

经典名方当归四逆汤物质基准量值传递分析

许金国¹, 梅茜¹, 夏金鑫¹, 赵晓莉¹, 谢辉¹, 毛靖¹, 高红宁¹, 李鹏², 陆兔林^{1*}, 毛春芹^{1*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 南京海陵中药制药工艺技术研究有限公司, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 建立经典名方当归四逆汤物质基准的 HPLC 特征图谱及指标性成分含量测定方法, 阐明当归四逆汤物质基准关键质量属性, 为后续复方制剂的开发奠定基础。方法 制备 18 批当归四逆汤物质基准, 建立 HPLC 特征图谱, 进行特征峰归属及相似度评价; 测定指标性成分的含量, 对物质基准进行量值传递分析。结果 18 批物质基准的特征图谱的相似度均大于 0.90, 共确定 19 个特征峰, 分别来自方中当归(峰 4、5、19)、桂枝(峰 10、11、14)、白芍(峰 6、9)、细辛(峰 1、3、13、15、18)和炒甘草(峰 7、8、12、16、17); 各指标成分从饮片到物质基准的转移率分别为芍药苷 78.47%~96.01%、甘草苷 43.79%~94.62%、阿魏酸 81.20%~131.24%、肉桂酸 70.03%~106.75%、桂皮醛 3.17%~5.50%、甘草酸 31.08%~52.43%、细辛脂素 9.63%~13.37%。结论 采用特征图谱结合多指标性成分含量测定对当归四逆汤物质基准进行量值传递研究, 该方法科学合理, 为当归四逆汤物质基准的质量控制及复方制剂的开发提供科学依据。

关键词: 经典名方; 当归四逆汤; 物质基准; 量值传递; 当归; 桂枝; 白芍; 细辛; 炒甘草; 芍药苷; 甘草苷; 阿魏酸; 肉桂酸; 桂皮醛; 甘草酸; 细辛脂素; 质量控制

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)21-6501-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.21.007

Analysis on quality value transmitting of substance benchmarks of Danggui Sini Decoction

XU Jin-guo¹, MEI Xi¹, XIA Jin-xin¹, ZHAO Xiao-li¹, XIE Hui¹, MAO Jing¹, GAO Hong-ning¹, LI Peng², LU Tu-lin¹, MAO Chun-qin¹

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

2. Nanjing Hailing Pharmaceutical Technology Research Co., Ltd., Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To establish the HPLC characteristic chromatogram and multi-index components determination for substance benchmark of Danggui Sini Decoction (DSD, 当归四逆汤), which clarified the critical quality attributes, so as to lay a foundation for subsequent formulation development. **Methods** The substance benchmark of 18 batches of DSD was prepared based on ancient medical records. The characteristic chromatogram methodology was established to evaluate the origin and similarity of characteristic peaks, the components content and transfer rate were measured and the transfer analysis of substance benchmark was performed. **Results** The similarity of the 18 batches of DSD material characteristic chromatogram were all greater than 0.90, and a total of 19 characteristic peaks were identified, which came from Danggui (*Angelicae Sinensis Radix*) (peaks 4, 5, 19), Guizhi (*Cinnamomi Ramulus*) (peaks 10, 11, 14), Baishao (*Paeoniae Radix Alba*) (peaks 6, 9), Xixin (*Asari Radix et Rhizoma*) (peaks 1, 3, 13, 15, and 18) and Chaogancao (fried *Glycyrrhizae Radix et Rhizome*) (peaks 7, 8, 12, 16, and 17). The transfer rate of each index component from the decoction pieces to the substance benchmark was in the range of paeoniflorin 78.47%—96.01%, liquiritin 43.79%—94.62%, ferulic acid 81.20%—131.24%, cinnamic acid 70.03%—106.75%, cinnamaldehyde 3.17%—5.50%, glycyrrhizic acid 31.08%—52.43%, asarone 9.63%—13.37%. **Conclusion** In this study, the HPLC characteristic chromatogram combined with multi-index components determination were used to carry out the quantity value transfer analysis of the substance benchmark of

收稿日期: 2021-04-29

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1707000)

作者简介: 许金国, 高级实验师, 主要从事中药炮制及中药饮片质量标准研究。E-mail: 300024@njucm.edu.cn

*通信作者: 陆兔林, 教授, 博士生导师, 主要从事中药炮制及中药饮片质量标准研究。E-mail: ltl2021@njucm.edu.cn

毛春芹, 正高级实验师, 主要从事中药新药研发及中药质量标准研究。E-mail: 300555@njucm.edu.cn

DSD. The method is scientific and reasonable, and can provide scientific basis for the quality control substance benchmark and the development of compound preparations of DSD.

