

# 黄芪桂枝五物汤基准样品指纹图谱及关键质量属性量值传递规律研究

张萍芝<sup>1</sup>, 姚爱娜<sup>1</sup>, 张永强<sup>1</sup>, 阮意丹<sup>1</sup>, 张慧中<sup>1</sup>, 徐晓涵<sup>1</sup>, 李诗曼<sup>1</sup>, 王欣竹<sup>1</sup>, 王雯琪<sup>1</sup>, 杨静雯<sup>1</sup>,  
匡 鸣<sup>2</sup>, 董晓旭<sup>1\*</sup>, 倪 健<sup>1\*</sup>

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488

2. 华润三九医药股份有限公司, 广东 深圳 518000

**摘要:** 目的 建立黄芪桂枝五物汤(Huangqi Guizhi Wuwu Decoction, HGWD)基准样品的指纹图谱方法,并建立 HGWD 基准样品中 4 个关键指标性成分定量测定的 HPLC 方法,为 HGWD 基准样品质量控制提供参考。方法 采用 HPLC 法建立 HGWD 指纹图谱,通过基准样品与各单味药材的相关性分析进行共有峰归属,以对照品进行共有峰指认,通过各批次间相似度评价结合化学模式识别分析 15 批 HGWD 基准样品的质量差异。同时建立指标性成分毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芍药苷、肉桂酸、桂皮醛定量测定方法,结合干膏率及定量测定结果进行量值传递研究。结果 建立了 15 批 HGWD 基准样品的 HPLC 指纹图谱,共标定 14 个共有峰,经对照品比对,确定其中 3 号峰为芍药内酯苷、4 号峰为芍药苷,5 号峰为毛蕊异黄酮葡萄糖苷、8 号峰为香豆素、11 号峰为肉桂酸、12 号峰为桂皮醛、14 号峰为 6-姜辣素;各批次间相似度均 $\geq 0.904$ ,可聚为 2 类,5 个主成分累积贡献率达 84.205%;毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芍药苷、肉桂酸和桂皮醛的质量分数分别为 0.503~0.920、16.452~28.520、0.344~0.866、0.842~1.735 mg/g, HGWD 饮片-基准样品的转移率分别为 23.480%~38.717%、36.468%~53.193%、20.054%~33.694%、2.782%~4.570%。结论 采用指纹图谱及多指标性成分定量测定方法为经典名方 HGWD 的基准样品量值传递进行分析,为 HGWD 基准样品质量控制和复方制剂的开发提供依据。

**关键词:** 黄芪桂枝五物汤; 基准样品; HPLC; 指纹图谱; 关键质量属性; 量值传递; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 芍药苷; 肉桂酸; 桂皮醛; 芍药内酯苷; 香豆素; 6-姜辣素; 相似度

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2025)08-2829-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.08.018

## Fingerprint of benchmark samples of classical prescription Huangqi Guizhi Wuwu Decoction and critical quality attribute quality value transfer of multi-index components

ZHANG Pingzhi<sup>1</sup>, YAO Aina<sup>1</sup>, ZHANG Yongqiang<sup>1</sup>, RUAN Yidan<sup>1</sup>, ZHANG Huizhong<sup>1</sup>, XU Xiaohan<sup>1</sup>, LI Shiman<sup>1</sup>, WANG Xinzhu<sup>1</sup>, WANG Wenqi<sup>1</sup>, YANG Jingwen<sup>1</sup>, KUANG Ming<sup>2</sup>, DONG Xiaoxu<sup>1</sup>, NI Jian<sup>1</sup>

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. China Resources Sanjiu Pharmaceutical Co., Ltd., Shenzhen 518000, China

**Abstract: Objective** To establish a fingerprint method for the reference samples of Huangqi Guizhi Wuwu Decoction (HGWD, 黄芪桂枝五物汤) and a HPLC method for the determination of three index components in the reference samples, so as to provide reference for the quality control of the reference samples. **Methods** The fingerprint of HGWD was established by HPLC, the common peak was assigned by correlation analysis between the reference samples and each single flavor of medicinal materials, and the common peak was identified by reference products. The quality difference of 15 batches of reference samples was analyzed by similarity evaluation and chemical pattern recognition. At the same time, the determination method of paeoniflorin and cinnamic acid was established, and the transfer of the quantity value was studied in combination with the determination results of dry paste. **Results** The fingerprints of 15 batches of HGWD were established, and 14 common peaks were identified, among which peak 3 was albiflorin,

收稿日期: 2024-11-11

基金项目: 国家中医药管理局高水平建设学科 (zyyzdxk-2023272)

作者简介: 张萍芝, 硕士研究生, 研究方向为中药制药新技术与新剂型。Tel: 13835194036 E-mail: 13835194036@163.com

\*通信作者: 倪 健, 教授, 主要从事中药新剂型与新技术的研究。E-mail: njtem@263.net

董晓旭, 副教授, 主要从事中药新剂型与新技术的研究。E-mail: dxiaoxv@163.com

peak 4 was paeoniflorin, peak 5 was glucoside of calysoisoflavone, peak 8 was coumarin, peak 11 was cinnamic acid, peak 12 was cinnamaldehyde and peak 14 was 6-gingerol. The similarity of each batch was  $\geq 0.904$ , which could be clustered into two categories, and the cumulative contribution rate of the five principal components was 84.205. The contents of calycosin-7-*O*- $\beta$ -*D*-glucoside, paeoniflorin, cinnamic acid and cinnamic were 0.503—0.920, 16.452—28.520, 0.344—0.866, 0.842—1.735 mg/g, respectively. The transfer rates of decoction slices and reference samples were 23.480%—38.717%, 36.468%—53.193%, 20.054%—33.694%, 2.782%—4.570%, respectively. **Conclusion** By using the combination of fingerprint and the content determination of the multi-index components, the quality value transfer of benchmark samples in HGWD can be analyzed, which provides a scientific basis for the quality control of the benchmark samples and the development of compound preparations.

**Key words:** Huangqi Guizhi Wuwu Decoction; benchmark sample; HPLC; fingerprints; critical quality attribute; quality value transmitting; calycosin-7-glucoside; paeoniflorin; cinnamic acid; cinnamaldehyde; albiflorin; coumarin; 6-gingerol; similarity

黄芪桂枝五物汤 (Huangqi Guizhi Wuwu Decoction, HGWD) 最早见于张仲景《金匮要略》，由黄芪、桂枝、白芍、生姜和大枣组成，具有益气温经、和血通痹之功，主治血痹证。方中黄芪益气固表，为君药；桂枝温经通阳，白芍和营敛阴，共为臣药；生姜、大枣调和营卫，共为佐使药。现代研究发现，HGWD 具有保护心脑血管、调节免疫、抗炎、镇痛等药理作用<sup>[1]</sup>；临床应用上，其治疗神经系统、骨科、心血管系统、内分泌系统疾病等方面应用广泛<sup>[2]</sup>。

经典名方是指目前仍广泛应用、疗效确切、具有明显特色与优势的清代及清代以前医籍所载方剂<sup>[3]</sup>。经典名方制备工艺的研究内容主要为基准样品制备工艺研究和制剂成型工艺研究 2 个部分<sup>[4]</sup>，基准样品的制备工艺、质量标准研究也是目前经典名方领域的主要研究趋势之一<sup>[5]</sup>。经典名方物质基准的研究目的，是连接古代经典名方和中药新药 3.1 类制剂，通过基准样品还原古代临床应用，再以“制剂与基准样品质量基本一致”作为制剂研究要求，实现药品现代化工业化生产<sup>[6]</sup>。

HGWD 化学成分复杂，组方药材产地分布广泛，质量控制存在一定难度。目前关于 HGWD 的报道多集中于临床药效研究<sup>[7-9]</sup>、文献考证<sup>[10]</sup>等方面，对其基准样品质量值传递及质量标准的研究相对较少。故本实验收集 HGWD 中来自不同产地的 15 批药材，通过随机数表法组合排序，按照关键信息表中考证工艺制备 15 批 HGWD 基准样品。通过 HPLC 法建立 HGWD 指纹图谱，分析其相似度，对特征峰进行归属，并结合干膏率、指标性成分的含量、转移率等指标建立 HGWD 基准样品的评价方法，阐明饮片-基准样品的量值传递关系，初步拟定 HGWD 基准样品质量标准，以期为 HGWD 后续药学研究奠定基础，为其相关制剂的开

