

平火茶标准汤剂的质量分析^Δ

赵新梅^{1*}, 桑宏扬¹, 杨春静^{2#}, 雷敬卫¹, 龚海燕¹, 谢彩侠¹, 张春亚¹, 段浩瀚¹, 余浩¹(1. 河南中医药大学药学院, 郑州 450046; 2. 河南中医药大学第三附属医院药剂科, 郑州 450046)

中图分类号 R284.1;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)01-0071-08
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.01.12



摘要 目的 建立平火茶标准汤剂指纹图谱和多指标含量测定的方法,并探究饮片-标准汤剂化学成分的量值传递关系。方法 制备15批平火茶标准汤剂,测定其出膏率;采用高效液相色谱(HPLC)法建立该制剂的指纹图谱,并进行相似度评价和共有峰确定,同时进行化学计量学分析;同法测定该制剂中指标性成分含量并计算含量的转移率。色谱柱为 Venusil C₁₈,流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(梯度洗脱),柱温为30℃,检测波长为238 nm(0~37 min, 85~102 min)、330 nm(37~85 min),流速为1.0 mL/min,进样量为10 μL。结果 15批平火茶标准汤剂HPLC指纹图谱的相似度均不小于0.968;共标定出24个共有峰,指认出了其中9个,分别为新绿原酸(峰3)、绿原酸(峰6)、栀子苷(峰9)、甘草苷(峰10)、木犀草苷(峰11)、异绿原酸A(峰14)、木犀草素(峰21)、山柰酚(峰23)、甘草酸(峰24)。聚类分析、主成分分析与正交偏最小二乘判别分析结果一致,均可将15批样品分为3类。15批平火茶标准汤剂的指标性成分栀子苷、木犀草苷、异绿原酸A、甘草苷、甘草酸的线性范围分别为0.020 580~0.411 600、0.001 617~0.080 850、0.006 076~0.607 600、0.005 125~0.071 740、0.017 288~0.432 200 mg/mL;精密性、重复性、稳定性、加样回收率试验的RSD均不高于4%(n均为6);含量范围分别为3.227 9~10.002 2、0.297 4~0.554 6、3.350 1~6.159 6、0.720 6~1.073 3、2.003 1~3.030 1 mg/g,饮片-标准汤剂含量的转移率范围分别为19.762 8%~35.840 5%、12.123 3%~21.254 0%、46.097 2%~82.869 4%、58.708 8%~91.629 6%、39.114 3%~63.710 6%。15批平火茶标准汤剂出膏率的转移率范围为61.15%~84.68%。结论 本研究所建立的HPLC指纹图谱和含量测定方法简单且准确度高,可为平火茶标准汤剂的量值传递研究、质量控制、临床应用及后续制剂的开发提供参考。

关键词 平火茶标准汤剂;含量测定;指纹图谱;量值传递;质量控制;高效液相色谱法

Quality analysis of Pinghuo tea standard decoction

ZHAO Xinmei¹, SANG Hongyang¹, YANG Chunjing², LEI Jingwei¹, GONG Haiyan¹, XIE Caixia¹, ZHANG Chunya¹, DUAN Haohan¹, YU Hao¹(1. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Dept. of Pharmacy, Third Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To establish the fingerprint of Pinghuo tea standard decoction and a method for determination of multi-component to clarify the transfer relationship of quantities and quality from pieces and standard decoction. **METHODS** Fifteen batches of Pinghuo tea standard decoction were prepared and the extract rate was determined; the fingerprint of the preparation was established by using high-performance liquid chromatography (HPLC); the similarity evaluation and the determination of common peaks were performed, and chemometric analysis was performed; the same method was used to determine the content of indicator components and the transfer rate was calculated. The chromatographic column was Venusil C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (gradient elution); the column temperature was 30 °C, and the detection wavelengths were 238 nm (0-37 min, 85-102 min) and 330 nm (37-85 min) at a flow rate of 1.0 mL/min with an injection volume of 10 μL. **RESULTS** The similarity of HPLC fingerprints for 15 batches of Pinghuo tea standard decoction was not lower than 0.968. A total of 24 common peaks were calibrated and 9 peaks were recognized, which were as follows neochlorogenic acid (peak 3), chlorogenic acid (peak 6), geniposide (peak 9), glycyrrhizin (peak 10), galuteolin (peak 11), isochlorogenic acid A (peak 14), luteolin (peak 21), kaempferol (peak 23) and glycyrrhizic acid (peak 24). Cluster analysis, principal component analysis and orthogonal partial least squares discriminant analysis showed consistent results, all of which could classify the 15 batches of samples into three categories. The linear range of indicator components in 15 batches of Pinghuo tea standard decoction, such as geniposide, luteolin, isochlorogenic acid A, glycyrrhizin, and glycyrrhizic acid, were 0.020 580-0.411 600, 0.001 617-0.080 850, 0.006 076-0.607 600, 0.005 125-0.071 740, and 0.017 288-0.432 200 mg/mL, respectively; RSDs of precision, repeatability, stability and recovery rate tests were all not higher than 4% (n=6). The mass fractions ranged 3.227 9-10.002 2, 0.297 4-

^Δ基金项目 河南省中医药科学研究专项课题(No.2022ZY1101)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向:中药分析与质量评价。

E-mail:1529190059@qq.com

通信作者 主任药师,硕士生导师。研究方向:中药功效成分及作用机制、临床药学。E-mail:ycj5961@163.com

0.554 6, 3.350 1-6.159 6, 0.720 6-1.073 3, 2.003 1-3.030 1 mg/g; transfer rates from the pieces and standard decoction were 19.762 8%-35.840 5%, 12.123 3%-21.254 0%, 46.097 2%-82.869 4%, 58.708 8%-91.629 6%, 39.114 3%-63.710 6%. The transfer rates of the extract from 15 batches of Pinghuo tea standard decoction ranged from 61.15%-84.68%. **CONCLUSIONS** Established HPLC fingerprint and content determination methods in this study are simple and accurate, which can provide reference for the quantitative value transfer study, quality control, clinical application and the development of subsequent formulations of Pinghuo tea standard decoction.

