

经典名方葛根芩连汤基准样品的 HPLC 指纹图谱及量质传递规律研究

陈佳美, 陈蓉, 成颜芬, 杨晓琴, 王潇, 傅超美, 章津铭*, 吴亿晗*

成都中医药大学药学院, 西南特色中药资源国家重点实验室, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川 成都 611137

摘要: 目的 建立经典名方葛根芩连汤 (Gegen Qinlian Decoction, GQD) 基准样品的 HPLC 指纹图谱及指标性成分含量测定方法, 研究 GQD 基准样品量质传递规律。方法 根据《伤寒论》记载方法遵古制备了 15 批 GQD 基准样品, 并建立了 15 批基准样品的 HPLC 指纹图谱, 明确指纹图谱中峰归属和相似度范围, 并对出膏率范围、指标性成分含量范围及转移率范围等量质传递指标进行分析, 初步建立 GQD 基准样品的质量控制体系。结果 15 批 GQD 共标定了 34 个共有峰, 且相似度良好 (>0.99)。基准样品中 11 种指标性成分质量分数分别为葛根素 0.803 1%~1.093 8%, 大豆苷 0.104 8%~0.178 9%, 大豆苷元 0.011 7%~0.024 4%, 黄芩苷 0.470 9%~0.736 9%, 汉黄芩苷 0.211 2%~0.219 9%, 黄芩素 0.001 1%~0.002 2%, 汉黄芩素 0.001 2%~0.002 2%, 盐酸小檗碱 0.053 2%~0.115 4%, 巴马汀 0.022 4%~0.042 3%, 甘草苷 0.118 8%~0.195 4%, 甘草酸 0.087 6%~0.099 2%。饮片至水煎液、水煎液至基准样品的平均转移率分别为葛根素 17.71%~19.69%、84.18%~104.00%, 大豆苷 10.32%~13.65%、86.90%~105.38%, 大豆苷元 21.13%~27.65%、64.64%~104.09%, 黄芩苷 22.46%~23.99%、71.58%~107.61%, 汉黄芩苷 21.38%~28.16%、82.54%~106.78%, 黄芩素 2.15%~3.81%、51.85%~83.33%, 汉黄芩素 4.83%~9.55%、43.75%~73.33%, 盐酸小檗碱 6.33%~8.70%、60.33%~99.95%, 巴马汀 11.09%~15.79%、60.56%~76.94%, 甘草苷 57.82%~76.53%、80.98%~103.70%, 甘草酸 14.98%~18.08%、87.96%~106.12%。15 批基准样品干膏率传递率的均值为 81.35%。结论 通过指纹图谱、出膏率及指标性成分含量测定相结合, 对经典名方 GQD 基准样品的量质传递过程进行分析, 可为后续 GQD 经典名方制剂的质量控制研究提供参考。

关键词: 经典名方; 葛根芩连汤; 基准样品; HPLC; 指纹图谱; 量质传递; 伤寒论; 葛根素; 大豆苷; 大豆苷元; 黄芩苷; 汉黄芩苷; 黄芩素; 汉黄芩素; 盐酸小檗碱; 巴马汀; 甘草苷; 甘草酸; 出膏率

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)04-1189-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.04.013

Establishment of HPLC fingerprint chromatogram and quantity-quality transmitting of benchmark samples of classical prescription Gegen Qinlian Decoction

CHEN Jiamei, CHEN Rong, CHENG Yanfen, YANG Xiaoqin, WANG Xiao, FU Chaomei, ZHANG Jinming, WU Yihan

Key Laboratory of Standardization of Chinese Materia Medica, Ministry of Education, State Key Laboratory of Southwest Specialty Chinese Medicine Resources, College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective The HPLC fingerprint and the content determination method of the benchmark sample of Gegen Qinlian Decoction (葛根芩连汤, GQD) were established to study the rule of quantitative transmitting of GQD benchmark sample. **Methods** Fifteen batches of GQD benchmark samples were prepared according to the record method of "Treatise on Febrile Diseases", and the HPLC fingerprint of 15 batches of benchmark samples was established. The peak attribution and similarity range in the fingerprint were clarified, and the quality transfer indexes such as the range of extract yield, the content range of index components and the range of transfer rate were analyzed. The quality control system of GQD benchmark samples was preliminarily established. **Results**

收稿日期: 2023-07-18

基金项目: 国家中医药管理局中药创新团队及人才支持计划项目 (ZYXCXTD-D-202209); 2021 年成都市科技人才创新创业项目 (2021-RC05-00020-CG)

作者简介: 陈佳美, 女, 硕士研究生, 专业方向为中药新制剂、新剂型、新技术研究。Tel: 15884482775 E-mail: 2974363675@qq.com

*通信作者: 章津铭, 教授, 主要从事中药新剂型与新制剂研究。Tel: 13551043885 E-mail: cducmzjm@126.com

吴亿晗, 讲师, 主要从事中药新剂型与新制剂研究。Tel: 15680803903 E-mail: yihanwuone@126.com

A total of 34 common peaks were calibrated for 15 batches of GQD, and the similarity was good (> 0.99). The contents of puerarin, daidzin, daidzein, baicalin, wogonoside, baicalein, wogonin, berberine hydrochloride, palmatine, liquiritin, glycyrrhizic acid in the benchmark sample were 0.803 1%—1.093 8%, 0.104 8%—0.178 9%, 0.011 7%—0.024 4%, 0.470 9%—0.736 9%, 0.211 2%—0.219 9%, 0.001 1%—0.002 2%, 0.001 2%—0.002 2%, 0.053 2%—0.115 4%, 0.022 4%—0.042 3%, 0.118 8%—0.195 4%, 0.087 6%—0.099 2%, respectively. The average transfer rates of decoction pieces to decoction and decoction to benchmark samples were 17.71%—19.69% and 84.18%—104.00% for puerarin, 10.32%—13.65% and 86.90%—105.38% for daidzein, 21.13%—27.65% and 64.64%—104.09% for daidzein, 22.46%—23.99% and 71.58%—107.61% for baicalin, and 21.38%—28.16% and 82.54%—106.78% for wogonoside, 2.15%—3.81% and 51.85%—83.33% for baicalein, 4.83%—9.55% and 43.75%—73.33% for wogonin, 6.33%—8.70% and 60.33%—99.95% for berberine hydrochloride, 11.09%—15.79% and 60.56%—76.94% for palmatine, 57.82%—76.53% and 80.98%—103.70% liquiritin, 14.98%—18.08% and 87.96%—106.12% for glycyrrhizic acid, respectively. The average dry paste rate transfer rate of 15 batches of benchmark samples was 81.35%. **Conclusion** Through the combination of fingerprint, extract yield and index component content determination, the quality transfer process of the benchmark sample of the classic prescription GQD was analyzed, which can provide reference for the quality control research of the classic prescription preparation of GQD.

Key words: classic prescription; Gegen Qinlian Decoction; benchmark samples; HPLC; fingerprint chromatogram; quantity-quality transmitting; *Treatise on Febrile Diseases*; puerarin; daidzin; daidzein; baicalin; wogonoside; baicalein; wogonin; berberine hydrochloride; palmatine; liquiritin; glycyrrhizic acid; extract yield

经典名方葛根芩连汤 (Gegen Qinlian Decoction, GQD) 出自东汉著名医家张仲景所著《伤寒论》第 34 条, 原方名为葛根黄芩黄连汤, 至近代《中国医药大辞典》始成“葛根芩连汤”方名^[1]。全方由葛根、黄芩、黄连、炙甘草 4 味中药组成, 方中以葛根为君, 既能清热解表, 又能升发脾胃清阳之气而治下痢; 臣药以黄芩、黄连苦寒之品可清胃肠之湿, 使以炙甘草清热解毒, 调和诸药^[2]。该方具有表里双解、清热止利之功, 为治热陷阳明、协热下利常用方^[3]。现代研究表明, GQD 具有止泻、抗炎抑菌、解热、抗心律失常、降糖等药理作用^[4]。可用于治疗胃肠型感冒、细菌性痢疾、糖尿病、高血压病、高脂血症、溃疡性结肠炎等疾病^[5]。

《中药注册分类及申报资料要求》^[6]将第 3 类古代经典名方中药复方制剂细分为“3.1 按古代经典名方目录管理的中药复方制剂”(以下简称“3.1 类”)及“3.2 其他来源于古代经典名方的中药复方制剂”(以下简称“3.2 类”)。在“3.1 类”经典名方相关政策出台逐步完善、其制剂的关键技术研发讨论热这一趋势下, 本研究参考“3.1 类”经方制剂研发思路开发“3.2 类”经典名方 GQD 具有巨大潜力与研究意义。在《古代经典名方中药复方制剂基准样品的申报资料要求(征求意见稿)》中提出了为保障制剂的质量, 应重点关注基准样品质量控制体系的建立, 该质量控制体系的建立应以按照国家发布的古代经典名方关键信息及古籍记载内容制备的基准样品为前提^[7], 以出膏率、含量测定、指纹图谱或特征图

