

经典名方茵陈蒿汤基准样品 HPLC 指纹图谱及多指标量值传递研究

肖复耀, 桂 郎, 曾红玉, 刘佳玉, 毛 鑫, 刘 雨, 唐 灿*

西南医科大学药学院, 四川 泸州 646000

摘要: **目的** 建立经典名方茵陈蒿汤 (Yinchenhao Decoction, YD) 基准样品的 HPLC 指纹图谱并对其指标性成分 (绿原酸、栀子苷、对羟基苯乙酮、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚) 进行含量测定, 研究 YD 基准样品的量值传递规律。**方法** 制备 15 批 YD 基准样品, 建立 HPLC 指纹图谱, 明确其指纹图谱与对照指纹图谱 (R) 的相似度, 共有峰的峰归属, 出膏率范围, 对指标性成分的含量及转移率进行分析。**结果** 15 批 YD 基准样品指纹图谱与 R 的相似度均大于 0.900; 共归属 33 个共有峰, 经对照品指认 8 个共有峰信息, 其中峰 1、6、10、11、13 (对羟基苯乙酮)、15、19、20、22 来源于茵陈, 峰 3、7、8、12 (栀子苷)、14、21、23、24、27、28 来源于栀子, 峰 2、16、17、18、25、26、29~33 (芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚) 来源于大黄, 峰 4、5、9 (绿原酸) 为茵陈和栀子所共有; 15 批基准样品的出膏率为 23.170%~29.952%; 指标性成分绿原酸、栀子苷、对羟基苯乙酮、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚质量分数分别为 0.107%~0.282%、3.153%~5.757%、0.010%~0.035%、0.008%~0.039%、0.007%~0.147%、0.003%~0.008%、0.003%~0.012%、0.001%~0.003%, 转移率分别为 32.290%~61.345%、40.365%~81.823%、66.473%~93.596%、7.398%~35.966%、4.971%~91.091%、1.841%~16.085%、0.599%~6.922%、0.173%~1.965%; 15 批基准样品中 5 种游离总蒽醌的质量分数为 0.033%~0.185%, 转移率为 2.081%~40.274%。**结论** 采用指纹图谱及多指标性成分含量测定相结合的模式, 对经典名方 YD 基准样品的量值传递过程进行分析, 可为 YD 基准样品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; 茵陈蒿汤; 基准样品; 量值传递; HPLC; 指纹图谱; 游离蒽醌; 绿原酸; 栀子苷; 对羟基苯乙酮; 芦荟大黄素; 大黄酸; 大黄素; 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(2024)02-0446-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.02.010

HPLC fingerprint of benchmark samples of classical prescription Yinchenhao Decoction and quality value transfer of multi-index components

XIAO Fuyao, GUI Lang, ZENG Hongyu, LIU Jiayu, MAO Xin, LIU Yu, TANG Can

School of Pharmacy, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

Abstract: **Objective** To establish the HPLC fingerprint of benchmark samples of a classical famous prescription, Yinchenhao Decoction (YD, 茵陈蒿汤), determine the content of its multi-index components including chlorogenic acid, geniposide, 4'-hydroxyacetophenone, aloemodin, rhein, emodin, chrysophanol and physcion, and explore the rules for the quality value transfer of benchmark samples in YD. **Methods** By preparing 15 batches of benchmark samples of YD, the methodology of the fingerprints of benchmark samples was established. Furthermore, the similarity range between these fingerprints and the reference fingerprint (R) and the identification of attribution of common peaks were explored. The paste-forming rate range was determined, the contents and the transfer rate range of index components were analyzed. **Results** The 15 batches of the benchmark samples fingerprints had good similarities with R, which were all higher than 0.900. 33 Common peaks were assigned, and eight common peaks were assigned by the reference substance, among which, peaks 1, 6, 10, 11, 13 (4'-hydroxyacetophenone), 15, 19, 20, 22 originated from Yinchenhao (*Artemisiae Scopariae Herba*, ASH); Peaks 3, 7, 8, 12 (geniposide), 14, 21, 23, 24, 27, 28 came from Zhizi (*Gardeniae Fructus*, GF); Peaks 2, 16, 17, 18, 25, 26, 29-33 (aloemodin, rhein, emodin, chrysophanol and physcion) came from Dahuang (*Rhei Radix* et

收稿日期: 2023-06-16

基金项目: 四川省科技厅-泸州市政府-泸州医学院三方联合专项 (14ZC0045); 四川省科技支撑计划项目 (2010SZ0049)

作者简介: 肖复耀 (1998—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药制剂与质量分析。E-mail: 1771615423@qq.com

*通信作者: 唐 灿, 教授, 硕士生导师, 主要从事中药品质的教学和科研工作。E-mail: Tang9670625@163.com

Rhizoma, RRR), and peaks 4, 5, 9 (chlorogenic acid) were the common peaks of ASH and GF. The paste-forming rate of the 15 batches of benchmark samples ranged from 23.170% to 29.952%. The mass fraction ranges of chlorogenic acid, geniposide, 4'-hydroxyacetophenone, aloecmodin, rhein, emodin, chrysophanol and physcion were 0.107%—0.282%, 3.153%—5.757%, 0.010%—0.035%, 0.008%—0.039%, 0.007%—0.147%, 0.003%—0.008%, 0.003%—0.012%, and 0.001%—0.003%, respectively. The transfer rates ranged from 32.290% to 61.345%, 40.365% to 81.823%, 66.473% to 93.596%, 7.398% to 35.966%, 4.971% to 91.091%, 1.841% to 16.085%, 0.599% to 6.922%, and 0.173% to 1.965%, respectively; The mass fraction range of free total anthraquinone in the 15 batches of YD benchmark samples was 0.033%—0.185%, and the transfer rate ranged from 2.081% to 40.274%. **Conclusion** By using the combination of fingerprint and the content determination of the multi-index components, the quality value transfer of benchmark samples in YD can be analyzed, which provides a scientific basis for the quality control of the benchmark samples and the development of compound preparations.

Key words: classical prescription; Yinchenhao Decoction; benchmark samples; quality value transfer; HPLC; fingerprint; free anthraquinone; chlorogenic acid; geniposide; 4'-hydroxyacetophenone; aloecmodin; rhein; emodin; chrysophanol; physcion

茵陈蒿汤 (Yinchenhao Decoction, YD) 源于东汉医学家张仲景所著的《伤寒杂病论》, 由茵陈、栀子和大黄 3 味药配伍而成, 具有清热利湿、利胆退黄之功效, 疗效确切, 组方严谨, 用药精简, 是治疗阳黄症的经典名方^[1]。

方中以茵陈清热利湿、疏利肝胆为君, 栀子清泄三焦湿热, 兼达退黄之效为臣, 大黄通利大便, 导热下行为佐。现代临床亦可用于治疗急性慢性肝炎、脂肪肝、胆管闭锁症术后、肝硬化和肝衰竭等肝病, 以及 2 型糖尿病、癌症等疾病^[2]。自古以来被众多医家广泛运用, 且根据实际病证衍生出许多实用的加减方, 更加满足临床实践的需求, 对其进行经典名方的开发研究意义重大。

茵陈蒿汤基准样品是在提取工艺“尊古不泥古”的基础上, 由其水煎液浓缩冷冻干燥所制, 使其在符合传统中药方剂使用形式的同时加以现代技术的应用。但由于中药复方化学成分复杂多样, 部分中药材多基原、多产地, 药材加工过程有所不同, 制剂过程中存在差异, 使得质量控制难度较大。目前, 对茵陈蒿汤的文献报道多是中药药理及临床应用研究, 也有对茵陈、栀子和大黄单味标准汤剂的量值传递研究, 尚未见对其复方基准样品量值传递关系分析的相关研究。

本研究通过制备 15 批茵陈蒿汤基准样品, 对其进行指纹图谱及 8 种指标成分的含量测定研究, 进行饮片-基准样品量值传递的分析。可为后续经典名方茵陈蒿汤基准样品的相关研究提供实验依据, 为后续相关制剂的开发提供借鉴。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Shimadzu 型系列高效液相色谱仪, 配有 LC-

2030/2040 PDA Detector, LC-2030 Pump, LC-2030 Autosampler, LC-2030 Oven, 株式会社岛津制作所; SB-5200DT 型超声波清洗机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; ME155DU/02 和 ME204E/02 型电子天平, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; Alpha 1-4 LSCbasic 型冷冻干燥机, Marin Christ 公司; SHZ-DIII 型循环水真空泵、YRE-2000B 型旋转蒸发器, 巩义市予华仪器有限责任公司; 800C 型多功能粉碎机, 永康市红太阳机电有限公司; C22-WT2202 型多功能电磁炉, 广东美的生活电器制造有限公司。