KEYWORDS Pinghuo tea standard decoction; content determination; fingerprint; quality value transfer; quality control; HPLC

“上火”的概念源于中医学对人体和疾病的认识,其基本病机为阴阳失衡,火热上炎于头面;其临床表现主要以口舌生疮、口腔溃疡、牙龈及咽喉肿痛、眼睛红肿等头面部症状为主。“上火”的潜在机制比较复杂,与人们饮食习惯、作息时间、不良情绪等多种因素有关。研究发现,假如“上火”的症状一直存在,就有可能引发心血管疾病^[1]、胆管疾病^[2]、抑郁症^[3]。

平火茶标准汤剂为国医大师张磊应用多年的临床经验方,由栀子、菊花、白茅根、山楂、甘草5味中药组成。方中栀子为君药,清上中下三焦之火,具有凉血、清热、生津、利尿通淋的功效^[4];菊花和白茅根相须为用,共为臣药,其中菊花清上焦之火,具有清肝明目、清热解毒、消肿的功效^[5],白茅根清下焦之火,具有泻火除烦、清热解毒、利尿、凉血的功效^[6];山楂为佐药,清中焦之火,具有消食健胃、消导下行、行气散瘀的功效^[7];甘草为使药,可以调和诸药^[8]。诸药合用,可以清上中下三焦之火,用于治疗头昏、心烦、睡眠欠佳和小便黄赤等症。中药复方的质量控制是保证患者用药安全、有效的基础^[9],但目前尚未见关于平火茶标准汤剂整体质量控制的研究。基于此,本研究通过制备15批平火茶标准汤剂并建立其指纹图谱,对其进行相似度评价、化学模式识别、峰归属分析、出膏率测定、饮片-标准汤剂的量值传递等质量控制研究,以期为其临床合理使用和后续平火茶的制剂研究提供理论参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器包括2695-2998型高效液相色谱(HPLC)仪(美国Waters公司),ME204E型万分之一分析天平、AB135-S型十万分之一分析天平(瑞士Mettler Toledo公司),KQ-700DB型数控超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司),HH-S6型电子恒温水浴锅(巩义市予华仪器有限责任公司),ST-10N-60A型冷冻干燥机(山东三体仪器有限公司)。

1.2 主要试剂

栀子苷对照品(批号220916,质量分数 $\geq 98\%$)购自成都植化纯生物技术有限公司;绿原酸(批号MUST-18030620,质量分数 $\geq 99.39\%$)、新绿原酸(批号AFBH2301,质量分数 $\geq 98\%$)、异绿原酸A(批号AFCE0656,质量分数 $\geq 98\%$)、木犀草素(批号AFCE0510,质量分数 $\geq 98\%$)、甘草苷(批号AFBI0102,质量分数 $\geq 98\%$)、甘草酸(批号AFCB0903,质量分数 \geq

98%)、木犀草苷(批号AFBI0506,质量分数 $\geq 98\%$)、山柰酚(批号MUST-18091810,质量分数 $\geq 99.3\%$)对照品均购自曼斯特(成都)生物科技有限公司;甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯)均购自美国Tedia公司;磷酸(色谱纯)购自天津市科密欧化学试剂有限公司;水为娃哈哈纯净水。

1.3 药材

平火茶中栀子、菊花、白茅根、山楂、甘草5味饮片均购自安徽三义堂中药饮片有限公司,经河南中医药大学中药资源与鉴定教研中心陈随清教授鉴定均为真品。饮片具体信息见表1。

表1 平火茶饮片来源信息

名称	产地	批次
菊花	浙江桐乡	ZJTX-1~ZJTX-3
	安徽滁州	AHCZ-1~AHCZ-3
	河南焦作	HNJZ-1~HNJZ-3
栀子	江西宜春	JXYC-1~JXYC-3
	湖北江陵	HBJL-1~HBJL-3
	河南唐河	HNTX-1~HNTX-3
白茅根	安徽亳州	AHBZ-1~AHBZ-3
	河北邢台	HBXT-1~HBXT-3
	福建邵武	FJSW-1~FJSW-3
山楂	河北兴隆	HBXL-1~HBXL-3
	山东青州	SDQZ-1~SDQZ-3
	山西绛县	SXJX-1~SXJX-3
甘草	甘肃陇西	GSLX-1~GSLX-3
	新疆阿勒泰	XJAL-1~XJAL-3
	内蒙古鄂尔多斯	NMGE-1~NMGE-3

2 方法与结果

2.1 平火茶标准汤剂的制备

使用随机数字表法对表1中不同产地的组方饮片进行组合,样品组合信息见表2。参照《医疗机构中药煎药室管理规范》^[10],取菊花10 g、栀子15 g、白茅根30 g、山楂15 g、甘草6 g,一煎加7倍量水,浸泡30 min,煎30 min,趁热以150目滤布滤过;二煎加6倍量水,煎20 min,趁热过滤;合并2次滤液,浓缩至500 mL,真空冷冻干燥,即得15批平火茶标准汤剂冻干粉。同时,按上述工艺分别制备缺栀子、缺菊花、缺白茅根、缺甘草、缺山楂的阴性冻干粉和各单味饮片冻干粉。

2.2 平火茶标准汤剂HPLC指纹图谱的建立

2.2.1 供试品溶液的制备

取平火茶标准汤剂冻干粉约0.25 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇25 mL,称定质量;超声

表2 15批平火茶标准汤剂信息

编号	菊花批次	栀子批次	白茅根批次	山楂批次	甘草批次
S1	AHCZ-3	HNTH-1	HBXT-2	HBXL-2	NMGE-1
S2	ZJTX-2	HNTH-3	FJSW-1	SXJX-1	XJAL-1
S3	HNJZ-3	JXYC-2	AHBZ-3	SXJX-3	XJAL-2
S4	HNJZ-2	HBJL-1	FJSW-2	SDQZ-3	NMGE-2
S5	AHCZ-2	JXYC-2	AHBZ-3	HBXL-3	NMGE-3
S6	ZJTX-2	HNTH-2	HBXT-3	SXJX-3	XJAL-2
S7	HNJZ-3	JXYC-1	FJSW-2	SXJX-3	GSLX-3
S8	AHCZ-2	JXYC-1	AHBZ-2	SDQZ-2	NMGE-2
S9	HNJZ-2	HNTH-1	AHBZ-3	SXJX-2	XJAL-2
S10	ZJTX-1	JXYC-1	FJSW-1	HBXL-3	GSLX-2
S11	ZJTX-3	JXYC-2	FJSW-2	SDQZ-1	NMGE-2
S12	AHCZ-2	HBJL-2	HBXT-1	SXJX-1	GSLX-3
S13	HNJZ-2	HNTH-2	HBXT-2	HBXL-1	XJAL-3
S14	ZJTX-3	JXYC-3	AHBZ-1	HBXL-1	XJAL-1
S15	AHCZ-1	HBJL-1	FJSW-2	HBXL-1	NMGE-2

