

经典名方桃核承气汤物质基准关键质量属性研究

关雅戈¹, 罗 赣^{1#}, 高晓燕^{1*}, 蒋宇航¹, 刘雨涵¹, 韩 晨¹, 苗家燕¹, 韩妮娜², 张志强^{2*}

1. 北京中医药大学, 北京 100029

2. 北京同仁堂药业有限公司, 北京 101301

摘要: 目的 建立桃核承气汤(Taohe Chengqi Decoction, TCD)物质基准的HPLC特征图谱及指标成分含量测定方法, 阐明TCD物质基准的关键质量属性, 构建其质量控制体系。方法 特征图谱1, 色谱柱为Diamonsil钻石二代C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 甲醇-0.1%磷酸水溶液为流动相, 体积流量为1.0 mL/min, 梯度洗脱, 进样量为10 μL, 柱温30 ℃, 检测波长为254 nm; 特征图谱2, 色谱柱为Diamonsil钻石一代C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 甲醇-0.2%磷酸水溶液为流动相, 体积流量为1.0 mL/min, 梯度洗脱, 进样量为10 μL, 柱温35 ℃, 检测波长为210 nm。结果 根据方中成分的极性差异, 建立2张特征图谱, 结果显示, 15批TCD物质基准相似度分别为0.928~0.992和0.809~0.995, 共确定32个特征峰, 并指认苦杏仁苷、甘草苷、甘草酸铵、芦荟大黄素、大黄酸5个共有成分。15批TCD物质基准的平均出膏率为19.10%, 苦杏仁苷、甘草酸铵、桂皮醛、芦荟大黄素、大黄酸的质量分数分别为2.650~7.318、3.563~17.486、0.013~0.128、0.034~0.215、0.930~3.582 mg/g。结论 为TCD物质基准的质量控制和复方制剂开发提供科学依据。

关键词: 经典名方; 桃核承气汤; 物质基准; 关键质量属性; 特征图谱; HPLC; 质量控制; 苦杏仁苷; 甘草苷; 甘草酸铵; 芦荟大黄素; 大黄酸; 桂皮醛; 出膏率

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2021)08-2267-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.08.009

Study on critical quality attributes of classical prescription substance benchmarks of Taohe Chengqi Decoction

GUAN Ya-ge¹, LUO Gan¹, GAO Xiao-yan¹, JIANG Yu-hang¹, LIU Yu-han¹, HAN Chen¹, MIAO Jia-yan¹, HAN Ni-na², ZHANG Zhi-qiang²

1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. Beijing Tcmages Pharmaceutical Co., Ltd., Beijing 101301, China

Abstract: Objective To establish the HPLC characteristic chromatogram and content determination method of index components in Taohe Chengqi Decoction (TCD) substance benchmarks, which clarified the critical quality attributes and constructed the quality control system. **Methods** For characteristic chromatogram 1, the separation was performed on the Diamonsil diamond second-generation C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) at 30 ℃. The mobile phase consisted of methanol and water with 0.1% phosphoric acid at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was 254 nm; Characteristic chromatographic 2 analysis was performed using the Diamonsil diamond first-generation C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). Methanol and 0.2% phosphoric acid aqueous solution were utilized as the mobile phases. The flow rate was set at 1.0 mL/min using a gradient program. The temperature of the column was maintained at 35 ℃, and the signal was detected at 210 nm. For these two methods, the injection volume of the standard and sample was kept as 10 μL. **Results** According to polarity differences among these components of TCD, two HPLC characteristic chromatograms were established. The similarities for the two HPLC characteristic chromatograms of 15 batches of substance benchmarks of TCD were 0.928—0.992 and 0.809—0.995, respectively. A total of 32 characteristic peaks were identified

收稿日期: 2020-11-27

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81673562)

作者简介: 关雅戈(1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药质量控制。E-mail: gyg1421@163.com

*通信作者: 高晓燕(1967—), 博士, 教授, 主要从事中药分析及药效物质研究。Tel: 13439727699 E-mail: gaoxiaoyan@bucm.edu.cn

张志强(1981—), 男, 正高级工程师, 主要从事中药质量标准及产业化研究。E-mail: zhangzhiqiang@tcmages.com

#共同第一作者: 罗 赣(1986—), 男, 博士, 讲师, 主要从事中药质量控制研究。E-mail: luna049@126.com

and five common components were identified as amygdalin, glycyrrhizin, ammonium glycyrrhizinate, aloe-emodin, and rhein. The average dry extract yield of 15 batches of TCD was 19.10%. The contents of amygdalin, ammonium glycyrrhizinate, cinnamaldehyde, aloe-emodin and rhein were 2.650—7.318, 3.563—17.486, 0.013—0.128, 0.034—0.215, 0.930—3.582 mg/g, respectively. **Conclusion** This study could provide scientific basis for the quality control of substance benchmarks and the development of compound preparations of TCD.

