

经典名方三化汤基准样品量值传递研究

刘明松¹, 邓亚伟¹, 忻晓东¹, 梁董茜¹, 李春花^{1,2*}, 刘晓明^{3*}

1. 河北中医学院药学院, 河北 石家庄 050200

2. 河北省中药组方制剂技术创新中心, 河北 石家庄 050090

3. 河北省药品审评中心, 河北 石家庄 050090

摘要: 目的 阐明三化汤基准样品的关键质量属性, 建立其特征图谱并测定紫花前胡苷、柚皮苷、新橙皮苷、5种游离蒽醌、和厚朴酚与厚朴酚等指标成分, 探究三化汤饮片-基准样品量值传递规律, 为评价三化汤制剂奠定物质基础。方法 通过文献考证, 制备15批三化汤基准样品, 采用UPLC建立特征图谱, 计算其相似度并确定共有峰归属, 结合指标成分及干膏转移率对基准样品进行量值传递分析。结果 建立的15批三化汤基准样品相似度均大于0.98, 特征图谱相似度良好, 共指认26个共有峰, 其中5个来自厚朴, 6个来自枳实, 5个来自羌活, 10个来自大黄; 指标成分紫花前胡苷、柚皮苷、新橙皮苷、厚朴酚与和厚朴酚、游离总蒽醌从饮片到基准样品平均转移率分别为(28.08±5.28)%、(45.07±5.35)%、(41.03±4.91)%、(3.32±0.92)%、(16.54±3.57)%, 全处方干膏转移率为64.43%~76.39%。结论 采用特征图谱结合多指标成分含量测定及出膏率等评价指标对经典名方三化汤基准样品进行了量值传递综合考察, 为三化汤的质量控制和制剂开发提供了科学依据。

关键词: 经典名方; 三化汤; 基准样品; 量值传递; 紫丁香苷; 紫花前胡苷; 芸香柚皮苷; 柚皮苷; 橙皮苷; 新橙皮苷; 芦荟大黄素; 大黄酸; 大黄素; 和厚朴酚; 异欧前胡素; 厚朴酚; 大黄酚; 大黄素甲醚

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)11-3501-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.11.012

Study on quality value transmitting of benchmark samples of classical prescription Sanhua Decoction

LIU Ming-song¹, DENG Ya-wei¹, XIN Xiao-dong¹, LIANG Dong-qian¹, LI Chun-hua^{1,2}, LIU Xiao-ming³

1. College of Pharmacy, Hebei College of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China

2. Hebei Higher Education Institute Applied Technology Research Center on TCM Formula Preparation, Shijiazhuang 050090, China

3. Hebei Center for Drug Evaluation, Shijiazhuang 050090, China

Abstract: Objective To elucidate the key quality attributes of the benchmark samples of Sanhua Decoction (三化汤), establish its characteristic chromatogram and determine the content of index components, including nodakenin, naringin, neohesperidin, five free anthraquinones, and magnolol and honokiol. The study explores the rules for the transfer of the Sanhua Decoction herbal pieces - benchmark sample, laying a material foundation for the later evaluation of Sanhua Decoction formulations. **Methods** Through literature research, 15 batches of Sanhua Decoction reference samples were prepared. UPLC was used to establish a characteristic profile and calculate the similarity, and the common peaks were identified. The transfer analysis of the reference sample was conducted through the content determination of the index components and the transfer rate of the dry paste. **Results** The similarity of the 15 batches of Sanhua Decoction benchmark sample established was greater than 0.98, and the characteristic profiles were similar, with 26 common characteristic peaks identified, including five from Houpo (*Magnoliae Officinalis Cortex*), six from Zhishi (*Aurantii Fructus Immaturus*), five from Qianghuo (*Notopterygii Rhizoma et Radix*), and 10 from Dahuang (*Rhei Radix et Rhizoma*). The average transfer

收稿日期: 2022-12-17

基金项目: 河北省省级科技计划资助(19272502D); 2022年省属高校基本科研业务费专项项目(YXTD2022005)

作者简介: 刘明松, 硕士研究生, 主要从事中药制剂新技术、新方法研究。Tel: 15331485507 E-mail: 2786964750@qq.com

*通信作者: 李春花, 教授, 博士生导师, 主要从事中药制剂新技术、新方法研究。Tel: 13803369966 E-mail: 13803369966@163.com

刘晓明, 副主任药师, 主要从事药品技术审评。E-mail: lxmbby2008@163.com

rates of the index components nodakenin, naringenin, neohesperidin, honokiol and magnolol, and total free anthraquinones from the decoction to the reference sample were $(28.08 \pm 5.28)\%$, $(45.07 \pm 5.35)\%$, $(41.03 \pm 4.91)\%$, $(3.32 \pm 0.92)\%$, and $(16.54 \pm 3.57)\%$, respectively. The transfer rate of the whole formula dry paste ranged from 64.43% to 76.39%. **Conclusion** This study comprehensively investigated the transfer of the Sanhua Decoction benchmark samples using a characteristic chromatogram combined with content determination and dry paste rate evaluation, providing a scientific basis for the quality control and subsequent formulation development of Sanhua Decoction.

Key words: classic prescriptions; Sanhua Decoction; benchmark sample; quality value transmitting; syringin; nodakenin; narirutin; naringenin; hesperidin; neohesperidin; aloe rhodopsin; rhein; emodin; honokiol; isoimperatorin; magnolol; chrysophanic acid; physcion

三化汤 (Sanhua Decoction) 为国家中医药管理局公布的《古代经典名方目录 (第一批)》第 55 首, 来源于金·刘完素《素问病机气宜保命集》卷中^[1]。原文记载:“中风外有六经之形证, 先以加减续命汤, 随证治之, 内有便溺之阻格, 复以三化汤主之。”可见三化汤治疗中风临床应用已久^[2]。全方由大黄、枳实、羌活、厚朴 4 味药组成, 君药大黄与枳实、厚朴 3 药合用, 泻热祛瘀、通腹降气, 再加羌活祛风解表, 有升有降、表里结合, 共治内风外风, 是中医治疗中风的经典方^[3-5]。

目前, 有关三化汤的研究多集中于临床、药理和含量测定等方面, 对其量值传递研究较少^[6]。在国家药品监督管理局药品审评中心组织起草的《按古代经典名方目录管理的中药复方制剂药学研究技术指导原则 (试行)》要求中明确指出, 经典名方基准样品的关键质量属性 (critical quality attributes, CQAs) 的研究应包括特征图谱、指标成分含量及干膏率等关键信息^[7-8]。本研究在文献考证结合煎煮工艺结果的基础上确定三化汤制备工艺, 制备了 15 批基准样品煎液, 通过构建其特征图谱并对指标性成分进行含量测定, 确定其含量及转移率范围, 并结合出膏率分析饮片-基准样品量值传递规律, 为其质量研究提供科学依据, 也为三化汤中药复方制剂进一步研究提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters H-Class 型超高效液相色谱仪、Empower 工作站, 美国 Waters 公司; YP2002 型电子天平, 上海津平科学仪器有限公司; D5.5-L 型煎药壶, 潮州市潮安区康雅顺电器有限公司; Milli-QReference 超纯水系统, 法国 Millipore 公司; KQ500D 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; HCP-1000A 型高速多功能粉碎机, 浙江省永康市金穗机械制造有限公司; HWS-28 型恒温水浴锅、DHG-9030A 型电热鼓