处理(功率300 W,频率40 kHz)40 min,放冷,再称定质量;用70%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液过0.22 μm微孔滤膜,即得供试品溶液。

2.2.2 混合对照品溶液的制备

精密称取绿原酸、新绿原酸、异绿原酸A、栀子苷、木犀草素、甘草苷、甘草酸、木犀草苷、山柰酚对照品各适量,加70%甲醇制成质量浓度分别为0.445 3、0.529 2、0.607 6、0.245 0、0.421 4、0.107 8、0.186 2、0.080 85、0.347 6 mg/mL的混合对照品溶液。

2.2.3 单味饮片及阴性样品溶液的制备

分别取栀子、菊花、白茅根、山楂和甘草饮片冻干粉约0.25 g,按照“2.2.1”项下方法制备各单味饮片供试品溶液;同法制备各饮片的阴性样品溶液。

2.2.4 色谱条件

色谱柱为Venusil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~16 min, 5%A→9%A; 16~32 min, 9%A→18%A; 32~63 min, 18%A; 63~68 min, 18%A→28%A; 68~84 min, 28%A→36%A; 84~98 min, 36%A→51%A; 98~102 min, 51%A→36%A);柱温为30 °C;检测波长为238 nm(0~37 min、85~102 min)、330 nm(37~85 min);流速为1.0 mL/min;进样量为10 μL。

2.2.5 精密度试验

取平火茶标准汤剂冻干粉(S1),按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.4”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。以栀子苷色谱峰为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,所得RSD均小于4.36%,表明该方法精密度良好。

2.2.6 稳定性试验

取平火茶标准汤剂冻干粉(S1),按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.4”项下色谱条件分别在室温下放置0、2、4、6、8、12、24 h时进样测定,记录峰面积。以栀子苷色谱峰为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,所得RSD均小于4.47%,表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.2.7 重复性试验

取平火茶标准汤剂冻干粉(S1),按“2.2.1”项下方法平行制备6份供试品溶液,分别按“2.2.4”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以栀子苷色谱峰为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,所得RSD均小于4.67%,表明该方法重复性良好。

2.2.8 指纹图谱的建立及相似度评价

按照“2.2.1”项下方法平行制备15批平火茶标准汤剂的供试品溶液,分别按“2.2.4”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。将15批平火茶标准汤剂的HPLC图导入2012版《中药色谱指纹图谱评价软件》,以S1的指纹图谱为参照图谱,设时间窗宽度为0.1 min,采用中位数法,经多点校正和Mark峰匹配生成15批平火茶标准汤剂的指纹图谱和对照指纹图谱R(图1),并标定出24个共有峰;经与混合对照品的HPLC图(图2)比对,其中3、6、9、10、11、14、21、23、24号峰对应成分分别为新绿原酸、绿原酸、栀子苷、甘草苷、木犀草苷、异绿原酸A、木犀草素、山柰酚、甘草酸。15批平火茶标准汤剂(S1~S15)的相似度分别为0.986、0.990、0.988、0.968、0.993、0.977、0.979、0.997、0.983、0.979、0.996、0.972、0.988、0.981、0.977,均不小于0.968,表明不同批次平火茶标准汤剂所含化学成分的种类基本一致。

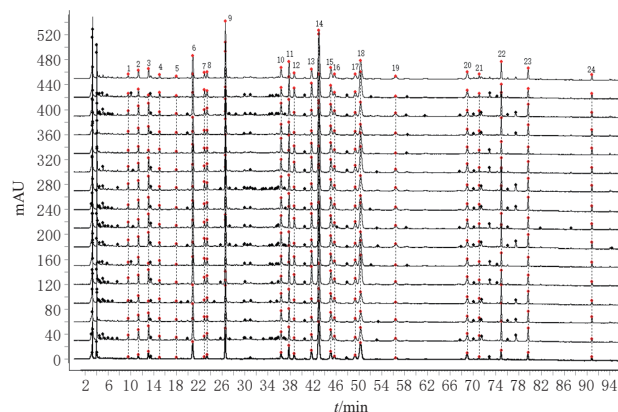
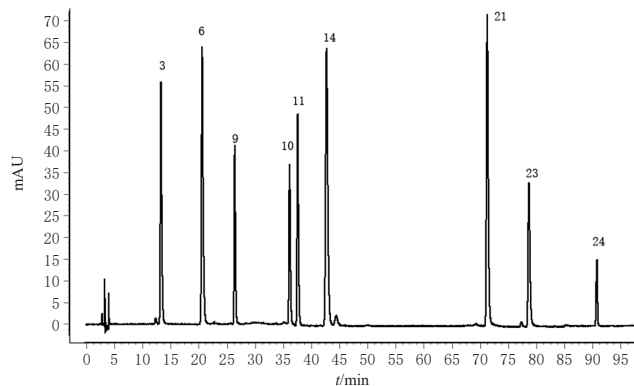


图1 15批平火茶标准汤剂的HPLC指纹图谱和对照指纹图谱R



3:新绿原酸;6:绿原酸;9:栀子苷;10:甘草苷;11:木犀草苷;14:异绿原酸A;21:木犀草素;23:山柰酚;24:甘草酸。

图2 混合对照品溶液的HPLC图

2.2.9 平火茶标准汤剂共有峰的归属研究

通过对平火茶标准汤剂、单味饮片、各饮片阴性样品的HPLC图谱进行分析,发现其单味饮片的特征峰均可传递到标准汤剂的指纹图谱中,详见图3。图3中1号峰属于甘草、栀子,2、18号峰属于菊花、栀子,3号峰(新绿原酸)属于菊花、栀子、白茅根,4、9(栀子苷)、19号峰为栀子专属峰,5号峰属于栀子、白茅根,6号峰(绿原酸)属于菊花、栀子、白茅根、山楂,7、13号峰属于菊花、栀子,8号峰属于菊花、栀子、白茅根、山楂,10(甘草苷)、24(甘草酸)号峰为甘草专属峰,11(木犀草苷)、12、14(异绿原酸A)、15、16、17、20、21(木犀草素)、22、23(山柰酚)号峰为菊花专属峰。这表明平火茶标准汤剂制备工艺稳定,其特征峰与主要成分在饮片和标准汤剂间的传递也稳定,且归属关系较为清晰。

