

大黄标准汤剂量值传递规律研究

戴莹¹, 施凯^{2,3*}, 窦志华^{1,2,3*}, 周荣荣^{2,3}, 周云中⁴, 王兆龙⁴, 倪丽丽¹

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023

2. 南京中医药大学南通中西医结合临床医学院, 江苏 南通 226006

3. 南通市第三人民医院, 江苏 南通 226006

4. 精华制药集团股份有限公司, 江苏 南通 226005

摘要: **目的** 研究大黄标准汤剂的量值传递规律。**方法** 制备 23 批大黄标准汤剂, 建立标准汤剂及其原料饮片的 HPLC 指纹图谱, 标定共有峰, 采用四级杆飞行时间高分辨质谱 (quadrupole time-of-flight mass spectrometry, Q-TOF-MS/MS) 对共有峰进行鉴定, 分别测定饮片和标准汤剂中 8 个结合型蒽醌 (芦荟大黄素-8-O-葡萄糖苷、大黄酸-8-O-葡萄糖苷、大黄素-1-O-葡萄糖苷、大黄酚-1-O-葡萄糖苷、大黄酚-8-O-葡萄糖苷、芦荟大黄素-3-羟甲基-O-葡萄糖苷、大黄素-8-O-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-O-葡萄糖苷)、5 个游离型蒽醌 (芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚)、4 个鞣质类成分 (没食子酸、儿茶素、表儿茶素、表儿茶素没食子酸酯) 和 1 个二苯乙烯类成分 [白藜芦醇 4'-O-β-D-(6"-O-没食子酰)-葡萄糖苷 (RGG)] 的含量及标准汤剂出膏率, 以共有峰传递数、成分转移率及出膏率为指标, 分析大黄标准汤剂的量值传递规律。

结果 大黄饮片指纹图谱标定共有峰 45 个, 其中 40 个传递到了标准汤剂, 40 个共有峰的成分均得到鉴定, 其中 8 个结合型蒽醌、5 个游离型蒽醌、2 个蒽酮类成分、5 个鞣质类成分、2 个二苯乙烯类成分采用对照品比对确认。8 个结合型蒽醌和 5 个游离型蒽醌合计的平均转移率分别为 43.83% 和 11.03%, 没食子酸、儿茶素、表儿茶素和表儿茶素没食子酸酯的平均转移率分别为 233.00%、79.58%、303.18% 和 58.71%, RGG 的平均转移率为 68.89%, 标准汤剂平均出膏率为 23.26%。**结论** 研究结果为大黄配方颗粒和含大黄经典方制剂工艺研究和质量评价奠定了基础。

关键词: 大黄; 标准汤剂; 量值传递; 指纹图谱; 共有峰传递数; 转移率; 出膏率; Q-TOF-MS/MS; 蒽醌; 大黄素; 大黄酚; 大黄酸; 没食子酸; 儿茶素; 白藜芦醇; 蒽酮; 鞣质; 二苯乙烯

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)10-2938-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.10.010

Study on law of quality value transmitting of *Rhei Radix et Rhizoma* standard decoction

DAI Ying¹, SHI Kai^{2,3}, DOU Zhi-hua^{1,2,3}, ZHOU Rong-rong^{2,3}, ZHOU Yun-zhong⁴, WANG Zhao-long⁴, NI Li-li¹

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Nantong Clinical Medical College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine of Nanjing University of Chinese Medicine, Nantong 226006, China

3. Nantong Third People's Hospital, Nantong 226006, China

4. Jinghua Pharmaceutical Group Co., Ltd., Nantong 226005, China

Abstract: Objective To study the law of quality value transmitting of Dahuang (*Rhei Radix et Rhizoma*, RRR) standard decoction.

Methods Twenty-three batches of RRR standard decoction were prepared. The HPLC fingerprints of standard decoction and decoction pieces were established. The common peaks in fingerprints were assigned and the components of common peaks were

收稿日期: 2020-12-31

基金项目: 江苏省重点研发计划 (社会发展) 项目 (BE2018674); 江苏省中医药科技计划项目 (YB201836)

作者简介: 戴莹, 硕士研究生, 主要从事中药质量评价研究。Tel: 15195816775 E-mail: 779010519@qq.com

*通信作者: 施凯, 学士, 副主任药师, 主要从事药事管理和药品质量评价研究。Tel: (0513)85116180 E-mail: ntsyshikai@163.com

窦志华, 博士, 副教授, 主任中医师, 硕士生导师, 主要从事中药药效物质及质量评价研究。

Tel: (0513)85116018 E-mail: zhihuadou@163.com

identified by Q-TOF-MS/MS. The contents of the components in raw pieces and standard decoctions of RRR were determined, including eight combination anthraquinones of aloe emodin-8-*O*-glucoside (AE8G), rhein-8-*O*-glucoside (R8G), emodin-1-*O*-glucoside (E1G), chrysophanol-1-*O*-glucoside (C1G), chrysophanol-8-*O*-glucoside (C8G), aloe emodin-3-CH₂-*O*-glucopyranoside (AE3G), emodin-8-*O*-glucoside (E8G) and physcion-8-*O*-glucoside (P8G), five free anthraquinones of aloe emodin, rhein, emodin, chrysophanol and physcion, four tannins of gallic acid, catechin, epicatechin and epicatechin gallate, and one stilbene of resveratrol 4'-*O*-β-*D*-(6"-*O*-galloyl)-glucoside (RGG) in decoction pieces and standard decoction, and the extraction ratio of standard decoction were determined, respectively. Taking the transfer number of common peaks, component transfer rate and extraction ratio as indexes, the law of quality value transmitting of RRR standard decoction was analyzed. **Results** There were 45 common peaks in the fingerprint of RRR decoction pieces, 40 of which were transferred to the standard decoction. The components of 40 common peaks were identified, among them, eight combination anthraquinones, five free anthraquinones, two anthrones, five tannins and two stilbenes were confirmed by reference substances. The average transfer rates of total eight combination anthraquinones and five free anthraquinones were 43.83% and 11.03%, and that of gallic acid, catechin, epicatechin, epicatechin gallate and RGG were 233.00%, 79.58%, 303.18%, 58.71% and 68.89%, respectively. The average extraction rate of standard decoction was 23.26%. **Conclusion** The results of this study laid a foundation for the process research and quality evaluation of RRR dispensing granules and preparations of the classic prescriptions containing RRR.

Key words: *Rhei Radix et Rhizoma*; standard decoction; quality value transmitting; fingerprint; transfer number of common peaks; component transfer rate; extraction ratio; Q-TOF-MS/MS; anthraquinones; emodin; chrysophanol; rhein; gallic acid; catechin; resveratrol; anthrones; tannins; stilbenes

中药标准汤剂同时是配方颗粒和经典名方制剂的物质基准^[1],其核心作用是作为两者工艺研究和质量评价量值传递的桥梁。国家药品监督管理局 2021 年 1 月发布的《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》明确提出:为使中药配方颗粒能够承载中药饮片安全性、有效性,需要以标准汤剂为桥梁,该标准汤剂为衡量单味中药配方颗粒是否与其相对应的单味中药饮片临床汤剂基本一致的物质基准;中药配方颗粒生产工艺研究应以标准汤剂为对照,以出膏率、主要成分含量转移率、指纹图谱或特征图谱的一致性为考察指标,对原料、中间体及成品制备过程中的量质传递和物料平衡进行全面研究^[2]。该局 2018 年 5 月《关于发布古代经典名方中药复方制剂简化注册审批管理规定的公告》规定:经典名方制剂的研制分“经典名方物质基准”研制与制剂研制 2 个阶段;对汤剂而言,该物质基准又可称为“标准汤剂”或“标准煎液”^[3]。经典名方物质基准研究应关注制备过程中受热等因素对质量的影响、关键质量属性的量值传递等^[4]。因此,阐明从饮片到标准汤剂的量值传递规律可以为配方颗粒和经典名方制剂工艺研究和质量评价奠定基础。

大黄是一味常用中药,被收载于 19 个国家的药典^[5],大黄所含成分包括蒽醌、蒽酮、鞣质、二苯乙烯、苯丁酮类等^[6]。赵曼佳等^[7]收集了 10 批大黄饮片,采用加热回流法制备了标准汤剂,测定了 5 个游离蒽醌的含量并计算了转移率,建立了标准汤

剂 UPLC 指纹图谱,标定共有峰 9 个,采用四级杆飞行时间高分辨质谱 (quadrupole time-of-flight mass spectrometry, Q-TOF-MS/MS) 技术对共有峰进行了鉴定。但该研究未达到标准汤剂“不少于 15 批”及“不得使用连续回流提取设备”的要求^[2],标定的指纹图谱共有峰及测定的成分也偏少。