风干燥箱, 上海一恒科学仪器有限公司。

1.2 试药

对照品厚朴酚 (批号 PS012117, 质量分数 $\geq 98.5\%$)、紫花前胡苷 (批号 PS010688, 质量分数 $\geq 99.5\%$)、紫丁香苷 (批号 PS012100, 质量分数 99.86%)、柚皮苷 (批号 PS012062, 质量分数 $\geq 99.5\%$)、新橙皮苷 (批号 PS011239, 质量分数 99.54%)、橙皮苷 (批号 PS011588, 质量分数 99.54%)、芸香柚皮苷 (PS012543, 质量分数 $\geq 98.5\%$), 均购自成都普斯生物科技股份有限公司; 对照品大黄酚 (批号 20120320)、芦荟大黄素 (批号 20120320), 质量分数均 $\geq 98\%$, 购自上海源叶生物科技有限公司; 对照品和厚朴酚 (批号 MUST-20032205, 质量分数 $> 98\%$)、大黄酸 (批号 MUST-11032801, 质量分数 $> 98\%$)、大黄素 (批号 MUST-19100810, 质量分数 $\geq 98\%$), 购自成都曼思特生物科技有限公司。甲醇, 色谱级, 赛默飞世尔科技有限公司; 甲酸, 色谱级, 天津大茂化学试剂厂; 三氯甲烷, 天津大茂化学试剂厂; 乙腈, 色谱级, 天津市康科德科技有限公司。

不同产地及批号饮片见表 1, 经河北中医学院药学院段绪红副教授鉴定, 大黄为蓼科大黄属植物药用大黄 *Rheum officinale* Baill. 的干燥根和根茎, 枳实为芸香科柑橘属植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 的干燥幼果, 羌活为伞形科羌活属植物羌活 *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang 的干燥根茎和根, 厚朴为木兰科厚朴属植物厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. 的干燥干皮及枝皮, 以上均为符合《中国药典》2020 年版炮制要求的饮片。通过随机数表法对表 1 中不同批次三化汤饮片进行随机组合, 结果见表 2。

2 方法与结果

2.1 三化汤基准样品的制备

三化汤原文记载“每服三两, 水三升, 煎至一

表1 三化汤饮片来源信息

Table 1 Source information of Sanhua Decoction herbal pieces

饮片	产地	批号	来源	饮片	产地	批号	来源
大黄	四川阿坝	22022201~22022203	国药乐仁堂河北药业有限公司	厚朴	四川都江堰	22022001	国药乐仁堂河北药业有限公司
	四川甘孜	2012070	天津尚药堂制药有限公司		四川	2203026-1	天津尚药堂制药有限公司
	四川雅安	220102~220105	河北美威药业股份有限公司		四川平武	220102~220108	河北美威药业股份有限公司
	甘肃礼县	200701	河北药兴药业有限公司		四川	2201153	安徽普仁中药饮片有限公司
	甘肃陇南	2112063	安徽普仁中药饮片有限公司		四川绵阳	220501~220505	安国市伊康药业有限公司
	四川	211001~211005	河北安国振宇药业有限公司	枳实	湖南益阳	21052101	国药乐仁堂河北药业有限公司
羌活	四川理县	21081001	国药乐仁堂河北药业有限公司		江西	2007049~2007054	天津尚药堂制药有限公司
	四川阿坝	Z-2012049-3	天津尚药堂制药有限公司		江西赣州	201201~201206	河北美威药业股份有限公司
	四川	210901	河北美威药业股份有限公司		江西樟树	2109231	安徽普仁中药饮片有限公司
	四川理县	2201181~2201184	安徽普仁中药饮片有限公司		江西	220301~220302	河北安国振宇药业有限公司
	陕西	220101~220108	河北安国振宇药业有限公司				

表2 三化汤随机组合

Table 2 Random combination table of Sanhua Decoction

批号	大黄	羌活	厚朴	枳实	批号	大黄	羌活	厚朴	枳实	批号	大黄	羌活	厚朴	枳实
S1	2012070	Z-2012049-3	22022001	2109231	S6	2112063	220104	220104	220302	S11	211002	220107	220504	2007054
S2	2112063	220101	220102	2007049	S7	211001	220106	220105	2007052	S12	2112063	2201181	220502	2007049
S3	22022201	220103	220103	2007050	S8	211003	2201181	220106	21052101	S13	220104	220105	220107	2007053
S4	22022202	21081001	220103	2007051	S9	2210105	2201182	220501	201205	S14	211005	2201183	220505	201201
S5	200701	220102	2203026-1	220301	S10	211004	2201185	220503	201203	S15	22022203	220108	220101	201202

升半，终日服之。”经文献考证，确定处方中各饮片所用剂量及加水量，最终明确煎煮工艺。确定全方为厚朴、大黄、枳实、羌活各 30 g，粉碎过 10 目筛，加纯水 2100 mL，浸泡 0.5 h，开盖，武火煮沸后，保持文火（500 W）微沸状态约 90 min，200 目滤网滤过，滤液放凉，调整体积至 1050 mL，即得三化汤基准样品。同法制备三化汤各单味饮片及缺大黄、缺枳实、缺厚朴、缺羌活的阴性样品溶液。

2.2 三化汤基准样品特征图谱的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Acquity UPLC® BEH C₁₈ 柱（100 mm×2.1 mm, 1.7 μm）；流动相为乙腈-0.1% 甲酸水溶液，梯度洗脱：0~5 min, 10%~13%乙腈；5~11 min, 13%~17%乙腈；11~31 min, 17%~25%乙腈；31~32 min, 25%~29%乙腈；32~40 min, 29%~34%乙腈；40~43 min, 34%~47%乙腈；43~55 min, 47%~75%乙腈；体积流量 0.2 mL/min；进样体积 2 μL；柱温 35 °C；检测波长 255 nm。三化汤基准样品 UPLC 图见图 1-A，混合对照品图见图 1-B。

