炮制工艺为取鲜地骨皮, 洗去内外表面泥土及杂质, 文火焙干至体轻脆质, 易折断, 摊凉。

2.1.3 炙甘草 泻白散处方中甘草选用乌拉尔甘草^[25]进行“蜜制”^[26], 参考《中国药典》2015 年版炙甘草项下描述, 最终确定炙甘草炮制工艺为取甘草片, 照蜜炙法 (药典通则 0213) 炒至黄色至深黄色, 不黏手时取出, 晾凉。

2.1.4 粳米 参考《天津市中药饮片炮制规范》2018 年版进行粳米的炮制, 即取原药材, 去除杂质, 筛去灰屑。

2.2 煎煮方法

泻白散原文中描述为“地骨皮(洗去土,焙)、桑白皮炒各一两、炙草一钱。上锉散,入粳米一撮,水二小盏,煎七分,食前服”。经文献考证,宋代一两折合现代41.3 g,宋代一钱折合现代4.13 g^[27],但考察《小儿药证直诀》和宋代官修的《太平惠民合剂局方》书中各方剂的用法用量大多以“每服几钱”的形式用于临床应用。明万历二年甲戌(1502)太医院《小儿药证直诀》校刻本和清代汪昂《本草备要》都对泻白散有“每服二钱”的注释。故经典名方泻白散中炒桑白皮、焙地骨皮、炙甘草用量为“取二钱”用量。

原方中“一撮”约为“四刀圭”,一刀圭约为0.5 mL^[28],即“一撮”约为2 mL粳米,通过考证和实物测量,“一撮”粳米用量约为1.50 g。宋代“一小盏”约为180 mL^[29]。

综上,确定经典名方泻白散物质基准制备工艺为取炒桑白皮3.93 g,焙地骨皮3.93 g,炙甘草0.39 g,将上述饮片破碎至粗颗粒,即过1号筛,加粳米1.50 g,加水360 mL,传统煎药锅提取至药液剩余约252 mL,趁热滤过,收集滤液后经冻干制得。

2.3 色谱条件

2.3.1 指纹图谱色谱条件 检测波长254 nm/325 nm,柱温35℃;体积流量0.8 mL/min;进样量25 μL;流动相为0.1%甲酸水溶液-乙腈,二元梯度洗脱:0~20 min,5%~10%乙腈;20~33 min,10%~15%乙腈;33~50 min,15%~20%乙腈;50~95 min,20%~58%乙腈。

2.3.2 含量测定色谱条件 检测波长237 nm,柱温30℃;体积流量1.0 mL/min;进样量5 μL;流动相为0.1%磷酸水溶液-乙腈,二元梯度洗脱:0~10 min,5%~20%乙腈;10~18 min,20%~60%乙腈;18~26 min,60%~100%乙腈;26~38 min,100%乙腈;38~41 min,100%~5%乙腈;41~45 min,5%乙腈。理论塔板数按照桑皮苷A计算应不低于2 000。

2.4 对照品溶液制备

2.4.1 指纹图谱对照品溶液制备 取桑皮苷A、甘草苷、甘草酸铵对照品适量,精密称定,加流动相溶液分别制成含桑皮苷A 222.1 μg/mL、甘草苷186.2 μg/mL、甘草酸铵130.3 μg/mL的对照品溶液,即得。

2.4.2 含量测定对照品溶液制备 取桑皮苷A、甘草苷、甘草酸铵对照品适量,精密称定,加流动相

制成含桑皮苷A 197.6 μg/mL、甘草苷53.6 μg/mL、甘草酸铵52.0 μg/mL的混合对照品溶液,即得。

2.5 供试品溶液制备

2.5.1 指纹图谱供试品溶液制备 取泻白散物质基准约0.25 g(过3号筛),精密称定,置具塞锥形瓶中,加水25 mL,密塞,称定质量,浸泡30 min,加热回流,保持微沸30 min,放冷至室温,再称定质量,用水补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得指纹图谱供试品溶液。

