

经典名方当归四逆汤物质基准指纹图谱及关键质量属性量值传递规律研究

储烟阁^{1,2}, 匡艳辉¹, 严曾豪¹, 王德勤¹, 郭海彪¹, 张偲偲^{1*}, 刘晓秋^{2*}

1. 广州白云山和记黄埔中药有限公司现代中药研究院, 广东 广州 510000

2. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016

摘要: **目的** 建立经典名方当归四逆汤 (Danggui Sini Decoction, DSD) 指纹图谱并结合化学模式识别进行分析, 建立多成分含量测定的方法, 明确关键质量属性的传递规律。**方法** 采用 HPLC 法, 乙腈-0.2% 乙酸水溶液为流动相, 建立指纹图谱, 采用中药色谱指纹图谱相似度评价软件 (2012 年版), 结合层次聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 与正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA), 寻找造成不同批次 DSD 物质基准质量差异的主要化学成分。制备 15 批物质基准, 测定其指纹图谱相似度、指标性成分含量及干膏率。**结果** 建立了当归四逆汤指纹图谱, 确定了 16 个共有峰, 15 批 DSD 物质基准相似度大于 0.90, 3 种化学识别模式均将样品分为 3 类, 造成主要差异的质量差异物来源于甘草苷。所建立的多成分含量测定方法耐用性良好。饮片-物质基准芍药苷、甘草苷、甘草酸的平均转移率分别为 52.94%、48.79%、47.39%, 干膏率平均传递率为 86.40%。**结论** 建立了经典名方当归四逆汤指纹图谱, 寻找出了造成批次差异的标志物及含量测定的方法, DSD 物质基准的关键质量属性均可在饮片-水煎液-物质基准中稳定传递, 初步构建 DSD 全过程质量控制体系, 为后续制剂研究提供参考。

关键词: 当归四逆汤; 指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析; 正交偏最小二乘法-判别分析; 化学模式识别; 物质基准; 量值传递; 芍药苷; 甘草苷; 甘草酸

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)03-0746-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.03.008

HPLC fingerprint of classic prescription Danggui Sini Decoction and quantity transfer law of key quality attributes

CHU Yan-tian^{1,2}, KUANG Yan-hui¹, YAN Zeng-hao¹, WANG De-qin¹, GUO Hai-biao¹, ZHANG Si-si¹, LIU Xiao-qiu²

1. Guangzhou Baiyunshan Hutchison Whampoa Chinese Medicine Co., Ltd., Guangzhou 510000, China

2. Shengyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: Objective To establish a fingerprint of the classical formula Danggui Sini Decoction (当归四逆汤, DSD) and combine it with chemical pattern recognition to analyze and establish a method for multi-component content determination, clarify the transmission law of key quality attributes. **Methods** HPLC was used to establish the fingerprint of DSD, and traditional Chinese medicine (TCM) Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation Software (2012) combined with hierarchical cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) were used to evaluate the quality differences between different batches of substance benchmark of DSD, and find the main chemical composition causing quality differences between batches. Fifteen batches of material benchmarks were prepared, and their fingerprint similarity, index component content and dry paste rate range were determined. **Result** The fingerprint of DSD was established, and 16 common peaks were determined. The similarity of 15 batches of DSD was greater than 0.90. The samples were divided into three categories by three chemical recognition modes, and the quality markers that caused the main difference came from liquiritin. The established method for the determination of multi-component content has good durability. The average transfer rates of paeoniflorin, liquiritin and glycyrrhizic acid were 52.94%, 48.79%, and 47.39%. Respectively, the average transfer rate of dry paste rate was 86.40%. **Conclusion**

收稿日期: 2022-07-11

基金项目: 国家科技部重大新药创制 (2018ZX09721004-001)

作者简介: 储烟阁, 硕士研究生, 研究方向为中药分析。E-mail: chuyantian0411@163.com

*通信作者: 张偲偲, 硕士, 制药工程师, 研究方向为中药质量控制及质量标准。Tel: (020)66282439 E-mail: cici55@qq.com

刘晓秋, 教授, 博士, 博士生导师, 从事中药质量控制研究。Tel: (021)43520708 E-mail: liuxiaoqiu3388@126.com

To establish an HPLC fingerprint of the substance benchmark of classic prescription DSD and evaluate its quality with chemical pattern recognition method. The markers causing batch differences and the content determination methods of seven components were found. The critical quality attributes of DSD substance benchmarks can be stably transferred from decoction pieces to decoction finally to substance benchmarks, and the whole process quality control system of DSD was preliminarily constructed to provide reference for subsequent preparation research.

Key words: Danggui Sini Decoction; fingerprint; cluster analysis; PCA; OPLS-DA; chemical pattern recognition; material benchmark; quantity value transmission; paeoniflorin; liquiritin; glycyrrhizic acid

当归四逆汤 (Danggui Sini Decoction, DSD), 来源于张仲景的《伤寒论》, 由当归、桂枝、白芍、细辛、甘草、木通、大枣 7 味药组成, 具有温经散寒、养血通脉的作用, 主治血虚寒厥证^[1-2]。现代药理研究表明, DSD 可用于痛经^[3]、风湿性关节炎^[4]、冠心病^[5]、周围神经病变^[6]、雷诺病^[7]等诸多疾病的治疗, 临床使用广泛。DSD 在 2018 年国家中医药管理局发布的《古代经典名方目录 (第一批)》中为第 13 方^[8]。根据《伤寒论》原文记载, 其煎煮方法为“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, 温服一升, 日三服。”根据国家药品监督管理局 2018 年 5 月发布《古代经典名方中药复方制剂简化注册审批管理规定》^[9], 经典名方复方制剂开发必须首先进行物质基准研究, 为其后续的制剂开发提供依据。此外, 国家药品监督管理局 2019 年 3 月发布《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)》^[10], 经典名方的开发研究要首先明确其煎煮方法及投料规格等, 且“原则上应与经典名方古代医籍记载一致”。