1.2 试药

对照品绿原酸 (批号 MUST-22111711, 质量分数 99.82%)、栀子苷 (批号 MUST-22101813, 质量分数 99.87%)、芦荟大黄素 (批号 MUST-22090914, 质量分数 98.34%)、大黄酸 (批号 MUST-22111012, 质量分数 99.10%)、大黄素 (批号 MUST-22021513, 质量分数 99.56%)、大黄酚 (批号 MUST-22110710, 质量分数 99.46%) 和大黄素甲醚 (批号 MUST-22062811, 质量分数 99.04%), 成都曼思特生物科技有限公司; 对照品对羟基苯乙酮, 批号 111897-201602, 质量分数 99.90%, 中国食品药品检定研究院; 甲醇、乙腈、磷酸, 色谱纯, Fisher 公司; 纯净水, 杭州娃哈哈集团有限公司。

于泸州市 15 家药房购入此 3 味中药, 共 15 批次, 中药饮片均经西南医科大学张春教授鉴定, 茵陈为菊科蒿属植物茵陈蒿 *Artemisia capillaris* Thunb. 的干燥地上部分, 栀子为茜草科栀子属植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实, 大黄为蓼科大黄属植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 的干燥根和根茎^[3]。茵陈蒿汤基准样品 (S1~S15) 对应的 15 批药材产地组合信息见表 1。

表 1 15 批茵陈蒿汤基准样品 (S1~S15) 对应饮片来源信息

Table 1 Source information of 15 batches of benchmark samples of YD (S1—S15) corresponding to decoction pieces									
编号	茵陈			栀子			大黄		
	批号	产地	生产企业	批号	产地	生产企业	批号	产地	生产企业
S1	220808-4	河北	泸州百草堂中药饮片有限公司	220607-1	四川	泸州百草堂中药饮片有限公司	221023-1	四川	泸州百草堂中药饮片有限公司
S2	220801	甘肃	四川五盛药业集团有限责任公司	220701	四川	四川五盛药业集团有限责任公司	220901	四川	成都市天晟中药材饮片有限责任公司
S3	220301	重庆	重庆众妙药业有限公司	220801	四川	四川盛世锦荣药业有限公司	220601	四川	重庆众妙药业有限公司
S4	220800321	江西	康美药业股份有限公司	221102761	江西	康美药业股份有限公司	221100149	甘肃	康美（亳州）世纪国药有限公司
S5	220618	甘肃	安徽康和中药科技有限公司	221106	江西	安徽康和中药科技有限公司	220806	甘肃	安徽康和中药科技有限公司
S6	210513	甘肃	安徽旭松中药饮片有限公司	221001	四川	四川利民中药饮片有限责任公司	211101	四川	四川省泓圃药业有限公司
S7	2208128	陕西	四川新荷花中药饮片股份有限公司	21110301	四川	四川天植中药股份有限公司	220701	四川	四川博仁药业有限责任公司
S8	220701	重庆	重庆众妙药业有限公司	221101	四川	四川莉君药业有限责任公司	220701	四川	四川启隆中药饮片有限公司
S9	221025002	陕西	北京仟草中药饮片有限公司	220907001	江西	北京仟草中药饮片有限公司	221129006	青海	北京仟草中药饮片有限公司
S10	221001	甘肃	四川相如制药有限公司	21070101	四川	四川中庸药业有限公司	220801	四川	四川紫荆花药业有限公司
S11	211101	重庆	重庆众妙药业有限公司	20221001	四川	四川省天府神龙中药饮片有限公司	211001	四川	重庆众妙药业有限公司
S12	230401-03	甘肃	成都市祺隆中药饮片有限公司	220401	四川	四川莉君药业有限责任公司	220101-07	四川	成都市祺隆中药饮片有限公司
S13	220801	甘肃	四川五盛药业集团有限责任公司	221201	福建	成都仁济宏药业有限公司	220201	四川	四川原上草中药饮片有限公司
S14	221001	甘肃	成都市祺隆中药饮片有限公司	220607-1	四川	泸州百草堂中药饮片有限公司	230101	四川	重庆众妙药业有限公司
S15	230501	甘肃	洪雅县瓦屋山药业有限公司	230201	四川	洪雅县瓦屋山药业有限公司	220701	四川	四川鑫仁泰药业有限责任公司

2 方法与结果

2.1 茵陈蒿汤基准样品的制备

通过前期考证,确定经典名方茵陈蒿汤中 3 种饮片的用量及标准汤剂的煎煮工艺^[4]。称取茵陈 18.0 g, 栀子 12.0 g, 大黄 6.0 g。加水 720 mL, 先加入茵陈, 浸泡 1 h 后, 武火 (2200 W) 煮沸, 再用文火 (300 W) 煎煮 30 min 后, 加入栀子、大黄共煎 30 min, 趁热抽滤; 药渣加水 650 mL 再煎煮 30 min, 趁热抽滤, 合并 2 次滤液, 50 ℃减压浓缩至适量, 全部转移至西林瓶中, 于-20 ℃冰箱中预冷冻 12 h 后, 置于真空冷冻干燥机 (冻干温度-55 ℃, 真空度为 6 Pa) 干燥 60 h, 即得 15 批茵陈蒿汤基准样品 (S1~S15) 冻干粉样品。

2.2 茵陈蒿汤基准样品指纹图谱方法的建立

2.2.1 色谱条件 Shimadzu Shim-pack Gist C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~10 min, 5%乙腈; 10~18 min, 5%~9%乙腈; 18~45 min, 9%~10%乙腈; 45~50 min, 10%~15%乙腈; 50~60 min, 15%~17%乙腈; 60~100 min, 17%~25%乙腈; 100~110 min, 25%~26%乙腈; 110~115 min, 26%~30%乙腈; 115~125 min, 30%~40%乙腈; 125~140 min, 40%乙腈; 140~145 min, 40%~55%乙腈; 145~160 min, 55%~70%乙腈; 160~170 min, 70%~

85%乙腈; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 254 nm; 进样体积 10 μL。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取茵陈蒿汤基准样品冻干粉约 0.5 g 于具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 10 mL, 称定质量, 超声处理 (240 W、40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 50% 甲醇补足减少的质量, 摇匀, 10 000 r/min 离心 (离心半径 5 cm) 5 min 后, 取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得茵陈蒿汤基准样品供试品溶液。

按处方量称取各单味饮片及缺相应饮片的阴性对照复方, 按“2.1”项全方标准汤剂基准样品冻干粉制备方法, 同法制得单味饮片及阴性对照冻干粉, 称取适量各冻干粉制备单味饮片和缺味阴性复方供试品溶液。

2.2.3 对照品溶液的制备 称定绿原酸、栀子苷、对羟基苯乙酮、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚适量, 置于棕色量瓶中, 加 50% 甲醇至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

2.2.4 指纹图谱方法学考察

(1) 精密度试验: 取编号为 S1 的冻干粉, 按“2.2.2”项下制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件, 连续进样 6 次。以栀子苷为参照峰, 计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积 RSD, 结果各共有峰相对保留时间 RSD<0.7%, 相对峰面积 RSD<

3.0%，相似度 >0.96 ，表明仪器精密度良好。

(2) 重复性试验：取 S1 基准样品冻干粉，按“2.2.2”项下平行制备 6 份供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进样。以栀子苷为参照峰，计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积 RSD，结果各共有峰相对保留时间 RSD $<0.9\%$ ，相对峰面积 RSD $<4.5\%$ ，相似度 >0.90 ，表明方法重复性良好。

(3) 稳定性试验：取 S1 供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件，分别于制样后 0、3、6、9、12、24 h 进样。以栀子苷为参照峰，计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积 RSD，结果各共有峰相对保留时间 RSD $<0.8\%$ ，相对峰面积 RSD $<5.0\%$ ，相似度 >0.95 ，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 取 15 批茵陈蒿汤基准样品，按“2.2.2”项下方法制备成供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进样，将所得到的色谱图以.cdf 格式导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012A) 软件中进行评价，以 S1 作为参照图谱，采用中位数法，时间窗宽度为 0.1 s，进行全谱峰匹配，并生成对照指纹图谱 (R)，计算相似度。15 批茵陈蒿汤基准样品指纹图谱见图 1，相似度结果见表 2。从相似度结果可知，15 批茵陈蒿汤基准样品指纹图谱与 R 的相似度均大于 0.900，说明茵陈蒿汤基准样品的制备工艺稳定，不同批次间差异较小。

2.2.6 共有峰的指认及归属 通过与对照品进行比对，共指认了 8 个指标成分，结果见图 2；分别取

各单味饮片及缺味阴性复方供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进样，记录色谱图，见图 3。结果表明，峰 1、6、10、11、13 (对羟基苯乙酮)、15、19、20、22 来源于茵陈，峰 3、7、8、12 (栀子苷)、14、21、23、24、27、28 来源于栀子，峰 2、16、17、18、25、26、29~33 (芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚) 来源于大黄，其中峰 4、5、9 (绿原酸) 为茵陈和栀子所共有。以 12 号峰栀子苷为参照峰 (S)，计算 15 批茵陈蒿汤基准样品中各特征峰的峰面积比值和相对保留时间，结果见表 3、4。其中 18 号峰相对峰面积的比值波动较其他峰更为明显，而所有特征峰的相对保留时间稳定，其 RSD 均小于 1.5%。

