

化湿败毒组合物的质量控制方法

技术领域

本发明涉及中药质量控制技术领域，尤其涉及一种化湿败毒组合物的质量控制方法。

背景技术

2019 新型冠状病毒（COVID-19）感染引起的肺炎疫情，由于传染性强，传播迅速，人群普遍易感，且特效药缺乏，已在全球范围内形成大流行，成为了全球性的超重大公共卫生突发事件。中医药在抗击新冠肺炎疫情的过程中，发挥了独特的、重要的作用。中国中医药管理局指出，经研究筛选，“三药三方”中的金花清感颗粒、连花清瘟颗粒、血必净注射液、清肺排毒汤、化湿败毒方、宣肺败毒方在此次抗击疫情中发挥了良好的作用。

化湿败毒方由 14 味中药组成，包括生麻黄、杏仁、生石膏、甘草、藿香、厚朴、苍术、草果、法半夏、茯苓、生大黄、生黄芪、葶苈子和赤芍。临床实验表明，化湿败毒方对改善患者症状、提高核酸转阴率具有突出的作用。但目前对于化湿败毒方的研究多集中在药理、疗效的研究，尚无对于其质量标准的研究。且现有的生产也仅限于小范围内进行，无大规模工业化生产，对质量监控的要求也相对较低。

文献《抗新型冠状病毒肺炎（COVID-19）的化湿败毒组合物药味的物质基础研究》（中国现代中药，2020 年第 3 期）研究了各味药物的物质基础。但并未对药品的具体质量控制方法进行研究。

发明内容

本发明所要解决的技术问题在于，提供一种化湿败毒组合物的质量控制方法，该方法可为大生产提供数据基础，有效保证产品质量的稳定性和可控性。

为了解决上述技术问题，本发明提供了一种化湿败毒组合物的质量控制方法，所述化湿败毒组合物主要包括以下组分：麻黄，炒苦杏仁，生石膏，甘草，

广藿香，厚朴，麸炒苍术，炒草果仁，法半夏，茯苓，大黄，黄芪，葶苈子，赤芍，辅料；

所述化湿败毒组合物质量控制方法包括：

(1) 采用薄层色谱对麻黄、甘草、厚朴进行鉴别；

(2) 采用高效液相色谱法测定化湿败毒组合物中总蒽醌含量、游离蒽醌含量、盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱总含量以及芍药苷含量，并计算结合蒽醌含量；其中，结合蒽醌含量=总蒽醌含量-游离蒽醌含量。

作为上述技术方案的改进，所述化湿败毒组合物的质量控制方法还包括：

(3) 采用薄层色谱对黄芪、葶苈子、赤芍和大黄进行鉴别。

作为上述技术方案的改进，所述总蒽醌含量的测定方法包括：

(1) 取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚适量，加甲醇制成混合溶液，制得蒽醌对照品溶液；

(2) 取化湿败毒组合物，利用甲醇提取，制得总蒽醌供试品溶液；

(3) 吸取蒽醌对照品溶液和总蒽醌供试品溶液，注入液相色谱仪，所述液相色谱仪以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂，以乙腈为流动相 A，磷酸水溶液为流动相 B 进行梯度洗脱，测定得到化湿败毒组合物中总蒽醌含量。

作为上述技术方案的改进，所述游离蒽醌含量的测定方法包括：

(1) 取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚适量，加甲醇制成混合溶液，制得蒽醌对照品溶液；

(2) 取化湿败毒组合物，利用甲醇提取，制得游离蒽醌供试品溶液；

(3) 吸取蒽醌对照品溶液和游离蒽醌供试品溶液，注入液相色谱仪，所述液相色谱仪以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂，以乙腈为流动相 A，磷酸水溶液为流动相 B 进行梯度洗脱，测定得到化湿败毒组合物中游离蒽醌含量。

作为上述技术方案的改进，所述总蒽醌含量的测定方法和游离蒽醌含量的测定方法均采用以下洗脱程序进行：

0~10min，流动相 A 从 35%→40%，流动相 B 从 65%→60%；

10~38min，流动相 A 从 40%→60%，流动相 B 从 60%→40%；

38~48min，流动相 A 为 60%，流动相 B 为 40%。

作为上述技术方案的改进，所述总蒽醌含量和游离蒽醌含量的测定方法中，以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂，以乙腈为流动相 A，0.1 vol%磷酸水溶液为

流动相 B 进行梯度洗脱, 流速为 0.6~1 mL/min, 检测波长为 253~256nm, 柱温为 25~35°C。

作为上述技术方案的改进, 所述总蒽醌供试品溶液由下述方法制得:

取化湿败毒组合物 0.2~0.5g, 置具塞锥形瓶中, 加入甲醇 20~30mL, 加热回流提取 20~30 分钟, 取出, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液 10~15mL, 减压回收溶剂至干, 加 8%盐酸溶液 10~15mL, 超声处理 2~5 分钟, 再加三氯甲烷 10~20mL, 加热回流 1~3 小时, 放冷, 置分液漏斗中, 用少量三氯甲烷洗涤容器, 并入分液漏斗中, 分取三氯甲烷层, 酸液再用三氯甲烷提取 2~5 次, 每次 10~15mL, 合并三氯甲烷液, 减压回收溶剂至干, 残渣加甲醇使溶解, 转移至 10mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

作为上述技术方案的改进, 所述游离蒽醌供试品溶液由下述方法制得:

取化湿败毒组合物 0.2~0.5g, 置具塞锥形瓶中, 加入甲醇 25~30mL, 称定重量, 加热回流 20~60 分钟, 取出, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

作为上述技术方案的改进, 所述蒽醌对照品溶液由下述方法制得:

称定芦荟大黄素对照品 1.581mg、大黄酸对照品 3.017mg、大黄素对照品 1.604mg、大黄酚对照品 2.656mg、大黄素甲醚对照品 5.221mg, 置 100mL 量瓶中, 加甲醇分别制成每 1mL 含芦荟大黄素 15.807 μ g、大黄酸 30.167 μ g、大黄素 16.039 μ g、大黄酚 26.563 μ g、大黄素甲醚 52.213 μ g 的母液; 分别精密吸取上述芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚母液各 1mL, 大黄素甲醚母液 0.1mL, 置 10mL 量瓶中, 加甲醇制成每 1mL 含芦荟大黄素 1.581 μ g、大黄酸 3.017 μ g、大黄素 1.604 μ g、大黄酚 2.656 μ g、大黄素甲醚 0.522 μ g 的混合溶液, 即得。

作为上述技术方案的改进, 所述盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱总含量的测定方法包括:

(1) 取盐酸麻黄碱对照品、盐酸伪麻黄碱对照品适量, 称定, 加甲醇分别制成每 1mL 各含 10 μ g 的混合溶液, 制得麻黄碱对照品溶液;

(2) 取化湿败毒组合物, 利用盐酸溶液提取, 制得麻黄碱供试品溶液;

(3) 吸取麻黄碱对照品溶液和麻黄碱供试品溶液, 注入液相色谱仪, 所述液相色谱仪以极性乙醚连接苯基键合硅胶为填充剂, 以甲醇和磷酸水溶液的混

合溶液为流动相,流速为 0.6~1mL/min,柱温为 25~35℃,检测波长为 205~215nm;测定得到化湿败毒组合物中盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的总含量。

作为上述技术方案的改进,所述盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱总含量的测定方法中,以甲醇和磷酸水溶液为流动相;

所述磷酸水溶液为磷酸、二乙胺、三乙胺和水的混合溶液;其中,磷酸的体积分数为 0.090~0.094%,二乙胺的体积分数为 0.01~0.04%,三乙胺的体积分数为 0.02~0.06%。

作为上述技术方案的改进,所述芍药苷含量的测定方法包括:

(1) 取芍药苷对照品适量,称定,加甲醇制成每 1mL 含 0.13mg 的溶液,制得芍药苷对照品溶液;

(2) 取化湿败毒组合物,利用甲醇提取,制得芍药苷供试品溶液;

(3) 吸取芍药苷对照品溶液和芍药苷供试品溶液,注入液相色谱仪;所述液相色谱仪以十八烷基键合硅胶为填充剂,以甲醇-0.05mol/L 磷酸二氢钾水溶液为流动相,流速为 0.8~1.2 mL/min,检测波长为 225~230nm,柱温为 30~35℃;测定得到化湿败毒组合物中芍药苷的含量。

作为上述技术方案的改进,所述麻黄的薄层色谱鉴别方法为:

(1) 取化湿败毒组合物 5~10g,研细,加浓氨试液 3~5 mL 使润湿,再加三氯甲烷 25~30 mL,加热回流 0.5~1 小时,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 1~2mL 溶解,制得麻黄供试品溶液;

(2) 取盐酸麻黄碱对照品,加甲醇制成每 1mL 含 1mg 的溶液,得到麻黄对照品溶液;

(3) 吸取麻黄供试品溶液和麻黄对照品溶液各 1~5 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以体积比为 20:5:0.5 的三氯甲烷、甲醇、浓氨溶液的混合溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以茚三酮试液,加热至斑点显色清晰;供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。

作为上述技术方案的改进,所述甘草的薄层色谱鉴别方法为:

(1) 取化湿败毒组合物 5~10g,研细,加乙醚 40~50mL,加热回流 1~2 小时,滤过,弃去醚液,残渣加甲醇 30~50mL,加热回流 0.5~1.5 小时,滤过,滤液蒸干,残渣加水 40~50mL 使溶解,用正丁醇振摇提取 1~3 次,每次 20~40mL,合并正丁醇液,用水洗涤 1~3 次,弃去水液,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇 5~10mL

使溶解，制得甘草供试品溶液；

(2) 取甘草对照药材 1~3g，按照步骤 (1) 中的甘草供试品溶液制备，得到甘草对照药材溶液；

(3) 吸取甘草供试品溶液、甘草对照药材溶液各 2~5 μ l，分别点于同一用 1%氢氧化钠溶液制备的硅胶 G 薄层板上，以体积比为 15:1:1:2 的乙酸乙酯、甲酸、冰醋酸和水的混合溶液为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 10%硫酸乙醇溶液，在 100~110℃加热至斑点显色清晰；供试品色谱中，在与对照药材色谱相应的位置上，显相同颜色的斑点。

作为上述技术方案的改进，所述厚朴的薄层色谱鉴别方法为：

(1) 取化湿败毒组合物 5~10g，研细，加甲醇 15~25mL，超声处理 0.5~1 小时，滤过，滤液蒸干，残渣加水 40~50mL 使溶解，用乙酸乙酯振摇提取 1~3 次，每次 20~30mL，合并乙酸乙酯液，蒸干，残渣加甲醇 1~2mL 使溶解，制得厚朴供试品溶液；

(2) 取厚朴酚对照品，加甲醇制成每 1mL 含 1mg 的溶液，制得厚朴酚对照品溶液；另取和厚朴酚对照品，加甲醇制成每 1mL 含 1mg 的溶液，制得和厚朴酚对照品溶液；

(3) 吸取厚朴供试品溶液、厚朴酚对照品溶液和和厚朴酚对照品溶液各 2~5 μ l，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以体积比为 17:3:3 的甲苯、乙酸乙酯、甲醇混合溶液为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 5%香草醛硫酸溶液，加热至斑点显色清晰；供试品色谱中，在与对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的斑点。

作为上述技术方案的改进，所述黄芪的薄层色谱鉴别方法为：

(1) 取化湿败毒组合物 5~10g，加甲醇 25~30mL，超声处理 0.5~1 小时，放冷，滤过，滤液蒸干，残渣加水 20~30mL 使溶解，用水饱和正丁醇振摇提取 1~3 次，每次 15~30mL，合并正丁醇液，用氨试液洗涤 1~3 次，每次 20~30mL，弃去氨试液，正丁醇液蒸干，残渣加甲醇 1~3mL 使溶解，制得黄芪供试品溶液；