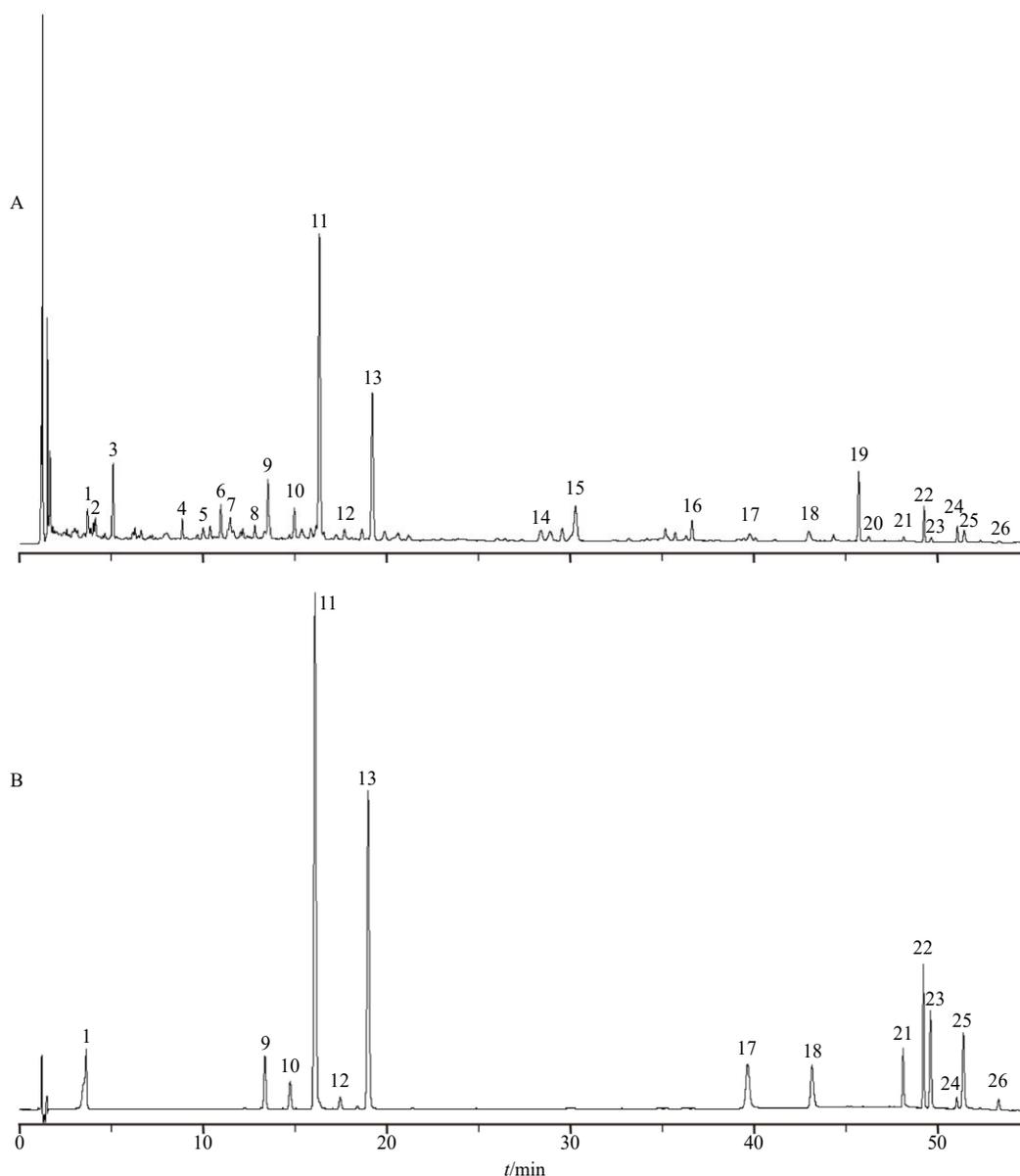
2.2.2 供试品溶液的制备 精密吸取“2.1”项制备

的煎液 2 mL，甲醇定容至 10 mL 量瓶中，摇匀，静置，取上清液过 0.22 μm 滤膜，即得供试品溶液。

2.2.3 对照品溶液的制备 分别取异欧前胡素、大黄酸、大黄素、大黄酚、和厚朴酚、厚朴酚、芦荟大黄素、大黄素甲醚、紫丁香苷、紫花前胡苷、柚皮苷、橙皮苷、芸香柚皮苷和新橙皮苷对照品适量，精密称定，甲醇定容，制成质量浓度为 25.21、15.25、16.11、19.13、17.29、18.22、16.34、12.31、42.11、72.08、210.64、36.24、45.62、171.97 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.4 精密度考察 取 S1 号供试品溶液，按“2.2.2”项下方法制备，按“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，色谱图中新橙皮苷（13 号峰）保留时间适中且峰形较好、分离度高，因此以新橙皮苷为参照峰，计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积，结果显示各共有峰相对保留时间的 RSD 均<0.5%，相对峰面积的 RSD 均<1.5%，表明仪器精密度良好。

2.2.5 重复性考察 取同一批三化汤基准样品，平行制备 6 份供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进样，以新橙皮苷（13 号峰）为参照峰，计算各共



1-紫丁香苷 9-紫花前胡苷 10-芸香柚皮苷 11-柚皮苷 12-橙皮苷 13-新橙皮苷 17-芦荟大黄素 18-大黄酸 21-大黄素 22-和厚朴酚
23-异欧前胡素 24-厚朴酚 25-大黄酚 26-大黄素甲醚
1-syringin 9-nodakenin 10-narirutin 11-naringenin 12-hesperidin 13-neohesperidin 17-aloe rhodopsin 18-rhein 21-emodin 22-honokiol
23-isoimperatorin 24-magnolol 25-chrysophanic acid 26-physcion

图1 三化汤基准样品的UPLC图谱(A)和对照品图谱(B)

Fig. 1 UPLC chromatogram (A) and comparator chromatogram (B) of substance benchmarks in Sanhua Decoction

有峰相对保留时间和相对峰面积,结果显示各共有峰相对保留时间的RSD均 $<0.8\%$,相对峰面积的RSD均 $<1.8\%$,表明该方法重复性好。

2.2.6 稳定性考察 取同一供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件,分别于制样后0、2、4、8、12、24 h进样,以新橙皮苷(13号峰)为参照峰,计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积,结果显示,各共有峰相对保留时间的RSD均 $<0.9\%$,相对峰面积的RSD均 $<2.6\%$,表明供试品溶液在24 h内稳

定性良好。

2.3 三化汤特征图谱评价及饮片-基准样品量值传递关系研究

2.3.1 基准样品相似度评价 将表2不同批次饮片组合按“2.2.2”项制备方法制备15批三化汤基准样品供试品溶液,按“2.2.1”项色谱条件测定,记录色谱图。将S1~S15批基准样品特征图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)”生成叠加图(图2),以S1为参照图谱,时间窗宽度0.1 s,

