

经典名方易黄汤物质基准的量值传递分析

毕嘉谣, 田湾湾, 张翼, 杨麒麟, 王迪磊, 杜守颖*, 白洁*

(北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

[摘要] 目的:以指纹图谱、指标成分含量及出膏率为评价指标探索饮片-物质基准的量值传递关系,考察15批易黄汤物质基准的关键质量属性,初步建立其物质基准的质量标准。方法:制备15批易黄汤物质基准冻干粉样品,采用高效液相色谱法(HPLC)对15批饮片和物质基准进行指纹图谱、指标成分含量测定,流动相选择乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~6 min, 97%B; 6~12 min, 97%~92%B; 12~25 min, 92%~90%B; 25~35 min, 90%~89%B; 35~50 min, 89%~82%B; 50~75 min, 82%~72%B; 75~85 min, 72%~35%B),检测波长230 nm,结合出膏率明确特征峰的归属及其与对照图谱的相似度范围,京尼平苷酸、盐酸小檗碱的含量范围及转移率范围,物质基准的出膏率范围及变化幅度等。结果:建立的HPLC指纹图谱检测方法精密性、重复性和稳定性均良好,能同时适用于饮片、物质基准指纹图谱的检测。15批易黄汤物质基准指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均>0.99;共归属15个特征峰,经对照品比对后指认了8个特征峰信息,其中6个来自盐黄柏,1个来自酒车前子,1个来自炒山药。15批易黄汤物质基准中京尼平苷酸、盐酸小檗碱质量分数范围分别为0.10%~0.16%, 0.63%~1.05%,转移率范围分别为20.91%~32.65%, 19.60%~29.59%;物质基准出膏率范围8.45%~9.92%。结论:采用指纹图谱、出膏率及指标成分含量测定相结合的模式,对经典名方易黄汤物质基准的量值传递过程进行分析,可初步拟定易黄汤物质基准的质量标准,可为该经典名方的质量控制及相关制剂开发提供依据。

[关键词] 经典名方; 易黄汤; 物质基准; 量值传递; 高效液相色谱法(HPLC); 出膏率; 指纹图谱

[中图分类号] R22;R289;R28;O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)16-0024-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210488

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210111.1623.005.html>

[网络出版日期] 2021-01-12 11:29

Analysis on Quality Transmitting of Substance Benchmarks of Yihuangtang

BI Jia-yao, TIAN Wan-wan, ZHANG Yi, YANG Qi-lin, WANG Di-lei, DU Shou-ying*, BAI Jie*
(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the quality transmitting relationship between decoction pieces and substance benchmarks with the fingerprint, index component content and dry extract rate as evaluation indexes, and investigate the key quality attributes of 15 batches of substance benchmarks of Yihuangtang, and establish the quality standard of this substance benchmarks. **Method:** Fifteen batches of Yihuangtang substance benchmarks freeze-dried powder samples were prepared, the fingerprint and index component content of 15 batches of decoction pieces and substance benchmarks were determined by high performance liquid chromatography (HPLC), the mobile phase was acetonitrile (A)-0.1% phosphoric acid aqueous solution (B) for gradient elution (0-6 min, 97%B; 6-12 min, 97%-92%B; 12-25 min, 92%-90%B; 25-35 min, 90%-89%B; 35-50 min, 89%-82%B; 50-75 min, 82%-72%B; 75-85 min, 72%-35%B), the detection wavelength was set at 230 nm, combined the dry extract rate to clarify the attribution of characteristic peaks and the range of

[收稿日期] 20201124(006)

[基金项目] 中央高校基本科研业务费专项(2020-JYB-ZDGG-031)

[第一作者] 毕嘉谣,在读硕士,从事中药新剂型与新技术研究, Tel:024-52818899, E-mail:15641300076@163.com

[通信作者] *杜守颖,博士,教授,从事中药新剂型与新技术研究, Tel:010-84738615, E-mail:dushouying@263.net;

*白洁,博士,副教授,从事中药新剂型与新技术研究, Tel:010-84738657, E-mail:baijie22811@163.com

similarity with the control chromatogram, the content range and transfer rate range of geniposidic acid and berberine hydrochloride, the dry extract rate range and the variation range of the substance benchmarks. **Result:** The established HPLC fingerprint had good precision, repeatability and stability, and could be used for the simultaneous determination of decoction pieces and substance benchmarks of Yihuangtang. The similarities between the control chromatogram and fingerprint of substance benchmarks were >0.99. A total of 15 characteristic peaks were assigned, and 8 characteristic peaks were identified by the reference substances, of which 6 were from *Phellodendri Chinensis* Cortex processed with salt, 1 was from *Plantaginis Semen* processed with wine, and 1 was from stir-fried *Dioscoreae Rhizoma*. The content ranges of geniposidic acid and berberine hydrochloride in 15 batches of substance benchmarks of Yihuangtang were 0.10%-0.16% and 0.63%-1.05%, the transfer rate ranges of them were 20.91%-32.65% and 19.60%-29.59%, respectively. The dry extract rate range of the substance benchmarks was 8.45%-9.92%. **Conclusion:** The quality standard of Yihuangtang substance benchmarks can be preliminarily formulated by the combination of fingerprint, dry extract rate and determination of index component, which can provide the basis for the quality control of Yihuangtang and the development of related preparations.

