

经典名方化肝煎物质基准特征图谱及多指标成分含量测定研究

聂欣¹, 庞兰¹, 江华娟¹, 陈意¹, 王琳¹, 王升菊¹, 赵晨希², 杨智松², 傅超美¹,
章津铭^{1*}, 游宇^{1*}

1. 成都中医药大学 药学院, 四川 成都 611137

2. 安徽誉隆亚东药业有限公司, 安徽 亳州 236800

摘要: **目的** 建立经典名方化肝煎物质基准的 UPLC 特征图谱以及 HPLC 多指标含量测定方法, 构建其质量控制体系。**方法** 遵古籍并结合前期考察工艺, 制备不同产地的 18 个批次化肝煎物质基准, 采用 UPLC 法建立物质基准特征图谱, 使用《中药色谱指纹图谱相似度评价软件》(2012 版) 计算相似度, 并结合正交偏最小二乘判别分析, 挖掘影响不同产地不同批次化肝煎物质基准质量的主要成分; 将其中源自处方君药、臣药和佐药的 3 种指标性成分橙皮苷、芍药苷、牡丹皮作为化肝煎物质基准含测指标, 建立其 HPLC 含量测定方法, 并对 18 个批次样品进行含量测定。**结果** 特征图谱相似度均 ≥ 0.989 。标定了 33 个共有峰, 对 8 个共有峰进行了化学成分指认, 分别为没食子酸(4 号峰)、梔子苷(10 号峰)、芍药苷(13 号峰)、橙皮苷(22 号峰)、香蜂草苷(27 号峰)、丹皮酚(29 号峰)、甜橙黄酮(30 号峰)、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮(32 号峰), 找到 9 个影响批次间稳定性的指标性成分(峰 31、20、11、13、22、33、21、29、1), 最后遴选出芍药苷、橙皮苷、丹皮酚作为含测指标, 其在化肝煎物质基准中的质量分数为芍药苷 1.28%~1.95%、橙皮苷 0.91%~1.02%、丹皮酚 0.48%~0.57%。**结论** 通过 UPLC 特征图谱及 HPLC 指标性成分含量测定初步建立了经典名方化肝煎物质基准的质量控制方法, 此方法快速简单可行, 重复性、稳定性良好, 可为后续制剂的开发和质量控制提供理论依据。

关键词: 经典名方; 化肝煎; 物质基准; 特征图谱; UPLC; HPLC; 质量控制; 橙皮苷; 芍药苷; 丹皮酚

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)20-5177-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.20.009

Study on specific chromatogram and content determination of multi-index components about material reference of classic prescription of Huaganjian

NIE Xin¹, PANG Lan¹, JIANG Hua-juan¹, CHEN Yi¹, WANG Lin¹, WANG Sheng-ju¹, ZHAO Chen-xi²,
YANG Zhi-song², FU Chao-mei¹, ZHANG Jin-ming¹, YOU Yu¹

1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Anhui Yulong Yadong Pharmaceutical Co., Ltd., Bozhou 236800, China

Abstract: Objective To establish the UPLC specific chromatogram and HPLC content determination methods of multi-index components about the material reference of classical Huaganjian and build its quality control system. **Methods** According to the ancient books and combining with the previously inspected process, 18 batches of Huaganjian material reference from different origins were prepared. The specific chromatogram was established by using UPLC. Similarity was calculated by using *TCM Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation Software* (2012). Combining with orthogonal partial least squares discriminant analysis, we excavated the main components that affected the quality of Huaganjian material reference from different batches and origins. Three of these index components (paeoniflorin, hesperidin, paeonol) from prescription sovereign drug, minister drug, and assistant drug were selected and used as indicators for content determination of Huaganjian material reference. HPLC content determination methods were established and the content of 18 batches of samples was determined respectively. **Results** The similarity of the specific chromatogram was ≥ 0.989 . Thirty-three common peaks were calibrated, and eight common peaks were

收稿日期: 2020-05-08

基金项目: 2018—2020 年中国科协青年人才托举工程项目(2018QNRC1-01)

作者简介: 聂欣, 在读硕士, 从事中药新制剂和新剂型研究。E-mail: niexin@stu.cdutcm.edu.cn

*通信作者 章津铭, 教授, 从事中药新制剂和新剂型研究。E-mail: cdutcmzjm@126.com

游宇, 讲师, 从事中药新制剂和新剂型研究。E-mail: 20122071@cdutcm.edu.cn

identified by chemical composition (gallic acid, geniposide, paeoniflorin, hesperidin, didymin, paeonol, sinensetin, and 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone). Nine index components that affected the stability between batches were found out (Peak 31, 20, 11, 13, 22, 33, 21, 29, 1). Paeoniflorin, hesperidin, and paeonol were selected as content determination indicators. The content range of these components in material reference was 1.28%—1.95% paeoniflorin, 0.91%—1.02% hesperidin, 0.48%—0.57% paeonol. **Conclusion** The quality control method of the material reference of classic prescription Huaganjian was established preliminarily through the UPLC specific chromatogram and HPLC content determination of index components. This method was rapid, simple, feasible, reproducible, stable and could provide a theoretical basis for the subsequent development and quality control of Huaganjian preparations.

Key words: classic prescription; Huaganjian; material reference; specific chromatogram; UPLC; HPLC; quality control; hesperidin; paeoniflorin; paeonol

化肝煎是国家中医药管理局发布的《古代经典名方目录（第一批）》的经典名方之一（编号 62）^[1]，来源于明代医家张景岳所著《景岳全书·新方八阵·寒阵》，由青皮、陈皮、白芍、牡丹皮、栀子（炒）、泽泻、浙贝母组成，药虽七味，而经归五脏^[2]。原书云“治怒气伤肝，因而气逆动火，致为烦热胁痛，胀满动血等证。”本方的最大特点是善解肝气之郁，平气逆而散郁火，集疏肝、清肝、柔肝诸法于一体，使肝气得疏、郁火得泄、阴血不伤^[3]。目前，因其疗效确切，临床仍广泛应用，常用于治疗肝胃郁热型胃食管返流^[4]、反流性食管炎^[5]、消化性溃疡^[6]以及慢性胃炎^[7]、胆汁反流性胃炎^[8]、慢性浅表性胃炎^[9]、糜烂性胃炎^[10]，具有复发率低、不良反应少等优点，并且化肝煎临证不拘泥胃病，若紧抓肝郁化火病机，治疗范围可扩大到妇科病^[11-15]、皮肤病^[16]、肝病^[17-18]等。