目前, 关于经典名方 DSD 的研究多见文献考证及临床应用, 少见其多个成分含量测定方法及物质基准制备工艺的研究报道^[11-12], 本研究拟建立 DSD 指纹图谱并结合 3 种化学模式识别进行多维度质量评价, 同时建立含量测定的方法。测定 15 批 DSD 物质基准指纹图谱、指标成分的含量及出膏率, 探究关键质量属性在饮片-水煎液-物质基准的传递规律, 初步建立 DSD 的全过程质量控制体系, 为 DSD 后续复方制剂研究提供前期基础, 并为其他经典名方的物质基准研究提供借鉴。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters 2695 型高效液相色谱仪, 沃特世科技有限公司; KQ-600VDB 型双频数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; C21-SDHCB9E32S

型电磁炉, 浙江苏泊尔股份有限公司; CP225D 型十万分之一电子分析天平, 赛多利斯科学仪器有限公司; Genie U12 型超纯水仪, 上海乐枫生物科技有限公司; LDZ4-0.8 型离心机, 北京医用离心机厂; FD-2D 型冷冻干燥机, 上海比朗仪器制造有限公司。

1.2 材料

饮片信息如表 1 所示, 委托广州采芝林药房进行采购, 经广州白云山和记黄埔中药有限公司匡艳辉制药高级工程师鉴定均属正品。DSD 流浸膏, 批号为 200601S, 由广州白云山和记黄埔中药有限公司提供。对照品阿魏酸 (批号 110773-201915, 质量分数 99.4%)、甘草苷 (批号 11610-201908, 质量分数 95.0%)、苯甲酸 (批号 100419-201703, 质量分数 99.9%)、绿原酸 (批号 110753-202018, 质量分数 96.1%)、芍药苷 (批号 110736-202044, 质量分数 96.8%) 购自中国食品药品检定研究院; 对照品芍药内酯苷 (批号 39011-90-0, 质量分数 90.5%)、甘草酸 (批号 1405-86-3, 质量分数 96.3%) 购自上海诗丹德标准技术服务有限公司。乙腈、乙酸为色谱纯, 德国默克公司; 其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 DSD 物质基准的制备

采用随机数表法对表 1 (表 1 中各味饮片委托广州采芝林大药房进行采购, 均来自道地产区, 每味饮片 3 个产地, 每个产地 5 个批次) 中 15 批次各饮片进行随机组合并排序, 组合信息见表 2。通过本课题组前期考证及度量衡换算, 宋代 1 两折算为今 3 g, 大枣折算为 24 g, 1 升换算为 200 mL, 煎煮时间由原文记载的“煮取 3 升”即可明确, 煎煮时间确定为 1.5 h, 煎煮次数按原文记载为 1 次, 称取处方剂量当归 9 g、桂枝 9 g、白芍 9 g、细辛 9 g、木通 6 g、甘草 6 g、大枣 24 g, 置 3 L 陶瓷罐中, 加 1600 mL^[13]去离子水, 武火 1400 W 煮沸后转文火 600 W 煎煮 1.5 h, 煎煮至 600 mL, 双层 300 目筛网滤过, 即得标准煎液, 均匀取适量药液, 4000 r/min 下离心 (离心半径 5 cm) 10 min, 过 0.45 μm

表 1 DSD 饮片信息

Table 1 DSD pieces information

饮片名称	基原及药用部位	产地	批号
当归	伞形科当归属植物当归 <i>Angelica sinensis</i> (Oliv.) Diels 的干燥根	甘肃省定西市岷县	DG20211001-5
		云南省曲靖市	DG20211101-5
		甘肃省甘南临潭县	DG20211201-5
桂枝	樟科樟属植物肉桂 <i>Cinnamomum cassia</i> Presl. 的干燥嫩枝	广东省罗定市龙湾镇	GZ2101001-5
		广东省肇庆市	GZ2102001-5
		广东省肇庆市德庆县	GZ2103001-5
白芍	毛茛科芍药属植物芍药 <i>Paeonia lactiflora</i> Pall. 的干燥根	安徽省亳州市谯城	BS3911-5
		安徽省亳州市颍泉	BS3921-5
		浙江省磐安县	BS3931-5
细辛	马兜铃科细辛属植物北细辛 <i>Asarum heterotropoides</i> Fr. Schmidt var. <i>mandshuricum</i> (Maxim.) Kitag. 的干燥根	辽宁新宾	XX211301-5
		吉林抚松	XX212301-5
		辽宁桓仁	XX213301-5
木通	木通科木通属植物木通 <i>Akebia quinata</i> (Thunb.) Decne. 的干燥藤茎	安徽	MT011901-5
		陕西	MT012901-5
		安徽	MT013901-5
甘草	豆科甘草属植物甘草 <i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch. 的干燥根及根茎	内蒙古鄂尔多斯市杭锦旗巴拉贡	GC0442101-5
		甘肃省白银市	GC0442201-5
		甘肃省榆中县	GC0442301-5
大枣	鼠李科枣属植物枣 <i>Ziziphus jujuba</i> Mill. 的干燥成熟果实	新疆和田	DZ0101-5
		山西临县	DZ0201-5
		宁夏中宁	DZ0301-5

表 2 15 批 DSD 物质基准样品组合信息

Table 2 Information table of random combination of 15 batches of DSD substances

编号	药材批号						
	当归	桂枝	白芍	细辛	木通	甘草	大枣
S1	DG20211003	GZ2102003	BS3915	XX211302	MT011903	GC0442302	DZ0102
S2	DG20211103	GZ2102002	BS3914	XX212302	MT011902	GC0442202	DZ0301
S3	DG20211003	GZ2102005	BS3914	XX211302	MT012901	GC0442105	DZ0302
S4	DG20211201	GZ2103002	BS3923	XX213304	MT012904	GC0442104	DZ0302
S5	DG20211204	GZ2102005	BS3924	XX211302	MT012902	GC0442304	DZ0303
S6	DG20211102	GZ2103002	BS3912	XX212302	MT013901	GC0442102	DZ0101
S7	DG20211003	GZ2101002	BS3912	XX212303	MT013902	GC0442302	DZ0204
S8	DG20211005	GZ2103002	BS3924	XX212304	MT011903	GC0442305	DZ0203
S9	DG20211205	GZ2103005	BS3924	XX211305	MT012902	GC0442204	DZ0301
S10	DG20211105	GZ2102004	BS3914	XX211304	MT013904	GC0442103	DZ0105
S11	DG20211204	GZ2103003	BS3922	XX211301	MT012905	GC0442205	DZ0104
S12	DG20211101	GZ2102003	BS3934	XX212301	MT013904	GC0442305	DZ0202
S13	DG20211104	GZ2101001	BS3932	XX212305	MT012902	GC0442305	DZ0103
S14	DG20211202	GZ2103004	BS3915	XX212304	MT012901	GC0442103	DZ0102
S15	DG20211104	GZ2101002	BS3933	XX212303	MT013902	GC0442105	DZ0203