2.3 经典名方茵陈蒿汤基准样品指标成分含量测定及量值传递关系研究

2.3.1 色谱条件

(1) HPLC 法测定茵陈中绿原酸含量：色谱柱为 Shimadzu Shim-pack Gist C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)；流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液 (8 : 92)；体积流量为 1.0 mL/min；检测波长 327 nm；柱温 30 $^{\circ}$ C；进样体积 10 μ L。

(2) HPLC 法测定茵陈中对羟基苯乙酮含量：色谱柱为 Shimadzu Shim-pack Gist C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)；流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液 (15 : 85)；体积流量为 1.0 mL/min；检测波长 275 nm；柱温 30 $^{\circ}$ C；进样体积 10 μ L。

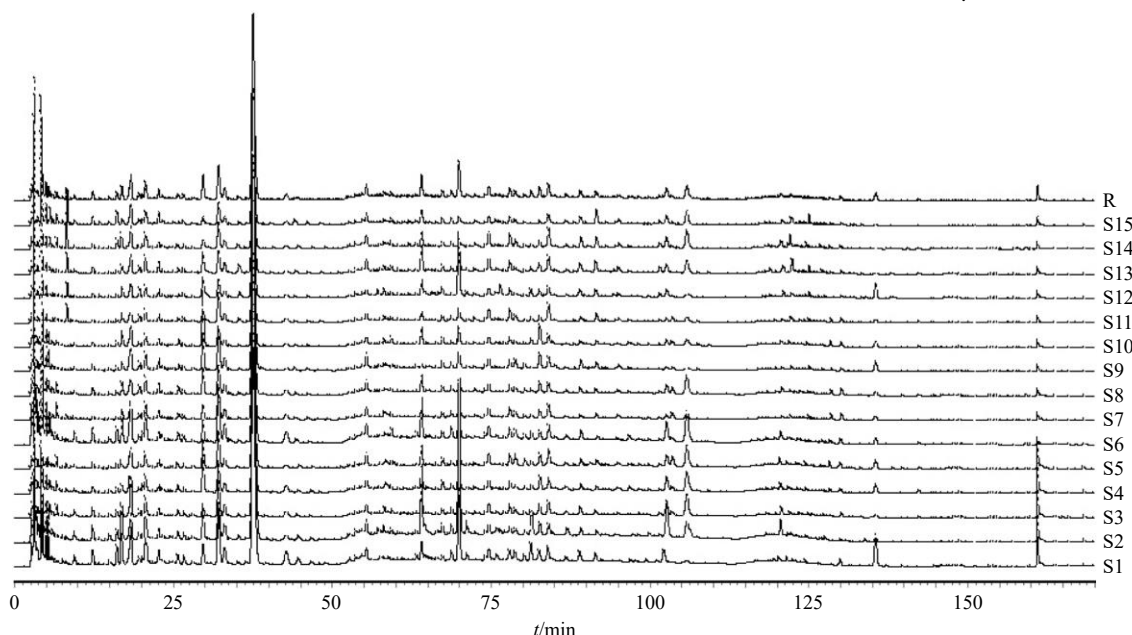


图 1 15 批茵陈蒿汤基准样品指纹图谱

Fig. 1 Fingerprints of 15 batches of benchmark samples of YD

表 2 15 批基准样品指纹图谱相似度
Table 2 Similarity of fingerprints of 15 batches of benchmark samples

样品	相似度														
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15
S1	1.000	0.951	0.929	0.928	0.936	0.924	0.914	0.907	0.912	0.899	0.907	0.922	0.894	0.887	0.878
S2		1.000	0.935	0.946	0.945	0.905	0.922	0.925	0.923	0.914	0.908	0.956	0.921	0.845	0.885
S3			1.000	0.974	0.961	0.948	0.966	0.971	0.958	0.953	0.963	0.947	0.966	0.912	0.948
S4				1.000	0.977	0.929	0.971	0.974	0.971	0.962	0.959	0.954	0.958	0.872	0.944
S5					1.000	0.915	0.961	0.961	0.960	0.945	0.947	0.936	0.945	0.899	0.926
S6						1.000	0.926	0.929	0.916	0.914	0.924	0.903	0.916	0.902	0.924
S7							1.000	0.990	0.991	0.971	0.989	0.965	0.973	0.935	0.973
S8								1.000	0.986	0.977	0.979	0.966	0.980	0.851	0.969
S9									1.000	0.975	0.979	0.965	0.967	0.843	0.965
S10										1.000	0.967	0.964	0.971	0.923	0.949
S11											1.000	0.964	0.979	0.860	0.979
S12												1.000	0.975	0.816	0.943
S13													1.000	0.851	0.963
S14														1.000	0.842
S15															1.000
R	0.951	0.961	0.983	0.986	0.978	0.952	0.987	0.987	0.984	0.976	0.981	0.977	0.979	0.902	0.965

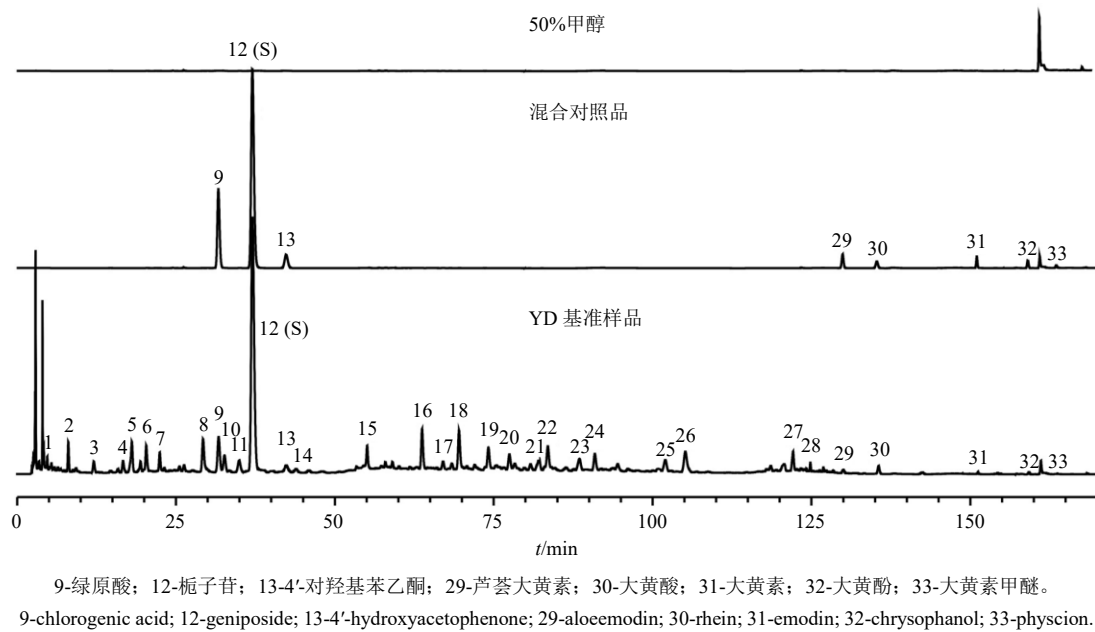


图 2 混合对照品与供试品溶液的 HPLC 图
Fig. 2 HPLC chromatograms of mixed reference substances and test solution

(3) HPLC 法测定栀子中栀子苷含量：色谱柱为 Shimadzu Shim-pack Gist C₁₈ 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为乙腈-水（10：90）；体积流量为 1.0 mL/min；检测波长 238 nm；柱温 30 ℃；进样体积 10 μL。

(4) HPLC 法测定栀子中绿原酸含量：色谱柱为 Shimadzu Shim-pack Gist C₁₈ 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液（5：95）；体积流量为 1.0 mL/min；检测波长 327 nm；柱温 30 ℃；进样体积 10 μL。