Key words: classical prescription; Taohe Chengqi Decoction; substance benchmarks; critical quality attributes; characteristic chromatogram; HPLC; quality control; amygdalin; liquiritin; ammonium glycyrrhizinate; aloe-emodin; rhein; cinnamaldehyde; dry extract rate

经典名方物质基准是指以古代医籍中记载的经典名方制备方法为依据制备而得的中药药用物质的标准,除成型工艺外,其余制备方法应当与古代医籍记载基本一致^[1],是连接传统制法与现代生产工艺的对照物质,是评价复方制剂与传统汤剂一致性的准绳^[2-3]。经典名方关键质量属性(critical quality attributes, CQAs)是指影响药品安全性、有效性或一致性的物理、化学、生物活性等质量属性^[4],在经典名方物质基准研究中,CQAs主要包括特征图谱、指标性成分含量、出膏率。从传统汤剂、物质基准到复方制剂,在经典名方的开发研究中CQAs不可或缺。《中药经典名方复方制剂简化注册审批管理规定(征求意见稿)》亦要求,经典名方制剂的研制包括物质基准和复方制剂2个阶段,应保证二者CQAs一致^[1]。

桃核承气汤(Taohe Chengqi Decoction, TCD)出自东汉张仲景所著《伤寒论》,主治下焦蓄血证。全方由桃仁、大黄、桂枝、甘草和芒硝组成^[5]。其中桃仁与大黄并用,活血破瘀泻热;芒硝助大黄下瘀、泻热;桂枝助桃仁活血化瘀;甘草和中,缓诸药峻烈之性;5药合用共奏破血下瘀之效。TCD常用于闭经、子宫内膜异位症、崩漏以及不孕症,同时治疗慢性肾功能衰竭、糖尿病等疾病应用广泛^[6-11]。

目前未见关于TCD物质基准CQAs研究的报道,针对此问题,本实验建立TCD物质基准HPLC特征图谱,依据处方配伍和文献研究,确定桃仁中苦杏仁苷、甘草中甘草酸铵、桂枝中桂皮醛、大黄中芦荟大黄素及大黄酸作为TCD物质基准指标成分并建立其含量测定方法,联合HPLC特征图谱和出膏率共同构建TCD物质基准的质量控制体系,以期为其复方制剂的开发提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Thermo Fisher Ultimate 3000 高效液相色谱仪,

DAD 检测器, CM7.2 色谱工作站, 美国 Thermo-Fisher 公司; Sorvall ST 8R 高速冷冻离心机, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; XP-6 型百万分之一精密天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; KQ5200DA 超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; Milli-Q 超纯水系统, 美国 Millipore 公司; 陶瓷锅, 曼达尼旗舰店; LC-E013S 电陶炉, 广东顺德忠臣电器有限公司; SHB-III 循环水式多用真空泵, 郑州长城科工贸有限公司。

1.2 试药

TCD 中各药材产地信息见表 1。经前期研究确定大黄、桃仁、甘草的炮制方法后,由北京康仁堂药业有限公司提供各批次药材和饮片。方中各药材经北京中医药大学杨瑶珺教授鉴定分别为蔷薇科桃属植物山桃 *Prunus davidiana* (Carr.) Franch. 的干燥成熟种子, 蓼科大黄属植物唐古特大黄 *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. 的干燥根和根茎, 豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎, 樟科樟属植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥嫩枝, 硫酸盐类矿物芒硝族芒硝 *Natrii Sulfas*, 经加工精制而成的结晶体。

对照品苦杏仁苷(批号 DST190829-004)、甘草苷(批号 DST190702-009)、甘草酸铵(批号 DST190702-008)购自成都德思特生物技术有限公司;对照品桂皮醛(批号 110710-201418)、大黄酸(批号 110757-201607)、芦荟大黄素(批号 110795-201710)、大黄素(批号 110756-201913)、大黄酚(批号 110796-201621)、大黄素甲醚(批号 110758-201616)购自中国食品药品检定研究院,上述对照品均为 HPLC 含量测定用,质量分数均大于 98%。色谱纯乙腈、甲醇,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;实验室自制超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 TCD 物质基准对应实物的制备

《伤寒论》记载 TCD 的处方及制法为“桃仁五

表1 TCD药材来源及批号信息

Table 1 Origin and batch information of TCD medicinal materials

名称	产地	批号
桃仁	北京市门头沟区	JF-TR-201905
	北京市东城区	JF-TR-201911、JF-TR-201915
	山东省临沂市	JF-TR-201906、JF-TR-201908、JF-TR-201913
	山东省菏泽市	JF-TR-201907、JF-TR-201919
	河北省张家口市	JF-TR-201918、JF-TR-201916
	山西省运城市	JF-TR-201909、JF-TR-201914
	山西省临汾市	JF-TR-201910
	山西省大同市	JF-TR-201917
	山西省忻州市	JF-TR-201912
大黄	青海省海西蒙古族藏族自治州	JF-DH-201954
	青海省西宁市	JF-DH-201951-52、JF-DH-201969、JF-DH-201908、JF-DH-201971-72、JF-DH-202001
	青海省海东市	JF-DH-201955、JF-DH-201957-59
	甘肃省甘南州合作市	JF-DH-201961-62、JF-DH-201967-68、JF-DH-202003
桂枝	广西壮族自治区南宁市	JF-GZ-201901、JF-GZ-201917、JF-GZ-201919、JF-GZ-201921
	广西壮族自治区玉林市	JF-GZ-201907
	广西壮族自治区防城港市	JF-GZ-201908
	广东省肇庆市	JF-GZ-201903、JF-GZ-201905、JF-GZ-201918、JF-GZ-201920、JF-GZ-201922-23
	云南省文山壮族苗族自治州	JF-GZ-201911、JF-GZ-201913-14
甘草	甘肃省定西市	JF-GC-201959-61
	宁夏回族自治区吴忠市	JF-GC-201962、JF-GC-201965、JF-GC-201967-69
	内蒙古自治区包头市	JF-GC-201971-77
芒硝	山东省菏泽市	JF-MX-201907、JF-MX-201909、JF-MX-20191、JF-MX-201913、JF-MX-201915、 JF-MX-201918、JF-MX-201923
	河南省信阳市	JF-MX-201911
	河北省保定市	JF-MX-201901-04、JF-MX-201906、JF-MX-201919-20

