

基于多指标定量指纹图谱及大类成分分析的芍药甘草汤基准样品质量评价

袁梦如^{1,2,3}, 姚雪^{1,3}, 闫明^{1,3}, 王振中^{1,3}, 胡军华^{1,3*}, 肖伟^{1,2,3*}

1. 中药制药过程控制与智能制造技术全国重点实验室(江苏康缘药业股份有限公司/南京中医药大学), 江苏 南京 210000
2. 南京中医药大学 康缘中药学院, 江苏 南京 210023
3. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

摘要: **目的** 构建芍药甘草汤基准样品 HPLC 指纹图谱及 11 种成分定量测定方法, 同时建立大类成分总黄酮、总苷、总酚、总多糖的 UV 含量测定手段, 全面评价基准样品的质量, 为芍药甘草汤基准样品质量控制提供依据。 **方法** 运用高效液相色谱法(HPLC)构建芍药甘草汤基准样品的 HPLC 指纹图谱, 并同步实现 11 种指标成分的定量测定, 同时, 结合化学计量学方法, 明确芍药甘草汤基准样品的差异性特征成分; 借助紫外-可见分光光度法, 对芍药甘草汤基准样品中的总黄酮、总苷、总酚、总多糖含量进行检测分析, 在此基础上, 深入剖析 11 个有效成分在总黄酮、总苷、总酚 3 个大类成分中的占比情况, 从而达成对芍药甘草汤基准样品质量的系统性、全面性评价。 **结果** 建立了 17 批芍药甘草汤基准样品指纹图谱, 相似度均大于 0.9, 标定了 13 个共有峰, 指认了其中 11 个色谱峰信息; 17 批芍药甘草汤基准样品中没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷、芹糖甘草苷、甘草苷、苯甲酸、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖、异甘草素、甘草素、异甘草苷、甘草酸铵的质量分数分别为 2.72~4.92、4.82~19.44、29.68~40.98、2.94~6.10、5.47~7.90、1.31~3.44、0.83~1.10、0.67~0.96、0.78~1.52、0.12~0.23、10.16~20.29 mg·g⁻¹, 芍药内酯苷、芍药苷、甘草酸铵为区分不同批次芍药甘草汤基准样品的差异性标志物; 17 批基准样品总黄酮质量分数为 2.25%~3.45%、总苷质量分数为 9.40%~14.18%、总酚质量分数为 0.97%~2.19%、总多糖质量分数为 45.44%~59.47%, 大类成分总质量分数为 62.64%~75.97%; 11 个定量指标在黄酮类、酚酸类、苷类成分占比分别为 44.20%~54.19%、32.95%~59.76%、43.11%~61.70%。 **结论** 建立的指纹图谱及质量分数测定方法可靠, 重复性及准确性良好, 结合化学计量学筛选的质量差异物, 可为后续质量评价研究提供依据。

关键词: 芍药甘草汤; 大类成分; 定量指纹; 紫外-可见分光光度法; 化学计量学; 芍药内酯苷; 芍药苷; 甘草酸铵

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)07-1920-14

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.07.020

Quality evaluation of benchmark samples of Shaoyao Gancao Decoction based on multi-index quantitative fingerprint pattern and large-class component analysis

YUAN Mengru^{1,2,3}, YAO Xue^{1,3}, Yan Ming^{1,3}, WANG Zhenzhong^{1,3}, HU Junhua^{1,3}, XIAO Wei^{1,2,3}

1. State Key Laboratory of Technologies for Chinese Medicine Pharmaceutical Process Control and Intelligent Manufacture (Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd. & Nanjing University of Chinese Medicine), Nanjing 210000, China.
2. Kanion School of Chinese Material Medica, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China.
3. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China.

Abstract: Objective HPLC fingerprint chromatogram of the benchmark sample of the Shaoyao Gancao Decoction and the quantitative determination method of 11 components were established. Meanwhile, the UV content determination methods of the major components such as total flavonoids, total glycosides, total phenols and total polysaccharides were developed to comprehensively evaluate the quality of the benchmark sample and provide a basis for the quality control of the benchmark sample of the Shaoyao Gancao Decoction. **Methods** The HPLC fingerprint chromatogram of the benchmark sample of the Shaoyao Gancao Decoction was

收稿日期: 2025-02-28

基金项目: 国家工信部产业基础再造和制造业高质量发展专项(2440STCZB2614)

作者简介: 袁梦如(2000—), 硕士研究生, 研究方向为中药制药技术与产品开发。E-mail: yuanmengru0719@163.com

*通信作者: 肖伟, 中国工程院院士, 研究员, 博士生导师, 从事中药新药研发及过程质量控制研究。E-mail: kanionlunwen@163.com
胡军华, 女, 高级研究员, 从事中药质量标准研究。E-mail: hujunhua2001@163.com

constructed by HPLC, and the quantitative determination of 11 index components was simultaneously achieved. In addition, the characteristic components of the benchmark sample of the Shaoyao Gancan Decoction were identified by chemometrics. The contents of total flavonoids, total glycosides, total phenols and total polysaccharides in the benchmark sample of the Shaoyao Gancan Decoction were detected by UV spectrophotometry. On this basis, the proportion of 11 effective components in the three major components of total flavonoids, total glycosides and total phenols was analyzed in depth to achieve a systematic and comprehensive evaluation of the quality of the benchmark sample of the Shaoyao Gancan Decoction. **Results** The HPLC fingerprint chromatograms of 17 batches of benchmark samples of the Shaoyao Gancan Decoction were established, with similarity greater than 0.9. Thirteen common peaks were identified, and the information of 11 chromatographic peaks was recognized. The mass fractions of gallic acid, paeoniflorin, paeonol, apioside, liquiritin, benzoic acid, 1, 2, 3, 4, 6-pentagalloyl glucose, isoliquiritigenin, liquiritigenin, isoliquiritin and ammonium glycyrrhizinate in 17 batches of benchmark samples of the Shaoyao Gancan Decoction were 2.72—4.92, 4.82—19.44, 29.68—40.98, 2.94—6.10, 5.47—7.90, 1.31—3.44, 0.83—1.10, 0.67—0.96, 0.78—1.52, 0.12—0.23 and 10.16—20.29 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively. Paeoniflorin, paeonol and ammonium glycyrrhizinate were the differential markers for distinguishing different batches of benchmark samples of the Shaoyao Gancan Decoction. The contents of total flavonoids, total glycosides, total phenols and total polysaccharides in 17 batches of benchmark samples were 2.25%—3.45%, 9.40%—14.18%, 0.97%—2.19% and 45.44%—59.47%, respectively. The total content of major components was 62.64%—75.97%. The proportions of 11 quantitative indicators in flavonoids, phenolic acids and glycosides were 44.20%—54.19%, 32.95%—59.76% and 43.11%—61.70%, respectively. **Conclusion** The established fingerprint chromatogram and content determination method were reliable, with good repeatability and accuracy. Combined with the quality difference substances screened by chemometrics, it can provide a basis for subsequent quality evaluation research.

Key words: Shaoyao Gancan Decoction; large class of ingredients; quantitative fingerprinting; UV-Vis spectrophotometry; chemoichiometry; paeoniflorin; paeonolide; ammonium glycyrrhizinate

刘孝昌等^[1]指出中药中的次生代谢物是中药有效成分的物质基础,其常见类型包括生物碱类、黄酮类、萜类、蒽醌类等。由于次生代谢物具有结构复杂多样性的特征,导致部分特定结构的化合物存在显著的含量差异性,单一成分的质量控制难以全面反映中药整体质量。有研究发现,药物有效成分活性高低与药物分离程度成反比,当成分分离至单一状态时,其药理活性往往低于混合状态的总成分^[2],因此,在新药研发中,聚焦于多成分-多靶点-多通路协同作用的整体质量控制模式更具科学价值,而各大类成分的含量研究是该模式的核心环节。目前,大类成分含量测定常采用紫外-可见(UV-Vis)分光光度法,通过特定波长下的吸光度(A)加和性表征混合体系的总量信息。然而,该方法可能受体系内其他成分的特异性干扰。通过HPLC的分离功能解析复杂体系中的各组分贡献,结合UV-Vis的总量测定优势,对于大类成分的精准定量与质量溯源具有重要意义。

经典名方芍药甘草汤收录于《古代经典名方目录(第一批)》^[3],首载于东汉张仲景的《伤寒杂病论》,原文为“伤寒脉浮,自汗出,小便数,心烦,微恶寒,脚挛急……更作芍药甘草汤与之,其脚即伸^[4]”。全方由白芍、炙甘草两味药组成,具有柔肝阴、柔筋止痛之效,是中医临床常用的缓急止痛之

方^[5],其中甘草具有抗肿瘤、抗炎、抗病毒、保肝等作用^[6],白芍可镇痛、调节免疫、保肝、抗郁、保护心血管、调节胃肠道功能^[7]。化学成分研究表明,芍药甘草汤内主要含黄酮类、三萜皂苷类、单萜苷类、小分子酚酸类、多糖类及其他类化学成分^[8],其中黄酮类、三萜皂苷类成分、多糖类主要来源于甘草,单萜苷类、小分子酚酸类主要来源于白芍。