发与研究提供借鉴。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

LC-20AT 型高效液相色谱仪，岛津（中国）有限公司，二极管阵列检测器 (DAD)，LC Solution 色谱工作站；MS105DU 型电子分析天平，梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司；JY6002 型电子天平，上海衡平仪器仪表厂；KQ-500DE 型数控超声波清洗机，昆山市超声仪器有限公司；FD-1A-80+型冷冻干燥机，北京博医康实验仪器有限公司；C22-CS01 型电陶炉，浙江苏泊尔股份有限公司；砂锅，江西晖翔科技有限公司。

### 1.2 试药与材料

对照品毛蕊异黄酮葡萄糖苷（批号 111920-201907，质量分数 96.8%）、桂皮醛（批号 110710-202223，质量分数 98.8%）、肉桂酸（批号 110786-202305，质量分数 99.8%）、芍药苷（批号 110736-202246，质量分数 96.7%）、6-姜辣素（批号 111833-202007，质量分数 99.3%），中国食品药品检定研究院；对照品芍药内酯苷（批号 O31GB166251）、香豆素（批号 Y29M9C57109），质量分数均  $\geq 98.0\%$ ，上海源叶生物科技有限公司。甲醇、乙腈，色谱纯，赛默飞世尔科技（中国）有限公司；甲酸，色谱纯，福晨（天津）化学试剂有限公司；磷酸，色谱纯，天津市大茂化学试剂厂；纯净水，杭州娃哈哈有限集团公司。

黄芪、桂枝、白芍、生姜、大枣药材均由华润三九医药股份有限公司提供，均经北京中医药大学刘春生教授鉴定，分别来源于豆科黄芪属植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根，樟科樟属植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥嫩枝，毛茛科芍药属植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根，

姜科姜属植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的新鲜根茎、鼠李科枣属植物枣 *Ziziphus jujuba* Mill. 的干燥成熟果实，均符合《中国药典》2020 年版标准。

## 2 方法和结果

### 2.1 15 批 HGWD 样品的制备

本课题组前期对方中中药味进行研究，选取 3 个产地至少 20 批药材，并按《中国药典》2020 年

版一部各药材项下检测均合格。依据关键信息表对药材进行炮制，得到对应饮片，均符合《中国药典》2020 年版一部各药材项下相关规定。最终选出 15 批饮片进行基准样品研究。对该 15 批黄芪、桂枝、白芍、生姜及大枣饮片进行编号并排序，通过随机数表法组合出 15 批全方，以此制备出 15 批 HGWD 的基准样品，具体组合见表 1。

表 1 15 批 HGWD 基准样品对应饮片批号及产地信息

Table 1 Fifteen batches of HGWD reference samples correspond to batch number and origin information of decoction pieces

| 基准样     | 黄芪         |         | 桂枝         |         | 白芍         |         | 生姜                  |         | 大枣             |           |
|---------|------------|---------|------------|---------|------------|---------|---------------------|---------|----------------|-----------|
| 品批号     | 批号         | 产地      | 批号         | 产地      | 批号         | 产地      | 批号                  | 产地      | 批号             | 产地        |
| HGWD-1  | K202212010 | 山西大同浑源县 | GY20230601 | 广西贵港平南县 | K202209006 | 安徽亳州谯城区 | YC-SJ-SCQW221205020 | 四川乐山犍为县 | YPKY20221104   | 山东乐陵(县级市) |
| HGWD-2  | K202301005 | 山西大同浑源县 | GY20230614 | 广西贵港平南县 | K202209010 | 安徽亳州谯城区 | YC-SJ-SCQW221205019 | 四川乐山犍为县 | YPKY20221101   | 山东乐陵(县级市) |
| HGWD-3  | K202212024 | 山西大同浑源县 | GY20230608 | 广西贵港平南县 | K202209004 | 安徽亳州谯城区 | YC-SJ-SCQW221205003 | 四川乐山犍为县 | YPKY202301003  | 山东乐陵(县级市) |
| HGWD-4  | K202212021 | 山西大同浑源县 | GY20230611 | 广西贵港平南县 | K202209012 | 安徽亳州谯城区 | YC-SJ-SCQW221205001 | 四川乐山犍为县 | YPDZ-SD-221002 | 山东乐陵(县级市) |
| HGWD-5  | K202301003 | 山西大同浑源县 | GY20230606 | 广西贵港平南县 | K202209018 | 安徽亳州谯城区 | YC-SJ-SCQW221205020 | 四川乐山犍为县 | YPKY202301005  | 山东乐陵(县级市) |
| HGWD-6  | K202212013 | 山西大同浑源县 | GY20230613 | 广西贵港平南县 | K202209019 | 安徽亳州谯城区 | YC-SJ-SCQW221205008 | 四川乐山犍为县 | YPKY202301002  | 山东乐陵(县级市) |
| HGWD-7  | K202212017 | 山西大同浑源县 | GY20230607 | 广西贵港平南县 | K202209003 | 安徽亳州谯城区 | YC-SJ-SCQW221205007 | 四川乐山犍为县 | YPKY20221102   | 山东乐陵(县级市) |
| HGWD-8  | K202212015 | 山西大同浑源县 | GY20230605 | 广西贵港平南县 | K202209017 | 安徽亳州谯城区 | YC-SJ-SCQW221205009 | 四川乐山犍为县 | YPDZ-SD-221003 | 山东乐陵(县级市) |
| HGWD-9  | K202212022 | 山西大同浑源县 | GY20230615 | 广西贵港平南县 | K202209014 | 安徽亳州谯城区 | YC-SJ-SCQW221205019 | 四川乐山犍为县 | YPKY20221105   | 山东乐陵(县级市) |
| HGWD-10 | K202301001 | 山西大同浑源县 | GY20230615 | 广西贵港平南县 | K202209007 | 安徽亳州谯城区 | YC-SJ-SCQW221205001 | 四川乐山犍为县 | YPKY20221103   | 山东乐陵(县级市) |
| HGWD-11 | K202301003 | 山西大同浑源县 | GY20230609 | 广西贵港平南县 | K202209011 | 安徽亳州谯城区 | YC-SJ-SCQW221205018 | 四川乐山犍为县 | YPDZ-SD-221005 | 山东乐陵(县级市) |
| HGWD-12 | K202301010 | 山西大同浑源县 | GY20230612 | 广西贵港平南县 | K202209005 | 安徽亳州谯城区 | YC-SJ-SCQW221205003 | 四川乐山犍为县 | YPKY202301004  | 山东乐陵(县级市) |
| HGWD-13 | K202212023 | 山西大同浑源县 | GY20230603 | 广西贵港平南县 | K202209018 | 安徽亳州谯城区 | YC-SJ-SCQW221205016 | 四川乐山犍为县 | YPDZ-SD-221004 | 山东乐陵(县级市) |
| HGWD-14 | K202301007 | 山西大同浑源县 | GY20230610 | 广西贵港平南县 | K202209020 | 安徽亳州谯城区 | YC-SJ-SCQW221205012 | 四川乐山犍为县 | YPKY202301001  | 山东乐陵(县级市) |
| HGWD-15 | K202212014 | 山西大同浑源县 | GY20230602 | 广西贵港平南县 | K202209002 | 安徽亳州谯城区 | YC-SJ-SCQW221205006 | 四川乐山犍为县 | YPDZ-SD-221001 | 山东乐陵(县级市) |

称取黄芪 41.40 g、桂枝 41.40 g、白芍 41.40 g、生姜 82.80 g、大枣 36.00 g 于砂锅中，加水 1 200 mL，武火(2 200 W)加热至沸腾，改文火(800 W)，煎煮至 400 mL，趁热滤过(滤布材质为尼龙布，目数为 200 目)。将水煎液置于样品盘中，-20 ℃冰箱中预冷冻 12 h 后置冷冻干燥机(-80 ℃预冷冻 1 h)中干燥 72 h，即得 HGWD 基准样品。

### 2.2 HGWD 基准样品指纹图谱研究

**2.2.1 色谱条件** 色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse Plus C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 柱；流动相为乙腈-0.2%甲酸水溶液，梯度洗脱：0~5 min, 5%乙腈；5~15 min, 5%~10%乙腈；15~40 min, 10%~20%乙腈；40~60 min, 20%乙腈；60~65 min, 20%~30%乙腈；65~75 min, 30%乙腈；75~85 min, 30%~40%乙腈；85~95 min, 40%~90%乙腈；体积流量 1 mL/min；检测波长 270 nm；柱温 30 ℃；进样量 10 μL。