鉴于此,本实验在前期建立 35 批大黄饮片 HPLC 指纹图谱,采用 Q-TOF-MS/MS 技术鉴定指纹图谱共有峰,并测定芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷 (AE8G)、大黄酸-8-*O*-葡萄糖苷 (R8G)、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷 (E1G)、大黄酚-1-*O*-葡萄糖苷 (C1G)、大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷 (C8G)、芦荟大黄素-3-羟甲基-*O*-葡萄糖苷 (AE3G)、大黄素-8-*O*-葡萄糖苷 (E8G)、大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷 (P8G) 8 个结合型蒽醌和芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 5 个游离型蒽醌含量的基础上^[6],选择其中 23 批大黄饮片制备了标准汤剂,建立了标准汤剂 HPLC 指纹图谱,标定了共有峰,采用 Q-TOF-MS/MS 对共有峰进行了鉴定,测定了标准汤剂中 8 个结合型蒽醌 (AE8G、R8G、E1G、C1G、C8G、AE3G、E8G、P8G)、5 个游离型蒽醌 (芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚) 及饮片和标准汤剂中 4 个鞣质类成分 (没食子酸、儿茶素、表儿茶素、表儿茶素没食子酸酯)、1 个二苯乙烯类成分 [白藜芦醇 4'-*O*-β-*D*-(6"-*O*-没食子酰)-葡萄糖苷 (RGG)] 的含量,进行了标准汤剂量值传递规

律研究。

1 仪器与材料

Waters Alliance 高效液相色谱系统, 包括 e2695 分离单元、2998PAD 检测器和 Empower 3 色谱工作站, 美国 Waters 公司; UFLC-DAD-Triple-Q-TOF/MS 系统, 包括日本岛津公司 Shimadzu Prominence UFLC 液相色谱仪和美国 AB SCIEX 公司 AB Sciex Triple TOF 4600 质谱仪, 该质谱仪包括 Q-TOF-MS/MS 检测器和 PeakView1.6 质谱分析软件; BT 25S 型电子天平, 德国 Sartorius 公司; PB-10 型 pH 计, 德国 Sartorius 公司; SK5200H 超声波清洗器, 上海科导超声仪器有限公司。

对照品大黄素 (批号 110751-201512, 质量分数 98.7%)、芦荟大黄素 (批号 110795-201710, 质量分数 98.3%)、大黄素甲醚 (批号 110758-201616, 质量分数 99.0%)、大黄酸 (批号 110757-201607, 质量分数 99.3%)、大黄酚 (批号 110796-201621,

质量分数 99.2%) 购自中国食品药品检定研究院; AE8G (批号 190115)、R8G (批号 180726)、E1G (批号 180726)、C1G (批号 1180725)、C8G (批号 180726)、AE3G (批号 190114)、E8G (批号 180727)、P8G (批号 180730)、没食子酸 (批号 180114)、儿茶素 (批号 141224)、表儿茶素没食子酸酯 (批号 140923)、番泻苷 A (批号 170508)、番泻苷 B (批号 CHB170509), 质量分数均 ≥ 98%, 购自成都克洛玛生物科技有限公司; 白藜芦醇 4'-O-葡萄糖苷 (批号 38963-95-0)、RGG (批号 928340-97-0), 质量分数均为 98%, 购自上海一林生物科技有限公司。

大黄饮片 YP1~YP23 同文献中 S1~S23^[6], 其中 YP1 和 YP23 直接购自中药饮片生产企业, 其余均购自国内大中型中医院, YP10~YP17 为小包装, 其余均为普通包装, 饮片来源具有一定代表性, 具体信息见表 1, 经质量检验, 均符合《中国药典》2020 年版一部大黄项下要求。

表 1 大黄饮片信息

Table 1 Information of decoction pieces of RRR

编号	批号	产地	生产企业	医院
YP1	170915	甘肃	南通三越中药饮片有限公司	—
YP2	2017112005	甘肃	盐城市中药饮片有限公司	盐城市中医院
YP3	171202	重庆	重庆万力药业有限公司	徐州市中医院
YP4	170426	甘肃	苏州市博源药业有限公司	张家港市中医医院
YP5	171201	甘肃	安徽孟氏中药饮片有限公司	宿迁市中医院
YP6	171101	甘肃	亳州市谯城区万事祥中药饮片有限公司	淮安市中医院
YP7	180128	甘肃	苏州市天灵中药饮片有限公司	苏州市中医医院
YP8	17072906	甘肃	安徽协和成药业饮片有限公司	连云港市中医院
YP9	2016100091	甘肃	安徽盛海堂中药饮片有限公司	南京浦口中医院
YP10	1702153	甘肃	安徽普仁中药饮片有限公司	辽宁中医药大学附属医院
YP11	171125010	甘肃	苏州市天灵中药饮片有限公司	扬州市中医院
YP12	1712073	甘肃	安徽普仁中药饮片有限公司	河南中医药大学第一附属医院
YP13	171211	甘肃	江苏苏轩堂药业有限公司	泰州市中医院
YP14	170824010	甘肃	苏州市天灵中药饮片有限公司	常熟市中医院
YP15	20170830	甘肃	铜陵禾田中药饮片股份有限公司	昆山市中医院
YP16	20170101-03	四川	贵州同德药业有限公司	江苏省中西医结合医院
YP17	171222	甘肃	南通三越中药饮片有限公司	南通市中医院
YP18	20171101	甘肃	亳州亳药堂药业有限公司	烟台中医医院
YP19	171106	甘肃	亳州市芍花堂国药股份有限公司	长春中医药大学附属医院
YP20	20170501	甘肃	安徽井泉中药股份有限公司	南京中医药大学附属医院
YP21	180226	甘肃	江西江中中药饮片有限公司	江西中医药大学附属医院
YP22	180101	甘肃	湖南省南国药都中药饮片有限公司	湖南中医药大学第一附属医院
YP23	180411	甘肃	南通三越中药饮片有限公司	—

2 方法与结果

2.1 大黄标准汤剂及供试品、对照品溶液制备

2.1.1 大黄标准汤剂制备 称取大黄饮片 100 g, 置烧杯中, 加 7 倍量纯化水浸泡 30 min, 煮沸, 保持微沸 30 min, 倾出药液, 4 层纱布滤过; 药渣加 6 倍量纯化水煮沸, 保持微沸 20 min, 倾出药液, 4 层纱布滤过; 2 次煎液合并, 50 °C 下真空减压浓缩至 500 mL, 与表 1 中饮片编号对应, 标准汤剂编号 TJ1~TJ23。

2.1.2 标准汤剂供试品溶液制备 精密量取“2.1.1”项下制备的标准汤剂 1 mL 置于 50 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇 48 mL, 超声处理 30 min (功率 200 W, 频率 53 kHz), 放冷后加 50% 甲醇至量瓶刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.3 饮片供试品溶液制备 取大黄饮片粉末 (过四号筛) 约 0.15 g, 精密称定, 置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇 24 mL, 其余操作同“2.1.2”项。

2.1.4 成分鉴定用混合对照品溶液制备 取所有 20 个对照品适量, 精密称定, 加入 50% 甲醇溶解, 混匀, 配制质量浓度为 0.73~17.60 µg/mL 混合对照品溶液。

2.1.5 含量测定用 8 种结合型蒽醌混合对照品溶液制备 精密称取 8 个结合型蒽醌类成分对照品适量, 加 70% 甲醇分别配制质量浓度为 12.12~96.40 µg/mL 的含量测定用 8 种结合型蒽醌混合对照品溶液, 取该混合对照品溶液分别稀释 100、20、10、2 倍, 配制系列质量浓度混合对照品溶液。

2.1.6 含量测定用 5 种游离型蒽醌类成分混合对照品溶液制备 精密称取 5 个游离型蒽醌类成分对照品适量, 加甲醇分别配制质量浓度为 23.2~104.0 µg/mL 的含量测定用 5 个游离型蒽醌类成分混合对照品溶液, 其余操作同“2.1.5”项。

2.1.7 含量测定用 5 种非蒽醌类成分混合对照品溶液制备 精密称取对照品没食子酸、儿茶素、表儿茶素、表儿茶素没食子酸酯、RGG 适量, 分别加甲醇溶解并定容, 配制质量浓度分别为 1.232、1.870、0.509、0.832、2.300 mg/mL 的 5 种非蒽醌类成分对照品储备液; 分别精密量取一定体积的 5 种非蒽醌类成分对照品储备液, 混匀, 加甲醇定容, 配制以上 5 种对照品质量浓度分别为 61.60、374.00、76.35、83.20、115.00 µg/mL 的含量测定用 5 种非蒽醌类成分混合对照品溶液, 其余操作同“2.1.5”项。

2.2 指纹图谱建立及量值传递分析

2.2.1 色谱条件^[6,8] Symmetry C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 µm) 色谱柱; 以甲醇-0.1% 磷酸水溶液梯度洗脱: 0~10 min, 5%~30% 甲醇; 10~40 min, 30%~60% 甲醇; 40~60 min, 60% 甲醇; 60~70 min, 60%~100% 甲醇; 70~80 min, 100% 甲醇; 柱温 30 °C; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 280 nm。