以芍药甘草汤为例,近10年相关成分研究虽已从单药(甘草、白芍提取物)层面逐步转向复方体系层面,但研究内容仍以化学成分组成解析及指纹图谱构建为主。单一依赖指纹相似度评价质量的方式存在明显局限性^[10]。中药指纹图谱具备整体性与模糊性特征,能够最大程度体现样品中的定量与定性信息,进而实现对中药及其制剂质量的综合评价^[11]。近年来,指纹图谱与有效成分定量相结合、化学计量学分析与药效关联研究,已成为中药质量标准创新的重要方向^[12]。本研究采用指纹图谱结合含量测定的方法,运用UV-Vis分光光度法测定总黄酮、总苷、总酚、总多糖等大类成分的含量,并结合聚类分析(CA)、主成分分析(PCA)及正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA),量化多批次基准样品的成分组成差异,明确可控成分的占比分布,从而为芍药甘草汤质量标准的科学化构建提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司; KQ-500DB 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; AL204 型万分之一天平, 梅特勒-托利多仪器上海有限公司; XP6 型百万分之一电子分析天平, 梅特勒-托利多仪器上海有限公司; Milli-Q Academic 纯水仪, 美国密理博公司; H1650-W 型医用离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; HH-6 数显恒温水浴锅, 金坛市康华仪器制造有限公司; UV-2700 紫外分光光度计, 日本岛津公司; ZQTY-50F 台式震荡培养箱, 上海知楚仪器有限公司。

1.2 材料

对照品甘草苷(质量分数 95.2%, 批号 111610-202209)、甘草酸铵(质量分数 94.4%, 批号 110731-202122)、D-无水葡萄糖(质量分数 99.9%, 批号 110833-202109)、没食子酸(质量分数 91.5%, 批号 110831-2016050)、芍药苷(质量分数 98.1%, 批号 110736-202447)、苯甲酸(质量分数 99.9%, 批号 100419-201703), 均购自中国食品药品检定研究院; 芍药内酯苷(质量分数 95.0%, 批号 ST240711-071)、异甘草苷(质量分数 99.7%, 批号 DST240720-0151)、甘草素(质量分数 99.7%, 批号 DSTDG001002), 均购自成都乐美天医药科技有限公司; 芹糖甘草苷(质量分数 98.0%, 批号 12797)、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖(质量分数 99.7%, 批号 17060201)、异甘草素(质量分数 99.7%, 批号 12750), 均购自上海诗丹德标准技术有限公司。乙腈为色谱纯, 乙醇为分析纯, 超纯水为实验室自制。

1.3 药材

药材均经沈阳药科大学贾景明教授鉴定, 甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎, 白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根。芍药甘草汤样品 Y1、S1~S9 所用药材购于亳州庭鑫堂药业有限公司, 芍药甘草汤样品 S10~S17 所用药材购于安徽新盛中药饮片有限公司, 详见表 1。

2 方法与结果

2.1 17 批芍药甘草汤基准样品的制备

1 批质控样品及 17 批基准样品各味药材均产自道地产区或主产区。采用随机数表法, 将基准样品中 2 味药各 17 批次药材组合成 17 批芍药甘草汤基准样品, 见表 1。

表 1 1 批芍药甘草汤质控样品及 17 批芍药甘草汤基准样品对应饮片批号

Table 1 One batch of quality control samples of Shaoyao Gancao Decoction and 17 batches of Shaoyao Gancao Decoction reference samples corresponding to batch numbers

样品	白芍		甘草	
	批号	产地	批号	产地
Y1(质控)	230209	安徽	230227	新疆
S1	230205	安徽	230228	内蒙古
S2	230206	安徽	230237	新疆
S3	230207	安徽	230234	新疆
S4	230208	安徽	230235	新疆
S5	230211	安徽	230236	新疆
S6	230217	安徽	230240	甘肃
S7	230215	安徽	230224	内蒙古
S8	230216	安徽	230232	新疆
S9	230220	安徽	230226	内蒙古
S10	2302542-1	安徽	230225	内蒙古
S11	2302542-2	浙江	230229	内蒙古
S12	2302542-3	安徽	230230	内蒙古
S13	2302542-4	浙江	230238	甘肃
S14	2302542-5	安徽	230231	新疆
S15	2302542-6	安徽	230223	内蒙古
S16	2302542-7	浙江	230239	甘肃
S17	2302542-8	浙江	230233	新疆

本方中白芍以生品入药, 甘草需炮制为炒甘草, 经查阅文献, 结合关键信息及工艺考察后确定炒甘草工艺为: 取甘草原药材, 除去杂质, 洗净, 湿毛巾覆盖闷润 3~4 h, 润至内外湿度一致、切厚片(2~4 mm), 将饮片至炒锅内, 用文火炒至表面微黄, 略有焦香气, 即得。所用药材及饮片均由康缘药业股份有限公司提供, 按照《中国药典》2020 年版及内控标准检测, 均符合要求。根据国家公布关键信息及关键工艺参数^[13]考察后确定芍药甘草汤基准样品制备工艺, 具体步骤如下: 取白芍、炒甘草饮片各 55.20 g, 分别置于煎药壶中, 加入 600 mL 纯化水, 浸泡 30 min, 煎煮时闭盖, 武火煮沸后转为文火煎至约 300 mL, 趁热使用 200 目纱布自然过滤, 直接冷冻干燥。即得芍药甘草汤质控样品(Y1)及芍药甘草汤基准样品(S1~S17)喷干粉。同法制备缺甘草、缺白芍阴性样品。

2.2 指纹图谱研究

2.2.1 色谱条件 采用 Waters XBridge C₁₈ 色谱柱(150mm×4.6 mm, 3.5 μm), 流动相为乙腈(A)-

0.05%磷酸溶液(B),梯度洗脱0~8 min, 7%~14% A; 8~10 min, 14%~16% A, 10~20 min, 16%~18% A; 20~26 min, 18%~22% A; 26~29 min, 22%~30% A; 29~41 min, 30%~33% A; 41~53 min, 33%~45% A; 53~57 min, 45%~70% A; 57~60 min, 70%~90% A; 60~65 min, 90% A, 柱温 25 ℃, 体积流量 $0.4\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 检测波长为 230 nm, 进样量 $2\text{ }\mu\text{L}$ 。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取样品 2 g, 置 150 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 50 mL 水, 密塞, 称定质量, 加热回流提取 1 h。放冷, 再称定质量, 用水补足减失的质量, 摇匀, 以 $12000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min (离心半径 10 cm), 即得各供试品溶液。同法制备缺白芍、缺甘草阴性样品溶液。

2.2.3 对照品溶液的制备 精密称取对照品没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷、芹糖甘草苷、甘草苷、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖、苯甲酸、异甘草素、甘草素、异甘草苷、甘草酸铵适量, 加乙醇配制成质量浓度分别为 0.152 9、0.202 5、0.798 3、0.109 4、0.154 9、0.031 5、0.029 4、0.020 2、0.030 9、0.021 1、0.394 9 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.2.4 精密度实验 取质控样品 Y1, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.2.1”项下条件进样分析, 连续进样 6 次, 利用中药色谱指纹图谱相似

度评价系统(2012 版)计算色谱图相似度均为 1.000, 表明仪器精密度良好。

2.2.5 重复性实验 取质控样品 Y1, 按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按照“2.2.1”项下条件进样分析, 利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)计算色谱图相似度均为 1.000, 表明该方法重复性良好。

2.2.6 稳定性实验 取 Y1 溶液, 分别于制备后 0、4、8、12、15、21、25、30 h、按照“2.2.1”项下条件进样分析, 利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)计算色谱图相似度均为 1.000。表明供试品溶液 30 h 内稳定。

2.2.7 指纹图谱的建立及相似度评价 按照“2.2.2”项下方法制备 17 批芍药甘草汤基准样品的供试品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图。将 17 批芍药甘草汤基准样品数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版), 以样品 S1 为参照图谱, 采用中位数法, 时间窗宽度为 0.1 min, 色谱峰多点校正, 生成对照指纹图谱(图 1)。以峰 4 (芍药苷) 为对照峰, 共标定 11 个共有峰。