**2.2.2 对照品溶液的制备** 精密称定芍药苷、毛蕊

异黄酮葡萄糖苷、桂皮醛、肉桂酸、6-姜辣素、芍药内酯苷、香豆素对照品适量，加甲醇制成含芍药苷 10.00 μg/mL、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 10.13 μg/mL、桂皮醛 10.56 μg/mL、肉桂酸 10.07 μg/mL、6-姜辣素 10.66 μg/mL、芍药内酯苷 10.27 μg/mL、香豆素 10.49 μg/mL 的混合对照品溶液。

**2.2.3 HGWD 基准样品供试品溶液的制备** 取 HGWD 基准样品 0.2 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，加入 10 mL 50%甲醇，称定质量，超声(功率 100 W、频率 40 kHz) 15 min，放冷，50%甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得 HGWD 基准样品供试品溶液。

**2.2.4 单味饮片供试品溶液的制备** 按处方量称取各单味饮片，按照“2.1”项下方法制得各单味饮片提取液冻干粉，按照“2.2.3”项下方法制得单味饮片供试品溶液。

**2.2.5 阴性供试品溶液的制备** 分别按处方量称取缺少相应饮片的其他 4 味中药的阴性复方，按照

“2.2.1”项下方法制得各饮片阴性提取液冻干粉，按照“2.2.2”项下方法分别制得缺黄芪、缺桂枝、缺白芍、缺生姜、缺大枣的 5 个阴性供试品溶液。

**2.2.6 精密度考察** 取编号为 HGWD-13 的冻干粉，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，连续进样 6 次，以 12 号峰（桂皮醛）为参照，经计算各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 1.00%，相对峰面积的 RSD 均小于 6.20%，结果表明，该仪器精密度良好。

**2.2.7 稳定性考察** 取 HGWD-13 供试品溶液，分别于制备后 0、3、6、9、12、15、24 h 进样测定，以 12 号峰（桂皮醛）为参照，经计算各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 1.00%，相对峰面积的 RSD 均小于 7.50%，结果表明，供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.2.8 重复性考察** 取编号为 HGWD-13 的冻干粉，按“2.2.3”项下平行制备 6 份供试品溶液，进

样分析，以 12 号峰（桂皮醛）为参照，经计算各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 1.00%，相对峰面积的 RSD 均小于 4.50%，结果表明，该方法重复性良好。

**2.2.9 指纹图谱的建立** 取 15 批 HGWD 基准样品（HGWD-1~HGWD-15），按“2.2.2”项下方法制备各供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进样分析，记录色谱图。将得到的 HGWD-1~HGWD-15 图谱导入国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》（2012 版）进行分析，以 HGWD-1 图谱作为参照图谱，采用中位数法，时间窗宽度为 0.1 min，经多点校正后 Mark 峰匹配，生成对照指纹图谱（R），结果见图 1。根据所测得的图谱选择稳定性好、吸收较强、特征明显的色谱峰作为共有峰进行标定，确定了 14 个共有峰；并选择峰面积较大、分离度较好的 12 号峰（桂皮醛）作为参照峰（S）。15 批 HGWD 基准样品指纹图谱见图 1。

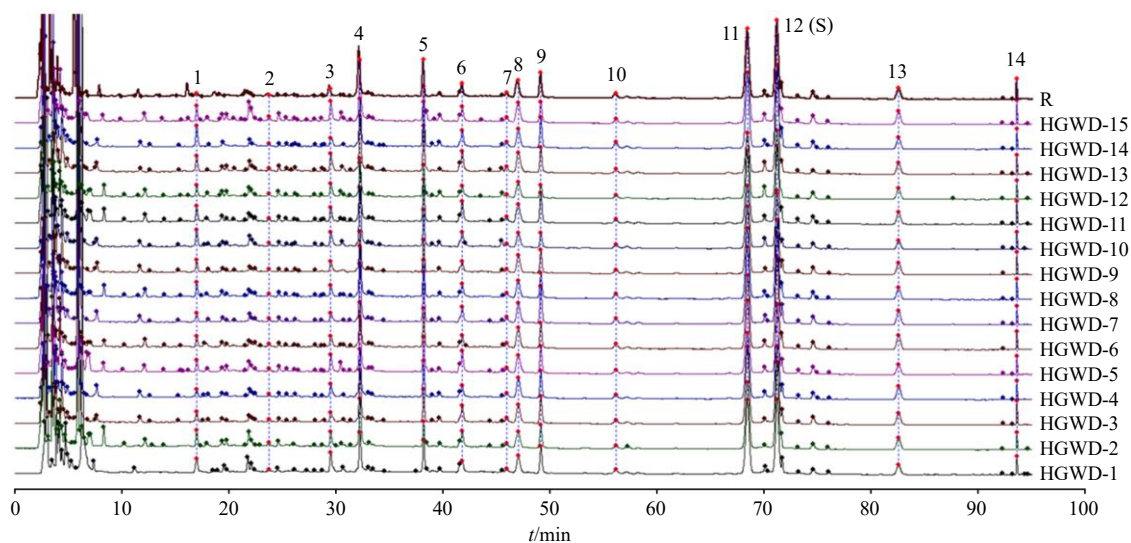


图 1 15 批 HGWD 基准样品的 HPLC 指纹图谱及其对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 Fingerprints and comparator chromatogram (R) of 15 batches of benchmark samples of HGWD

**2.2.10 共有峰的归属与指认** 分别取单味药供试品溶液及阴性供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进行分析，记录色谱图，结果见图 2。结果显示，5、9、10 号峰来源于黄芪，8、11~13 号峰来源于桂枝，3、4、6 号峰来源于白芍，14 号峰来源于生姜，1、2、7 号峰来源于桂枝、白芍。通过与对照品色谱图（图 3）进行比对，共指认 7 个成分，其中，3 号峰为芍药内酯苷、4 号峰为芍药苷、5 号峰为毛蕊异黄酮葡萄糖苷、8 号峰为香豆素、11 号峰为肉桂酸、12 号峰为桂皮醛、14 号峰为 6-姜辣素。

**2.2.11 相似度分析** 对 15 批 HGWD 基准样品指纹

图谱进行相似度分析，结果（表 2）表明，15 批样品指纹图谱与对照指纹图谱相似度均  $\geq 0.948$ ，各批次间相似度均  $\geq 0.904$ ，可见，HGWD 基准样品制备工艺稳定，不同产地、不同批次药材制备的 HGWD 基准样品中的主要物质差异较小。

**2.2.12 系统聚类分析**（hierarchical cluster analysis, HCA）以 15 批 HGWD 基准样品指纹图谱的 14 个共有峰峰面积为变量，运用 SPSS 20.0 软件，采用 Ward 法进行 HCA，结果见图 4。当类间距为 15~20 时，15 批 HGWD 基准样品被聚类为 2 类，其中 HGWD-1~HGWD-12、HGWD-14、HGWD-15 聚为

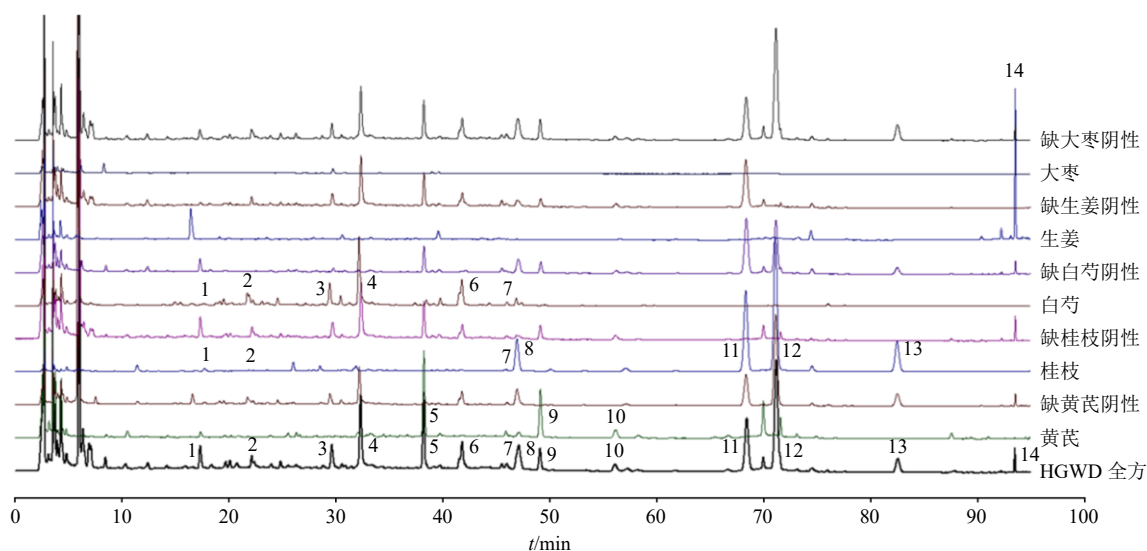


图 2 HGWD 单味药、阴性与全方供试品溶液 HPLC 特征指纹图谱

Fig. 2 HPLC characteristic chromatogram of single medicinal material, negative solution and test solution of HGWD