微孔滤膜，取续滤液，即得供试品溶液；取标准煎液 50 mL，冷冻干燥，即得 DSD 物质基准。

2.2 DSD 指纹图谱研究

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 ACE Excel 3 C₁₈-AR (150 mm×4.6 mm, 3 μm)；流动相为乙腈-0.2%乙酸水溶液，梯度洗脱：0~18 min, 8%~10%乙腈；18~48 min, 10%~14%乙腈；48~70 min, 14%~17%乙腈；70~85 min, 17%~21%乙腈；85~95 min, 21%~21.5%乙腈；95~135 min, 21.5%~45%乙腈；检测波长 237 nm；体积流量 0.6 mL/min；进样体积 5 μL；柱温 25 ℃。理论塔板数以芍药苷峰计算大于 5000。

2.2.2 混合对照品溶液的制备 分别取绿原酸、芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸、苯甲酸、甘草苷、甘草酸适量，精密称定，加甲醇配制成质量浓度分别为 30.10、167.70、277.50、35.50、42.45、170.40、144.30 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取 DSD 流浸膏 2 g (物质基准 1.25 g)，精密称定，置 50 mL 量瓶中，加水定容，超声处理 20 min，放冷，过 0.45 μm 微孔滤膜，取续滤液为供试品溶液。

2.2.4 指纹图谱方法学考察

(1) 参照峰的选择：指纹图谱中，芍药苷的含量较高，且色谱峰稳定故选择芍药苷 (峰 6) 作为指纹图谱的参照峰，计算指纹图谱中各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。

(2) 精密度试验：取 DSD 流浸膏，按“2.2.3”

项下制备供试品溶液，连续进样 6 次，按“2.2.1”项下色谱条件进行测定，记录色谱图。以芍药苷 (峰 6) 为参照峰，计算各共有峰的相对保留时间及相对峰面积，并计算其 RSD 值。结果表明各共有峰的相对保留时间 RSD 均≤0.32%，相对峰面积 RSD 均≤3.84%，表明仪器精密度良好。

(3) 重复性试验：按“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，连续进样 6 次，按“2.2.1”项下色谱条件进行测定。各共有峰的相对保留时间 RSD 均≤0.53%，相对峰面积 RSD 均≤3.81%，表明该方法重复性良好。

(4) 稳定性试验：取 DSD 流浸膏，按“2.2.3”项下制备供试品溶液，分别在 0、2、4、6、12、24 h 进样，按“2.2.1”项下色谱条件进行测定。各共有峰的相对保留时间 RSD 值均≤0.28%，相对峰面积 RSD 值均≤4.10%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.5 指纹图谱的建立及共有峰归属 按“2.1”项下制备物质基准取 15 批 DSD 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”项下色谱条件进行测定。采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统” (2012 版) 软件对样品指纹图谱进行分析。以样品 S1 的指纹图谱作为参照谱进行指纹匹配 (中位数法，时间窗 0.1 min)，确定了 16 个共有峰，并生成对照指纹图谱 (R)，15 批 DSD 物质基准的 HPLC 指纹图谱叠加见图 1。15 批 DSD 物质基准指纹

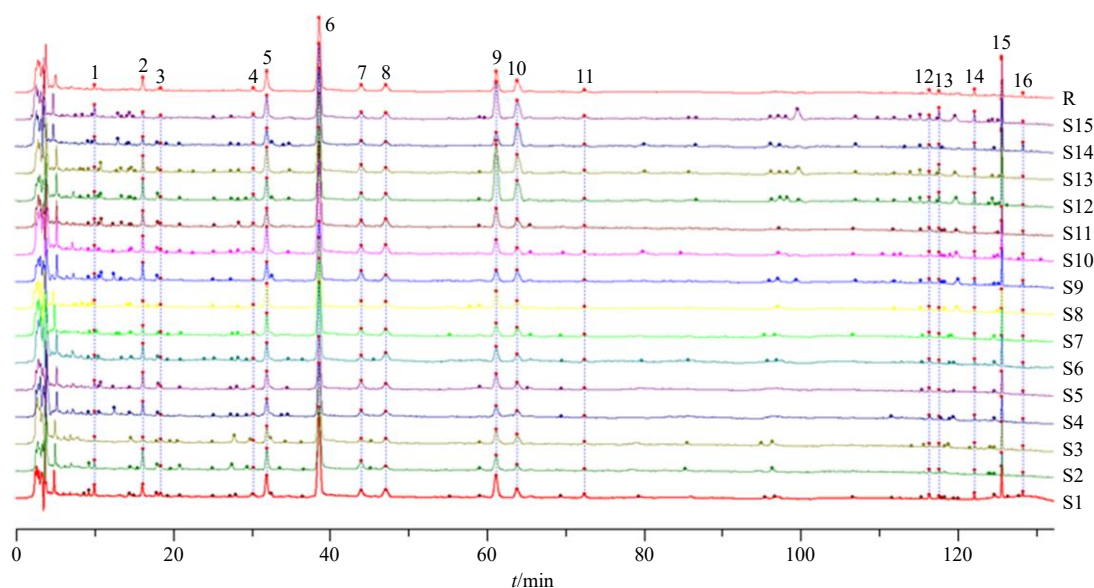


图 1 15 批 DSD 物质基准 HPLC 指纹图谱 (S1~S15) 和对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 HPLC fingerprints (S1—S15) and control fingerprint (R) of 15 batches of DSD substances

图谱与对照图谱的相似度大于 0.90。指认了其中 16 个共有峰,通过与对照品比较,分别为绿原酸(2 号峰)、芍药内酯苷(5 号峰)、芍药苷(6 号峰)、阿魏酸(7 号峰)、苯甲酸(8 号峰)、甘草苷(9 号峰)、甘草酸(15 号峰)。如图 2 所示,其中 1、4、9、10、13~16 号峰来自于甘草;2、3、11 号峰来自于木通;5、6、8、12 来自于白芍。15 批 DSD 物质基准(S1~S15)相似度结果分别为 0.996、0.987、0.990、0.994、0.993、0.991、0.993、0.991、0.989、0.985、0.993、