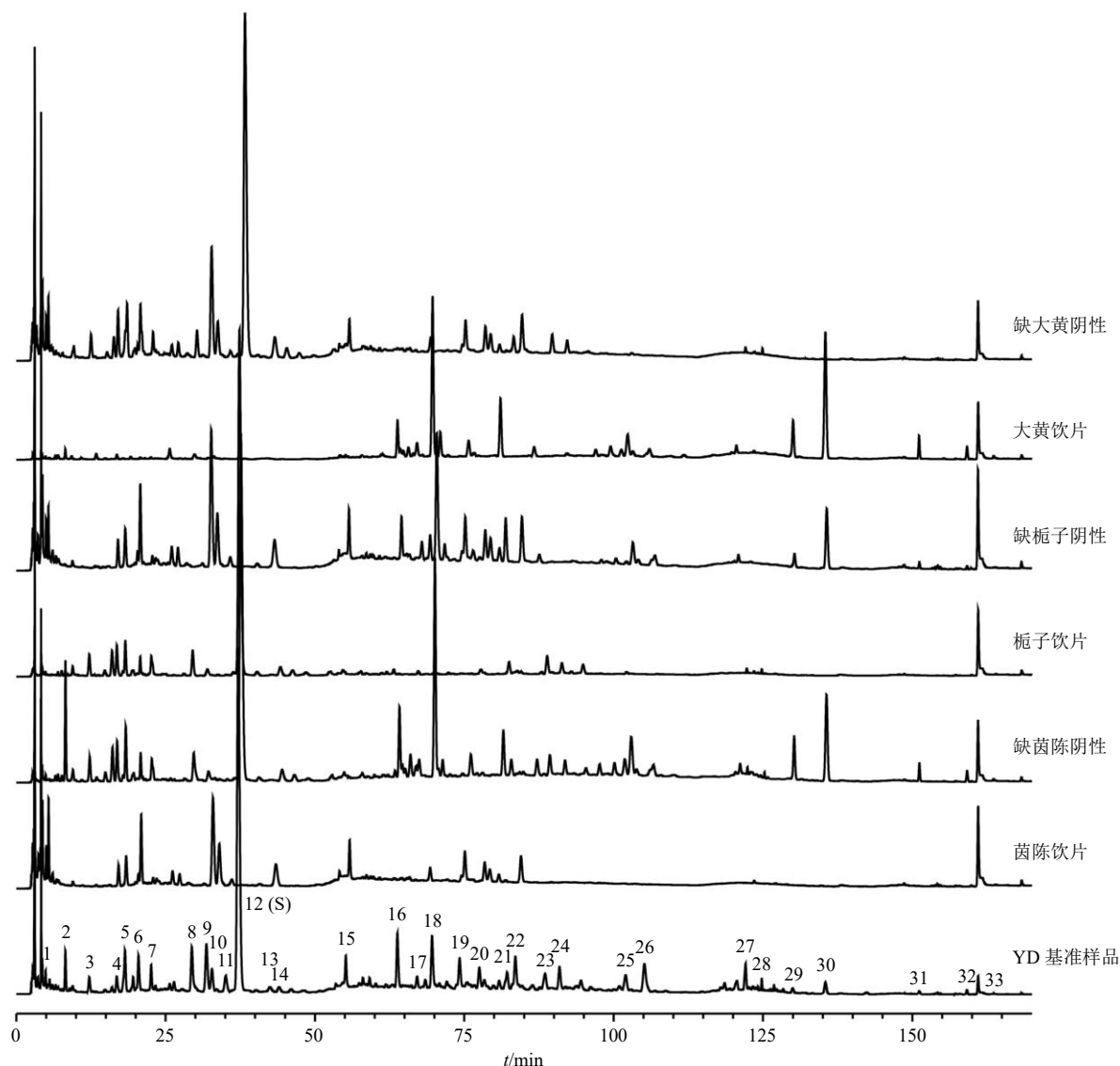


图 3 茵陈蒿汤单味药及阴性供试品溶液的 HPLC 图

Fig. 3 HPLC of single medicinal material of YD and negative test solution

(5) HPLC 法测定大黄中 5 种游离蒽醌含量：色谱柱为 Shimadzu Shim-pack Gist C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液 (80:20)；体积流量为 1.0 mL/min；检测波长 254 nm；柱温 30 ℃；进样体积 10 μL。

(6) HPLC 法测定经典名方茵陈蒿汤基准物质中 8 种指标性成分含量：色谱柱为 Shimadzu Shim-pack Gist C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液，梯度洗脱：0~10 min, 5% 乙腈；10~18 min, 5%~9% 乙腈；18~45 min, 9%~10% 乙腈；45~55 min, 10%~20% 乙腈；55~85 min, 20%~30% 乙腈；85~95 min, 30%~40% 乙腈；95~115 min, 40% 乙腈；115~120 min, 40%~55% 乙腈；120~135 min, 55%~70% 乙腈；135~145 min,

70%~85% 乙腈；体积流量为 1.0 mL/min；绿原酸检测波长 327 nm，栀子苷检测波长 238 nm，对羟基苯乙酮检测波长 275 nm，5 种游离蒽醌检测波长 254 nm；柱温 30 ℃；进样体积 10 μL。

2.3.2 单味饮片供试品溶液的制备

(1) 茵陈 (绿原酸)：取茵陈粉末 (过二号筛) 约 1 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 50% 甲醇 50 mL，称定质量，超声 30 min。放冷，再称定质量，用 50% 甲醇补足减失的质量，摇匀，10 000 r/min 离心 (离心半径 5 cm) 5 min，精密量取上清液 5 mL，置 25 mL 棕色量瓶中，加 50% 甲醇置刻度，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

(2) 茵陈 (对羟基苯乙酮)：取茵陈粉末 (过二号筛) 约 0.5 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密

表 3 15 批茵陈蒿汤基准样品特征峰比值分析

Table 3 Characteristic peaks ratio of 15 batches of benchmark samples of YD

样品	特征峰比值/%																
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12(S)	峰 13	峰 14	峰 15	峰 16	峰 17
S1	1.84	2.35	3.34	13.05	19.72	10.08	5.73	6.81	24.62	7.58	2.46	100.00	6.83	2.76	4.06	8.36	2.05
S2	0.92	1.72	2.13	10.08	10.95	10.27	3.36	9.63	13.01	5.67	3.94	100.00	1.97	1.34	3.85	21.09	3.71
S3	1.69	10.22	3.27	5.59	19.33	8.89	3.60	6.64	23.30	7.87	2.03	100.00	4.38	1.09	4.33	14.88	2.34
S4	1.53	7.23	1.63	2.64	9.01	5.45	1.76	13.08	16.36	5.09	1.66	100.00	4.19	1.03	3.55	8.38	2.96
S5	1.31	10.91	2.09	2.64	10.68	6.17	3.35	12.73	21.10	5.86	1.18	100.00	2.48	1.62	4.87	7.70	3.24
S6	2.32	7.08	3.19	11.28	30.74	16.28	4.55	6.75	28.17	9.14	2.08	100.00	5.63	1.60	6.65	19.86	3.88
S7	1.89	12.52	1.10	3.59	6.81	6.36	3.66	6.52	20.75	6.73	1.84	100.00	4.38	1.33	3.79	3.87	2.03
S8	1.40	8.24	1.66	4.28	8.12	5.65	3.26	9.12	14.55	5.46	1.57	100.00	3.10	0.89	3.32	5.76	1.87
S9	0.90	5.64	1.61	2.44	9.78	5.02	3.16	9.91	17.43	5.09	1.24	100.00	1.48	1.08	3.79	1.50	2.12
S10	1.53	2.45	1.49	6.74	13.20	4.93	3.49	24.33	13.47	4.70	1.88	100.00	3.17	1.19	2.98	8.10	3.42
S11	1.39	5.54	1.77	4.02	7.54	5.44	3.58	8.24	20.51	6.23	2.43	100.00	5.00	1.33	3.69	5.65	2.52
S12	1.89	3.34	2.01	3.67	7.03	3.53	2.92	11.60	9.25	4.02	2.58	100.00	2.63	1.10	2.12	6.47	3.51
S13	1.22	4.41	2.52	2.80	8.08	5.51	3.49	10.53	11.16	5.37	4.49	100.00	1.91	1.54	4.17	10.01	2.23
S14	3.01	13.78	4.35	9.10	17.21	10.55	2.92	9.16	22.28	6.93	3.98	100.00	5.58	3.53	6.35	11.61	3.35
S15	3.96	9.81	3.63	2.55	12.50	6.93	4.94	4.14	14.00	5.04	1.33	100.00	3.45	3.77	3.05	6.67	2.10

样品	特征峰比值/%																
	峰 18	峰 19	峰 20	峰 21	峰 22	峰 23	峰 24	峰 25	峰 26	峰 27	峰 28	峰 29	峰 30	峰 31	峰 32	峰 33	
S1	37.50	5.85	5.79	6.19	7.72	4.93	3.54	8.13	2.60	0.90	0.56	2.25	11.89	0.52	0.37	0.05	
S2	68.59	3.84	2.77	9.49	5.20	3.25	2.67	17.57	12.82	5.96	0.45	0.52	1.28	0.15	0.17	0.03	
S3	11.14	5.58	5.20	5.84	8.62	4.70	2.58	6.61	17.69	2.76	0.37	1.60	1.78	0.20	0.65	0.07	
S4	11.48	3.98	3.14	1.64	5.30	2.76	2.32	2.08	12.92	0.51	0.43	1.26	4.20	0.28	0.50	0.05	
S5	11.43	6.11	4.91	5.62	8.24	2.05	2.76	5.95	15.08	0.81	0.66	1.88	4.15	0.37	0.76	0.10	
S6	21.02	7.73	6.60	5.19	9.19	4.05	6.12	14.20	28.11	4.16	0.42	1.75	2.69	0.28	0.67	0.06	
S7	6.51	5.74	4.88	3.48	7.50	1.61	1.91	3.58	4.34	0.60	0.59	2.33	2.54	0.22	0.58	0.07	
S8	5.75	3.88	2.70	4.10	3.61	1.89	1.58	2.70	11.77	0.41	0.33	2.27	2.15	0.25	0.80	0.08	
S9	5.87	2.81	3.16	5.99	5.16	3.18	2.46	0.91	1.50	0.48	0.48	0.82	3.91	0.30	0.21	0.02	
S10	10.13	4.44	3.78	3.63	11.86	2.37	2.32	2.66	6.42	0.82	0.59	2.28	3.78	0.29	0.46	0.06	
S11	8.34	8.10	7.81	3.16	13.06	2.36	4.64	3.14	5.13	3.38	1.45	2.25	2.95	0.31	0.60	0.11	
S12	26.80	2.93	2.98	2.83	4.91	3.66	3.30	3.68	2.91	1.89	0.83	0.93	7.85	0.24	0.28	0.06	
S13	10.63	6.28	4.02	4.80	8.76	4.32	5.18	4.10	9.01	4.39	1.19	1.01	0.87	0.20	0.46	0.06	
S14	4.38	11.55	10.06	4.67	17.76	7.74	7.32	10.19	21.57	6.76	2.20	1.79	0.92	0.32	1.46	0.13	
S15	3.48	3.22	3.27	1.51	6.42	3.81	7.86	5.66	10.66	3.54	2.41	0.93	0.49	0.11	0.62	0.08	