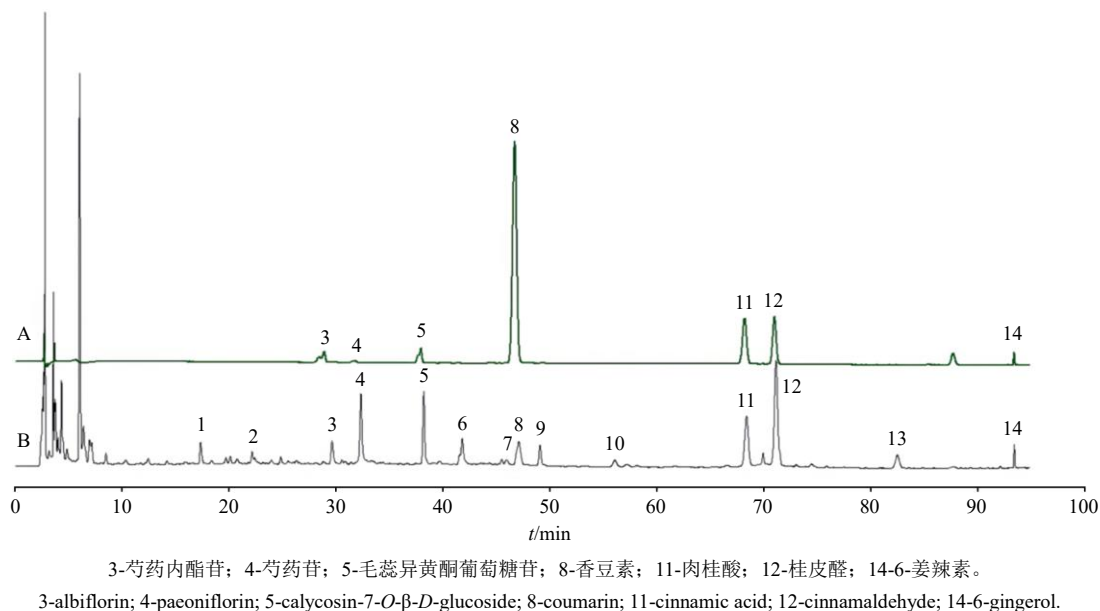


图 3 混合对照品溶液 (A) 与 HGWD 基准样品供试品溶液 (B) 的 HPLC 特征指纹图谱

Fig. 3 HPLC characteristic chromatogram of mixed reference solution (A) and HGWD test solution (B)

一类, HGWD-13 聚为一类。HCA 结果与相似度分析结果相符。

**2.2.13 主成分分析 (principal component analysis, PCA)** 运用 SPSS 20.0 软件对 15 批 HGWD 基准样品指纹图谱的 14 个共有峰峰面积数据进行分析, 提取得到 5 个特征值 >1 的主成分 ( $Z_1 \sim Z_5$ ), 累积方差贡献率为 84.205%, 说明 5 个主成分能够代表 15 批 HGWD 基准样品 14 个共有峰中 84.205% 的信息。结果见表 3。

依据表 4 所示的主成分载荷矩阵, 明确各主成分中具有较大载荷量的变量, 其中第 1 主成分主要

反映了 8 (香豆素)、5 (毛蕊异黄酮葡萄糖苷)、9、7、10、13、12 (桂皮醛)、6 号峰的信息; 同理, 第 2 主成分主要反映了 3 (芍药内酯苷)、2、1、6、7 号峰的信息; 第 3 主成分主要反映了 2、8 (香豆素)、12 (桂皮醛)、13 号峰的信息; 第 4 主成分主要反映了 11 (肉桂酸)、14 (6-姜辣素) 号峰的信息; 第 5 主成分主要反映了 10、1 号峰的信息。

以各主成分方差贡献率占累积贡献率的比例为权重系数, 得主成分综合得分 ( $Y$ ) 模型为  $Y = 0.299\ 28\ Z_1 + 0.202\ 58\ Z_2 + 0.149\ 21\ Z_3 + 0.113\ 85\ Z_4 + 0.077\ 12\ Z_5$ , 对各样本的综合得分进行计算并排序,

表 2 15 批 HGWD 基准样品相似度评价

Table 2 Similarity of HPLC characteristic chromatogram for 15 batches of HGWD reference sample

| 样品      | 相似度    |        |        |        |        |        |        |        |        |         |         |         |         |         |         | R     |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-------|
|         | HGWD-1 | HGWD-2 | HGWD-3 | HGWD-4 | HGWD-5 | HGWD-6 | HGWD-7 | HGWD-8 | HGWD-9 | HGWD-10 | HGWD-11 | HGWD-12 | HGWD-13 | HGWD-14 | HGWD-15 |       |
| HGWD-1  | 1.000  |        |        |        |        |        |        |        |        |         |         |         |         |         |         |       |
| HGWD-2  | 0.989  | 1.000  |        |        |        |        |        |        |        |         |         |         |         |         |         |       |
| HGWD-3  | 0.995  | 0.990  | 1.000  |        |        |        |        |        |        |         |         |         |         |         |         |       |
| HGWD-4  | 0.984  | 0.997  | 0.985  | 1.000  |        |        |        |        |        |         |         |         |         |         |         |       |
| HGWD-5  | 0.992  | 0.983  | 0.997  | 0.978  | 1.000  |        |        |        |        |         |         |         |         |         |         |       |
| HGWD-6  | 0.989  | 0.996  | 0.989  | 0.997  | 0.980  | 1.000  |        |        |        |         |         |         |         |         |         |       |
| HGWD-7  | 0.990  | 0.992  | 0.995  | 0.993  | 0.992  | 0.993  | 1.000  |        |        |         |         |         |         |         |         |       |
| HGWD-8  | 0.993  | 0.993  | 0.997  | 0.991  | 0.995  | 0.991  | 0.997  | 1.000  |        |         |         |         |         |         |         |       |
| HGWD-9  | 0.992  | 0.998  | 0.993  | 0.997  | 0.985  | 0.999  | 0.995  | 0.995  | 1.000  |         |         |         |         |         |         |       |
| HGWD-10 | 0.978  | 0.967  | 0.985  | 0.959  | 0.993  | 0.960  | 0.978  | 0.986  | 0.968  | 1.000   |         |         |         |         |         |       |
| HGWD-11 | 0.990  | 0.989  | 0.997  | 0.986  | 0.998  | 0.986  | 0.997  | 0.998  | 0.990  | 0.990   | 1.000   |         |         |         |         |       |
| HGWD-12 | 0.994  | 0.993  | 0.993  | 0.989  | 0.987  | 0.996  | 0.990  | 0.992  | 0.996  | 0.973   | 0.988   | 1.000   |         |         |         |       |
| HGWD-13 | 0.916  | 0.956  | 0.921  | 0.966  | 0.919  | 0.949  | 0.947  | 0.941  | 0.949  | 0.904   | 0.939   | 0.930   | 1.000   |         |         |       |
| HGWD-14 | 0.994  | 0.992  | 0.996  | 0.989  | 0.993  | 0.993  | 0.996  | 0.997  | 0.995  | 0.980   | 0.996   | 0.994   | 0.938   | 1.000   |         |       |
| HGWD-15 | 0.995  | 0.991  | 0.997  | 0.985  | 0.995  | 0.988  | 0.990  | 0.997  | 0.992  | 0.988   | 0.994   | 0.994   | 0.925   | 0.992   | 1.000   |       |
| R       | 0.994  | 0.997  | 0.997  | 0.995  | 0.994  | 0.995  | 0.998  | 0.999  | 0.998  | 0.981   | 0.997   | 0.995   | 0.948   | 0.998   | 0.996   | 1.000 |