2.5.2 含量测定供试品溶液制备 取泻白散物质基准约0.25 g(过3号筛),精密称定,置具塞锥形瓶中,加入70%甲醇25 mL,密塞,称定质量,超声处理30 min,放冷,再称定质量,用70%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得含量测定供试品溶液。

2.6 指纹图谱方法学考察

2.6.1 精密度 精密吸取S1批泻白散物质基准指纹图谱供试品溶液,按“2.3”项中指纹图谱色谱条件,连续进样6次,记录谱图。以桑皮苷A为参照峰,各特征共有峰相对保留时间的RSD均小于1%,相对峰面积的RSD均小于5%,表明所用仪器精密度良好。

2.6.2 稳定性 取S1批泻白散指纹图谱供试品溶液,按“2.3”项中指纹图谱色谱条件,分别在0、3、6、9、12、15、18、21、24 h测定HPLC色谱图,以桑皮苷A为参照峰。结果显示,各特征共有峰相对保留时间的RSD均小于1%,相对峰面积的RSD均小于5%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.6.3 重复性 取S1批次泻白散物质基准,按照“2.5”项中指纹图谱供试品溶液制备方法制备供试品溶液6份,按“2.3”项中指纹图谱色谱条件依次进样,记录色谱图,各特征共有峰相对保留时间的RSD均小于2%,相对峰面积的RSD均小于5%,表明本方法重复性良好,符合指纹图谱的技术要求。

2.7 泻白散物质基准指纹图谱建立与相似度评价

2.7.1 共有峰识别及3个指标成分指认 取上述10批次泻白散物质基准,按照“2.5.1”项指纹图谱供试品溶液制备方法制备供试品溶液,按照“2.3.1”项中指纹图谱色谱条件进行测定,记录色谱图见图1。采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)”对测定结果进行评价,根据匹配结果,在254 nm波长下确定了55个共有峰,在325 nm波长下确定了57个共有峰。在共有峰中