Key words: classical prescriptions; Danggui Sini Decoction; substance benchmarks; quality value transmitting; *Angelicae Sinensis Radix*; *Cinnamomi Ramulus*; *Paeoniae Radix Alba*; *Asari Radix et Rhizoma*; fried *Glycyrrhizae Radix et Rhizome*; paeoniflorin; glycyrrhizin; ferulic acid; cinnamic acid; cinnamaldehyde; glycyrrhizic acid; asarone; quality control

当归四逆汤 (Danggui Sini Decoction, DSD) 来源于汉代张仲景所著《伤寒论》，由当归、桂枝、白芍、细辛、炒甘草[经考证确定原方中的甘草(炙)为炒甘草，炒甘草与炙甘草炮制方法不同，本研究为中为炒甘草，非炙甘草]、木通、大枣 7 味药组成，具有温运血行、散寒通脉的功效，主治血脉凝涩、手足厥寒；或肠鸣腹痛、下利不止等病症^[1-2]。方中当归甘温，主入肝经，养血和血以补虚；桂枝辛温，温经散寒以通脉，共为君药。细辛温经散寒，增桂枝温通之力；白芍养血和营，既助当归补益营血，又配桂枝以和阴阳，共为臣药。木通通利经脉以畅血行；大枣、甘草，益气健脾、养血补虚，皆为佐药。重用大枣，既合归、芍以补营血，又防桂枝、细辛燥烈太过，伤及阴血。甘草兼调药而为使药之用。全文共奏温经散寒、养血通脉之功^[3]。该方组方配伍精良，临床疗效优异，被历代医家所推崇，广泛用于临床数百年，现代临床用于糖尿病周围神经病变^[4]、雷诺综合征^[5]、痛经^[6]等疾病的治疗。该方位于国家中医药管理局 2018 年发布的《古代经典名方目录（第一批）》^[7]，作为经典名方开发研究的主要对象之一。在其研究过程中，制备多批次物质基准，全面考察药材-饮片-物质基准的相关性，关注物质基准制备过程中关键质量属性的量值传递，对于保证经典名方的临床疗效，制备经典名方中药复方制剂具有重要意义。

物质基准的质量研究是经典名方开发过程中的关键环节，关键质量属性的量值传递研究能为全面控制经典名方质量提供依据。本研究在确定煎煮工艺的基础上，通过随机数表法组合制备 18 批 DSD 物质基准，对其特征图谱、指标性成分含量进行测定，分析饮片-物质基准关键质量属性量值传递规律，初步确定 DSD 物质基准指标性成分含量及转移率的质量控制范围，为经典名方 DSD 复方制剂的开发研究和质量控制提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

MS-105DU 型电子分析天平，梅特勒-托利多公司， $d=0.01$ mg；KQ-500E 数控超声波清洗器，昆

山市超声仪器有限公司；Milli-Q Integral 水纯化系统，美国 Millipore 公司；H1650-W 型台式高速离心机，湖南湘仪实验室仪器开发有限公司；AE-1106A 型爱仕卡微电脑电陶炉，中山市爱米生活电器有限公司；Waters e2695 高效液相色谱仪，包括 Empower 工作站，自动进样器，2998 检测器，美国 Waters 公司。

1.2 试药

当归、桂枝、白芍、细辛、炒甘草、木通、大枣饮片具体信息见表 1，均经南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定，分别为伞形科当归属植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. 的干燥根、樟科樟属植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl. 的干燥嫩枝、毛茛科芍药属植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根、马兜铃科细辛属植物北细辛 *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag. 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、木通科木通属植物三叶木通 *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz. 的干燥藤茎、鼠李科枣属植物枣 *Ziziphus jujuba* Mill. 的干燥成熟果实。当归、桂枝、白芍、细辛、木通、大枣均按照《中国药典》2020 年版炮制符合要求的饮片，炒甘草按照《中国药典》2020 年版及《浙江省中药饮片炮制规范（2015 年版）》指导下优化工艺参数炮制所得。

对照品阿魏酸（批号 110773-201915，质量分数 99.4%）、桂皮醛（批号 110710-201217，质量分数 99.5%）、肉桂酸（批号 110786-201604，质量分数 98.8%）、芍药苷（批号 110736-201943，质量分数 95.1%）、细辛脂素（批号 111889-201705，质量分数 100.0%）、甘草苷（批号 111610-201908，质量分数 95.0%）、甘草酸铵（批号 110731-202021，质量分数 96.2%）、苯甲酸（批号 100419-201703，质量分数 99.9%）均购自中国食品药品检定研究院；对照品藁本内酯（批号 200626，质量分数 >98%）购自南京森贝伽生物科技有限公司。

乙腈，色谱纯，默克股份有限公司；甲醇，色谱纯，江苏汉邦科技有限公司；磷酸，色谱纯，上

表 1 DSD 饮片来源信息
Table 1 Source information of DSD

名称	产地	批号	供货商
当归	甘肃岷县	yp1807101~yp1807103、yp1807201~yp1807203、yp1807301~yp1807303、yp1807401~yp1807403、yp1807501~yp1807503	盛实百草药业有限公司
桂枝	广东肇庆	yp1801010~yp1801100	盛实百草药业有限公司
白芍	安徽亳州	yp201810-1~yp201810-5、yp1809601~yp1810001、yp1809602~yp1810002	盛实百草药业有限公司
细辛	辽宁新宾	yp1814201~yp1814601、yp1817301~yp1817310	盛实百草药业有限公司
炒甘草	甘肃民勤	ypGC-11~ypGC-51、ypGC-12~ypGC-52、ypGC-13~ypGC-52	石家庄以岭药业股份有限公司
木通	陕西西安	yp20042011-1~yp20042015-1、yp20042011-2~yp20042015-2、yp20042011-3~yp20042015-3	安徽亳州谯城区神农谷交易中心
大枣	山东新泰	yp18071611~yp18071651、yp18071612~yp18071652、yp18071613~yp18071653	河北神威药业集团有限公司