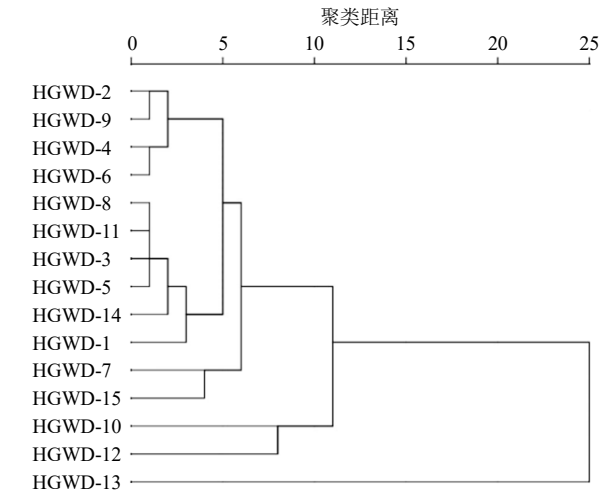


图 4 15 批 HGWD 基准样品 HCA 树状图

Fig. 4 HCA dendrogram of 15 batches of HGWD

表 3 15 批 HGWD 基准样品指纹图谱共有峰 PCA 结果

Table 3 PCA results of common peaks in fingerprints of 15 batches of HGWD

| 主成分            | 特征值   | 方差贡献率/% | 累积方差贡献率/% |
|----------------|-------|---------|-----------|
| Z <sub>1</sub> | 4.190 | 29.928  | 29.928    |
| Z <sub>2</sub> | 2.836 | 20.258  | 50.186    |
| Z <sub>3</sub> | 2.089 | 14.921  | 65.107    |
| Z <sub>4</sub> | 1.594 | 11.385  | 76.492    |
| Z <sub>5</sub> | 1.080 | 7.712   | 84.205    |

结果见表 5, 15 批次 HGWD 基准样品中, HGWD-15 的综合得分优于其他批次, 表明质量较好。

表 4 15 批 HGWD 基准样品指纹图谱共有峰主成分载荷矩阵

Table 4 Principal component loading matrix of common peaks in fingerprints of 15 batches of HGWD

| 峰号 | 载荷矩阵           |                |                |                |                |
|----|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|    | Z <sub>1</sub> | Z <sub>2</sub> | Z <sub>3</sub> | Z <sub>4</sub> | Z <sub>5</sub> |
| 1  | 0.024          | 0.616          | -0.387         | -0.079         | 0.469          |
| 2  | 0.015          | 0.633          | 0.670          | 0.123          | 0.245          |
| 3  | -0.173         | 0.711          | 0.406          | -0.155         | 0.355          |
| 4  | 0.569          | 0.567          | -0.143         | 0.257          | -0.149         |
| 5  | 0.733          | 0.045          | -0.484         | -0.240         | 0.100          |
| 6  | 0.499          | 0.550          | -0.425         | 0.005          | -0.412         |
| 7  | 0.711          | 0.529          | 0.240          | 0.027          | -0.208         |
| 8  | 0.813          | 0.035          | 0.453          | -0.161         | -0.109         |
| 9  | 0.729          | -0.268         | -0.193         | 0.095          | 0.132          |
| 10 | 0.693          | -0.217         | -0.410         | 0.117          | 0.505          |
| 11 | 0.121          | -0.248         | 0.136          | 0.866          | 0.280          |
| 12 | 0.618          | -0.314         | 0.432          | -0.478         | 0.112          |
| 13 | 0.627          | -0.602         | 0.431          | -0.041         | 0.027          |
| 14 | 0.284          | 0.042          | 0.178          | 0.628          | -0.231         |

2.3 HGWD 基准样品指标成分定量测定

2.3.1 色谱条件

(1) 毛蕊异黄酮葡萄糖苷: 色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse Plus C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 柱; 流动相为乙腈-0.2%甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0~23 min, 12%乙腈; 23~65 min, 12%~26%乙腈;



表 5 15 批 HGWD 基准样品主成分得分及综合得分结果

Table 5 Results of principal component score and comprehensive score of 15 batches of HGWD

| 批次      | Z <sub>1</sub> | Z <sub>2</sub> | Z <sub>3</sub> | Z <sub>4</sub> | Z <sub>5</sub> | Y          | 排序 |
|---------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------|----|
| HGWD-1  | 1.66           | 2.02           | 2.35           | 2.69           | 3.27           | 1.815 099  | 6  |
| HGWD-2  | 1.43           | 1.74           | 2.03           | 2.32           | 2.82           | 1.564 966  | 7  |
| HGWD-3  | -3.78          | -4.59          | -5.35          | -6.12          | -7.44          | -4.129 930 | 11 |
| HGWD-4  | -5.40          | -6.56          | -7.65          | -8.75          | -10.63         | -5.902 470 | 14 |
| HGWD-5  | 1.30           | 1.58           | 1.84           | 2.10           | 2.56           | 1.420 199  | 8  |
| HGWD-6  | -4.02          | -4.88          | -5.69          | -6.52          | -7.92          | -4.393 790 | 12 |
| HGWD-7  | -1.71          | -2.08          | -2.43          | -2.78          | -3.37          | -1.872 110 | 10 |
| HGWD-8  | -0.80          | -0.97          | -1.13          | -1.30          | -1.57          | -0.873 620 | 9  |
| HGWD-9  | -5.55          | -6.74          | -7.85          | -8.99          | -10.92         | -6.063 350 | 15 |
| HGWD-10 | 1.82           | 2.22           | 2.58           | 2.96           | 3.59           | 1.993 236  | 5  |
| HGWD-11 | 3.52           | 4.27           | 4.98           | 5.70           | 6.92           | 3.844 163  | 3  |
| HGWD-12 | -4.98          | -6.05          | -7.05          | -8.07          | -9.80          | -5.442 500 | 13 |
| HGWD-13 | 6.28           | 7.63           | 8.90           | 10.18          | 12.37          | 6.866 100  | 2  |
| HGWD-14 | 2.78           | 3.38           | 3.93           | 4.50           | 5.47           | 3.037 286  | 4  |
| HGWD-15 | 7.44           | 9.04           | 10.53          | 12.06          | 14.65          | 8.131 987  | 1  |

体积流量 1 mL/min; 检测波长 260 nm; 柱温 30 ℃; 进样量 10 μL。

(2) 芍药苷: 色谱柱为 Agilent Zorbax Stable Bond C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 柱; 流动相为乙腈-0.2%甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0~7 min, 5%~12%乙腈; 7~25 min, 12%~19%乙腈; 25~50 min, 19%~30%乙腈; 体积流量 1 mL/min; 检测波长 250 nm; 柱温 30 ℃; 进样量 10 μL。

(3) 肉桂酸: 色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse Plus C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 柱; 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液 (28:72), 等度洗脱; 体积流量 1 mL/min; 检测波长 276 nm; 柱温 30 ℃; 进样量 10 μL。

(4) 桂皮醛: 色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse Plus C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 柱; 流动相为乙腈-水 (32:68), 等度洗脱; 体积流量 1 mL/min; 检测波长 290 nm; 柱温 30 ℃; 进样量 10 μL。

**2.3.2** HGWD 基准样品供试品溶液的制备 取 HGWD 基准样品 0.2 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入 50%甲醇 30 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 15 min (功率 100 W、频率 40 kHz), 放冷后称定质量, 50%甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得 HGWD 基准样品供试品溶液。

**2.3.3** 阴性供试品溶液的制备 按处方量称取缺相应饮片的其他 4 味中药的阴性复方, 按照“2.1”

项下方法制得各饮片阴性提取液冻干粉, 按照“2.2.2”项下方法分别制备得到缺白芍、缺桂枝、缺黄芪的 3 个阴性供试品溶液。

**2.3.4** 对照品溶液的制备 分别精密称取芍药苷、肉桂酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、桂皮醛对照品适量, 制成含芍药苷 98.63 μg/mL、肉桂酸 5.02 μg/mL、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 5.07 μg/mL、桂皮醛 10.26 μg/mL 的单一对照品溶液。