共指认桑皮苷 A (S)、甘草苷、甘草酸铵 3 种物质，见图 2。

2.7.2 对照指纹图谱建立 采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”对

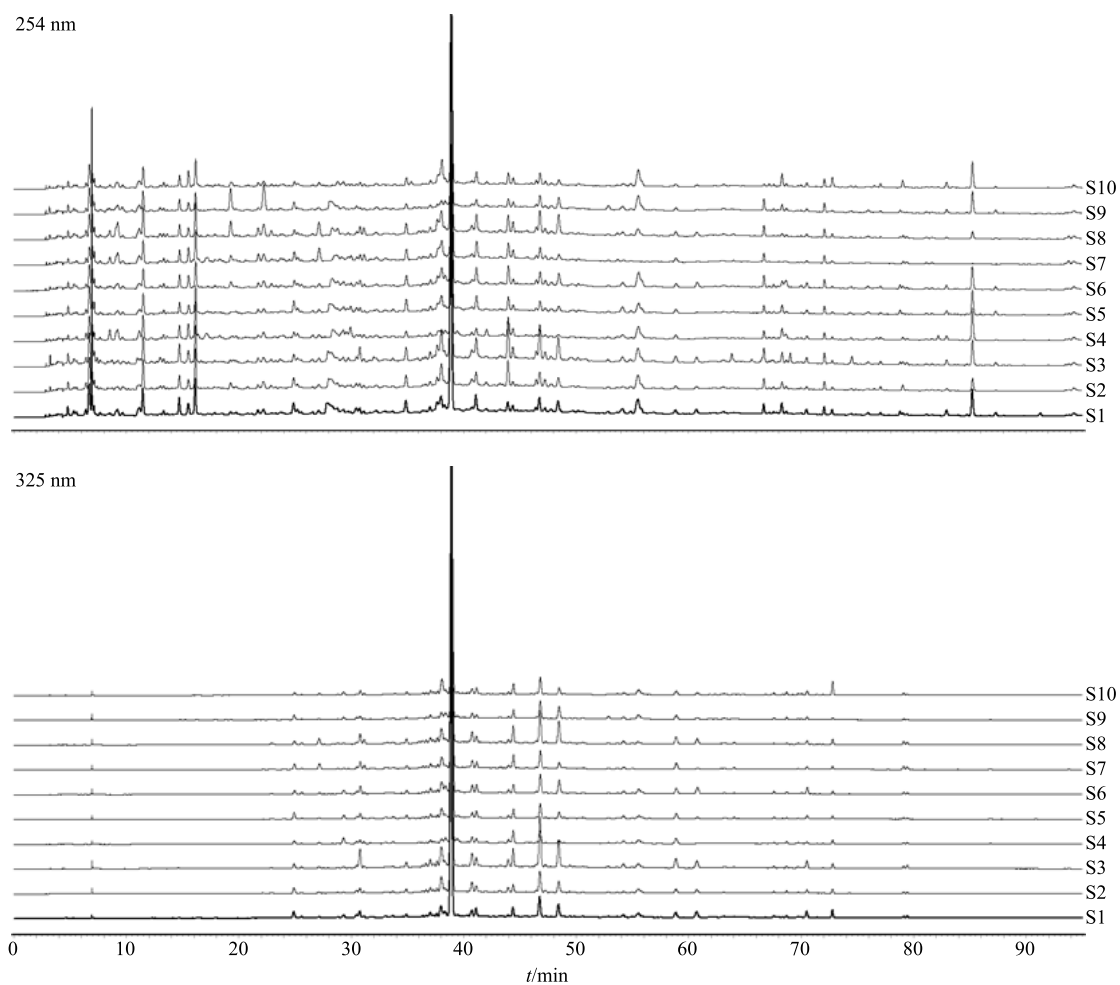


图 1 10 批次泻白散物质基准 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of 10 batches of substance benchmarks of Xiebai Powder

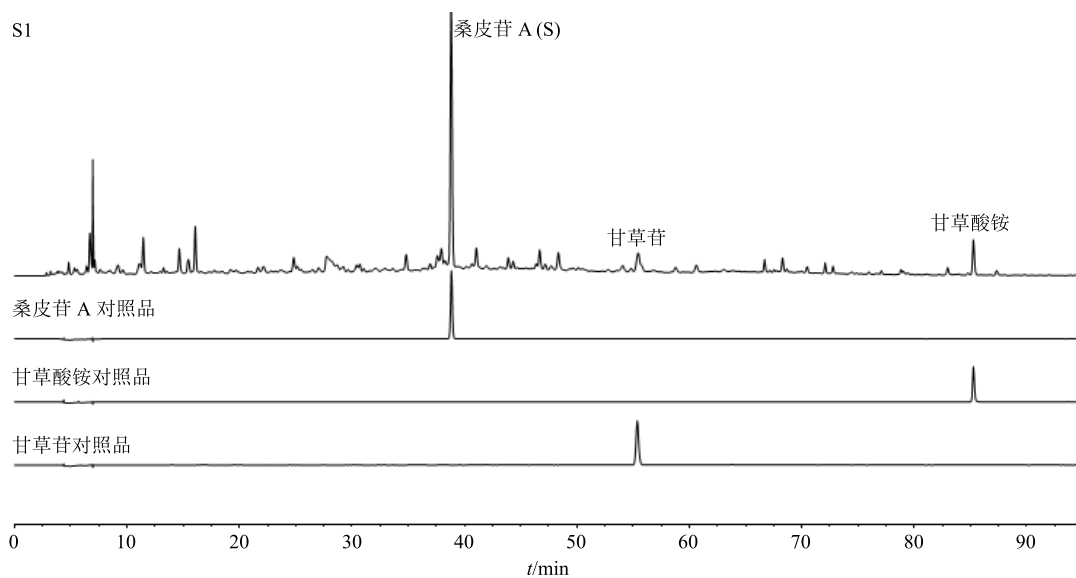


图 2 泻白散物质基准指纹图谱峰指认结果

Fig. 2 Fingerprint peak identification results of substance benchmarks of Xiebai Powder