海阿拉丁生化科技有限公司；其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 18 批 DSD 物质基准的制备

通过剂量考证确定处方中各饮片所用剂量，根据《古代经典名方中药复方制剂物质基准的申报资料要求（征求意见稿）》（以下简称《申报资料》），对浸泡时间、煎煮火力、是否加盖 3 个因素进行考察，最终确定煎煮工艺。

采用随机数表法，对不同批号的当归、桂枝、白芍、细辛、炒甘草、木通及大枣 7 味饮片进行随机组合，形成 18 批 DSD 物质基准的处方。分别称取当归 9 g，桂枝 9 g，白芍 9 g，细辛 9 g，木通 6 g，炒甘草 6 g，大枣 24 g 置砂锅中，加水 1600 mL，浸泡 45 min，武火（2200 W）煮沸后转文火（1000 W）煎煮约 70 min，煮至约 600 mL，100 目筛滤过，调整体积至 600 mL，共制得 18 批 DSD 物质基准，编号为 DSD01~DSD18。分别取处方量单味饮片，同法制备，即得各单味饮片水煎液。

2.2 DSD 物质基准特征图谱的建立

2.2.1 色谱条件 Merck Purospher Star LP RP-18 Endcapped 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液，梯度洗脱：0~20 min，2%~15%乙腈；20~30 min，15%~20%乙腈；30~38 min，20%~25%乙腈；38~50 min，25%~40%乙腈；50~55 min，40%~50%乙腈；55~65 min，50%~95%乙腈；65~68 min，95%~2%乙腈；体积流量 0.9 mL/min；检测波长 220 nm；柱温 25 ℃；进样量 20 μL。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密量取 DSD 物质基

准 3 mL，置 10 mL 量瓶中，加甲醇 6 mL，再加水至刻度，使甲醇体积分数为 60%，称定质量，超声处理（功率 500 W、频率 40 kHz）30 min，放冷，再称定质量，用 60%甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液离心 10 min（12 000 r/min），即得。

各单味饮片供试品溶液制备方法同物质基准供试品溶液。

2.2.3 精密度试验 取编号为 DSD15 的 DSD 物质基准制备的供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件，连续进样 6 次。以芍药苷为参照峰，计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD，结果各峰相对保留时间 RSD<0.20%，相对峰面积 RSD<4.31%，表明仪器精密度良好。

2.2.4 重复性试验 取编号为 DSD15 的 DSD 物质基准，按“2.2.2”项下方法制备 6 份供试品溶液，按“2.2.1”项下进样检测。以芍药苷为参照峰，计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD，结果各峰相对保留时间 RSD<0.17%，相对峰面积 RSD<4.54%，表明方法重复性良好。

2.2.5 稳定性试验 取编号为 DSD15 的 DSD 物质基准制备供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件，分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样检测。以芍药苷为参照峰，计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD，结果各峰相对保留时间 RSD<0.18%，相对峰面积 RSD<4.50%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.6 18 批 DSD 特征图谱的测定及相似度分析 按“2.2.2”项下方法制备 18 批供试品溶液，采用“2.2.1”项下色谱条件进行测定。将 18 批 DSD 物

质基准特征图谱以 AIA 格式导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)》, 对前 4 min 的色谱峰进行剪切, 以 S1 为参照图谱, 时间窗宽度为 0.1, 采用中位数法, 进行全谱峰匹配, 计算相似度。

DSD 物质基准对照特征图谱见图 1, 18 批 DSD 物质基准特征图谱叠加图见图 2, 相似度见表 2。18 批 DSD 物质基准特征图谱与对照特征图谱的相似度大于 0.90。

2.3 饮片-物质基准特征图谱的量值传递关系研究

将 18 批物质基准生成的对照图谱与各味饮片 (当归、桂枝、白芍、细辛、炒甘草) 的对照图谱进行比对, 结果见图 3, 并以每味中药中的 1 个特征峰为参考峰, 计算相对峰面积, 比较物质基准和各饮片中特征峰峰面积的比值, 结果见表 3。DSD 物质基准特征图谱标定了 19 个色谱峰, 对其中 18 个特征峰进行了单味饮片的归属研究, 并经与对照品