2.2.2 质谱条件^[6,8] 流动相为甲醇-0.1% 甲酸水溶液, 梯度条件同“2.2.1”项。DuoSpray 离子源, ESI 电离方式, 负离子模式检测。离子源喷射电压-4500 V, 离子源温度 600 °C, 气帘气 (CUR) 241.317 kPa (35 psi), 雾化气 (Gas 1) 413.685 kPa (60 psi), 加热气 (Gas 2) 413.685 kPa (60 psi)。采用 TOFMS-IDA-10MS/MS 信息采集方式获取质谱信息, 参数设置如下: 一级质谱解簇电压 (DP) -80 V, 碰撞能量 (CE) -10 eV, TOF-MS 累计时间 250 ms, 母离子扫描范围 m/z 115~1500; 二级质谱子离子质谱扫描范围 m/z 50~1500, 碰撞能量 (CE) -35 eV, 碰撞能量扩展 (CES) 15 eV。

2.2.3 指纹图谱测定及对照指纹图谱建立 取 YP1~YP23、TJ1~TJ23 供试品溶液测定, 进样量均为 30 µL, 采用 AIA 格式将指纹图谱依次导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件 (2012 版)》, 以 YP1 和 TJ1 指纹图谱分别作为参照谱, 在使用中位数自动匹配的基础上进行多点校正, 生成大黄饮片及标准汤剂对照指纹图谱, 饮片指纹图谱标定共有峰 45 个, 其中除 29、32、37、38 和 41 号峰外的 40 个传递到了标准汤剂, 共有峰个数传递率为 88.89%。大黄饮片和大黄标准汤剂指纹图谱及对照指纹图谱见图 1、2。

2.2.4 指纹图谱相似度评价 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件 (2012 版)》分别对大黄饮片和标准汤剂指纹图谱进行相似度计算。结果显示, 23 批饮片指纹图谱中 YP10、YP3、YP16 相似度较低, 分别为 0.458、0.675、0.784, 对应的标准汤剂指纹图谱 TJ10、TJ3、TJ16 相似度也较低, 分别为 0.584、0.762、0.835, 其余批次饮片和标准汤剂指纹图谱相似度均较高。提示标准汤剂的制备工艺稳定、可行, 饮片质量较好地传递到了标准汤剂。见表 2。

2.2.5 共有峰鉴定 取 TJ1 供试品溶液采用“2.2.2”项下质谱条件测定, 进样量为 20 µL, PeakView1.6

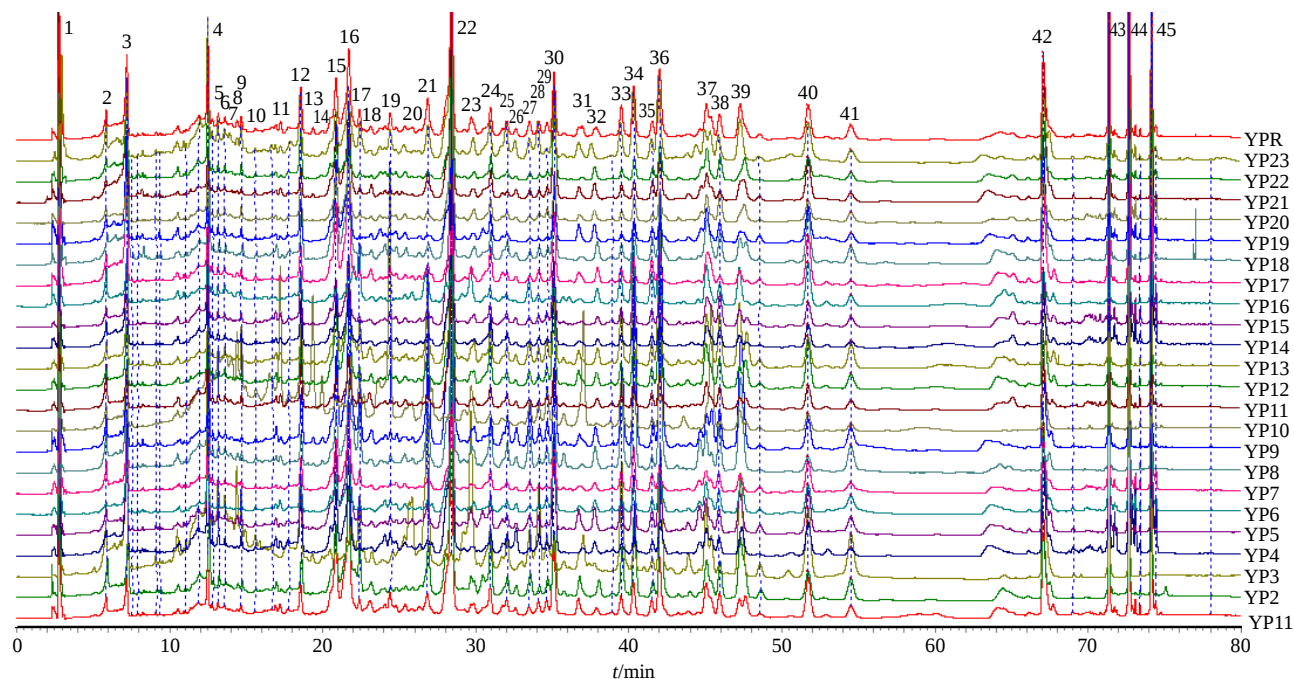


图1 大黄饮片 (YP1~YP23) 指纹图谱及对照指纹图谱 (YPR)

Fig. 1 Fingerprints of decoction pieces of RRR (YP1—YP23) and reference fingerprint (YPR)

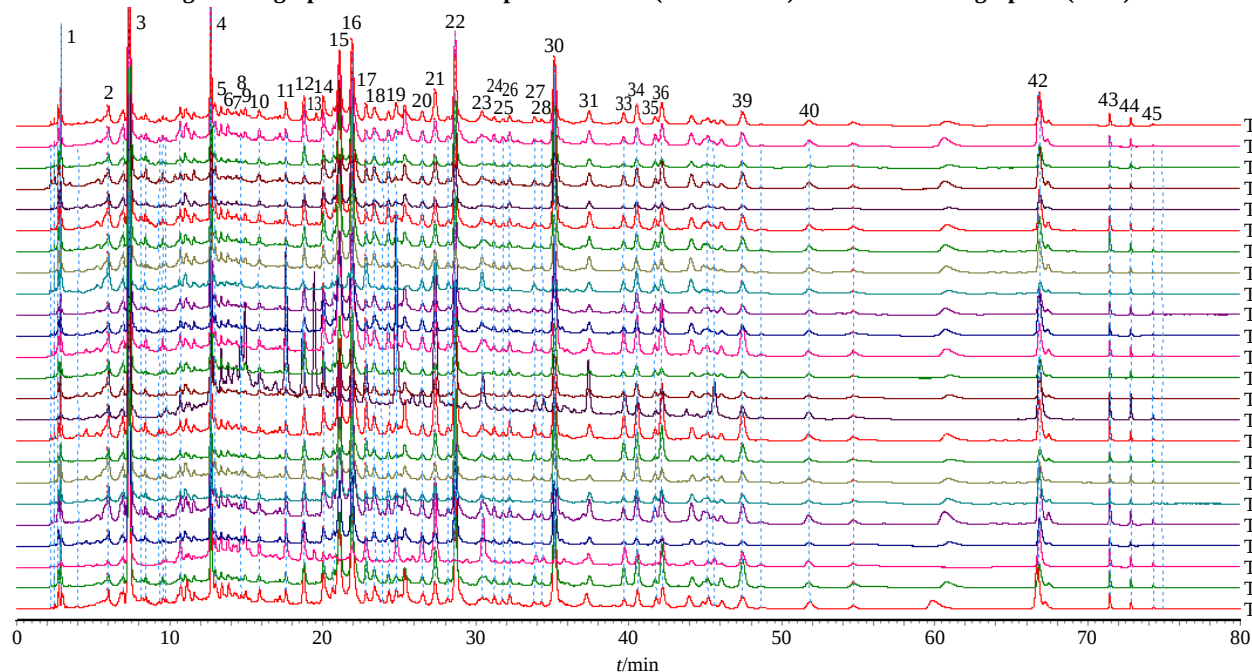


图2 大黄标准汤剂 (TJ1~TJ23) 指纹图谱及对照指纹图谱 (TJR)

Fig. 2 Fingerprints of standard decoction of RRR (TJ1—TJ23) and reference fingerprint (TJR)

质谱分析软件提取标准汤剂总离子流图(图3),根据准分子离子 $[M-H]$ 信息判断并得到的一级质谱精确相对分子质量,并根据产生的二级质谱碎片离子信息,通过与前期对照品及饮片测定数据^[6]比对,对标准汤剂共有峰进行成分鉴定,结果见表3。结果显示,标准汤剂指纹图谱色谱峰质谱测定数据与前期测定饮片及对照品相应保留时间色谱峰数据

基本一致^[6],表明饮片指纹图谱传递到标准汤剂指纹图谱的共有峰为同一成分,其中8个结合蒽醌(共有峰17、21、27、33~36、39)、5个游离型蒽醌(共有峰40、42~45)、2个蒽酮类成分(共有峰20、23)、5个鞣质类成分(共有峰3、4、7、10、12)及2个二苯乙烯类成分(共有峰11、19)共计22个成分采用对照品比对确认,其余28个共有峰的鉴

表 2 大黄饮片和标准汤剂指纹图谱相似度

Table 2 Similarity of fingerprints of decoction pieces of RRR and its standard decoction