十个(去皮尖), 大黄四两, 桂枝二两(去皮), 甘草二两(炙), 芒硝二两, 右五味, 以水七升, 煮取二升半, 去滓, 内芒硝, 更上火, 微沸下火, 先食温服五合, 日三服, 当微利。”经文献考证^[11-13]确定东汉一两相当于今之 13.8 g, 一升相当于 200 mL, 故确定处方剂量为焯桃仁 50 枚、大黄 55.2 g、炙甘草 27.6 g、桂枝 27.6 g、芒硝 27.6 g。取处方量的各饮片, 置 3 L 陶瓷锅中, 加入 1400 mL 去离子水, 武火煮沸后, 转文火煎煮至约 500 mL, 滤过, 加入芒硝 27.6 g, 文火煮至微沸, 放冷后定容至 500 mL, 即得标准煎液。取上述标准煎液适量, 4 ℃、9000 r/min 离心 20 min 后, 精密量取上清液 50 mL, 冷冻干燥, 即得。

将表 1 中各批次各单味饮片随机取样组合得 15 批 TCD 物质基准 S1~S15。

2.2 TCD 物质基准特征图谱研究

2.2.1 色谱条件

(1) 特征图谱 1: Diamonsil 钻石二代 C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.1% 磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~3 min, 20%~30% 甲醇; 3~30 min, 30%~45% 甲醇; 30~55 min, 45%~70% 甲醇; 55~80 min, 70%~80% 甲醇; 80~85 min, 80% 甲醇; 85~90 min, 80%~95% 甲醇; 90~95 min, 95%~100% 甲醇; 95~100 min, 100% 甲醇; 柱温 30 ℃; 体积流量 1 mL/min; 进样量 10 μL; 检测波长 254 nm。

(2) 特征图谱 2: Diamonsil 钻石一代 C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相甲醇-0.2% 磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~10 min, 10% 甲醇; 10~50 min, 10%~25% 甲醇; 柱温 35 ℃; 体积流量 1

mL/min; 进样量 10 μ L; 检测波长 210 nm。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取苦杏仁苷对照品适量, 加 70% 甲醇制得质量浓度为 1.770 mg/mL 的苦杏仁苷对照品溶液; 精密称取甘草苷和甘草酸铵对照品适量, 加甲醇制得质量浓度分别为 16.72、42.20 μ g/mL 的甘草苷、甘草酸铵混合对照品溶液; 精密称取桂皮醛对照品适量, 加甲醇制得质量浓度为 942.58 μ g/mL 的桂皮醛对照品溶液; 取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品适量, 加甲醇制得质量浓度分别为 213、660、205、209、244 μ g/mL 的大黄蒽醌类成分混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备

(1) TCD 物质基准供试品溶液制备: 取适量物质基准冻干粉, 加去离子水定容至 10 mL, 4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 即得。

(2) 各单味药及阴性样品供试品溶液制备: 取处方剂量各单味药饮片及分别缺桃仁、大黄、甘草、桂枝、芒硝的处方量饮片, 按“2.1”项下标准煎液制备方法制备后, 按上述供试品溶液制备方法制备, 即得。

2.2.4 方法学考察

(1) 参照峰的选择: 特征图谱 1 中, 大黄酸含量较高, 色谱峰较稳定, 故选择大黄酸的色谱峰(23)作为特征图谱 1 的参照峰, 计算特征图谱 1 中各共有峰的相对保留时间和相对峰面积; 特征图谱 2 中, 27 号共有峰含量较高, 色谱峰较稳定, 故选择 27 号共有峰作为特征图谱 2 的参照峰, 计算特征图谱 2 中各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。

(2) 精密度试验: 同一批物质基准供试品溶液, 按“2.2.1”项色谱条件, 连续进样 6 次, 记录谱图, 结果显示各共有峰的相对保留时间 RSD 均 < 0.27%, 相对峰面积 RSD 均 < 3%, 表明仪器精密度良好。

(3) 重复性试验: 同一批次 6 份物质基准供试品溶液, 按“2.2.1”项色谱条件, 测定特征图谱, 结果显示各共有峰的相对保留时间 RSD 均 < 0.56%, 相对峰面积 RSD 均 < 3%, 表明方法重复性良好。

(4) 稳定性试验: 同一批物质基准供试品溶液, 按“2.2.1”项色谱条件, 将样品置于室温下, 于 0、2、4、8、12、24 h 进样, 结果显示各共有峰的相对保留时间 RSD 均 < 0.58%, 相对峰面积 RSD 均 < 3%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.5 TCD 物质基准特征图谱的建立

(1) 特征图谱 1 的建立: 取 15 批物质基准、各单味药及阴性对照样品, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.1 (1)”项下色谱条件检测, 将数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 年版)软件, 以第 1 批的 HPLC 图谱为参照, 采用平均数法, 进行多点校正和色谱峰匹配, 自动匹配得到 15 批物质基准的特征图谱叠加图及共有模式, 如图 1 所示, 以生成的共有模式为参照, 15 批物质基准特征图谱与对照图谱的相似度均大于 0.92。

根据特征图谱分析结果, 将 TCD 物质基准与各单味药及其阴性样品 HPLC 谱图进行比对, 确定出峰情况良好、无阴性干扰的色谱峰为各药味特征峰。特征图谱 1 共确定 23 个特征峰, 特征峰 1~4、6~21、23 为大黄特征峰, 特征峰 5、22 为甘草特征峰。经与对照品比对, 指认出 4 个共有成分, 分别是 5 号峰甘草苷、21 号峰芦荟大黄素、22 号峰甘草酸铵和 23 号峰大黄酸。