谱等为指标, 进行量质传递分析, 从而保证基准样品质量的均一性和可追溯性^[8]。

目前, 对于 GQD 中 4 味中药的化学基础及主要活性成分的研究较为清楚^[9-13], 其相关制剂的整体质量控制的研究, 多为以 HPLC 同时测定多种有效成分为主, 其中, 章军等^[9]、李丽莉等^[14]、毛莹等^[15]分别建立了葛根芩连相关制剂中 10 种以上有效成分, 在不同波长下同时测定的 HPLC 含量测定方法, 胡晓茹等^[16]对葛根芩连片特征图谱中 8 个特征峰进行指认。因此, 本研究在前期文献考证明确《伤寒论》中记载的 GQD 的饮片处方量、加水量、煎煮时间、煎煮次数的基础上, 拟制备 15 批 GQD 基准样品, 并分别建立了 4 味中药中关键指标成分的含量测定方法, 优化前期研究中葛根芩连相关制剂的 HPLC 指纹图谱条件, 以出膏率、含量测定、指纹图谱或特征图谱等为指标, 探明 GQD 指标成分在“饮片-水煎液-冻干粉”的传递规律, 为后续 GQD 经方制剂的质量控制奠定了研究基础。

1 仪器与试药

1.1 仪器

UPK-I-107 型优普超纯水器, 四川优普超纯科技有限公司; FTS-10A 型全自动煎药壶, 潮州市一壶百饮电器实业有限公司; Sartorius CPA225D 型电子天平, 十万分之一, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司; HTP-312 型电子天平, 万分之一, 上海华潮电器有限公司; SCIENTZ-10N 型冷冻干燥机, 宁波新芝生物科技有限公司; DL-720D 型超声机,

上海之信仪器有限公司; UltiMate 3000 型高效液相色谱仪, 美国 Thermo Fisher 公司; 色谱柱 Xterra RP18 (250 mm×4.6 mm, 5μm), 沃特世科技(上海)有限公司; 色谱柱 5C₁₈-MS-II (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 上海屹利科学仪器有限公司; SHZ-D (III) 型循环水式多用真空泵, 巩义市予华仪器有限公司; N-1100 型旋转蒸发器, 上海泉杰仪器有限公司; Scientz-10N 型冷冻干燥机, 宁波新芝生物科技有限公司。

1.2 试药

对照品葛根素(批号 wkq22012601)、大豆苷(批号 wkq22041304)、大豆苷元(批号 wkq16080304)、黄芩苷(批号 wkq21010608)、黄芩素(批号 wkq21030203)、汉黄芩苷(批号 wkq21031811)、汉黄芩素(批号 wkq21022605)、黄连碱(批号 wkq21030107)、盐酸小檗碱(批号 wkq21022201)、

巴马汀(批号 wkq21050608)、表小檗碱(批号 wkq22032907)、甘草苷(批号 wkq18040902)、甘草酸铵(批号 wkq22011005)均购于成都维克奇生物科技有限公司, 各对照品质量分数均≥98%。水为超纯水; 乙腈(色谱级, 湖北弗顿科学技术有限公司、磷酸、甲醇(色谱级, 成都市诺尔施科技有限责任公司), 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。葛根、黄芩、黄连、甘草药材均购自四川新荷花中药饮片股份有限公司, 经成都中医药大学蒋桂华教授鉴定, 分别为豆科葛属植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根、唇形科黄芩属植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根、毛茛科黄连属植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎、豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎。葛根、黄芩、黄连、炙甘草饮片均为自制^[17], 药材产地与饮片炮制加工方法见表 1。

表 1 GQD 饮片来源
Table 1 Sources of GQD pieces

饮片名称	饮片炮制(切制)工艺	批号	产地
葛根	取葛根药材, 除去杂质, 洗净, 润透, 切厚片, 晒干	GG-2022063001~GG-2022063006	四川广元
		GG-2022070101~GG-2022070104	四川绵阳
黄芩	取黄芩药材, 除去杂质, 置沸水中煮 10 min, 取出, 闷透, 切薄片, 干燥	HQ-2022102201~HQ-2022102210	山西太原
黄连	取黄连药材, 除去杂质, 润透后切薄片, 晾干	HL-2022083101~HL-2022083105	四川彭山
		HL-2022090101~HL-2022090105	重庆石柱
炙甘草	取甘草药材, 除去杂质和泥沙, 洗净, 切厚片, 干燥, 置炒制容器内, 炒至微黄, 取出, 放凉	ZGC-2022073101~ZGC-2022073104	内蒙古包头
		ZGC-2022080101~ZGC-2022080106	甘肃定西

2 方法与结果

2.1 15 批 GQD 基准样品的制备

2.1.1 药材基原、饮片炮制、用法用量考证 参照《中国药典》2020 年版一部^[17], 明确了葛根为豆科葛属植物野葛 *P. lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根、黄芩为唇形科黄芩属植物黄芩 *S. baicalensis* Georgi 的干燥根。根据《中国药典》2020 年版以及国家中医药管理局、国家药品监督管理局联合发布的 32 首经典名方关键信息^[18]中来源于《伤寒论》的经方对于黄连的基原记载, 明确了黄连为多基原植物, 其来源于毛茛科黄连属植物黄连 *C. chinensis* Franch.、三角叶黄连 *C. deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao 或云连 *C. teeta* Wall. 的干燥根茎。在本研究中考虑到实验的时效性以及药材方便购买程度, 固定了黄连基原为毛茛科黄连属植物黄连 *C. chinensis* Franch. 的干燥根

茎做进一步研究。经课题组前期对于甘草的本草考证发现, 所记载的甘草基原均为乌拉尔甘草 *G. uralensis* Fisch., 未见药典所载胀果甘草 *G. inflata* Bat. 和光果甘草 *G. glabra* L.^[17,19-22]。参照 32 首经典名方关键信息来源于《伤寒论》的经方对于甘草基原记载, 其明确规定了甘草药材基原为豆科甘草属植物甘草 *G. uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎。对于甘草的“炙”法, 药典规定为蜜炙, 然而蜜作为辅料最早出现于唐代, 在此之前未提及关于辅料的记载, 参照 32 首经典名方关键信息, 此处的“炙”法应为清炒法^[17,22]。

对于处方剂量, 原文记载: “葛根(半斤)、黄芩(三两)、黄连(三两)、甘草(二两)……, 上四味, 以水八升, 先煮葛根, 减二升, 内诸药, 煮取二升, 去滓……”^[18]。参照古代计量史专家丘光

明、邱隆、杨平合著,由科技出版社出版的《中国科学技术史·度量衡卷》^[23],明确东汉时期的1两折合为13.8 g,1升折合成现今200 mL,“去滓”多指过滤除去药渣^[24],由此可知,《伤寒论》中GQD的制法为加水1 600 mL,先煮葛根(110.4 g),当煮至汤液体积为1 200 mL,再加入黄芩(41.4 g)、黄连(41.4 g)、炒甘草(27.6 g),煮至汤液为400 mL,过滤除去药渣。

2.1.2 15批GQD基准样品的制备 采用随机数表法对4味饮片进行随机组合及排序,组成15批GQD基准样品对应饮片的批号。按前期研究得到的方法制备GQD基准样品,先将葛根置于紫砂壶中,加入1 600 mL纯水,设定浸泡时间为30 min,参考传统武火煮沸、文火保持微沸的汤液煎煮方法,武火煮沸后,转文火煎煮至汤液体积为1 200 mL时,加入黄芩、黄连、炙甘草,煮至汤液为400 mL。150目无纺布趁热滤过,滤液减压浓缩至一定体积,得葛根芩连水煎浓缩液,将浓缩液置入冷冻干燥机中进行冷冻干燥,即得到15批GQD基准样品。

2.2 GQD基准样品指纹图谱的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱为5C₁₈-MS-II(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.02 mol/L醋酸铵加入0.03%三乙胺(用冰醋酸调节pH值为4.3),梯度洗脱:0~5 min,15%乙腈;5~10 min,15%~20%乙腈;10~15 min,20%~25%乙腈;15~30 min,25%乙腈;30~33 min,25%~40%乙腈;33~48 min,40%~50%乙腈;48~57 min,50%~65%乙腈;57~60 min,65%~15%乙腈;60~65 min,15%乙腈;体积流量1.0 mL/min;检测波长为280 nm;柱温30 ℃;进样量10 μL。