[Keywords] famous classical formulas; Yihuangtang; substance benchmarks; quality transmitting; high performance liquid chromatography (HPLC); dry extract rate; fingerprint

易黄汤来源于《傅青主女科》，由炒山药、炒芡实、酒车前子、盐黄柏和白果组成，具有固肾止带、清热祛湿的功效，是治疗妇科带下病的常用方^[1]，临床上多用于治疗宫颈炎、盆腔炎等妇科疾病。通过对易黄汤临床应用文献和医案的研究发现，该方不止局限于治疗带下病，通过加减或联合用药，也被灵活地运用到临床其他疾病的治疗中，如排卵期出血^[2]、慢性前列腺炎^[3]、未足月胎膜早破^[4]、尿路感染和慢性肾炎^[5]等，且均具有很好的疗效。目前，易黄汤被收录于《古代经典名方目录（第一批）》。《古代经典名方中药复方制剂及其物质基准的申报资料要求（征求意见稿）》指出，应从浸出物、指纹图谱、含量测定等方面对饮片与物质基准之间的量值传递进行研究。经典名方物质基准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^[6]，对饮片与物质基准的量值传递过程进行分析，明确其质量控制指标及范围，具有重要意义。

目前，对于易黄汤的研究多集中在单独应用或与西药联用的临床效果研究上^[7]，对于易黄汤的作用机制缺乏足够的研究，质量控制方面研究也较少，尚未见其物质基准量值传递方面的报道。基于此，本实验拟制备15批易黄汤物质基准，建立其指纹图谱的检测方法，分析指纹图谱的相似度及色谱峰归属，并结合出膏率范围、指标性成分含量及转移率范围，进行饮片与物质基准的量值传递分析及整体质量研究，以为易黄汤及其复方制剂的后续开发和研究提供借鉴。

1 材料

FD-2A型真空冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司), 2XZ-4型旋片式真空泵(临海市谭氏真空设备有限公司), YC7144-T型单相异步电动机(奉化市飞马电机厂), JM-B10002型1/1万电子天平(余姚市纪铭称重校验设备有限公司), BSA224S型电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司], LC-20A型高效液相色谱仪[岛津(中国)有限公司], 包括二极管阵列检测器(DAD), LCsolution色谱工作站, DZF-6051型真空干燥器(北京利康达圣科技发展有限公司), DHG-9140A型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司), GW-T5型电陶炉(中山市冠为环保科技有限公司), MDN-JS08型陶瓷锅(景德镇荣特陶瓷有限公司), G20型医用离心机(北京白洋医疗器械有限公司)。

炒山药、炒芡实、盐黄柏、酒车前子、白果饮片来源信息见表1，均由亿帆医药股份有限公司提供，经北京中医药大学刘春生教授鉴定，分别为薯蓣科植物薯蓣 *Dioscorea opposita* 的干燥根茎的炒制品、睡莲科植物 *Euryale ferox* 的干燥成熟种仁的炒制品、芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* 的干燥树皮的盐炙品、车前科植物车前 *Plantago asiatica* 的干燥成熟种子的酒炙品、银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* 的干燥成熟种子。

京尼平苷酸(批号111828-201805, 纯度98.1%), 盐酸黄柏碱(批号111895-201805, 纯度94.9%), 绿原酸(批号110753-201817, 纯度96.8%),

表1 易黄汤组方中的饮片来源

Table 1 Source of decoction pieces in formula of Yihuangtang

饮片	产地	批号
炒山药	河南省焦作市孟州	CSY-201803-1-YP~CSY-201803-5-YP
炒芡实	湖北省荆州市	CQS-201801-1-YP~CQS-201801-5-YP
	广东省肇庆市高要区禄步镇	CQS-201802-1-YP~CQS-201802-5-YP
	山东省泰安市东平县	CQS-201804-1-YP
	山东省济宁市汶上县	CQS-201804-2-YP~CQS-201804-5-YP
盐黄柏	四川省江油市大康镇	YCHB-201802-1-YP~YCHB-201802-5-YP
	四川省雅安市荣经县	YCHB-201804-1-YP~YCHB-201804-5-YP
酒车前子	江西省吉安市泰和县万合镇	JCQZ-201801-1-YP~JCQZ-201801-5-YP
	江西省吉安市新干县三湖镇	JCQZ-201802-1-YP~JCQZ-201802-5-YP
	江西省赣州市兴国县	JCQZ-201803-1-YP~JCQZ-201803-5-YP
白果	江苏省徐州市邳州	BG-PZ-1~BG-PZ-5
	山东省临沂市郯城县	BG-TC-1~BG-TC-5
	安徽省宣城市绩溪县	BG-JX-1~BG-JX-5