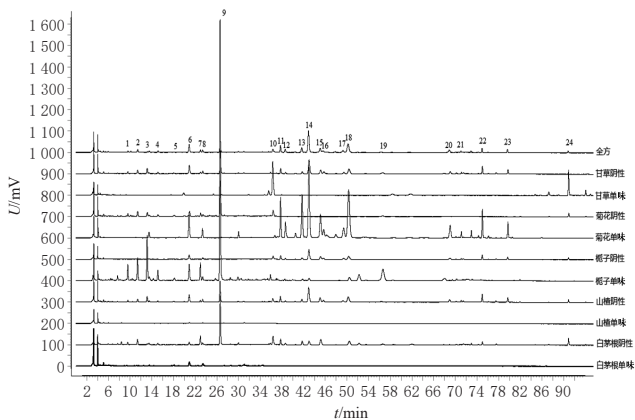


图3 平火茶标准汤剂、单味饮片、阴性样品的HPLC指纹图谱

2.3 15批平火茶标准汤剂的化学计量学分析

2.3.1 聚类分析

以15批平火茶标准汤剂的24个共有峰的峰面积为原始数据,使用SPSS 22.0软件进行系统聚类分析,结果见图4。由图4可知,当组间距离为20时,可聚为3类,其中S5、S6、S8、S11、S15聚为一类,S7、S9、S10聚为一类,S1、S2、S3、S4、S12、S13、S14聚为一类,这表明不同批次样品中各成分含量存在差异。

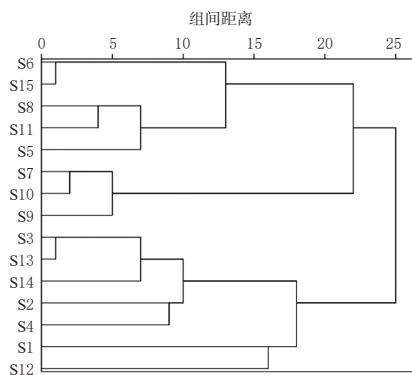


图4 15批平火茶标准汤剂的聚类分析树状图

2.3.2 主成分分析

以15批平火茶标准汤剂的24个共有峰的峰面积为原始数据,运用SIMCA 14.1软件进行主成分分析。结果显示,该数据矩阵的解释率参数 R^2X 为0.973,模型预测能力参数 Q^2 为0.648,均大于0.5,表明该模型有较好的预测能力^[11]。15批平火茶标准汤剂的主成分得分图见图5。由图5可知,主成分分析与聚类分析的结果基本一致,其中S5、S6、S8、S11、S15为一类,S7、S9、S10为一类,S1、S2、S3、S4、S12、S13、S14为一类,表明15批平火茶标准汤剂中成分特征存在差异。

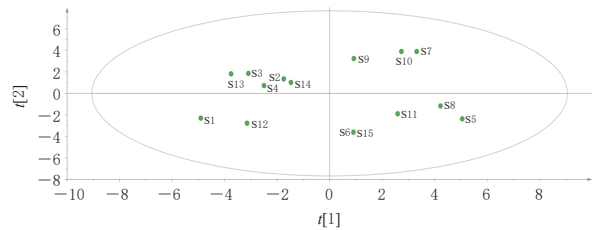


图5 15批平火茶标准汤剂的主成分得分图

2.3.3 正交偏最小二乘判别分析

将15批平火茶标准汤剂的24个共有峰的峰面积数据导入SIMCA14.1软件,进行正交偏最小二乘判别分析。结果显示,该数据矩阵的解释率参数 R^2X 为0.844,模型区分参数 R^2Y 为0.784,模型预测能力参数 Q^2 为0.690,均大于0.5,表明模型拟合度较好,具有较高的稳定性与预测能力^[12]。15批平火茶标准汤剂的正交偏最小二乘判别分析得分图见图6。由图6可知,15批平火茶标准汤剂被分为3类:S5、S6、S8、S11、S15为一类,S7、S9、S10为一类,S1、S2、S3、S4、S12、S13、S14为一类,该结果与聚类分析、主成分分析结果一致。

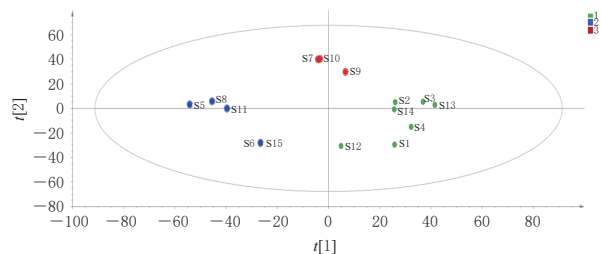


图6 15批平火茶标准汤剂的正交偏最小二乘判别分析得分图

将15批平火茶标准汤剂的24个共有峰的峰面积数据导入SIMCA 14.1软件,以变量重要性投影值(variable importance in the projection, VIP) > 1 筛选差异性成分^[13],结果见图7。由图7可知,共筛选出7个VIP > 1的成分,分别是3(新绿原酸)、6(绿原酸)、9(栀子苷)、12、13、14(异绿原酸A)、18号峰对应的成分,表明这7个共有峰可能对样品分类具有显著影响,是引起15批平火茶标准汤剂质量差异的主要标志性色谱峰,这也与肖复耀等^[14]的研究结论一致。