2.2.2 GQD基准样品供试品溶液的制备 取GQD基准样品0.2 g于25 mL棕色量瓶中,精密加70%甲醇25 mL,超声(250 W、40 kHz)30 min,取出,待冷却后加70%甲醇定容至刻度,摇匀,转移至50 mL离心管中,1 000 r/min离心10 min(离心半径16 cm),取上清液过0.45 μm微孔滤膜,即得。

2.2.3 单味饮片和阴性对照供试品溶液的制备 分别称取处方量的葛根、黄芩、黄连、炙甘草4味饮片,按“2.1”项下GQD基准样品制备工艺和“2.2.2”项下的处理方法,制得单味饮片供试品溶液;同法按处方量分别制备缺葛根、缺黄芩、缺黄连、缺甘草的4个阴性对照供试品溶液。

2.2.4 对照品溶液的制备 分别取葛根素、大豆苷、

大豆苷元、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、黄连碱、盐酸小檗碱、巴马汀、表小檗碱、甘草苷、甘草酸铵适量,精密称定,用70%甲醇分别制成含葛根素1.013 mg/mL、大豆苷1.005 mg/mL、大豆苷元0.995 mg/mL、黄芩苷2.120 mg/mL、黄芩素1.020 mg/mL、汉黄芩苷0.520 mg/mL、汉黄芩素1.067 mg/mL、黄连碱1.005 mg/mL、盐酸小檗碱1.045 mg/mL、巴马汀1.020 mg/mL、表小檗碱0.990 mg/mL、甘草苷0.995 mg/mL、甘草酸铵1.030 mg/mL的对照品储备液。

2.2.5 精密度考察 取GQD基准样品冻干粉,按“2.2.2”项下方法制备同一批GQD基准样品冻干粉(S6)供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样6次,结果指纹图谱相似度>0.96;以6号峰为参照峰,计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均<2%,表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性考察 按“2.2.2”项下方法平行制备同一批GQD基准样品冻干粉(S6)的供试品溶液6份,按“2.2.1”项下色谱条件进样分析,结果指纹图谱相似度>0.98;以6号峰为参照峰,计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均<2%,表明方法的重复性良好。

2.2.7 稳定性考察 按“2.2.2”项下方法制备GQD基准样品冻干粉(S6)供试品溶液1份,按“2.2.1”项下色谱条件,分别于样品制备后的0、12、15、18、24、30 h后进样分析,结果指纹图谱相似度>0.96;以6号峰为参照峰,计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均<2%,表明本方法的稳定性良好。

2.2.8 化学指纹图谱的建立及其相似度评价 根据“2.2.1”项下色谱条件对15批次GQD基准样品供试品溶液进行检测,将样品所得色谱数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012A版)软件进行分析,利用中位数法,时间窗宽度设置为0.2 min,以S6为对照,生成HPLC叠加指纹图谱和对照指纹图谱,结果见图1。共标定了34个共有峰,对15批GQD基准样品相似度进行计算,得到不同批次的指纹图谱的相似度均>0.993,符合指纹图谱要求,结果见表2。

经与化学对照品的色谱行为进行比较,指认了13个共有峰,分别为葛根素(6号峰)、大豆苷(10号峰)、甘草苷(15号峰)、黄芩苷(20号峰)、表小檗碱(24号峰)、黄连碱(25号峰)、汉黄芩苷(26

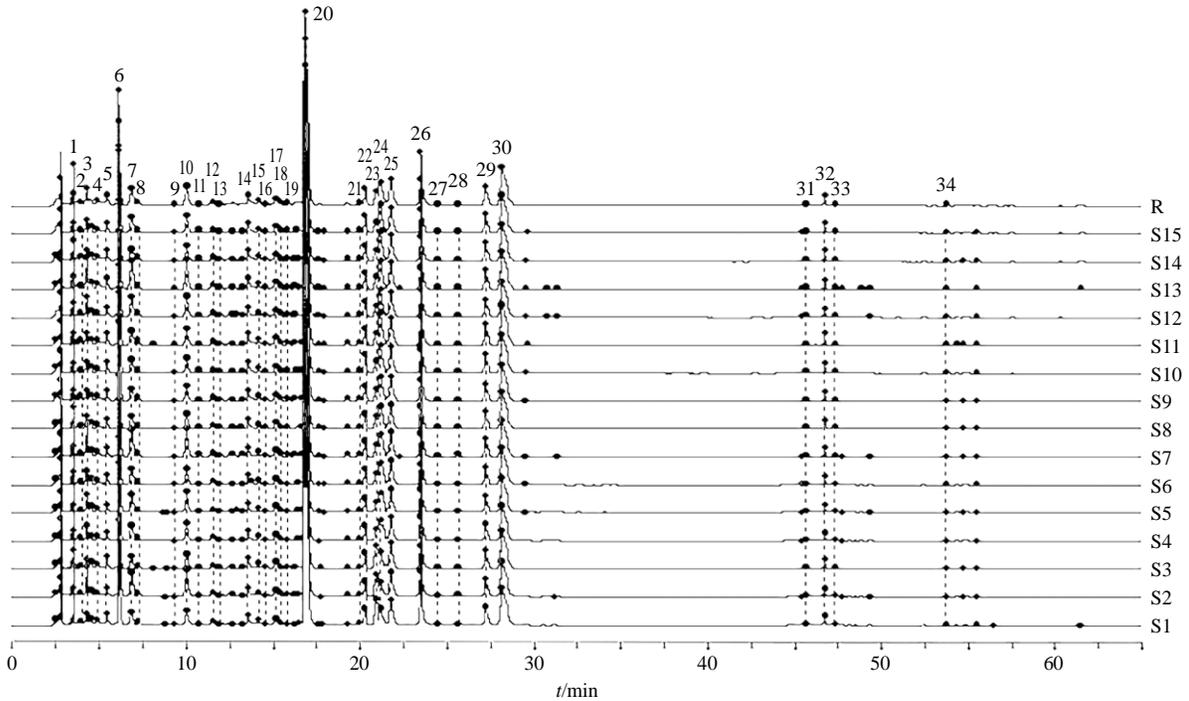


图 1 15 批 GQD 基准样品指纹图谱和对照指纹图谱的 HPLC 图

Fig. 1 Fingerprints of 15 batches of GQD benchmark samples and HPLC of control fingerprints

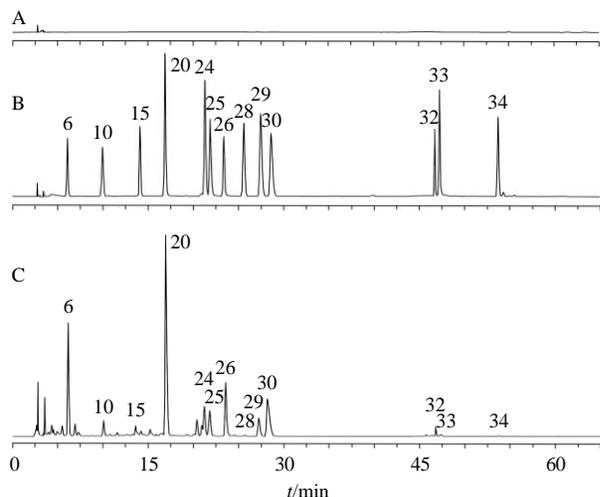
表 2 15 批 GQD 基准样品指纹图谱相似度评价结果

Table 2 Similarity evaluation results of 15 batches of GQD benchmark samples

编号	指纹图谱相似度															
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	R
S1	1.000	0.992	0.999	0.995	0.993	0.995	0.987	0.995	0.996	0.996	0.995	0.993	0.987	0.996	0.996	0.996
S2	0.992	1.000	0.993	0.991	0.992	0.990	0.994	0.989	0.989	0.987	0.987	0.992	0.994	0.989	0.990	0.993
S3	0.999	0.993	1.000	0.995	0.992	0.994	0.987	0.994	0.994	0.994	0.994	0.992	0.987	0.994	0.994	0.996
S4	0.995	0.991	0.995	1.000	0.998	0.999	0.993	0.998	0.999	0.999	0.998	0.998	0.993	0.999	0.999	0.999
S5	0.993	0.992	0.992	0.998	1.000	0.999	0.998	0.999	0.999	0.998	0.998	1.000	0.998	0.999	0.999	0.999
S6	0.995	0.990	0.994	0.999	0.999	1.000	0.995	1.000	1.000	1.000	0.999	0.999	0.994	1.000	1.000	1.000
S7	0.987	0.994	0.987	0.993	0.998	0.995	1.000	0.994	0.993	0.991	0.991	0.998	1.000	0.993	0.994	0.996
S8	0.995	0.989	0.994	0.998	0.999	1.000	0.994	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999	0.994	1.000	1.000	0.999
S9	0.996	0.989	0.994	0.999	0.999	1.000	0.993	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999	0.993	1.000	1.000	0.999
S10	0.996	0.987	0.994	0.999	0.998	1.000	0.991	1.000	1.000	1.000	1.000	0.998	0.991	1.000	1.000	0.999
S11	0.995	0.987	0.994	0.998	0.998	0.999	0.991	1.000	1.000	1.000	1.000	0.998	0.991	1.000	1.000	0.999
S12	0.993	0.992	0.992	0.998	1.000	0.999	0.998	0.999	0.999	0.998	0.998	1.000	0.998	0.999	0.999	0.999
S13	0.987	0.994	0.987	0.993	0.998	0.994	1.000	0.994	0.993	0.991	0.991	0.998	1.000	0.993	0.994	0.996
S14	0.996	0.989	0.994	0.999	0.999	1.000	0.993	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999	0.993	1.000	1.000	0.999
S15	0.996	0.990	0.994	0.999	0.999	1.000	0.994	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999	0.994	1.000	1.000	1.000
R	0.996	0.993	0.996	0.999	0.999	1.000	0.996	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.996	0.999	1.000	1.000