国家药品监督管理局发布的《古代经典名方中药复方制剂简化注册审批管理规定》中明确了古代经典名方制剂的申报和研制分为物质基准和制剂两个阶段^[19]，因此物质基准的制备和质量控制是经典名方制剂申报的前提和基础，全面、准确的物质基准质控体系对于经典名方复方制剂的质量保障具有重要意义。故本研究基于课题组前期所考察得到的物质基准制备工艺，制备来源于 3 个产地、共 18 个批次饮片的化肝煎物质基准，建立其 UPLC 特征图谱，在短时间内较为全面地表征了整体化学成分信息。2016 年 3 月 4 日在国务院发布的《关于促进医药产业健康发展的指导意见》中，提出“健全以《中国药典》为核心的国家药品标准体系”的要求。故本研究基于《中国药典》，针对影响化肝煎物质基准质量的主要指标成分分别建立了 HPLC 含量测定方法，并对 18 个批次化肝煎物质基准进行含量测定，明确其含量范围，以期为提升化肝煎复方制剂

质量的稳定性和一致性提供参考。值得一提的是，本研究所建立的 HPLC 含量测定方法同时适用于药材、饮片、中间体与对应实物的相关性考察，为量值传递研究提供了可靠的技术保障。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Ulti Mate 3000 超高效液相色谱仪，美国 Thermo Fisher 公司；LC-16 高效液相色谱仪，日本 Shimadzu 公司；1260 Infinity II 高效液相色谱仪、色谱柱 HC-C₁₈（2）柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），美国 Agilent 公司；色谱柱 Sun Fire C₁₈（150 mm×3.0 mm，3.5 μm），美国 Waters 公司；UPK-I-10T 型纯水机，四川优普超纯科技有限公司；AR224CN 电子天平，万分之一，奥豪斯仪器（常州）有限公司；CPA225D 电子天平，十万分之一，赛多利斯科学仪器（北京）有限公司；FTS-10A 全自动煎药壶，潮州市一壶百饮电器实业有限公司；SCIENTZ-10N 冷冻干燥机，宁波新芝生物科技股份有限公司；DL-720D 数控超声波清洗器，上海之信仪器有限公司。

1.2 试剂

色谱纯乙腈、甲醇，美国 Sigma-Aldrich 公司；色谱纯磷酸，成都市科隆化学品有限公司；水为超纯水，自制。对照品没食子酸（CAS 号 149-91-7，批号 wkq19010307）、绿原酸（CAS 号 327-97-9，批号 wkq19010201）、栀子苷（CAS 号 24512-63-8，批号 wkq19011702）、芍药苷（CAS 号 23180-57-6，批号 wkq19013007）、橙皮苷（CAS 号 520-26-3，批号 wkq19013105）、香蜂草苷（CAS 号 14259-47-3，批号 wkq19010204）、丹皮酚（CAS 号 552-41-0，批号 wkq19030801）、甜橙黄酮（CAS 号 2306-27-6，批号 wkq19021405）、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮（CAS 号 1178-24-1，批号 wkq19010710），各对照品均购自四川省维克奇生物科技有限公司，质量分

数均 $\geq 98\%$ 。化肝煎中 7 味药味均各收集 18 个批次,且每个药味饮片来源于 3 个产地,包含道地药材产地、主产区,具有一定的产地代表性,每个产地收集 6 个批次,产地信息见表 1,经成都中医药大学裴瑾教授鉴定,陈皮为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥成熟果皮、青皮为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥幼果或未成熟果实的果皮、白芍为毛茛

科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根、牡丹皮为毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮、栀子为茜草科植物栀子 *Gardenia jasmiNoides* Ellis 的干燥成熟果实、泽泻为泽泻科植物泽泻 *Alisma orientale* (Sam.) Juzep. 的干燥块茎、浙贝母为百合科植物浙贝母 *Fritillaria thunbergii* Miq. 的干燥鳞茎,各药味均符合《中国药典》2015 年版的规定品种。

表 1 化肝煎中各药味 18 个批次饮片的产地信息

Table 1 Origin information of 18 batches of decoction pieces in Huaganjian

饮片	产地		
	S1~S6	S7~S12	S13~S18
陈皮	浙江省台州市黄岩区宁溪镇	浙江省台州市黄岩区头陀镇	浙江省台州市黄岩区富山乡
青皮	云南省玉溪市新平县	湖南省永州市道县	江西省赣州市龙南县
白芍	安徽省亳州市谯城区十九里镇	安徽省亳州市谯城区谯东镇	安徽省亳州市谯城区五马镇
牡丹皮	安徽省亳州市谯城区五马镇	安徽省亳州市谯城区辛集镇	安徽省亳州市谯城区十九里镇
栀子	福建省宁德市福鼎市贯岭县	福建省宁德市福鼎市白琳县	福建省宁德市福鼎市店下县
泽泻	四川省眉山市彭山县	四川省乐山市夹江县	四川省乐山市五通桥
浙贝母	浙江省金华市磐安县新渥镇	浙江省台州市黄岩区头陀镇	浙江省金华市磐安县仁川镇

将各批次药味随机编号 (S1~S18),并且将每一种药味的 S1 批次饮片,依据处方量投料,合煎制备得到 S1 批次化肝煎样品,一共得到 18 个批次化肝煎样品,用于后续实验。

2 方法与结果

2.1 化肝煎物质基准的制备

原文记载,化肝煎用法用量为“青皮、陈皮各二钱,芍药二钱,丹皮、栀子(炒)、泽泻各一钱半,土贝母二、三钱,水一盅半,煎七八分,食远温服”。称取全方饮片 3 倍剂量,共 145.08 g,根据古籍记载和课题组前期研究所得制备工艺(因经典名方制剂暂未申报,故工艺暂时保密),制得粉末状化肝煎物质基准。