加入 50%甲醇 25 mL，称定质量，超声 30 min。放冷，再称定质量，用 50%甲醇补足减失的质量，摇匀，10 000 r/min 离心（离心半径 5 cm）5 min，取上清液，过 0.45 μm 滤膜，即得。

（3）栀子（栀子苷）：取栀子粉末（过四号筛）约 0.1 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 25 mL，称定质量，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，10 000 r/min 离心（离心半径 5 cm）5 min，精密量取上清液 10 mL，置 25 mL 量瓶中，加甲醇置刻度，摇匀，过 0.45 μm 微孔滤膜，即得。

（4）栀子（绿原酸）：取栀子粉末（过四号筛）约 1 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 50% 甲醇 20 mL，称定质量，超声处理 30 min，放冷，

表 4 15 批茵陈蒿汤基准样品特征峰相对保留时间分析

Table 4 Analysis of relative retention time of characteristic peaks of 15 batches of benchmark samples of YD

样品	相对保留时间																
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12(S)	峰 13	峰 14	峰 15	峰 16	峰 17
S1	0.13	0.22	0.33	0.45	0.49	0.55	0.60	0.79	0.86	0.88	0.94	1.00	1.13	1.18	1.46	1.69	1.78
S2	0.13	0.22	0.33	0.45	0.49	0.55	0.60	0.79	0.86	0.88	0.94	1.00	1.14	1.19	1.47	1.69	1.78
S3	0.13	0.22	0.33	0.45	0.49	0.55	0.60	0.79	0.85	0.88	0.94	1.00	1.14	1.18	1.47	1.70	1.79
S4	0.13	0.22	0.33	0.45	0.48	0.54	0.60	0.79	0.85	0.88	0.94	1.00	1.13	1.18	1.46	1.69	1.78
S5	0.13	0.22	0.33	0.44	0.48	0.54	0.60	0.79	0.85	0.88	0.94	1.00	1.13	1.18	1.45	1.68	1.77
S6	0.13	0.22	0.33	0.45	0.49	0.55	0.61	0.79	0.86	0.88	0.94	1.00	1.14	1.19	1.48	1.72	1.81
S7	0.13	0.22	0.33	0.45	0.49	0.55	0.61	0.79	0.86	0.88	0.94	1.00	1.14	1.18	1.48	1.71	1.80
S8	0.13	0.22	0.33	0.45	0.49	0.55	0.61	0.79	0.86	0.88	0.94	1.00	1.14	1.18	1.49	1.72	1.81
S9	0.13	0.22	0.33	0.46	0.49	0.55	0.61	0.79	0.86	0.88	0.95	1.00	1.15	1.19	1.49	1.75	1.81
S10	0.13	0.23	0.33	0.45	0.49	0.55	0.61	0.79	0.86	0.88	0.94	1.00	1.14	1.19	1.49	1.72	1.81
S11	0.13	0.22	0.33	0.45	0.49	0.55	0.61	0.79	0.86	0.88	0.94	1.00	1.14	1.18	1.48	1.72	1.81
S12	0.13	0.22	0.33	0.45	0.49	0.55	0.61	0.79	0.86	0.88	0.94	1.00	1.15	1.18	1.49	1.72	1.81
S13	0.13	0.22	0.33	0.45	0.49	0.55	0.61	0.79	0.86	0.88	0.94	1.00	1.14	1.18	1.48	1.72	1.81
S14	0.13	0.22	0.33	0.45	0.48	0.54	0.60	0.79	0.85	0.88	0.94	1.00	1.13	1.18	1.45	1.68	1.77
S15	0.13	0.22	0.33	0.45	0.49	0.55	0.61	0.79	0.86	0.88	0.94	1.00	1.14	1.18	1.49	1.72	1.81
均值	0.13	0.22	0.33	0.45	0.49	0.55	0.60	0.79	0.86	0.88	0.94	1.00	1.14	1.18	1.48	1.71	1.80
RSD/%	0.80	1.21	0.28	0.80	0.52	0.71	0.75	0.14	0.17	0.12	0.35	0.00	0.55	0.17	0.98	1.10	0.93

样品	相对保留时间																
	峰 18	峰 19	峰 20	峰 21	峰 22	峰 23	峰 24	峰 25	峰 26	峰 27	峰 28	峰 29	峰 30	峰 31	峰 32	峰 33	
S1	1.85	1.97	2.06	2.19	2.22	2.36	2.43	2.71	2.81	3.21	3.29	3.43	3.57	3.98	4.19	4.31	
S2	1.85	1.98	2.06	2.19	2.23	2.36	2.43	2.72	2.80	3.22	3.29	3.43	3.57	3.98	4.19	4.31	
S3	1.85	1.98	2.06	2.19	2.22	2.36	2.42	2.71	2.80	3.23	3.30	3.44	3.59	4.00	4.21	4.33	
S4	1.85	1.97	2.06	2.18	2.22	2.35	2.42	2.71	2.79	3.20	3.28	3.42	3.56	3.97	4.18	4.29	
S5	1.83	1.96	2.04	2.17	2.20	2.34	2.40	2.69	2.77	3.17	3.24	3.38	3.52	3.92	4.13	4.25	
S6	1.88	2.01	2.10	2.23	2.26	2.40	2.47	2.76	2.85	3.28	3.35	3.49	3.64	4.05	4.27	4.38	
S7	1.87	2.00	2.09	2.21	2.25	2.39	2.45	2.78	2.84	3.28	3.36	3.50	3.65	4.07	4.28	4.40	
S8	1.88	2.00	2.09	2.22	2.25	2.39	2.46	2.78	2.84	3.28	3.36	3.50	3.65	4.07	4.29	4.41	
S9	1.88	2.01	2.10	2.23	2.26	2.40	2.47	2.79	2.85	3.31	3.38	3.52	3.67	4.10	4.32	4.44	
S10	1.88	2.01	2.10	2.23	2.27	2.40	2.47	2.77	2.86	3.29	3.37	3.51	3.65	4.07	4.29	4.41	
S11	1.87	2.00	2.09	2.21	2.25	2.39	2.45	2.77	2.83	3.28	3.35	3.49	3.64	4.06	4.28	4.40	
S12	1.88	2.00	2.09	2.22	2.26	2.39	2.46	2.78	2.84	3.30	3.38	3.52	3.66	4.09	4.31	4.43	
S13	1.87	2.00	2.09	2.21	2.25	2.38	2.45	2.74	2.83	3.28	3.36	3.50	3.64	4.07	4.28	4.40	
S14	1.83	1.96	2.04	2.16	2.20	2.33	2.40	2.71	2.76	3.18	3.25	3.39	3.53	3.93	4.14	4.25	
S15	1.88	2.00	2.09	2.22	2.26	2.39	2.46	2.78	2.84	3.30	3.37	3.51	3.66	4.08	4.30	4.42	
均值	1.86	1.99	2.08	2.20	2.24	2.38	2.44	2.75	2.82	3.25	3.33	3.47	3.61	4.03	4.24	4.36	
RSD/%	0.93	0.94	0.95	0.98	0.98	1.00	1.02	1.29	1.06	1.44	1.45	1.41	1.41	1.47	1.48	1.49	

再称定质量，用 50%甲醇补足减失的质量，摇匀，10 000 r/min 离心（离心半径 5 cm）5 min，取上清液，过 0.45 μm 微孔滤膜，即得。

（5）大黄（5 种游离蒽醌）：取大黄粉末（过四号筛）约 0.5 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 25 mL，称定质量，90 ℃加热回流 1 h，

放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3.3 茵陈蒿汤基准样品供试品溶液的制备 同“2.2.2”项。

2.3.4 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸对照品适量,加 50%甲醇制成质量浓度为 251.0 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品母液;精密称取栀子苷对照品适量,加甲醇制成质量浓度为 230.0 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品母液;精密称取对羟基苯乙酮对照品适量,加 50%甲醇制成质量浓度为 363.0 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品母液;精密称取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品适量,加甲醇制成质量浓度分别为 44.8、107.2、86.4、38.8、39.0 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品母液。