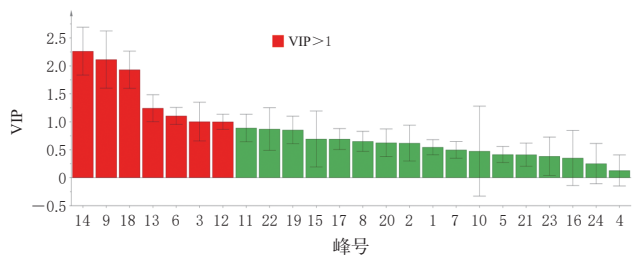


图7 15批平火茶标准汤剂的VIP得分图

2.4 平火茶标准汤剂中指标性成分含量测定及量值传递研究

2.4.1 色谱条件

色谱条件同“2.2.4”项下。

2.4.2 供试品溶液的制备

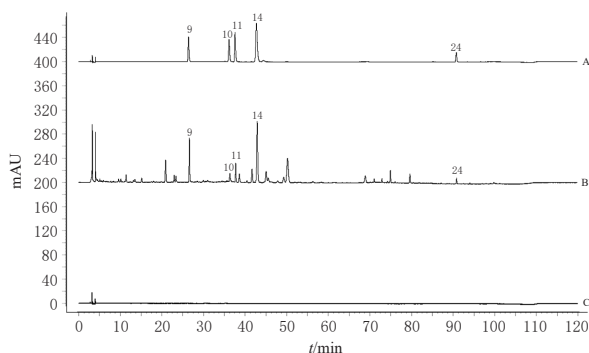
按“2.2.1”项下方法分别制备15批平火茶标准汤剂的供试品溶液。

2.4.3 混合对照品溶液的制备

精密称取异绿原酸A、栀子苷、甘草苷、甘草酸、木犀草苷对照品各适量,置于同一5 mL容量瓶中,加70%甲醇制成质量浓度分别为0.607 6、0.411 6、0.071 7、0.432 2、0.080 9 mg/mL的单一对照品溶液。分别取上述各单一对照品溶液1 mL,置于5 mL容量瓶中,加70%甲醇制成质量浓度分别为0.121 5、0.082 3、0.014 3、0.086 4、0.016 2 mg/mL的混合对照品溶液。

2.4.4 系统适用性试验

取“2.4.3”项下混合对照品溶液、“2.4.2”项下供试品溶液以及空白溶液(70%甲醇),按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图(图8)。结果显示,各待测色谱峰与其相邻色谱峰间的分离度均大于1.5,理论板数均不低于10 000;供试品溶液色谱图中,在与混合对照品溶液色谱图相对应的位置上均有相同保留时间的色谱峰,且空白溶液对测定无干扰。



A:混合对照品溶液;B:供试品溶液;C:空白溶液;9:栀子苷;10:甘草苷;11:木犀草苷;14:异绿原酸A;24:甘草酸。

图8 混合对照品、供试品、空白溶液的HPLC图

2.4.5 线性关系考察

取“2.4.3”项下单一对照品溶液适量,逐级稀释配制6个系列浓度的单一对照品溶液,按“2.4.1”项下色谱条

件进样测定,记录峰面积。以各对照品的质量浓度(X , mg/mL)为横坐标、峰面积积分值(Y)为纵坐标,进行线性回归,得栀子苷、木犀草苷、异绿原酸A、甘草苷、甘草酸的线性回归方程分别为 $Y=13\ 760\ 767.800\ 4X-28\ 090.119\ 6$ ($R^2=1.000\ 0$)、 $Y=74\ 115\ 257.993\ 7X-6\ 297.122\ 4$ ($R^2=1.000\ 0$)、 $Y=33\ 796\ 166.403\ 7X-265\ 897.329\ 3$ ($R^2=0.999\ 6$)、 $Y=15\ 522\ 544.291\ 2X+41\ 548.943\ 9$ ($R^2=0.999\ 0$)、 $Y=4\ 920\ 602.055\ 1X-28\ 239.806\ 1$ ($R^2=0.999\ 5$)。结果表明,栀子苷、木犀草苷、异绿原酸A、甘草苷、甘草酸的质量浓度分别在0.020 580~0.411 600、0.001 617~0.080 850、0.006 076~0.607 600、0.005 125~0.071 740、0.017 288~0.432 200 mg/mL范围内与各自峰面积积分值线性关系良好。

2.4.6 精密度试验

取平火茶标准汤剂冻干粉(S1),按“2.4.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.4.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果显示,栀子苷、木犀草苷、异绿原酸A、甘草苷、甘草酸峰面积的RSD分别为1.71%、2.41%、3.14%、1.72%、2.37% (n 均为6),表明该方法精密度良好。

2.4.7 重复性试验

取平火茶标准汤剂冻干粉(S1)6份,分别按“2.4.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以标准曲线法计算样品含量。结果显示,供试品溶液中栀子苷、木犀草苷、异绿原酸A、甘草苷、甘草酸的平均含量分别为6.661 8、0.504 7、4.150 1、1.318 4、2.684 7 mg/g,RSD分别为1.40%、3.95%、2.56%、3.53%、1.82% (n 均为6),表示该方法重复性良好。

2.4.8 稳定性试验

取平火茶标准汤剂冻干粉(S1),按“2.4.2”项下方法制备供试品溶液,分别于制备后室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,栀子苷、木犀草苷、异绿原酸A、甘草苷、甘草酸峰面积的RSD分别为2.95%、3.47%、3.01%、1.78%、1.76% (n 均为6),表示平火茶标准汤剂供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.4.9 加样回收率试验

取已知含量的平火茶标准汤剂冻干粉(S1)6份,分别按样品中栀子苷、木犀草苷、异绿原酸A、甘草苷、甘草酸含量的100%加入对照品,按“2.4.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率与RSD。结果显示,栀子苷、木犀草苷、甘草苷、甘草酸、异绿原酸A的平均加样回收率分别为98.94%、98.61%、98.43%、99.72%、98.93%,RSD分别为1.13%、1.03%、1.29%、0.78%、1.79% (n 均为6),RSD均小于3%,表明该方法准确度良好。

2.4.10 样品含量及转移率测定

取15批平火茶标准汤剂冻干粉,分别按“2.4.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,以标准曲线法计算样品中栀子苷、甘草苷、异绿原酸A、木犀草苷、甘草酸的含量,平行测定3次,并按下式计算含量的转移率:含量的转移率(%)=(标准汤剂中指标性成分的含量×冻干粉的质量/稀释倍数)/(对应批次饮片中指标性成分的含量×饮片质量)×100%(式中,各对应批次饮片中指标性成分的含量测定方法参照2020年版《中国药典》(一部)进行操作^[15]),结果见表3。最后将含量测定范围按均值±30%计算^[16],用于拟定平火茶标准汤剂中各指标性成分的含量和转移率的范围。

2.5 出膏率的测定

取按“2.1”项下方法制备的平火茶标准汤剂和各单味饮片标准汤剂,各精密吸取10 mL置于恒重蒸发皿中,蒸干,于105 °C干燥至恒重,放干燥器冷却后称定质量^[17],然后按下式计算15批平火茶标准汤剂及各单味饮片标准汤剂^[18]出膏率:出膏率(%)=mv/MV(式中,m表示干膏的质量,v表示取样体积,M表示饮片的质量,V表示水煎液的体积)。