10 批次泻白散物质基准指纹图谱测定结果进行评价, 选取 S1 作为参照图谱, 选择平均数生成方法,

时间窗宽度设为 0.1, 进行多点校正及全谱匹配, 生成对照指纹图谱见图 3。

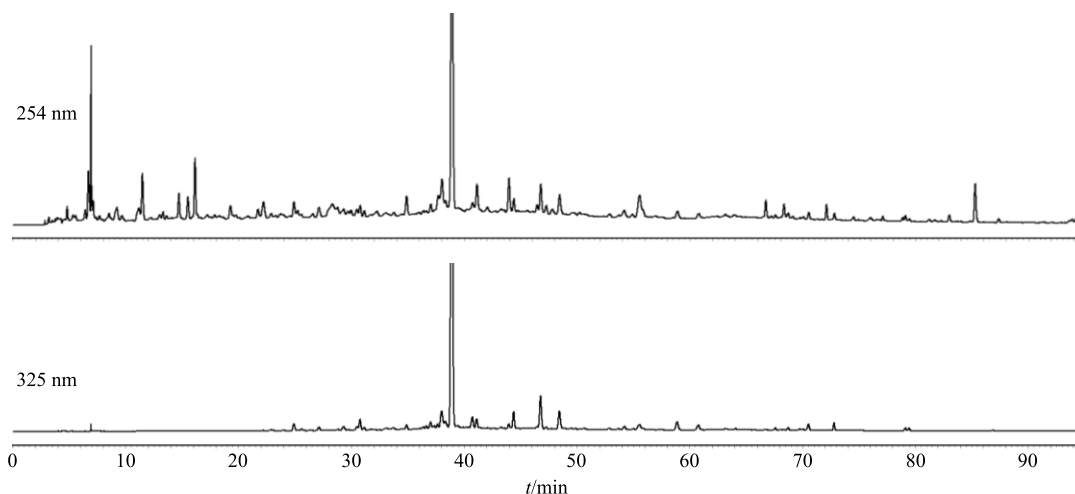


图 3 泻白散物质基准 HPLC 对照指纹图谱

Fig. 3 HPLC control fingerprint of substance benchmarks of Xiebai Powder

2.7.3 泻白散物质基准指纹图谱相似度评价 采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)”对 10 批次泻白散物质基准指纹图谱与对照图谱之间进行相似度比较, 结果分别为 0.982、0.993、0.992、0.978、0.979、0.988、0.984、0.992、0.963、0.991 (254 nm) 与 0.999、0.999、0.999、0.998、0.999、1.000、0.999、0.999、0.997、0.999 (325 nm), 由此可见, 10 批次样品指纹图谱与对照图谱之间有很高的相似度。

2.8 含量测定方法学考察

2.8.1 加样回收率考察 取泻白散物质基准 S1, 按照“2.5.2”项含量测定供试品溶液制备方法制备供试品溶液 6 份, 每组分别精密加入含桑皮苷 A 306 $\mu\text{g/mL}$ 、甘草苷 43 $\mu\text{g/mL}$ 、甘草酸铵 23 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液 25 mL。按“2.3.2”项中含量测定色谱条件测定, 记录色谱图, 计算桑皮苷 A、甘草苷、甘草酸铵的平均加样回收率分别为 97.82%、97.40%、105.81%, RSD 分别为 4.41%、2.51%、1.19%, 均满足《中国药典》2015 年版要求。

2.8.2 精密度考察 取泻白散物质基准 S1, 按照“2.5.2”项中含量测定供试品溶液制备方法制备供试品溶液, 按“2.3.2”项中含量测定色谱条件测定, 连续进样 6 针, 记录色谱图, 计算各组分峰面积 RSD, 结果桑皮苷 A、甘草苷、甘草酸铵的峰面积 RSD 分别为 1.03%、2.01%、0.75%, 说明仪器精密度良好。