(2) 取黄芪甲苷对照品，加甲醇制成每 1mL 含 1mg 的溶液，制得黄芪对照品溶液；

(3) 吸取黄芪供试品溶液 5~8 μ l，黄芪对照品溶液 2~3 μ l，点样于同一硅胶 G 薄层板上，以体积比为 13:7:2 的三氯甲烷、甲醇、水的下层溶液为展开剂，

在 4~10℃条件下展开，取出，晾干，喷以 10%硫酸乙醇溶液，在 100~105℃加热至斑点显色清晰；在紫外光下检视，供试品色谱中，在与对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的荧光斑点。

作为上述技术方案的改进，所述葶苈子的薄层色谱鉴别方法为：

(1) 取化湿败毒组合物 5~10g，研细，加 70%甲醇 20~30mL，超声处理 0.5~1 小时，放冷，滤过，滤液蒸干，残渣加水 5~10mL 使溶解，通过 D101 大孔树脂柱，先用水洗脱至洗脱液无颜色，再用 70%甲醇洗脱至洗脱液无颜色，收集 70%甲醇洗脱液，蒸干，残渣加甲醇 1~2mL 使溶解，制得葶苈子供试品溶液；

(2) 取槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖-7-O-β-D-龙胆双糖苷对照品，加 30%甲醇制成每 1mL 含 0.1mg 的溶液，制得葶苈子对照品溶液；

(3) 吸取葶苈子供试品溶液和葶苈子对照品溶液各 1~5μL，分别点于同一聚酰胺薄膜上，以体积比为 7:2:1 的乙酸乙酯、甲醇、水的混合溶液为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 2%三氯化铝乙醇溶液，热风吹干，置紫外光灯下检视；供试品色谱中，在与对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的荧光斑点。

作为上述技术方案的改进，所述赤芍的薄层色谱鉴别方法为：

(1) 取化湿败毒组合物 3~5g，研细，加甲醇 25~40mL，超声处理 0.5~1 小时，滤过，滤液蒸干，残渣加甲醇 1~2mL 使溶解，制得赤芍供试品溶液；

(2) 取芍药苷对照品，加甲醇制成每 1mL 含 1mg 的溶液，制得赤芍对照品溶液；

(3) 吸取赤芍供试品溶液、赤芍对照品溶液各 2~5μL，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以体积比为 40:5:10:0.2 的三氯甲烷、乙酸乙酯、甲醇、甲酸的混合溶液为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 5%香草醛硫酸溶液，加热至斑点显色清晰；供试品色谱中，在与对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的斑点。

作为上述技术方案的改进，所述大黄的薄层色谱鉴别方法为：

(1) 取化湿败毒组合物 5~10g，研细，加甲醇 20~30mL，超声处理 20~30 分钟，滤过，取滤液 3~10mL，蒸干，残渣加水 5~15mL 使溶解，再加盐酸 1~3mL，加热回流 20~60 分钟，立即冷却，用乙醚振摇提取 2~3 次，每次 20~30mL，合并乙醚液，蒸干，残渣加三氯甲烷 1~3mL 使溶解，制得大黄供试品溶液；

(2) 取大黄对照药材 0.1g，按照步骤 (1) 中的大黄供试品溶液的制备方法制备，制得大黄对照药材溶液；

(3) 吸取上述两种溶液各 1~5 μ L, 分别点于同一硅胶 H 薄层板上, 以体积比为 15:5:1 的石油醚、甲酸乙酯、甲酸的上层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 在紫外光下检视; 供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点。

作为上述技术方案的改进, 所述化湿败毒组合物主要包括下述组分: 麻黄 3-60 份, 炒苦杏仁 4.5-90 份, 生石膏 7.5-150 份, 甘草 1.5-30 份, 广藿香 5-100 份, 厚朴 5-100 份, 麸炒苍术 7.5-150 份, 炒草果仁 5-100 份, 法半夏 4.5-90 份, 茯苓 7.5-150 份, 大黄 2.5-50 份, 黄芪 5-100 份, 葶苈子 5-100 份, 赤芍 5-100 份, 辅料适量;

所述化湿败毒组合物被制成中药制剂, 所述中药制剂为颗粒剂、汤剂、散剂、胶囊剂、口服液、片剂或丸剂。

实施本发明, 具有如下有益效果:

1. 本发明基于对化湿败毒组合物分子作用机制的研究, 大生产具体情况的分析以及大量的试验研究, 选择了对麻黄、甘草、厚朴、黄芪、葶苈子、赤芍和大黄进行薄层色谱鉴别; 对结合蒽醌、盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、芍药苷含量进行测定。通过以上几个方面的测定, 为化湿败毒组合物大生产质量控制提供了数据基础。

2. 本发明中化湿败毒组合物的各个成分测定方法, 均具有较优的专属性和耐用性, 其准确性、稳定性均可达到大规模生产的要求, 为保证化湿败毒组合物中活性组分的稳定性提供良好基础。

3. 本发明中的各个薄层色谱鉴别方法, 分离度较好, 阴性无干扰, 鉴别方法可行; 且展开时间短, 检视清晰, 具有较强的专属性和良好的重现性, 能更好地控制大生产过程中药品的质量。

附图说明

图 1 是蒽醌对照品溶液的 HPLC 图; 其中, 峰 1 为芦荟大黄素峰, 峰 2 为大黄酸峰, 峰 3 为大黄素峰, 峰 4 为大黄酚峰, 峰 5 为大黄素甲醚峰;

图 2 是游离蒽醌阴性样品溶液 HPLC 图;

图 3 是总蒽醌阴性样品溶液的 HPLC 图;