精密吸取“2.2.2”项下对照品溶液、阴性样品溶液、供试品溶液, 按照“2.2.1”项下条件进样分析, 根据紫外吸收及对照品标定出峰时间对比, 指认出

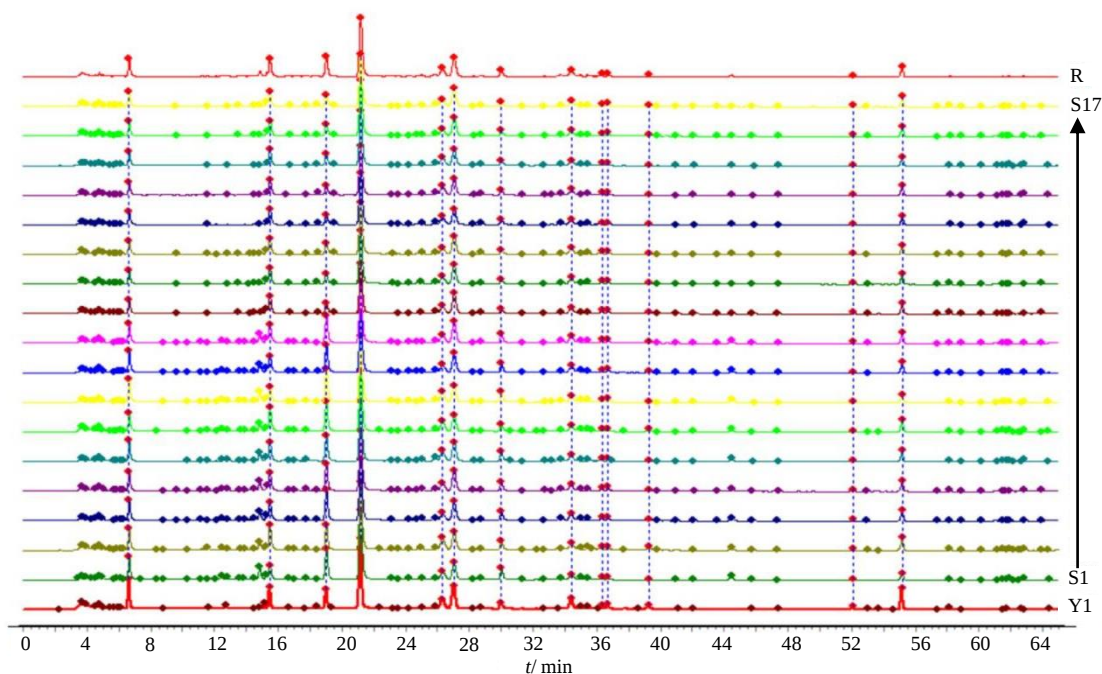
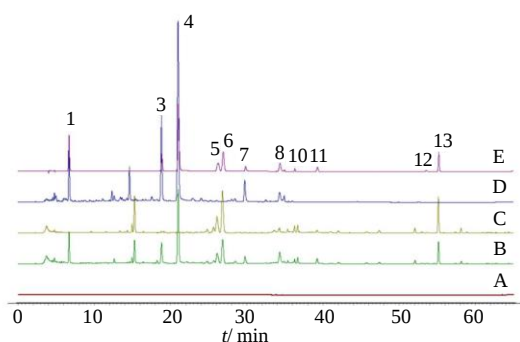


图 1 17 批芍药甘草汤基准样品(S1~S17)、1 批芍药甘草汤质控样品(Y1)和对照图谱(R)的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of 17 batches of benchmark samples (S1~S17) of Shaoyao Gancao Decoction, one batch of quality control sample (Y1) of Shaoyao Gancao Decoction, and the reference chromatogram (R)

11 个色谱峰(图 2)。峰 1(没食子酸)、峰 3(芍药内酯苷)、峰 4(芍药苷)、峰 7(1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖)、峰 8(苯甲酸)来源于白芍,峰 5(芹糖甘草苷)、峰 6(甘草苷)、峰 10(异甘草素)、峰 11(甘草素)、峰 12(异甘草苷)、峰 13(甘草酸铵)。将样品与对照指纹图谱进行相似度评价分析,计算得到 17 批芍药甘草汤样品(S1~S17)、芍药甘草汤质控样品(Y1)与对照指纹图谱(R)的相似度结果分别为 0.992、0.989、0.996、0.992、0.995、0.996、0.989、0.987、0.994、0.997、0.990、0.990、0.992、0.991、0.990、0.992、0.993、0.992,相似度均较高,表明各批次样品间较稳定,质量一致性良好。



1-没食子酸; 3-芍药内酯苷; 4-芍药苷; 5-芹糖甘草苷; 6-甘草苷; 7-1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖; 8-苯甲酸; 10-异甘草素; 11-甘草素; 12-异甘草苷; 13-甘草酸铵。

1-gallic acid; 3-paeoniflorin; 4-paeoniflorin; 5-apirandin; 6-glycyrrhizin; 7-1,2,3,4,6-pentagalloylglucose; 8-benzoic acid; 10-isoglycyrrhizin; 11-glycyrrhizin; 12-isoglycyrrhizin; ammonium 13-glycyrrhizinate.

图 2 空白溶剂(A)、Y1 样品溶液(B)、缺白芍样品溶液(C)、缺甘草样品溶液(D)、混合对照品溶液(E)的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC chromatograms of blank solvent (A), Y1 sample solution (B), sample solution lacking peony (C), sample solution lacking licorice (D), and mixed reference substance solution (E)

2.3 芍药甘草汤多成分含量测定

2.3.1 色谱条件 用 Waters XBridge C₁₈ 色谱柱(150mm×4.6 mm, 3.5 μm), 流动相为乙腈(A)-0.05%磷酸溶液(B), 梯度洗脱 0~8 min, 7%~14% A; 8~10 min, 14%~16% A; 10~20 min, 16%~18% A; 20~26 min, 18%~22% A; 26~29 min, 22%~30% A; 29~41 min, 30%~33% A; 41~53 min, 33%~45% A; 53~57 min, 45%~70% A; 57~60 min, 70%~90% A; 60~65 min, 90% A, 柱温 25 °C, 体积流量 0.4 mL·min⁻¹, 检测波长为 230、360、265 nm (230 nm

下检测芍药苷、芍药内酯苷、甘草苷、芹糖甘草苷、没食子酸、苯甲酸、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖; 360 nm 下测定异甘草素、异甘草苷; 265 nm 下测定甘草素和甘草酸铵), 进样量 2 μL。

2.3.2 线性关系考察 分别精密称取没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷、芹糖甘草苷、甘草苷、苯甲酸、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖、异甘草素、甘草素、异甘草苷、甘草酸铵共 11 个对照品适量, 加 80%乙醇溶解, 制成质量浓度分别为 0.277 5、0.389 1、1.157 6、0.200 7、0.291 7、0.069 1、0.067 4、0.044 5、0.067 2、0.021 0、0.762 9 mg·mL⁻¹ 的混合对照品母液。分别吸取母液稀释成 5 个质量浓度, 以质量浓度为横坐标, 峰面积作为纵坐标进行线性分析, 拟合得到回归方程及线性范围分别为, 没食子酸 $Y=12\,104X+7.366\,2$, $R^2=0.999\,9$, 线性范围 0.013 9~0.277 5 mg·mL⁻¹; 芍药内酯苷 $Y=5\,674X-4.657\,3$, $R^2=1.000\,0$, 线性范围 0.019 5~0.389 1 mg·mL⁻¹; 芍药苷 $Y=6\,255.8X-14.186$, $R^2=1.000\,0$, 线性范围 0.057 9~1.157 6 mg·mL⁻¹; 芹糖甘草苷 $Y=7\,675.8X-19.777$, $R^2=0.999\,7$, 线性范围 0.010 0~0.200 7 mg·mL⁻¹; 甘草苷 $Y=9\,679.9X-1.433\,3$, $R^2=0.999\,8$, 线性范围 0.014 6~0.291 7 mg·mL⁻¹; 1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖 $Y=11\,465X-17.67$, $R^2=0.999\,9$, 线性范围 0.003 5~0.069 1 mg·mL⁻¹; 苯甲酸 $Y=23\,381X+17.266$, $R^2=0.999\,5$, 线性范围 0.003 4~0.134 9 mg·mL⁻¹; 异甘草素 $Y=9\,679.9X-1.433\,3$, $R^2=0.999\,9$, 线性范围 0.002 2~0.044 4 mg·mL⁻¹; 甘草素 $Y=10\,479X-1.762\,3$, $R^2=0.999\,9$, 线性范围 0.003 4~0.067 2 mg·mL⁻¹; 异甘草苷 $Y=67\,474X-7.366\,6$, $R^2=0.999\,9$, 线性范围 0.001 0~0.021 0 mg·mL⁻¹; 甘草酸铵 $Y=2\,677.4X-4.817\,8$, $R^2=1.000\,0$, 线性范围 0.038 1~0.762 9 mg·mL⁻¹, 11 个成分线性关系良好, 符合含量测定要求。

2.3.3 精密度试验 取 Y1, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 连续进样 6 次, 按照“2.2.1”项下条件进样分析, 计算没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷、芹糖甘草苷、甘草苷、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖、苯甲酸、异甘草素、甘草素、异甘草苷、甘草酸铵峰面积的 RSD 为 0.29%、0.27%、0.28%、0.79%、0.39%、0.39%、0.30%、0.25%、0.20%、0.26%、0.21%, 表明仪器精密度良好。

2.3.4 重复性试验 取质控样品 Y1, 按“2.2.2”项

下方法平行制备 6 份供试品溶液,按照“2.2.1”项下条件进样分析,计算没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷、芹糖甘草苷、甘草苷、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖、苯甲酸、异甘草素、甘草素、异甘草苷、甘草酸铵质量分数均值分别为 2.99、5.62、21.32、2.94、4.66、1.20、0.95、0.55、0.85、0.13、11.86 mg·g⁻¹,RSD 分别为 0.37%、0.28%、0.50%、0.20%、0.23%、2.00%、1.36%、0.63%、0.53%、1.09%、0.19%,表明该方法重复性良好。

2.3.5 稳定性试验 取质控样品 Y1,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别于制备后室温放置 0、4、8、12、15、21、25、30 h、按照“2.2.1”项下条件进样分析,计算没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷、芹糖甘草苷、甘草苷、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖、苯甲酸、异甘草素、甘草素、异甘草苷、甘草酸铵含量 RSD 为 0.22%、0.24%、0.23%、0.26%、0.18%、1.42%、0.25%、0.57%、0.85%、0.58%、0.22%,表明供试品溶液在室温下 30 h 内稳定。

2.3.6 加样回收率试验 精密称取 1 g 质控样品 Y1,置 150 mL 具塞锥形瓶中,按照芍药甘草汤基准样品中已知含量 100%加入没食子酸、芍药内酯苷、芍药