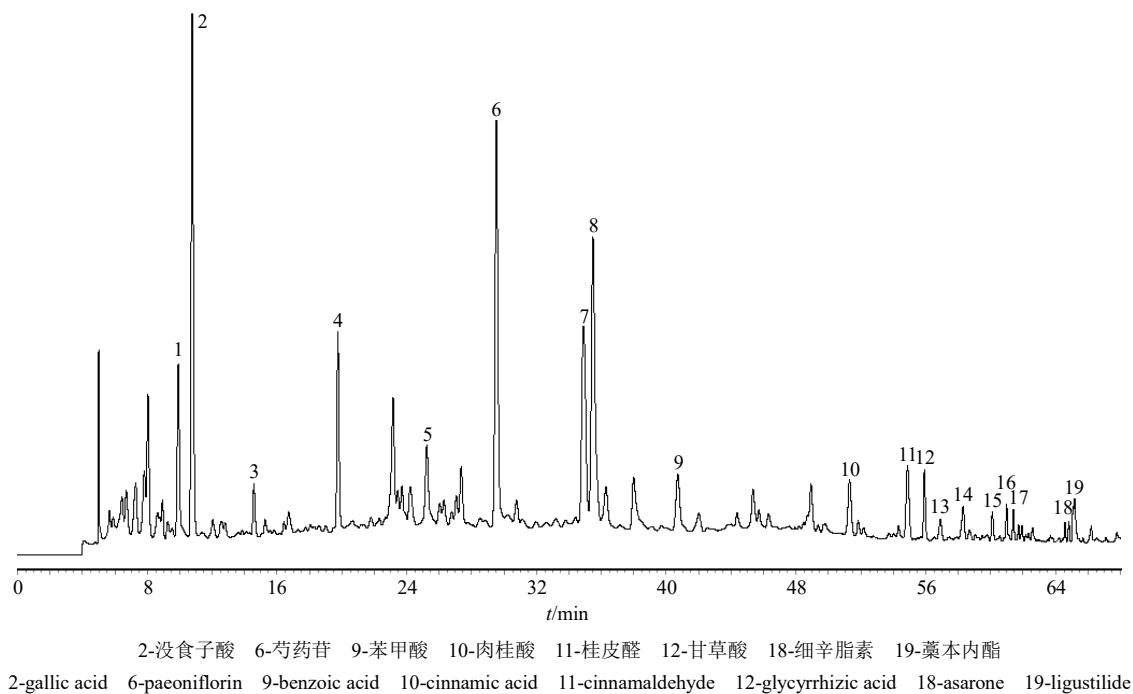


图 1 DSD 物质基准特征图谱

Fig. 1 Characteristic spectrum of the material reference of DSD

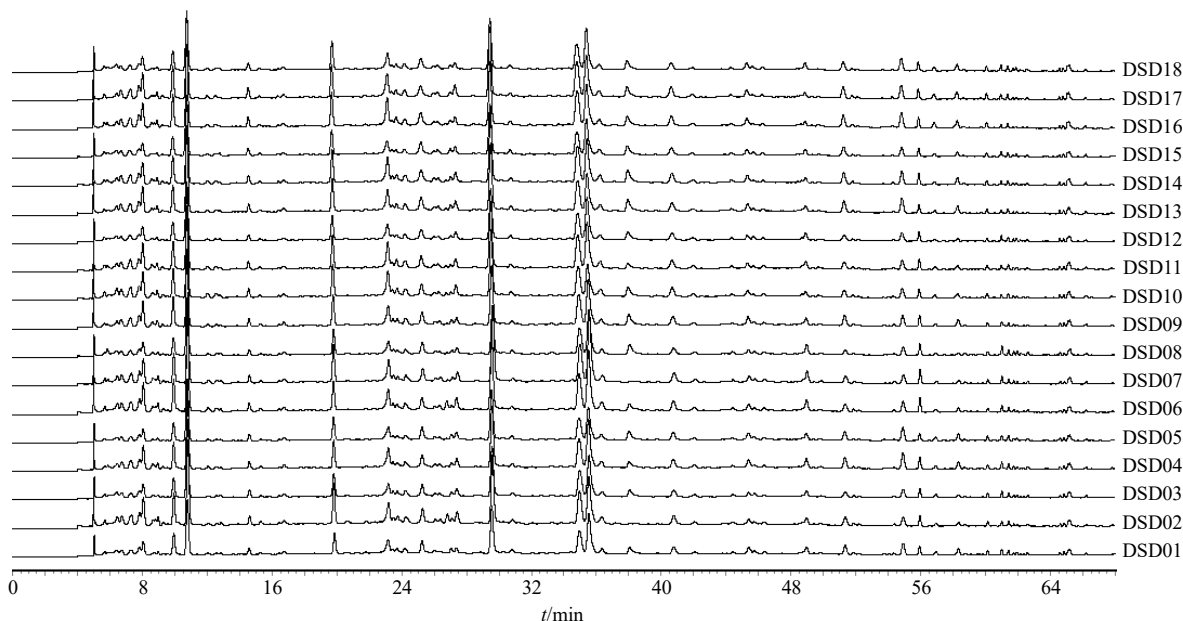


图 2 18 批 DSD 物质基准特征图谱

Fig. 2 Characteristic spectrum of material reference of 18 batches of DSD

从单味药相对峰面积与全方物质基准相对峰面积的差异的比值可以看出,大部分特征峰的比值在各饮片和物质基准中变化较小,各饮片中特征峰与物质基准中对应特征峰峰面积虽存在差异,但各饮片大部分相对峰面积与物质基准中相对峰面积相似,表明饮片单煎和多味饮片合煎时不同成分含量间比例关系较为稳定,各药味中的主要物质群可较为完整地由饮片传递到物质基准中,且物质群归属清晰。

个别特征峰的比值在饮片和物质基准间存在明显差异,如以芍药苷(6号峰)为参照峰时的苯甲酸(9号峰)、以4号峰为参照峰时的5号峰、以1号峰为参照峰时的细辛脂素(18号峰),推测可能与复方中的多成分化合物在煎煮过程中发生复杂的化学反应有关。