0.901、0.974、0.991、0.972,相似度均大于 0.90。其中 S12、S13、S15 低于其他样品,说明不同批次药材制备的物质基准样品存在一定的质量差异。

2.2.6 层次聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA)^[14] 采用 SPSS 25.0 数据分析软件,对 15 批样品的共有峰的峰面积进行系统聚类,采用组间连接法,测量区间为平方欧氏距离,聚类结果见图 3,结果发现当欧氏距离约为 8 时,15 批 DSD 物质基准可分为 3 类,即样品 S1~S11、S14 为第 1 类,

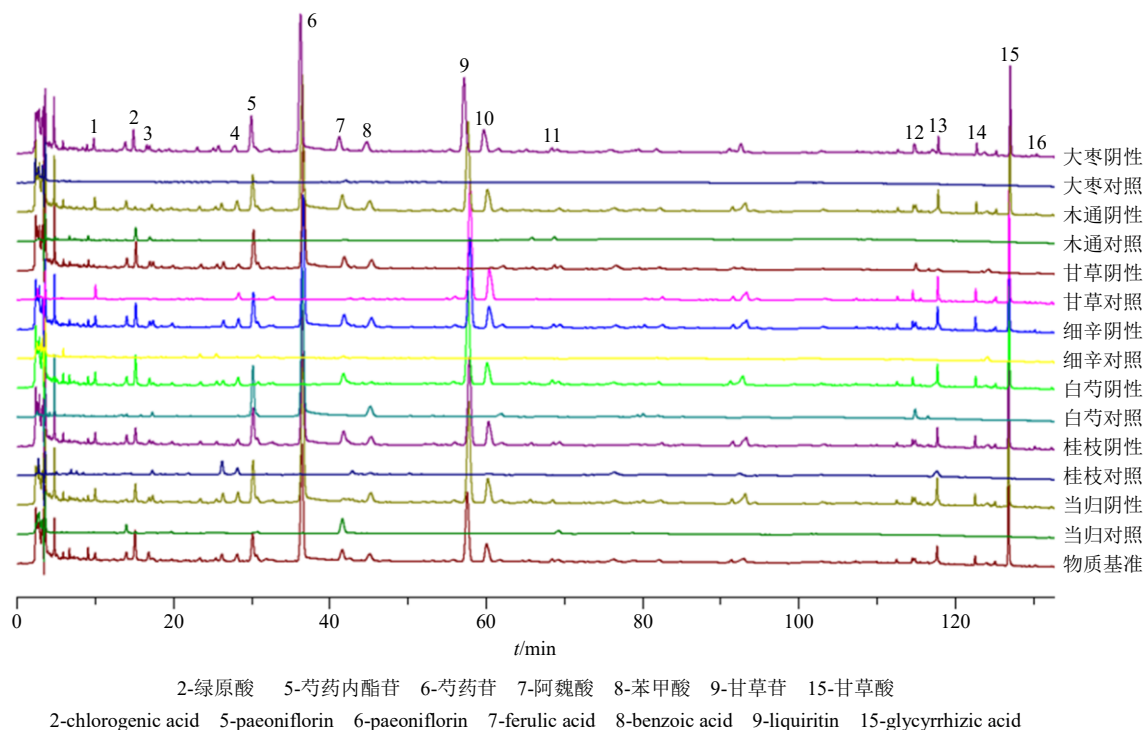


图 2 DSD 物质基准指纹图谱中 16 个特征峰及其归属

Fig. 2 Specific peaks and their attribution in benchmark fingerprints of DSD substances

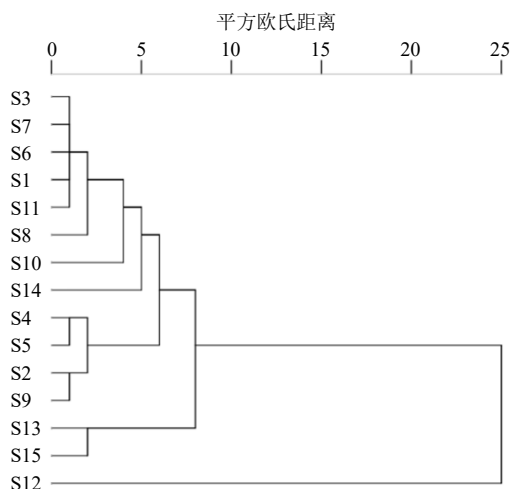


图 3 15 批 DSD 物质基准 HCA 谱系图

Fig. 3 Reference HCA pedigree of 15 batches

样品 S13、S15 为第 2 类, S12 为第 3 类,此结果可与相似度评价结果相互印证。

2.2.7 主成分分析(principal component analysis, PCA) 选择 15 批 DSD 物质基准的 16 个共有峰的峰面积为变量,导入 SIMCA-P+14.1 (Demo) 软件进行 PCA 处理,得分矩阵图见图 4。15 批 DSD 物质基准可分为 3 类,即样品 S1~S11、S14 为第 1 类,样品 S13、S15 为第 2 类, S12 为第 3 类,此结果可与 HCA 结果相互印证。

2.2.8 OPLS-DA 将 15 批 GSD 物质基准的 16 个共有峰的峰面积导入 SIMCA-P+14.1 (Demo) 软件进行 OPLS-DA 处理,得分矩阵图见图 5。结果发现 15 批样品聚为 3 类,结合以变量重要性投影(VIP)值>1 为判定标准,筛选差异组分,见图 6。结果共