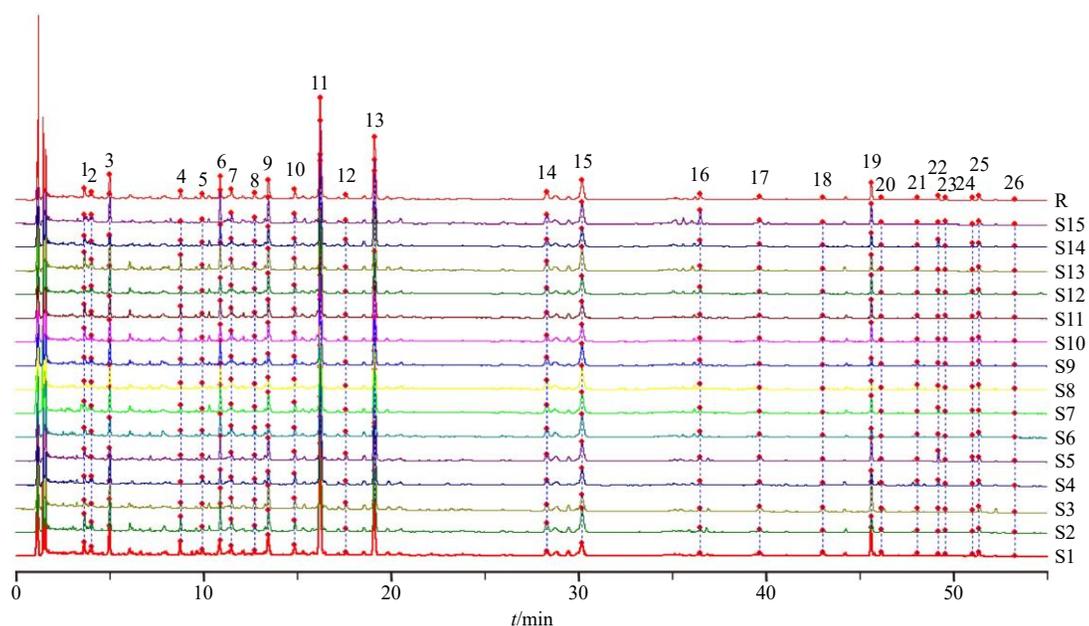


图2 15批三化汤基准样品特征图谱

Fig. 2 Characteristic chromatogram of substance benchmarks in 15 batches of Sanhua Decoction

设置中位数法, Marker 峰匹配, 并生成对照图谱 (R), S1~S15 批基准样品相似度结果分别为 0.996、0.981、0.988、0.994、0.985、0.997、0.993、0.995、0.995、0.998、0.987、0.994、0.991、0.997、0.984, 可见, 各批次三化汤基准样品特征图谱相似度均大于 0.98。

2.3.2 特征峰归属 按“2.2.2”项方法制备各单味饮片和阴性供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 记录色谱图。通过基准样品与各单味饮片(图

3) 及阴性供试品图谱(图4)比对, 将各特征峰进行归属, 全处方共归属 26 个特征峰, 其中峰 6、7、14、15、16、17 (芦荟大黄素)、18 (大黄酸)、21 (大黄素)、25 (大黄酚)、26 (大黄素甲醚) 归属于大黄; 峰 1、2、4、22 (和厚朴酚)、24 (厚朴酚) 归属于厚朴; 峰 3、8、10 (芸香柚皮苷)、11 (柚皮苷)、12 (橙皮苷)、13 (新橙皮苷) 归属于枳实; 峰 5、9 (紫花前胡苷)、19、20、23 (异欧前胡素) 归属于羌活。

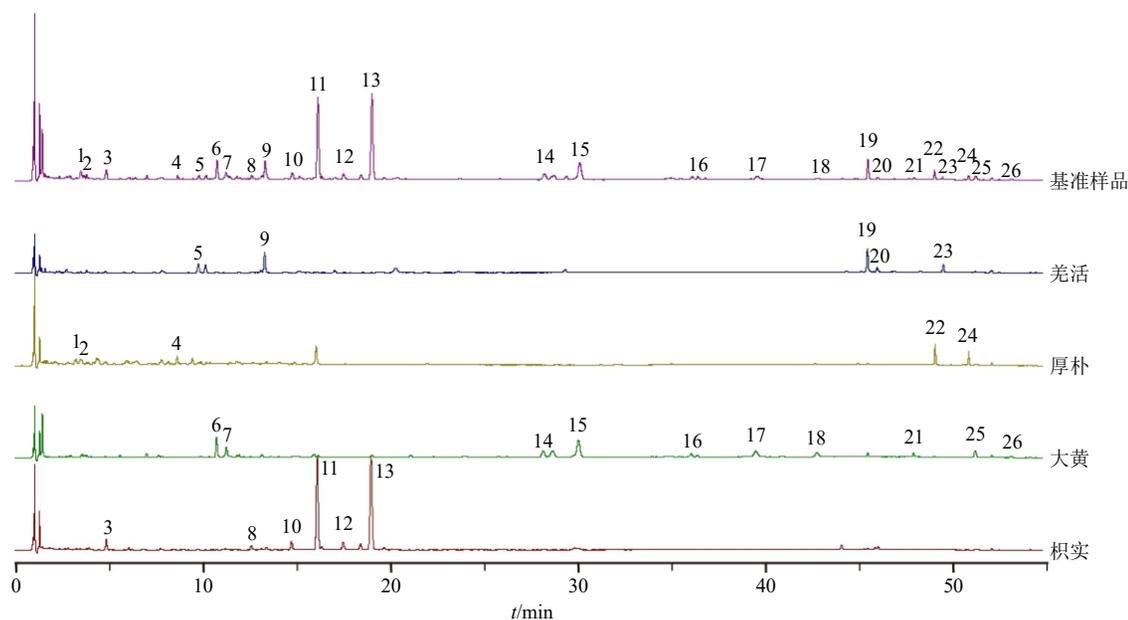


图3 三化汤基准样品与单味饮片的 UPLC 图谱

Fig. 3 UPLC chromatogram of Sanhua Decoction benchmark samples and single herbal pieces

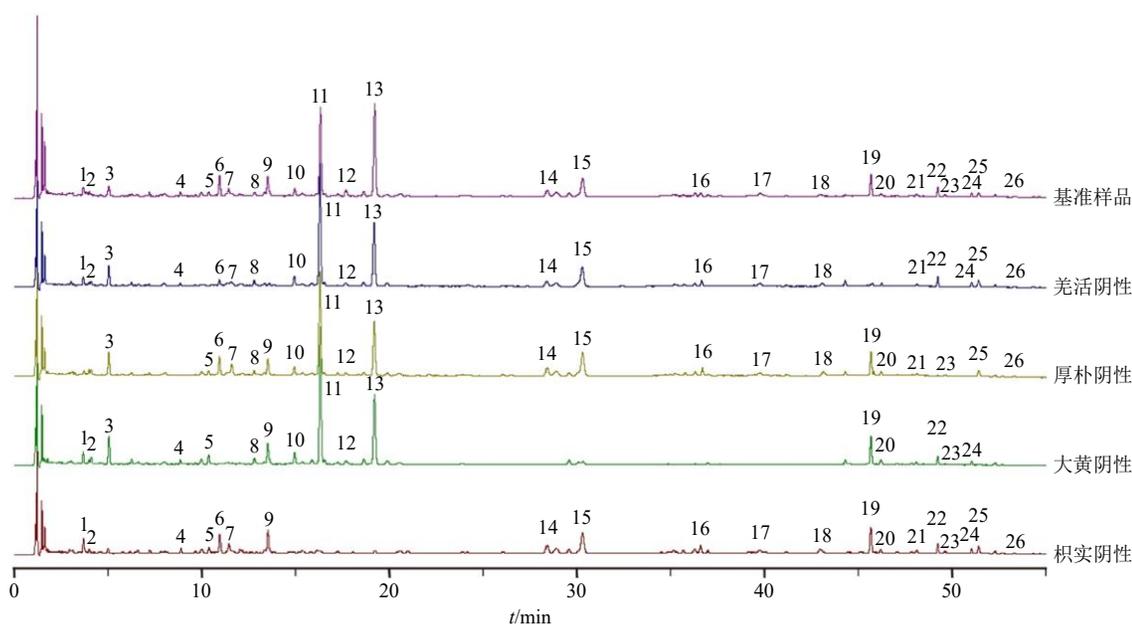


图4 三化汤基准样品与阴性样品的UPLC图谱

Fig. 4 UPLC chromatogram of Sanhua Decoction benchmark samples and negative sample