苷、芹糖甘草苷、甘草苷、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖、苯甲酸、异甘草素、甘草素、异甘草苷、甘草酸铵,按照“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按照“2.2.1”项下条件进样分析,并计算各指标成分的回收率,11 种指标成分平均加样回收率分别为 91.3%、104.7%、94.8%、90.9%、90.9%、95.4%、88.3%、87.1%、106.5%、107.6%、93.3%、RSD 分别为 0.79%、0.90%、0.54%、1.17%、0.56%、2.68%、3.18%、1.27%、0.77%、1.00%、0.87%,RSD 均小于 4%,结果表明该方法准确度良好,方法可行。

2.3.7 样品含量测定 按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按照“2.2.1”项下色谱条件测定,计算 1 批芍药甘草汤质控样品及 17 批芍药甘草汤基准样品中没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷、芹糖甘草苷、甘草苷、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖、苯甲酸、异甘草素、甘草素、异甘草苷、甘草酸铵含量,结果见表 2。

2.4 化学计量学分析

2.4.1 CA 以 17 批芍药甘草汤基准样品中没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷、芹糖甘草苷、甘草苷、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖、苯甲酸、异甘草素、

表 2 芍药甘草汤基准样品中 11 个成分含量

Table 2 Content of 11 components in the benchmark sample of Shaoyao Gancao Decoction

样 品	质量分数/(mg·g ⁻¹)										
	没食 子酸	芍药内 酯苷	芍药苷	芹糖甘 草苷	甘草苷	1, 2, 3, 4, 6- 五没食子酰 葡萄糖	苯甲酸	异甘 草素	甘草素	异甘 草苷	甘草 酸铵
Y1	2.99	5.62	21.32	2.94	4.66	1.20	0.95	0.55	0.85	0.13	11.86
S1	4.92	18.33	40.98	4.42	6.15	3.44	0.83	0.73	1.45	0.22	20.18
S2	4.52	13.57	39.13	6.10	6.63	2.6	1.08	0.83	1.46	0.23	20.03
S3	4.52	17.64	35.07	3.76	7.10	2.66	1.10	0.90	1.52	0.23	19.98
S4	4.11	15.98	34.77	3.78	7.59	2.51	1.07	0.94	0.78	0.13	10.21
S5	4.49	14.64	35.24	5.19	7.10	2.93	1.09	0.89	0.78	0.12	10.16
S6	4.07	16.88	35.98	5.50	6.06	2.11	0.96	0.76	1.46	0.22	20.29
S7	4.90	19.44	38.88	4.99	5.98	3.16	1.10	0.75	1.46	0.22	20.26
S8	4.57	16.58	36.22	4.06	7.20	2.75	1.10	0.89	1.45	0.22	20.15
S9	4.11	16.04	36.99	3.97	7.90	2.64	1.08	0.96	1.45	0.22	20.16
S10	2.79	6.03	30.03	3.63	7.38	1.31	0.98	0.88	1.48	0.23	19.97
S11	2.75	5.46	31.76	3.43	6.98	1.42	0.94	0.82	1.51	0.23	19.85
S12	2.72	6.05	30.89	3.02	6.60	1.44	0.94	0.81	0.78	0.13	10.25
S13	2.74	5.16	31.16	3.91	5.49	1.48	0.88	0.67	0.78	0.12	10.16
S14	2.8	4.82	29.68	4.30	5.89	1.46	0.91	0.74	1.45	0.22	20.16
S15	3.01	6.04	32.91	3.70	5.47	1.62	0.93	0.69	1.45	0.22	20.15
S16	3.02	6.14	33.26	2.94	6.52	1.64	0.88	0.83	1.45	0.22	20.13
S17	2.99	5.74	31.09	2.98	6.34	1.36	0.93	0.81	1.45	0.22	20.11

甘草素、异甘草苷、甘草酸铵含量为变量，将数据导入 SPSS 27.0 数据分析软件数据进行 CA，结果见图 3。当平方欧氏距离达到 25 时，芍药甘草汤基准样品聚为 2 类，S1~S9 聚为第 1 类，S10~S17 聚为第 2 类，结果表明，药材产地差异可通过稳定的制备工艺传递至基准样品，尽管不同产地药材的指纹图谱相似性较高，但其化学成分的含量差异在基准样品定量研究中被有效表征。该结果从物质基础层面揭示了药材产地对芍药甘草汤质量的潜在影响，需在质量控制中予以关注。

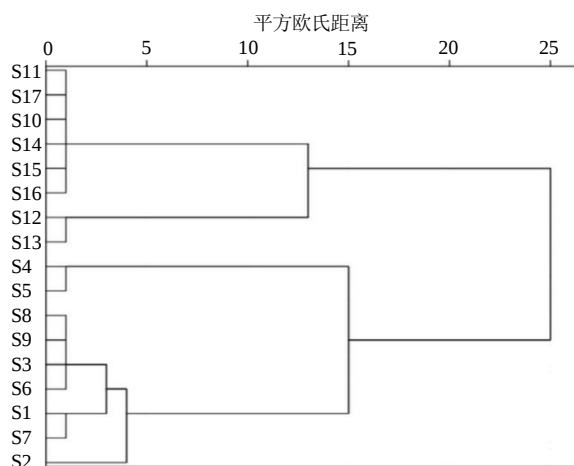


图 3 17 批芍药甘草汤基准样品的 CA 图

Fig. 3 CA diagram of 17 batches of benchmark sample of Shaoyao Gancao Decoction

2.4.2 PCA 运用 SPSS 27.0 数据分析软件进行凯泽-迈耶-奥尔金 (KMO) 检验及巴特利特球形度检验，结果表明，KMO 值为 0.609，并且巴特利特球形度检验的显著性水平接近于 0，表明 11 个成分含量变量间存在显著相关性，满足因子分析的前提条件，可对多批次芍药甘草汤基准样品的成分含量数据展开进一步分析。以特征值>1 为筛选条件提取主成分，共得到 3 个主成分，其累积贡献率为 90.906% (表 3)，说明所选主成分能充分反映原始数据信息，可作为质量评价指标。经最大方差法正交旋转后，公共因子载荷矩阵 (表 4) 显示，主成分 1 与没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷、芹糖甘草苷、1, 2, 3, 4, 6-五没食子酰葡萄糖、苯甲酸的相关性较强；主成分 2 与甘草素、异甘草苷、甘草酸铵的关联性显著；主成分 3 与甘草苷、异甘草素的相关性突出。此外，以 17 批基准样品的 11 种成分含量为变量，运用 SIMCA14.1 软件构建 PCA 模型，经分析生成的得分矩阵图见图 4。

表 3 主成分特征值与方差贡献率

Table 3 Eigenvalues and variance contribution rates of principal components

成分	初始特征值		
	特征值	贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	4.911	44.642	44.642
2	3.042	27.653	72.295
3	2.047	18.610	90.906

表 4 公共因子成分矩阵

Table 4 Common factor component matrix

变量	成分矩阵		
	主成分 1	主成分 2	主成分 3
没食子酸	0.968	-0.048	-0.193
芍药内酯苷	0.950	-0.089	-0.125
芍药苷	0.891	0.107	-0.309
芹糖甘草苷	0.637	0.042	-0.480
甘草苷	0.408	-0.356	0.807
1, 2, 3, 4, 6-五没食子酰葡萄糖	0.927	-0.113	-0.236
苯甲酸	0.707	-0.304	0.358
异甘草素	0.441	-0.367	0.805
甘草素	0.224	0.941	0.250
异甘草苷	0.224	0.932	0.279
甘草酸铵	0.229	0.947	0.214

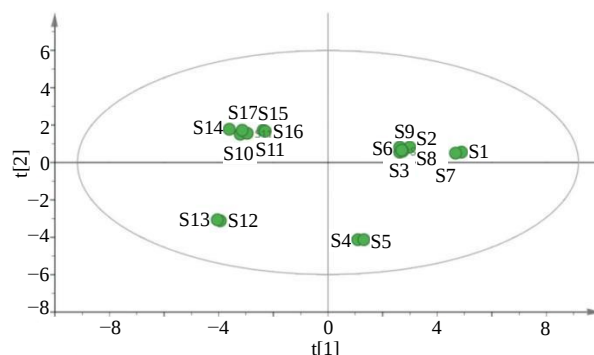


图 4 PCA 得分图

Fig. 4 Principal component analysis score plot

2.4.3 OPLS-DA 为分析影响芍药甘草汤基准样品质量的差异标志物，以 17 批芍药甘草汤基准样品中 11 种成分含量为变量，应用 SIMCA14.1 软件建立 OPLS-DA 模型，该模型 $R_x^2=0.934$ ， $R_y^2=0.983$ ， $Q^2=0.966$ ，均大于 0.5，表明模型稳定可行，可用于不同批次芍药甘草汤基准样品中差异标志物筛选。OPLS-DA 得分图见图 5。由得分图可知，与 17 批样品的 CA、PCA 结果相一致。