2.2 化肝煎物质基准特征图谱研究

2.2.1 溶液的制备

(1) 对照品溶液的制备:取没食子酸、绿原酸、栀子苷、芍药苷、橙皮苷、香蜂草苷、丹皮酚、甜橙黄酮、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮对照品适量,精密称定,加甲醇制成分别含没食子酸 102.3 $\mu\text{g/mL}$ 、绿原酸 103.4 $\mu\text{g/mL}$ 、栀子苷 102.7 $\mu\text{g/mL}$ 、芍药苷 104.8 $\mu\text{g/mL}$ 、橙皮苷 101.4 $\mu\text{g/mL}$ 、香蜂草苷 106.9 $\mu\text{g/mL}$ 、丹皮酚 101.7 $\mu\text{g/mL}$ 、甜橙黄酮 100.3 $\mu\text{g/mL}$ 、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮 101.2

$\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液,即得。

(2) 供试品溶液的制备:分别取 18 批化肝煎标准煎液冻干粉约 0.5 g,精密称定,置 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 50 kHz) 30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

(3) 单味饮片样品的制备:按“2.1”项下化肝煎制备工艺制备单味饮片的物质基准粉末样品,并按“2.2.1 (2)”项下供试品溶液的制备方法制备单味饮片物质基准供试品溶液,即得。

2.2.2 色谱条件 色谱仪为 Ulti Mate 3000 超高效液相色谱仪;色谱柱为 Sun Fire C₁₈ 柱 (150 mm \times 3.0 mm, 3.5 μm);流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液,梯度洗脱:0~3 min, 5%~8%乙腈;3~4 min, 8%乙腈;4~7 min, 8%~12%乙腈;7~15 min, 12%乙腈;15~17 min, 12%~20%乙腈;17~20 min, 20%~23%乙腈;20~40 min, 23%~49%乙腈;40~43 min, 49%~65%乙腈;43~45 min, 65%~77%乙腈;45~50 min, 77%~95%乙腈;检测波长为 230 nm;柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,体积流量 0.5 mL/min;进样体积 5 μL 。

2.2.3 方法学研究^[20-21]

(1) 精密度试验: 取同一供试品溶液 (S1), 在“2.2.2”项的色谱条件下, 连续进样 6 次。以栀子苷为参照峰 (分离良好, 峰面积较大且为所有样品共有), 计算各峰相对保留时间及相对峰面积, 考察色谱峰相对保留时间和相对峰面积的一致性。结果表明, 各色谱峰的相对保留时间的 RSD 均小于 1.0%, 相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%, 以《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件》(2012.130723 版) 评价, 6 次进样的相似度均为 1.00, 结果表明该仪器精密度良好。

(2) 重复性试验: 按“2.1”及“2.2.1 (2)”项下要求, 平行制备 6 份供试品溶液 (S1), 在“2.2.2”项的色谱条件下依次进样, 记录色谱图。以栀子苷为参照峰, 计算各峰相对保留时间及相对峰面积, 考察色谱峰相对保留时间和相对峰面积的一致性。结果表明, 各色谱峰的相对保留时间的 RSD 均小于 1.0%, 相对峰面积的 RSD 均小于 5.0%, 以《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件》(2012.130723 版) 评价, 6 次进样的相似度均为 1.00, 结果表明该方法重复性良好。

(3) 稳定性考察: 取供试品溶液 (S1), 在“2.2.2”项的色谱条件下, 分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 进样, 记录色谱图。以栀子苷为参照峰, 计算各峰相对保留时间及相对峰面积, 考察色谱峰相对保留时间和相对峰面积的一致性。结果表明, 各色谱峰的相对保留时间的 RSD 均小于 2.0%, 相对峰面积

的 RSD 均小于 5.0%, 以《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件》(2012.130723 版) 评价, 6 次进样的相似度均为 1.00, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.4 特征图谱相似度评价 采用国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件》(2012.130723 版) 对 18 批化肝煎物质基准供试品的特征图谱进行分析。

以 S1 号样品的特征图谱作为参照谱进行指纹匹配 (中位数法, 时间窗为 0.1 min), 确定了 33 个共有峰, 18 批化肝煎物质基准供试品 UPLC 特征图谱叠加图见图 1, 并进行相似度计算, 18 批供试品的相似度均 ≥ 0.989 , 表明各批样品的相似度较好, 结果见表 2。

2.2.5 色谱峰的化学成分指认及归属 通过与对照品比较指认了其中 8 个共有峰, 分别为没食子酸 (4 号峰)、栀子苷 (10 号峰)、芍药苷 (13 号峰)、橙皮苷 (22 号峰)、香蜂草苷 (27 号峰)、丹皮酚 (29 号峰)、甜橙黄酮 (30 号峰)、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮 (32 号峰)。其中 4 号峰没食子酸、13 号峰芍药苷归属于白芍和牡丹皮, 22 号峰橙皮苷、27 号峰香蜂草苷、30 号峰甜橙黄酮、32 号峰 3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮归属于青皮和陈皮, 10 号峰栀子苷为栀子的特征峰, 29 号峰丹皮酚为牡丹皮的特征峰。供试品溶液、对照品溶液及各单味饮片 UPLC 色谱图见图 2、3。