精密称取绿原酸、栀子苷、对羟基苯乙酮适量,加 50%甲醇制成质量浓度分别为 2 110.0、8 420.0、

156.8 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液;精密称取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚适量,加甲醇制成质量浓度分别为 72.8、177.6、41.6、43.2、19.6 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液;分别精密吸取上述 2 种混合对照品溶液各 5 mL 至 10 mL 棕色量瓶中,混匀,配制成含 8 种指标性成分的混合对照品溶液,并逐级稀释,得到 7 个系列质量浓度溶液,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.3.5 茵陈蒿汤基准样品的指标成分含量测定方法学考察

(1) 专属性考察:按照“2.3.1”项下测定茵陈蒿汤基准物质指标性成分含量方法进行实验,结果供试品溶液中各待测成分色谱峰分离度均大于 1.5,符合含量测定要求,其他杂质峰及空白对照溶液对待测成分均无干扰。色谱图见图 4。

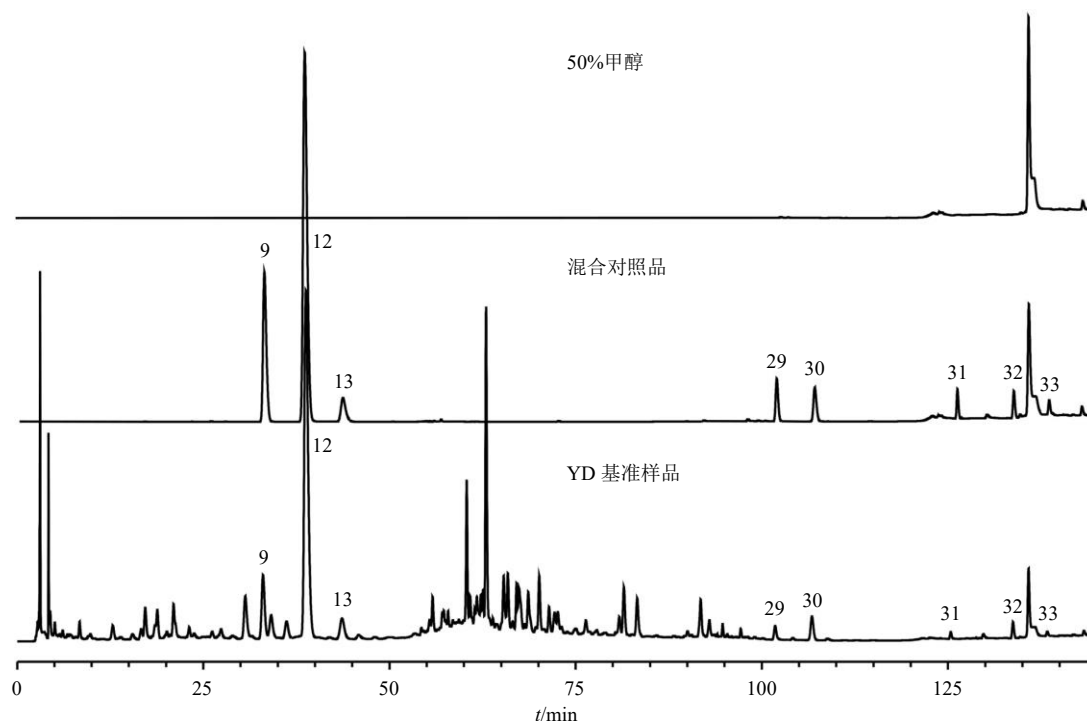


图 4 空白溶剂、混合对照品和供试品溶液 HPLC 图

Fig. 4 HPLC chromatograms of blank solvent, mixed reference substances and test solution

(2) 线性关系考察:取“2.3.4”项下的混合对照品溶液,按“2.3.1”项下的色谱条件进样 7 个系列质量浓度,建立茵陈蒿汤基准样品中 8 种指标性成分的标准曲线。以对照品溶液的质量浓度为横坐标 (X),以峰面积积分值为纵坐标 (Y) 进行线性回归,得线性回归方程:绿原酸 $Y=30\,762.607\,7\,X-44\,547.844\,8$, $R^2=0.999\,9$,线性范围 16.48~1 055.00 $\mu\text{g/mL}$; 栀子苷 $Y=14\,435.473\,7\,X-120\,815.574\,7$,

$R^2=1.000\,0$,线性范围 65.78~4 210.00 $\mu\text{g/mL}$; 对羟基苯乙酮 $Y=61\,433.289\,3\,X-2\,311.712\,6$, $R^2=0.999\,9$,线性范围 1.22~78.40 $\mu\text{g/mL}$; 芦荟大黄素 $Y=45\,553.528\,3\,X+3\,856.672\,4$, $R^2=0.999\,8$,线性范围 0.57~36.40 $\mu\text{g/mL}$; 大黄酸 $Y=42\,859.763\,0\,X+4\,336.143\,7$, $R^2=1.000\,0$,线性范围 1.39~88.80 $\mu\text{g/mL}$; 大黄素 $Y=35\,958.601\,1\,X+1\,111.534\,5$, $R^2=0.999\,9$,线性范围 0.32~20.80 $\mu\text{g/mL}$; 大黄酚 $Y=$

51 661.595 4 $X-3$ 017.304 6, $R^2=1.000$ 0, 线性范围 0.34~21.60 $\mu\text{g/mL}$; 大黄素甲醚 $Y=31$ 657.585 6 $X+574.270$ 1, $R^2=0.999$ 5, 线性范围 0.15~9.80 $\mu\text{g/mL}$; 结果表明各指标性成分在线性范围内线性关系良好。

(3) 精密度考察: 取茵陈蒿汤基准样品 (S1) 供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 分别计算绿原酸、槲子苷、对羟基苯乙酮、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 0.26%、0.05%、1.96%、0.20%、0.14%、2.29%、0.32%、1.45%, 表明系统精密度良好。

(4) 稳定性考察: 取茵陈蒿汤基准样品 (S1) 供试品溶液, 分别于制备后 0、3、6、9、12、24 h 按“2.3.1”项下色谱条件进样, 分别计算绿原酸、槲子苷、对羟基苯乙酮、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 0.37%、0.06%、2.13%、0.20%、0.24%、2.54%、0.36%、1.51%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

(5) 重复性考察: 取茵陈蒿汤基准样品 (S1) 冻干粉, 按“2.3.3”项下方法平行制备供试品溶液 6 份, 按“2.3.1”项下色谱条件分别进样, 分别计算绿原酸、槲子苷、对羟基苯乙酮、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 RSD

分别为 1.31%、2.03%、1.18%、0.40%、0.40%、0.40%、1.77%、0.50%, 结果表明该方法重复性良好。

(6) 加样回收率考察: 精密称取 6 份已测定指标成分含量的同一批次茵陈蒿汤基准样品 (S1) 冻干粉约 0.30 g, 根据样品中 8 种指标成分的含量以 100% 的比例加入各指标成分的对照品, 按“2.3.3”项下制备样品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件分别进样, 分别计算加样回收率及其 RSD, 结果绿原酸、槲子苷、对羟基苯乙酮、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的平均加样回收率分别为 100.52%、97.16%、99.50%、100.06%、97.71%、96.99%、98.06%、97.34%, RSD 分别为 3.32%、2.75%、1.19%、0.94%、1.35%、1.66%、1.42%、2.83%, 结果表明该方法准确度良好。

2.3.6 15 批茵陈蒿汤基准样品指标成分的含量测定及量值传递关系研究 按照“2.3.3”项下方法制备茵陈蒿汤基准样品供试品溶液, 采用“2.3.1”项下色谱条件进样, 测定 15 批茵陈蒿汤基准样品中指标成分的含量。计算饮片-基准样品中指标成分含量的转移率, 结果见表 5、6。

转移率 = w/W
 w 为基准样品中指标成分的含量, W 为对应批次饮片中指标成分的含量

表 5 茵陈蒿汤饮片-基准样品中绿原酸、槲子苷和对羟基苯乙酮的转移率
Table 5 Transfer rate of chlorogenic acid, geniposide and 4'-hydroxyacetophenone in herbal pieces-benchmark samples of YD