为避免模型过度拟合造成结果假阳性，设置分

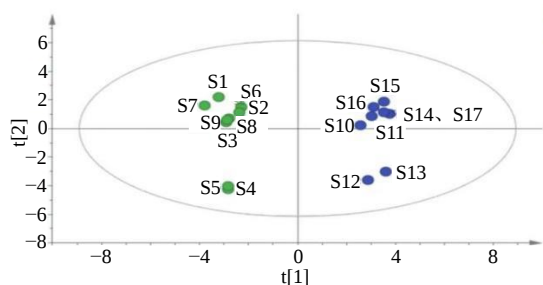


图 5 17 批芍药甘草汤基准样品 OPLS-DA 得分图

Fig. 5 OPLS-DA score of 17 batches of Shaoyao Gancao Decoction benchmark samples

类 Y 矩阵变量随机排列 200 次做置换检验, 检验图见图 6。结果最右侧的 R^2 值和 Q^2 值均高于左侧, R^2 回归线 Y 轴截距为 0.172、 Q^2 回归线在 Y 轴截距为 -0.659, 说明模型未出现过拟合现象, 可用于判别分析 17 批样品的组间差异。以变量重要性投影值 (VIP) > 1 为标准, 筛选出芍药内酯苷 (2.2284)、芍药苷 (1.5848)、甘草酸铵 (1.2188) 3 种关键成分, 可能是引起芍药甘草汤基准样品质量差异的主要特征成分, VIP 得分见图 7。

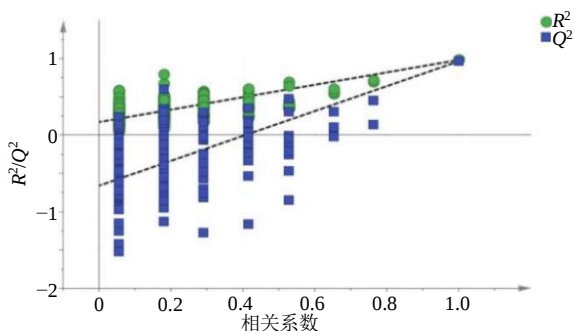


图 6 17 批芍药甘草汤基准样品 200 次检验置换图

Fig. 6 200 inspection displacement diagrams of 17 batches of Shaoyao Gancao Decoction benchmark samples

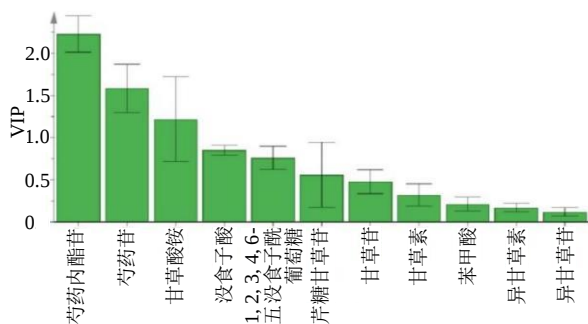


图 7 17 批芍药甘草汤基准样品 11 种成分的 VIP 图

Fig. 7 VIP diagram of 11 components of 17 batches of Shaoyao Gancao Decoction benchmark

2.5 总黄酮、总苷、总酚酸、总多糖大类成分含量测定

2.5.1 对照品溶液制备 精密称取甘草苷对照品适量, 加甲醇制成质量浓度为 $0.0825 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的甘草苷对照品溶液作为总黄酮含量测定对照品母液; 精密称取甘草酸铵对照品适量, 加甲醇制成质量浓度为 $0.1916 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的甘草酸铵作为总苷含量测定对照品母液; 精密称取没食子酸对照品适量, 加乙醇制成质量浓度为 $0.0249 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的没食子酸对照品溶液作为总酚酸含量测定母液; 精密称取 D-无水葡萄糖对照品适量, 加水制成质量浓度为 $0.3010 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 D-无水葡萄糖对照品溶液作为总多糖含量测定母液。

2.5.2 供试品溶液制备及测定 (1) 总黄酮: 精密吸取“2.2.2”项下供试品溶液 $100 \mu\text{L}$ 于 10 mL 量瓶中, 用甲醇补足体积至 2 mL , 加入 $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 氢氧化钾溶液 1 mL , 充分摇匀, 静置 5 min , 加水定容, 充分摇匀后于 334 nm 下测定 A 值, 根据标准曲线计算供试品溶液中总黄酮含量。

(2) 总苷: 精密量取“2.2.2”项下供试品溶液 $100 \mu\text{L}$ 于 10 mL 试管中挥干溶剂, 加 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL , 摇匀, 加 0.8 mL 高氯酸, 摇匀, 于 60°C 水浴锅下加热 15 min , 取出冰浴冷至室温, 加入冰醋酸 5 mL , 稀释, 充分摇匀后于 596 nm 下测定 A 值。根据标准曲线计算供试品溶液中总苷含量。

(3) 总酚酸: 精密量取“2.2.2”项下供试品溶液 $200 \mu\text{L}$ 于 10 mL 量瓶中, 加水至刻度线稀释, 再精密移取稀释后溶液 1 mL 至 25 mL 量瓶, 用乙醇补足体积至 5.0 mL 再分别精密加入 0.3% 的十二烷基硫酸钠溶液 2 mL , 0.6% 的铁氰化钾- 0.9% 的三氯化铁 (1:1) 混合溶液 1 mL , 摇匀, 暗处放置 5 min 。用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液定容至刻度, 摇匀, 在暗处放置 20 min , 充分摇匀后于 280 nm 测定 A 值。根据标准曲线计算供试品溶液中总酚酸含量。

(4) 总多糖: 精密量取“2.2.2”项下供试品溶液 $500 \mu\text{L}$ 于 10 mL 量瓶中, 加水至刻度线稀释, 再精密移取稀释后溶液 0.1 mL 于 10 mL 试管中, 加水补足体积至 2 mL , 置冰水中加 0.2% 硫酸蒽酮溶液至试管 10 mL 刻度线, 摇匀放冷后沸水浴 10 min , 再置冰水浴 10 min , 充分摇匀后于 626 nm 测定 A 值。根据标准曲线计算供试品溶液中总多糖含量。

2.5.3 线性关系考察 (1) 总黄酮: 精密量取甘草苷对照品溶液 0.2 、 0.4 、 0.8 、 1.0 、 1.5 、 2.0 mL

分别置于 10 mL 量瓶中, 甲醇补足体积至 2.0 mL, 加入 $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 氢氧化钾溶液 0.5 mL, 静置 5 min, 用甲醇定容至刻度。充分摇匀后测定 A 值。以 $A(Y)$ 为纵坐标, 甘草苷溶液浓度 (X) 为横坐标, 绘制标准曲线。拟合方程为 $Y=0.0623X+0.0075$, $r=0.9998$, 线性范围 $1.6508 \sim 16.5077 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

(2) 总苷: 精密吸取甘草酸铵对照品溶液 0.25、0.50、0.75、1.00、1.50、2.00 mL 分别置于 10 mL 试管中挥干溶剂, 加 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL, 摇匀, 加 0.8 mL 高氯酸, 摇匀, 于 60°C 水浴锅下加热 15 min, 取出冰浴冷至室温, 加入冰醋酸 5 mL 稀释^[14], 充分摇匀后测定 A 值。以 $A(Y)$ 为纵坐标, 甘草酸铵溶液浓度 (X) 为横坐标, 绘制标准曲线。拟合方程为 $Y=0.0121X+0.0202$, $r=0.9999$, 线性范围 $7.9815 \sim 63.8522 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

(3) 总酚酸: 精密量取没食子酸对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.5 mL 分别置于 25 mL 量瓶中, 用乙醇补足体积至 5.0 mL 再分别精密加入 0.3% 的十二烷基硫酸钠溶液 2 mL, 0.6% 的铁氰化钾-0.9% 的三氯化铁 (1:1) 混合溶液 1 mL, 摇匀, 暗处放置 5 min。用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液定容至刻度, 摇匀, 在暗处放置 20 min, 测定 A 值^[15]。以 $A(Y)$ 为纵坐标, 没食子酸溶液浓度 (X) 为横坐标, 绘制标准曲线。拟合方程为 $Y=0.7868X+0.1497$, $r=0.9996$, 线性范围 $0.1989 \sim 1.4916 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

(4) 总多糖: 精密量取 D -无水葡萄糖对照品溶液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL 分别置于 10 mL 试管中, 加水至试管 2 mL 刻度线, 置冰水中加 0.2% 硫酸蒽酮溶液至刻度线, 摇匀放冷后沸水浴 10 min, 再置冰水浴 10 min^[16], 取出测定 A 值。以 $A(Y)$ 为纵坐标, 没食子酸溶液浓度 (X) 为横坐标, 绘制标准曲线。拟合方程为 $Y=0.0518X-0.0026$, $r=0.9997$, 线性范围 $3.0104 \sim 18.0623 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.5.4 精密度考察 精密吸取“2.5.1”项下对照品溶液和“2.5.2”项下供试品 (Y_1) 溶液连续测定 6 次。计算甘草苷、甘草酸铵、甘草酸铵、 D -无水葡萄糖 A 值的 RSD 分别为 0.11%、0.04%、0.08%、0.02%; 总黄酮、总苷、总酚酸、总多糖 A 值的 RSD 分别为 0.05%、0.05%、0.06%、0.03%, 提示仪器精密度良好。

2.5.5 稳定性试验 精密吸取“2.5.1”项下对照品溶液和“2.5.2”项下供试品 (Y_1) 溶液于显色 15、

30、45、60、75、90 min 后测定 A 值, 计算甘草苷、甘草酸铵、甘草酸铵、 D -无水葡萄糖 A 值的 RSD 分别为 0.11%、0.82%、0.40%、0.48%; 总黄酮、总苷、总酚酸、总糖 A 值的 RSD 为 0.58%、0.75%、1.31%、1.27%, 结果表明各大类成分对照品、供试品溶液在 90 min 内稳定。