号峰)、大豆苷元(28号峰)、巴马汀(29号峰)、盐酸小檗碱(30号峰)、甘草酸铵(32号峰)、黄芩素(33号峰)、汉黄芩素(34号峰)。对照品溶液、供试品溶液、空白溶剂的 HPLC 图见图 2。

2.2.9 指纹图谱量质传递关系分析 通过分别将 4 种单味饮片样品、缺单味饮片阴性样品和全方基准样品指纹图谱进行比对,对标定的 34 个共有峰进行归属,结果见图 3。结果表明,4、6(葛根素)、7、



6-葛根素; 10-大豆苷; 15-甘草苷; 20-黄芩苷; 24-表小檗碱; 25-黄连碱; 26-汉黄芩苷; 28-大豆苷元; 29-巴马汀; 30-盐酸小檗碱; 32-甘草酸铵; 33-黄芩素; 34-汉黄芩素。
 6-puerarin; 10-daidzin; 15-liquiritin; 20-baicalin; 24-epiberberine; 25-coptisine; 26-wogonoside; 28-daidzein; 29-palmatine; 30-berberine hydrochloride; 32-glycyrrhizic acid; 33-baicalein; 34-wogonin.

图2 空白溶剂 (A)、混和对照品 (B) 和 GQD 基准样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of solvent blank (A), mixed reference substances (B) and GQD benchmark sample (C)

9、10 (大豆苷)、12、28 (大豆苷元) 号峰来源于葛根, 11、14、16、19、20 (黄芩苷)、21、22、26 (汉黄芩苷)、27、33 (黄芩素)、34 (汉黄芩素) 来源于黄芩, 3、8、13、23、24 (表小檗碱)、25 (黄连碱)、29 (巴马汀)、30 (盐酸小檗碱) 来源于黄连; 15 (甘草苷)、29、31、32 (甘草酸铵) 来源于甘草, 5 号峰在葛根、黄连均有出现, 17、18 号峰在葛根、黄芩、黄连均有出现, 1、2 号峰在 4 味中药中均有出现, 推测可能为极性相似的一类化合物, 有待进一步研究。

2.3 GQD 基准样品中各指标成分含量在饮片-水煎液-基准样品中的传递规律研究

2.3.1 HPLC 色谱条件

(1) 葛根饮片、GQD 水煎液、GQD 基准样品中葛根素、大豆苷、大豆苷元: 5C₁₈-MS-II 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水, 梯度洗脱: 0~20 min, 25% 甲醇; 20~30 min, 25%~45% 甲醇; 30~40 min, 45%~60% 甲醇; 40~50 min, 60%~75% 甲醇; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 250 nm; 柱温 35 °C; 进样量 10 μL。

(2) 黄芩饮片、GQD 水煎液、GQD 基准样品

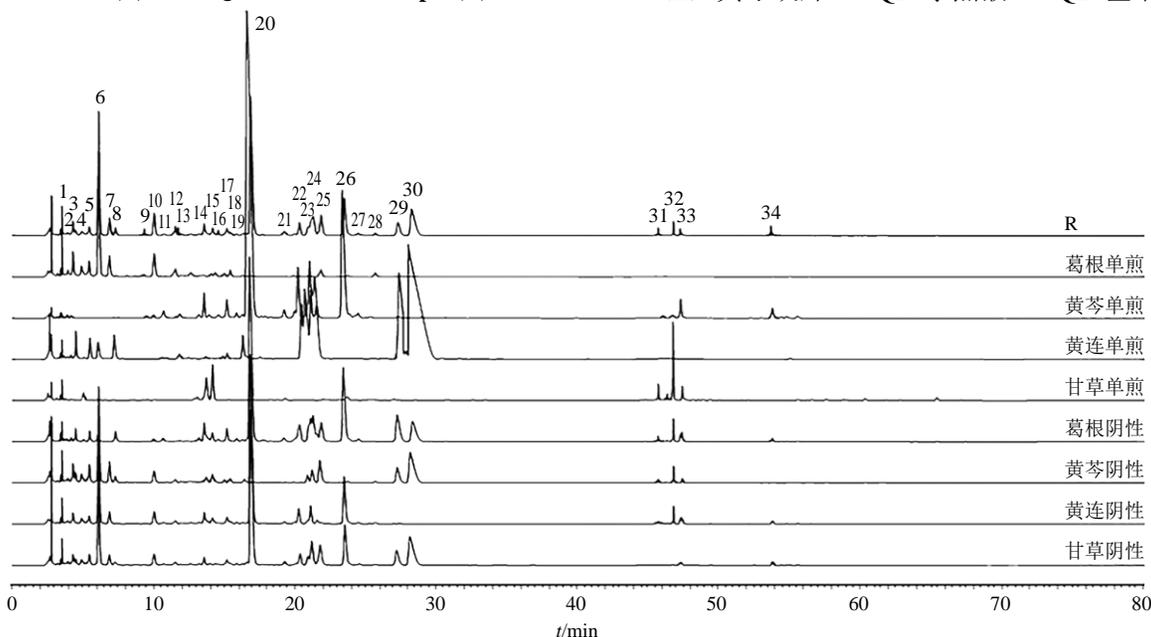


图3 GQD 基准样品指纹图谱 (R) 中 34 个共有峰及其归属

Fig. 3 Common peaks and their assignments in fingerprint chromatogram of GQD benchmark sample (R)

中黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素: Xterra RP18 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1% 甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0~10 min, 25%~30% 乙腈; 10~30 min, 30%~50% 乙腈; 30~35 min, 50%~100% 乙腈; 35~40 min, 100%~25%

乙腈; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 275 nm; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL。

(3) 甘草饮片、GQD 水煎液、GQD 基准样品中甘草苷、甘草酸铵: Xterra RP18 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: 0~3 min, 19%乙腈; 3~20 min, 19%~26%乙腈; 20~22 min, 26%~40%乙腈; 22~34 min, 40%乙腈; 34~36 min, 40%~19%乙腈; 体积流量 0.7 mL/min; 检测波长 237 nm; 柱温 35 °C; 进样量 10 μ L。

(4) 黄连饮片、GQD 水煎液、GQD 基准样品中盐酸小檗碱、巴马汀: Xterra RP18 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾水溶液(用磷酸调节 pH 值为 3.0)25:75; 体积流量 1 mL/min; 检测波长 346 nm; 柱温 30 °C; 进样量 10 μ L。

2.3.2 水煎液供试品溶液的制备 精密吸取水煎液 0.2 mL 于 5 mL 棕色量瓶中, 加入 70% 甲醇 2 mL, 1 000 r/min 离心 10 min (离心半径 16 cm), 取上清液过 0.45 μ m 微孔滤膜, 即得。

2.3.3 基准样品供试品溶液的制备 同“2.2.2”项下。

2.3.4 单味饮片供试品溶液的制备 同“2.2.3”项下。

2.3.5 阴性对照供试品溶液的制备 同“2.2.3”项下。

2.3.6 对照品溶液的制备 按“2.2.4”项下方法配制的不同质量浓度的葛根素、大豆苷、大豆苷元、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、盐酸小檗碱、巴马汀、甘草苷、甘草酸铵 11 个对照品溶液。

2.3.7 系统适用性考察 取上述基准样品、单味饮片、阴性对照供试品溶液, 以及对照品溶液, 按“2.3.1”项下各 HPLC 色谱条件分别进行测定, 记录色谱图, 结果各成分分离度均 >1.5 , 符合《中国药典》2020 年版要求, 峰形较好, 理论塔板数 (n) 以保留时间 (t_R) 和峰宽 (W) 按 $n=16(t_R/W)^2$ 计算均不低于 15 000, 阴性样品无干扰。