(2) 特征图谱 2 的建立: 按“2.2.1 (2)”项下色谱条件检测, 同“2.2.5 (1)”项操作, 结果如图 2 所示, 以生成的共有模式为参照, 15 批 TCD 物质基准特征图谱与对照图谱的相似度均大于 0.8。

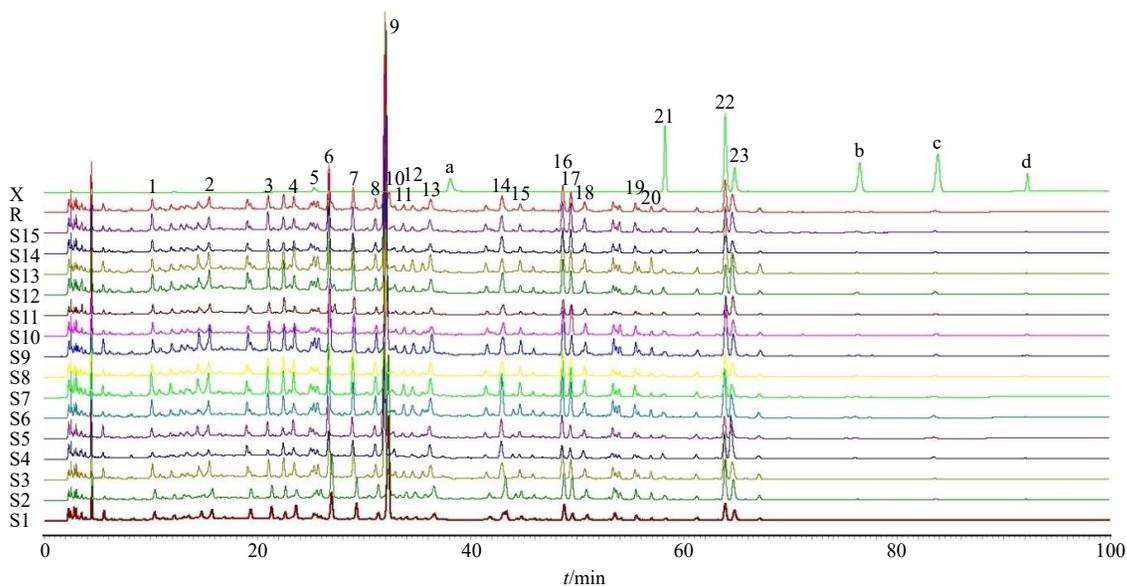
根据特征图谱分析结果, 将 TCD 物质基准与各单味药及其阴性样品 HPLC 谱图进行比对, 确定出峰情况良好、无阴性干扰的色谱峰为各药味特征峰。特征图谱 2 共确定 9 个特征峰, 特征峰 24~27、30~32 为大黄特征峰, 特征峰 28 为甘草特征峰, 特征峰 29 为桃仁特征峰。经与对照品 HPLC 图谱比对, 指认出 2 个共有成分, 分别是 24 号峰没食子酸、29 号峰苦杏仁苷。

2.3 指标成分含量测定研究

2.3.1 色谱条件

(1) 大黄蒽醌类成分和甘草酸铵含量测定: Diamonsil C₁₈ 钻石二代色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为甲醇-0.1% 磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~3 min, 20%~30% 甲醇; 3~30 min, 30%~45% 甲醇; 30~55 min, 45%~70% 甲醇; 55~80 min, 70%~80% 甲醇; 80~85 min, 80% 甲醇; 85~90 min, 80%~95% 甲醇; 90~95 min, 95%~100% 甲醇; 95~100 min, 100% 甲醇; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 体积流量 1 mL/min; 进样量 10 μ L; 检测波长 254 nm。

(2) 苦杏仁苷含量测定: Diamonsil C₁₈ 钻石一



5-甘草苷 21-芦荟大黄素 22-甘草酸铵 23-大黄酸 a-桂皮醛 b-大黄素 c-大黄酚 d-大黄素甲醚
5-glycyrrhizin 21-aloe-emodin 22-ammonium glycyrrhizinate 23-rhein a-cinnamaldehyde b-emodin c-rhubarb d-phycion

图1 15批TCD物质基准的HPLC特征图谱1(S1~S15)、对照图谱1(R)、混合对照品HPLC图(X)

Fig. 1 HPLC characteristic chromatogram 1 of 15 batches of TCD substance benchmarks (S1—S15), HPLC reference chromatogram 1 (R), HPLC of mixed reference substance (X)