盐酸小檗碱(批号110713-201814,纯度86.7%),尿囊素(批号111501-200202,纯度≥98%)对照品均购自中国食品药品检定研究院;木兰花碱(批号2141-09-5,纯度≥98%),4-O-阿魏酰奎尼酸(批号2613-86-7,纯度≥95%),5-O-阿魏酰奎尼酸(批号40242-06-6,纯度≥98%)对照品均购自上海源叶生物科技有限公司;水为娃哈哈纯净水,乙腈、甲醇、磷酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 15批易黄汤物质基准的制备 参照《古代经典名方中药复方制剂及其物质基准的申报资料要求(征求意见稿)》的要求,物质基准最终以冻干粉或者干浸膏为基本形态,考虑到浓缩成干浸膏的过程中,中药中的一些成分可能受热不稳定,且干浸膏在复溶时可能有一定困难,而冻干粉形态疏松、受污染小、含水量低且较为稳定,具有便于少量制备及储存、容易复溶、更能反映原始汤剂中信息等特点,故易黄汤物质基准选择以冻干粉的形式存在。根据随机数表法对5味饮片进行随机组合及排序,15批易黄汤物质基准对应饮片的批号见表2。分别称取炒山药38.0 g,炒芡实38.0 g,盐黄柏8.0 g,酒车前子4.0 g,白果10.0 g于陶瓷锅^[8-9]中,一煎加8倍量(约800 mL)水,浸泡45 min,武火(1 500 W,下同)煎煮至沸腾,调成文火(400 W,下同)煎煮45 min,用1层300目尼龙布趁热过滤(下同);二煎时加6倍量(约600 mL)水,武火煎煮至沸腾,再调文火煎煮30 min,过滤;合并2次滤液,加去离子水至体积为

600 mL。精密移取该水煎液10 mL于25 mL西林瓶中,于-20 °C冰箱中预冷冻12 h,于-80 °C预冷2 h的真空冷冻干燥机中,冻干温度-80 °C,开启真空泵,冷冻干燥72 h,即得易黄汤物质基准冻干粉样品。

2.2 易黄汤物质基准指纹图谱方法的建立

2.2.1 色谱条件 Waters XSelect HSS T3 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~6 min, 97%B; 6~12 min, 97%~92%B; 12~25 min, 92%~90%B; 25~35 min, 90%~89%B; 35~50 min, 89%~82%B; 50~75 min, 82%~72%B; 75~85 min, 72%~35%B),柱温30 °C,流速1.0 mL·min⁻¹,检测波长230 nm,进样量10 μL。

2.2.2 供试品溶液的制备 取易黄汤物质基准冻干粉1支(约0.15 g),精密加入25%甲醇10 mL,密封,超声(250 W, 40 kHz)30 min,摇匀。取8 mL于10 mL离心管中,离心(1万 r·min⁻¹, 10 min, 离心半径5.79 cm,下同),取上清液过0.45 μm微孔滤膜,即得易黄汤物质基准的供试品溶液。称取0.5倍处方量的炒山药、炒芡实、盐黄柏、酒车前子、白果饮片分别置于圆底烧瓶中,加与全方等比例水300 mL回流75 min(同全方煎煮时间),300目尼龙纱布过滤后放冷,加水调整体积至300 mL,取适量离心,取上清液过0.45 μm滤膜,得各饮片的供试品溶液。

2.2.3 精密度考察 取YHTS1易黄汤物质基准冻干粉的供试品溶液1份,按2.2.1项下的条件连续进样6次,以12号峰(木兰花碱)为参照,计算各特征

表2 15批易黄汤物质基准对应饮片的批号

Table 2 Batch numbers of decoction pieces corresponding to 15 batches of substance benchmarks of Yihuangtang

物质基准批号	批号				
	炒山药	炒芡实	盐黄柏	酒车前子	白果
YHTS1	CSY-201803-5-YP	CQS-201804-3-YP	YCHB-201802-3-YP	JCQZ-201802-2-YP	BG-PZ-1
YHTS2	CSY-201803-5-YP	CQS-201801-3-YP	YCHB-201802-1-YP	JCQZ-201801-5-YP	BG-PZ-2
YHTS3	CSY-201803-5-YP	CQS-201804-1-YP	YCHB-201802-4-YP	JCQZ-201801-1-YP	BG-JX-5
YHTS4	CSY-201803-3-YP	CQS-201801-2-YP	YCHB-201804-5-YP	JCQZ-201803-1-YP	BG-TC-4
YHTS5	CSY-201803-2-YP	CQS-201801-1-YP	YCHB-201802-1-YP	JCQZ-201802-3-YP	BG-TC-1
YHTS6	CSY-201803-4-YP	CQS-201802-2-YP	YCHB-201804-3-YP	JCQZ-201803-3-YP	BG-TC-3
YHTS7	CSY-201803-1-YP	CQS-201804-5-YP	YCHB-201802-2-YP	JCQZ-201801-3-YP	BG-PZ-3
YHTS8	CSY-201803-3-YP	CQS-201802-4-YP	YCHB-201804-2-YP	JCQZ-201801-2-YP	BG-JX-4
YHTS9	CSY-201803-1-YP	CQS-201801-4-YP	YCHB-201804-4-YP	JCQZ-201803-4-YP	BG-TC-2
YHTS10	CSY-201803-4-YP	CQS-201802-5-YP	YCHB-201804-3-YP	JCQZ-201801-4-YP	BG-PZ-5
YHTS11	CSY-201803-3-YP	CQS-201801-5-YP	YCHB-201804-2-YP	JCQZ-201802-4-YP	BG-JX-2
YHTS12	CSY-201803-4-YP	CQS-201804-4-YP	YCHB-201804-1-YP	JCQZ-201802-1-YP	BG-JX-3
YHTS13	CSY-201803-2-YP	CQS-201802-3-YP	YCHB-201802-5-YP	JCQZ-201802-5-YP	BG-JX-1
YHTS14	CSY-201803-1-YP	CQS-201802-1-YP	YCHB-201802-4-YP	JCQZ-201803-2-YP	BG-TC-5
YHTS15	CSY-201803-2-YP	CQS-201804-2-YP	YCHB-201802-5-YP	JCQZ-201803-5-YP	BG-PZ-4