2.3.8 线性关系考察 将“2.3.6”项下对照品溶液按比例稀释 2 倍形成系列梯度质量浓度, 各指标成分按“2.3.1”项下各 HPLC 色谱条件进样分析, 以峰面积为横坐标 (X)、以质量浓度为纵坐标 (Y) 进行线性回归方程计算, 各指标成分的回归方程、相关系数 (r) 及线性范围分别为葛根素 $Y=0.558 0 X+1.456 3$, $R^2=0.999 9$, 线性范围 3.96~1 012.50 μ g/mL; 大豆苷 $Y=0.653 6 X+2.109 0$, $R^2=0.999 7$, 线性范围 1.96~502.50 μ g/mL; 大豆苷元 $Y=1.258 7 X+2.367 8$, $R^2=0.999 7$, 线性范围 1.94~497.50 μ g/mL; 黄芩苷 $Y=0.614 8 X-3.939 7$, $R^2=1.000 0$, 线性范围 16.56~2 120.00 μ g/mL; 汉黄芩苷 $Y=0.556 6 X-1.531 9$, $R^2=0.999 4$, 线性范围 2.03~520.00 μ g/mL; 黄芩素 $Y=0.856 4 X+0.018 5$, $R^2=$

1.000 0, 线性范围 1.99~510.00 μ g/mL; 汉黄芩素 $Y=0.940 1 X+1.888 9$, $R^2=0.999 7$, 线性范围 2.07~530.00 μ g/mL; 盐酸小檗碱 $Y=0.403 3 X+0.054 1$, $R^2=1.000 0$, 线性范围 4.10~523.30 μ g/mL; 巴马汀 $Y=0.403 5 X+0.023 6$, $R^2=1.000 0$, 线性范围 4.0~502.20 μ g/mL; 甘草苷 $Y=0.449 7 X+0.683 7$, $R^2=0.999 9$, 线性范围 3.87~495.00 μ g/mL; 甘草酸铵 $Y=0.113 4 X-0.967 4$, $R^2=0.999 3$, 线性范围 4.02~515.00 μ g/mL。

2.3.9 精密度考察 取编号为 S13 的 GQD 基准样品, 按“2.3.3”项下制备其供试品溶液 1 份, 参照“2.3.1”项下 4 种 HPLC 色谱条件, 分别连续进样 6 次, 记录峰面积, 结果显示, 11 种指标成分葛根素、大豆苷、大豆苷元、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、盐酸小檗碱、巴马汀、甘草苷、甘草酸铵峰面积的 RSD 分别为 1.7%、0.5%、0.8%、1.2%、1.5%、1.0%、0.3%、0.8%、0.9%、1.3%、0.7%, 均小于 2.0%, 表明仪器精密度良好。

2.3.10 稳定性考察 取编号为 S13 的 GQD 基准样品, 按“2.3.3”项下制备其供试品溶液 1 份, 参照“2.3.1”项下 4 种 HPLC 色谱条件, 分别在制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样, 结果显示, 11 种指标成分葛根素、大豆苷、大豆苷元、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、盐酸小檗碱、巴马汀、甘草苷、甘草酸铵峰面积的 RSD 分别为 1.9%、0.8%、0.6%、1.2%、1.8%、0.3%、1.0%、1.1%、0.7%、1.2%、1.0%, 均小于 2.0%, 表明基准样品供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.3.11 重复性考察 取编号为 S13 的 GQD 基准样品, 按“2.3.3”项下方法平行制备 6 份其供试品溶液, 参照“2.3.1”项下 4 种 HPLC 色谱条件, 分别进样分析, 结果显示, 11 种指标成分葛根素、大豆苷、大豆苷元、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、盐酸小檗碱、巴马汀、甘草苷、甘草酸铵峰面积的 RSD 分别为 0.9%、1.6%、1.3%、0.4%、0.9%、1.2%、1.8%、0.5%、1.5%、0.7%、1.2%, 均小于 2.0%, 表明该方法重复性良好。

2.3.12 加样回收率考察 精密称取编号为 S13 的已知指标成分含量的 GQD 基准样品 2.00 g 于 25 mL 量瓶中, 分别按样品中各成分含量的 100% 水平加入“2.3.6”项下 11 种对照品溶液, 按“2.3.3”项下方法平行制备 6 份其供试品溶液, 参照“2.3.1”项下 4 种 HPLC 色谱条件, 分别进样分析, 进行含量

测定,计算 11 种指标成分的加样回收率及 RSD 值,结果葛根素、大豆苷、大豆苷元、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、盐酸小檗碱、巴马汀、甘草苷、甘草酸铵的平均加样回收率分别为 102.79%、98.89%、103.25%、104.22%、99.78%、105.10%、96.87%、99.10%、101.76%、101.44%、99.76%,RSD 分别为 0.6%、0.7%、0.6%、0.8%、1.0%、1.2%、1.1%、0.9%、1.2%、1.0%、0.9%,表明该方法加样回收率良好。

2.3.13 GQD 处方各味药指标成分在饮片、水煎液、基准样品中的含量测定结果 按“2.3.1”项下方法分别测定 15 批饮片、水煎液、基准样品中 11 个指标成分的含量,结果见表 3~5。

15 批饮片中各成分质量分数分别为葛根素 92.142~116.619 mg/g、大豆苷 20.412~28.744 mg/g、大豆苷元 1.338~1.989 mg/g、黄芩苷 150.442~162.818 mg/g、汉黄芩苷 48.887~51.232 mg/g、黄芩素 4.419~4.818 mg/g、汉黄芩素 1.848~2.485 mg/g、盐酸小檗碱 66.437~88.617 mg/g、巴马汀 17.446~22.016 mg/g、甘草苷 19.950~20.613 mg/g、甘草酸铵 43.400~52.267 mg/g; 15 批水煎液中各成分质量分数分别为葛根素 8.891~11.205 mg/g、大豆苷 1.206~1.949 mg/g、大豆苷元 0.162~0.260 mg/g、黄芩苷 6.577~7.285 mg/g、汉黄芩苷 2.049~

2.663 mg/g、黄芩素 0.018~0.032 mg/g、汉黄芩素 0.021~0.035 mg/g、盐酸小檗碱 0.809~1.32 2 mg/g、巴马汀 0.365~0.652 mg/g、甘草苷 1.442~1.972 mg/g、甘草酸铵 0.883~1.071 mg/g;

15 批基准样品中各成分质量分数分别为葛根素 8.031~10.938 mg/g、大豆苷 1.048~1.789 mg/g、大豆苷元 0.117~0.244 mg/g、黄芩苷 4.709~7.369 mg/g、汉黄芩苷 2.112~2.199 mg/g、黄芩素 0.011~0.022 mg/g、汉黄芩素 0.012~0.022 mg/g、盐酸小檗碱 0.532~1.154 mg/g、巴马汀 0.224~0.423 mg/g、甘草苷 1.188~1.954 mg/g、甘草酸铵 0.876~0.992 mg/g。

2.3.14 GQD 各味药指标成分含量在饮片-水煎液-基准样品之间的传递规律 饮片-水煎液-基准样品中指标成分含量的转移率是考察传递规律的重要指标,其计算方法为饮片到水煎液转移率= m_2/m_1 ,水煎液到基准样品转移率= m_3/m_2 ,其中, m_1 为饮片中指标性成分的质量, m_2 为水煎液中指标性成分的质量, m_3 为冻干粉中指标性成分的质量。

根据试验样品所测数据,对各药味指标成分含量转移率结果如表 6、7 所示,葛根素饮片到水煎液的转移率为 17.71%~19.69%,水煎液到基准样品的转移率为 84.18%~104.00%;大豆苷饮片到水煎液的转移率为 10.32%~13.65%,水煎液到基准样品的

表 3 饮片中指标性成分的含量

Table 3 Content of index components in decoction pieces

批次	质量分数/(mg·g ⁻¹)										
	葛根素	大豆苷	大豆苷元	黄芩苷	汉黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素	盐酸小檗碱	巴马汀	甘草苷	甘草酸铵
S1	116.619	28.558	1.937	150.951	50.807	4.617	2.058	88.331	22.016	20.323	44.100
S2	99.604	20.412	1.529	150.442	48.997	4.817	1.954	88.617	21.935	19.950	52.267
S3	97.681	20.728	1.607	151.785	51.232	4.818	2.485	73.203	17.446	20.142	47.138
S4	116.297	28.448	1.953	152.386	51.191	4.797	1.848	73.706	17.630	20.515	47.894
S5	102.798	24.773	1.989	156.907	50.968	4.787	1.854	85.399	21.061	20.613	51.924
S6	104.933	27.606	1.771	160.912	49.596	4.684	2.436	85.547	21.166	20.596	51.765
S7	107.896	27.412	1.788	157.586	51.094	4.692	2.142	81.390	19.788	20.516	51.824
S8	92.142	20.627	1.338	156.955	51.124	4.450	2.319	81.038	19.671	20.037	47.767
S9	105.616	24.343	1.790	152.345	50.484	4.459	2.325	73.845	17.893	20.340	46.980
S10	115.484	28.744	1.892	162.263	50.701	4.484	1.958	73.816	17.900	20.125	47.477
S11	95.936	21.206	1.412	162.818	50.663	4.692	1.863	66.437	19.658	19.963	52.100
S12	98.175	20.711	1.694	152.678	50.731	4.687	2.185	66.634	19.067	20.143	46.980
S13	106.216	27.642	1.772	153.084	50.901	4.584	2.063	78.164	18.896	20.469	45.054
S14	97.905	20.806	1.427	161.870	48.887	4.419	2.431	81.742	20.174	20.330	43.400
S15	99.534	21.408	1.502	162.647	50.179	4.767	1.936	71.029	20.194	20.485	51.924