2.3.3 量值传递关系研究 以每味药中的1个特征峰为参照峰(大黄参照峰为15号,枳实参照峰为13号,羌活参照峰为9号,厚朴参照峰为22号),对基准样品与各单味饮片共有峰峰面积比值作分析,结果见表3。各单味药与基准样品中对应共有峰峰面积虽存在差异,但大部分特征峰比值变化较小,结果表明各单味药特征图谱中主要物质成分可以从饮片-基准样品较为完整地传递,且各物质成分归属关系清晰。

2.4 三化汤基准样品及各单位饮片中指标成分含量测定方法的建立

2.4.1 色谱条件

(1) 枳实饮片、羌活饮片、基准样品(紫花前胡苷、柚皮苷、新橙皮苷)UPLC定量色谱条件:Acquity UPLC® BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)色谱柱;流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液,梯度洗脱:0~10 min, 10%~17%乙腈;10~28 min, 17%~26%乙腈;体积流量0.2 mL/min;进样体积2 μL;柱温

表3 三化汤基准样品与各药味饮片中特征峰峰面积比值

Table 3 Peak area ratio of characteristic peaks between Sanhua Decoction benchmarks sample and each herbal pieces

峰号	峰面积/(mAU·min)					相对峰面积		峰号	峰面积/(mAU·min)					相对峰面积	
	大黄	枳实	羌活	厚朴	基准样品	单味饮片	基准样品		大黄	枳实	羌活	厚朴	基准样品	单味饮片	基准样品
1				47 921	44 041	0.66	0.70	14	124 603				101 930	0.35	0.35
2				57 853	49 374	0.80	0.79	15	352 801				292 048	1.00	1.00
3		60 159			51 264	0.07	0.06	16	24 562				22 391	0.07	0.08
4				51 247	39 775	0.71	0.64	17	38 158				30 025	0.11	0.10
5			76 155		37 189	0.44	0.22	18	51 285				47 287	0.15	0.16
6	160 598				149 913	0.46	0.51	19			132 581		119 118	0.77	0.70
7	52 148				39 902	0.15	0.14	20			18 597		13 258	0.11	0.08
8		40 139			35 830	0.04	0.04	21	32 145				21 628	0.09	0.06
9			172 133		169 182	1.00	1.00	22				72 591	62 600	1.00	1.00
10		60 487			58 704	0.07	0.07	23			30 998		30 111	0.18	0.17
11		845 611			757 353	0.94	0.90	24				41 594	22 278	0.57	0.36
12		30 157			29 291	0.03	0.03	25	41 257				37 225	0.12	0.13
13		895 618			845 386	1.00	1.00	26	9 017				5 665	0.03	0.02

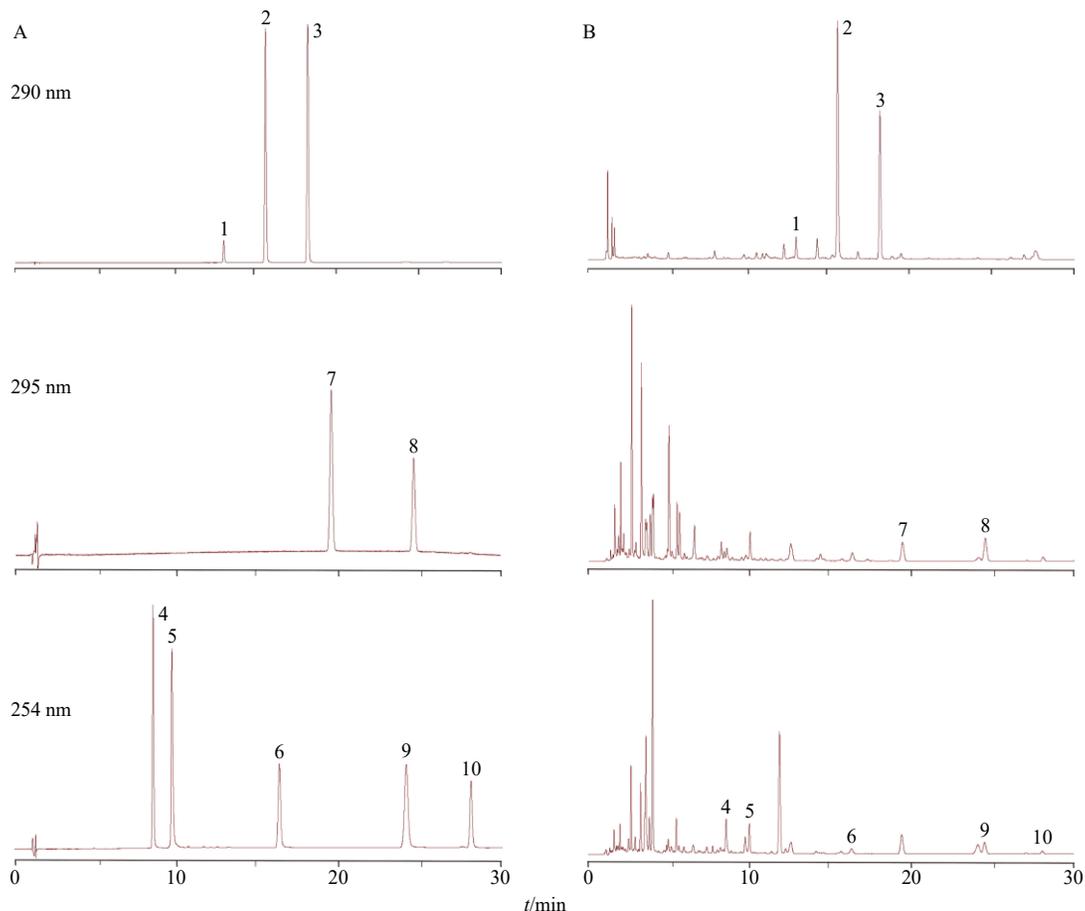
35 ℃；检测波长 290 nm。对照品见图 5-A，基准样品见图 5-B。

(2) 大黄饮片、厚朴饮片、基准样品（芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、和厚朴酚、厚朴酚）UPLC 定量色谱条件：Acquity UPLC® BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱；流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液，梯度洗脱：0~8 min, 30%~42%乙腈；8~18 min, 42%~46%乙腈；18~22 min, 46%~50%乙腈；22~30 min, 50%~

72%乙腈；体积流量 0.2 mL/min；进样体积 2 μL；柱温 35 ℃；游离总蒽醌（芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚）检测波长 254 nm，混合对照品色谱图见图 5-A，基准样品见图 5-B；和厚朴酚、厚朴酚检测波长 295 nm，混合对照品色谱图见图 5-A，基准样品见图 5-B。