2.5.6 重复性试验 按照“2.5.2”项下方法平行制备 6 份, 总黄酮、总苷、总酚酸、总多糖供试品 (Y_1) 溶液, 显色后测定 A 值, 质量分数平均值为 18.24、74.11、14.20、673.68 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 值分别为 1.17%、1.15%、1.17%、1.82%。提示该方法重复性良好。

2.5.7 加样回收率考察 (1) 总黄酮: 精密称质控样品 (Y_1) 0.2 g, 加入 6 份等质量甘草苷对照品, 置 150 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 10 mL 水, 密塞, 称定质量, 静置 1 h 后回流 1 h, 放冷后取下锥形瓶, 密塞, 再称定质量, 用水补足减失的质量, 摇匀依据“2.5.2”项下方法测定其 A 值, 计算总黄酮的平均加样回收率为 97.6%, RSD 为 1.79%。

(2) 总苷: 精密称取质控样品 (Y_1) 50 mg, 加入 6 份等质量甘草酸铵对照品, 置 150 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 25 mL 水, 密塞, 称定质量, 静置 1 h 后回流 1 h。放冷后取下锥形瓶, 密塞, 再称定质量, 用水补足减失的质量, 摇匀, 精密量取供试品溶液 1 mL 于 10 mL 比色管中挥干, 加 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL, 摇匀, 加 0.8 mL 高氯酸, 摇匀, 于 60°C 水浴锅下加热 15 min, 取出冰浴冷至室温, 加入冰醋酸 5 mL, 稀释, 充分摇匀后于 596 nm 下测定 A 值。根据标准曲线计算总皂苷的平均加样回收率为 93.1%, RSD 为 1.22%。

(3) 总酚酸: 精密称取质控样品 (Y_1) 0.2 g, 加入 6 份等质量没食子酸对照品, 置 150 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 10 mL 水, 密塞, 称定质量, 静置 1 h 后回流 1 h, 放冷后取下锥形瓶, 密塞, 再称定质量, 用水补足减失的质量, 摇匀, 依据“2.5.2”项下方法测定其 A 值, 计算总酚酸的平均加样回收率为 98.9%, RSD 为 1.52%。

(4) 总多糖: 精密称取质控样品 (Y_1) 25 mg, 加入 6 份等质量 D -无水葡萄糖对照品, 置 150 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 25 mL 水, 密塞, 称定质量, 静置 1 h 后回流 1 h。放冷后, 取下锥形瓶, 密塞, 再称定质量, 用水补足减失的质量, 摇匀, 精密量取供试品溶液 0.1 mL 于 10 mL 试管中, 加水补足体积至 2 mL 刻度线, 依据“2.5.2”项下方

法测定其 A 值，总多糖的平均加样回收率为 98.0%，RSD 为 1.76%。

2.5.8 含量测定 按照“2.2.2”下方法制备供试品溶液，按照“2.5.2”项下方法测得 17 批次基准样品

总黄酮质量分数为 2.25%~3.45%、总苷质量分数 9.40%~14.18%、总酚质量分数为 0.97%~2.19%、总多糖质量分数为 45.44%~59.47%、大类成分质量分数共计 62.64%~75.97%，结果见表 6。

表 6 芍药甘草汤基准样品大类成分含量测定结果

Table 6 Determination results of major types of components in the benchmark samples of Shaoyao Gancao Decoction											
样品	总糖/%	总酚/%	总黄酮/%	总苷/%	总和/%	样品	总糖/%	总酚/%	总黄酮/%	总苷/%	总和/%
S1	56.18	1.32	2.74	12.88	73.12	S10	57.73	0.97	2.55	10.35	71.59
S2	47.31	2.49	3.45	14.15	67.40	S11	49.57	1.52	2.74	10.31	64.15
S3	53.91	2.43	2.63	13.29	72.26	S12	52.11	1.35	2.38	10.54	66.39
S4	45.44	1.52	2.76	12.91	62.64	S13	53.65	1.04	2.25	10.78	67.73
S5	58.25	1.43	2.74	13.55	75.97	S14	59.47	1.38	2.33	11.15	74.32
S6	46.78	1.61	2.99	14.18	65.57	S15	53.39	1.43	2.37	12.2	69.38
S7	50.10	1.73	2.63	13.61	68.07	S16	53.28	1.03	2.33	11.27	67.90
S8	50.29	1.51	2.92	12.53	67.25	S17	54.99	0.95	2.38	9.40	67.72
S9	53.55	1.49	2.90	12.82	70.76						

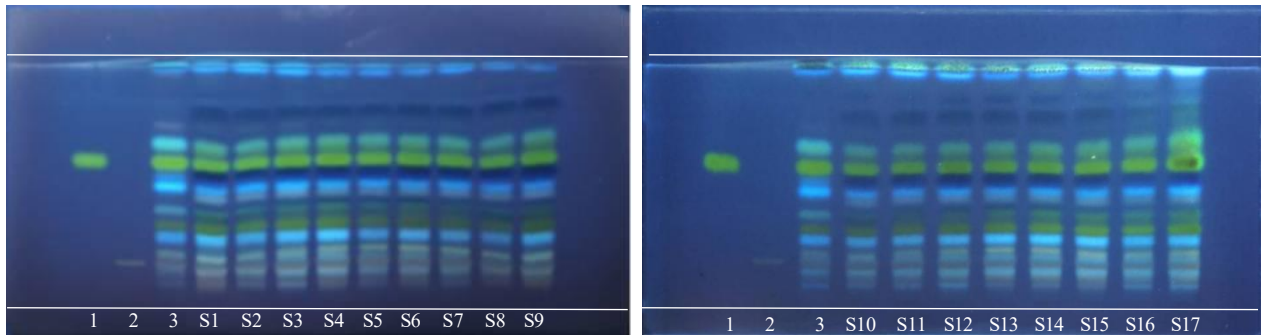
2.6 其他质控标准研究

为系统评价芍药甘草汤基准样品的质量，本研究从多维度开展分析。首先，对样品性状进行观察与描述，确定其外观特征为浅棕色至褐色粉末，气微、味甜，并依据《中国药典》2020 年版，制定其溶化性标准为，称取基准样品粉末各 1 g，置于烧杯中，加入热水 20 mL，搅拌 5 min，立即观察溶解情况，17 批基准样品均在 5 min 内全部溶化或轻微浑浊。

在薄层色谱鉴别方面，取“2.2.2”项下对照品溶液，“2.2.3”项下供试品溶液，甘草苷、甘草酸铵、甘草对照药材、供试品溶液分别点于同一 0.1% NaOH 浸泡后的硅胶 G 薄层板上，以醋酸乙酯：甲酸：乙酸：水（15：1：1：2）为展开剂，取出，晾干，置于紫外灯（365 nm）下检视有荧光色斑点，

结果见图 8，建立了甘草薄层色谱鉴别；取“2.2.2”项下对照品溶液，“2.2.3”项下供试品溶液，芍药苷、没食子酸、白芍对照药材、供试品溶液分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以醋酸乙酯：甲酸（15：2）为展开剂，取出，晾干，喷以 10%磷钼酸乙醇后置于 105 ℃烘箱中烘至蓝绿色斑点显色，置日光下检视，结果见图 9，建立白芍薄层鉴别。

此外，依据《中国药典》2020 年版四部相关通则，对 17 批次基准样品的水分、醇溶性浸出物、重金属及有害元素进行测定，结果见表 7。其中，水分为 6.1%~7.6%，根据《中国药典》2020 版中颗粒剂要求水分均不超过 8.0%；采用乙醇冷浸法测得醇溶性浸出物为 31.0%~43.9%，均值为 38.8%，根据均值±30%制定醇溶性浸出物限度为 27.2%~50.5%；重金属及有害元素检测结果显示，铅、汞、

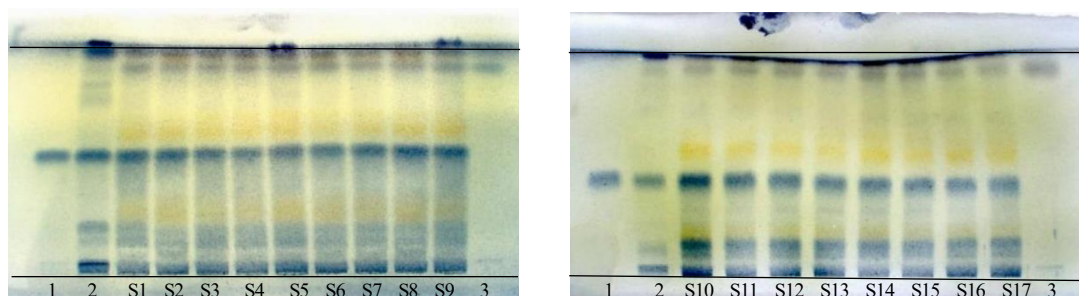


1-甘草苷；2-甘草酸铵；3-甘草对照药材。

1-glycyrrhizin; 2-ammonium glycyrrhizinate; 3- Standard medicinal material of licorice.