2.8.3 重复性考察 取泻白散物质基准 S1, 按照“2.5.2”项中含量测定供试品溶液制备方法制备供试

品溶液 6 份, 按“2.3.2”项中含量测定色谱条件测定, 记录色谱图, 计算各组分峰面积 RSD, 结果桑皮苷 A、甘草苷、甘草酸铵质量分数的 RSD 分别为 0.17%、1.01%、2.79%, 表明该仪器方法及分析条件重复性良好。

2.8.4 专属性考察 取泻白散物质基准 S1, 按照“2.5.2”项中含量测定供试品溶液制备方法制备供试品溶液, 与空白溶液, 混合对照品溶液一起, 按照“2.3.2”项中含量测定色谱条件测定。结果见图 4, 供试品溶液在与对照品溶液峰相同的位置出峰, 空白溶液无色谱峰出现, 表明分析方法专属性良好。

2.8.5 线性关系考察 取“2.4.2”项中含量测定混合对照品溶液适量, 逐级稀释成质量浓度分别为母液 100%、75%、50%、25%、10%、1% 的混合对照品溶液, 按照“2.3.2”项中含量测定色谱条件测定, 记录不同质量浓度 (X) 对照品的色谱峰面积 (Y),

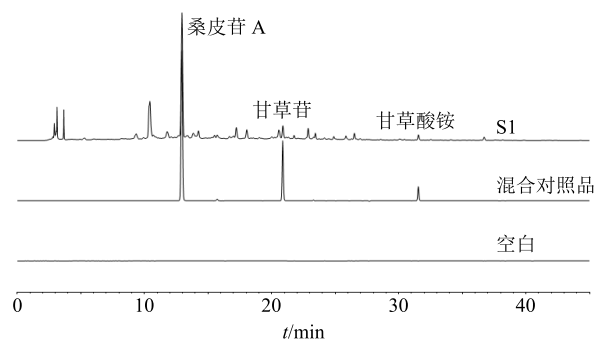


图 4 含量测定专属性实验图谱

Fig. 4 Specific experimental chromatograms of content determination

拟合得到线性回归方程为桑皮苷 A $Y=158.29 X+0.331 3$ ($r^2=0.999 7$)、甘草苷 $Y=161.13 X+0.563 7$ ($r^2=0.999 4$)、甘草酸铵 $Y=48.37 X+0.084 4$ ($r^2=0.998 9$)，分析结果表明，桑皮苷 A、甘草苷、甘草酸铵分别在 25.25~2 525.00、25~2 500、8.5~850.0 ng 的范围内线性关系良好。

2.8.6 稳定性考察 取泻白散物质基准 S1，按照“2.5.2”项中含量测定供试品溶液制备方法制备供试品溶液 1 份，按照“2.3.2”项中含量测定色谱条件，分别在 0、3、6、9、12、15、18、21、24 h 进行测定，分析桑皮苷 A、甘草苷、甘草酸铵峰面积，RSD 分别为 1.64%、0.60%、1.54%，结果表明供试品溶液稳定性良好。

2.9 10 批次物质基准含量测定

取上述 10 批次泻白散物质基准，按照“2.5.2”项中含量测定供试品溶液制备方法制备供试品溶液，按照“2.3.2”项中含量测定色谱条件进行进样分析，记录色谱峰，分别代入回归方程，计算 10 批次样品中桑皮苷 A、甘草苷、甘草酸（质量分数=甘草酸铵/1.0207）含量，结果见表 2。

表 2 10 批次泻白散物质基准含量测定结果

Table 2 Determination of 10 batches of substance benchmarks of Xiebai Powder

物质基准批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)		
	桑皮苷 A	甘草苷	甘草酸
S1	16.5	1.4	2.2
S2	31.5	1.3	1.1
S3	35.5	1.2	1.9
S4	15.9	1.2	2.5
S5	11.6	0.7	2.0
S6	19.6	1.3	1.8
S7	18.4	0.1	0.3
S8	24.9	0.8	0.9
S9	12.1	1.4	1.8
S10	16.9	1.6	2.0