饮片	相似度	标准汤剂	相似度	饮片	相似度	标准汤剂	相似度	饮片	相似度	标准汤剂	相似度
YP1	0.962	TJ1	0.962	YP9	0.909	TJ9	0.970	YP17	0.890	TJ17	0.957
YP2	0.938	TJ2	0.975	YP10	0.458	TJ10	0.584	YP18	0.965	TJ18	0.984
YP3	0.675	TJ3	0.762	YP11	0.943	TJ11	0.973	YP19	0.943	TJ19	0.988
YP4	0.956	TJ4	0.972	YP12	0.961	TJ12	0.978	YP20	0.963	TJ20	0.970
YP5	0.978	TJ5	0.981	YP13	0.931	TJ13	0.979	YP21	0.931	TJ21	0.976
YP6	0.953	TJ6	0.976	YP14	0.956	TJ14	0.963	YP22	0.944	TJ22	0.961
YP7	0.919	TJ7	0.979	YP15	0.927	TJ15	0.981	YP23	0.966	TJ23	0.982
YP8	0.839	TJ8	0.955	YP16	0.784	TJ16	0.835				

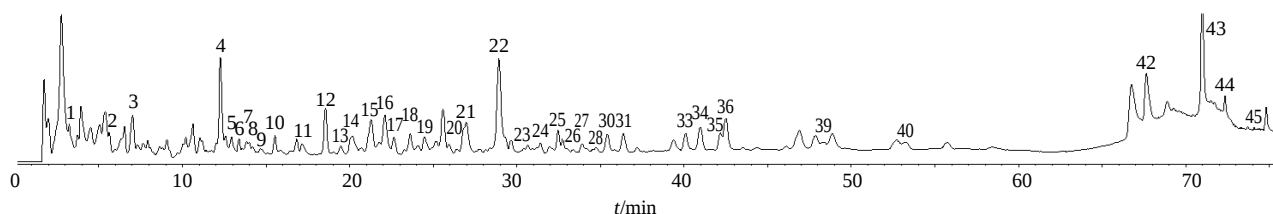


图 3 大黄标准汤剂总离子流图 (负离子模式)

Fig. 3 TIC of standard decoction of RRR (negative ion mode)

定依据见本课题组前期发表的论文^[6,9]。

2.3 蒽醌类成分含量测定及转移率计算

2.3.1 色谱条件 测定波长 430 nm, 其余同“2.2.1”项。

2.3.2 样品含量测定及转移率计算 提取“2.2.3”项下所得 TJ1~TJ23 的 430 nm 色谱图, 记录 8 个结合蒽醌和 5 个游离蒽醌的峰面积, 代入前期建立的回归方程^[6]计算标准汤剂中各成分的含量。根据前期饮片含量测定结果计算 13 个成分的转移率。

$$\text{转移率} = wv / (WvM)^{[1]}$$

w 表示标准汤剂中成分的质量浓度, v 表示标准汤剂体积, W 表示标准汤剂生药质量浓度, M 表示饮片中成分的质量分数

标准汤剂中 13 个蒽醌类成分含量测定结果见表 4, 转移率计算结果见表 5。

2.4 非蒽醌类成分含量测定及转移率计算

2.4.1 色谱条件 同“2.2.1”项。

2.4.2 专属性考察 取 YP1 和 TJ1 供试品溶液及混合对照品溶液进样测定, 提取色谱图。结果显示, 样品色谱图中 5 个待测成分基本能达到基线分离, 见图 4。

2.4.3 线性关系考察 取 5 种非蒽醌系列质量浓度混合对照品溶液各 10 μL , 混合对照品溶液 10、20、30、40 μL , 进样测定, 记录 6 个成分的峰面积, 以峰面积 (Y) 对进样量 (X) 进行回归处理, 得 5 个

成分的回归方程、线性范围及相关系数: 没食子酸回归方程 $Y = 2\,410\,982 X - 36\,296$, $r = 0.999\,9$, 线性范围 6.16~2464 ng; 儿茶素回归方程 $Y = 732\,349 X - 68\,689$, $r = 0.999\,9$, 线性范围 37.4~14\,960 ng; 表儿茶素回归方程 $Y = 734\,494 X - 4435$, $r = 0.999\,7$, 线性范围 7.635~3054 ng; 表儿茶素没食子酸酯回归方程 $Y = 1\,596\,107 X - 24\,613$, $r = 0.999\,9$, 线性范围 8.32~3328 ng; RGG 回归方程 $Y = 3\,137\,732 X - 85\,754$, $r = 0.999\,9$, 线性范围 11.5~4600 ng。

2.4.4 准确度 (加样回收率) 考察 精密称定 S1 粉末 6 份, 每份约 0.075 g, 分别精密添加“2.1.7”项下配制的 5 个对照品储备液适量 (各成分的添加量约等于样品中根据回归方程的计算量), 加甲醇 24 mL, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 根据样品含量测定方法测定, 计算 5 个成分的加样回收率及其 RSD。结果为没食子酸平均回收率 95.05%, RSD 为 1.89%; 儿茶素平均回收率 102.99%, RSD 为 3.64%; 表儿茶素平均回收率 97.60%, RSD 为 4.89%; 表儿茶素没食子酸酯平均回收率 97.65%, RSD 为 3.74%; RGG 平均回收率 96.51%, RSD 为 1.14%, 符合《中国药典》分析方法验证指导原则^[10]相关要求。

2.4.5 重复性考察 精密称定 S1 粉末 6 份, 每份约 0.15 g, 分别按“2.1.3”项下方法制备成 6 份供试品溶液, 根据样品含量测定方法测定, 计算 6 份

表3 大黄标准汤剂指纹图谱共有峰 Q-TOF/MS 鉴定结果

Table 3 Identification of common peaks in standard decoction of RRR fingerprint by Q-TOF/MS

峰号	tr/min	分子式	MS ^a			MS/MS	化合物名称	化合物种类
			理论值	实际值	误差/($\times 10^{-6}$)			
1	2.981	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	331.067 1	331.068 7	4.8	169.013 5, 125.025 0	没食子酸-3-O-β-D-葡萄糖苷	鞣质类
2	5.791	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	331.067 1	331.068 2	3.4	169.012 8, 125.022 9	没食子酸-4-O-β-D-葡萄糖苷	鞣质类
3	7.018	C ₇ H ₆ O ₅	169.014 2	169.014 8	3.3	125.022 0	没食子酸 ^b	鞣质类
4	12.331	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.071 8	289.072 9	3.9	245.082 6	儿茶素 ^b	鞣质类
5	13.084	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₆	729.146 1	729.148 6	3.4	577.136 2, 289.070 6, 125.023 8	原花青素 B-1-3-O-没食子酸酯	鞣质类
6	13.346	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₆	729.146 1	729.147 7	2.2	577.132 3, 289.071 4, 125.024 6	原花青素 B-2-3'-O-没食子酸酯	鞣质类
7	13.809	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	457.077 8	453.077 6	0.2	305.070 7, 169.014 3, 125.025 5	表没食子儿茶素没食子酸酯 ^b	鞣质类
8	14.269	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577.135 2	577.137 9	4.8	425.088 1, 289.070 1, 125.024 7	原花青素 B1	鞣质类
9	14.899	C ₄₄ H ₃₄ O ₂₀	811.1567	881.157 1	-0.5	729.152 9, 577.0997, 559.122 7	原花青素 B-2-3,3'-二-O-没食子酸酯	鞣质类
10	15.509	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.071 8	289.073 2	4.8	245.081 1, 179.034 8	表儿茶素 ^b	鞣质类
11	17.110	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	389.124 2	389.125 4	3.1	227.070 5	白藜芦醇 4'-O-葡萄糖苷 ^b	二苯乙烯类
12	18.423	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	441.082 7	441.084 7	4.5	289.072 2, 271.061 7, 169.014 3	表儿茶素没食子酸酯 ^b	鞣质类
13	19.505	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₁	477.140 2	477.142 5	4.8	313.057 2, 169.014 8	异莲花掌苷	苯丁酮类
14	20.208	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₁	477.140 2	477.142 0	3.8	313.055 3, 169.014 0	莲花掌苷	苯丁酮类
15	21.161	C ₁₅ H ₁₈ O ₇	309.098 0	309.099 1	3.6	147.043 1	2-O-桂皮酰-β-D-葡萄糖苷	鞣质类
16	22.183	C ₁₂ H ₁₀ O ₅	233.045 5	233.046 4	3.9	189.035 4	2-甲基-5-羧甲基-7-羟基色原酮	色原酮类
17	22.510	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.098 4	431.099 2	1.9	269.045 5, 240.045 2	AE8G ^b	蒽醌类
18	23.464	C ₁₅ H ₁₈ O ₇	309.098 0	309.099 3	4.7	147.043 7	1-O-桂皮酰-β-D-葡萄糖苷	鞣质类
19	24.396	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₂	541.135 2	541.137 8	4.9	313.050 2, 169.016 1	RGG ^b	二苯乙烯类
20	26.325	C ₄₂ H ₃₈ O ₂₀	861.188 4	861.192 2	4.5	699.134 2, 386.101 7	番泻苷 B ^b	蒽醌类
21	26.844	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	445.077 6	445.078 5	1.9	283.025 6, 239.034 7, 211.042 8	R8G ^b	蒽醌类
22	28.915	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	461.108 9	461.110 8	4.1	313.056 6, 169.013 7	1-O-没食子酰-2-O-肉桂酰-β-D-葡萄糖苷	鞣质类
23	30.390	C ₄₂ H ₃₈ O ₂₀	861.188 4	861.191 6	3.8	699.137 8, 386.100 2	番泻苷 A ^b	蒽醌类
24	31.358	C ₂₉ H ₂₆ O ₁₅	613.119 9	613.122 3	3.9	465.065 9, 313.054 9, 169.015 1	1,6-二-O-没食子酰-2-O-肉桂酰-β-D-葡萄糖苷	鞣质类
25	32.135	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	461.108 9	461.109 3	0.9	443.085 7, 313.054 9, 169.015 3	1-O-没食子酰-6-O-肉桂酰-β-D-葡萄糖苷	鞣质类
26	33.034	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₂	487.088 2	487.089 8	3.3	239.035 0, 211.028 7	大黄酸-1-O-(6'-O-乙酰)-β-D-葡萄糖苷	蒽醌类
27	33.712	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.098 4	431.099 5	2.6	269.044 5, 240.041 0	E1G ^b	蒽醌类
28	34.369	C ₂₉ H ₂₆ O ₁₅	613.119 9	613.122 3	3.9	443.037 9, 169.014 3, 125.022 5	1,2-二-O-没食子酰-6-O-肉桂酰-β-D-葡萄糖苷	鞣质类
30	35.375	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₂	487.088 2	487.090 3	4.3	283.024 4, 239.037 1, 211.052 1	大黄酸-8-O-(6'-O-乙酰)-β-D-葡萄糖苷	蒽醌类
31	36.375	C ₂₀ H ₂₄ O ₉	407.134 8	407.136 1	3.6	245.080 9, 230.057 0	6-甲氧基酸模素-8-O-β-D-葡萄糖苷	茺类
33	40.099	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	415.103 5	415.104 2	1.8	253.050 3, 225.057 6	C1G ^b	蒽醌类
34	40.803	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	415.103 5	415.105 3	4.4	253.050 6	C8G ^b	蒽醌类
35	42.052	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.098 4	431.099 4	2.4	269.042 9	AE3G ^b	蒽醌类
36	42.520	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.098 4	431.099 8	3.3	269.039 9	E8G ^b	蒽醌类
39	48.190	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	445.114 0	445.115 2	2.6	283.061 3, 240.043 1	P8G ^b	蒽醌类
40	53.172	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.045 5	269.046 6	3.9	240.041 8, 195.044 8, 183.046 0	芦荟大黄素 ^b	蒽醌类
42	68.093	C ₁₅ H ₈ O ₆	283.024 8	283.025 8	3.5	239.035 1, 211.039 9, 183.044 8	大黄酸 ^b	蒽醌类
43	71.381	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.045 5	269.046 8	4.7	241.050 9, 225.052 2	大黄素 ^b	蒽醌类
44	72.726	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	253.050 6	253.051 3	2.6	225.054 7	大黄酚 ^b	蒽醌类
45	73.720	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283.061 2	283.062 2	3.5	240.042 7, 211.040 0, 183.046 3	大黄素甲醚 ^b	蒽醌类