**2.3.5** 专属性考察 分别取供试品溶液、对照品溶液、阴性供试品溶液, 按照“2.3.1”项下色谱条件进样分析, 色谱图见图 5~8, 结果显示, 各指标成分在阴性下无干扰, 结果表明该方法专属性良好。

**2.3.6** 线性关系考察 取各单一对照品溶液, 分别

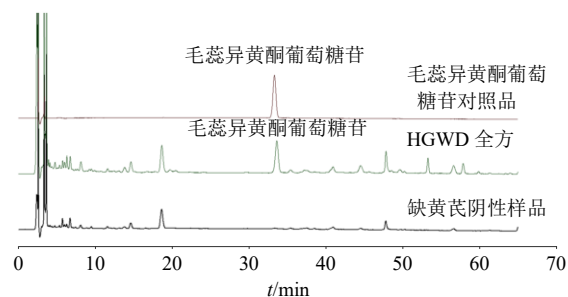


图 5 基准样品中毛蕊异黄酮葡萄糖苷定量测定色谱图

Fig. 5 Chromatograms of content determination of calycosin-7-O-β-D-glucoside

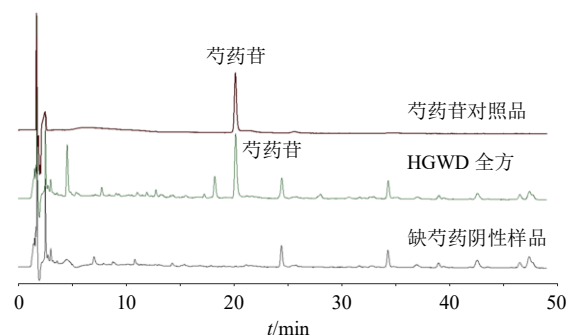


图 6 基准样品中芍药苷定量测定 HPLC 图

Fig. 6 HPLC of content determination of paeoniflorin

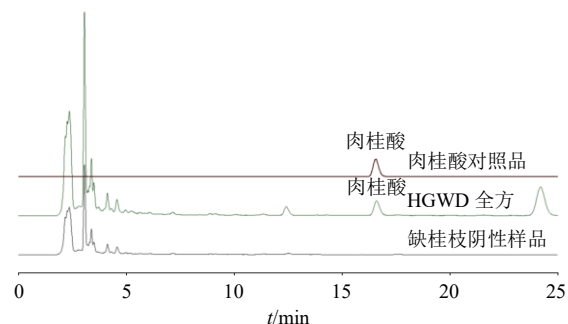


图 7 基准样品中肉桂酸定量测定 HPLC 图

Fig. 7 HPLC of content determination of cinnamic acid

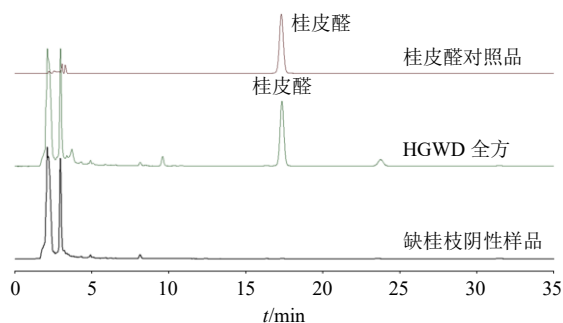


图 8 基准样品中桂皮醛定量测定 HPLC 图

Fig. 8 HPLC of content determination of cinnamaldehyde

按照“2.3.1”项下色谱条件进行分析,以质量浓度为横坐标( $X$ ),峰面积为纵坐标( $Y$ ),绘制标准曲线并计算回归方程,结果分别为毛蕊异黄酮葡萄糖苷  $Y=34\,038.0X-53\,427.0$ ,  $R^2=0.999\,1$ ,线性范围为  $1.63\sim 104.93\,\mu\text{g/mL}$ ;芍药苷  $Y=2\,608.0X-48\,054.0$ ,  $R^2=0.999\,6$ ,线性范围为  $33.18\sim 1\,061.77\,\mu\text{g/mL}$ ;肉桂酸  $Y=84\,341.0X-93\,324.0$ ,  $R^2=0.999\,7$ ,线性范围为  $1.60\sim 102.20\,\mu\text{g/mL}$ ;桂皮醛  $Y=74\,858.0X-6\,468.2$ ,  $R^2=0.999\,8$ ,线性范围为  $1.63\sim 52.17\,\mu\text{g/mL}$ ;结果显示,各指标成分在线性范围内线性关系良好。

**2.3.7 精密度考察** 取“2.3.4”项下各对照品溶液,分别连续进样 6 次,计算得芍药苷、肉桂酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、桂皮醛峰面积的 RSD 分别为 0.59%、0.42%、0.24%、1.28%,结果显示该仪器精密度良好。

**2.3.8 稳定性考察** 取 HGWD 基准样品(HGWD-13)供试品溶液 1 份,分别于制样后 0、2、4、6、8、10、12、24 h,按照“2.3.1”项下色谱条件进样分析,计算得芍药苷、肉桂酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、桂皮醛峰面积的 RSD 分别为 0.40%、0.40%、1.85%、0.32%,结果显示供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.3.9 重复性考察** 取 HGWD 基准样品(HGWD-13)冻干粉,按“2.3.2”项下制备方法平行制备供试品溶液 6 份,按照“2.3.1”项下色谱条件进样分析,计算得芍药苷、肉桂酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、桂皮醛质量分数的 RSD 分别为 1.42%、1.35%、2.56%、1.45%,结果显示该方法重复性良好。

**2.3.10 加样回收率考察** 取 HGWD 基准样品(HGWD-13)冻干粉 9 份,每份 0.1 g,分别以 0.8:1、1:1、1.2:1 的比例加入各指标成分对照品,按照“2.3.2”项下方法各平行制备 3 份供试品溶液,

按照“2.3.1”项下色谱条件进样分析,计算得芍药苷、肉桂酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、桂皮醛的平均加样回收率分别为 101.26%、92.93%、102.28%、104.06%,RSD 分别为 2.34%、1.90%、2.48%、1.89%,结果显示该方法的准确度良好。

**2.3.11 HGWD 基准样品指标成分定量测定** 分别按照“2.3.2”项下方法制备 15 批 HGWD 基准样品供试品溶液,按照“2.3.1”项下色谱条件测定 15 批 HGWD 基准样品中 4 个指标性成分的含量,结果见表 6。

## 2.4 15 批 HGWD 基准样品中指标成分量值传递关系研究

根据《中国药典》2020 年版的方法测定对应批次饮片中 4 种指标成分的含量,量值传递关系结果如表 6。不同批次 HGWD 基准样品的干膏率在 7.740%~9.293%。由表 6 结果可知,不同批次 HGWD 基准样品中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的质量分数为 0.503~0.920 mg/g,转移率为 23.480%~38.717%;芍药苷质量分数为 16.452~28.520 mg/g,转移率为 36.468%~53.193%;肉桂酸质量分数为 0.344~0.866 mg/g,转移率为 20.054%~33.694%;桂皮醛质量分数为 0.842~1.735 mg/g,转移率为 2.782%~4.570%。

转移率=物质基准中指标性成分含量/对应批次饮片中指标性成分含量

## 3 讨论

### 3.1 指纹图谱参照峰及定量测定指标性成分选择

桂皮醛作为臣药桂枝在《中国药典》2020 年版中的定量测定指标性成分,也是 HGWD 基准样品前期制备工艺研究中的指标性成分。因此,选择峰形好,分离度高、峰面积大的 12 号峰(经指认为桂皮醛)作为指纹图谱的参照峰。

关键信息表中黄芪的基原包括蒙古黄芪和膜荚黄芪 2 种。刘凤波<sup>[11]</sup>和邵杰敏等<sup>[12]</sup>通过比较多批次不同基原不同批次黄芪药材,发现蒙古黄芪总皂苷含量显著高于膜荚黄芪。万燕晴<sup>[13]</sup>和周鹏等<sup>[14]</sup>用 HPLC 法对黄芪中黄酮类成分进行测定,结果发现蒙古黄芪中的总黄酮含量、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素的含量均高于膜荚黄芪。因此,本研究选用蒙古黄芪作为君药黄芪的基原进行研究。毛蕊异黄酮葡萄糖苷作为君药黄芪在《中国药典》2020 年版中的定量测定指标成分,具有抗炎、抗氧化、神经保护、增强免疫、抗癌的作用<sup>[15-17]</sup>。芍药苷作为