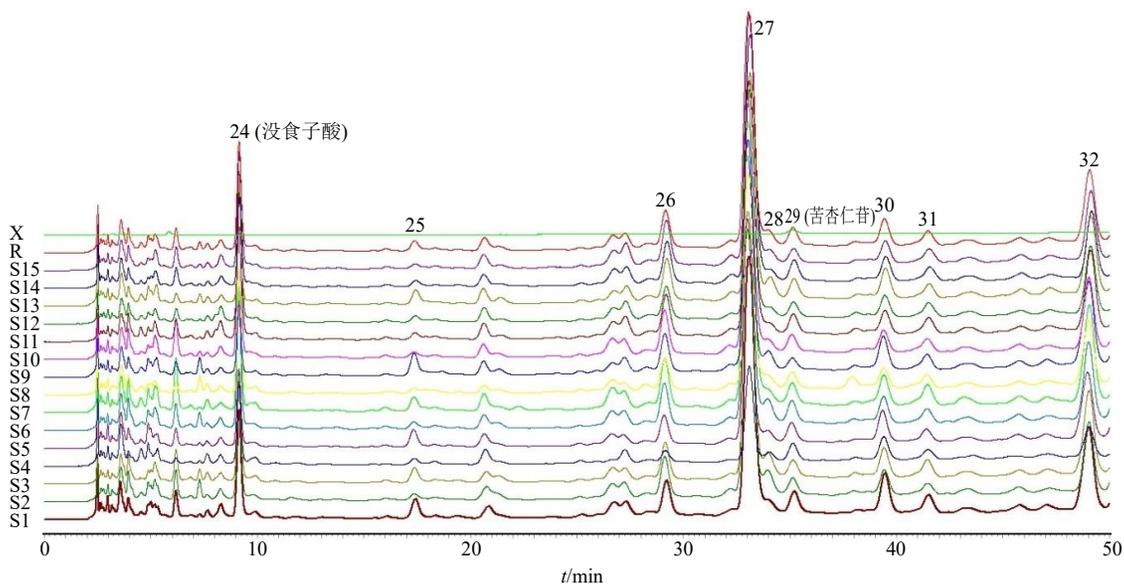


图2 15批TCD物质基准的HPLC特征图谱2(S1~S15)、对照图谱2(R)、混合对照品HPLC色谱图(X)

Fig. 2 HPLC characteristic chromatogram 2 of 15 batches of TCD substance benchmarks (S1—S15), HPLC reference chromatogram 2 (R), HPLC of mixed reference substance (X)

代色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.2%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~10 min, 10% 甲醇; 10~50 min, 10%~23%甲醇; 柱温 38 °C; 体积流量 1 mL/min; 进样量 10 μL; 检测波长 210 nm。

(3) 桂皮醛含量测定: Diamonsil C₁₈ 钻石二代色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-

0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~15 min, 3%~32% 甲醇; 15~60 min, 32%甲醇; 柱温 30 °C; 体积流量 1 mL/min; 进样量 10 μL; 检测波长 290 nm。

2.3.2 对照品溶液的制备

(1) 甘草酸铵对照品溶液制备: 精密称取甘草酸铵对照品适量, 加甲醇制得质量浓度分别为 1.235 mg/mL 的甘草酸铵对照品溶液。

(2) 桂皮醛、苦杏仁苷、大黄蒽醌类成分混合对照品溶液制备: 同“2.2.2”项下桂皮醛、苦杏仁苷、大黄蒽醌类成分混合对照品溶液配制。

2.3.3 供试品溶液制备 取适量物质基准冻干粉, 加30%甲醇定容至5 mL, 4 °C、13 000 r/min离心20 min, 取上清液进行苦杏仁苷、甘草酸铵、桂皮醛、芦荟大黄素、大黄酸含量测定。

2.3.4 方法学考察

(1) 系统适应性试验: 按照“2.3.1”项下色谱条件测定混合对照品溶液、TCD物质基准的供试品溶液、各单味药及其阴性样品溶液, 结果表明样品中各指标成分的分离度均大于1.5、理论塔板数均大于9900, 且阴性无干扰, 可进行含量测定, 典型图谱如图3~6所示。

(2) 线性关系考察: 精密吸取“2.3.2”项下各指标成分对照品储备液, 分别用倍比稀释法配制成

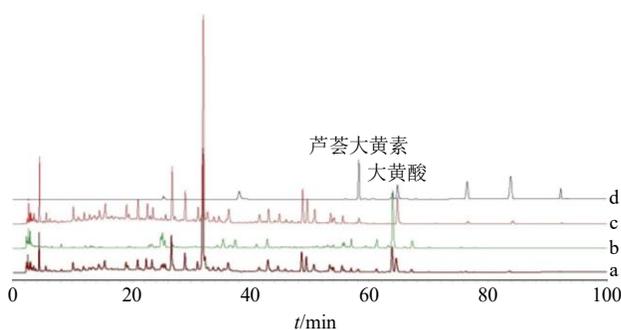


图3 TCD物质基准(a)、缺大黄阴性样品(b)、大黄单味药样品(c)、混合对照品(d)的HPLC图谱

Fig. 3 HPLC of sample of TCD substance benchmarks (a), negative sample without *Rhei Radix et Rhizoma* (b), *Rhei Radix et Rhizoma* sample (c), and mixed reference substance (d)

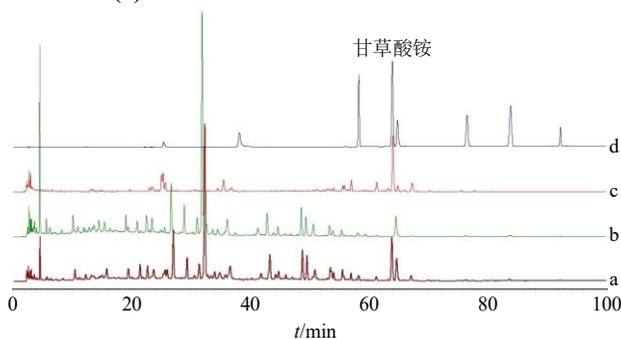


图4 TCD物质基准(a)、甘草阴性样品(b)、甘草单味药样品(c)、混合对照品(d)的HPLC图谱

Fig. 4 HPLC of sample of TCD substance benchmarks (a), negative sample without *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* (b), *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* (c), and mixed reference substance (d)