a-准分子离子为[M-H]⁻; b-通过对照品比对确认a-quasi-molecular ion is [M-H]⁻; b-confirmed by comparison of reference substances

表 4 大黄标准汤剂中 13 个蒽醌类成分定量测定结果

Table 4 Determination of 13 anthraquinones in standard decoction of RRR

样品	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)												
	AE8G	R8G	E1G	C1G	C8G	AE3G	E8G	P8G	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
TJ1	0.054	0.165	0.014	0.059	0.087	0.105	0.080	0.060	0.058	0.712	0.020	0.017	0.016
TJ2	0.117	0.337	0.035	0.141	0.197	0.071	0.160	0.124	0.044	0.318	0.022	0.021	0.022
TJ3	0.103	0.700	0.033	0.137	0.066	0.025	0.110	0.059	0.053	0.466	0.023	0.022	0.030
TJ4	0.024	0.067	0.005	0.023	0.032	0.057	0.024	0.017	0.028	0.359	0.009	0.011	0.011
TJ5	0.110	0.283	0.028	0.109	0.142	0.146	0.127	0.085	0.086	0.830	0.048	0.029	0.040
TJ6	0.042	0.123	0.012	0.047	0.069	0.073	0.053	0.038	0.032	0.405	0.009	0.011	0.010
TJ7	0.078	0.095	0.017	0.074	0.136	0.082	0.048	0.040	0.039	0.270	0.010	0.016	0.018
TJ8	0.100	0.275	0.028	0.141	0.157	0.042	0.133	0.074	0.025	0.162	0.011	0.014	0.015
TJ9	0.178	0.622	0.045	0.182	0.222	0.106	0.210	0.120	0.058	0.538	0.026	0.022	0.022
TJ10	0.168	1.479	0.042	0.183	0.078	0.052	0.099	0.054	0.061	0.798	0.029	0.046	0.043
TJ11	0.043	0.087	0.011	0.047	0.074	0.056	0.036	0.026	0.031	0.242	0.007	0.013	0.012
TJ12	0.029	0.083	0.006	0.030	0.059	0.060	0.030	0.023	0.031	0.273	0.013	0.017	0.018
TJ13	0.163	0.489	0.041	0.173	0.219	0.092	0.211	0.140	0.049	0.433	0.021	0.023	0.027
TJ14	0.048	0.171	0.013	0.048	0.058	0.073	0.060	0.039	0.043	0.578	0.015	0.015	0.017
TJ15	0.050	0.156	0.013	0.060	0.112	0.082	0.048	0.037	0.036	0.337	0.015	0.019	0.025
TJ16	0.179	0.242	0.027	0.082	0.110	0.071	0.053	0.047	0.044	0.151	0.004	0.012	0.012
TJ17	0.048	0.105	0.013	0.048	0.068	0.094	0.048	0.028	0.046	0.410	0.010	0.013	0.011
TJ18	0.067	0.212	0.017	0.066	0.084	0.092	0.085	0.060	0.047	0.463	0.026	0.019	0.024
TJ19	0.073	0.240	0.018	0.100	0.145	0.106	0.086	0.065	0.051	0.540	0.018	0.016	0.016
TJ20	0.019	0.051	0.004	0.018	0.037	0.038	0.025	0.018	0.016	0.195	0.004	0.010	0.008
TJ21	0.080	0.272	0.022	0.093	0.105	0.092	0.104	0.066	0.054	0.586	0.005	0.013	0.008
TJ22	0.021	0.072	0.006	0.024	0.043	0.060	0.032	0.021	0.025	0.297	0.008	0.012	0.010
TJ23	0.056	0.182	0.015	0.065	0.095	0.115	0.084	0.060	0.059	0.719	0.014	0.018	0.014

表 5 大黄标准汤剂 13 个蒽醌类成分转移率

Table 5 Components transfer rate of 13 anthraquinones of standard decoction of RRR

样品	转移率/%														
	AE8G	R8G	E1G	C1G	C8G	AE3G	E8G	P8G	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚	结合蒽醌	游离蒽醌
TJ1	37.29	53.48	37.93	35.24	42.69	53.92	37.19	64.43	13.73	44.60	3.83	1.18	0.80	45.71	13.73
TJ2	26.28	46.86	31.81	30.89	32.51	37.99	26.79	27.58	15.64	30.92	5.38	2.41	1.46	33.10	10.41
TJ3	17.51	27.66	17.86	13.67	33.98	14.73	18.20	10.15	7.31	17.42	4.01	2.43	1.70	21.05	8.97
TJ4	34.06	41.73	22.14	23.68	28.12	32.83	17.28	10.89	8.05	23.96	1.36	0.72	0.62	26.70	7.18
TJ5	40.93	79.26	39.15	36.80	38.10	54.02	41.20	37.80	19.01	50.15	6.34	1.91	1.55	47.50	14.78
TJ6	51.98	78.35	41.45	45.19	40.92	45.18	27.98	19.80	10.57	31.13	1.30	0.83	0.45	42.18	7.88
TJ7	42.20	100.97	44.45	43.69	48.89	48.98	54.98	40.32	12.04	32.74	1.84	1.02	0.73	50.95	6.20
TJ8	18.05	30.63	15.72	18.57	18.47	35.55	19.78	13.46	16.69	42.71	5.41	2.79	1.63	20.74	10.49
TJ9	36.10	43.89	25.42	25.34	20.63	36.53	20.71	18.40	18.44	37.97	4.04	1.74	1.37	28.86	12.65
TJ10	44.38	61.89	39.28	40.86	35.78	44.93	43.22	49.78	34.87	53.58	18.68	12.65	10.96	53.94	37.95
TJ11	34.02	55.99	33.68	50.67	47.27	38.09	29.13	43.13	13.00	40.25	1.94	1.18	0.75	42.49	7.91
TJ12	17.39	20.80	9.08	14.85	27.34	28.09	10.10	14.26	6.58	15.30	1.84	1.24	0.87	18.57	5.51
TJ13	42.50	62.33	38.62	33.74	31.09	39.47	37.63	43.19	16.04	40.60	5.34	2.29	1.80	42.33	13.02
TJ14	51.89	114.96	57.95	51.70	37.31	56.03	72.61	73.31	18.67	77.19	4.83	1.40	1.36	65.62	18.25