表 6 15 批 HGWD 基准样品中指标成分含量及量值传递关系  
Table 6 Index component content in reference sample of 15 batches of HGWD

| 批号              | 毛蕊异黄酮葡萄糖苷/(mg·g <sup>-1</sup> ) |             |           | 芍药苷/(mg·g <sup>-1</sup> ) |         |           | 肉桂酸/(mg·g <sup>-1</sup> ) |        |           | 桂皮醛/(mg·g <sup>-1</sup> ) |        |           | 出膏率/<br>% |
|-----------------|---------------------------------|-------------|-----------|---------------------------|---------|-----------|---------------------------|--------|-----------|---------------------------|--------|-----------|-----------|
|                 | 饮片                              | 基准样品        | 转移率/<br>% | 饮片                        | 基准样品    | 转移率/<br>% | 饮片                        | 基准样品   | 转移率/<br>% | 饮片                        | 基准样品   | 转移率/<br>% |           |
| HGWD-1          | 1.150                           | 0.611       | 28.935    | 24.600                    | 16.452  | 36.468    | 1.415                     | 0.712  | 27.438    | 16.680                    | 1.190  | 3.889     | 9.293     |
| HGWD-2          | 0.990                           | 0.503       | 23.804    | 22.700                    | 20.268  | 41.873    | 1.300                     | 0.627  | 22.635    | 15.819                    | 1.380  | 4.091     | 7.991     |
| HGWD-3          | 1.220                           | 0.594       | 25.318    | 26.700                    | 26.779  | 52.194    | 1.339                     | 0.866  | 33.694    | 15.145                    | 1.004  | 3.453     | 8.871     |
| HGWD-4          | 1.300                           | 0.588       | 23.714    | 23.700                    | 23.058  | 50.959    | 1.300                     | 0.698  | 28.140    | 16.735                    | 1.147  | 3.591     | 8.931     |
| HGWD-5          | 1.280                           | 0.656       | 27.800    | 26.800                    | 26.285  | 53.193    | 1.367                     | 0.770  | 30.579    | 14.251                    | 0.842  | 3.205     | 9.248     |
| HGWD-6          | 1.120                           | 0.689       | 31.022    | 22.800                    | 20.989  | 46.395    | 1.293                     | 0.756  | 29.476    | 15.937                    | 1.137  | 3.597     | 8.590     |
| HGWD-7          | 1.190                           | 0.920       | 38.717    | 26.600                    | 25.802  | 48.558    | 1.398                     | 0.748  | 26.801    | 16.258                    | 1.054  | 3.248     | 8.532     |
| HGWD-8          | 1.110                           | 0.568       | 23.480    | 24.000                    | 24.431  | 46.693    | 1.318                     | 0.710  | 24.713    | 13.861                    | 0.966  | 3.196     | 7.813     |
| HGWD-9          | 1.060                           | 0.536       | 24.268    | 22.200                    | 18.487  | 39.929    | 1.413                     | 0.648  | 22.010    | 16.940                    | 0.983  | 2.782     | 8.173     |
| HGWD-10         | 0.870                           | 0.509       | 30.118    | 26.300                    | 21.132  | 41.378    | 1.413                     | 0.550  | 20.054    | 16.940                    | 1.132  | 3.444     | 8.777     |
| HGWD-11         | 1.280                           | 0.705       | 25.026    | 27.200                    | 27.125  | 45.309    | 1.308                     | 0.703  | 24.406    | 16.043                    | 1.018  | 2.881     | 7.740     |
| HGWD-12         | 0.980                           | 0.512       | 29.613    | 23.900                    | 16.550  | 39.257    | 1.354                     | 0.602  | 25.200    | 14.752                    | 0.857  | 3.290     | 9.260     |
| HGWD-13         | 1.060                           | 0.641       | 34.132    | 26.800                    | 22.347  | 47.154    | 0.850                     | 0.344  | 22.869    | 21.452                    | 1.735  | 4.570     | 9.030     |
| HGWD-14         | 1.260                           | 0.809       | 30.519    | 23.700                    | 23.611  | 47.311    | 1.400                     | 0.762  | 25.852    | 17.226                    | 1.470  | 4.054     | 8.098     |
| HGWD-15         | 1.060                           | 0.611       | 24.407    | 30.400                    | 28.520  | 39.738    | 1.365                     | 0.834  | 25.901    | 15.649                    | 1.050  | 2.842     | 7.916     |
| $\bar{x}$       | 1.129                           | 0.630       | 28.058    | 25.227                    | 22.789  | 45.094    | 1.322                     | 0.689  | 25.985    | 16.246                    | 1.131  | 3.476     | 8.551     |
| 70% $\bar{x}$ ~ | 0.790~1.467                     | 0.441~0.819 | 19.641~   | 17.659~                   | 15.952~ | 31.566~   | 0.926~                    | 0.482~ | 18.189~   | 11.372~                   | 0.792~ | 2.433~    | 7.676~    |
| 130% $\bar{x}$  |                                 |             | 36.476    | 32.795                    | 29.626  | 58.622    | 1.719                     | 0.895  | 33.780    | 21.120                    | 1.470  | 4.518     | 9.406     |

臣药白芍在《中国药典》2020 年版中的定量测定指标成分，具有调节免疫、镇痛、脑缺血后损伤保护、保护心肌细胞、保肝抗抑郁等作用<sup>[18-20]</sup>。肉桂酸为臣药桂枝中的指标成分，具有调节体温、抑菌、镇静、抗焦虑作用<sup>[21-22]</sup>。桂皮醛为臣药桂枝在《中国药典》2020 年版中定量测定指标成分，具有镇痛、抗炎、促进血管舒张的作用<sup>[23]</sup>。

许如玲等<sup>[24]</sup>采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术分析 HGWD 标准煎液中化学成分，共分析和鉴定出 110 种化合物。陈秋谷等<sup>[25]</sup>采用 HPLC-MS 联用的方法同时测定 HGWD 中 21 种成分，方法简便可行，稳定可靠，为质量评价的定量测定成分选择提供参考。谢思梅等<sup>[26]</sup>建立经典名方 HGWD 多指标定量测定及特征图谱方法，分析量值传递规律。但其缺少君药黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的定量测定指标。指纹图谱 PCA 结果表明，芍药苷、肉桂酸均对第 1 主成分有较大贡献，其含量能够客观反映基准样品的质量优劣，故指标性成分最终选择毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芍药苷、肉桂酸和桂皮醛。

3.2 HGWD 基准样品供试品溶液的制备方法 & 色谱条件优化

考虑到方中黄芪、白芍及大枣含多糖类成分较

多，水煎液杂质多且易于霉变，不便于储存、分析；同时为了减少浓缩及干燥过程中高温带来桂皮醛等挥发性成分的损失，以冷冻干燥的方式进行基准样品的制备<sup>[27]</sup>。超声提取具有提取效率高、提取完全的优点<sup>[28]</sup>。因此，本研究选用冷冻干燥后得到的冻干粉作为 HGWD 的物质基准，采用超声的方式进行提取，并选用 100%、80%、50% 甲醇作为溶媒考察其对基准样品的复溶效果。指纹图谱结果显示，50% 甲醇复溶 HGWD 基准样品色谱峰与 100% 甲醇及 80% 甲醇处理的基准样品相比，杂峰干扰较少，色谱峰数量多，分离度好，峰形及色谱峰响应更高；提取溶剂用量为 50 倍时，峰面积较大；超声 15 min 后色谱峰峰面积无显著改变，说明已基本提取完全。综合色谱峰的数量、响应值、分离度等因素，选择 50 倍 50% 甲醇作为溶媒、超声 15 min 处理基准样品进行指纹图谱研究。

对于 HGWD 基准样品指标性成分定量测定来说，选用 100%、80%、50% 甲醇处理基准样品，50% 甲醇处理的样品含量显著高于 100%、80% 甲醇处理的样品；提取溶剂用量为 150 倍时，指标性成分含量最高；超声 15 min 后色谱峰峰面积无显著改变，说明已基本提取完全。故选用 150 倍 50% 甲醇超声

15 min 处理基准样品进行定量测定。

以色谱峰的数量及峰形作为指标,对流动相乙腈-0.2%磷酸水溶液、乙腈-水、甲醇-0.2%甲酸水溶液、乙腈-0.2%甲酸水溶液,检测波长 230、250、270、290 nm,体积流量 0.8、1.0、1.2 mL/min,柱温 25、30、35 °C,进样量 10、20  $\mu$ L 等色谱条件进行考察,最终确定乙腈-0.2%甲酸水溶液为流动相,检测波长为 270 nm,体积流量为 1 mL/min,柱温为 30 °C,进样量为 10  $\mu$ L。