2.4.2 三化汤基准样品含量测定供试品溶液的制备

(1) 紫花前胡苷、柚皮苷、新橙皮苷：同“2.2.2”项下制法制备供试品溶液。



1-紫花前胡苷 2-柚皮苷 3-新橙皮苷 4-芦荟大黄素 5-大黄酸 6-大黄素 7-和厚朴酚 8-厚朴酚 9-大黄酚 10-大黄素甲醚
1-nodakenin 2-naringenin 3-neohesperidin 4-aloe rhodopsin 5-rhein 6-emodin 7-honokiol 8-magnolol 9-chrysophanic acid 10-phycion

图 5 混合对照品 (A) 和三化汤基准样品指标性成分 (B) 含量测定色谱图

Fig. 5 Chromatogram for content determination of mixed control sample (A) and reference standard components of Sanhua Decoction (B)

(2) 游离总蒽醌、和厚朴酚、厚朴酚：精密量取基准样品汤液 25 mL，置分液漏斗中，用三氯甲烷提取 3 次，每次 20 mL，合并三氯甲烷溶液，蒸干，残渣加适量甲醇溶解，转移至 5 mL 量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，静置，过 0.22 μm 滤膜，即得供试品溶液。

2.4.3 单味饮片含量测定溶液的制备

(1) 枳实：取饮片粉末约 0.1 g，精密称定，置

圆底烧瓶中，精密加入甲醇 30 mL，称定质量，加热回流 1.5 h，放冷，再称定质量，用甲醇补足减失的质量，摇匀，静置，过 0.22 μm 滤膜，即得。

(2) 羌活：取饮片粉末约 0.1 g，精密称定，分别置不同具塞锥形瓶中，加甲醇 20 mL，超声处理 20 min，放冷，再称定质量，用甲醇补足减失的质量，摇匀，过 0.22 μm 滤膜，即得。

(3) 大黄、厚朴：含量测定供试品溶液的制备

参照《中国药典》2020年版。

2.4.4 对照品溶液的制备 取紫花前胡苷、柚皮苷、新橙皮苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、和厚朴酚、厚朴酚对照品适量，精密称定，甲醇溶解，制得质量浓度分别为 248.01、908.02、992.01、68.42、86.01、64.41、74.80、32.41、204.01、156.80 $\mu\text{g/mL}$ 的各对照品溶液。

2.4.5 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，结果表明芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、和厚朴酚、厚朴酚、紫花前胡苷、柚皮苷、新橙皮苷在各自的线性范围内线性关系良好。

表4 指标性成分含量测定方法学考察

Table 4 Methodological investigation of determining of content of index components

指标成分	回归方程	R^2	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD/%			平均加样 回收率/%
				精密度	稳定性	重复性	
芦荟大黄素	$Y=20\ 164.20 X+17\ 694.43$	0.999 8	3.42~41.05	0.87	1.26	2.41	98.87
大黄酸	$Y=15\ 693.08 X-3\ 012.60$	0.999 4	4.30~51.65	0.99	2.02	2.19	99.21
大黄素	$Y=13\ 950.01 X+4\ 173.82$	0.999 7	3.22~38.35	1.01	1.55	1.95	100.11
大黄酚	$Y=19\ 786.04 X+21\ 799.62$	0.999 6	3.74~44.88	0.97	0.98	2.56	97.88
大黄素甲醚	$Y=4\ 181.04 X+1\ 140.63$	0.999 2	1.62~19.45	1.14	1.25	2.47	99.87
和厚朴酚	$Y=9\ 218.32 X+116\ 093.11$	0.999 6	5.23~204.01	1.35	1.85	2.09	100.09
厚朴酚	$Y=2\ 407.83 X-14\ 643.00$	0.999 8	2.72~156.80	1.95	1.22	1.62	100.15
紫花前胡苷	$Y=2\ 514.22 X-6\ 196.01$	0.999 9	9.31~248.01	1.12	1.31	1.84	98.64
柚皮苷	$Y=1\ 937.93 X-4\ 861.11$	0.999 1	181.60~908.02	1.08	2.13	2.68	98.98
新橙皮苷	$Y=1\ 739.41 X-13\ 096.02$	0.999 4	173.64~661.34	0.79	1.86	1.92	101.22

2.4.6 精密度考察 取同一批三化汤基准样品(S1)，参照“2.4.2”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，芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、和厚朴酚、厚朴酚、紫花前胡苷、柚皮苷、新橙皮苷峰面积的RSD值均小于1.95%，RSD见表4，表明仪器精密度良好。

2.4.7 重复性考察 取同一批三化汤基准样品，按“2.4.2”项下方法平行制备6份供试品溶液，按“2.4.1”项下色谱条件进样检测，芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、和厚朴酚、厚朴酚、紫花前胡苷、柚皮苷、新橙皮苷质量分数的RSD值均小于2.68%，RSD见表4，表明该方法的重复性良好。

2.4.8 稳定性考察 取同一批三化汤基准样品(S1)，参照“2.4.2”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，芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、和厚朴酚、厚朴酚、紫花前胡苷、柚皮苷、新橙皮苷峰面积的RSD见表4，结果表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.4.9 加样回收率考察 精密量取已知指标成分含量的三化汤基准样品(S1)共6份，分别按已知质量浓度的80%、100%和120%加入对照品，采用“2.4.2”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4所示，芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、和厚朴酚、厚朴酚、紫花前胡苷、柚皮苷、新橙皮苷的平均加样回收率均在95%~105%，RSD均小于3.0%，表明方法准确度良好。

2.4.10 样品测定 取三化汤基准样品(S1~S15)和各单味药材饮片，分别按照“2.4.2”“2.4.3”项下方法制备供试品溶液，按照“2.4.1”项下色谱条件进样分析，计算三化汤基准样品和单味饮片中指标成分的含量。

2.5 三化汤饮片-基准样品中指标成分转移率考察

按照公式计算三化汤饮片-基准样品中指标成分的转移率。

$$\text{转移率} = w/W$$

w 为基准样品中指标性成分的含量， W 为饮片中指标性成分的含量

由表5、6结果可知，15批三化汤基准样品中

表5 三化汤饮片-基准样品紫花前胡苷、柚皮苷、新橙皮苷含量及转移率

Table 5 Content and transfer rate of nodakenin, naringenin and neohesperidin in Sanhua Decoction herbal pieces-benchmark samples