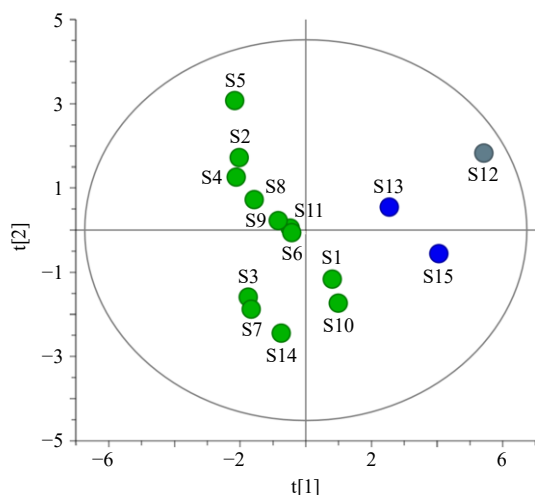


图 4 15 批 DSD 物质基准 PCA 得分矩阵

Fig. 4 PCA scoring plots of 15 batches of substance of DSD substances benchmarks of DSD

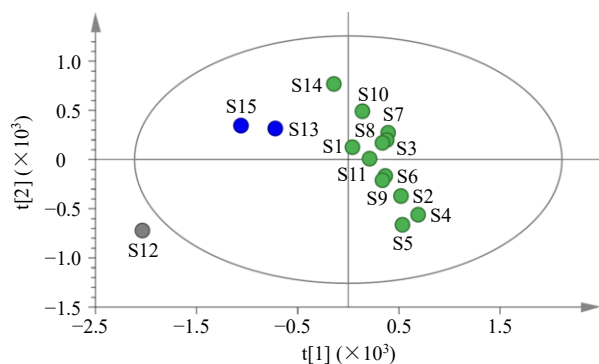


图 5 15 批 DSD 物质基准 OPLS-DA 得分

Fig. 5 OPLS-DA scoring plots of 15 batches of substance benchmarks of DSD

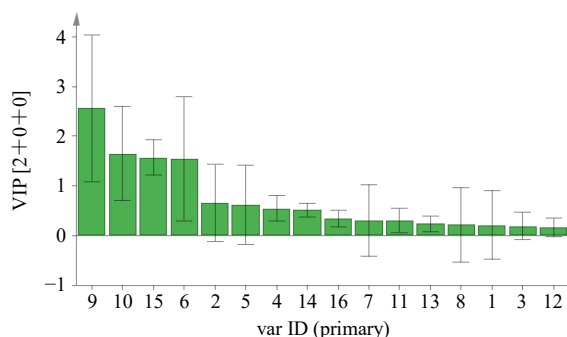


图 6 DSD 物质基准 OPLS-DA 的 VIP 值

Fig. 6 VIP values of OPLS-DA of DSD substance benchmarks

找到了 4 个成分，按 VIP 值大小排序分别为 9（甘草苷）、10、15（甘草酸）、6（芍药苷）号峰。上述 4 个差异成分中 3 个来自甘草，1 个来自白芍，进一步说明严格控制甘草饮片质量是确保 DSD 物质基准质量稳定的关键。

2.3 DSD 物质基准指标成分芍药苷、甘草苷、甘草酸定量测定

2.3.1 色谱条件 同“2.2.1”项下，3 个成分的理论板数均大于 5000，分离度大于 1.5。色谱图见图 7。

2.3.2 混合对照品溶液的制备 同“2.2.2”项下方法制备芍药苷、甘草苷、甘草酸混合对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 同“2.2.3”项下。

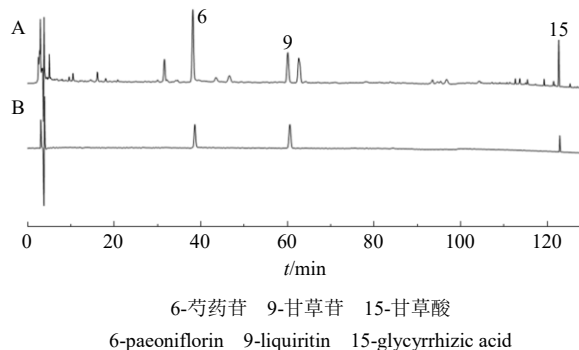


图 7 DSD 样品 (A) 和混合对照品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 7 HPLC of DSD sample (A) and mixed reference substances (B)

2.3.4 方法学考察

(1) 线性关系考察：分别精密吸取适量“2.3.2”项下的混合对照品溶液，加甲醇稀释，得芍药苷质量浓度为 13.88、27.75、55.50、111.00、222.00、277.50 $\mu\text{g/mL}$ ，甘草苷质量浓度为 8.52、17.04、34.08、68.16、136.32、170.40 $\mu\text{g/mL}$ ，甘草酸质量浓度为 7.22、14.43、28.86、57.72、115.44、144.30 $\mu\text{g/mL}$ 的系列混合对照品溶液。取各个质量浓度的混合对照品溶液各 5 μL 注入液相色谱仪，按“2.2.1”项下色谱条件测定各成分的峰面积，以质量浓度为横坐标 (X)，峰面积积分值为纵坐标 (Y) 进行线性回归，得回归方程：芍药苷 $Y=9\,025.82X-1\,653.98$, $r=1.000\,0$ ，线性范围 13.88~277.50 $\mu\text{g/mL}$ ；甘草苷 $Y=17\,790.30X-17\,745.64$, $r=1.000\,0$ ，线性范围 8.52~170.40 $\mu\text{g/mL}$ ；甘草酸 $Y=4\,436.94X-2\,084.58$, $r=1.000\,0$ ，线性范围 7.22~144.30 $\mu\text{g/mL}$ 。结果表明，各成分在各自质量浓度范围内线性关系良好。

(2) 精密性试验：精密吸取中等质量浓度的混合对照品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件连续进样分析 6 次，分别计算峰面积。结果芍药苷、甘草苷和甘草酸峰面积的 RSD 分别为 0.81%、1.00%、1.03%，表明仪器精密性良好。

(3) 稳定性试验：精密吸取“2.3.3”项下方法制备所得的供试品溶液，分别于 0、2、4、6、8、

12、24 h, 精密吸取 5 μ L 供试品溶液并按“2.2.1”项下色谱条件进行测定, 结果芍药苷、甘草苷和甘草酸峰面积的 RSD 分别为 2.55%、2.56%、2.09%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

(4) 重复性试验: 根据“2.3.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 分别精密吸取 5 μ L 供试品溶液并按“2.2.1”项下色谱条件进行测定, 结果流浸膏中芍药苷、甘草苷和甘草酸质量浓度平均值分别为 4.427 9、1.075 6、2.192 8 mg/g, RSD 分别为 2.80%、2.81%、2.87%, 表明该方法重复性良好。