峰相对保留时间的相对标准偏差(RSD)均<0.2%,相对峰面积的RSD均<3.8%。

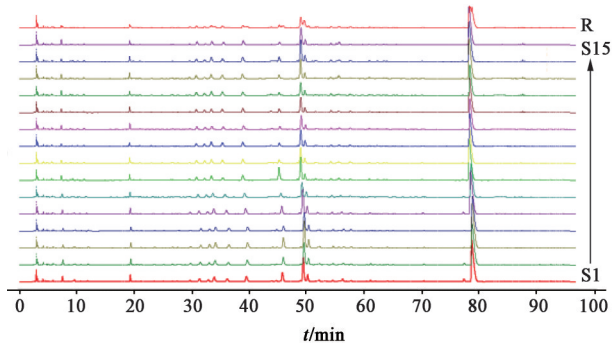
2.2.4 重复性考察 取YHTS2易黄汤物质基准冻干粉6份,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件测定,以12号峰(木兰花碱)为参照,计算各特征峰相对保留时间的RSD均<1.0%,相对峰面积的RSD均<7.7%。

2.2.5 稳定性考察 取YHTS2易黄汤物质基准冻干粉1份,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,分别于制备后0,2,4,6,8,10,12,24 h按2.2.1项下色谱条件测定,以12号峰(木兰花碱)为参照,计算各特征峰相对保留时间的RSD均<0.7%,相对峰面积的RSD均<7.1%,说明易黄汤物质基准冻干粉供试品溶液在24 h内稳定性较好。

2.3 指纹图谱研究 取15批易黄汤物质基准冻干粉样品适量,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下条件测定,得高效液相色谱法(HPLC)指纹图谱,见图1。将色谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012版),将样品YHTS1的指纹图谱设置为参照图谱,选择对照图谱生成方式为中位数法,设定时间窗宽度0.2 min,对色谱图进行全谱峰匹配,系统根据多批次样品色谱图的共有模式生成对照指纹图谱(R)。结果15批易黄汤物质基准(YHTS1~YHTS15)与对照指纹图谱的相似度分

别为0.996,0.997,0.997,0.997,0.998,0.998,0.994,0.998,0.997,0.996,0.997,0.994,0.997,0.999,0.996(均>0.99),各批样品之间的指纹图谱相似度也均>0.90,说明易黄汤物质基准制备工艺稳定。对易黄汤物质基准指纹图谱进行特征峰归属,共归属15个特征峰,见图1和图2,与对照品比对后指认了8个特征峰信息。其中,1号峰(尿囊素)归属于炒山药;4号峰归属炒芡实;3号峰为山药和白果共有峰;2号峰和5号峰(京尼平苷酸)归属于酒车前子;6号峰和9号峰归属白果;7号峰,8号峰(绿原酸),10号峰,11号峰(盐酸黄柏碱),12号峰(木兰花碱),13号峰(5-O-阿魏酰奎尼酸),14号峰(4-O-阿魏酰奎尼酸),15号峰(盐酸小檗碱)均归属于盐黄柏饮片。以12号峰(木兰花碱)为参照,各特征峰峰面积与木兰花碱峰面积的比值见表3。

将15批易黄汤物质基准生成的对照指纹图谱与各饮片不同批次样品的对照指纹图谱进行比对,结果见图2。选择12号峰(木兰花碱)为参照峰,利用其他特征峰的峰面积与其相除,计算比值,得相对峰面积,见表4。结果比较各特征峰的峰面积时,发现从饮片制备成物质基准后,1,3,9,13,14号峰的峰面积均有不同程度的增加;同时,比较各特征峰的相对峰面积时,发现13和15号峰变化较为明显。