编号	绿原酸/%					槲子苷/%			对羟基苯乙酮/%		
	茵陈饮片	槲子饮片	饮片总量	基准样品	转移率	槲子饮片	基准样品	转移率	茵陈饮片	基准样品	转移率
S1	0.713	0.075	0.458	0.235	51.356	4.704	3.330	70.795	0.034	0.031	91.792
S2	0.442	0.051	0.286	0.171	59.750	5.878	4.658	79.246	0.012	0.010	86.267
S3	0.713	0.106	0.470	0.233	49.572	5.356	3.462	64.635	0.025	0.022	89.846
S4	0.757	0.042	0.471	0.221	47.022	6.427	4.762	74.089	0.039	0.035	88.923
S5	0.820	0.055	0.514	0.276	53.643	5.632	4.609	81.823	0.022	0.019	85.869
S6	0.644	0.084	0.419	0.247	58.812	5.201	3.153	60.622	0.030	0.028	93.380
S7	0.834	0.030	0.512	0.229	44.755	8.706	3.923	45.062	0.035	0.028	79.395
S8	0.676	0.031	0.418	0.202	48.381	8.737	4.922	56.341	0.028	0.025	87.977
S9	0.738	0.043	0.460	0.282	61.345	7.058	5.757	81.565	0.015	0.013	83.687
S10	0.403	0.041	0.258	0.130	50.223	5.624	3.332	59.244	0.022	0.018	85.791
S11	0.500	0.042	0.317	0.193	61.018	8.566	3.457	40.365	0.028	0.025	88.485
S12	0.489	0.041	0.310	0.107	34.600	8.539	4.219	49.412	0.026	0.018	67.307
S13	0.442	0.090	0.301	0.136	45.231	6.414	4.309	67.180	0.012	0.010	82.892
S14	0.609	0.075	0.396	0.172	43.368	4.704	3.652	77.625	0.029	0.019	66.473
S15	0.743	0.042	0.463	0.149	32.290	5.555	4.090	73.640	0.017	0.016	93.596

表 6 茵陈蒿汤饮片-基准样品中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚和游离总蒽醌的转移率及其出膏率
Table 6 Transfer rate of aloecmodin, rhein, and emodin, chrysophanol, physcion and free total anthraquinones in herbal pieces-benchmark samples and its extraction rate of YD

编号	芦荟大黄素/%			大黄酸/%			大黄素/%			出膏率/%
	大黄饮片	基准样品	转移率	大黄饮片	基准样品	转移率	大黄饮片	基准样品	转移率	
S1	0.072	0.026	35.882	0.161	0.147	91.091	0.097	0.008	7.817	23.170
S2	0.023	0.008	35.966	0.033	0.022	65.948	0.019	0.003	15.878	25.119
S3	0.092	0.019	21.246	0.039	0.023	59.736	0.035	0.003	8.728	26.391
S4	0.119	0.021	17.253	0.219	0.074	33.617	0.174	0.006	3.376	28.204
S5	0.111	0.030	26.943	0.159	0.070	44.241	0.139	0.007	5.256	29.952
S6	0.127	0.019	15.093	0.142	0.031	22.099	0.082	0.004	4.624	26.158
S7	0.149	0.032	21.293	0.086	0.037	42.731	0.100	0.004	3.731	27.440
S8	0.155	0.039	25.116	0.163	0.039	23.930	0.094	0.005	5.797	27.925
S9	0.217	0.016	7.398	0.409	0.082	20.180	0.402	0.007	1.841	28.182
S10	0.172	0.027	15.746	0.098	0.048	48.741	0.091	0.004	4.748	27.451
S11	0.112	0.025	22.633	0.074	0.036	48.288	0.086	0.004	5.173	28.285
S12	0.094	0.013	13.642	0.173	0.123	71.204	0.027	0.004	16.085	26.270
S13	0.108	0.016	14.565	0.066	0.014	20.820	0.048	0.004	7.635	26.079
S14	0.173	0.015	8.853	0.188	0.009	4.971	0.092	0.003	3.653	27.849
S15	0.190	0.014	7.412	0.129	0.007	5.446	0.097	0.003	2.658	29.606

编号	大黄酚/%			大黄素甲醚/%			游离总蒽醌/%		
	大黄饮片	基准样品	转移率	大黄饮片	基准样品	转移率	大黄饮片	基准样品	转移率
S1	0.082	0.004	4.836	0.047	0.001	1.790	0.460	0.185	40.274
S2	0.047	0.003	5.450	0.029	0.001	1.965	0.150	0.036	23.932
S3	0.324	0.007	2.233	0.113	0.001	1.022	0.602	0.054	8.959
S4	0.492	0.008	1.545	0.202	0.001	0.556	1.206	0.109	9.025
S5	0.424	0.011	2.568	0.173	0.002	1.332	1.005	0.121	11.998
S6	0.217	0.007	3.104	0.105	0.001	0.872	0.674	0.062	9.218
S7	0.754	0.007	0.961	0.338	0.001	0.370	1.426	0.081	5.653
S8	0.943	0.012	1.307	0.333	0.002	0.562	1.687	0.098	5.779
S9	0.662	0.004	0.599	0.320	0.001	0.173	2.010	0.110	5.492
S10	0.345	0.005	1.454	0.163	0.001	0.596	0.870	0.085	9.792
S11	0.641	0.006	0.995	0.206	0.002	0.790	1.119	0.074	6.587
S12	0.057	0.004	6.922	0.103	0.001	0.740	0.454	0.145	31.977
S13	0.247	0.006	2.588	0.110	0.001	1.283	0.578	0.041	7.055
S14	0.918	0.012	1.293	0.348	0.003	0.723	1.719	0.042	2.467
S15	0.848	0.008	0.898	0.311	0.001	0.477	1.575	0.033	2.081

由表 5、6 可知, 15 批茵陈蒿汤基准样品中指标性成分绿原酸的质量分数为 0.107%~0.282%, 转移率为 32.290%~61.345%, 平均质量分数为 0.199%, 平均转移率为 49.424%; 栀子苷的质量分数为 3.153%~5.757%, 转移率为 40.365%~81.823%, 平均质量分数为 4.109%, 平均转移率为 65.443%; 对羟基苯乙酮的质量分数为 0.010%~0.035%, 转移率为 66.473%~93.596%, 平均质量分数为 0.021%, 平均转移率为 84.779%; 芦荟大黄素的质量分数为 0.008%~0.039%, 转移率为 7.398%~35.966%, 平均质量分数为 0.021%, 平均转移率为 19.269%; 大黄酸的质量分数为 0.007%~0.147%,

转移率为 4.971%~91.091%，平均质量分数为 0.051%，平均转移率为 40.203%；大黄素的质量分数为 0.003%~0.008%，转移率为 1.841%~16.085%，平均质量分数为 0.005%，平均转移率为 6.467%；大黄酚的质量分数为 0.003%~0.012%，转移率为 0.599%~6.922%，平均质量分数为 0.007%，平均转移率为 2.450%；大黄素甲醚的质量分数为 0.001%~0.003%，转移率为 0.173%~1.965%，平均质量分数为 0.001%，平均转移率为 0.883%；15 批基准样品中 5 种游离总蒽醌的质量分数为 0.033%~0.185%，转移率为 2.081%~40.274%，平均质量分数为 0.085%，平均转移率为 12.019%。

2.3.7 出膏率测定 15 批茵陈蒿汤基准样品冻干后记录质量，计算出膏率，结果见表 6，结果表明，15 批茵陈蒿汤基准样品出膏率为 23.170%~29.952%，平均出膏率为 27.205%，出膏率在均值的 85.168%~108.826%，13 批基准样品出膏率在其均值的 $\pm 10\%$ 范围内，其中 S1 出膏率低于均值的 $\pm 10\%$ 范围，S5 出膏率略高于均值的 $\pm 10\%$ 范围。

3 讨论

3.1 指标成分的选择及饮片中指标性成分含量测定色谱条件的优化

君药茵陈主要含香豆素、黄酮、有机酸类等，其中有机酸与茵陈的清热利湿、利胆作用相关，有明显的抗病毒、保肝利胆等作用^[5-7]，《中国药典》2020 年版规定绵茵陈的含量测定项为绿原酸，茵陈提取物的含量测定项还包括对羟基苯乙酮。臣药梔子的主要有效成分是环烯醚萜苷类，其中梔子苷具有利胆、抗炎、镇痛、降低血糖等药理活性^[8-9]，且为药典规定梔子含量测定项。佐药大黄含蒽醌衍生物类、有机酸类、黄酮类、苷类及鞣质等多种有效成分^[10]，而蒽醌类具有保肝降酶、利胆等作用，结合蒽醌在高温或持续受热时易分解成游离型蒽醌^[11]，故此仅先选择游离型蒽醌作为指标性成分。

茵陈蒿较滨蒿而言，以绿原酸等为主要质量标志性成分的含量明显较高，主产于陕西、甘肃、河北等地^[12-13]。梔子基原确定，临床常用整个梔子入药，主产区为江西、福建、四川等省^[14]。掌叶大黄为大黄的主要栽培种，较其他 2 个基原的大黄主产地资源丰富，采收较易，资源易受保证，主产于甘肃、青海和四川等省^[15-16]。在对饮片中指标性成分进行含量分析时，按照《中国药典》2020 年版药典中规定的色谱条件进样发现，指标性成分绿原酸、

梔子苷及游离蒽醌均未在相应饮片中实现基线分离，分离度不满足含量测定要求，故先进行色谱条件的优化，结果发现改变流动相比比例后均可满足含量测定要求。

3.2 基准样品供试品溶液的制备考察

经典名方基准样品，是以古代医籍中记载的古代经典名方制备方法为依据，制备的中药药用物质的标准，其基本形态是冻干品或浓缩浸膏^[17]，考虑到浓缩浸膏不易保存且大黄部分化学成分热稳定性差^[18]，因此考虑以冻干品为茵陈蒿汤基准样品的保存形式。