### 3.3 基准样品质量及量值传递研究

以基准样品指标成分转移率及含量在均值的 $\pm 30\%$ 为度量标准,15 批 HGWD 基准样品中芍药苷转移率及含量完全达到要求,但部分批次肉桂酸和毛蕊异黄酮葡萄糖苷各存在 1 个批次不在 $\pm 30\%$ 范围内,其中 HGWD-13 批次的肉桂酸含量略低于度量标准,HGWD-7 批次的毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量略高于度量标准。推测原因可能为肉桂酸含量较小,提取率较低,其允许的波动范围较窄,以及在制备过程中受饮片差异、煎煮环境等影响<sup>[29]</sup>。后续在新药研发过程中可考虑所用饮片的质量一致性或者采用不同批次饮片混批投料,以保证批次间质量一致性及量值传递的均一性。

相似度评价结果表明,不同批次基准样品在化学组成上具有很好的一致性,但含量存在一定差异。PCA 结果显示,第 1 主成分主要反映了君药黄芪及臣药桂枝的信息,结合前 5 个主成分提供的共有峰信息,筛选出毛蕊异黄酮葡萄糖苷、桂皮醛、肉桂酸 3 个差异性成分,可作为评价不同批次 HGWD 基准样品质量的差异性标志物<sup>[30-31]</sup>。

经典名方基准样品作为制剂开发的中间体,是经典名方制剂开发前期的重要部分,也是建立饮片-中间体-制剂质量控制体系的关键,阐明方中关键成分量值传递规律,保证基准样品的均一、稳定,为制剂制备过程的质量传递和质量相关性提供参考<sup>[32]</sup>。本实验采用指纹图谱、干膏率及指标性成分定量测定相结合的方式,对经典名方 HGWD 基准样品的量值传递过程进行分析,初步建立了 HGWD 基准样品质量评价方法,所建立的指纹图谱相似度均大于 0.9,定量测定结果显示,基准样品中各指标成分转移率基本控制在均值的 $\pm 30\%$ ,各批次干膏率转移率均在均值的 90%~110%,表明基准样品制备工艺及转移率较为稳定,为经典名方 HGWD 相关制剂的开发及质量控制提供借鉴。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] 卢广英,王嘉昀,高祖,等.经典名方黄芪桂枝五物汤的研究进展及质量标志物的预测分析[J].中国中药杂志,2023,48(20): 5438-5449.
- [2] 朱垚羽,钱百成,李雅迪,等.黄芪桂枝五物汤的临床应用及作用机制研究进展[J].中医学报, [2024-08-28] (2024-10-30). <http://kns.cnki.net/kcms/detail/41.1411.R.20240827.1202.030.html>.
- [3] 国家食品药品监督管理局.关于印发中药注册管理补充规定的通知[EB/OL]. (2008-01-07) [2024-11-01]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/gzwj/gzwjyp/20080107120001991.html>.
- [4] 张星,张臻,林夏,等.经典名方制剂开发的主要环节关键技术问题探析[J].中草药,2021,52(21): 6724-6731.
- [5] 刘艳梅,黄小丹,彭致铖,等.经典名方桃核承气汤的 UPLC 指纹图谱及多指标成分含量测定研究[J].中草药,2024,55(11): 3689-3704.
- [6] 赵晓霞,阳长明,韩炜,等.试论按古代经典名方目录管理的中药复方制剂的基准样品研究[J].中国中药杂志,2024,49(12): 3404-3408.
- [7] 杨莹,张治国,陈彦静.黄芪桂枝五物汤在心血管疾病中的临床应用与作用机制[J].中国中医基础医学杂志,2023,29(10): 1769-1772.
- [8] 张增辉.浅谈黄芪桂枝五物汤的临床应用[J].内蒙古中医药,2022,41(9): 58-61.
- [9] 王骥远,谭凌婕,陈清光,等.2000—2021 年黄芪桂枝五物汤临床应用情况可视化分析[J].中国中医药信息杂志,2023,30(2): 68-73.
- [10] 唐艳丹,彭永,何顺清,等.经典名方黄芪桂枝五物汤古籍文献分析[J].湖南中医药大学学报,2022,42(12): 2105-2110.
- [11] 刘凤波.黄芪药材质量的差异及影响因素研究[D].北京:北京中医药大学,2013.
- [12] 邵杰敏,连玉菲,阎乐浩,等.不同产地黄芪中的黄芪总皂苷含量对比分析[J].陕西中医,2018,39(2): 268-270.
- [13] 万燕晴.基于化学成分的黄芪药材质量评价研究[D].太原:山西大学,2015.
- [14] 周鹏,胡明勋,李浩飞,等.不同品种、产地和种植方式黄芪药材中黄酮类成分的质量分析[J].中国药房,2016,27(18): 2575-2578.
- [15] 王丹阳,冯毅晖,潘加豪,等.黄芪的主要化学成分及药理作用[J].新农民,2024(24): 126-128.
- [16] 吴娇,全芳超.黄芪的化学成分、药理作用及临床应用[J].滨州医学院学报,2024,47(1): 68-75.

- [17] 谷海媛, 刘杰, 马双成, 等. 黄芪的研究进展及其质量标志物的预测分析 [J]. 中国药事, 2023, 37(10): 1180-1192.
- [18] 沈子芯, 牟春燕, 周雪儿, 等. 白芍及其化学成分的药理作用研究进展 [J]. 江苏中医药, 2024, 56(8): 76-79.
- [19] 姚庄娴, 袁智宇, 郭明真, 等. 白芍及其药对药理作用及临床应用研究进展 [J]. 安徽中医药大学学报, 2024, 43(5): 109-112.
- [20] 崔红倩, 迟宇昊, 申远. 白芍的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 新乡医学院学报, 2024, 41(3): 291-297.
- [21] 李雪, 赵婧含, 吴文轩, 等. 桂枝的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中医药学报, 2023, 51(5): 111-114.
- [22] 朱华, 秦丽, 杜沛霖, 等. 桂枝药理活性及其临床应用研究进展 [J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(22): 61-65.
- [23] 赵凯, 薛培凤, 屠鹏飞. 肉桂的化学成分及其生物活性研究进展 [J]. 内蒙古医科大学学报, 2013, 35 (1): 63-74.
- [24] 许如玲, 范君婷, 董惠敏, 等. 经典名方黄芪桂枝五物汤标准煎液化学成分的上PLC-Q-TOF-MS 分析 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(23): 5614-5630.
- [25] 陈秋谷, 吴锦如, 李常慧, 等. HPLC-MS/MS 法同时测定黄芪桂枝五物汤中 21 种成分的含量 [J]. 中成药, 2025, 47(2): 365-371.
- [26] 谢思梅, 陈盛君, 祝倩倩, 等. 经典名方黄芪桂枝五物汤不同形态基准物质质量评价及分析 [J]. 南京中医药大学学报, 2024, 40(7): 710-721.
- [27] 钟雨虹, 惠玉玉, 田文丽, 等. 经典名方中药复方颗粒剂制备技术的研究进展 [J]. 天津中医药大学学报, 2024, 43(8): 745-751.
- [28] 蔡梦如, 董晓旭, 朱荣玥, 等. 经典名方吴茱萸汤研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(1): 155-159.
- [29] 李月, 吴斌, 高敏洁. 古代经典名方中药复方制剂的研发现状思考及建议 [J]. 中成药, 2024, 46(7): 2488-2492.
- [30] 马宿杉, 苏建, 李舒琪, 等. 基于指纹图谱与化学计量学的藿香正气软胶囊质量控制方法研究 [J]. 中国现代中药, 2024, 26(2): 378-386.
- [31] 马永桦, 田宇柔, 田伟, 等. 基于 HPLC 指纹图谱及化学计量学筛选石楠叶质量标志物及其含量测定研究 [J]. 中国新药杂志, 2023, 32(9): 961-968.
- [32] 刘明松, 邓亚伟, 忻晓东, 等. 经典名方三化汤基准样品量值传递研究 [J]. 中草药, 2023, 54(11): 3501-3511.

[责任编辑 郑礼胜]