R. 对照指纹图谱; S1~S15 分别对应物质基准批号 YHTS1~YHTS15 (表3同)

图1 15批易黄汤物质基准的HPLC指纹谱

Fig. 1 Fingerprint of 15 batches of Yihuangtang substance benchmarks by HPLC

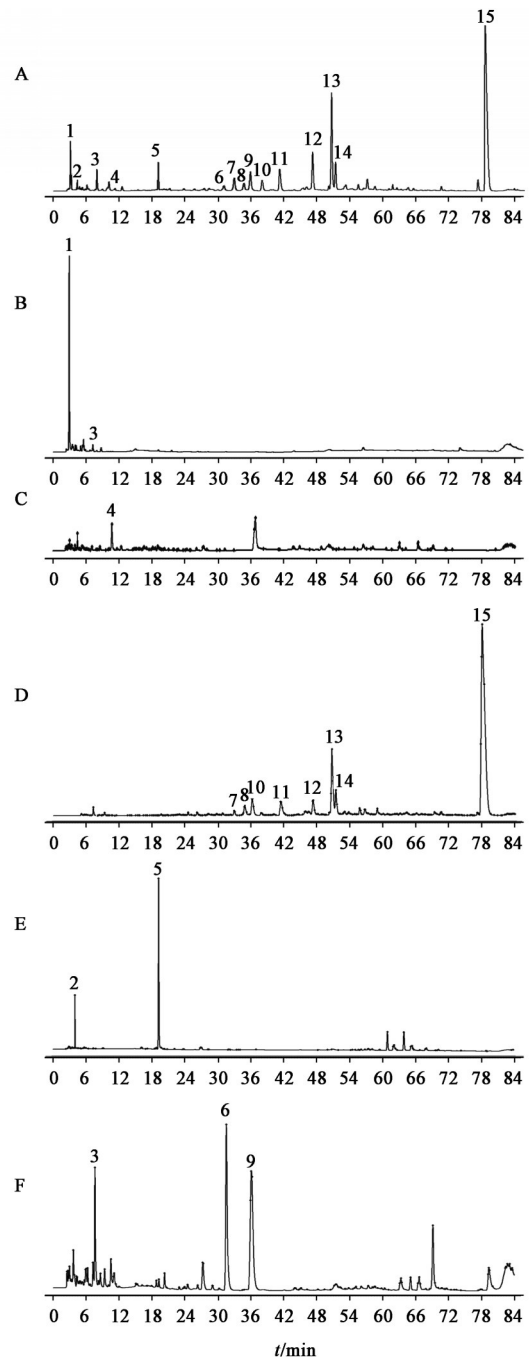
2.4 易黄汤物质基准指标成分定量方法的建立

2.4.1 对照品溶液的制备 精密称取京尼平苷酸对照品 8.89 mg 于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,得 $872.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液;加甲醇将该母液稀释成 $87.21 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 京尼平苷酸对照品溶液。精密称取盐酸小檗碱对照品 6.67 mg,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,得 $0.578 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液;精密吸取该母液 1 mL,加甲醇稀释成 $57.82 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸小檗碱对照品溶液。

2.4.2 供试品溶液的制备 同 2.2.2 项。

2.4.3 方法学考察 查阅 2020 年版《中华人民共和国药典》(下文简称《中国药典》)^[10],发现山药、芡实、白果均未设定指标成分,黄柏和车前子中则各有 2 个指标性成分,但京尼平苷酸和盐酸小檗碱在指纹图谱的分离度较优、峰面积和出峰时间均合适且无阴性干扰、性质稳定便于考察且易购买,综合考虑后最终选择京尼平苷酸、盐酸小檗碱为评价指标。根据 2020 年版《中国药典》^[10] 方法学考察要求,按 2.2.1 项下色谱条件进行易黄汤物质基准中指标成分含量测定的方法学考察,见表 5。结果表明方法专属性、仪器精密度、方法重复性、供试品溶液稳定性、方法加样回收率均良好,符合实验要求。

2.4.4 样品测定 取 15 批易黄汤物质基准冻干粉样品适量,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,每批平行 2 份,取平均值,见表 6。结果发现 15 批物质基准中京尼平苷酸质量分数处于 0.10%~0.16%,平均值 0.12%,各批样品中该成分质量分数为均值的 80.58%~128.72%;盐酸小檗碱质量分数 0.63%~1.05%,平均值 0.86%,各批样品中该成分质量分数为均值的 73.66%~121.72%,均符合含量波动范围(均值的 70%~130%)的要求。



A~F 分别对应物质基准、炒山药、炒芡实、盐黄柏、酒车前子、白果
图2 易黄汤物质基准 HPLC 指纹谱中共有峰的归属

Fig. 2 Attribution of characteristic peaks in HPLC fingerprint of Yihuangtang substance benchmarks

2.5 指标成分含量的量值传递关系研究 计算饮片-物质基准中指标成分含量的转移率,考察其间传递,计算公式为转移率 = $(w \times m \times 60) / (W \times M) \times 100\%$,式中 w 表示从 600 mL 水煎液取样 10 mL 冻干所得物质基准中有效成分的质量分数, m 表示物质基准样品质量, W 表示饮片中有效成分的质量分数, M 表示处方中饮片的质量,见表 7。结果发现从饮片到