本研究考察了水、25%甲醇、50%甲醇及甲醇对基准样品的复溶效果。发现 50%甲醇与水复溶的特征图谱基本一致，可以反映基准样品的整体信息。水和 25%甲醇复溶后，样品溶液较为黏稠，即使高速离心数分钟后仍不易通过滤膜，而 50%甲醇复溶经离心后上清液易过滤膜。50%甲醇与水复溶的基准样品对指标成分的含量测定影响较小，而甲醇复溶后含量测定影响较大，分析原因可能是甲醇复溶产生较多沉淀影响指标性成分的溶出^[19]。综上所述，最终选择 50%甲醇作为基准样品的复溶溶剂。

3.3 基准样品指纹图谱的方法建立

在建立指纹图谱色谱条件时，考察几种不同流动相组成对色谱图的影响，包括乙腈-水、甲醇-水、乙腈-0.1%磷酸水溶液、甲醇-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.2%磷酸水溶液，结果发现流动相使用乙腈比甲醇更易获得平稳基线，水相加入磷酸后分离效果更优，但是磷酸的浓度对样品的分离及响应值的影响不大，故选择乙腈-0.1%磷酸水溶液作为流动相。

本实验采用 PDA 检测器在 190~800 nm 紫外扫描，结果发现指纹图谱的检测波长以 254 nm 处色谱峰最为丰富，且 8 个指标成分均得到分离。实验发现基准样品溶液在 20%~30%乙腈条件下色谱峰丰富，成分较多，基准样品在含量测定色谱条件下 50~80 min 内基线不稳定，分离效果不佳，不能确保指纹图谱的评价效果，故此建立指纹图谱色谱条件时宜适当延长梯度洗脱时间，获得更好的分离效果。15 批次基准样品的指纹图谱与对照图谱的相似度均 >0.9 ，各批次间样品相似度均 >0.8 ，说明茵陈蒿汤基准样品制备工艺稳定，不同批次供试品的主要物质差异较小。

3.4 基准样品的量值传递

对共有峰的归属进行分析时发现共有 11 个共有

峰由大黄饮片传递到基准样品中,茵陈饮片贡献 12 个共有峰,栀子饮片贡献 13 个共有峰,有 3 个共有峰为茵陈和栀子所共有。15 批茵陈蒿汤基准样品出膏率为 23.170%~29.952%,平均出膏率为 27.205%,13 批基准样品出膏率在其均值的 $\pm 10\%$ 范围内,S5 略高于均值的 $\pm 10\%$ 范围,S1 低于均值的 $\pm 10\%$ 范围,各批次的出膏率均在其均值的 70%~130%,表明制备工艺较为稳定。

以基准样品指标成分转移率在均值的 $\pm 30\%$ 为度量标准,15 批茵陈蒿汤基准样品中对羟基苯乙酮转移率完全达到要求,S7、S11 批次的栀子苷转移率略低于度量标准,S15 批次的绿原酸略低于度量标准,且该 3 种指标成分的平均转移率均在 45%以上,表明这 3 种指标成分可以较为稳定的从相应饮片转移至茵陈蒿汤基准样品中。其中绿原酸的转移率为 32.290%~61.345%,平均转移率为 49.424%,根据倪丽丽等^[20]报道的 15 批茵陈标准汤剂中绿原酸的转移率及窦志华等^[21]报道的 23 批栀子标准汤剂中绿原酸的转移率可得出两药煎煮液混合得到的绿原酸平均转移率大致为 48.96%,两者结果相差较小。栀子苷的转移率为 40.365%~81.823%,平均转移率为 65.443%,窦志华等^[21]报道的 23 批栀子标准汤剂的相应数据分别为 55.30%~95.06%和 77.16%,两者结果存在一定偏差,分析可能原因是煎煮过程及单煎与合煎导致的差异。

5 种游离蒽醌的转移率变化差异较大,不同批次游离总蒽醌的转移率在 2.081%~40.274%,分析原因可能是在制备过程受饮片差异、煎煮环境等因素影响导致转移率相差较大^[18],所购入的 15 批大黄饮片中有成块或厚片的不同形式,厚片的大小也不尽相同,后期制剂生产可考虑所用中药饮片的质量一致性或者不同批次饮片混批投料用以保证量值传递的均一性^[22-23]。

5 种游离总蒽醌的转移率为 2.081%~40.274%,平均转移率为 12.019%,戴莹等^[19]报道的 23 批大黄标准汤剂的相应数据分别为 5.44%~37.95%和 11.03%,两者结果差异较小。大黄中游离蒽醌类化合物水溶性较差,转移率较低,大黄素甲醚、大黄酚、大黄素的平均转移率分别为 0.883%、2.450%和 6.467%,芦荟大黄素为 19.269%,大黄酸相对较高,为 40.203%。但大体上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,极性较小,水煎液提取效果不理想,已有多

篇文献提到标准汤剂中脂溶性成分的转移率低的问题^[24]。大黄中游离蒽醌类化合物热稳定性差,随煎煮时间的影响显著,故在后期制剂生产中应改进提取工艺,以提高基准样品的有效成分含量且保证其均一、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] 汉·张仲景述. 晋·王叔和撰次. 钱超尘, 郝万山整理. 伤寒论 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 13.
- [2] 李高辉, 吕文良. 简述茵陈蒿汤古今临床研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(7): 90-95.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 24, 250, 259.
- [4] 黄玉宇, 陈汀, 沈晗, 等. 茵陈蒿汤煎煮工艺的优化 [J]. 中成药, 2021, 43(5): 1135-1140.
- [5] 杜微波, 张志强, 万莹莹, 等. 茵陈蒿汤基准样品特征图谱的建立 [J]. 亚太传统医药, 2021, 17(12): 82-86.
- [6] 刘玉萍, 邱小玉, 刘烨, 等. 茵陈的药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(9): 2235-2241.
- [7] Cai Y J, Zheng Q, Sun R, et al. Recent progress in the study of *Artemisiae Scopariae Herba* (Yin Chen), a promising medicinal herb for liver diseases [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 130: 110513.
- [8] Tian J Z, Qin S S, Han J Y, et al. A review of the ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Fructus Gardeniae* (Zhi-zi) [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 289: 114984.
- [9] 刘鹏, 刘凤英, 黄颖, 等. 栀子中栀子苷的研究进展 [J]. 农产品加工, 2021(23): 72-75.
- [10] 金丽霞, 金丽军, 栾仲秋, 等. 大黄的化学成分和药理研究进展 [J]. 中医药信息, 2020, 37(1): 121-126.
- [11] 唐艳, 张永, 潘翔玲, 等. 大黄蒽醌类成分在不同煎煮时间内的含量变化分析 [J]. 中医药临床杂志, 2022, 34(9): 1707-1711.
- [12] 周仔莉, 贾文江, 李鹏, 等. 基于 HPLC 指纹图谱对不同基原茵陈的区分及各品种茵陈质量评价 [J]. 现代中药研究与实践, 2022, 36(5): 12-18.
- [13] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第五十七卷, 第三分册) [M]. 北京: 科学出版社, 1991: 216-218.
- [14] 李明利, 赵佳琛, 金艳, 等. 经典名方中栀子的本草考证 [J]. 中国现代中药, 2020, 22(8): 1287-1302.
- [15] 刘杰, 刘培, 郭盛, 等. 掌叶大黄不同组织器官中主要资源性化学成分的分析评价 [J]. 中草药, 2017, 48(3): 567-572.
- [16] 荣晓惠, 刘艳, 王秋茹, 等. 不同产区掌叶大黄酒蒸前后指纹图谱的建立及 3 种差异性成分的含量测定 [J]. 中国药房, 2022, 33(3): 280-286.

- [17] 张钰明, 杜守颖, 白洁, 等. 经典名方真武汤的基准样品量值传递分析 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(4): 820-829.
- [18] 刘明松, 邓亚伟, 忻晓东, 等. 经典名方三化汤基准样品量值传递研究 [J]. 中草药, 2023, 54(11): 3501-3511.
- [19] 戴莹, 施凯, 窦志华, 等. 大黄标准汤剂量值传递规律研究 [J]. 中草药, 2021, 52(10): 2938-2950.
- [20] 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.
- [21] 窦志华, 许波, 居宇峰, 等. 栀子标准汤剂量值传递规律研究 [J]. 中草药, 2021, 52(23): 7162-7175.
- [22] 樊启猛, 贺鹏, 李海英, 等. 经典名方基准样品研制的关键技术分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(15): 202-209.
- [23] 高武锋, 周湘杰, 庄欣雅, 等. 基于混料设计的经典名方当归补血汤喷雾干燥工艺研究 [J]. 中草药, 2023, 54(7): 2086-2095.
- [24] 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.

[责任编辑 郑礼胜]