3 讨论

3.1 波长选择

实验中为呈现最多的化合物信息并突出药效成分桑皮苷 A 及黄酮类化合物，选择不同检测波长的 HPLC 色谱图作为泻白散指纹图谱。黄酮类物质由于具有 2-苯基色元酮的基本结构，具有特定的紫外吸收峰，常有 2 个较强的吸收带，I 带在 300~400 nm，它是由于 B 环桂皮酰基引起的，II 带在 240~

285 nm，它是由于 A 环上的苯甲酰基引起的。桑皮苷 A 最大吸收波长在 325 nm 左右，此波长下黄酮类物质也具有较强吸收，因此拟选用 325 nm 作为泻白散指纹图谱的波长之一。采用 DAD 检测器对泻白散冻干粉供试品进行全波长扫描（190~800 nm），分析发现，在 254 nm 波长条件下，物质基准指纹图谱出现的峰数量最多，故选择 254 nm 为指纹图谱检测波长之一。

在含量测定波长选择过程中，采用 DAD 检测器对桑皮苷 A、甘草苷、甘草酸铵对照品进行全波长扫描（190~800 nm），结果发现在 237 nm 下桑皮苷 A、甘草苷、甘草酸铵均有较高的响应值，因此将 237 nm 作为含量测定波长。

3.2 色谱条件优化及供试品制备方法选择

在指纹图谱方法开发时，研究对比了甲醇、乙腈作为有机相与甲酸水溶液、乙酸水溶液、磷酸水溶液作为水相之间的组合，分析结果，最终确定乙腈与 0.1%甲酸水溶液作为流动相，并对洗脱梯度进行优化。

经典名方煎煮工艺大部分为水煎，提取的药效成分多为水溶性成分，基于此，采用加水回流提取法来制备指纹图谱供试品溶液，使其能最大程度的反映处方物质基础。在多成分含量测定方法开发时，研究对比了甲醇、乙腈作为有机相与甲酸水溶液、乙酸水溶液、磷酸水溶液作为水相之间的组合，分析结果，最终确定乙腈与 0.1%磷酸水溶液组合作为流动相。对比不同比例甲醇水溶液与乙醇水溶液，以峰面积除以供试品称样量为指标，分析结果发现，100 倍 70%甲醇作为溶剂能稳定的将 3 种成分提取出来，因此确定溶剂提取液为 70%甲醇。

古代经典名方的开发，关键在于建立基于药效作用的质量标准，严格把控制备过程中质量情况^[30]，对于成分复杂的中药处方来说，指纹图谱及多指标成分含量测定是评价其质量情况的一种重要手段^[31]，本研究以此为出发点，开发了中药经典名方泻白散物质基准 HPLC 指纹图谱及多成分含量测定方法，经过方法学验证简单可行，便于操作，将其应用于泻白散质量评价，为泻白散物质基准质量标准研究提供数据参考。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局. 关于发布《古代经典名方目录（第一批）》的通知 [EB/OL]. [2018-04-16]. <http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2018-04-16/7107.html>.