2.4 18批DSD物质基准指标性成分含量测定及量值传递关系研究

2.4.1 色谱条件 Merck Purospher Star LP RP-18 Endcapped 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液,梯度洗脱:0~14

min, 16%~19%乙腈; 14~20 min, 19%~25%乙腈; 20~30 min, 25%~35%乙腈; 30~40 min, 35%~50%乙腈; 40~50 min, 50%乙腈; 50~62 min, 50%~65%乙腈; 62~63 min, 65%~16%乙腈; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 230、250、287、316 nm; 柱温 30 ℃; 进样量 20 μL。

2.4.2 混合对照品溶液的制备 取芍药苷、甘草苷、阿魏酸、肉桂酸、桂皮醛、甘草酸、细辛脂素对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度分别为 390.72、70.44、9.79、8.88、20.40、135.60、7.04 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.4.3 供试品溶液的制备 同“2.2.2”项下供试品溶液的制备方法。

2.4.4 线性关系考察 取不同质量浓度的指标性成分对照品溶液,采用“2.4.1”项下色谱条件进样测定,以质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线并计算回归方程,结果如表4所示,结果表明芍药苷、甘草苷、阿魏酸、肉桂酸、桂皮醛、甘草酸和细辛脂素在各自的线性范围内线性关系良好。

表4 DSD物质基准中指标性成分线性关系和加样回收率考察结果

Table 4 Methodological study on linearity and reproducibility of indicator components in material benchmark of DSD

指标成分	线性关系考察			平均加样 回收率/%	RSD/%
	回归方程	r	线性范围/(μg·mL ⁻¹)		
芍药苷	$Y=1\,483\,691.74\,X+40\,821.94$	0.999 9	24.42~390.72	97.07	2.6
甘草苷	$Y=2\,686\,941.51\,X+22\,015.77$	1.000 0	4.40~70.44	100.52	2.4
阿魏酸	$Y=4\,517\,962.00\,X+21\,290.56$	0.999 2	0.61~9.79	95.84	2.8
肉桂酸	$Y=7\,824\,167.73\,X+8\,454.69$	1.000 0	0.55~8.88	97.31	1.8
桂皮醛	$Y=10\,745\,529.93\,X+27\,935.08$	1.000 0	1.27~20.40	100.62	2.3
甘草酸	$Y=895\,960.27\,X-2\,069.69$	1.000 0	8.48~135.60	95.44	2.5
细辛脂素	$Y=1\,423\,450.48\,X+3\,224.04$	0.999 9	0.44~7.04	102.48	2.9

2.4.5 精密度考察 取同一批 DSD 物质基准(DSD01),参照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液1份,按“2.4.1”项下色谱条件,连续进样6次,芍药苷、甘草苷、阿魏酸、肉桂酸、桂皮醛、甘草酸和细辛脂素峰面积的 RSD 值分别为 0.13%、0.21%、0.63%、0.24%、0.31%、0.23%、0.76%,表明仪器精密度良好。

2.4.6 重复性考察 取同一批 DSD 物质基准(DSD01)6份,参照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,芍药苷、甘草苷、阿魏酸、肉桂酸、桂皮醛、甘草酸和细辛

脂素质量分数的 RSD 值分别为 2.20%、1.50%、1.90%、1.50%、0.97%、2.00%、2.00%,表明该方法重复性良好。

2.4.7 稳定性考察 取同一批 DSD 物质基准(DSD01),参照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液1份,按“2.4.1”项下色谱条件,分别在制样后0、2、4、8、12、18、24 h 进行测定,芍药苷、甘草苷、阿魏酸、肉桂酸、桂皮醛、甘草酸和细辛脂素峰面积的 RSD 分别为 0.09%、0.19%、1.20%、0.19%、0.71%、0.17%、1.50%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.8 加样回收率考察 精密量取已测知指标成分含量的 DSD 物质基准 (DSD01) 3 mL, 共 6 份, 分别加入一定量的对照品, 采用“2.4.3”项下方法制备供试品溶液, 测定样品中各指标成分含量, 计算加样回收率, 结果如表 5 所示, 芍药苷、甘草苷、阿魏酸、肉桂酸、桂皮醛、甘草酸和细辛脂素的加样回收率均在 95%~105%, RSD 值均小于 3.0%, 表明方法准确度良好。

2.4.9 样品测定及量值传递关系研究 饮片中标记性成分的含量, 按《中国药典》2020 年版测定, 饮片-物质基准中指标成分的转移率按公式计算, 结果见表 5。由表 5 结果可知, 18 批 DSD 物质基准中指标性成分芍药苷为 2.04%~2.75%, 平均转移率为 85.15%; 阿魏酸为 0.057%~0.073%, 平均转移率为 110.74%; 细辛脂素为 0.030%~0.048%, 平均转移率为 11.08%。根据相关规定, 不同批次物质基准的指标性成分质量分数及转移率应控制在其均值的