图 8 17 批芍药甘草汤基准样品甘草薄层鉴别色谱图

Fig. 8 TLC of Licorice herb in 17 batches of Shaoyao Gancao Decoction



1-芍药苷; 2-白芍对照药材; 3-没食子酸。
1-paeoniflorin; 2- white peony standard medicinal material; 3-gallic acid.

图 9 17 批芍药甘草汤基准样品白芍薄层鉴别色谱图

Fig. 9 TLC of White peony in 17 batches of Shaoyao Gancao Decoction

表 7 17 批芍药甘草汤基准样品水分和浸出物测定结果

Table 7 Determination of water and extract of 17 batches of Shaoyao Gancao Decoction benchmark samples

样品	浸出物/%	水分/%	样品	浸出物/%	水分/%	样品	浸出物/%	水分/%
S1	43.3	7.4	S7	41.0	6.6	S13	35.8	7.0
S2	41.1	7.2	S8	42.2	7.2	S14	35.5	6.3
S3	43.0	7.3	S9	43.3	6.8	S15	39.1	7.1
S4	40.7	7.6	S10	35.3	7.3	S16	35.0	7.3
S5	43.9	6.1	S11	34.7	7.2	S17	31.0	7.1
S6	41.9	7.4	S12	33.5	7.2			

砷、铜等含量均远低于药典规定的限度标准，充分保障了样品质量的安全性与可控性。

2.7 数据分析

综合分析表 2 和表 7 测定结果，各主要大类成分占比（表 8）分布特征如下：黄酮类成分占比稳定在 44.20%~54.19%；酚酸类（32.95%~59.76%）

与苷类（43.11%~61.70%）占比范围虽较宽但均维持较高比例。11 个成分在各大类成分中占比显著，表明基准样品中活性成分总体含量丰富，且各成分类别分布相对均衡，符合复方制剂多组分协同作用的特点，能较好反映芍药甘草汤基准样品的物质组成，为质量标准研究提供了重要依据。

表 8 药甘草汤基准样品 HPLC 测定黄酮、酚类及苷类成分及其在大类成分中的占比

Table 8 Determination of flavonoids, phenols and glycosides and their proportions in the main class of components by HPLC of the benchmark samples of Shaoyao Gancao Decoction

样品	芹糖甘草苷、甘草苷、异甘草素、甘草素、异甘草苷在总黄酮中占比/%	没食子酸、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖、苯甲酸在总酚中占比/%	芍药内酯苷、芍药苷、甘草酸铵在总苷中占比/%	样品	芹糖甘草苷、甘草苷、异甘草素、甘草素、异甘草苷在总黄酮中占比/%	没食子酸、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖、苯甲酸在总酚中占比/%	芍药内酯苷、芍药苷、甘草酸铵在总苷中占比/%
S1	47.35	49.92	61.70	S10	53.42	52.32	54.16
S2	44.20	32.95	51.40	S11	47.24	33.64	55.35
S3	51.34	34.05	54.70	S12	47.57	37.73	44.76
S4	47.92	50.44	47.21	S13	48.72	48.84	43.11
S5	51.41	59.76	44.30	S14	54.19	37.58	49.01
S6	46.79	44.25	51.57	S15	48.77	38.98	48.46
S7	50.95	53.03	57.72	S16	51.38	53.97	52.84
S8	47.34	55.67	58.23	S17	49.61	55.79	60.57
S9	49.95	52.78	57.10				

对 17 批基准样品的大类成分及各定量指标(图 10)统计分析表明,药材产地和生产工艺对成分含量影响显著。在甘草成分方面,新疆产甘草特定成分含量较高,其中 S14 和 S5 批次总糖含量突出,S2 批次总黄酮含量显著;甘肃产甘草中,S6 批次总糖含量较低,S13 批次总黄酮含量

处于较低水平,且同一产地不同批次间差异明显。白芍成分方面,安徽产白芍中 S2 批次总酚含量较高,S6 批次总苷类成分含量显著;值得注意的是,亳州庭鑫堂药业提供的 S1~S9 批次芍药内酯苷含量高于安徽新盛中药饮片公司提供的 S10~S17 批次。

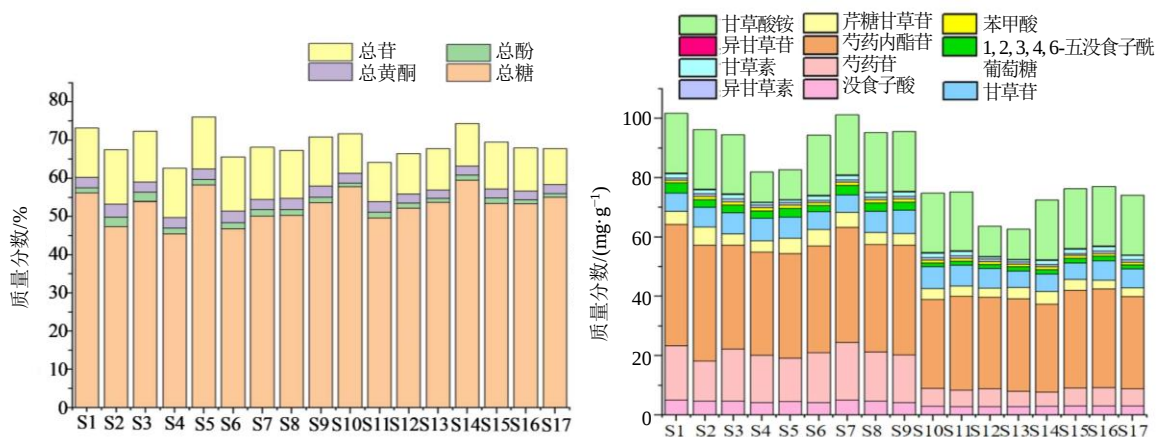


图 10 17 批芍药甘草汤基准样品 4 个大类成分及 11 个成分含量测定结果

Fig. 10 Content determination results of 4 major categories and 11 components of 17 batches of Shaoyao Gancao Decoction benchmark samples

上述差异表明,药材产地是影响成分含量的基础因素,但不同生产商在种植管理、采收时机、炮制工艺、储存条件等环节的质量控制差异,对最终产品成分稳定性起决定性作用。因此,为确保基准样品质量稳定性,需建立严格的原料采购标准和规范化生产工艺流程,建议后续研究重点关注关键生产环节对成分含量的具体影响机制。

3 讨论

朱广伟等^[17]研究表明氧化芍药苷、芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷、甘草素、甘草酸、异甘草苷、异甘草素等 9 种成分通过协同作用能够发挥解痉、镇痛的药理作用,具有研究意义。基于实验探索和对照品指认,本研究最终确定了 11 种成分作为含量测定的指标,其中包括黄酮类成分(芹糖甘草苷、甘草苷、异甘草素、甘草素、异甘草苷)、酚类成分(没食子酸、苯甲酸、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖)以及苷类成分(芍药内酯苷、芍药苷、甘草酸铵)。在定量指纹测定波长的选择中,通过全波长扫描发现:苷类成分在 230 nm 处有最大吸收,黄酮类成分(甘草苷、芹糖甘草苷)在 254 nm 处有最大吸收,酚类成分(没食子酸、苯甲酸、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖)在 280 nm 处有最大吸

收,同时在 230 nm 处也有较好的吸收;黄酮类中的查尔酮成分(异甘草素、异甘草苷)在 360 nm 处有最大吸收,而甘草素和甘草酸铵分别在 275 nm 和 250 nm 处有最大吸收,且在 265 nm 处两者均有较好的吸收。因此,本研究最终选择 230 nm、265 nm 和 360 nm 作为测定波长。此外,总黄酮、总苷、总酚和总多糖的最大吸收波长分别确定为 334 nm、596 nm、280 nm 和 626 nm,且在上述波长下无色谱峰干扰。为了测定实验方法耐用性,同时考察不同流动相(乙腈-0.1%磷酸、乙腈-0.1%甲酸、乙腈-0.05%磷酸),不同色谱柱(Kromasil C18、XBridge C18),不同柱温(20、23、25、28、30 °C),不同体积流量(0.3、0.4、0.5 mL·min⁻¹),不同型号(Agilent 1260、Agilent 1200、Waters Arc)高效液相色谱仪对色谱峰的影响,发现以 Waters XBridge C18 色谱柱,柱温 25 °C,体积流量 0.4 mL·min⁻¹,对目标成分分离效果最好,峰形最佳。研究考察中,对芍药甘草汤基准样品质控批与 17 批基准样品经 11 个目标成分含量对比分析、13 个色谱峰指纹图谱相似度对比分析,发现 11 个目标成分含量范围差异较小且相似度结果均大于 0.9,芍药甘草汤基准样品质控批与 17 批基准样品差异较小,芍药甘草汤基准样品

质控批考察方法可用于 17 批基准样品测定。

芍药甘草汤中白芍、甘草均含有黄酮类成分,这类成分具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、调节脂质代谢^[18]等多种药理活性。在 UV-Vis 测定总黄酮类成分时,通过对芦糖甘草苷、甘草苷、异甘草素、甘草素、异甘草苷等对照品及供试品的全波长扫描,发现甘草苷与供试品的吸收光谱最为相似,因此选择甘草苷作为总黄酮含量测定的对照品,并采用碱液显色法进行测定。三萜皂苷类成分主要来源于甘草,单萜皂苷则来源于白芍,苷类化合物具有抗炎、保肝、保护心血管^[19]的作用。在 UV-Vis 测定苷类成分时,本研究采用香草醛-高氯酸法进行测定。酚类成分主要来源于白芍,具有抗氧化、抗炎和抗肿瘤作用,本研究采用三氯化铁-铁氰化钾法测定总酚含量。多糖类成分主要来源于甘草,具有免疫调节、抗氧化和抗肿瘤作用^[20],通常选用硫酸-蒽酮与硫酸-苯酚法作为多糖的含量测定方法,考虑到实验的安全性,故本研究选定硫酸-蒽酮法。