(5) 加样回收率试验: 取 6 份已测定各成分量的流浸膏 1 g, 精密称定, 分别加入芍药苷 4.23 mg、甘草苷 1.11 mg、甘草酸 2.19 mg, 按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液, 分别精密吸取 5 μ L 供试品溶液并按“2.2.1”项下色谱条件进行测定, 计算各成分的平均回收率和 RSD 值, 结果芍药苷、甘草苷和甘草酸的平均加样回收率分别为 98.81%、96.68%、100.75%, RSD 分别为 2.17%、2.33%、1.78%, 表明该方法准确度良好。

2.4 DSD 物质基准指标成分在饮片-水煎液-物质基准之间的量值传递分析

饮片的含量测定方法参考《中国药典》2020 年

版, 选取“2.3”项建立含量测定方法中具有特征性的白芍、甘草中的芍药苷、甘草苷及甘草酸探究其饮片-水煎液-物质基准的量值传递规律, DSD 物质基准水煎液中指标成分的测定按“2.1”项下制备供试品溶液及物质基准。

$$\text{转移率} = \omega m / WM$$

ω 表示物质基准中指标成分的质量分数, m 表示物质基准样品质量, W 表示饮片中有有效成分的质量分数, M 表示处方中的饮片质量

各药味指标成分的含量及从饮片-物质基准转移率结果如表 3 所示, 芍药苷、甘草苷、甘草酸从饮片-物质基准平均转移率分别为 52.94%、48.79%、47.39%。结果见图 8。

2.5 DSD 物质基准制备过程中各药味干膏率传递规律研究

按上述确定的工艺制备 15 批次的 DSD 物质基准样品, 测定其干膏率。干膏率的测定方式为取 100 mL ($n=2$) 提取液或单味药材 105 $^{\circ}\text{C}$ 烘干至恒定质量, 计算公式为干膏率 = $6m/M$, 公式中 $6m$ 表示干膏的质量, M 表示各组称取的饮片量。比较全方的理论干膏率与实际干膏率的转移规律。

结果如图 9 和表 4 所示, 15 批 DSD 物质基准

表 3 白芍及甘草药味指标成分含量及饮片-物质基准转移率

Table 3 Content of medicinal flavor index components and reference transfer rate of decoction pieces and substances of paeoniflorin and glycyrrhizae

物质基	芍药苷				甘草苷				甘草酸			
	饮片/%	水煎液/g	物质基准/g	转移率/%	饮片/%	水煎液/g	物质基准/g	转移率/%	饮片/%	水煎液/g	物质基准/g	转移率/%
S1	3.19	0.159 4	0.159 2	55.44	1.09	0.034 8	0.032 7	49.98	2.78	0.085 1	0.085 3	65.10
S2	3.05	0.172 8	0.131 0	47.73	2.24	0.043 7	0.043 0	32.02	4.17	0.074 9	0.074 2	29.64
S3	2.99	0.159 5	0.149 2	55.42	2.35	0.063 7	0.062 3	44.15	4.32	0.125 3	0.125 1	48.21
S4	3.23	0.151 0	0.150 9	51.90	2.25	0.063 3	0.046 9	34.76	4.47	0.129 3	0.123 5	46.05
S5	3.03	0.145 3	0.141 5	51.89	1.02	0.048 1	0.045 7	74.62	2.81	0.089 4	0.081 3	48.21
S6	3.11	0.155 2	0.151 3	54.01	2.32	0.063 5	0.061 5	44.21	4.35	0.132 3	0.130 6	50.04
S7	2.67	0.173 9	0.171 7	71.44	1.00	0.038 1	0.037 7	62.85	2.80	0.093 7	0.090 9	54.05
S8	3.24	0.168 7	0.165 9	56.87	1.02	0.036 3	0.034 5	56.31	2.65	0.090 3	0.086 7	54.47
S9	3.02	0.144 3	0.140 1	51.52	2.19	0.055 2	0.053 1	40.44	4.13	0.093 9	0.090 0	36.30
S10	3.11	0.146 1	0.144 9	51.72	2.21	0.053 9	0.053 7	40.46	4.30	0.115 4	0.111 1	43.05
S11	3.07	0.147 0	0.143 2	51.80	2.18	0.046 9	0.046 8	35.82	4.12	0.089 8	0.084 9	34.33
S12	3.00	0.126 3	0.120 5	44.61	1.03	0.055 4	0.032 5	52.58	2.50	0.113 2	0.074 2	44.15
S13	3.23	0.140 5	0.130 6	44.89	1.05	0.050 4	0.049 5	78.49	2.70	0.104 2	0.103 8	64.03
S14	3.19	0.154 3	0.151 4	52.69	2.29	0.057 9	0.054 4	39.53	4.11	0.125 4	0.112 9	45.75
S15	3.01	0.141 5	0.141 2	52.13	2.20	0.064 5	0.060 3	45.66	4.29	0.138 1	0.122 2	47.46
均值	3.08	0.152 4	0.146 1	52.94	1.76	0.051 7	0.047 6	48.79	3.63	0.106 7	0.099 8	47.39