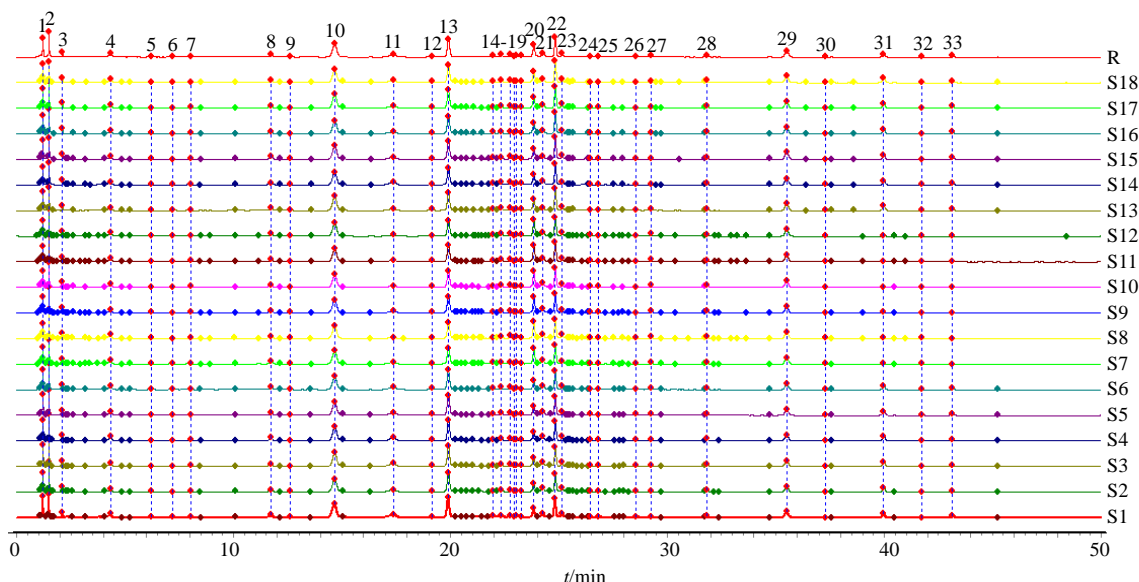


图 1 18 批化肝煎物质基准 (S1~S18) 的 UPLC 特征图谱及对照特征图谱 (R)

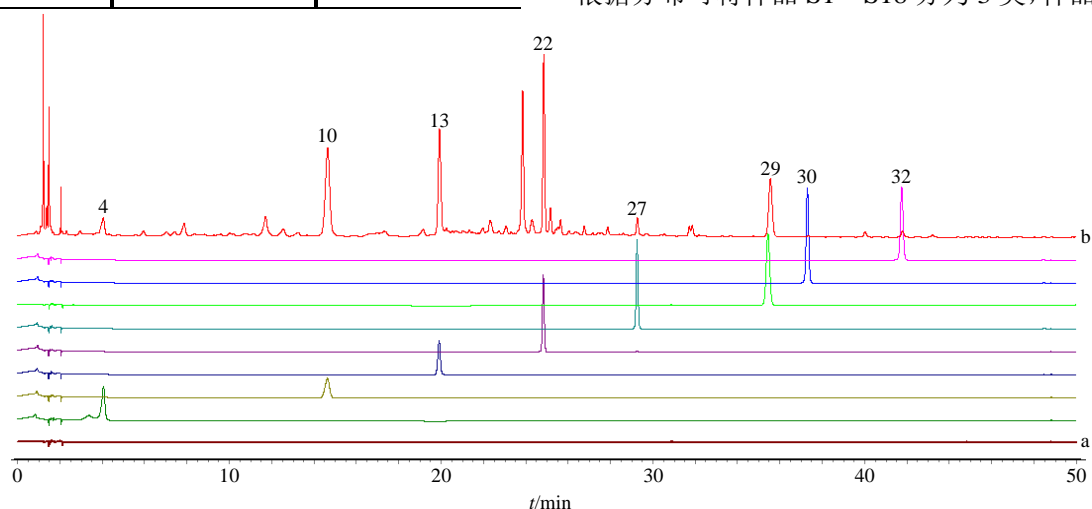
Fig. 1 UPLC specific chromatogram of 18 batches of Huaganjian material reference (S1—S18) and reference specific chromatogram (R)

表 2 18 批化肝煎物质基准 (S1~S18) 的相似度结果

Table 2 Similarities of 18 batches of Huaganjian material reference (S1—S18)

样品编号	相似度	样品编号	相似度	样品编号	相似度
S1	0.994	S7	0.993	S13	0.997
S2	0.995	S8	0.990	S14	0.997
S3	0.995	S9	0.991	S15	0.998
S4	0.996	S10	0.989	S16	0.998
S5	0.995	S11	0.991	S17	0.997
S6	0.995	S12	0.991	S18	0.997

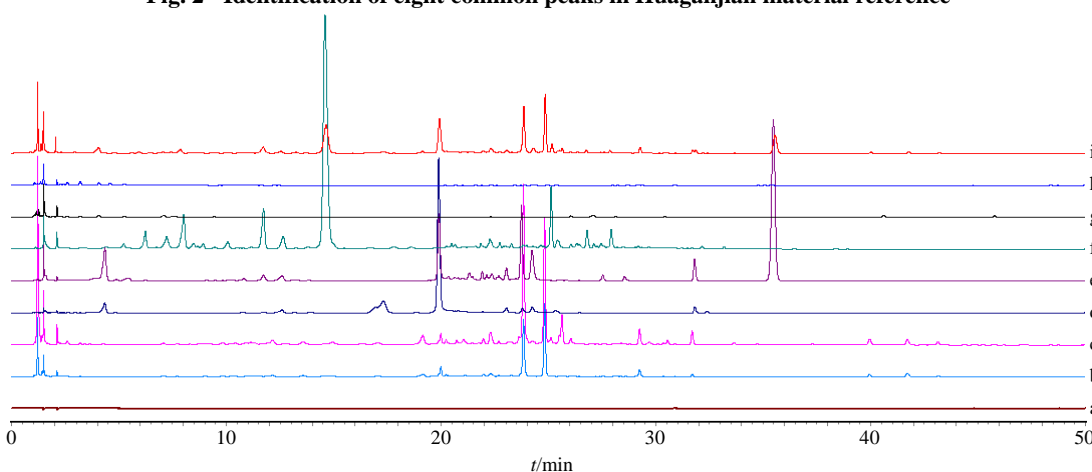
2.2.6 正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 处理数据^[22-23] 本研究采用有监督的 OPLS-DA 模型进行建模分析, 将 18 个批次的化肝煎样品各个共有峰相对于参照峰栀子苷 (10 号峰) 的峰面积量化, 得到 18×33 阶数据矩阵, 导入 SIMCA 14.1 软件, 选取 33 个主要色谱峰的相对峰面积值作为变量, OPLS-DA 得分矩阵图见图 4。结果发现在置信区间 (95%) 内, 18 批样品存在一定差异性。不同产地批次间差异明显, 同一产地不同批次间差异较小。根据分布可将样品 S1~S18 分为 3 类, 样品 S1~S6



a-空白溶剂 4-没食子酸 10-栀子苷 13-芍药苷 22-橙皮苷 27-香蜂草苷 29-丹皮酚 30-甜橙黄酮 32-3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮 b-化肝煎全方样品
a-blank 4-gallic acid 10-geniposide 13-paeoniflorin 22-hesperidin 27-didymin 29-paeonol 30-sinensetin 32-3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone b-Huaganjian sample