70%~130%, 本研究中 18 批 DSD 物质基准中芍药苷、阿魏酸、细辛脂素含量及转移率均在均值 70%~130%, 从芍药苷、阿魏酸、细辛脂素的转移率进行分析, DSD 物质基准的制备工艺稳定, 不同批次物质基准的芍药苷、阿魏酸、细辛脂素转移率符合要求, 说明实验前期当归、白芍、细辛的质量控制及物质基准制备工艺可以实现 DSD 中芍药苷、阿魏酸、细辛脂素含量的稳定传递。

$$\text{转移率} = w/W$$

w 表示物质基准中指标性成分的含量, W 表示饮片中标记性成分的含量

DSD 物质基准中肉桂酸为 0.022%~0.054%, 平均转移率为 89.28%; 桂皮醛为 0.055%~0.105%, 平均转移率为 4.12%; 甘草苷为 0.42%~0.85%, 平均转移率为 65.37%; 甘草酸为 0.95%~1.65%, 平均转移率为 41.15%。部分批次物质基准中甘草苷、甘草酸、肉桂酸、桂皮醛质量分数未在其均值的

表 5 DSD 物质基准中指标成分含量及转移率

Table 5 Content and transfer rate of paeoniflorin, glycyrrhizin, ferulic acid, cinnamic acid in DSD

编号	芍药苷/%			甘草苷/%			阿魏酸/%			肉桂酸/%			桂皮醛/%			甘草酸/%			细辛脂素/%		
	物质基准	饮片	转移率	物质基准	饮片	转移率	物质基准	饮片	转移率	物质基准	饮片	转移率	物质基准	饮片	转移率	物质基准	饮片	转移率	物质基准	饮片	转移率
DSD01	2.09	2.49	83.64	0.58	0.83	70.20	0.074	0.057	129.43	0.028	0.031	90.71	0.075	1.37	5.50	1.17	2.85	40.95	0.041	0.374	11.01
DSD02	2.37	2.58	91.93	0.62	0.92	67.71	0.089	0.073	122.04	0.033	0.036	93.77	0.058	1.41	4.10	1.18	3.16	37.46	0.041	0.382	10.81
DSD03	2.30	2.79	82.50	0.54	0.92	59.12	0.063	0.070	90.08	0.024	0.031	76.46	0.057	1.73	3.27	1.15	2.77	41.48	0.030	0.316	9.63
DSD04	2.13	2.62	81.38	0.63	0.90	70.44	0.070	0.061	114.24	0.049	0.055	88.53	0.105	2.47	4.24	1.38	3.14	43.93	0.040	0.345	11.59
DSD05	2.34	2.72	86.01	0.44	0.80	54.54	0.057	0.064	89.02	0.043	0.060	70.79	0.092	1.97	4.66	0.95	2.74	34.66	0.032	0.310	10.19
DSD06	2.75	3.11	88.40	0.78	0.90	87.40	0.074	0.063	116.80	0.029	0.029	100.00	0.069	1.61	4.33	1.63	3.14	51.89	0.040	0.343	11.70
DSD07	2.39	2.49	96.01	0.85	0.90	94.62	0.074	0.060	123.12	0.031	0.029	106.75	0.058	1.61	3.64	1.65	3.14	52.43	0.044	0.343	12.84
DSD08	2.24	2.49	89.88	0.59	0.82	71.71	0.052	0.061	81.20	0.022	0.031	70.03	0.055	1.73	3.17	1.40	2.76	50.87	0.036	0.371	9.76
DSD09	2.04	2.52	80.85	0.59	0.95	61.56	0.083	0.063	131.24	0.047	0.060	78.56	0.069	1.97	3.51	1.24	2.93	42.17	0.038	0.359	10.54
DSD10	2.25	2.86	78.47	0.42	0.95	43.79	0.075	0.064	117.28	0.029	0.029	97.61	0.063	1.61	3.90	1.01	2.93	34.65	0.041	0.382	10.64
DSD11	2.28	2.57	88.66	0.60	1.01	59.22	0.080	0.063	127.12	0.030	0.031	95.74	0.059	1.37	4.31	1.15	2.96	38.86	0.048	0.359	13.37
DSD12	2.31	2.79	82.85	0.56	0.86	65.71	0.059	0.070	83.60	0.027	0.029	91.65	0.058	1.61	3.59	1.13	3.16	35.87	0.036	0.343	10.42
DSD13	2.30	2.72	84.67	0.49	0.86	56.94	0.073	0.070	103.11	0.050	0.057	88.71	0.098	2.14	4.56	0.98	3.16	31.08	0.041	0.374	10.99
DSD14	2.37	2.73	86.87	0.57	0.83	68.32	0.071	0.060	117.64	0.052	0.059	87.00	0.086	2.05	4.18	1.24	2.85	43.34	0.046	0.345	13.19
DSD15	2.13	2.57	82.90	0.54	0.92	58.70	0.073	0.060	120.87	0.051	0.057	89.39	0.099	2.14	4.62	1.17	2.77	42.16	0.038	0.366	10.50
DSD16	2.32	2.79	83.18	0.55	0.90	60.83	0.073	0.072	101.25	0.047	0.052	89.11	0.088	2.15	4.10	1.22	2.95	41.23	0.038	0.352	10.79
DSD17	2.25	2.79	80.45	0.50	0.90	55.12	0.079	0.072	109.79	0.047	0.052	90.28	0.085	2.15	3.93	1.11	2.95	37.68	0.038	0.352	10.77
DSD18	2.34	2.79	83.98	0.64	0.90	70.71	0.083	0.072	115.47	0.054	0.052	101.98	0.099	2.15	4.59	1.18	2.95	39.99	0.038	0.352	10.78
平均值	2.29	2.69	85.15	0.58	0.89	65.37	0.072	0.066	110.74	0.039	0.043	89.28	0.076	1.85	4.12	1.22	2.96	41.15	0.039	0.354	11.08
范围	2.04~2.75	2.49~3.11	78.47~96.01	0.42~0.85	0.80~1.01	43.79~94.62	0.052~0.089	0.057~0.073	81.20~131.24	0.022~0.054	0.029~0.060	70.03~106.75	0.055~0.105	1.37~5.50	3.17~5.50	0.95~1.65	2.74~3.16	31.08~52.43	0.030~0.048	0.310~0.382	9.63~13.37