图 4 是游离蒽醌供试品溶液的 HPLC 图; 其中, 峰 1 为芦荟大黄素峰, 峰 2

为大黄酸峰，峰 3 为大黄素峰，峰 4 为大黄酚峰，峰 5 为大黄素甲醚峰；

图 5 是总蒽醌供试品溶液的 HPLC 图；其中，峰 1 为芦荟大黄素峰，峰 2 为大黄酸峰，峰 3 为大黄素峰，峰 4 为大黄酚峰，峰 5 为大黄素甲醚峰；

图 6 是游离蒽醌含量测定中芦荟大黄素对照品标准曲线图；

图 7 是游离蒽醌含量测定中大黄酸对照品标准曲线图；

图 8 是游离蒽醌含量测定中大黄素对照品标准曲线图；

图 9 是游离蒽醌含量测定中大黄酚对照品标准曲线图；

图 10 是游离蒽醌含量测定中大黄素甲醚对照品标准曲线图；

图 11 是总蒽醌对照品中芦荟大黄素标准曲线图；

图 12 是总蒽醌含量测定中大黄酸对照品标准曲线图；

图 13 是总蒽醌含量测定中大黄素对照品标准曲线图；

图 14 是总蒽醌含量测定中大黄酚对照品标准曲线图；

图 15 是总蒽醌含量测定中大黄素甲醚对照品标准曲线图；

图 16 是采用不同流动相时麻黄碱对照品的 HPLC 图；

图 17 是麻黄阴性样品溶液的 HPLC 图；

图 18 是麻黄碱对照品溶液的 HPLC 图；其中，峰 1 为盐酸麻黄碱峰，峰 2 为盐酸伪麻黄碱峰；

图 19 是麻黄碱供试品溶液的 HPLC 图；其中，峰 1 为盐酸麻黄碱峰，峰 2 为盐酸伪麻黄碱峰；

图 20 是麻黄碱对照品中盐酸麻黄碱标准曲线图；

图 21 是麻黄碱对照品中盐酸伪麻黄碱标准曲线图；

图 22 是芍药阴性样品溶液的 HPLC 图；

图 23 是芍药苷对照品溶液的 HPLC 图；其中，峰 1 为芍药苷峰；

图 24 是芍药苷供试品溶液的 HPLC 图；其中，峰 1 为芍药苷峰；

图 25 是芍药苷对照品标准曲线图；

图 26 是麻黄的薄层色谱图；其中，1~3 为不同批次化湿败毒组合物，4 为麻黄对照品，5 为缺麻黄阴性样品；

图 27 是 21.1℃下麻黄的薄层色谱图，其中，1~3 为不同批次化湿败毒组合物，4 为麻黄对照品；

图 28 是 6.4℃下麻黄的薄层色谱图，其中，1~3 为不同批次化湿败毒组合物，

4 为麻黄对照品;

图 29 是相对湿度为 36% 时麻黄的薄层色谱图, 其中, 1~3 为不同批次化湿败毒组合物, 4 为麻黄对照品;

图 30 是相对湿度为 79% 时麻黄的薄层色谱图, 其中, 1~3 为不同批次化湿败毒组合物, 4 为麻黄对照品;

图 31 是不同点样量下麻黄的薄层色谱图, 其中, 1~5 中为麻黄对照品溶液点样量分别为 1 μ L、2 μ L、3 μ L、5 μ L 和 10 μ L, 6~10 为麻黄供试品溶液点样量分别为 1 μ L、2 μ L、3 μ L、5 μ L 和 10 μ L;

图 32 是采用谱科硅胶 G 板时麻黄的薄层色谱图, 其中, 1~3 为不同批次化湿败毒组合物, 4 为麻黄对照品;

图 33 是采用默克硅胶 G 板时麻黄的薄层色谱图, 其中, 1~3 为不同批次化湿败毒组合物, 4 为麻黄对照品;

图 34 是甘草的薄层色谱图, 其中, 1~3 为不同批次化湿败毒组合物, 4 为甘草对照药材, 5 为缺甘草阴性样品;

图 35 是 21.1 $^{\circ}$ C 下甘草的薄层色谱图, 其中, 1~3 为不同批次化湿败毒组合物, 4 为甘草对照药材;

图 36 是 6.4 $^{\circ}$ C 下甘草的薄层色谱图, 其中, 1~3 为不同批次化湿败毒组合物, 4 为甘草对照药材;

图 37 是相对湿度为 36% 时甘草的薄层色谱图, 其中, 1~3 为不同批次化湿败毒组合物, 4 为甘草对照药材;

图 38 是相对湿度为 79% 时甘草的薄层色谱图, 其中, 1~3 为不同批次化湿败毒组合物, 4 为甘草对照药材;

图 39 是不同点样量下甘草的薄层色谱图, 其中, 1~5 为甘草供试品溶液点样量分别为 2 μ L、4 μ L、6 μ L、8 μ L 和 10 μ L; 6~10 为甘草对照药材溶液点样量分别为 2 μ L、4 μ L、6 μ L、8 μ L 和 10 μ L;

图 40 是采用谱科硅胶 G 板时甘草的薄层色谱图, 其中, 1~3 为不同批次化湿败毒组合物, 4 为甘草对照药材;

图 41 是采用默克硅胶 G 板时甘草的薄层色谱图, 其中, 1~3 为不同批次化湿败毒组合物, 4 为甘草对照药材;

图 42 是厚朴的薄层色谱图, 其中, 1~3 为不同批次化湿败毒组合物, 4 为

厚朴酚对照品, 5 为和厚朴酚对照品, 6 为缺厚朴阴性样品;

图 43 是 26.1°C 下厚朴的薄层色谱图, 其中, 1~3 为不同批次化湿败毒组合物, 4 为厚朴酚对照品, 5 为和厚朴酚对照品;

图 44 是 3.1°C 下厚朴的薄层色谱图, 其中, 1~3 为不同批次化湿败毒组合物, 4 为厚朴酚对照品, 5 为和厚朴酚对照品;

图 45 是相对湿度为 36% 时厚朴的薄层色谱图, 其中, 1~3 为不同批次化湿败毒组合物, 4 为厚朴酚对照品, 5 为和厚朴酚对照品;

图 46 是相对湿度为 78% 时厚朴的薄层色谱图, 其中, 1~3 为不同批次化湿败毒组合物, 4 为厚朴酚对照品, 5 为和厚朴酚对照品;