平火茶标准汤剂的组方为:菊花10 g、栀子15 g、白茅根30 g、山楂15 g、甘草6 g,全方共76 g。按各单味药折算,全方理论出膏率(%)=10/76×对应批次菊花饮片的出膏率+15/76×对应批次栀子饮片的出膏率+30/76×对应批次白茅根饮片的出膏率+15/76×对应批次山楂饮片的出膏率+6/76×对应批次甘草饮片的出膏率。出膏率的转移率(%)=全方实际出膏率/全方理论出膏率×100%;变化幅度(%)=(全方理论出膏率-全方实际出膏率)/全方理论出膏率×100%。结果见表4。

由表4可知,15批平火茶标准汤剂的理论出膏率均值为29.24%,范围为27.03%~33.10%,均在其均值±30%

的范围内(20.47%~38.01%);实际出膏率均值为20.84%,范围为17.59%~25.54%,均在其均值±30%的范围内(14.59%~27.09%);出膏率的变化幅度范围为15.32%~38.85%,未出现离散数据。以上表明平火茶标准汤剂的制备工艺较为合理,稳定可行,未造成明显的批间差异。

3 讨论

本研究前期对平火茶标准汤剂的HPLC指纹图谱色谱条件进行了考察——对流动相考察了甲醇-0.1%甲酸溶液、甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.2%磷酸溶液,对柱温考察了25、30、35 °C,对进样量考察了5、10、15 μL,对流速考察了0.8、1.0 mL/min,对检测波长考察了230、238、330、348 nm。结果表明,以乙腈-0.1%磷酸溶液作为流动相(梯度洗脱)、柱温为30 °C、进样量为10 μL、流速为1.0 mL/min时,色谱峰的分离度和峰形均较好,且基线较平稳;检测波长在0~37 min和85~102 min时设为238 nm、37~85 min时设为330 nm的色谱峰数量较多,同时栀子苷、甘草苷、甘草酸在238 nm波长处的响应值最高且峰形和分离度较好,木犀草苷、异绿原酸A在330 nm波长处的响应值较高且峰形和分离度较好,故选择以上色谱条件作为平火茶标准汤剂的HPLC指纹图谱条件。

本研究结果显示,15批平火茶标准汤剂HPLC指纹图谱的相似度均不小于0.968,表明不同批次样品所含化学成分基本一致。正交偏最小二乘判别分析结果与聚类分析及主成分分析结果一致,均可将15批样品分为3类,表明不同批次样品的化学成分含量存在差异,这可能与饮片来自不同产地、取样不均一等因素有关。本研究还通过VIP>1筛选出对样品质量影响较大的成分,分别为峰3(新绿原酸)、峰6(绿原酸)、峰9(栀子苷)、峰12、峰13、峰14(异绿原酸A)、峰18所对应的成分。

表3 15批平火茶标准汤剂-饮片中5种指标性成分的含量及其转移率(n=3)

编号	栀子苷			甘草苷			异绿原酸A			木犀草苷			甘草酸		
	标准汤剂/ (mg/g)	饮片/ (mg/g)	含量的转 移率/%	标准汤剂/ (mg/g)	饮片/ (mg/g)	含量的转 移率/%	标准汤剂/ (mg/g)	饮片/ (mg/g)	含量的转 移率/%	标准汤剂/ (mg/g)	饮片/ (mg/g)	含量的转 移率/%	标准汤剂/ (mg/g)	饮片/ (mg/g)	含量的转 移率/%
S1	5.817 6	33.075 1	20.203 7	0.821 7	3.750 7	62.074 6	4.989 8	18.219 7	46.097 2	0.352 5	3.285 5	18.057 8	2.069 7	14.438 0	40.615 6
S2	6.909 1	36.626 3	21.378 9	0.745 6	3.284 1	65.416 5	4.095 4	9.566 1	70.659 1	0.551 9	7.690 3	12.324 2	2.003 1	14.755 7	39.114 3
S3	5.921 2	33.736 0	23.012 2	0.720 6	3.341 3	58.708 8	3.350 1	11.261 1	48.590 2	0.297 4	3.691 1	13.158 9	2.739 6	15.201 2	49.060 2
S4	3.227 9	12.375 2	27.277 0	0.976 1	3.695 1	70.440 6	4.140 3	11.394 7	58.136 6	0.351 8	3.617 7	15.558 9	2.384 3	14.510 9	43.817 0
S5	8.688 2	33.736 0	29.846 7	0.791 3	2.954 0	75.614 3	5.247 5	19.108 2	47.582 8	0.510 2	4.001 2	21.254 0	2.115 5	14.388 9	41.497 7
S6	5.261 1	36.103 8	19.762 8	0.917 3	3.341 3	72.065 2	5.650 6	9.566 1	79.742 3	0.554 6	8.173 0	14.079 6	2.314 3	15.201 2	52.650 1
S7	10.002 2	34.390 0	31.719 9	1.072 5	3.914 4	72.991 4	4.752 6	11.261 1	67.235 6	0.401 9	3.691 1	17.348 7	2.954 6	18.403 4	42.768 8
S8	8.797 4	34.390 0	30.931 7	0.935 0	3.695 1	78.023 1	6.159 6	19.108 2	59.635 4	0.504 1	3.331 2	21.186 1	2.824 3	14.510 9	60.011 9
S9	8.879 3	37.975 1	24.833 7	0.782 6	3.341 3	62.397 6	4.331 0	11.394 7	61.764 3	0.344 7	3.617 7	15.482 0	2.779 8	15.201 2	48.714 6
S10	9.839 5	34.390 0	35.840 5	1.073 3	3.925 9	88.140 0	4.090 2	8.307 6	82.869 4	0.436 3	8.240 1	12.123 3	3.030 1	18.497 4	52.813 3
S11	8.410 3	33.736 0	29.329 2	1.054 0	3.695 1	85.572 3	4.044 2	8.394 8	77.908 1	0.498 2	8.381 3	12.409 5	2.744 2	14.510 9	56.734 4
S12	4.092 0	12.898 8	35.480 4	1.058 9	3.914 4	91.629 6	5.204 2	19.108 2	56.073 0	0.375 7	3.331 2	21.009 7	2.907 0	18.403 4	53.503 2
S13	5.993 5	37.103 8	22.766 3	0.818 7	3.460 7	84.204 2	3.469 3	11.394 7	63.937 9	0.306 5	3.617 7	17.794 1	2.676 1	15.388 0	61.899 7
S14	8.898 7	35.068 4	25.952 1	0.864 1	3.284 1	69.069 9	4.254 0	8.394 8	80.619 3	0.549 4	8.381 3	12.374 4	2.503 8	14.755 7	44.542 1
S15	5.166 9	12.375 2	35.685 5	0.873 4	3.695 1	84.044 6	5.979 0	20.260 5	72.793 1	0.351 0	3.383 8	21.224 8	2.248 8	14.510 9	63.710 6
均值	7.060 3	30.532 0	27.601 4	0.900 3	3.552 8	74.692 8	4.650 5	13.116 0	64.909 6	0.425 7	5.095 6	16.359 1	2.553 0	15.511 8	50.096 9