70%~130%，甘草苷和桂皮醛转移率未在均值的 70%~130%。研究表明，甘草不同组织部位（木质部、韧皮部和木栓层）中总黄酮含量及甘草苷含量存在显著性差异，是造成不同批次甘草中指标性成分含量差异较大的主要原因^[9]，本研究中甘草的研究结果与多数学者的研究结果相一致^[10-11]。物质基准中，肉桂酸和桂皮醛在其均值 70%~130%外的批次，其所对应批次饮片中的肉桂酸和桂皮醛也在其均值 70%~130%外，这提示在今后进行 DSD 物质基准制备时，首先要制定饮片原料的质量标准范围，且对饮片药用部位及大小严格分档，保证原料质量的均一、稳定，以确保物质基准质量的稳定。

3 讨论

3.1 物质基准处方组成、剂量及制备方法

《伤寒论》中 DSD 原方记载为：“当归三两，桂枝三两（去皮），芍药三两，细辛三两，甘草二两（炙），通草二两，大枣二十五枚（擘）。上七味，以水八升，煮取三升，去滓”，经文献考证^[12-14]，确定方中芍药为现今白芍，通草为木通，甘草（炙）为炒甘草，1 两为 3 g，1 升折合 200 mL，大枣 25 枚折合为 24 g。根据《申报资料》要求，收集不少于 3 个产地（包含道地药材产地、主产区）不少于 15 批次的药材进行质量分析，确定药材的最佳产地，并炮制为对应饮片。随后对煎煮、滤过、浓缩及干燥工艺进行了研究，最终确定 DSD 物质基准制备方法。

3.2 DSD 物质基准供试品溶液制备方法考察

本实验前期对供试品制备的超声提取法的主要因素提取溶剂（水、50%甲醇、60%甲醇、70%甲醇），提取时间（15、30、45 min），提取功率（250、350、500 W）进行了全面考察，以 7 个指标性成分提取率为主要评价指标，最终选择供试品溶液的制备方法为以 60%甲醇为溶剂，超声提取（功率 500 W，频率 40 kHz）30 min。

3.3 色谱条件考察

实验前期比较了不同厂家（Waters、Merck、Hanbon）生产的色谱柱分离效果，对不同流动相（乙腈-水、甲醇-水、乙腈-0.05%磷酸水溶液、乙腈-0.05%甲酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液），不同柱温（25、30、35 ℃）、不同体积流量（0.8、0.9、1.0、1.2 mL/min）等进行了考察，结果发现以 Merck 色谱柱，流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液，柱温 25 ℃（特征图谱）、30 ℃（含量测定），体积流量为 0.9 mL/min（特征

图谱）、1.0 mL/min（含量测定）时，有较好的色谱峰峰形，分离度良好，出峰数量较多，响应值较高，因此确定为色谱条件。

采用紫外检测器对 DSD 物质基准供试品溶液进行全波长扫描，分析其 3D 图谱，特征图谱研究中比较了 220、245、280 nm 波长下的色谱图，综合考虑其出峰数量、峰形、基线等情况，最终选定 220 nm 最为特征图谱的检测波长。多成分含量测定研究中通过全波长扫描结合各指标性成分最大紫外吸收波长，最终确定采用多波长切换法，在 230 nm 下测定芍药苷和甘草苷，250 nm 下测定甘草酸，287 nm 下测定肉桂酸、桂皮醛和细辛脂素，在 316 nm 下测定阿魏酸。

3.4 饮片与物质基准的特征图谱传递

全方标定的特征峰，能归属到当归、桂枝、白芍、细辛和炒甘草 5 味饮片，而木通和大枣在该色谱条件下色谱峰信息少、响应值较低，在全方特征图谱中未见有特征峰的体现。木通和大枣均为方中的佐药，木通主要的活性成分包括三萜及三萜皂苷类、酚醇及其苷类等，其中，三萜皂苷类化合物的苷元类型有 10 种，以常春藤皂苷元、齐墩果酸皂苷元较为常见^[15]；大枣中的化学成分复杂，含有环腺苷、鸟苷、芦丁、槲皮素和葡萄糖等化学成分^[16]。木通和大枣中的成分在本实验条件下可能由于成分含量低、响应值低、梯度洗脱程序不适宜等因素导致出峰不明显，无法体现药味信息。在后期实验中可单独建立复方中木通和大枣特征图谱测定方法，同时结合薄层色谱鉴别、大类成分含量测定等方法，对 DSD 全方进行整体的质量控制。