图 47 是不同点样量下厚朴的薄层色谱图, 其中, 1~4 中为厚朴供试品溶液点样量分别为 2 μ L、4 μ L、6 μ L、和 8 μ L, 5~8 为厚朴酚对照品溶液点样量分别为 2 μ L、4 μ L、6 μ L、和 8 μ L, 9~12 为和厚朴酚对照品溶液点样量分别为 2 μ L、4 μ L、6 μ L、和 8 μ L;

图 48 是采用谱科硅胶 G 板时厚朴的薄层色谱图, 其中, 厚朴的薄层色谱图, 其中, 1~3 为不同批次化湿败毒组合物, 4 为厚朴酚对照品, 5 为和厚朴酚对照品;

图 49 是采用海洋硅胶 G 板时厚朴的薄层色谱图, 其中, 1~3 为不同批次化湿败毒组合物, 4 为厚朴酚对照品, 5 为和厚朴酚对照品;

图 50 是黄芪的薄层色谱图; 其中, 1~3 为不同批次化湿败毒组合物, 4 为黄芪对照品, 5 为缺黄芪阴性样品;

图 51 是 25°C 下黄芪的薄层色谱图; 其中, 1~3 为不同批次化湿败毒组合物, 4 为黄芪对照品;

图 52 是 9°C 下黄芪的薄层色谱图; 其中, 1~3 为不同批次化湿败毒组合物, 4 为黄芪对照品;

图 53 是相对湿度为 41% 时黄芪的薄层色谱图; 其中, 1~3 为不同批次化湿败毒组合物, 4 为黄芪对照品;

图 54 是相对湿度为 92% 时黄芪的薄层色谱图; 其中, 1~3 为不同批次化湿败毒组合物, 4 为黄芪对照品;

图 55 是不同点样量下黄芪的薄层色谱图, 其中, 1~3 分别为黄芪供试品溶液点样量为 3 μ L、5 μ L 和 8 μ L; 4~6 分别为黄芪对照品溶液点样量为 2 μ L、3 μ L

和 5 μ L;

图 56 是采用海洋硅胶 G 板时黄芪的薄层色谱图; 其中, 1~3 为不同批次化湿败毒组合物, 4 为黄芪对照品;

图 57 是采用银龙硅胶 G 板时黄芪的薄层色谱图; 其中, 1~3 为不同批次化湿败毒组合物, 4 为黄芪对照品;

图 58 是葶苈子的薄层色谱图; 其中, 1~3 为不同批次化湿败毒组合物, 4 为葶苈子对照品, 5 为缺葶苈子阴性样品;

图 59 是 25 $^{\circ}$ C 下葶苈子的薄层色谱图, 其中, 1~3 为不同批次化湿败毒组合物, 4 为葶苈子对照品;

图 60 是 9 $^{\circ}$ C 下葶苈子的薄层色谱图, 其中, 1~3 为不同批次化湿败毒组合物, 4 为葶苈子对照品;

图 61 是相对湿度为 41% 时葶苈子的薄层色谱图, 其中, 1~3 为不同批次化湿败毒组合物, 4 为葶苈子对照品;

图 62 是相对湿度为 92% 时葶苈子的薄层色谱图, 其中, 1~3 为不同批次化湿败毒组合物, 4 为葶苈子对照品;

图 63 是不同点样量下葶苈子的薄层色谱图; 其中, 1~3 分别为葶苈子对照品溶液点样量分别为 1 μ L、2 μ L 和 3 μ L; 4~6 分别为葶苈子供试品溶液点样量分别为 1 μ L、2 μ L 和 3 μ L;

图 64 是赤芍的薄层色谱图, 其中, 1~3 为不同批次化湿败毒组合物, 4 为赤芍对照品, 5 为缺赤芍阴性样品;

图 65 是 21.1 $^{\circ}$ C 下赤芍的薄层色谱图, 其中, 1~3 为不同批次化湿败毒组合物, 4 为赤芍对照品;

图 66 是 6.4 $^{\circ}$ C 下赤芍的薄层色谱图, 其中, 1~3 为不同批次化湿败毒组合物, 4 为赤芍对照品;

图 67 是相对湿度为 36% 时赤芍的薄层色谱图, 其中, 1~3 为不同批次化湿败毒组合物, 4 为赤芍对照品;

图 68 是相对湿度为 79% 时赤芍的薄层色谱图, 其中, 1~3 为不同批次化湿败毒组合物, 4 为赤芍对照品;

图 69 是不同点样量下赤芍的薄层色谱图, 其中, 1~5 中为赤芍对照品溶液点样量分别为 1 μ L、2 μ L、3 μ L、5 μ L 和 10 μ L, 6~10 为赤芍供试品溶液点样量分

别为 1 μ L、2 μ L、3 μ L、5 μ L 和 10 μ L；

图 70 是采用谱科硅胶 G 板时赤芍的薄层色谱图，其中，1~3 为不同批次化湿败毒组合物，4 为赤芍对照品；

图 71 是采用默克硅胶 G 板时赤芍的薄层色谱图，其中，1~3 为不同批次化湿败毒组合物，4 为赤芍对照品；

图 72 是大黄的薄层色谱图，其中，1~3 为不同批次化湿败毒组合物，4 为大黄对照药材，5 为缺大黄阴性样品；

图 73 是 26.1 $^{\circ}$ C 下大黄的薄层色谱图，其中，1~3 为不同批次化湿败毒组合物，4 为大黄对照药材；

图 74 是 3.1 $^{\circ}$ C 下大黄的薄层色谱图，其中，1~3 为不同批次化湿败毒组合物，4 为大黄对照药材；

图 75 是相对湿度为 36% 时大黄的薄层色谱图，其中，1~3 为不同批次化湿败毒组合物，4 为大黄对照药材；

图 76 是相对湿度为 78% 时大黄的薄层色谱图，其中，1~3 为不同批次化湿败毒组合物，4 为大黄对照药材；

图 77 是不同点样量下大黄的薄层色谱图，其中，1~5 中为大黄供试品溶液点样量分别为 1 μ L、2 μ L、3 μ L、5 μ L 和 10 μ L，6~10 为大黄对照药材溶液点样量分别为 1 μ L、2 μ L、3 μ L、5 μ L 和 10 μ L；