续表 5

样品	转移率/%														
	AE8G	R8G	E1G	C1G	C8G	AE3G	E8G	P8G	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚	结合蒽醌	游离蒽醌
TJ15	56.34	102.11	43.33	46.89	50.83	48.78	45.62	49.62	14.47	44.98	3.94	1.54	1.50	57.66	10.14
TJ16	33.27	61.26	28.45	26.98	25.30	27.67	24.80	24.61	9.70	31.24	1.69	1.10	0.64	33.41	5.44
TJ17	40.21	73.27	41.94	41.95	40.10	30.09	40.27	43.02	8.88	28.49	1.13	0.68	0.37	42.06	6.31
TJ18	52.47	113.57	39.49	53.06	39.05	34.21	32.53	50.38	9.39	23.92	2.55	1.00	0.76	50.75	6.81
TJ19	135.47	450.08	112.52	192.60	106.54	61.82	120.74	70.54	14.91	38.10	2.81	1.21	0.70	128.99	10.57
TJ20	22.33	44.32	18.84	21.47	25.65	46.35	22.30	14.10	8.42	31.29	1.18	1.04	0.83	27.29	7.68
TJ21	74.34	86.87	52.54	69.20	91.17	39.02	58.47	82.09	12.87	25.37	0.65	1.03	0.35	69.11	9.79
TJ22	31.86	90.11	20.39	33.23	32.50	41.11	23.25	13.92	11.61	30.62	1.72	1.18	0.70	34.31	8.71
TJ23	15.56	39.60	14.99	17.32	19.41	40.38	22.15	23.43	14.15	65.56	2.32	1.13	0.56	24.84	13.37
均值	41.58	81.74	35.96	42.07	39.72	40.69	36.82	36.44	13.70	37.31	3.66	1.90	1.41	43.83	11.03
标准偏差	25.02	84.77	20.97	35.71	20.83	10.70	23.62	21.79	5.92	14.55	3.67	2.41	2.13	23.30	6.72

结合蒽醌为 8 个结合型蒽醌之和, 游离蒽醌为 5 个游离型蒽醌之和

Combination anthraquinone is the sum of eight bound anthraquinones, free anthraquinone is the sum of five free anthraquinones

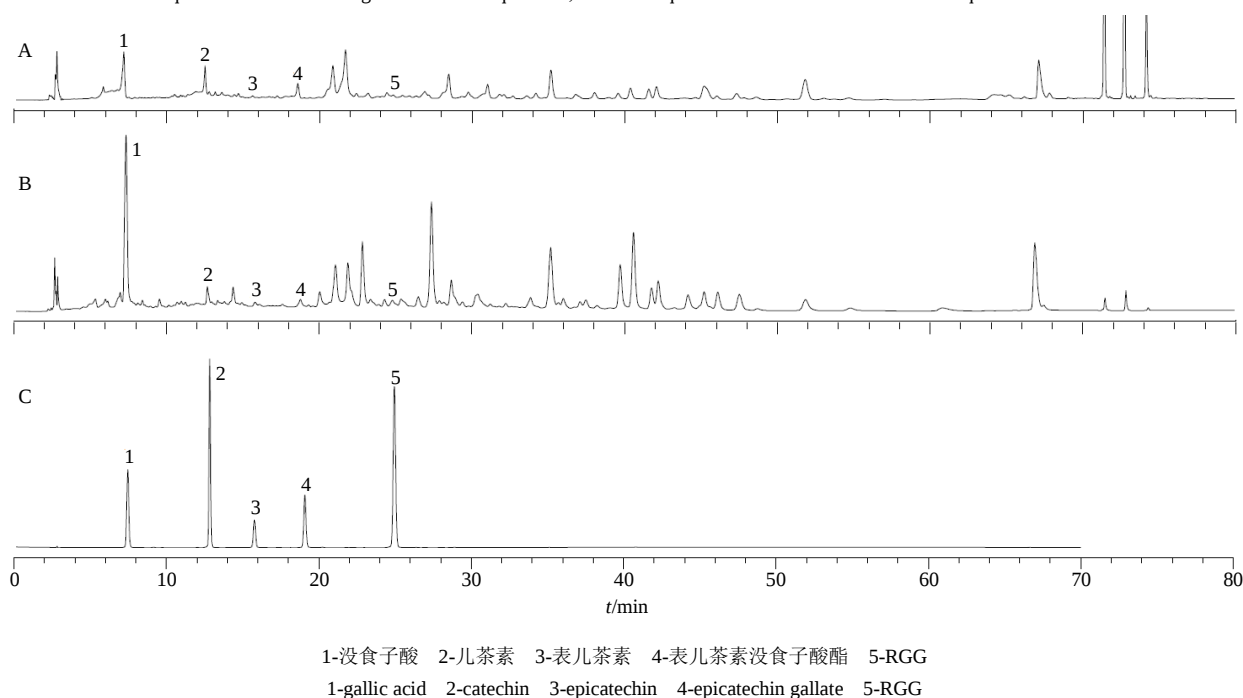


图 4 大黄饮片 (A)、标准汤剂 (B) 及混合对照品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 4 HPLC of decoction pieces of RRR (A), standard decoction of RRR (B) and mixed reference substances (C)

供试品溶液各成分的质量分数及其 RSD。结果没食子酸平均质量分数 0.803 mg/g, RSD 为 1.147%; 儿茶素平均质量分数 3.717 mg/g, RSD 为 2.24%; 表儿茶素平均质量分数 0.188 mg/g, RSD 为 1.88%; 表儿茶素没食子酸酯平均质量分数 1.191 mg/g, RSD 为 2.87%; RGG 平均质量分数 0.648 mg/g, RSD 为 2.43%, 符合《中国药典》分析方法验证指导原则^[10]相关要求。

2.4.6 耐用性(稳定性)考察 取 YP1 供试品溶液,

分别于制备后 0、6、12、18、24、36 h 根据样品含量测定方法测定, 计算 6 次测定的各成分峰面积的 RSD。以上 5 种成分的 RSD 分别为 2.75%、2.08%、1.00%、1.41%、3.03%。

2.4.7 样品含量测定及转移率计算 提取“2.2.3”项下所得 YP1~YP23 和 TJ1~TJ23 的色谱图, 记录 5 个成分的峰面积, 代入回归方程计算饮片和标准汤剂中各成分的含量。同“2.3.2”项下方法计算 5 个成分的转移率。大黄饮片中 5 个非蒽醌类成分

含量测定结果见表 6, 标准汤剂中 5 个非蒽醌类成分含量测定结果见表 7, 转移率计算结果见表 8。

2.5 标准汤剂 pH、出膏率测定及分析

按说明书校准 pH 计, 测定 TJ1~TJ23 的 pH 值, 每份样品重复 3 次, 取平均值。量取 23 批大黄标准汤剂各 50 mL, 置已恒定质量的蒸发皿中, 水浴锅上蒸干, 烘箱内 105 °C 干燥至质量恒定, 取出, 干燥器内冷却后称定质量, 计算出膏率 (干浸膏质量/制备 50 mL 标准汤剂的饮片质量)。每批标准汤剂重复 3 次试验。结果显示, 23 批标准汤剂 pH 在 4.84~5.43, 均值为 5.21, 高于赵曼佳等^[7]报道的 4.15。大黄标准汤剂的出膏率在 14.31%~28.63%,

均值为 23.26%, 较文献报道的 28.2%^[8]略低。出膏率允许的范围为均值加减 3 倍标准偏差或均值的 70%~130%^[2], 计算发现, 23 批大黄标准汤剂的出膏率均在均值±3 标准差范围内, 但有 2 批超出了均值的 70%~130%。结果见表 8。

3 讨论

3.1 关于方法学考察

指纹图方法学考察主要包括精密度试验 (同一供试品连续进样 5 次以上, 考察色谱峰的相对保留时间和峰面积比值的一致性, 采用 HPLC 法峰面积比值的相对标准偏差 RSD 不得大于 3%) 和重现性试验 (同一批号供试品 5 份以上, 考察内容同精密

表 6 大黄饮片中 5 个非蒽醌类成分定量测定结果

Table 6 Determination of five non-anthraquinone components in decoction pieces of RRR