图 2 8 个共有峰在化肝煎物质基准中的指认

Fig. 2 Identification of eight common peaks in Huaganjian material reference



a-空白溶剂 b-陈皮单煎样品 c-青皮单煎样品 d-白芍单煎样品 e-牡丹皮单煎样品 f-栀子单煎样品 g-泽泻单煎样品 h-浙贝母单煎样品 i-化肝煎全方样品
a-blank b-Citri Reticulatae Pericarpium c-Citri Reticulatae Pericarpium Viride d-Paeoniae Radix Alba e-Moutan Cortex f-Gardeniae Fructus g-Alismatis Rhizoma h-Fritillariae Thunbergii Bulbus i-Huaganjian sample

图 3 化肝煎及各单味药制得物质基准特征图谱

Fig. 3 UPLC specific chromatogram of Huaganjian material reference and single herb medicine

为 A 类, 样品 S7~S12 为 B 类, 样品 S13~S18 为 C 类。为进一步筛选出对上述样本分类贡献较大的成分, 本研究采用变量重要性投影值 (variable importance in project, VIP) > 1.0 (即该变量对整体模型的贡献度高于平均水平) 为有意义变量进行搜寻。结果共找到 9 个有意义变量, 按照 VIP 值大小依次为峰 31、20、11、13 (芍药苷)、22 (橙皮苷)、33、21、29 (丹皮酚)、1, 见图 5。

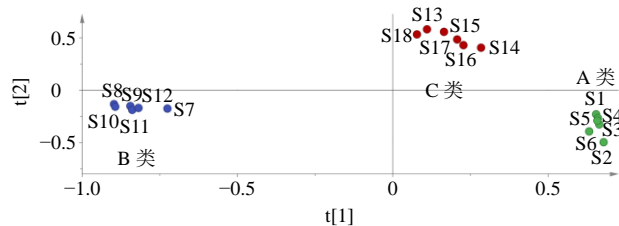


图 4 18 批化肝煎物质基准 OPLS-DA 的得分

Fig. 4 OPLS-DA score plot of 18 batches of material reference of Huaganjian

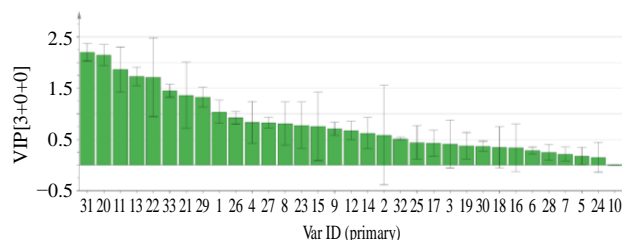


图 5 化肝煎物质基准中 33 个共有成分的 VIP 值

Fig. 5 Variable importance in projection (VIP) values of 33 common components in material reference of Huaganjian

根据中药质量标志物研究思路^[24], 产地差异带来的中药材生产过程外在环境变化, 是影响药用植物次生代谢产物的主要因素之一, 也是反映产地间、批次间质量差异的主要变量因素, 在中药质量控制中须重点关注。故随即对 18 个批次的化肝煎物质基准中差异较大的芍药苷、橙皮苷、丹皮酚 3 种指标成分进行含量测定, 将这 3 种成分作为化肝煎物质基准的定量质控指标。

2.3 化肝煎物质基准中芍药苷、橙皮苷、丹皮酚指标成分含量测定^[25]

2.3.1 溶液的制备

(1) 对照品溶液的制备: 分别取芍药苷、橙皮苷、丹皮酚对照品适量, 精密称定, 各加甲醇制成含芍药苷 427.2 μg/mL、橙皮苷 614.4 μg/mL、丹皮酚 135.3 μg/mL 的对照品溶液, 即得。

(2) 供试品溶液的制备: 同“2.2.1 (2)”项下供试品溶液的制备。

(3) 阴性样品的制备: 按化肝煎处方比例与制备工艺, 制备缺陈皮、缺青皮、缺牡丹皮、缺白芍的单阴性样品、缺陈皮和青皮、缺牡丹皮和白芍的双阴性样品, 并按供试品溶液的制备方法制备各阴性样品供试品溶液。

2.3.2 色谱条件

(1) 芍药苷: 色谱仪为 Infinity II 高效液相色谱仪; 色谱柱为 HC-C₁₈ (2) 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液 (18:82), 等度洗脱, 洗脱时间 30 min; 检测波长为 230 nm; 柱温 25 °C, 体积流量 1.0 mL/min; 进样体积 10 μL。

(2) 橙皮苷: LC-16 高效液相色谱仪; 色谱柱为 HC-C₁₈ (2) 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.5%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~10 min, 10%~30%乙腈; 10~20 min, 30%~70%乙腈; 20~25 min, 70%~10%乙腈; 25~27 min, 10%乙腈; 检测波长为 284 nm; 柱温 30 °C, 体积流量 1.0 mL/min; 进样体积 10 μL。

(3) 丹皮酚: 色谱仪为 Infinity II 高效液相色谱仪; 色谱柱为 HC-C₁₈ (2) 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水溶液 (45:55), 等度洗脱, 洗脱时间 28 min; 检测波长为 274 nm; 柱温 25 °C, 体积流量 1.0 mL/min; 进样体积 10 μL。

2.3.3 多成分含量测定的方法学考察^[26-28] 从专属性、线性关系、精密度、重复性、稳定性、加样回收率 6 个方面对建立方法的可行性和科学性进行考察。方法学考察结果见表 3。