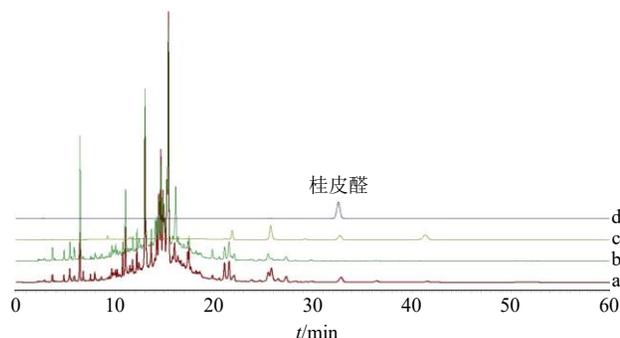


图5 TCD物质基准(a)、桂枝阴性样品(b)、桂枝单味药样品(c)、桂皮醛对照品(d)的HPLC图谱

Fig. 5 HPLC of sample of TCD substance benchmarks *Cinnamomi Ramulus* (a), negative sample without *Cinnamomi Ramulus* (b), *Cinnamomi Ramulus* (c), reference substance of cinnamaldehyde (d)

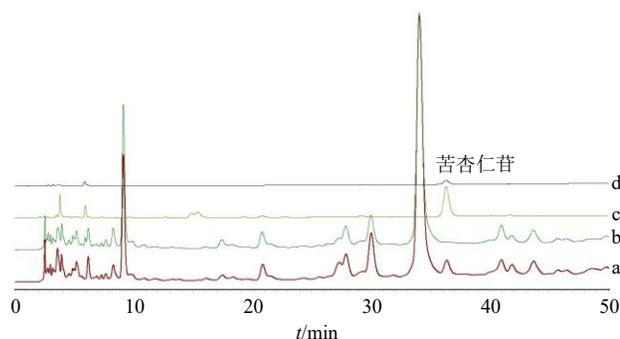


图6 TCD物质基准(a)、桃仁阴性样品(b)、桃仁单味药样品(c)、苦杏仁苷对照品(d)的HPLC图谱

Fig. 6 HPLC of sample of TCD substance benchmarks (a), negative sample without *Persicae Semen* (b), *Persicae Semen* (c), and reference substance of amygdalin (d)

系列对照品溶液, 按“2.3.1”项下各色谱条件分析, 记录色谱图及峰面积。以峰面积为纵坐标(Y), 质量浓度为横坐标(X), 分别绘制标准曲线, 如表2所示。结果表明, 苦杏仁苷、甘草酸铵、桂皮醛、芦荟大黄素、大黄酸在各自的线性范围内线性关系良好。

(3) 精密度试验: 同一批物质基准供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件, 连续进样6次, 结果显示苦杏仁苷、甘草酸铵、桂皮醛、芦荟大黄素、大黄酸峰面积的RSD值分别为0.68%、1.32%、2.02%、0.60%、0.29%, 表明仪器精密度良好。

(4) 稳定性试验: 同一批物质基准供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件, 分别于供试品溶液制备后0、2、4、8、12、24 h进样分析, 结果显示苦杏仁苷、甘草酸铵、桂皮醛、芦荟大黄素、大黄酸峰面积的RSD值分别为1.96%、1.67%、2.66%、2.50%、

表2 TCD物质基准对应实物中各指标成分含量测定方法学考察

Table 2 Methodological study on determination of contents of various indexes in substance benchmarks of TCD

指标成分	回归方程	r	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	加样回收率/%	RSD/%
苦杏仁苷	$Y=8.6181X+63.666$	0.9987	28.00~1770	102.37	4.36
甘草酸铵	$Y=0.0898X-0.7431$	0.9987	7.720~1235	96.98	2.65
桂皮醛	$Y=1.5331X+0.2886$	0.9998	0.120~235.7	96.40	3.05
芦荟大黄素	$Y=0.7526X+0.7145$	0.9997	2.662~213.0	100.31	3.72
大黄酸	$Y=0.6504X+0.0002$	1.0000	0.283~283.0	100.76	3.15

2.66%，表明供试品溶液在24h内稳定性良好。

(5) 重复性试验：同一批物质基准供试品溶液6份，按“2.3.1”项下色谱条件进样分析，结果显示苦杏仁苷、甘草酸铵、桂皮醛、芦荟大黄素、大黄酸质量分数的RSD值分别为1.87%、1.40%、1.64%、1.29%、2.55%，表明该方法重复性良好。

(6) 加样回收率试验：取已测定各指标成分含量的TCD第7批物质基准冻干粉适量，精密称定，分别以指标成分含量的50%、100%、150%加入各指标成分对照品储备液各3份，按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液；按“2.3.1”项下色谱条件进样测定，计算苦杏仁苷、甘草酸铵、桂皮醛、芦荟大黄素、大黄酸的回收率。结果如表2所示，各指标成分平均加样回收率均在95%~105%，RSD在2.65%~4.36%，结果表明加样回收率良好。

2.3.5 样品含量测定 采用“2.3.3”项下方法分别制备15批物质基准供试品溶液，按“2.3.1”项下色谱条件进样测定，结果见表3。15批物质基准中苦杏仁苷、甘草酸铵、桂皮醛、芦荟大黄素、大黄酸的质量分数分别为2.650~7.318、3.563~17.486、0.013~0.128、0.034~0.215、0.930~3.582 mg/g。

2.4 出膏率测定

按“2.1”项下方法制备15批物质基准样品，测定其出膏率，计算公式为出膏率= m/M ^[14]，式中m表示物质基准样品的质量，M表示饮片投料量，结果见表3。结果表明15批物质基准的平均出膏率为19.10%，RSD为11.90%，均未出现离散数据（平均值的70%~130%以外）。

3 讨论

CQAs是保证产品质量的物理、化学、生物或微生物的性质或特征，这些性质或特征应有适当的限度、范围或分布^[15]。在经典名方物质基准研究中CQAs指影响药品安全性、有效性或一致性的质量属性^[2]。特征图谱从整体层面对药材、饮片质量稳

表3 15批TCD物质基准中5种指标成分的含量及出膏率
Table 3 Contents of five index components and dry extract rate in 15 batches of TCD substance benchmarks