表4 水煎液中指标性成分的含量
Table 4 Content of index components in decoction

批次	质量分数/(mg·g ⁻¹)										
	葛根素	大豆苷	大豆苷元	黄芩苷	汉黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素	盐酸小檗碱	巴马汀	甘草苷	甘草酸铵
S1	11.205	1.949	0.260	6.790	2.138	0.027	0.021	1.236	0.652	1.863	0.886
S2	9.321	1.206	0.181	6.579	2.051	0.024	0.035	1.159	0.615	1.442	1.063
S3	9.325	1.207	0.184	6.577	2.055	0.021	0.030	1.056	0.365	1.807	0.883
S4	11.134	1.934	0.237	6.625	2.109	0.025	0.031	1.053	0.379	1.924	0.906
S5	9.324	1.278	0.220	6.693	2.122	0.020	0.024	1.014	0.582	1.972	1.062
S6	9.546	1.466	0.240	6.823	2.514	0.027	0.030	1.082	0.534	1.761	1.023
S7	9.555	1.466	0.213	6.754	2.514	0.025	0.024	1.076	0.497	1.959	1.065
S8	8.916	1.206	0.185	6.698	2.049	0.019	0.021	1.322	0.486	1.870	0.982
S9	9.505	1.277	0.199	6.616	2.056	0.018	0.024	1.020	0.391	1.815	0.888
S10	11.199	1.935	0.233	7.279	2.663	0.032	0.031	1.046	0.410	1.731	0.905
S11	8.925	1.277	0.184	7.285	2.663	0.032	0.032	0.809	0.438	1.467	1.065
S12	9.495	1.265	0.179	6.811	2.473	0.026	0.024	0.833	0.432	1.878	0.985
S13	10.457	1.462	0.198	6.771	2.470	0.022	0.028	0.928	0.436	1.954	0.906
S14	8.891	1.208	0.190	6.844	2.581	0.027	0.030	1.300	0.507	1.768	0.981
S15	9.319	1.280	0.162	6.848	2.582	0.031	0.032	0.944	0.420	1.845	1.071

表5 基准样品中指标性成分的含量
Table 5 Content of index components in benchmark samples

批次	质量分数/(mg·g ⁻¹)										
	葛根素	大豆苷	大豆苷元	黄芩苷	汉黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素	盐酸小檗碱	巴马汀	甘草苷	甘草酸铵
S1	10.938	1.711	0.226	6.880	2.121	0.014	0.012	1.062	0.423	1.822	0.929
S2	8.561	1.205	0.117	4.709	2.114	0.020	0.021	1.154	0.421	1.191	0.959
S3	8.544	1.208	0.127	5.714	2.114	0.011	0.022	0.742	0.224	1.826	0.937
S4	9.779	1.789	0.244	5.358	2.112	0.013	0.022	0.776	0.243	1.788	0.888
S5	8.751	1.298	0.229	6.010	2.194	0.012	0.013	1.014	0.382	1.954	0.992
S6	9.646	1.321	0.202	6.885	2.191	0.018	0.022	0.821	0.399	1.598	0.954
S7	9.142	1.318	0.201	6.882	2.121	0.017	0.016	0.962	0.301	1.952	0.992
S8	9.224	1.048	0.141	5.725	2.188	0.014	0.014	0.861	0.301	1.653	0.934
S9	8.695	1.293	0.189	5.342	2.117	0.014	0.013	0.630	0.265	1.831	0.937
S10	9.698	1.755	0.242	6.909	2.198	0.021	0.015	0.631	0.271	1.795	0.945
S11	9.282	1.281	0.141	6.909	2.199	0.022	0.015	0.532	0.337	1.188	0.957
S12	8.031	1.111	0.135	6.881	2.116	0.017	0.016	0.716	0.295	1.666	0.932
S13	8.803	1.378	0.194	6.367	2.186	0.013	0.013	0.767	0.265	1.785	0.876
S14	8.580	1.273	0.140	6.895	2.192	0.018	0.022	0.954	0.320	1.657	0.894
S15	8.681	1.138	0.125	7.369	2.197	0.022	0.014	0.791	0.307	1.713	0.942

转移率为 86.90%~105.38%；大豆苷元饮片到水煎液的转移率为 21.13%~27.65%，水煎液到基准样品的转移率为 64.64%~104.09%；黄芩苷饮片到水煎液的转移率为 22.46%~23.99%，水煎液到基准样品的转移率为 71.58%~107.61%；汉黄芩苷饮片到水

煎液的转移率为 21.38%~28.16%，水煎液到基准样品的转移率为 82.54%~106.78%；黄芩素饮片到水煎液的转移率为 2.15%~3.81%，水煎液到基准样品的转移率为 51.85%~83.33%；汉黄芩素饮片到水煎液的转移率为 4.83%~9.55%，水煎液到基准样品的

表6 饮片到水煎液中指标性成分的转移率

Table 6 Transfer rate of index components from decoction pieces to decoction

批次	转移率/%										
	葛根素	大豆苷	大豆苷元	黄芩苷	汉黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素	盐酸小檗碱	巴马汀	甘草苷	甘草酸铵
S1	19.22	13.65	26.85	23.99	22.44	3.12	5.44	7.46	15.79	73.34	16.07
S2	18.72	11.82	23.68	23.32	22.33	2.66	9.55	6.98	14.95	57.82	16.27
S3	19.09	11.65	22.90	23.11	21.39	2.32	6.44	7.69	11.16	71.77	14.98
S4	19.15	13.60	24.27	23.19	21.97	3.34	8.95	7.62	11.47	75.03	15.14
S5	18.14	10.32	22.12	22.75	22.20	2.23	6.90	6.33	14.74	76.53	16.36
S6	18.19	10.62	27.10	22.61	27.03	3.07	6.57	6.75	13.46	68.40	15.81
S7	17.71	10.70	23.83	22.86	26.24	2.84	5.98	7.05	13.40	76.39	16.44
S8	19.35	11.69	27.65	22.76	21.38	2.28	4.83	8.70	13.18	74.66	16.44
S9	18.00	10.49	22.23	23.16	21.72	2.15	5.51	7.37	11.65	71.39	15.12
S10	19.39	13.46	24.63	23.92	28.01	3.81	8.44	7.56	12.22	68.81	15.25
S11	18.61	12.04	26.06	23.86	28.03	3.64	9.16	6.49	11.88	58.79	16.35
S12	19.34	12.22	21.13	23.79	26.00	2.96	5.86	6.67	12.08	74.59	16.77
S13	19.69	10.58	22.35	23.59	25.88	2.56	7.24	6.33	12.31	76.37	16.09
S14	18.16	11.61	26.63	22.55	28.16	3.26	6.58	8.48	13.40	69.57	18.08
S15	18.73	11.96	21.57	22.46	27.44	3.47	8.82	7.09	11.09	72.05	16.50

表7 水煎液到基准样品中指标性成分的转移率

Table 7 Transfer rate of index components from decoction to benchmark sample

批次	转移率/%										
	葛根素	大豆苷	大豆苷元	黄芩苷	汉黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素	盐酸小檗碱	巴马汀	甘草苷	甘草酸铵
S1	97.62	87.79	86.92	101.33	99.20	51.85	57.14	85.92	64.88	97.80	104.85
S2	91.85	99.92	64.64	71.58	103.07	83.33	60.00	99.57	68.46	82.59	90.22
S3	91.62	100.08	69.02	86.88	102.87	52.38	73.33	70.27	61.37	101.05	106.12
S4	87.83	92.50	102.95	80.88	100.14	52.00	70.97	73.69	64.12	92.93	98.01
S5	93.85	101.56	104.09	89.80	103.39	60.00	54.17	99.95	65.64	99.09	93.41
S6	101.05	90.11	84.17	100.91	87.15	66.67	73.33	75.88	74.72	90.74	93.26
S7	95.68	89.90	94.37	101.90	84.37	68.00	66.67	89.41	60.56	99.64	93.15
S8	103.45	86.90	76.22	85.47	106.78	73.68	66.67	65.13	61.93	88.40	95.11
S9	91.48	101.25	94.97	80.74	102.97	77.78	54.17	61.76	67.77	100.88	105.52
S10	86.60	90.70	103.86	94.92	82.54	65.63	48.39	60.33	66.10	103.70	104.42
S11	104.00	100.31	76.63	94.84	82.58	68.75	46.88	65.76	76.94	80.98	89.86
S12	84.58	87.83	75.42	101.03	85.56	65.38	66.67	85.95	68.29	88.71	94.62
S13	84.18	94.25	97.98	94.03	88.50	59.09	46.43	82.65	60.78	91.35	96.69
S14	96.50	105.38	73.68	100.75	84.93	66.67	73.33	73.38	63.12	93.72	91.13
S15	93.15	88.91	77.16	107.61	85.09	70.97	43.75	83.79	73.10	92.85	87.96