(1) 专属性试验: 精密吸取对照品溶液、供试品溶液及各阴性样品溶液, 按“2.3.2”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图, 见图 6。

(2) 线性关系考察: 精密量取“2.3.1 (1)”项下各对照品溶液 10 mL, 用甲醇稀释成 6 种不同质量浓度的系列对照品溶液。按“2.3.2”项下色谱条件进样分析, 记录峰面积。以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 绘制标准曲线。

(3) 精密度试验: 精密吸取“2.3.1 (1)”项下各对照品溶液, 按“2.3.2”项下色谱条件, 连续重复进样 6 次, 记录峰面积, 计算各对照品色谱峰面积的 RSD。

(4) 重复性试验: 按“2.1”及“2.2.1 (2)”项下要求, 平行制备 6 份化肝煎物质基准供试品溶液 (S1), 按“2.3.2”项下色谱条件, 依次进样分析,

记录峰面积，计算各对照品色谱峰面积的 RSD。

(5) 稳定性考察：取同一化肝煎物质基准供试品溶液 (S1)，分别在 0、2、4、8、12、18、24、30 h 时，按“2.3.2”项下色谱条件进样分析，记录峰面积，计算各对照品色谱峰面积的 RSD。

(6) 加样回收率试验：精密称取已知含量的化肝煎物质基准 0.5 g，共 6 份，分别加入一定量的对

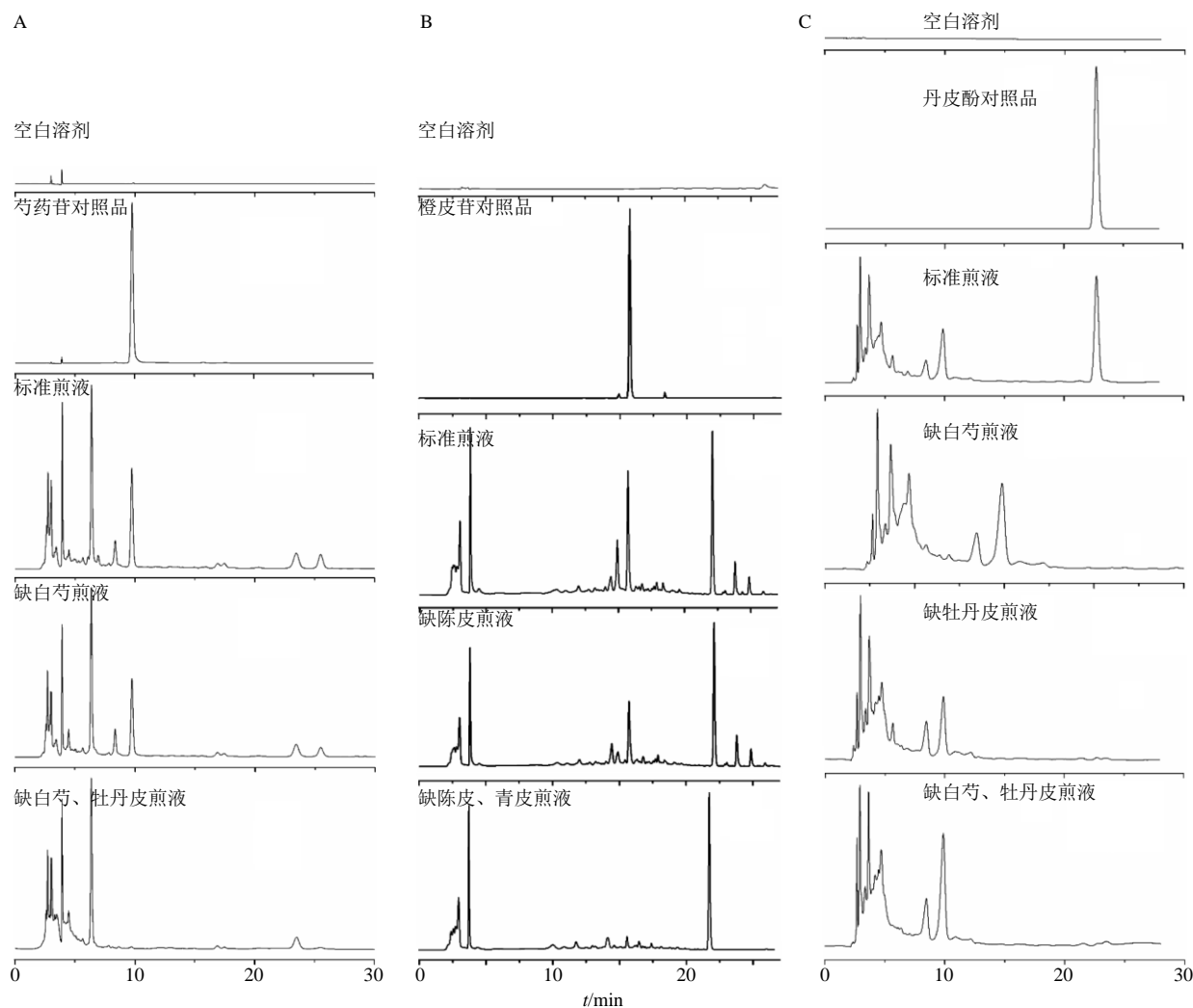
照品，按“2.2.1 (2)”项下要求制备各供试品溶液，按“2.3.2”项下色谱条件进样分析，记录峰面积，计算加样回收率。

结果显示 (表 3)，化肝煎物质基准中芍药苷、橙皮苷及丹皮酚含量测定方法专属性、线性、仪器精密度、方法重复性、样品稳定性和加样回收率均良好，本实验所建立的方法科学可行。

表 3 物质基准中指标性成分含量测定方法学考察

Table 3 Methodological study on content determination of index components in material reference

成分	回归方程	r^2	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	平均加样 回收率/%	RSD/%			
					精密度	重复性	稳定性	加样回收率
芍药苷	$Y=75.625\ 47\ X+353.006\ 37$	0.999 8	13.35~213.60	97.73	0.27	1.05	0.82	1.37
橙皮苷	$Y=18\ 437\ 495.34\ X-19\ 366.393$	0.999 9	19.20~614.40	96.90	0.69	1.65	1.83	1.21
丹皮酚	$Y=50.007\ X+86.674$	0.999 7	4.23~135.30	96.63	0.55	0.63	1.39	0.43