样品	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)					出膏率/%
	苦杏仁苷	甘草酸铵	桂皮醛	芦荟大黄素	大黄酸	
S1	3.266	4.730	0.098	0.109	0.930	22.19
S2	4.076	11.548	0.069	0.215	1.623	20.18
S3	4.906	12.178	0.114	0.073	1.643	19.13
S4	4.100	6.078	0.037	0.188	3.582	19.52
S5	5.541	5.731	0.013	0.059	1.225	19.20
S6	4.973	12.949	0.068	0.108	1.947	19.29
S7	5.565	6.957	0.029	0.085	1.232	18.83
S8	5.502	6.283	0.042	0.053	1.310	18.77
S9	2.650	15.181	0.042	0.104	2.097	14.02
S10	5.098	5.957	0.060	0.087	1.394	15.30
S11	6.760	3.563	0.077	0.131	1.626	18.11
S12	7.128	7.871	0.056	0.034	3.441	18.24
S13	6.418	17.486	0.035	0.104	2.249	20.12
S14	5.983	4.754	0.073	0.071	1.119	23.21
S15	7.318	6.354	0.128	0.082	1.816	20.33

定性进行评价和控制，在一定程度上可以较全面地反映经典名方中各药味有效成分的数与量^[16]，进而反映经典名方物质基准质量信息的完整概貌。经典名方药效的发挥是多成分、多靶点、多途径协同作用的结果，仅单一成分含量不足以反映经典名方的整体质量，多指标成分含量测定可完善经典名方质量控制体系^[17]。出膏率是考察制备工艺是否稳定、均一的整体性指标参数^[18]，直接影响中药复方质量稳定性和均一性，其波动对含量有极大影响。因此确定经典名方物质基准的CQAs为特征图谱、指标成分含量测定和出膏率。

经典名方的CQAs具有安全性、有效性、一致性的特性^[2]。本方共5味中药，根据中药复方君、臣、佐、使的配伍原则，优先选择方中君药（桃仁、

大黄)、臣药(桂枝)、佐药(甘草)的指标成分作为质量控制的指标^[19]。有研究表明,桃仁水提物、苦杏仁苷、桃仁脂肪油对二磷酸腺苷诱导的血小板聚集有不同程度的抑制作用^[20]。大黄中的蒽醌类化合物具有抗炎、抗肿瘤、保护心血管、保肝、护肺等生物活性^[21]。甘草酸类具有抗病毒、抗癌、免疫调节^[22]等作用。比较桂枝、桃仁配伍与单味药给药小鼠后对小鼠出、凝血时间和凝血酶时间影响,证实桂枝-桃仁配伍后较单药桂枝抗凝血作用更强,临床上用来治疗瘀血内结的各种病证,桂枝中主要挥发性成分为桂皮醛,具有一定的抗凝血作用^[23]。

本实验进行关键质量属性研究以各药味均有质控指标为原则,《中国药典》2020 年版将甘草苷、甘草酸铵均作为甘草的质控指标,在进行特征图谱研究时发现,经过多次色谱条件优化,甘草苷出峰仍不满足分离度大于 1.5 要求且阴性干扰严重,因此只对甘草酸铵进行含量测定。同时,桂皮醛是《中国药典》2020 年版桂枝的质控指标,在特征图谱研究中,桂皮醛存在阴性干扰,无法对其进行特征峰指认,因此,本实验建立了桂皮醛含量测定方法,排除阴性干扰,对其进行质量控制。综上所述,指标成分的选择以《中国药典》2020 年版中各单味药含量测定指标性成分为依据,结合 TCD 方解与药效,基于 CQAs 有效性特性综合分析确定 TCD 指标性成分为苦杏仁苷、芦荟大黄素、大黄酸、桂皮醛、甘草酸铵。

目前,对 TCD 化学成分研究鲜有报道,多为提取工艺的优化及对某些指标成分的含量测定^[24-26],缺乏对其质量的整体评价研究。本研究中,由于处方组成及成分信息繁杂,大黄与桃仁共为君药,剂量相差 4 倍,各成分峰面积差异很大,为了更全面地反映全方药味信息,兼顾强、弱极性成分在色谱图上的保留情况,本研究建立了 2 张特征图谱。

本研究分别考察了在甲醇-水、甲醇-0.1%磷酸水溶液、甲醇-0.2%磷酸水溶液 3 种不同的流动相体系下色谱峰的分离情况,结果显示甲醇-0.1%磷酸水溶液对于极性小成分有较好的色谱峰峰形,分离度较好,无明显拖尾,故将甲醇-0.1%磷酸水溶液应用于特征图谱 1,用于中等偏弱极性成分的分析;甲醇-0.2%磷酸水溶液对于极性大成分有较好的色谱峰峰形,分离度较好,无明显拖尾,故将甲醇-0.2%磷酸水溶液应用于特征图谱 2,用于中等偏强极性成分的分析。

本研究同时考察不同柱温对 TCD 各指标成分分离度的影响。结果发现,在 30~35 °C,柱温升高,大黄酸与甘草酸铵分离度变差,苦杏仁苷与周围成分的分离度改善,这表明温度升高不利于大黄酸和甘草酸铵的分离,但能够改善苦杏仁苷的分离情况。因此,选择 30、35 °C 分别作为物质基准特征图谱 1、2 的柱温。

由于 TCD 中大黄的处方量为 4 两(55.2 g),水煎液非常浑浊,为防止 HPLC 分析出现管路堵塞的问题,因此 TCD 水煎液冻干前进行离心处理,除去大部分沉淀。本实验考察 4、25 °C 2 个离心温度,发现 2 种温度处理所得供试品溶液的特征图谱差异较小,为尽量避免温度对成分产生的潜在影响,确定 4 °C 为离心温度。