样品	质量分数/(mg·g ⁻¹)					样品	质量分数/(mg·g ⁻¹)				
	没食子酸	儿茶素	表儿茶素	表儿茶素没食子酸酯	RGG		没食子酸	儿茶素	表儿茶素	表儿茶素没食子酸酯	RGG
YP1	0.797	3.722	0.188	1.173	0.648	YP13	1.596	4.661	0.278	1.146	0.544
YP2	1.356	6.131	0.431	1.270	0.320	YP14	2.111	5.835	0.285	1.461	0.289
YP3	3.588	19.853	4.696	4.437	0.726	YP15	1.263	6.000	0.345	1.704	0.366
YP4	2.626	7.676	0.505	2.404	0.599	YP16	1.125	4.690	0.755	1.150	0.182
YP5	1.387	5.216	0.190	1.284	0.457	YP17	2.515	5.716	0.463	1.207	0.475
YP6	1.343	3.650	0.271	0.947	0.397	YP18	3.010	5.614	0.454	1.741	0.346
YP7	1.284	4.104	0.184	1.067	0.327	YP19	2.441	4.550	0.340	1.286	0.298
YP8	1.905	7.768	1.036	1.288	0.450	YP20	1.112	3.693	0.177	0.958	0.305
YP9	1.753	6.006	0.716	1.950	0.466	YP21	3.425	3.932	0.615	0.995	0.279
YP10	1.459	13.926	4.892	5.712	4.867	YP22	2.061	5.908	0.246	1.552	0.310
YP11	1.046	5.975	0.203	1.642	0.336	YP23	1.672	9.651	0.339	2.504	0.776
YP12	1.209	3.682	0.269	1.231	0.441						

表 7 大黄标准汤剂中 5 个非蒽醌类成分定量测定结果

Table 7 Determination of five non-anthraquinone components in standard decoction of RRR

样品	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)					样品	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)				
	没食子酸	儿茶素	表儿茶素	表儿茶素没食子酸酯	RGG		没食子酸	儿茶素	表儿茶素	表儿茶素没食子酸酯	RGG
TJ1	0.819	1.229	0.234	0.272	0.065	TJ13	0.987	0.911	0.246	0.180	0.115
TJ2	0.646	0.648	0.253	0.165	0.052	TJ14	0.615	0.552	0.112	0.072	0.039
TJ3	0.580	1.182	0.428	0.319	0.125	TJ15	0.809	1.000	0.156	0.180	0.047
TJ4	0.732	0.753	0.154	0.133	0.038	TJ16	0.439	0.507	0.164	0.100	0.022
TJ5	1.215	1.344	0.396	0.290	0.120	TJ17	0.903	0.905	0.223	0.153	0.053
TJ6	0.727	0.692	0.175	0.104	0.041	TJ18	0.757	0.833	0.312	0.172	0.069
TJ7	0.762	0.872	0.175	0.149	0.041	TJ19	1.111	1.093	0.245	0.234	0.079
TJ8	0.410	0.469	0.061	0.093	0.028	TJ20	0.581	0.633	0.161	0.084	0.035
TJ9	0.874	0.854	0.309	0.225	0.077	TJ21	0.980	0.699	0.349	0.121	0.054
TJ10	0.399	1.767	1.123	0.810	0.617	TJ22	0.752	0.723	0.114	0.124	0.029
TJ11	0.525	0.697	0.075	0.069	0.026	TJ23	0.844	1.214	0.223	0.252	0.067
TJ12	0.713	0.931	0.137	0.207	0.036						

表 8 大黄标准汤剂 5 个非蒽醌类成分转移率及出膏率

Table 8 Components transfer rate and extraction ratio of five non-anthraquinone components of standard decoction of RRR

样品	成分转移率/%					出膏率/%	pH 值
	没食子酸	儿茶素	表儿茶素	表儿茶素没食子酸酯	RGG		
TJ1	513.50	165.06	621.08	115.87	49.94	23.24	5.43
TJ2	238.31	52.87	293.42	65.13	81.80	14.31	5.25
TJ3	80.89	29.78	45.57	35.93	86.29	22.44	4.84
TJ4	139.41	49.02	152.79	27.72	32.05	14.32	5.25
TJ5	437.90	128.81	1 042.39	112.99	131.86	23.82	5.21
TJ6	270.64	94.76	323.72	54.75	51.69	23.78	5.23
TJ7	296.59	106.17	476.55	69.67	62.67	23.27	5.05
TJ8	107.66	30.18	29.24	35.95	31.48	21.42	5.19
TJ9	249.38	71.07	215.52	57.63	82.92	21.34	5.20
TJ10	136.62	63.44	114.84	70.91	63.41	23.69	5.20
TJ11	250.67	58.29	185.96	20.99	38.60	25.14	5.14
TJ12	294.98	126.50	255.08	84.02	40.53	22.35	5.03
TJ13	309.33	97.72	442.69	78.54	106.09	24.55	5.27
TJ14	145.73	47.29	196.04	24.75	67.76	20.69	5.34
TJ15	320.15	83.31	225.41	52.71	63.86	27.80	5.12
TJ16	195.26	54.00	108.80	43.57	59.46	23.28	5.23
TJ17	179.46	79.19	240.60	63.31	56.03	24.18	5.23
TJ18	125.67	74.17	343.54	49.52	100.29	24.87	5.29
TJ19	227.67	120.06	359.60	91.06	133.36	25.71	5.29
TJ20	261.46	85.65	455.68	43.85	57.69	24.77	5.40
TJ21	143.12	88.86	284.24	60.97	96.02	26.70	5.30
TJ22	182.29	61.22	231.71	40.04	47.11	24.76	5.11
TJ23	252.31	62.89	328.69	50.35	43.48	28.63	5.33
均值	233.00	79.58	303.18	58.71	68.89	23.26	5.21
标准偏差	103.61	33.49	214.71	25.41	29.10	3.41	0.13

度试验,采用 HPLC 法峰面积比值的相对标准偏差 RSD 不得大于 3%)^[11]。本研究指纹图谱方法学考察及结果见前期发表论文^[6],精密密度试验峰面积比值的 RSD 为 2.92%,重现性试验峰面积比值的 RSD 为 2.98%,均符合技术要求。

根据《中国药典》四部中的通则 9101(分析方法验证指导原则)^[10],含量测定方法学考察项目包括专属性、准确度、精密密度、线性、耐用性。专属性方面,采用色谱法要求附代表性图谱;准确度一般用回收率表示,样品中待测成分含量范围对应应有回收率限度要求;精密密度主要以重复性体现,样品中待测成分含量范围对应应有重复性 RSD 要求;线性系指在设计的范围内,线性试验结果与试样中被测物浓度直接呈比例关系的能力;耐用性系指在测定条件有小的变动时,测定结果不受影响的承受程度,

典型的变动因素有被测溶液的稳定性、样品的提取次数、时间等,液相色谱法中典型的变动因素有流动相的组成和 pH 值、不同品牌或不同批号的同类型色谱柱、柱温、流速等。

尽管考察项目表述不符合药典要求,13 个蒽醌类成分含量测定的方法学考察参见前期发表论文^[6],且结果基本符合药典要求,本实验色谱图体现专属性,回收率试验体现准确度,重复性试验体现精密密度,线性关系考察体现线性,稳定性试验部分体现耐用性。本研究基本按药典要求对 5 个非蒽醌类成分含量测定进行了方法学考察,其中耐用性中被测溶液稳定性考察方法及结果见“2.4.6”项,流动相的组成、柱温、体积流量等耐用性试验及结果见本课题组前期建立的大黄药材中非蒽醌类成分含量测定方法^[12]。

3.2 关于提取溶剂

前期实验发现, 大黄结合型蒽醌并不像大部分文献报道的可溶于甲醇等有机溶剂中, 70% 甲醇为其合适的溶剂^[13], 故 8 个结合型蒽醌对照品溶液的制备采用 70% 甲醇。赵曼佳等^[7]采用离心取上清液的方法制备大黄标准汤剂供试品溶液, 可能会导致本来混悬于标准汤剂中的成分流失, 测出的成分含量与临床用药实际不符。预实验中比较了 50%、70%、100% 甲醇制备标准汤剂供试品溶液的效果, 发现加入 70% 和 100% 甲醇会产生沉淀造成成分损失, 加入 50% 甲醇则溶液基本澄清。

3.3 关于纳入量值规律研究的成分

大黄中所含的各类化学成分具有不同的药理活性^[12,14-15], 单一组分无法对大黄及其制剂进行全面质量评价^[16]。本研究采用 Q-TOF-MS/MS 对大黄标准汤剂指纹图 40 个共有峰进行了鉴定, 其中 8 个结合蒽醌、5 个游离型蒽醌、2 个蒽酮类成分、5 个鞣质类成分及 2 个二苯乙烯类成分共计 22 个成分采用对照品比对确认, 但是由图 1 和图 2 可见, 蒽酮类成分番泻苷 B 和番泻苷 A、鞣质类成分儿茶素、二苯乙烯类成分白藜芦醇 4'-O-葡萄糖苷共计 4 个成分色谱峰分离度较差, 不符合含量测定专属性要求, 其余 18 个成分均建立了含量测定方法, 纳入量值规律研究, 特别是在同类研究纳入游离型蒽醌基础上, 增加了结合型蒽醌。大黄中蒽醌类成分分结合型和游离型 2 种, 其中大部分为结合型蒽醌, 但由于其不稳定导致提取纯化比较困难, 目前研究较少^[9], 但近年来大黄结合型蒽醌的作用越来越受到人们的关注^[9,17], 仅测定游离蒽醌不能全面反映大黄及其制剂的质量^[18]。