表3 15批易黄汤物质基准其他特征峰与木兰花碱的峰面积比值

Table 3 Peak area ratio between other characteristic peaks in 15 batches of Yihuangtang substance benchmarks and magnoflorine

样品	峰号													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	14	15
S1	0.41	0.05	0.29	0.08	0.31	0.17	0.36	0.23	0.57	0.34	0.66	0.55	0.65	6.40
S2	0.46	0.09	0.31	0.09	0.30	0.19	0.36	0.30	0.63	0.36	0.70	2.43	0.71	7.23
S3	0.39	0.07	0.16	0.08	0.21	0.13	0.26	0.39	0.59	0.38	0.60	2.35	0.73	6.95
S4	0.91	0.16	0.29	0.17	0.38	0.20	0.54	0.53	0.95	0.83	1.01	3.41	0.96	10.00
S5	0.54	0.06	0.27	0.09	0.31	0.23	0.39	0.32	0.74	0.52	0.76	2.87	0.91	8.49
S6	0.83	0.11	0.38	0.15	0.45	0.18	0.51	0.53	0.94	0.67	0.93	2.81	1.04	9.60
S7	0.30	0.04	0.16	0.08	0.17	0.09	0.21	0.14	0.33	0.22	0.43	1.52	0.40	4.60
S8	1.24	0.16	0.5	0.28	0.74	0.26	0.94	0.77	1.25	1.17	1.47	4.37	1.43	14.75
S9	1.25	0.17	0.42	0.24	0.47	0.20	0.86	0.76	1.51	1.32	1.48	4.58	1.65	13.94
S10	1.29	0.19	0.66	0.34	1.02	0.25	0.92	0.79	1.15	0.96	1.40	3.93	1.31	12.96
S11	1.17	0.16	0.53	0.23	0.88	0.25	0.83	0.74	1.08	1.10	1.40	3.87	1.27	13.89
S12	1.29	0.19	0.82	0.40	0.65	0.27	1.19	0.79	1.48	1.60	1.48	4.00	1.55	13.84
S13	1.59	0.19	0.77	0.33	1.00	0.49	1.23	0.51	1.60	1.52	1.87	6.32	1.84	22.11
S14	0.94	0.11	0.29	0.18	0.50	0.18	0.58	0.38	1.08	0.76	1.20	4.25	1.26	13.50
S15	1.74	0.21	1.07	0.32	0.72	0.33	1.26	0.52	1.56	1.22	1.93	6.30	1.80	23.37

注:12号峰为木兰花碱。

表4 易黄汤物质基准与各组方饮片中特征峰的峰面积比较

Table 4 Comparison of peak area of characteristic peaks in 15 batches of Yihuangtang substance benchmarks and each decoction piece

峰号	峰面积						相对峰面积	
	物质基准	炒山药	炒芡实	盐黄柏	酒车前子	白果	物质基准	单味药
1	459 471	446 091	-	-	-	-	1.161	0.617
2	58 689	-	-	-	60 418	-	0.148	0.084
3	210 559	9 290	-	-	-	-	0.532	0.013
4	87 025	-	136 083	-	-	-	0.220	0.188
5	255 082	-	-	-	580 136	-	0.645	0.803
6	92 400	-	-	157 484	-	-	0.234	0.218
7	326 476	-	-	-	-	428 390	0.825	0.593
8	277 494	-	-	476 400	-	-	0.701	0.660
9	501 046	-	-	317 188	-	-	1.267	0.439
10	435 157	-	-	-	-	529 967	1.100	0.734
11	547 905	-	-	949 755	-	-	1.385	1.315
12	395 594	-	-	722 319	-	-	1.000	1.000
13	1 760 722	-	-	1 572 149	-	-	4.451	2.177
14	558 856	-	-	410 760	-	-	1.413	0.569
15	5 492 901	-	-	14 273 446	-	-	13.885	19.761

注:以12号峰面积为参照,每个峰与物质基准或单味药中12号峰的峰面积一一对应的比值。

易黄汤物质基准,京尼平苷酸的转移率20.91%~32.65%,均值27.18%;盐酸小檗碱转移率19.60%~29.59%,均值24.02%。整体来看,不同产地批次的酒车前子饮片、盐黄柏饮片与其他药味组方煎煮

后,2个指标成分含量均呈现不同程度的降低。这可能与酒车前子的包煎、饮片和物质基准的含量测定方法中色谱条件、提取溶剂等不同有关(饮片均按2020年版《中国药典》(一部)所载方法进行含量

表5 易黄汤物质基准中指标成分含量测定的方法学考察

Table 5 Methodological study on determination of index components in substance benchmarks of Yihuangtang

指标成分	回归方程	RSD/%			加样回收率(RSD)/%
		精密度	重复性	稳定性	
京尼平苷酸	$Y=790.187X+241.05 (R^2=0.999)$	2.2	2.8	2.4	99.58(3.0)
盐酸小檗碱	$Y=5.000.000X-23.906 (R^2=0.999)$	0.1	0.7	0.2	97.72(2.3)