转移率为43.75%~73.33%；盐酸小檗碱饮片到水煎液的转移率为6.33%~8.70%，水煎液到基准样品的转移率为60.33%~99.95%；巴马汀饮片到水煎液的转移率为11.09%~15.79%，水煎液到基准样品的转移率为60.56%~76.94%；甘草苷饮片到水煎液的平均

均转移率为57.82%~76.53%，水煎液到基准样品的平均转移率为80.98%~103.70%；甘草酸铵饮片到水煎液的平均转移率为14.98%~18.08%，水煎液到基准样品的转移率87.96%~106.12%。

根据《征求意见稿》中相关内容，不同批次基

准样品的指标性成分含量及转移率应控制在其均值的70%~130%，本实验中15批GQD基准样品的各指标性成分的含量及转移率均在其均值的±30%范围内，说明前期葛根、黄芩、黄连、炙甘草饮片和基准样品的制备工艺相对稳定可行。

2.4 GQD 基准样品制备过程中干膏率传递规律研究

按“2.1”项下的制备方法制备GQD全方、葛根、黄芩、黄连、甘草各单味的水煎液，精密吸取50 mL于100 mL恒定质量后的蒸发皿中，水浴加热成稠膏，真空干燥48 h以上至恒定质量，即得各饮片及15批GQD基准样品的干膏粉。计算15批基准样品的实际干膏率及其对应饮片的干膏率，计算公式为饮片单煎干膏率= m_1/M_1 ，全方水煎液干膏率= m_2/M_2 ，其中 m_1 表示饮片干膏粉质量， M_1 表示饮片质量， m_2 表示GQD基准样品干膏粉质量， M_2 表示全方饮片质量。

为了解饮片-基准样品传递过程中干膏率的变化，根据单味药剂量在全方中的占比以及各单味药饮片的干膏率，计算全方中各单味药折算加和后的理论干膏率，计算公式为全方理论干膏率= \sum 单味药干膏率 \times (单味药生药量/全方生药量)，对比理论干膏率于实际出膏率，计算转移率，结果见表8，具体计算公式为转移率=实际干膏率/理论干膏率。由表8可知，15批全方基准样品的理论干膏率为29.71%~33.31%，实际干膏率在24.63%~26.91%，干膏率的传递率均值为81.35%，转移率为75.08%~87.48%，均未出现离散数据(平均值的±10%以外)，表示不同批次基准样品间干膏率较为稳定。

3 讨论

3.1 指标性成分的确定

经典名方基准样品作为后续复方制剂生产及质量控制的参照，在研究过程中具有核心地位，因此，其指标成分的选择应具有代表性，并能全面反映复方质量^[25]。结合GQD质量标志物以及相关文献报道^[26-27]，本研究采用化学指纹图谱与多指标成分在饮片-水煎液-基准样品传递相结合进一步确定该方与药效相关联的关键成分。葛根中具有较强药理活性且含量最丰富的成分为异黄酮类，研究表明，异黄酮类中主要的活性成分为葛根素、大豆苷、大豆苷元等，这些成分在抗氧化、降血糖、解热、抗炎、调节免疫等方面具有较好的药理作用^[28]。黄芩中主要含有黄酮及其苷类化合物，其代表性活性成分为

表8 15批GQD单味药饮片、基准样品的干膏率及转移率结果

Table 8 Results of dry extract rate and transfer rate of each decoction pieces and benchmark samples of GQD

批次	干膏率/%						转移率/%
	葛根	甘草	黄连	黄芩	全方理论	全方实际	
S1	29.87	34.57	21.30	51.79	32.96	25.23	76.55
S2	30.34	33.04	21.64	53.09	33.31	25.01	75.08
S3	29.57	32.28	21.64	53.09	32.83	25.44	77.49
S4	30.18	20.98	19.20	49.13	30.53	25.44	83.33
S5	29.57	20.58	16.88	54.61	30.76	26.91	87.48
S6	27.72	22.10	21.76	48.02	29.71	25.66	86.37
S7	30.30	27.68	18.96	55.92	32.66	26.07	79.82
S8	30.24	25.07	20.89	54.15	32.33	26.18	80.98
S9	29.88	27.89	22.25	49.98	31.97	24.63	77.04
S10	29.90	29.02	19.37	55.46	32.61	26.81	82.21
S11	29.79	24.89	20.56	51.28	31.48	26.20	83.23
S12	30.03	25.58	20.58	49.52	31.36	26.31	83.90
S13	29.97	25.98	20.24	57.42	32.80	25.52	77.80
S14	29.57	24.57	18.57	48.41	30.41	26.53	87.24
S15	29.64	28.55	21.98	53.89	32.61	26.64	81.69

黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素，这些成分具有多方面的药理活性，包括抗炎、抗菌、抗肿瘤、抗氧化、降血压、提高免疫力等^[29]。黄连的主要活性成分为生物碱类成分，本研究参照《中国药典》^[17]收载的葛根芩连片剂、丸剂2种剂型中明确规定的黄连的定量指标盐酸小檗碱外，还选择了巴马汀作为指标成分进一步研究。甘草的指标成分的选择依据《中国药典》甘草饮片项下的定量指标甘草苷、甘草酸铵。因此，选择测定葛根素、大豆苷、大豆苷元、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、盐酸小檗碱、巴马汀、甘草苷、甘草酸铵11种与葛根芩连汤药效相关且较稳定的指标成分的含量，能进一步提升对GQD内在质量的控制。

3.2 供试品溶液制备方法考察

在供试品制备过程中，本研究对提取溶剂(50%甲醇、70%甲醇，甲醇、50%乙醇、70%乙醇、乙腈、纯水)、提取方法(超声、室温)、提取时间(20、25、30 min)和溶剂用量(15、20、25、30 mL)等影响因素进行了考察，从提取化学成分全面性以及方法稳定性等方面考虑，确定GQD基准样品及单味饮片供试品溶液最佳制备方法为以70%甲醇为提取溶剂，溶剂用量为25 mL，超声提取30 min。

3.3 色谱条件分析

3.3.1 GQD 基准样品指纹图谱的色谱条件考察 通过查阅相关文献数据^[17], 分别以乙腈-0.5%磷酸水溶液、乙腈-0.05%磷酸(含 0.01 mol/L 磷酸二氢钾)水溶液、乙腈-0.05%磷酸二氢钾+0.05%三乙胺溶液(磷酸调 pH 至 3.0)、乙腈-0.02 mol/L 醋酸铵+0.03%三乙胺溶液(用冰醋酸调 pH 至 4.3)共 4 种不同流动相体系和比例下色谱峰的分离情况, 结果显示以流动相乙腈-0.02 mol/L 醋酸铵+0.03%三乙胺溶液(用冰醋酸调 pH 至 4.3)进行梯度洗脱时, 基线平稳, 色谱峰分离度良好; 参考《中国药典》以及相关文献报道^[10,16], 选择 230、250、280、346 nm 4 个波长作为测试波长, 显示在 280 nm 时各色谱峰响应较好, 杂质干扰少; 另外, 考察了柱温(25、30、35 °C)对色谱峰分离的影响, 结果发现在 30 °C 条件下, 各色谱峰分离度较好。

3.3.2 GQD 4 味药指标成分含量测定的色谱条件考察 由于 GQD 中化学成分复杂多样, 主要为黄酮类、生物碱类和皂苷类成分, 通过全波长扫描发现黄芩、葛根以及甘草的指标成分在 230~280 nm 均有较强吸收, 而黄连的生物碱类成分在 330~360 nm 处有较强吸收, 因此, 采用同一波长不能同时实现不同成分的最大吸收。该研究曾采用指纹图谱色谱条件, 通过切换波长来实现对多成分含量同时测定, 但实际考察过程中发现切换波长对基线、峰形有一定的影响, 基线较差对含量测定的精度有一定影响。故本研究在参考《中国药典》的基础上, 分别建立了方中 4 味药的含量测定方法。