样品	紫花前胡苷/%		转移率/%	柚皮苷/%		转移率/%	新橙皮苷/%		转移率/%
	饮片	基准样品		饮片	基准样品		饮片	基准样品	
S1	2.34	0.68	28.87	7.41	3.60	48.66	5.31	2.20	41.42
S2	2.01	0.67	33.12	6.96	3.72	53.44	5.23	2.21	42.37
S3	3.10	0.72	23.13	6.78	3.77	55.63	5.14	2.47	48.01
S4	2.36	0.71	30.06	7.95	3.60	45.25	7.13	3.31	46.38
S5	0.95	0.39	40.64	8.10	3.73	46.10	5.40	2.45	45.32
S6	2.08	0.59	28.26	7.83	3.58	45.79	7.23	3.10	42.85
S7	2.61	0.66	25.33	6.57	3.04	46.24	8.64	3.88	44.90
S8	0.98	0.39	39.57	7.83	3.06	39.14	7.05	2.72	38.50
S9	1.95	0.65	33.15	8.22	3.73	45.36	5.40	2.51	46.50
S10	1.22	0.39	32.14	6.24	3.01	48.29	5.38	1.95	36.28
S11	2.22	0.60	26.83	8.05	3.12	38.71	5.36	2.13	39.68
S12	2.41	0.63	26.31	7.44	2.70	36.29	8.74	3.46	39.60
S13	1.86	0.55	29.45	7.38	2.88	39.01	5.30	1.72	32.40
S14	2.68	0.63	23.68	6.37	2.76	43.29	5.28	1.69	31.99
S15	3.04	0.69	22.73	7.41	3.32	44.88	5.32	2.09	39.29
均值	2.12	0.60	28.08	7.37	3.31	45.07	6.13	2.53	41.03
范围	0.95~3.10	0.39~0.72	22.73~40.64	6.24~8.22	2.70~3.77	36.29~55.63	5.14~8.74	1.69~3.88	31.99~48.01

表6 三化汤饮片-基准样品中游离总蒽醌、和厚朴酚与厚朴酚含量及转移率

Table 6 Free total anthraquinone, magnolol and honokiol content and transfer rate in Sanhua Decoction herbal pieces-benchmark samples

样品	和厚朴酚+厚朴酚/%		转移率/%	游离总蒽醌/%		转移率/%	样品	和厚朴酚+厚朴酚/%		转移率/%	游离总蒽醌/%		转移率/%
	饮片	基准样品		%	饮片			基准样品	%		饮片	基准样品	
S1	6.64	0.17	2.49	1.91	0.28	14.53	S10	3.39	0.13	3.94	0.55	0.12	21.31
S2	5.98	0.14	2.29	0.96	0.17	17.22	S11	6.63	0.13	1.97	0.98	0.15	15.25
S3	6.53	0.17	2.58	0.52	0.11	21.82	S12	3.52	0.17	4.78	1.94	0.26	13.48
S4	3.24	0.14	4.28	1.85	0.24	12.94	S13	6.54	0.26	4.02	1.91	0.25	13.32
S5	5.75	0.15	2.54	1.92	0.20	10.29	S14	6.59	0.24	3.61	0.61	0.10	16.00
S6	5.69	0.12	2.13	1.89	0.25	13.10	S15	4.17	0.14	3.30	0.58	0.13	21.78
S7	6.62	0.32	4.83	0.52	0.11	20.36	均值	5.20	0.17	3.32	1.16	0.19	16.54
S8	3.34	0.13	3.77	0.65	0.12	19.23	范围	3.24~	0.11~	1.97~	0.52~	0.10~	10.29~
S9	3.41	0.11	3.31	0.54	0.09	17.41		6.64	0.32	4.83	1.94	0.28	21.82

指标成分紫花前胡苷质量分数在 0.39%~0.72%，平均转移率为 (28.08±5.28) %；柚皮苷质量分数在 2.70%~3.77%，平均转移率为 (45.07±5.17) %；新橙皮苷质量分数在 1.69%~3.88%，平均转移率为 (41.03±4.75) %；和厚朴酚与厚朴酚总质量分数在 0.11%~0.32%，平均总转移率为 (3.32±0.92) %；大黄游离总蒽醌质量分数在 0.10%~0.28%，平均转

移率为 (16.54±3.57) %。

2.6 出膏率测定

按“2.1”项下制备方法制备 15 批基准样品汤液，精密吸取 50 mL 于蒸发皿中，水浴蒸干，真空干燥 48 h 后，置干燥器中至恒定质量，称定质量，计算得到各批次三化汤基准样品出膏率。

$$\text{出膏率} = mV/Mv$$

其中 m 表示干膏质量, M 表示饮片质量, v 代表取样体积, V 代表汤液总体积

分别取 15 批对应批号的大黄、枳实、羌活、厚朴单味饮片, 按“2.1”项下方法制备得到 4 味药单味饮片水煎液, 按照上述制备方法, 得到单味饮片出膏率。出膏率结果见表 7。全处方共计 120 g, 则理论出膏率 = 大黄出膏率 × 25% + 枳实出膏率 × 25% + 羌活出膏率 × 25% + 厚朴出膏率 × 25%, 其中枳实出膏率最高 (44.61% ± 3.01%), 厚朴的出膏率最低 (13.61 ± 0.67)%, 各批次处方干膏转移率为 64.43% ~ 76.22%, 均保持在均值的 ± 10%。

表 8 三化汤基准样品出膏率及转移率

Table 8 Paste yield rate and transfer rate of Sanhua Decoction benchmark samples

样品	出膏率/%				转移率/		
	大黄	枳实	羌活	厚朴	全方理论值	实际值	%
S1	30.67	44.80	29.05	14.33	29.71	20.16	67.85
S2	33.27	43.87	31.67	12.88	30.42	21.15	69.52
S3	35.35	47.77	24.77	12.98	30.22	19.47	64.43
S4	41.85	45.26	33.47	14.55	33.78	23.12	68.44
S5	39.22	41.28	26.35	12.53	29.85	20.48	68.62
S6	38.67	42.65	27.65	13.97	30.74	22.44	73.01
S7	34.65	40.01	28.64	13.97	29.32	19.76	67.40
S8	35.11	46.32	30.77	14.08	31.57	21.66	68.61
S9	40.16	42.35	26.89	12.88	30.57	23.30	76.22
S10	42.16	49.21	25.01	13.60	32.50	22.60	69.55
S11	39.55	47.65	25.59	14.13	31.73	22.17	69.87
S12	38.88	44.36	27.18	12.57	30.75	20.27	65.92
S13	37.59	39.68	26.11	13.56	29.49	20.33	68.95
S14	36.15	45.33	28.65	14.13	31.07	23.73	76.39
S15	43.73	48.67	33.01	14.01	34.86	22.93	65.79
均值	37.80	44.61	28.32	13.61	31.10	21.57	69.37

3 讨论

3.1 处方组成及计量考证

经典名方疗效确切且应用历史悠久, 但存在着古今剂量换算及炮制差异等众多难点问题。经文献考证, 金元与唐宋时期处方剂量折算类似^[9-10], 宋代 1 两合今 39~41 g^[11-12], 与国家中医药管理局和国家药品监督管理局公布的“古代经典名方关键信息表 (25 首方剂)”信息中金时期 1 两约为 41.30 g 基本吻合, “每服三两”也就是每服处方 117.00~123.00 g, “大黄、枳实、羌活、厚朴各等分”则四味药各 29.25~30.75 g; 参考苑祯等^[13]对宋元时期

“升”的考证, 得到处方现代计量单位换算: 金元时期 1 升折合今约为 702 mL。最终确定处方为大黄、枳实、羌活、厚朴均为生品各 30 g, 加水“三升”(2100 mL), 煎至“一升半”(1050 mL)。