A-芍药苷专属性 B-橙皮苷专属性 C-丹皮酚专属性

A-specificity of paeoniflorin B-specificity of hesperidin C-specificity of paeonol

图 6 物质基准中指标性成分含量测定专属性考察

Fig. 6 Specificity study on content determination of index components in material reference

2.3.4 样品的含量测定 取 18 批化肝煎饮片, 按“2.1”及“2.3.1 (2)”项下方法制备供试品溶液, 分别按“2.3.2”项下色谱条件测定, 双样双针, 记录峰面积, 采用标准曲线法计算样品中芍药苷、橙皮苷、丹皮酚的含量, 结果取平均值, 见表 4。

表 4 物质基准中指标性成分含量测定结果

Table 4 Results of content determination of index components in material reference

样品批次	质量分数/%		
	芍药苷	橙皮苷	丹皮酚
S1	1.73	0.94	0.55
S2	1.73	0.96	0.55
S3	1.77	0.96	0.55
S4	1.43	0.97	0.49
S5	1.42	0.96	0.48
S6	1.44	0.96	0.49
S7	1.81	0.91	0.54
S8	1.95	0.93	0.53
S9	1.87	0.93	0.52
S10	1.66	1.02	0.52
S11	1.47	1.00	0.51
S12	1.48	1.01	0.53
S13	1.30	0.92	0.54
S14	1.28	0.93	0.56
S15	1.33	0.94	0.57
S16	1.45	0.99	0.55
S17	1.44	0.99	0.54
S18	1.43	1.00	0.54
均值	1.56	0.96	0.53

3 讨论

3.1 特征图谱色谱条件及样品处理方法的摸索

3.1.1 流动相考察 本研究考察了乙腈-水、甲醇-水、乙腈-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.05%磷酸水溶液系统, 结果显示, 乙腈-0.05%磷酸水溶液系统梯度洗脱的色谱信息丰富, 峰形较好, 故选择此系统进行分析检测。

3.1.2 波长的选择 采用 DAD 检测器对供试品溶液进行全波长扫描, 并根据全方中各味药在《中国药典》2015 年版^[29]中的最佳检测波长条件, 考察其在 283、274、230 nm 波长下的色谱图, 在 230 nm 波长下色谱图中各峰之间的比例比较协调, 直观效果较好, 提供的信息量大, 故采用 230 nm 作为特

征图谱检测波长。

3.1.3 柱温的考察 选择 25、30、35 °C 进行考察, 在相同条件下不同柱温各峰形及分离情况均不受影响, 综合考虑 25 °C 作为检测柱温。

3.1.4 样品提取溶媒的考察 样品溶媒分别选择纯甲醇、70% 甲醇、50% 甲醇、25% 甲醇、纯水进行考察, 比较各自出峰速度及出峰量。提取溶媒考察过程中所用条件如下: 色谱仪为 Ulti Mate 3000 超高效液相色谱仪; 色谱柱为 Sun Fire C₁₈ (150 mm × 3.0 mm, 3.5 μm); 流动相乙腈-0.05% 磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~7 min, 5%~22% 乙腈; 7~12 min, 22%~23% 乙腈; 12~17 min, 23%~26% 乙腈; 17~27 min, 26%~49% 乙腈; 27~28 min, 49%~68% 乙腈; 28~29 min, 68%~77% 乙腈; 29~34 min, 77%~95% 乙腈; 检测波长为 230 nm; 柱温 25 °C; 体积流量 0.5 mL/min; 进样体积 5 μL。结果发现出峰速度、出峰数量以及峰形、基线等均差别不大。考虑到样品批次多、分析时间长, 为延长保存时间, 故本实验选择甲醇作为溶剂来处理样品。

3.2 检测结果分析

化肝煎物质基准指标性成分含量范围为芍药苷 1.28%~1.95%、橙皮苷 0.91%~1.02%、丹皮酚 0.48%~0.57%。3 个产地 18 个批次的芍药苷含量均值为 S7~S12>S1~S6>S13~S18; 橙皮苷 S7~S12>S13~S18>S1~S6; 丹皮酚 S13~S18>S7~S12>S1~S6。为了缩小指标性成分含量范围, 减少批次间的质量差异, 在今后进行化肝煎物质基准的制备时, 除了通过将饮片大小及部位严格分等或控制饮片的含量限度范围外^[30], 还可以借鉴日本津村药业的方式, 通过对不同年份、不同产地、不同批次饮片进行混合均化处理而投料生产的方法^[31], 控制饮片的质量波动, 以保证不同批次经典名方物质基准的相对稳定。

国家药品监督管理局组织起草的《古代经典名方中药复方制剂及其物质基准的申报资料要求(征求意见稿)》中也明确指出鼓励饮片均化投料^[32], 采用多批合格饮片经均化处理而投料生产的方法, 保证经典名方复方制剂质量稳定从而确保其临床疗效的稳健发挥。针对本研究成果, 在混批过程中, 应综合考虑所有指标性成分的含量, 可将指标成分含量最低的饮片和指标成分含量最高的饮片进行合理组合, 并将芍药苷、橙皮苷、丹皮酚作为饮片均化处理的评价指标。

3.3 指标性成分的选择

为体现中药制剂在中医学理论指导下的组方配伍的原理, 制剂质量标志物的确定应遵循组方配伍, 以君药为主, 臣、佐、使药兼顾的原则^[24,33]。根据各味药在处方中的不同作用, 确定了该方剂的君臣佐使, 方中青皮善解郁怒, 疏肝破气以宽胸胁三焦之郁而为方药之君; 陈皮辛温, 助青皮理气化痰消痞, 更能运脾为方药之臣, 二者合用共奏疏肝理气解郁之功; 气郁动火, 栀子清肝火宣郁除烦为方药之臣; 白芍、牡丹皮、泽泻、及浙贝母均为方药之佐, 火动伤血, 故用芍药、丹皮入血分, 清血热, 泻肝火, 养血行滞, 则郁热自解; 贝母最善降气化痰, 兼利肺气, 取“佐金平木”之意; 泽泻通利泄热, 利小便以泻伏火。本研究基于组方配伍特点, 结合指认指纹图谱的共有峰和批次之间产生差异的主要标志性成分, 综合分析, 选择陈皮、青皮中橙皮苷、白芍、牡丹皮中芍药苷、牡丹皮中丹皮酚作为化肝煎物质基准的指标成分, 评价物质基准批次间的一致性, 有利于控制其质量稳定性。