表4 15批平火茶标准汤剂的出膏率及其转移率结果 (n=3,%)

编号	实际出膏率	理论出膏率	出膏率的转移率	变化幅度
S1	19.74	32.28	61.15	38.85
S2	19.07	29.03	65.69	34.31
S3	19.65	27.16	72.35	27.65
S4	18.12	28.69	63.16	36.84
S5	19.59	27.96	70.06	29.94
S6	24.69	32.22	76.63	23.37
S7	18.81	27.95	67.30	32.70
S8	18.66	29.06	64.21	35.79
S9	17.59	27.53	63.89	36.11
S10	22.45	27.83	80.67	19.33
S11	21.59	29.02	74.40	25.60
S12	25.54	33.10	77.16	22.84
S13	24.77	30.60	80.95	19.05
S14	22.89	27.03	84.68	15.32
S15	19.47	29.14	66.82	33.18
均值	20.84	29.24	71.27	28.73

中药复方化学成分复杂,含量测定所选择的化学成分不仅需要符合2020年版《中国药典》的要求,还要确保在相应的饮片-物质基准-复方中能够实现稳定的质量控制。本研究所选择的平火茶标准汤剂指标性成分栀子苷、木犀草苷、异绿原酸A、甘草苷、甘草酸均为2020年版《中国药典》中栀子、菊花、甘草药材的含量测定成分,也是各药材的专属性成分。栀子苷是君药栀子的主要有效成分,具有解热、抗炎、保肝等功效^[19]。木犀草苷和异绿原酸A是臣药菊花的主要药效成分,均具有抗炎、抗病毒、抗菌、熄内热、平肝火等功效^[20]。甘草苷和甘草酸为甘草中的主要药效成分,具有抗菌、抗炎等多种作用^[21]。由于绿原酸在几种药材中都有,成分专属性不强,因此没有将其作为指标性成分进行测定。本研究结果显示,平火茶标准汤剂中栀子苷、木犀草苷、异绿原酸A、甘草苷、甘草酸的含量范围分别为3.227 9~10.002 2、0.297 4~0.554 6、3.350 1~6.159 6、0.720 6~1.073 3、2.003 1~3.030 1 mg/g,饮片-标准汤剂的含量转移率范围分别为19.762 8%~35.840 5%、12.123 3%~21.254 0%、46.097 2%~82.869 4%、58.708 8%~91.629 6%、39.114 3%~63.710 6%;15批平火茶标准汤剂中栀子苷、木犀草苷、异绿原酸A、甘草苷、甘草酸含量的转移率均在均值±30%范围内,部分批次指标性成分含量的转移率差别较大可能与饮片产地不同有关^[22]。另外,本研究还发现,产地为江西宜春的栀子中栀子苷的含量及其转移率较产地为湖北江陵、河南唐河的更高,产地为内蒙古鄂尔多斯的甘草中甘草苷、甘草酸的含量及其转移率较产地为甘肃陇西、新疆阿勒泰的更高,产地为安徽滁州的菊花中木犀草苷、异绿原酸A的含量及其转移率较产地为浙江桐乡、河南焦作的更高。另外,15批样品的实际出膏率均小于理论出膏率;出膏率的转移率范围为61.15%~84.68%,均在其均值±30%范围内(49.89%~92.65%),表明平火茶标准汤剂煎煮工艺稳定。本研究

以实际出膏率范围(17.59%~25.54%)作为上下限,建议平火茶标准汤剂的出膏率范围为17%~25%。

综上所述,本研究所建立的平火茶标准汤剂的HPLC指纹图谱和含量测定方法简单且准确度高,可为该制剂的量值传递研究、质量控制、临床应用及后续制剂的开发提供参考。

参考文献

- [1] 高嘉良,李军.莫让夏季上火引发心血管疾病[J]. 中医健康养生,2023,9(7):54-55.
GAO J L, LI J. Don't let summer fire cause cardiovascular diseases[J]. TCM Health Life Nurt, 2023, 9(7): 54-55.
- [2] 朱韵,丁元.感觉“上火”,可能是癌症信号[N]. 人民政协报,2021-12-08(007).
ZHU Y, DING Y. Feeling “on fire” may be a sign of cancer[N]. J Chin People's Polit Consul Conf, 2021-12-08(007).
- [3] MAJD M, SAUNDERS E F H, ENGELAND C G. Inflammation and the dimensions of depression: a review[J]. Front Neuroendocrinol, 2020, 56: 100800.
- [4] 梁朝锋,韩晓珂,秦亚东,等. 栀子饮片及栀子配方颗粒的指纹图谱建立、含量测定及化学模式识别[J]. 中国药房, 2022, 33(14): 1718-1723.
LIANG C F, HAN X K, QIN Y D, et al. Establishment of fingerprint, content determination and chemical pattern recognition of decoction pieces and dispensing granules of *Gardenia jasminoides*[J]. China Pharm, 2022, 33(14): 1718-1723.
- [5] 赵振霞,耿韞,雷蓉,等. 山菊降压胶囊多指标成分含量测定及量值传递分析菊花成分变化[J]. 药物分析杂志, 2024, 44(5): 796-805.
ZHAO Z X, GENG Y, LEI R, et al. Multi-component determination of Shanjujiangya capsules and analysis of compositional change in Chrysanthemi Flos by quantity transfer[J]. Chin J Pharm Anal, 2024, 44(5): 796-805.
- [6] 周湘媛,李振雨,马懿飞,等. 基于化学计量学和熵权TOPSIS法对不同产地白茅根药材的质量评价[J]. 中药材, 2023, 46(4): 940-945.
ZHOU X Y, LI Z Y, MA Y F, et al. Quality evaluation of cogongrass rhizome from different habitats based on chemometrics and entropy TOPSIS method[J]. J Chin Med Mater, 2023, 46(4): 940-945.
- [7] 孙飞,吴相亲,何琼,等. 山楂化浊降脂功效成分筛选及质量控制方法研究[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(1): 100-109.
SUN F, WU X Q, HE Q, et al. Screening of bioactive components endowing hawthorn with turbidity-eliminating and lipid-lowering functions and development of quality control method of hawthorn[J]. China J Chin Mater Med, 2024, 49(1): 100-109.
- [8] 化敏,周倩,蒋海强,等. 甘草饮片抗氧化活性成分的