表6 15批易黄汤物质基准中指标成分的质量分数

Table 6 Contents of index components in 15 batches of substance benchmarks of Yihuangtang %

物质基准批号	京尼平苷酸	盐酸小檗碱
YHTS1	0.15	0.98
YHTS2	0.13	0.91
YHTS3	0.11	1.05
YHTS4	0.10	0.80
YHTS5	0.12	1.03
YHTS6	0.11	0.72
YHTS7	0.14	0.99
YHTS8	0.13	0.75
YHTS9	0.10	0.73
YHTS10	0.16	0.63
YHTS11	0.14	0.74
YHTS12	0.10	0.65
YHTS13	0.13	0.92
YHTS14	0.13	0.97
YHTS15	0.11	0.98

表7 易黄汤饮片-物质基准指标成分含量的转移率

Table 7 Transfer rates of index components from decoction pieces to substance benchmarks of Yihuangtang %

批号	京尼平苷酸			盐酸小檗碱		
	饮片	物质基准	转移率	饮片	物质基准	转移率
YHTS1	1.04	0.15	32.45	4.12	0.98	26.76
YHTS2	1.10	0.13	27.48	4.23	0.91	25.01
YHTS3	1.10	0.11	24.00	4.59	1.05	27.45
YHTS4	0.99	0.10	20.91	3.86	0.80	21.45
YHTS5	1.05	0.12	27.26	4.23	1.03	29.04
YHTS6	0.96	0.11	25.27	3.64	0.72	21.81
YHTS7	1.09	0.14	30.63	3.99	0.99	29.59
YHTS8	1.10	0.13	28.72	3.91	0.75	23.31
YHTS9	0.99	0.10	21.97	3.73	0.73	21.28
YHTS10	1.11	0.16	32.65	3.64	0.63	19.60
YHTS11	1.06	0.14	30.11	3.91	0.74	21.58
YHTS12	1.03	0.10	20.97	3.48	0.65	20.17
YHTS13	1.06	0.13	28.70	4.39	0.92	24.52
YHTS14	0.96	0.13	31.69	4.59	0.97	24.73
YHTS15	0.95	0.11	24.84	4.39	0.98	23.94

注:盐黄柏、酒车前子质量分别为8.0,4.0 g;YHTS1~YHTS15的质量分别为0.150,0.155,0.160,0.138,0.159,0.147,0.159,0.162,0.145,0.151,0.152,0.144,0.156,0.156,0.143 g。

测定)。

2.6 出膏率研究 按2.1项下方法制备的15批易黄汤水煎液浓缩至一定体积后,分别转移至250 mL的蒸发皿中,水浴加热浓缩成稠膏,真空干燥72 h至恒重,即得易黄汤物质基准干膏粉,计算出膏率;同时,分别称取处方量一半的15批饮片置于圆底烧瓶中,加水300 mL,回流提取75 min,过滤,放凉,调整体积至300 mL,移入蒸发皿中,浓缩至稠膏后真空干燥72 h至恒重,计算出膏率。出膏率计算公式为出膏率= $m/M \times 100\%$,式中 m 表示干膏粉的质量, M 表示饮片初始质量,见表8。结果显示,15批易黄汤物质基准的出膏率处于8.45%~9.92%,RSD 4.7%,表示不同批次物质基准的出膏率较为稳定。

3 讨论

本研究在进行色谱条件考察时,为了确定检测波长,采用了DAD全波长(200~400 nm)检测,为避免所选波长被阴性溶剂峰干扰,故调用了波长200~254 nm下的阴性溶剂峰的指纹图谱作为对照。结

果发现当波长>230 nm后,指纹图谱的出峰信息逐渐减少,当波长>360 nm时,基本无明显的色谱峰;当波长位于200~230 nm时,指纹图谱整体出峰信息较多。考虑到空白溶剂(水)的干扰,且尽可能多地保留指纹图谱信息,最终选定230 nm作为易黄汤物质基准的指纹图谱检测波长。

考虑到色谱柱的耐受能力及尽量展现完整色谱峰信息,本文对易黄汤物质基准冻干粉的不同复溶溶剂进行了考察,考察其对易黄汤物质基准的指纹图谱及特征峰峰面积的影响。优选并确定了易黄汤物质基准冻干粉样品的测定前处理方法为加25%甲醇复溶。该方法实现了易黄汤物质基准冻干粉制备前后的一致性,保证了研究过程的科学性与可靠性,也可为类似方剂的研究提供参考。根据建立的全方水煎液的指纹图谱方法,比较了水回流

表8 易黄汤单味饮片及物质基准的出膏率

Table 8 Dry extract rates of each decoction piece and substance benchmarks of Yihuangtang %