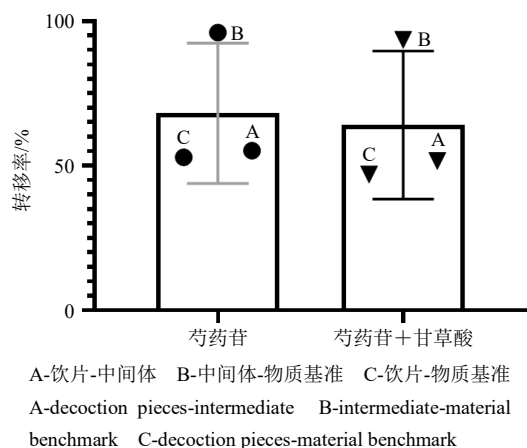


图 8 DSD 物质基准指标成分转移率

Fig. 8 Component transfer rate of DSD material benchmark index

全方理论干膏率为 24.26%~26.88%，实际全方干膏率为 19.13%~24.58%，干膏率的平均转移率为 86.40%。

理论干膏率=Σ(单味药干膏率×单味药生药量)/全方生药量

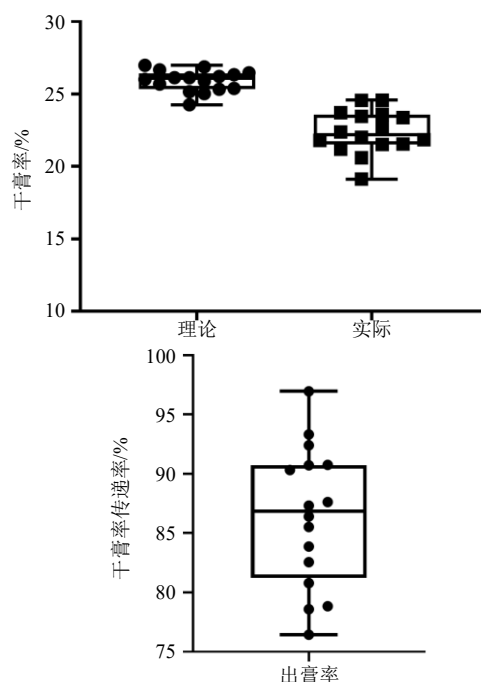


图 9 DSD 物质基准干膏率及传递率分析

Fig. 9 Analysis of DSD material standard dry paste rate and transmissibility

表 4 15 批 DSD 单味药及物质基准干膏率及传递率结果

Table 4 Results of 15 batches of DSD single drug and substance reference dry paste rate and transmissibility

批号	干膏率%								传递率/%	
	当归	桂枝	白芍	细辛	木通	甘草	大枣	理论	实际	
S1	49.54	9.49	21.21	14.66	8.96	25.76	36.38	26.88	21.19	78.84
S2	51.23	9.80	20.53	13.22	7.56	23.20	35.44	26.22	20.61	78.59
S3	48.45	8.70	19.80	14.45	8.50	24.79	32.90	25.16	21.52	85.52
S4	49.87	7.90	22.50	13.67	8.73	22.98	35.25	26.13	23.71	90.73
S5	47.99	9.30	21.44	14.03	7.98	24.78	32.11	25.03	19.13	76.44
S6	50.02	9.25	23.70	12.86	8.60	25.65	36.45	26.98	21.80	80.79
S7	47.90	9.02	19.60	13.66	8.03	24.33	37.12	26.34	24.58	93.32
S8	51.76	8.45	18.68	14.78	7.56	26.88	34.64	26.13	23.60	90.32
S9	48.23	7.88	16.98	14.99	6.78	23.56	32.18	24.26	22.02	90.75
S10	46.80	9.43	21.66	11.44	7.49	25.65	37.64	26.47	21.85	82.56
S11	45.22	7.98	20.78	13.89	8.29	24.33	35.97	25.69	21.55	83.88
S12	46.46	8.55	20.09	15.02	9.45	25.03	33.74	25.39	23.46	92.41
S13	49.22	8.30	19.67	12.66	8.67	23.78	38.20	26.67	23.37	87.62
S14	48.67	9.79	18.45	14.67	5.78	24.14	36.12	26.01	22.71	87.32
S15	48.55	9.33	17.99	14.53	9.47	23.45	33.87	25.33	24.56	96.95
均值	48.66	8.88	20.21	13.90	8.12	24.55	35.21	25.91	22.38	86.40

3 讨论

DSD 方中具有当归、桂枝、芍药、细辛、甘草(炙)、通草、大枣(擘)7 味药，方中桂枝辛温，温经散寒以通脉，与当归共为君药；白芍、细辛共为

臣药，助桂枝温通血脉^[15]。

原文记载的芍药、通草、细辛和甘草均为多基原药材，经过前期文献研究中进行的本草考证，并结合《伤寒论》所处历史时期，基本确定 DSD 中所

用的芍药药材基原为毛茛科芍药属植物芍药 *P. lactiflora* Pall. 的干燥根；通草药材基原为木通科木通属植物木通 *A. quinata* (Thunb.) Decne、三叶木通 *A. trifoliata* (Thunb.) Koidz. 的干燥藤茎；细辛药材基原为马兜铃科细辛属植物北细辛 *A. heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag. 的干燥根；甘草药材基原为豆科甘草属植物甘草 *G. uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎。其他 3 味药所用基原均为《中国药典》2020 年版中各自药材基原，当归为伞形科当归属植物当归 *A. sinensis* (Oliv.) Diels. 干燥根，桂枝为樟科樟属植物肉桂 *C. cassia* Presl. 干燥嫩枝，大枣为鼠李科枣属植物枣 *Z. jujuba* Mill. 干燥成熟果实。方中甘草原文记载为“炙甘草”，经考证该炮制品为炒甘草，炮制方法取甘草片，照清炒法（炮制通则）炒至深黄色^[16]。

课题组在建立指纹图谱和含量测定方法时，对比了 4.6 μm 及 3 μm 不同粒径色谱柱，3 μm 粒径的色谱柱分离度更好，因此，最终选择采用粒径为 3 μm 的色谱柱，建立复杂中药复方制剂的含量测定方法，在流动相体积流量筛选过程中，由于色谱柱的内填物粒径较小，为 3 μm ，且色谱柱为 150 mm 的短柱，因此选用 0.6 mL/min 的体积流量，从而避免高体积流量导致的高压对高效液相色谱仪器及色谱柱的损耗。

采用了 Agilent 1260 和 Waters 2695 高效液相色谱仪测定供试品溶液中各成分的含量，结果发现各成分含量差异不大；采用 ACE Excel 3 C₁₈-AR (150 mm $\times$ 4.6 mm, 3 μm)、Titank C₁₈ (150 mm $\times$ 4.6 mm, 3 μm)、SuperLu C₁₈ (150 mm $\times$ 4.6 mm, 3 μm) 3 种品牌的色谱柱测定各成分含量、分离度、理论塔板数及拖尾因子，结果发现各成分含量差异不大，分离度良好，理论塔板数较高，拖尾因子符合要求，说明该含量测定方法的耐用性良好。