3.2 色谱条件分析

本实验采用 UPLC 建立三化汤特征图谱和指标成分含量测定方法, 前期实验分别采用乙腈-0.1%磷酸水溶液、甲醇-0.1%甲酸水溶液和乙腈-0.1%甲酸水溶液做流动相, 经对比发现, 采用乙腈-0.1%甲酸水溶液进行梯度洗脱时, 基线平稳, 色谱峰分离效果较好。

另外考察不同体积流量 (0.2、0.3、0.4 mL/min) 对色谱峰的影响, 当体积流量升高时, 主要成分色谱峰分离度较低, 当体积流量控制在 0.2 mL/min 时, 色谱峰峰形较好。波长在 250~260 nm 时, 特征图谱出峰较多, 整体成分信息较为全面; 255 nm 波长下基线平稳, 各成分色谱峰分离效果较好, 故最终选择 255 nm 作为特征图谱的最佳波长。

3.3 指标成分的选择及量值传递研究

基准样品中柚皮苷和新橙皮苷专属性强且含量远高于其他成分, 在特征图谱中较为明显, 2 成分在热水中水溶性较好, 有研究证明, 新橙皮苷对柚皮苷具有一定的增溶作用^[14], 且两者转移率均大于 40%, 前期实验研究发现辛弗林在含量测定图谱中有明显阴性干扰, 因此未选择其作为枳实的测定指标成分。基准样品中紫花前胡苷相比于《中国药典》2020 年版规定的羌活测定指标成分异欧前胡素和羌活醇 UPLC 分离效果更好, 而且在进行 TLC 鉴别过程中紫花前胡苷的分离度较好、表征明显, 更有利于质量标准的建立, 因此选择其作为指标成分之一。基准样品中游离总蒽醌、和厚朴酚与厚朴酚极性较低, 作者采用三氯甲烷作提取溶剂制备基准样品中游离总蒽醌、和厚朴酚与厚朴酚含量测定供试品, 有效降低了大极性成分对于检测指标的干扰, 同时缩短了检测时间, 并通过切换不同波长, 增强了检测指标色谱峰信号。

以指标成分转移率在均值的 ± 30% 为衡量标准, 15 批三化汤基准样品中紫花前胡苷、柚皮苷和新橙皮苷转移率结果均符合该规定, 但部分批次和厚朴酚与厚朴酚总量、游离总蒽醌的转移率未在均值的 ± 30% 范围内, 其中 220105、220502 批次厚朴中明显略高于均值的 30%, 分析原因可能是制备过程中受煎煮环境等因素影响导致指标成分转移率相

差较大,后期制剂生产可考虑适当剔除部分批次转移率过低的饮片或采用混批投料方式来保证量值传递的均一性。大黄中游离蒽醌类化合物与厚朴中厚朴酚已被证明均是三化汤发挥治疗脑卒中的重要成分^[15-16],厚朴酚与和厚朴酚是同一化学结构的同分异构体,具有疏水性烯丙基联苯酚类结构^[17],水溶性较差,转移率较低;随着提取时间增加,部分游离蒽醌并不稳定,会产生氧化分解^[18],后期制剂生产中应改进提取工艺,以期提高药效成分含量。

经典名方基准样品作为制剂开发的中间体,是制剂前期生产的重要部分^[19],更是建立饮片-中间体-制剂质量控制体系的关键,阐明方中关键成分量值传递规律,可以保证基准样品的均一、稳定^[20-22]。本研究通过建立不同批次基准样品特征图谱对三化汤整体成分信息进行表征和相似度评价,并对其共有峰进行了指认与归属,所建立的特征图谱相似度均大于0.98,含量测定结果显示基准样品各指标成分转移率基本控制在均值的 $\pm 30\%$,各批次处方干膏转移率均在均值的90%~110%,波动范围在规定的均值 $\pm 10\%$,表明基准样品制备工艺及处方转移率较为稳定,可为后续三化汤制剂的进一步开发提供参考。

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

[2] 李雯洁,黄颖. 三化汤治疗中风的研究进展 [J]. 中医研究, 2021, 34(12): 67-71.

[3] 宋欣芸,邱模炎,赵程博文,等. 从俩三化汤看外风对脑卒中发病及病程的影响 [J]. 康复学报, 2016, 26(6): 51-54.

[4] 赵文龙,其乐木格,张晶晶,等. 基于3种疼痛病的羌活组方用药规律多维度分析 [J]. 中草药, 2023, 54(2): 608-619.

[5] 巩子汉,段永强,付晓艳,等. 羌活的药理作用研究 [J]. 亚太传统医药, 2019, 15(5): 192-194.

[6] Zhang W, Zhang L, Wang W J, et al. Network pharmacology and *in vitro* experimental verification to explore the mechanism of Sanhua Decoction in the treatment of ischaemic stroke [J]. *Pharm Biol*, 2022, 60(1):

119-130.

[7] 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.

[8] 徐瑞杰,薛蓉,梅茜,等. 经典名方枳实薤白桂枝汤物质基准的量值传递研究 [J]. 中草药, 2022, 53(9): 2650-2658.

[9] 王晓静. 金代度量衡研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2016.

[10] 储烟阁,匡艳辉,严曾豪,等. 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 [J]. 中草药, 2023, 54(3): 746-755.

[11] 丘光明. 中国历代度量衡考 [M]. 北京: 科学出版社, 1992: 448-465.

[12] 关增建. 宋元度量衡制度的发展 [J]. 质量与标准化, 2022, 366(12): 34-37.

[13] 苑祯,马然,张林. 宋代方剂煎服法中“盏”的量值研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2019, 42(9): 738-741.

[14] 姜华,李军. 新橙皮苷对柚皮苷增溶作用及其机制的初步考察 [J]. 中国药学杂志, 2021, 56(6): 484-488.

[15] 路颖慧,黄颖,孙明杰,等. 基于HPLC和网络药理学方法的三化汤治疗脑缺血活性成分含量测定及作用靶点预测 [J]. 国际中医中药杂志, 2021, 43(11): 1109-1115.

[16] Li X, Chu S F, Liu Y J, et al. Neuroprotective effects of anthraquinones from rhubarb in central nervous system diseases [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 3790728.

[17] 张明发,沈雅琴. 厚朴酚及和厚朴酚防治高血糖、高脂血症及其并发症的药理机制研究进展 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(1): 225-232.

[18] 王丹丹,卞理,张雯,等. 正交试验法改进大黄游离蒽醌提取方法的研究 [J]. 湖北中医药大学学报, 2022, 24(2): 42-45.

[19] 陈锦霞,高永坚,林碧珊,等. 当归补血汤基准样品质量控制方法研究 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(11): 2247-2256.

[20] 李军鸽,赵莹,王永春,等. 黄连解毒汤物质基准量值传递分析 [J]. 中草药, 2022, 53(11): 3348-3356.

[21] 汪欣怡,孙国祥,孙万阳,等. 经典名方质控策略—基于“等位等价”理论和定量指纹一致性的控制技术 [J]. 药学研究, 2023, 42(1): 1-9.

[22] 王延涛,孔令梅,程杰,等. 经典名方猪苓汤基准样品质量评价方法研究 [J]. 中草药, 2022, 53(12): 3643-3652.

[责任编辑 郑礼胜]