本研究建立了经典名方化肝煎物质基准的 UPLC 特征图谱和指标性成分 HPLC 含量测定方法, 共同作为化肝煎物质基准的质量控制方式, 其质控方式在多批次物质基准中应用, 重复性、稳定性良好, 可有效反映了化肝煎物质基准化学特征。本研究将特征图谱与含量测定相结合, 建立了指标性成分筛选模式, 不仅总体表征了该方化学成分, 还对影响该方批次间质量稳定性的指标性成分进行重点把控, 可用于化肝煎物质基准的质量控制, 同时也为化肝煎复方制剂开发研究的质量控制及一致性评价奠定了基础。

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]. <http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2018-04-16/7107.html>. 2018-04-16/2019-11/11.

[2] 余 达, 邵莉莉, 刘中良, 等. 冯昌汉应用化肝煎经验撷菁 [J]. 浙江中医杂志, 2020, 55(2): 143.

[3] 杨文峰, 应佳晓, 张亚梅, 等. 黄莺教授运用化肝煎加减治疗皮肤病经验举隅 [J]. 亚太传统医药, 2017, 13(3): 89-91.

[4] 李文斌. 化肝煎加味治疗肝胃郁热型胃食管返流病临床观察 [J]. 实用中医内科杂志, 2020, 34(1): 11-14.

[5] 许 话. 化肝煎加减治疗反流性食管炎肝胃郁热型临床观察 [J]. 实用中医药杂志, 2019, 35(7): 772-773.

[6] 米云鹏. 化肝煎加减治疗胃溃疡 50 例 [J]. 实用中医内

科杂志, 2008, 22(11): 34-35.

[7] 黄晓芬. 慢性胃炎肝胃郁热病机探讨及回顾性疗效分析 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2015.

[8] 王捷虹, 田旭东. 加味化肝煎治疗胆汁反流性胃炎 36 例 [J]. 陕西中医, 2003, 24(10): 903.

[9] 董小革. 化肝煎加减治疗肝胃郁热型慢性浅表性胃炎 39 例 [J]. 河北中医, 2009, 31(8): 1174-1175.

[10] 米云鹏. 化肝煎加减治疗糜烂型慢性胃炎 112 例 [J]. 长春中医药大学学报, 2009, 25(2): 240.

[11] 梁开发. 化肝煎加味治疗乳房疾病浅探 [J]. 中医药研究, 1992(6): 20-21.

[12] 韩兰香. 从肝郁探讨子宫肌瘤和乳腺增生的相关性 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2012.

[13] 李振兰. 化肝煎在妇科临床上的应用 [J]. 安徽医学, 2001, 22(2): 40.

[14] 王翠萍. 化肝煎治疗月经病 [J]. 天津中医, 1993(2): 8.

[15] 常维江. 化肝煎在妇科临床上的应用 [J]. 中医临床与保健, 1990(4): 31.

[16] 王 云, 宋 琪, 龚 娟, 等. 从肝郁探讨化肝煎治疗女性玫瑰痤疮 [J]. 河南中医, 2020, 40(1): 78-81.

[17] 孙永明. 化肝煎加味降低联苯双酯停药后谷丙转氨酶反跳 72 例 [J]. 实用中医内科杂志, 2005, 19(5): 475.

[18] 徐 蕾, 李 达. 化肝煎加减治疗 2 型糖尿病合并非酒精性脂肪性肝病的临床研究 [J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2017, 5(31): 81.

[19] 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的规定的公告 [EB/OL]. <http://www.nmpa.gov.cn/WS04/CL2093/228247.html>, 2018-05-29/2020-05/03.

[20] 陈燦文, 宋粉云, 李 华, 等. 安胎丸 UPLC 指纹图谱及模式识别研究 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(3): 465-472.

[21] 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.

[22] 成颜芬, 王升菊, 吴亿晗, 等. HPLC-DAD 波长切换法同时测定身痛逐瘀汤物质基准中 8 种有效成分含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(4): 16-22.

[23] 田双双, 赵晓梅, 刘珊珊, 等. 基于 UPLC 特征图谱及萜类成分含量测定的泽泻产地差异研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(7): 1545-1557.

[24] 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.

[25] 成颜芬, 江华娟, 王 琳, 等. 经典名方桃红四物汤化学指纹图谱及 9 种成分含量测定研究 [J]. 中草药, 2020, 51(3): 653-661.

- [26] 刘冬涵, 薛宇涛, 罗菊元, 等. 经典名方苓桂术甘汤的物质基准量值传递分析 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(24): 5421-5428.
- [27] 莫雨佳, 王彦, 齐琪, 等. 经典名方散偏汤 HPLC 指纹图谱的建立及川芎的量值传递研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(3): 572-578.
- [28] 肖萌, 刘宗洋, 吴霞, 等. HPLC 同时测定薯蓣中 6 种主要成分的含量 [J/OL]. 中国中药杂志: 1-8 [2020-05-08]. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcmm.20200220.201>.
- [29] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [30] 周菲, 林美斯, 王琳, 等. 经典名方百合地黄汤物质基准制备及过程质量控制研究 [J]. 中草药, 2019, 50(16): 3824-3832.
- [31] 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.
- [32] 国家药品监督管理局. 国家药监局综合司公开征求古代经典名方中药复方制剂及其物质基准申报资料要求(征求意见稿)意见 [EB/OL]. <http://www.nmpa.gov.cn/WS04/CL2101/335926.html>, 2019-03-22/2020-05-07.
- [33] 张铁军, 许浚, 韩彦琪, 等. 中药质量标志物(Q-marker)研究: 延胡索质量评价及质量标准研究 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1458-1467.