在供试品溶液的制备过程中，考察了水和不同体积分数的甲醇超声提取对各成分含量的影响，结果发现各成分含量差异不大，其中水提取的供试品溶液较为澄清且重复性较好，因此，选择水作为其提取溶剂以最大程度保留 DSD 的物质概貌。课题组在前期建立色谱条件时，将桂皮醛纳入含量测定的范围中，但由于其性质不稳定且极性小在水中的提取率较低，最终在物质基准中的含量仅为 0.01 mg/g，不建议对其进行含量检测，后续研究可考虑进行薄层色谱的鉴别。

在结合 3 种化学模式进行 15 批次 DSD 物质基准多维度质量差异分析时，结果表明造成差异的主要原因来源于甘草中的甘草苷（峰 9），其次是结合课题组后期质谱分析确定的芹糖甘草苷（峰 10）及甘草酸（峰 15），其原因可能是由于甘草不同部位对应含量不均匀而导致的差异^[17]，此外，甘草不同产地的含量也存在一定差异，甘草中总皂苷、总黄酮和甘草酸含量较高的经度区间均在 95°0′~99°59′和 104°0′~118°59′，地理位置上这 2 个点分别处于新疆与甘肃的交界、内蒙古与吉林的交界^[18]，经典名方开发过程中建议采用道地产区的优质药材并严格按照饮片部位、大小等进行分类以确保物质基准的质量稳定性。

通过开展指纹图谱研究，共指认了 16 个共有峰，15 批物质基准的相似度大于 0.90。同时指认了绿原酸、芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸、苯甲酸、甘草苷、甘草酸 7 个成分，15 批物质基准中芍药苷、甘草苷、甘草酸的平均质量分数分别为 8.267 8、2.533 3、5.160 5 mg/g，其中 15 批物质基准芍药苷、甘草酸的质量分数均在均值的 70%~130%，甘草苷含量范围为 2.56~3.35 mg/g。芍药苷、甘草苷和甘草酸质量分数均大于 1 mg/g，可作为含量测定指标，探究量值传递规律。

经典名方物质基准的制备工艺主要包括煎煮、滤过、干燥等工艺，本课题组前期通过考察煎煮工艺过程中所用的加热源、煎煮容器、加热火力、是否浸泡、过滤和干燥方法，确定了物质基准制备工艺的各项参数。以确定的工艺制备 15 批次的物质基准，从指标成分的含量、特征图谱、干膏率 3 个方面开展质量相关研究，拟从多个角度分析并阐述制备过程中的质量变化规律探究饮片-中间体-物质基准的量值传递规律，其中芍药苷、甘草苷、甘草酸从饮片-中间体的传递率接近 50%，证明水溶性成分在制备过程中转移率高。在分析 15 批次 DSD 物质基准干膏率时，干膏率均在均值的 $\pm 10\%$ 以内，但实际干膏率要低于理论干膏率的数值，其原因可能是由于单味药进行煎煮时其吸水量要大于全方进行煎煮时的吸水量，因此理论干膏率的数值要大于实际值^[19]。

本实验建立 DSD 指纹图谱及含量测定方法，从饮片入手探究饮片-中间体-物质基准的量值传递规律，证明 DSD 物质基准在制备过程中其指标成分的含量、指纹图谱相似性及干膏率均稳定。

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: 950.
- [2] Huang H M, Wu J X, Lu R G, *et al.* Dynamic urinary metabolomics analysis based on UHPLC-Q-TOF/MS to investigate the potential biomarkers of blood stasis syndrome and the effects of Danggui Sini Decoction [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 179: 112986.
- [3] 胡欣欣, 孙云, 马大正, 等. 当归四逆汤加味治疗血虚寒凝型原发性痛经的临床观察 [J]. 中国医药导报, 2022, 19(7): 132-136.
- [4] 范卫闯, 吕立桃. 当归四逆汤对类风湿性关节炎模型大鼠炎症因子表达及 TLR/Beclin-1 信号通路的影响 [J]. 中药与临床, 2020, 11(2): 27-30.
- [5] 王多德, 席孝萍, 刘吉宗, 等. 当归四逆汤治疗阴寒凝滞型冠心病不稳定性心绞痛疗效观察 [J]. 西部中医药, 2021, 34(5): 120-121.
- [6] Ding R, Wang Y, Zhu J P, *et al.* Danggui Sini Decoction protects against oxaliplatin-induced peripheral neuropathy in rats [J]. *J Integr Neurosci*, 2020, 19(4): 663-671.
- [7] 王文达. 当归四逆汤加减治疗雷诺病临床观察 [J]. 新中医, 2017, 49(12): 44-45.
- [8] 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]. [2020-06-28]. <http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2018-04-16/7107.html>.
- [9] 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]. [2018-05-29]. <http://www.nmpa.gov.cn/WS04/CL2093/228247.html>.
- [10] 国家药品监督管理局. 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) [EB/OL]. [2019-03-22]. <http://www.nmpa.gov.cn/WS04/CL2101/335926.html>.
- [11] 罗倩, 任一杰, 张启立, 等. 当归四逆汤颗粒质量标准的研究 [J]. 中成药, 2017, 39(10): 2196-2199.
- [12] 苗家燕, 罗赣, 高晓燕, 等. 经典名方当归四逆汤物质基准的关键质量属性研究 [J]. 分析测试学报, 2021, 40(5): 740-746.
- [13] 周丽萍, 孙宇博, 范欣生. 经典名方厚朴麻黄汤古代文献研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2022, 38(6): 554-558.
- [14] 管咏梅, 万鑫浩, 吴文婷, 等. 经典名方桂枝加葛根汤标准汤剂 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2021, 52(18): 5535-5542.
- [15] 夏金鑫, 梅茜, 郭爽, 等. 基于指纹图谱和网络药理学对当归四逆汤中桂枝的 Q-marker 预测分析 [J]. 中草药, 2020, 51(10): 2634-2641.
- [16] 河南省食品药品监督管理局. 河南省中药饮片炮制规范 [M]. 郑州: 河南人民出版社, 2005: 35.
- [17] 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.
- [18] 罗琳, 张豆豆, 李文斌, 等. 不同产地栽培甘草药用部位性状和质量的比较分析 [J]. 中药材, 2018, 41(4): 829-833.
- [19] 刘雨涵, 关雅戈, 韩晨, 等. 经典名方桃核承气汤物质基准关键质量属性传递规律分析 [J]. 中草药, 2022, 53(7): 2011-2021.

[责任编辑 郑礼胜]