3.5 饮片与物质基准的指标性成分转移率分析

DSD 主要用于治疗血虚寒厥证，方中与此主治病症相关的药效成分为阿魏酸、桂皮醛、肉桂酸、芍药苷、甘草苷和甘草酸^[17]，细辛脂素为历版《中国药典》中细辛的质控成分，具有抗病毒、抗结核杆菌的作用^[18]，故选择上述 7 个成分含量为指标进行 DSD 物质基准含量的研究。指标性成分含量及转移率结果中，桂皮醛和细辛脂素的转移率较低。桂皮醛为热不稳定性成分，在制备 DSD 物质基准的过程中采用加热煎煮的方式制备，温度高且煎煮时间较长，故造成桂皮醛由饮片到物质基准的转移率较低；细辛脂素为木脂素类成分，是历版《中国药典》中细辛鉴别和含量测定的指标性成分^[19]，游离木脂素为脂溶性成分，一般难溶于水，本研究采

用的提取方式为水煎煮,故细辛脂素的提取效率较低。转移率低表明从饮片到物质基准传递的过程中含量损失较高,这也提示在后续制剂开发的过程中需注意温度和加热时间对热不稳定成分的影响。

4 结论

物质基准是经典名方制剂研究的关键环节,是衡量复方制剂与传统汤剂是否一致的标准^[20-22]。物质基准同中药配方颗粒中标准汤剂一样,为中药药用物质的标准,其标准主要涵盖了投料中药饮片的道地性、制备工艺的统一性,以及质量控制的严谨性^[23]。本研究选用来自道地产地或主产区的原料进行投料,采用统一的制备方法制备了 18 批 DSD 物质基准开展研究,18 批 DSD 物质基准特征图谱相似度较高,指标性成分转移率大部分在均值±30%范围内,表明制备工艺稳定可行。所建立的 DSD 物质基准的 HPLC 特征图谱及多指标性成分含量测定方法,能实现对方中君药当归和桂枝,臣药白芍和细辛,佐使药炒甘草的化学表征,可为 DSD 复方制剂的进一步开发研究奠定基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 南京中医学院伤寒教研组. 伤寒论译释 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1980: 1195-1196.
- [2] 李克绍. 伤寒论语释 [M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1982: 294.
- [3] 李冀, 连建伟. 方剂学 [M]. 第 4 版. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 111.
- [4] 万首燕, 王宏丽. 当归四逆汤结合 α-硫辛酸治疗糖尿病周围神经病变的疗效 [J]. 内蒙古中医药, 2020, 39(2): 12-13.
- [5] 单梅花. 当归四逆汤加味治疗雷诺综合征临床分析 [J]. 河南医学研究, 2017, 26(7): 1282-1283.
- [6] 周少澎. 当归四逆汤配合艾灸对原发性痛经的疗效与安全性评价 [J]. 中国处方药, 2019, 17(4): 98-99.
- [7] 国家中医药管理局. 关于发布《古代经典名方目录(第一批)》[EB/OL]. [2018-04-13]. <http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2018-04-16/7107.html>.
- [8] 梅茜, 夏金鑫, 郭爽, 等. 基于指纹图谱及网络药理学的白芍质量标志物(Q-marker)预测分析 [J]. 中草药,

2020, 51(10): 2627-2633.

- [9] 王汉卿, 雍婧姣, 肖东, 等. 宁夏产甘草不同组织部位成分差异比较 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(6): 2672-2675.
- [10] 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.
- [11] 王璐, 谢辉, 赵晓莉, 等. 经典名方“竹茹汤”的物质基准量值传递分析[J/OL]. 中国中药杂志, [2021-06-14]. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcmm.20210302.304>.
- [12] 黄英杰. 《伤寒论》用药剂量及其相关问题的研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2007.
- [13] 李培生, 刘渡舟. 伤寒论讲义 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985: 228.
- [14] 广州中医学院. 方剂学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 12.
- [15] 柳岳超, 李洪亮, 曾小华, 等. 三叶木通藤茎的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 上海中医药大学学报, 2020, 34(3): 99-106.
- [16] 曾杉, 甘伟发, 史紫娟. 不同产地的大枣药材 UPLC 指纹图谱及含量测定方法研究 [J]. 广东药科大学学报, 2020, 36(4): 458-462.
- [17] 彭霞. 当归四逆汤方证研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2013.
- [18] 赫一鸣. 北细辛及其饮片质量评价研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2020.
- [19] 吴昊, 温晓茵, 颜鹏, 等. 细辛的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(4): 186-195.
- [20] 关雅戈, 罗赣, 高晓燕, 等. 经典名方桃核承气汤物质基准关键质量属性研究 [J]. 中草药, 2021, 52(8): 2267-2275.
- [21] 葛威, 刘小康, 王康宇, 等. 经典名方竹叶石膏汤的物质基准量值传递分析 [J]. 中草药, 2021, 52(11): 3239-3248.
- [22] 张欣舒, 董金香, 杨净尧, 等. 经典名方保元汤物质基准指纹图谱及多指标量值传递研究 [J]. 药物分析杂志, 2021, 41(2): 345-358.
- [23] 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(2021 年第 16 号)[EB/OL]. [2021-01-26]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/qtggtg/20210210145453181.html>.

[责任编辑 郑礼胜]