3.4 关于检测波长

查阅文献发现, 多以 280、430 nm 作为大黄的检测波长, 以 280 nm 检出的色谱峰较多^[19], 结合蒽醌和游离蒽醌在 254、430 nm 附近都有吸收峰, 但 430 nm 除蒽醌类成分外的其他成分无吸收^[20]。研究过程中提取 254、280、430 nm 色谱图进行了比较, 发现 280 nm 波长下检出的色谱峰最为全面, 因此选择其作为指纹图谱的检测波长。

8 个结合型蒽醌中 AE8G、R8G、C1G 和 C8G 分别在 254、410 nm 附近有最大吸收, E1G、E8G、P8G 分别在 280、420 nm 附近有最大吸收, AE3G 在 254、430 nm 附近有最大吸收^[9]; 5 个游离型蒽醌中芦荟大黄素、大黄酸、大黄酚分别在 254、430

nm 附近有最大吸收, 大黄素、大黄素甲醚分别在 280、440 nm 附近有最大吸收^[17]。提取 410、430 nm 色谱图比较发现, 两者并无较大差异, 为避免其他成分的干扰, 故选择 430 nm 作为蒽醌类成分含量测定波长。提取 5 个待测非蒽醌类成分色谱峰的紫外吸收光谱图发现, 5 个成分均在 280 nm 附近有最大吸收, 所以选择 280 nm 为非蒽醌类成分含量测定波长。

3.5 关于成分转移率

23 批大黄标准汤剂 5 个游离型蒽醌合计的转移率为 5.44%~37.95%, 均值为 11.03%, 赵曼佳等^[7]报道的 10 批大黄标准汤剂的相应数据分别为 11.16%~28.14% 和 19.87%, 两者结果差异有待分析。但总体来讲, 游离型蒽醌的平均转移率偏低, 其主要原因可能是游离型蒽醌苷元为脂溶性成分, 在水煎液中难以溶出, 已有多篇文献提到标准汤剂中脂溶性成分转移率低的问题^[21]。大黄素甲醚、大黄酚和大黄素的平均转移率分别只有 1.41%、1.90% 和 3.66%, 芦荟大黄素为 13.70%, 大黄酸则相对偏高, 为 37.31%, 可能是由于 5 个成分在加热煎煮过程中结构发生了相互转化而导致大黄酸的含量比例提高^[7,22-25], 计算结果显示, 23 批大黄饮片中大黄酸含量的平均值占 5 个游离型蒽醌合计平均值的比例为 24.24%, 标准汤剂中相应数据为 81.97%, 与文献报道的药材中大黄酸占游离蒽醌的比例为 17.39%, 而提取物中该比例提高到 37.71%^[22]。8 个结合型蒽醌转移率相对较高, 均值在 35.96%~81.74%, 8 个成分合计平均转移率为 44.83%, 尽管这些结合型蒽醌在加热煎煮和浓缩过程也有部分转化成了水不溶性的游离型蒽醌^[13], 但测定这些水溶性成分来计算转移率更为合理^[26]。

大黄中鞣质类成分含量高达 10%~30%^[27], 本次标定的大黄标准汤剂指纹图谱 40 个共有峰中 17 个为鞣质类成分, 大黄鞣质分水解型和缩合型 2 类, 单体分别为没食子酸和儿茶素^[28], 酚酸和多元醇通过苷键或酯键形成可水解鞣质^[29]。本实验测定的大黄标准汤剂中的 4 个鞣质类成分中表儿茶素和没食子酸平均转移率分别高达 303.18% 和 233.00%, 表儿茶素没食子酸酯最低, 为 58.71%, 其原因可能为含苷键和酯键的鞣质类成分易催化水解^[29], 如有研究表明, 在加热过程中表儿茶素没食子酸酯易水解为表儿茶素和没食子酸^[30], 这样就导致标准汤剂中表儿茶素没食子酸酯转移率偏低, 表儿茶素和没食

子酸相对含量提高。同样,其他结构中含没食子和表儿茶素结构的以酯键和苷键链接的缩合物也可能水解生成表儿茶素和没食子酸。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 倪丽丽,戴莹,窦志华,等.茵陈标准汤剂量值传递规律研究[J].中草药,2020,51(11):2954-2966.
- [2] 国家药品监督管理局.关于发布《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》的通告[EB/OL].[2021-01-26].<https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/qtggtg/20210210145453181.html>.
- [3] 国家药品监督管理局.关于发布古代经典名方中药复方制剂简化注册审批管理规定的公告[EB/OL].[2018-05-29].<http://www.nmpa.gov.cn/WS04/CL2093/228247.html>.
- [4] 国家药品监督管理局.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].[2019-03-22].<http://www.nmpa.gov.cn/WS04/CL2101/335926.html>.
- [5] 王玉,杨雪,夏鹏飞,等.大黄化学成分、药理作用研究进展及质量标志物的预测分析[J].中草药,2019,50(19):4821-4837.
- [6] 曹瑞,窦志华,倪丽丽,等.HPLC指纹图谱、Q-TOF/MS定性及多成分定量相结合的大黄饮片质量评价研究[J].中草药,2019,50(5):1100-1110.
- [7] 赵曼佳,赵嵘,代云桃,等.大黄标准汤剂质量评价[J].中国中药杂志,2018,43(5):861-867.
- [8] 倪丽丽.基于标准汤剂的茵陈蒿汤组方药味配方颗粒质量评价研究[D].南京:南京中医药大学,2020.
- [9] Dou Z H, Dai Y, Zhou Y Z, et al. Quality evaluation of rhubarb based on qualitative analysis of the HPLC fingerprint and UFLC-Q-TOF-MS/MS combined with quantitative analysis of eight anthraquinone glycosides by QAMS[J]. *Biomed Chromatogr*, 2021, 35(6): e5074.
- [10] 中国药典[S].四部.2020:480.
- [11] 国家药品监督管理局.中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)[S].2000.
- [12] 陆文瑾,窦志华,曹瑞,等.HPLC法同时测定大黄药材中8个非蒽醌类成分的含量[J].中国药房,2019,30(14):1975-1980.
- [13] 窦志华,曹瑞,卞理,等.正交试验法优选大黄中蒽醌类成分提取工艺[J].中草药,2018,49(14):3279-3286.
- [14] Sun M M, Wu H W, He M, et al. Integrated assessment of medicinal rhubarb by combination of delayed luminescence and HPLC fingerprint with emphasized on bioactivities based quality control[J]. *Chin Med*, 2020, 15: 72.
- [15] 王玉,杨雪,夏鹏飞,等.大黄化学成分、药理作用研究进展及质量标志物的预测分析[J].中草药,2019,50(19):4821-4837.
- [16] 龚小红,赵梦杰,党珏,等.基于主成分分析不同产地大黄13个成分量的比较研究[J].中草药,2017,48(23):4994-4999.
- [17] Chen A Z, Sun L, Yuan H, et al. Simultaneous qualitative and quantitative analysis of 11 active compounds in rhubarb using two reference substances by UHPLC[J]. *J Sep Sci*, 2018, 41(19): 3686-3696.
- [18] 冯素香,王哲,郝蕊,等.HPLC法同时测定不同产地掌叶大黄中10个蒽醌类化合物[J].药物分析杂志,2017,37(5):783-788.
- [19] 李丽.大黄炮制前后物质基础变化规律研究[D].北京:中国中医科学院,2011.
- [20] 逢瑜,孙磊,金红宇,等.指纹图谱结合化学计量学分析用于多种大黄的鉴别及质量评价[J].中国药理学杂志,2014,49(4):287-293.
- [21] 许洪波,杨康,高春晖,等.款冬花饮片标准汤剂制备及其指纹图谱研究[J].中国现代中药,2020,22(3):412-418.
- [22] 田杰,刘喜纲,常金花,等.黄芩对大黄蒽醌在提取精制过程中转化的影响[J].中国现代应用药学,2015,32(4):424-428.
- [23] 苏子仁,曾元儿,周华,等.大黄煎煮过程的化学变化初探[J].中国中药杂志,1999,24(5):291-292.
- [24] 武新安,王惠霞,魏玉辉,等.大黄粉末煎煮过程中游离蒽醌和结合蒽醌含量变化的考察[J].中国医院药学杂志,2007,27(10):1387-1390.
- [25] 秦云,李祥,陈建伟,等.大黄中蒽醌类成分配伍前后的量变规律[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(5):94-98.
- [26] 田伟,甄亚钦,高乐,等.野菊花饮片标准汤剂的研究[J].中国现代应用药学,2018,35(12):1831-1836.
- [27] 邓瑞雪,黄玉阳,张玉秀,等.掌叶大黄鞣质类化学成分研究[J].中草药,2020,51(4):908-911.
- [28] 窦志华,罗琳,姜晓燕,等.方剂配伍对茵陈蒿汤中15种成分提取率的影响[J].中草药,2015,46(12):1753-1758.
- [29] 吴玲芳,叶婷,梁林金,等.藏药余甘子鞣质部位主要药效成分在人工胃肠液中的稳定性研究[J].世界科学技术—中医药现代化,2017,19(8):1386-1390.
- [30] 刘洪林,曾艺涛,赵欣.乌龙茶加工过程中儿茶素的稳定性及化学变化[J].食品科学,2019,40(16):69-74.

[责任编辑 郑礼胜]