批号	炒山药	炒芡实	盐黄柏	酒车前子	白果	物质基准
YHTS1	10.16	6.63	19.50	15.00	20.24	9.18
YHTS2	10.16	5.11	19.00	14.50	20.44	9.49
YHTS3	10.16	6.26	17.75	14.00	27.69	9.80
YHTS4	8.63	4.37	15.50	15.00	27.44	8.45
YHTS5	9.37	4.26	19.00	13.00	25.84	9.73
YHTS6	9.11	5.79	14.75	14.50	28.77	9.00
YHTS7	9.63	5.05	18.75	13.50	21.19	9.73
YHTS8	8.63	5.74	16.25	14.50	30.50	9.92
YHTS9	9.63	4.58	15.75	15.00	27.67	8.87
YHTS10	9.11	6.11	14.75	14.50	23.03	9.24
YHTS11	8.63	5.95	16.25	15.50	27.83	9.31
YHTS12	9.11	5.89	15.75	13.50	30.56	8.82
YHTS13	8.78	5.94	17.75	14.50	31.41	9.55
YHTS14	8.68	5.74	17.75	15.00	28.32	9.55
YHTS15	8.78	5.37	17.75	14.00	26.04	8.75

提取和煎煮提取的差异,对各单味药不同批次的指纹图谱进行相似度评价,发现这2种提取方法差异不具有统计学意义。为便于多批次同时操作,节省药材,采用处方量减半的药材量进行回流提取,最终水提液也为全方煎液的一半量,保证水回流提取与水煎煮等效。饮片到物质基准的传递较为一致,盐酸小檗碱的含量低在一定程度上受到了盐黄柏品质的影响,所用盐黄柏均来自道地产区,但盐黄柏的品质有等级差异,品相较好的盐黄柏,指标成分的含量也高;另外,由于盐黄柏是树皮入药,在剥去粗皮时,粗皮是否剥干净,树皮的老嫩、枯萎程度对盐黄柏质量影响很大,提示在采收时要注意盐黄柏的最佳采收时期。预试验发现山药粗细对山药出膏率影响很大,粗大型的炒山药饮片平均出膏率26.03%,细长型的炒山药饮片平均出膏率9.38%,为了便于物质基准出膏率的一致性和稳定性,建议选用细长型的炒山药进行后续物质基准的研究。

经典名方作为中医药文化的杰出代表,对其进行标准化、现代化研究有利于将其开发成现代制剂^[6]。经典名方复方制剂研制的重点在于建立从药材源头到饮片、中间体、制剂全过程的质量控制措施,且整个过程需与“经典名方物质基准”作相关性比对^[11]。目前临床上易黄汤多以传统汤剂给药,尚未被开发成现代制剂,且缺乏对其质量的研究和控制。基于此,本文基于前期文献查阅及实验研究结

果,结合现代中医药研究手段,引入指标成分含量、指纹图谱、出膏率等指标,并将筛选出的饮片进行随机匹配,按照上述方法制备了15批易黄汤物质基准,初步拟定易黄汤物质基准的质量标准:本品为鲜黄色粉末,气微;物质基准中京尼平苷酸质量分数处于0.10%~0.16%,盐酸小檗碱质量分数处于0.63%~1.05%,出膏率处于8.45%~9.92%;15批物质基准的HPLC指纹图谱与其生成的对照图谱的相似度均>0.99。本研究不足之处在于山药、芡实指纹图谱信息较少,可考虑通过电雾式检测器对其糖类成分进行进一步表征,另外,还可通过研究中药超分子“印迹模板”的作用机制、运用生物遗传统计学原理^[12]完善其质量标准。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 傅山. 傅青主女科[M]. 北京:中国中医药出版社, 2019:5.
[2] 刘丹. 加味易黄汤治疗排卵期出血30例[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(8):1531.
[3] 邢益涛,张明强,王定国,等. 林天东主任运用易黄汤治疗慢性前列腺炎经验[J]. 云南中医中药杂志, 2018, 39(2):3-4.
[4] 光辉. 易黄汤加减联合抗生素预防未足月胎膜早破感染的临床观察[D]. 晋中:山西中医学院, 2016.
[5] 温静,杨继红. 易黄汤临床新用的文献研究[J]. 光明中医, 2012, 27(9):1740-1742.
[6] 代云桃,靳如娜,吴治丽,等. 基于标准汤剂(物质基准)的经典名方制备工艺和质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(2):164-174.
[7] 许桢惠. 加减易黄汤联合保妇康栓治疗老年阴道炎临床观察[J]. 光明中医, 2019, 34(7):984-986.
[8] 王乐,田湾湾,洪婷婷,等. 汉唐宋时期中医药典籍中制剂发展探索[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(11):230-234.
[9] 喻刚艳,薛宇涛,谭丽,等. 煎药器皿对白芥子煎液中芥子碱含量及其特征图谱的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(1):183-188.
[10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2020:69-70, 318.
[11] 曾瑾,杨安东,张爱军,等. 古代经典名方中药复方制剂的注册管理及高质量转化要素分析[J]. 中药药理学与临床, 2020, 36(3):242-254.
[12] 樊启猛,贺鹏,李海英,等. 经典名方物质基准研制的关键技术分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(15):202-209.

[责任编辑 刘德文]