本研究构建了有别于单一成分质控方法的新技术体系,建立了多成分定量指纹图谱联合 UV-Vis 含量测定方法,并完成严谨的方法学验证,各项指标均契合测定要求。借助 CA 与 PCA,对芍药甘草汤基准样品的物质基础构成及多批次间差异展开深入剖析。CA 聚类分析图谱清晰显示,17 批次基准样品可划分为两类,其中 S1~S9 聚为一类,S10~S17 聚为另一类,PCA 结果与 CA 完全一致。经研究表明,此类差异主要源自不同产地药材批次间的固有差异,这一现象充分说明基准样品的制备工艺具备良好的传递稳定性,能够将药材的差异性稳定传递至基准样品之中,进而可通过基准样品的质量分析数据直观反映药材的产地差异。

进一步运用 OPLS-DA,以 $VIP > 1$ 作为筛选标准,精准筛选出芍药内酯苷、芍药苷和甘草酸铵 3 个对芍药甘草汤基准样品质量产生影响的差异性标志物。在后续制剂研究过程中,可依据分析制备工艺参数(如煎煮时间、浓缩比例等)对差异标志物保留率的具体影响,科学制定工艺控制策略,切实保障制剂工艺的稳定性。

此外,本研究还对芍药甘草汤基准样品的大类成分进行系统测定,并通过计算可测得成分含量在基准样品总物质中的占比,清晰明确已知可控成分。在后续研究中,计划依据 VIP 值和大类成分占比情况,对差异标志物(高 VIP 值)和主要大类成分(高占比)

赋予差异化权重,构建科学合理的综合评分模型(如 Q-Marker 指数),以期达成提升质量标准研究水平的核心目标。该研究为中药复杂体系的质量控制提供了“多维度表征-差异性溯源-标志物筛选-综合评价”的创新技术路径,为构建更具科学性与系统性的中药质量标准体系奠定了坚实基础。

经过系统研究,最终建立了包括性状、甘草薄层鉴别、白芍薄层鉴别、水分、溶化性、浸出物、指纹图谱、多成分含量测定、大类成分(总糖、总苷、总黄酮、总酚)含量测定的全面质量评价标准,能够多面的控制产品质量,为制剂的开发提供了较好的参考依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 刘昌孝,陈士林,肖小河,等. 中药质量标志物(Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
Liu C X, Chen S L, Xiao X H, et al. A new concept on quality marker of Chinese materia Medica: Quality control for Chinese medicinal products [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [2] 李伯男,马超,王伟,等. 利用 LC/MS 检测中药总成分中各大类成分含量的方法学探讨 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2008, 10(4): 7-10.
Li B N, Ma C, Wang W, et al. Methodology for determining major components in herbal complex using LC/MS/MS [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med Mater Med, 2008, 10(4): 7-10.
- [3] 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]. (2018-04-13) [2025-02-28]. https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2018-12/31/content_5429153.htm.
National Administration of Traditional Chinese Medicine Notice on the Release of Directory of Ancient Classic Formulas (First Batch) [EB/OL]. (2018-04-13) [2025-02-28]. https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2018-12/31/content_5429153.htm.
- [4] 汉,张仲景. 伤寒论 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2013: 7-8.
Zhang, Z. J. (Han Dynasty). Shang Han Lun (Treatise on Cold Damage Disorders) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2013: 7-8.
- [5] 高志刚,戴卫红. 芍药甘草汤的临床应用及方剂研究进展 [J]. 河北中医, 2019, 41(5): 792-796.
Gao Z G, Dai W H. Clinical application and prescription research progress of Shaoyao Gancao Decoction [J]. Hebei

- J Tradit Chin Med, 2019, 41(5): 792-796.
- [6] 王波, 王丽, 刘晓峰, 等. 中药甘草成分和药理作用及其现代临床应用的研究进展 [J]. 中国医药, 2022, 17(2): 316-320.
- Wang B, Wang L, Liu X F, et al. Research progress on the components, pharmacological effects and modern clinical application of Radix Glycyrrhiza [J]. China Med, 2022, 17(2): 316-320.
- [7] 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.
- Yao Z X, Yuan Z Y, Guo M Z, et al. Research progress on pharmacological action and clinical application of *Paeonia lactiflora* and its drugs [J]. J Anhui Univ Chin Med, 2024, 43(5): 109-112.
- [8] 吴玲芳, 李雨桐, 唐迎紫, 等. 芍药甘草汤化学成分及药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(6): 1354-1360.
- Wu L F, Li Y T, Tang Y Z, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of Shaoyao Gancan Decoction [J]. Drug Eval Res, 2021, 44(6): 1354-1360.
- [9] 徐男, 孙蓉, 黄欣, 等. 基于“效-毒”相关的经典名方复方制剂质量及制药过程一致性评价的研究思路探讨 [J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(20): 2118-2125.
- Xu N, Sun R, Huang X, et al. Discussion on the research idea of quality and pharmaceutical process consistency of classical compound prescriptions based on “efficacy-toxicity” [J]. Chin J Hosp Pharm, 2019, 39(20): 2118-2125.
- [10] 韩君, 段翔译, 张志强, 等. 基于文献计量学可视化分析芍药甘草研究现状 [J]. 微量元素与健康研究, 2024, 41(2): 31-33, 36.
- Han J, Duan X Y, Zhang Z Q, et al. Research status of licorice peony based on econometric visual analysis of literature [J]. Stud Trace Elem Health, 2024, 41(2): 31-33, 36.
- [11] 李强, 杜思邈, 张忠亮, 等. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3095-3104.
- Li Q, Du S M, Zhang Z L, et al. Progress in fingerprint technology on Chinese materia Medica and prospect of its future development [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2013, 44(22): 3095-3104.
- [12] 余一鸣, 胡永慧, 韩立云, 等. 中药质量控制的研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(12): 2557-2563.
- She Y M, Hu Y H, Han L Y, et al. Research progress on quality control of Chinese materia Medica [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2017, 48(12): 2557-2563.
- [13] 陈浩, 宋菊, 杨平, 等. 《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)》简介 [J]. 中国食品药品监管, 2021(9): 78-87.
- Chen H, Song J, Yang P, et al. Introduction of guidance on CMC of traditional Chinese medicine compound preparations developed from catalogued ancient classical prescriptions(interim) [J]. China Food Drug Adm Mag, 2021(9): 78-87.
- [14] 戴万生, 毕露露, 邱斌, 等. 黄精总皂苷的提取和含量测定方法研究 [J]. 云南中医中药杂志, 2023, 44(2): 73-76.
- Dai W S, Bi L L, Qiu B, et al. Study on extraction and content determination of total saponins from *Polygonatum* [J]. Yunnan J Tradit Chin Med Mater Med, 2023, 44(2): 73-76.
- [15] 付煜荣, 张万明, 陈桂敏, 等. 景天三七中没食子酸和总酚酸含量测定 [J]. 中成药, 2006, 28(7): 1016-1018.
- Fu Y R, Zhang W M, Chen G M, et al. Determination of Gallic acid and total phenolic acid in *Sedum aizoon* L. [J]. Chin Tradit Pat Med, 2006, 28(7): 1016-1018.
- [16] 王宏军, 邓旭明, 蒋红, 等. 蒽酮-硫酸比色法检测多糖条件的优化 [J]. 中国饲料, 2011(4): 39-41.
- Wang H J, Deng X M, Jiang H, et al. Optimizing detection conditions of polysaccharide by anthrone-vitriol colorimetric method [J]. China Feed, 2011(4): 39-41.
- [17] 朱广伟, 张贵君, 王晶娟, 等. 单因素配伍剂量对经方芍药甘草汤药效组分的影响 [J]. 实用药物与临床, 2015, 18(2): 168-173.
- Zhu G W, Zhang G J, Wang J J, et al. Influence of compatibility dose with single factor on the active components alignment of classical prescription Shaoyao Gancan decoction [J]. Pract Pharm Clin Remedies, 2015, 18(2): 168-173.
- [18] 陈竞苗, 秦虹, 郑温雅. 甘草黄酮调节糖脂代谢作用的研究进展 [J]. 中草药, 2024, 55(23): 8301-8310.
- Chen J M, Qin H, Zheng W Y. Research progress on licorice flavonoids regulating glucose and lipid metabolism [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(23): 8301-8310.
- [19] 杨山景, 封安杰, 孙越, 等. 白芍总苷的药理作用及机制研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(13): 1627-1633.
- Yang S J, Feng A J, Sun Y, et al. Research progress on mechanism and pharmacological activities of total glucosides of paeony [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2021, 38(13): 1627-1633.
- [20] 朱韵辰, 林星. 甘草多糖药理学作用研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(21): 2763-2768.
- Zhu Y C, Lin X. Research progress on pharmacological activities of *Glycyrrhiza* polysaccharide [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2021, 38(21): 2763-2768.