- [2] 徐雯. 泻白散治疗儿科疾病验案举隅 [J]. 江苏中医药, 2017, 49(6): 47-49.
- [3] 邱宏. 使用参芪白术散合泻白散治疗小儿慢性咳嗽的效果分析 [J]. 当代医药论丛, 2015, 13(17): 25-26.
- [4] 李前前, 葛国岚, 韩雪. 小柴胡汤合泻白散加减治疗小儿类百日咳综合征临床观察 [J]. 光明中医, 2018, 33(20): 3027-3028.
- [5] 李彩霞, 舒兰. 加味泻白散治疗儿童感染后咳嗽阴虚肺热证的临床观察 [J]. 中医药导报, 2015, 21(8): 69-71.
- [6] 林倩, 于帅, 董丹华, 等. 泻白散及其加减方的临床应用研究进展 [J]. 中国药房, 2019, 30(18): 2589-2592.
- [7] 王琳琳, 王娜娜, 赵丽姣, 等. 整合药理学视角下的泻白散治疗小儿肺炎的作用机制研究 [J/OL]. 中华中医药学刊, [2020-01-19]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20191025.1005.002.html>.
- [8] 徐宝林, 张文娟, 孙静芸. 桑白皮提取物平喘、利尿作用的研究 [J]. 中成药, 2003, 25(9): 70-72.
- [9] 景王慧, 吴文进, 燕茹, 等. 归肺经中药桑白皮的化学、药理与药代动力学研究进展 [J]. 世界中医药, 2014, 9(1): 109-112.
- [10] 李崧, 王澈, 贾天柱, 等. 炮制对桑白皮止咳平喘、利尿作用的影响 [J]. 中成药, 2004, 26(6): 43-45.
- [11] 林立, 刘晓秋. 泻白散 HPLC 谱效关系初探 [J]. 中国现代中药, 2009, 11(8): 35-37.
- [12] 阙启明, 康宁, 田海涛, 等. 桑皮苷的镇咳平喘作用 [J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(6): 388-391.
- [13] 党院霞, 梁丹灵, 周欣欣, 等. 基于分子对接技术的桑白皮总黄酮对高血脂症并高尿酸血症大鼠肾保护作用研究 [J]. 中草药, 2019, 50(5): 1175-1181.
- [14] 韦媛媛, 徐峰, 陈侠, 等. 桑白皮总黄酮的镇咳祛痰作用 [J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(8): 644-647.
- [15] 韦媛媛, 徐峰, 陈晓伟, 等. 桑白皮黄酮平喘作用实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(11): 2743-2745.
- [16] 韦媛媛, 徐峰, 陈侠, 等. 桑白皮总黄酮对豚鼠离体气管平滑肌收缩功能的影响 [J]. 食品科技, 2009, 34(4): 185-187.
- [17] 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]. <http://www.nmpa.gov.cn/WS04/CL2138/228247.html>.
- [18] 林林, 顾国强, 崔巧红, 等. 红核妇洁洗液 GC 指纹图谱的建立及多成分定量测定 [J]. 中草药, 2019, 50(16): 3833-3839.
- [19] Gao S M, Liu J S, Wang M, et al. Quantitative and HPLC fingerprint analysis combined with chemometrics for quality evaluation of *Codonopsis Radix* processed with different methods [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(2): 160-168.
- [20] 邓斌, 王秋燕, 周成高, 等. 益肾排毒丸中有效成分含量测定及指纹图谱研究 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(4): 658-662.
- [21] 陈素娟, 聂静, 张旗, 等. 熟地黄饮片标准汤剂的质量标准研究 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(9): 2173-2177.
- [22] 苏汝彬, 李月婷, 马兆臣, 等. 芪参颗粒的 HPLC 指纹图谱与多成分定量测定研究 [J]. 中草药, 2019, 50(18): 4329-4337.
- [23] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [24] 文旺, 李莉, 李德坤, 等. 经典名方的“遵古”研发思路探讨——以泻白散为例 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(23): 196-201.
- [25] 李婷, 张彤, 王丹丹. 泻白散文献分析及研究进展 [J]. 中成药, 2019, 41(8): 1927-1931.
- [26] 李璐, 杨一帆, 杨彪, 等. 泻白散处方演变历史及方剂开发的研究进展 [J]. 中成药, 2019, 41(8): 1920-1926.
- [27] 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.
- [28] 方静, 傅延龄. 汉代、唐代、宋代煮散剂比较 [J]. 中医学报, 2013, 28(4): 523-525.
- [29] 汪晓蓉. 宋代煮散运用规律研究 [D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2017.
- [30] 杨平, 林丹, 宋菊, 等. 日本汉方制剂及其特点与中药新药研究的思考 [J]. 中草药, 2018, 49(9): 1985-1989.
- [31] 陈蒙, 林龙飞, 刘宇灵, 等. 经典名方苓桂术甘汤 HPLC 指纹图谱的建立及 3 种成分含量测定 [J]. 中草药, 2019, 50(17): 4152-4157.