特征图谱结果显示 15 批物质基准的特征图谱 2 相似度均大于 0.8。其中仅第 4 批物质基准样品相似度为 0.809,其余批次的相似度均大于 0.90。经比对发现,27 号共有峰所对应的化学成分对整体评价贡献较大,使得第 4 批物质基准的相似度相比其他批次有明显的降低。第 4 批物质基准的大黄来源于青海海西,结果显示该产地所产大黄和其余批次的大黄相比具有明显的质量差异,这表明产地对大黄质量具有非常明显的影响,进而影响物质基准的整体质量。

综上,本实验通过建立 TCD 物质基准 HPLC 特征图谱及各指标成分含量测定方法,明确其出膏率范围,初步阐明 TCD 物质基准的 CQAs,构建了 TCD 物质基准的质量控制体系,为 TCD 物质基准的质量控制和复方制剂开发提供科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 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.
- [2] 代云桃, 靳如娜, 吴治丽, 等. 基于标准汤剂(物质基准)的经典名方制备工艺和质量标准研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(2): 164-174.
- [3] 杨明, 伍振峰, 郑琴, 等. 中药经典名方开发与制剂研究的关键问题 [J]. 中草药, 2010, 41(10): 1590-1592.
- [4] 刘艳, 章军, 杨林勇, 等. 经典名方物质基准研制策略及关键问题分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(1): 1-9.
- [5] 汉·张仲景, 柳长华.(明赵开美本)伤寒论 [M]. 北京:

- 科学技术出版社, 2016: 46-47.
- [6] 石婧, 李军. 桃核承气汤的历史沿革与在妇科中的临床应用 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(72): 219-220.
- [7] 王红宇, 冀成玉, 常娜. 桃核承气汤对子宫内膜异位症患者临床疗效及可能作用机制研究 [J]. 世界中医药, 2020, 15(11): 1598-1602.
- [8] 庄燕, 戴林峰, 鲁俊. 基于网络药理学桃核承气汤防治脓毒症心肌功能障碍的作用机制探讨 [J]. 现代药物与临床, 2021, 36(3): 421-427.
- [9] 任青松. 桃核承气汤治疗产后引起的下肢深静脉血栓形成 58 例 [J]. 中国中医急症, 2007, 16(11): 1418-1419.
- [10] 夏洪涛. 桃核承气汤加味治愈产后麻痹型肠梗阻 1 例 [J]. 中国中医急症, 1993, 2(4): 189.
- [11] 李瑞生, 李晓娟, 王仲霞, 等. 桃核承气汤对肝性脑病大鼠肠道菌群的影响分析 [J]. 实验动物科学, 2016, 33(4): 63-66.
- [12] 国家药品监督管理局. 关于发布《古代经典名方关键信息考证原则》、《古代经典名方关键信息表(7 首方剂)》的通知 [EB/OL]. [http://kjs. satcm. gov. cn/zhengcewenjian/2020-11-10/18132. html](http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2020-11-10/18132.html). 2020-10-15.
- [13] 丘光明. 中国科学技术史 度量衡卷 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [14] 洪婷婷, 张钰明, 杨琳洁, 等. 经典名方半夏泻心汤水煎液的 HPLC 指纹图谱及黄芩、黄连量值传递研究 [J]. 中草药, 2020, 51(20): 5166-5176.
- [15] ICH: Q8 (R2): Pharmaceutical Development [EB/OL]. [2009-08-01]. [https://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines. html](https://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html).
- [16] 王常麟, 高鹏, 姜晶晶, 等. 开心散及其组成药材指纹/特征图谱的研究概况 [J]. 山东中医药大学学报, 2020, 44(1): 98-104.
- [17] 张岩, 张婷, 王文彤. 多波长 HPLC 结合 CCD 响应面法优化大七厘散多指标含量测定方法 [J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(7): 841-845.
- [18] 凌成利, 雷昌, 刘洪兵, 等. 不同产地天麻标准汤剂的制备与质量评价研究 [J]. 亚太传统医药, 2020, 16(1): 43-47.
- [19] 张玉鑫, 周冉冉, 陶晓华, 等. 谈桃核承气汤的方证要义与临床应用 [J]. 世界中医药, 2020, 15(14): 2175-2177.
- [20] 朱萱萱, 朱芳, 施荣山, 等. 桃仁、防己提取物对大鼠血小板聚集作用的研究 [J]. 中医药研究, 2000(3): 44-45.
- [21] 王亦君, 冯舒涵, 程锦堂, 等. 大黄蒽醌类化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(13): 227-234.
- [22] 张燕丽, 孟凡佳, 田园, 等. 炙甘草的化学成分与药理作用研究进展 [J]. 化学工程师, 2019, 33(8): 60-63.
- [23] 卞晓坤. 桂枝茯苓胶囊中桂枝和桃仁质量标志物的研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2020.
- [24] 黄家卫, 戴晓燕, 吴巧凤. 桃核承气汤中桃仁不同配伍对苦杏仁苷含量的影响 [J]. 浙江中医药大学学报, 2012, 36(4): 422-424.
- [25] 顿佳颖, 郑鹏, 李佳佳, 等. 响应面法结合信息熵理论优化桃核承气汤水提取工艺 [J]. 中国药房, 2019, 30(16): 2210-2215.
- [26] 陈淮臣, 何利, 石亚, 等. HPLC 法测定桃核承气汤中 10 种成分的含量 [J]. 亚太传统医药, 2020, 16(2): 47-50.

[责任编辑 郑礼胜]