图 78 是采用谱科硅胶 H 板大黄的薄层色谱图，其中，1~3 为不同批次化湿败毒组合物，4 为大黄对照药材；

图 79 是采用银龙硅胶 H 板大黄的薄层色谱图，其中，1~3 为不同批次化湿败毒组合物，4 为大黄对照药材。

具体实施方式

为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚，下面将结合附图及具体实施方式对本发明作进一步地详细描述。

本发明中，化湿败毒组合物主要包括以下组分：麻黄，炒苦杏仁，生石膏，甘草，广藿香，厚朴，麸炒苍术，炒草果仁，法半夏，茯苓，大黄，黄芪，葶苈子，赤芍。

本发明化湿败毒组合物，方中以麻黄、广藿香、石膏为君药，麻黄、广藿

香，辛、苦、温兼气味芳香，解表平喘，化湿和中；石膏，辛、甘、寒，清泻肺胃郁热兼以生津，三药相辅，以达解表散寒、芳香化湿、清热平喘之效。炒苦杏仁、法半夏、厚朴、麸炒苍术、炒草果仁、茯苓共为臣药，炒苦杏仁、法半夏、厚朴，辛、苦、温，行气降逆，开结平喘；麸炒苍术、炒草果仁，辛烈、苦温，入脾胃经，燥湿健脾、破戾气所结；茯苓，淡渗除湿健脾；六味药共用以达助君药燥湿健脾，行气通窍，疏泄腠理，助邪外出之效。以黄芪、赤芍、葶苈子、大黄为佐药，黄芪，甘温益肺脾气，赤芍，苦、微寒，凉血散瘀，用以治疗疫病后期伤其正气，气机郁闭导致的血瘀等；葶苈子辛寒，辅助君药石膏清泄肺热，兼以利水，预防或治疗“湿肺（肺水肿）病变”；大黄，苦寒入大肠经而通腑，肺与大肠相表里，辅助君药石膏清泄肺热，并配合赤芍凉血活血，四药共为佐药，以达顾护正气、泻热凉血、活血化瘀之效。以甘草为使药，甘草甘平，调和诸药，配赤芍取芍药甘草汤意缓急。全方共奏解表化湿，清热平喘、益气散瘀之功。

临床发现新冠肺炎重型患者具有如下特点：①发热为主要表现多为身热不扬，缠绵难愈，但亦可为中低热，甚至不发热；②喘憋、乏力显著，亦为主要表现；③多合并纳差、便溏、腹泻等消化系统症状；④大多舌苔厚腻。从上述特点来看，符合湿邪致病特点：重浊、碍气伤阳、黏滞、趋下。湿邪既可单独致病，又可兼寒、兼热，表现为寒湿、湿热，其中热可为伏燥所致，亦可为湿邪久郁所化。湿邪、寒湿、湿热均可与疫毒合而致病，可见于轻型的寒湿郁肺、湿热蕴肺，普通型的湿毒郁肺、寒湿阻肺，若失治误治，或疾病发展，伤及营血，逆传心包，演变为新冠肺炎重型。因此，认为新冠肺炎突出表现为“湿毒疫”，病位在肺，与脾密切相关，病理性质为寒热错杂、虚实并见，病理因素为毒、湿、热、寒、瘀、虚，其中疫毒为根本，核心病机为疫毒与湿邪搏结，可兼寒、热侵袭机体，闭阻胸肺，气机升降失常，血脉瘀阻，气阴耗伤。新冠肺炎病理性质复杂，涉及多个病理因素。

主要病位在肺，其次在脾胃，湿毒郁闭是其核心病机，可分为初期、中期、危重期及恢复期四期进行辨证论治，治法有化湿行气，辟秽解毒，清肺化痰，活血化瘀、通腑攻下和补益正气等方法。因此，本发明化湿败毒组合物配伍依据核心病机，当以解表化湿，清热平喘，祛毒为核心治法，兼以化瘀通络，益气养阴。疫毒与寒湿相合，恶寒发热，治宜解表化湿祛毒；疫毒与湿热相合，

便溏不爽，倦怠乏力，治宜清热化湿祛毒，兼以益气养阴；闭阻胸肺，喘憋、胸闷、气短，治宜平喘，兼以化痰通络。

本发明化湿败毒组合物融合了《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案（试行第五版）》中医治疗的核心病机，属湿热夹湿，致肺失宣降，肺气壅闭”，以湿浊化热郁肺为主，突显化湿行气，宣肺平喘，清热化痰，益气活血之功效。前期临床观察显示，本发明能够改善重型新型冠状病毒感染肺炎的临床症状，对于重症患者，可明显缓解咳嗽、乏力、口干或呕吐等主要症状，中西医结合治疗后，治愈时间缩短。明显改善患者的呼吸功能，脱离吸氧时间缩短。对于普通型患者，对发热症状明显缓解，还可改善食欲减退、胸闷症状。对于重型及普通型新型冠状病毒感染肺炎的咳嗽、乏力、口干或呕吐等临床症状改善显著，补充了目前疫情形势急需的重型及普通型新型冠状病毒感染肺炎治疗用药。

优选的，化湿败毒组合物包括以下组分：

麻黄 3-60 份，炒苦杏仁 4.5-90 份，生石膏 7.5-150 份，甘草 1.5-30 份，广藿香 5-100 份，厚朴 5-100 份，麸炒苍术 7.5-150 份，炒草果仁 5-100 份，法半夏 4.5-90 份，茯苓 7.5-150 份，大黄 2.5-50 份，黄芪 5-100 份，葶苈子 5-100 份，赤芍 5-100 份，辅料适量。

所述化湿败毒组合物被制成中药制剂，所述中药制剂为颗粒剂、汤剂、散剂、胶囊剂、口服液、片剂或丸剂。

本发明提供了一种化湿败毒组合物的质量控制方法，其对任意剂型的化湿败毒组合物均可以起到良好的检测效果。本发明在设定质量控制方法的过程中，分别考虑了化湿败毒组合物鉴别方法和含量测定等两个方面。