此外, 通过查阅文献发现, HPLC 法测定黄酮类化合物时, 流动相多为乙腈-水系统或甲醇-水系统^[30-31], 并通常在水相中加入 0.1%冰醋酸、磷酸或甲酸, 以抑制黄酮中酚羟基的电离, 改善拖尾, 并提高分离度^[32]。因此, 在参考《中国药典》的基础上, 结合预试验考察, 进一步优化了葛根、黄芩、黄连、甘草的色谱条件, 最终建立了 4 味药的含量测定方法。

3.4 15 批 GQD 基准样品的指纹图谱分析

15 批 GQD 基准样品的指纹图谱相似度良好(>0.99), 匹配结果显示有 34 个共有峰, 并指认出 13 个特征峰。方中的葛根、黄芩、黄连、炙甘草在《中国药典》2020 年版单味药项下规定的指标性成分均指认出, 表明所建立的指纹图谱可以基本满足表征每味药特征峰的要求。然而, 由于单味饮片

煎液及其基准样品的供试品溶液成分更为复杂, 使得黄连的指标性成分表小檗碱与黄连碱在该色谱条件下分离度并不理想。同时, 该色谱条件下的 30~45 min 并未检测到主成分, 仍可进一步优化。对于上述的不足之处, 本课题组今后将进一步深入研究, 力求方中各味药的主成分出峰时间更为合理, 分离度更佳。

3.5 15 批 GQD 基准样品量质传递规律分析

11 种指标性成分在饮片至水煎液的传递过程中, 成分的转移率皆在规定范围(均值的 70%~130%)内, 说明该煎煮过程较稳定可控, 工艺可行。其中, 甘草酸铵、盐酸小檗碱、巴马汀转移率较低, 通过对比研究发现, 黄连、甘草饮片单煎液皆较为澄清透明, 而复方汤液明显有大量絮状物生成, 通过查阅文献推测这些成分在复方汤液煎煮过程中发生酸碱络合反应, 以絮状物的形式被滤过除去部分, 造成了成分损失^[33-34]。

此外, 黄芩素、汉黄芩素转移率也较低, 通过查阅文献发现, 黄芩素与汉黄芩素本身不稳定, 易被氧化成醌类, 且黄芩素和汉黄芩素是由黄芩中所含的一种酶水解黄芩苷和汉黄芩苷而成, 此酶在冷水中活性较高, 热水中活性较低^[35], 因此, 其在煎煮过程中导致成分含量的下降。在水煎液-基准样品的过程中, 部分批次的转移率有些许升高, 大于 100%, 推测在水溶液和冻干粉两者不同的物理状态下, 导致虽在相同的溶剂和提取方法下检测到的含量仍有些许差异, 但 11 种指标成分在水煎液-基准样品的转移率皆在规定范围(均值的 70%~130%)内, 说明该基准样品的制备工艺稳定可行, 成分具有良好传递性。该研究为后续 GQD 基准样品的质量控制提供了参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 谢观编. 赖鸿铭等整理点校. 中国医学大辞典 [M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1998: 217.
- [2] 裴玉琼, 石海培, 严辉, 等. 基于 HPLC 指纹图谱及多成分一测多评法定量的炙甘草饮片质量评价研究 [J]. 中草药, 2019, 50(18): 4293-4304.
- [3] 路立峰, 张媛媛, 李振兴, 等. 葛根芩连汤药效物质基础及质量控制研究进展 [J]. 中成药, 2022, 44(10): 3239-3243.
- [4] 赵益, 赖小东, 叶争荣, 等. 葛根芩连汤对溃疡性结肠炎模型大鼠抗氧化及抗炎的作用机制 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(5): 1741-1745.

- [5] 熊兴江. 葛根芩连汤方证及其在糖尿病、高血压病、高脂血症、肥胖中的运用 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(12): 2760-2764.
- [6] 张泽康, 王昌海, 赵玥瑛, 等. 经典名方阳和汤基准样品量值传递分析 [J]. 中草药, 2023, 54(3): 756-767.
- [7] 国家药监局综合司. 公开征求古代经典名方中药复方制剂及其物质基准申报资料要求(征求意见稿)意见 [EB/OL]. (2019-03-27) [2023-09-09]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/zhqyj/zhqyiyp/20190327150101694.html>.
- [8] 韦卓纯, 林绘, 彭颖, 等. UPLC 指纹图谱多模式识别结合多指标成分测定的清热消炎宁胶囊质量控制研究 [J]. 中草药, 2023, 54(15): 4856-4865.
- [9] 章军, 刘宇政, 王跃生, 等. HPLC 同时测定葛根芩连汤中 12 个有效成分的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 58-62.
- [10] 王钰乐, 刘文, 杨道斌, 等. 葛根芩连汤的 UPLC-MS/MS 指纹图谱研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(2): 206-211.
- [11] 宋丽军, 谭晓梅, 罗佳波. 多成分可定性的葛根芩连汤的 HPLC 图谱解析 [J]. 中药材, 2010, 33(11): 1791-1794.
- [12] 宋丽军, 谭晓梅, 罗佳波. 葛根芩连方 3 种不同制剂 HPLC 特征图谱比较研究 [J]. 中国新药杂志, 2011, 20(10): 923-927.
- [13] 毛莹, 张贵君, 刘晶晶, 等. 葛根芩连汤中 14 种药效组分的 HPLC 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(2): 108-113.
- [14] 李丽莉, 吕轶峰, 朱雪妍. 葛根芩连片多成分含量测定的研究 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37(9): 1607-1614.
- [15] 毛莹, 张贵君, 彭慧, 等. 葛根芩连汤药效组分解热抗炎药效学研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(1): 30-32.
- [16] 胡晓茹, 杨思广, 戴忠, 等. 葛根芩连片特征图谱及含量测定方法研究 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34(9): 1590-1596.
- [17] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 59.
- [18] 国家中医药管理局办公室. 国家中医药管理局办公室国家药品监督管理局综合和规划财务司关于发布《古代经典名方关键信息表(25 首方剂)》的通知 [EB/OL]. (2022-09-16) [2023-09-09]. <http://www.natcm.gov.cn/kejisi/gongzuodongtai/2022-09-27/27803.html>.
- [19] 宋·苏颂编撰. 尚志钧辑校. 本草图经 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1994: 346.
- [20] 明·李时珍编著. 张守康等主校. 本草纲目 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 1998: 146.
- [21] 清·吴淇浚. 植物名实图考 [M]. 上海: 商务印书馆, 1957: 153.
- [22] 南朝·梁·陶弘景编. 尚志钧尚元胜辑校. 本草经集注: 辑校本 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 186.
- [23] 卢嘉锡, 丘光明, 邱隆, 等. 中国科学技术史. 度量衡卷 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 391.
- [24] 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.
- [25] 陈霞, 阳长明, 陈浩, 等. 基于中药复方制剂特点的中药复方制剂生产工艺研究 [J]. 中草药, 2021, 52(19): 5807-5813.
- [26] 任伟光, 郭丽丽, 张翠英. 葛根芩连汤的研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 中国新药杂志, 2021, 30(18): 1675-1679.
- [27] 徐蓓蓓, 韩晓宇, 刘晶晶, 等. 基于 Box-Behnken 设计响应面法与质量综合评价优化葛根芩连汤煎煮工艺 [J]. 中草药, 2022, 53(22): 7070-7081.
- [28] 陈凯, 魏平慧, 史琳. 葛根异黄酮类成分的药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2022, 42(12): 2602-2610.
- [29] 姚雪, 吴国真, 赵宏伟, 等. 黄芩中化学成分及药理作用研究进展 [J]. 辽宁中医杂志, 2020, 47(7): 215-220.
- [30] 朱溶月, 陈媛, 李博莉, 等. 不同工艺对黄芩总黄酮提取率及其提取物性能的影响 [J]. 宁夏医科大学学报, 2021, 43(1): 92-95.
- [31] 汪秋兰, 王文清, 马永贵. 高效液相色谱法在中药有效成分含量测定中的应用 [J]. 医药导报, 2011, 30(11): 1474-1476.
- [32] 郭鹤男, 杨学东, 刘军, 等. 高效液相色谱-质谱分析指导下制备黄芩中系列黄酮成分对照品 [J]. 色谱, 2012, 30(7): 690-695.
- [33] 王孟缘, 霍然, 于孟涵, 等. 经典名方甘草泻心汤基准样品的量值传递研究 [J]. 中草药, 2023, 54(16): 5214-5224.
- [34] 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.
- [35] 秦书芝, 李凤, 张瑶, 等. 不同软化处理方法对黄芩饮片中黄芩苷含量影响 [J]. 海峡药学, 2017, 29(10): 30-31.

[责任编辑 郑礼胜]