- 快速筛选及鉴定[J]. 中国药房, 2021, 32(2):176-181.
- HUA M, ZHOU Q, JIANG H Q, et al. Rapid screening and identification of antioxidant active components in *Glycyrrhiza uralensis* decoction pieces[J]. China Pharm, 2021, 32(2):176-181.
- [9] 戴业佳, 王云, 张雪, 等. 栀子及其相关复方的质控方法及药代动力学研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(24):208-216.
- DAI Y J, WANG Y, ZHANG X, et al. Research progress of quality control methods and pharmacokinetics of *Gardenia Fructus* and its related compounds[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2017, 23(24):208-216.
- [10] 国家中医药管理局. 医疗机构中药煎药室管理规范[EB/OL]. (2009-03-16) [2024-04-02]. <http://www.natcm.gov.cn/yizhengsi/gongzuodongtai/2018-03-25/6577.html>. National Administration of Traditional Chinese Medicine. Management standards for traditional Chinese medicine decoction rooms in medical institutions[EB/OL]. (2009-03-16) [2024-04-02]. <http://www.natcm.gov.cn/yizhengsi/gongzuodongtai/2018-03-25/6577.html>.
- [11] 赵峰, 高太祥, 石莉尧, 等. 越婢加术汤的 HPLC 指纹图谱建立、含量测定及化学模式识别分析[J]. 中国药房, 2021, 32(22):2724-2730.
- ZHAO F, GAO T X, SHI L Y, et al. Establishment of HPLC fingerprints, content determination and chemical pattern recognition analysis of Yuebi jiazhu decoction[J]. China Pharm, 2021, 32(22):2724-2730.
- [12] 梁慧, 潘晓君, 杨文惠, 等. 基于 UPLC 指纹图谱和一测多评法的虎杖药材质量评价[J]. 中国药房, 2021, 32(15):1842-1848.
- LIANG H, PAN X J, YANG W H, et al. Quality evaluation of *Polygonum cuspidatum* by UPLC fingerprint and QAMS[J]. China Pharm, 2021, 32(15):1842-1848.
- [13] 金唯唯, 金华燕, 费状丽, 等. 基于 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别辨析补中益气产品质量标志物[J]. 中草药, 2023, 54(7):2114-2126.
- JIN W W, JIN H Y, FEI Z L, et al. Identification of quality markers of Buzhong yiqi products based on HPLC fingerprint combined with chemical pattern recognition[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(7):2114-2126.
- [14] 肖复耀, 桂郎, 曾红玉, 等. 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[J]. 中草药, 2024, 55(2):446-459.
- XIAO F Y, GUI L, ZENG H Y, et al. HPLC fingerprint of benchmark samples of classical prescription Yinchenhao decoction and quality value transfer of multi-index components[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(2):446-459.
- [15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 2020年版. 北京:中国医药科技出版社, 2020:129-130.
- National Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: volume 1[M]. 2020 edition. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020:129-130.
- [16] 曹春琪, 周亚楠, 苏建, 等. 经典名方清肺汤的基准样品关键质量属性量值传递研究[J]. 中国现代中药, 2024, 26(10):1663-1671.
- CAO C Q, ZHOU Y N, SU J, et al. Quantitative value transfer of key quality attributes of benchmark samples of classical prescription Qingfei decoction[J]. Mod Chin Med, 2024, 26(10):1663-1671.
- [17] 田瀚举, 张维方, 贾豪, 等. 经典名方:一贯煎汤剂指标成分含量测定及量值传递分析[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(1):113-118.
- TIAN H J, ZHANG W F, JIA H, et al. Determination of index components in Yiguanjian decoction, a classic prescription, and analysis of value transfer[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2023, 34(1):113-118.
- [18] 张晴, 罗菊元, 胡文均, 等. 经典名方厚朴温中汤的物质基准量值传递分析[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(4):810-819.
- ZHANG Q, LUO J Y, HU W J, et al. Analysis on quality value transmitting of substance benchmark of Houpu wenzhong decoction[J]. China J Chin Mater Med, 2021, 46(4):810-819.
- [19] 张嘉豪, 呼田, 周雪薇, 等. 栀子药理作用及临床应用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2024, 26(5):93-98.
- ZHANG J H, HU T, ZHOU X W, et al. Research progress on the pharmacological effects and clinical application of Zhizi (*Gardenia Fructus*) [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2024, 26(5):93-98.
- [20] 周衡朴, 任敏霞, 管家齐, 等. 菊花化学成分、药理作用的研究进展及质量标志物预测分析[J]. 中草药, 2019, 50(19):4785-4795.
- ZHOU H P, REN M X, GUAN J Q, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Chrysanthemum morifolium* and predictive analysis on quality markers[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(19):4785-4795.
- [21] BARONE A, CRISTIANO M C, CILURZO F, et al. Ammonium glycyrrhizate skin delivery from ultradeformable liposomes: a novel use as an anti-inflammatory agent in topical drug delivery[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2020, 193:111152.
- [22] 赵新梅, 贾豪, 杨春静, 等. 牛膝及炮制品标准汤剂的量值传递研究[J]. 中华中医药学刊, 2024, 42(12):245-251.
- ZHAO X M, JIA H, YANG C J, et al. Study on the quantity transfer of standard decoction of *Achyranthes bidentata* and its processed products[J]. Chin Arch Trad Chin Med, 2024, 42(12):245-251.

(收稿日期:2024-07-17 修回日期:2024-12-18)

(编辑:胡晓霖)