具体的，对于鉴别方法而言：

在研究过程中，发明人采用分子对接技术对化湿败毒组合物配方各味中药与 COVID-19 侵入、复制、组装、脱落转移的关键靶标以及对宿主产生肺部损伤和炎症反应的关键作用靶标进行分析。结果表明：麻黄对抑制病毒侵入和脱落的靶标 TMPRSS2、TACE、AAK1（病毒侵入、内吞调节），病毒侵入宿主后产生的组织损伤关键靶标 VEGFR2（血管通透）和 ALK5（血管通透、肺部纤维化）有响应。甘草对抑制病毒侵入和脱落的靶标 FURIN（病毒侵入、内吞调节）、TACE、AAK1，病毒侵入宿主后产生的组织损伤关键靶标 sPLA2、AMPK（氧化应激、炎症）、CCR2（炎症）、p38 α MAPK（炎症、凋亡）、VEGFR2、ALK5

有相应；厚朴对抑制病毒侵入和脱落的靶标 AAK1，病毒侵入宿主后产生的组织损伤关键靶标 AMPK、VEGFR2 和 ALK5 有响应。大黄对于抑制病毒侵入和脱落的靶标 TMPRSS2，病毒侵入宿主后产生的组织损伤关键靶标 AMPK、VEGFR2 和 ALK5 有响应。黄芪对病毒侵入宿主后产生的组织损伤关键靶标 VEGFR2 有响应。赤芍对于靶标 Mpro 和 ACE2 有响应。通过上述组分与上述靶标的作用，发挥了化湿败毒组合物的抗 COVID-19 的作用。由此可见，麻黄、甘草、厚朴响应靶标较多，可有效抑制病毒侵入、组装和脱落转移，属于核心中药。黄芪、葶苈子、赤芍、大黄的响应靶标较少，但其对于抗 COVID-19 也具有重要的意义。因此，从药效角度出发，应优先选择对麻黄、甘草、厚朴等三味药物进行薄层色谱鉴别；同时，也可选择对黄芪、葶苈子、赤芍和大黄进行薄层色谱鉴别；以建立完善的鉴别方法，为化湿败毒组合物质量监控提供坚实的数据基础。

综上，本发明在考虑上述因素的基础上，选择对麻黄、甘草、厚朴、黄芪、葶苈子、赤芍和大黄进行薄层色谱鉴别，以建立完善的鉴别方法，为化湿败毒组合物的质量监控提供数据基础。

对于含量测定方法而言，在研究过程中，发明人采用分子对接技术进行进一步的研究表明，麻黄中芹菜素、3-甲氧基蜀葵苷元、3,5,4'-三羟基-8-甲氧基黄酮、山萘酚等 4 个成分对上述靶标有作用；大黄中的大黄酸、大黄素甲醚、6-羟基酸模素-8-O- β -D-葡萄糖糖苷、原矢车菊素 B1-3'-O-没食子酸酯、芦荟大黄素等 5 个成分对上述靶标有作用；赤芍中黄芩素、黄芩苷等 2 个成分对上述靶标有作用。因此，对麻黄、大黄、赤芍相关成分的检测是实现化湿败毒组合物质量控制的关键手段。

此外，对于化湿败毒组合物中的麻黄而言，其主要起到宣通肺气，化痰止咳的作用，从中药组方原则讲，属于君药，在方中起到重要的作用。同时，麻黄引入的麻黄碱具有挥发性，在大生产的过程中容易损失。因此，本发明对麻黄中盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的含量进行测定。具体的，为了有效发挥化湿败毒组合物的作用，应控制盐酸麻黄碱+盐酸伪麻黄碱的含量为 0.7~2.7 mg/g。

对于化湿败毒组合物中的大黄而言，其主要的作用是清泻肺热，活血凉血；其主要是通过大黄所引入的结合蒽醌（芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚）实现的。但结合蒽醌在受热时容易分解成游离蒽醌，导致药效减弱。为此，需要对结合蒽醌的含量进行监控。因此，本发明选择对成品药物中

结合蒽醌的含量进行测定、监控，以实现化湿败毒组合物的质量控制。具体的，在本发明的化湿败毒组合物中，控制结合蒽醌的含量不得少于 0.016%。

此外，本发明还通过测定芍药苷的含量对赤芍的含量进行了控制。具体的，在本发明的化湿败毒组合物中，芍药苷的含量为 3~14 mg/g。

以下分为三个部分分别对本发明的质量控制方法进行说明：

一、化湿败毒组合物的含量测定

1.1 总蒽醌、游离蒽醌含量的测定方法

本发明通过高效液相色谱法测定化湿败毒组合物中的总蒽醌含量和游离蒽醌含量，进而计算结合蒽醌含量。其中，结合蒽醌含量=总蒽醌含量-游离蒽醌含量。

具体的，在本发明中，总蒽醌含量的测定方法包括：

(1) 色谱条件：以十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱为色谱柱，以乙腈-0.1 vol% 磷酸水溶液为流动相，流速为 0.8mL/min，检测波长为 254nm，柱温为 30℃；进样量为 10 μL。

流动相按如下洗脱顺序进行梯度洗脱：

时间（分钟）	乙腈	0.1vol%磷酸水溶液
0~10	35%→40%	65%→60%
10~38	40%→60%	60%→40%
38~48	60%	40%。

(2) 总蒽醌供试品溶液制备：取化湿败毒组合物约 0.5g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 25mL，称定重量，加热回流提取 30 分钟，取出，放冷，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液 10mL，减压回收溶剂至干，加 8%盐酸溶液 10mL，超声处理 2 分钟，再加三氯甲烷 10mL，加热回流 1 小时，放冷，置分液漏斗中，用少量三氯甲烷洗涤容器，并入分液漏斗中，分取三氯甲烷层，酸液再用三氯甲烷提取 3 次，每次 10mL，合并三氯甲烷液，减压回收溶剂至干，残渣加甲醇使溶解，转移至 10mL 量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

(3) 蒽醌对照品溶液制备：称定芦荟大黄素对照品 1.581mg、大黄酸对照品 3.017mg、大黄素对照品 1.604mg、大黄酚对照品 2.656mg、大黄素甲醚对照

品 5.221mg, 置 100mL 量瓶中, 加甲醇分别制成每 1mL 含芦荟大黄素 15.807 μ g、大黄酸 30.167 μ g、大黄素 16.039 μ g、大黄酚 26.563 μ g、大黄素甲醚 52.213 μ g 的母液; 分别精密吸取上述芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚母液各 1mL, 大黄素甲醚母液 0.1mL, 置 10mL 量瓶中, 加甲醇制成每 1mL 含芦荟大黄素 1.581 μ g、大黄酸 3.017 μ g、大黄素 1.604 μ g、大黄酚 2.656 μ g、大黄素甲醚 0.522 μ g 的混合溶液, 即得。

(4) 精密吸取总蒽醌供试品溶液、蒽醌对照品溶液各 10 μ L, 注入液相色谱仪, 测定即得化湿败毒组合物中总蒽醌的含量。

具体的, 在本发明中, 游离蒽醌含量的测定方法如下:

(1) 色谱条件: 以十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱为色谱柱, 以乙腈-0.1 vol% 磷酸水溶液为流动相, 流动相流速为 0.8mL/min, 检测波长为 254nm, 柱温为 30 $^{\circ}$ C, 进样量为 10 μ L。

流动相按如下洗脱顺序进行梯度洗脱:

时间 (分钟)	乙腈	0.1vol%磷酸水溶液
0~10	35%→40%	65%→60%
10~38	40%→60%	60%→40%
38~48	60%	40%。

(2) 游离蒽醌供试品溶液制备: 取化湿败毒组合物约 0.5g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25mL, 称定重量, 加热回流 30 分钟, 取出, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

(3) 蒽醌对照品溶液制备: 称定芦荟大黄素对照品 1.581mg、大黄酸对照品 3.017mg、大黄素对照品 1.604mg、大黄酚对照品 2.656mg、大黄素甲醚对照品 5.221mg, 置 100mL 量瓶中, 加甲醇分别制成每 1mL 含芦荟大黄素 15.807 μ g、大黄酸 30.167 μ g、大黄素 16.039 μ g、大黄酚 26.563 μ g、大黄素甲醚 52.213 μ g 的母液; 分别精密吸取上述芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚母液各 1mL, 大黄素甲醚母液 0.1mL, 置 10mL 量瓶中, 加甲醇制成每 1mL 含芦荟大黄素 1.581 μ g、大黄酸 3.017 μ g、大黄素 1.604 μ g、大黄酚 2.656 μ g、大黄素甲醚 0.522 μ g 的混合溶液, 即得。

(4) 精密吸取游离蒽醌供试品溶液、蒽醌对照品溶液各 10 μ L, 注入液相色谱

谱仪，测定得到化湿败毒组合物中游离蒽醌含量。

需要说明的是，所述总蒽醌含量的测定方法和游离蒽醌含量的测定方法均采用相同的洗脱程序进行，所述总蒽醌含量的测定方法和游离蒽醌含量的测定方法中采用相同的蒽醌对照品溶液。

还需要说明的是，由于化湿败毒组合物总共含有 14 味原料药，其成品成分复杂，对于总蒽醌和游离蒽醌的测试准确度有较大的影响。为此，本发明在考虑测试方法准确性、耐用性以及专属性的基础上，重新设计了梯度洗脱程序。具体的，研究发现：在 10min~38min，乙腈比例 40%→60%，0.1vol%磷酸比例 60%→40%，可有效地分离化湿败毒组合物中的芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚，无需设置太多梯度变化。此外，在 38min~48min，大黄素甲醚在不同的色谱柱上出峰时间不同，因此在此时间范围内，设定乙腈-0.1vol%磷酸（60:40）等度洗脱 10min，以确保测试方法对不同色谱柱耐用性，也提升测试准确度。

以下对本发明中总蒽醌和游离蒽醌的测定方法进行方法学验证：

1.1.2 专属性考察

取大黄阴性样品按总蒽醌供试品溶液制备方法制备总蒽醌阴性样品溶液，取大黄阴性样品按游离蒽醌供试品溶液制备方法分别制游离蒽醌阴性样品溶液。将游离蒽醌供试品溶液、总蒽醌供试品溶液、游离蒽醌阴性样品溶液、总蒽醌阴性样品溶液和蒽醌对照品溶液各 10μL 分别注入液相色谱仪，按照拟定条件进行测试，其结果参见图 1~图 5。其中，各个对照品的出峰位置如下表所示：

表 1 化湿败毒组合物总蒽醌/游离蒽醌含量测定专属性考察出峰位置表					
	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
蒽醌对照品溶液	10.833	13.795	23.073	32.568	38.215
游离蒽醌供试品溶液	10.815	13.732	23.036	32.500	38.119
总蒽醌供试品溶液	10.798	13.688	23.017	32.504	38.090

结果显示，供试品色谱在与对照品色谱相应的保留时间处有相同的色谱峰，游离蒽醌阴性样品无干扰，总蒽醌阴性样品无干扰，该方法专属性良好。

1.1.3 线性关系考察

（1）游离蒽醌含量测定线性关系考察

精密称定芦荟大黄素对照品 3.570mg、大黄素对照品 2.751mg、大黄酚对照

品 1.631mg、大黄素甲醚对照品 3.051mg，各置 50mL 量瓶中，加甲醇分别制成每 1mL 含芦荟大黄素 71.405 μ g、大黄素 55.015 μ g、大黄酚 32.629 μ g、大黄素甲醚 61.024 μ g 的溶液；精密测定大黄酸对照品 2.057mg，再精密吸取上述芦荟大黄素、大黄素、大黄酚对照品溶液各 5mL，大黄素甲醚对照品 1mL，共置 100mL 量瓶中，加甲醇制成每 1mL 含芦荟大黄素 3.570 μ g、大黄酸 20.565 μ g、大黄素 2.751 μ g、大黄酚 1.631 μ g、大黄素甲醚 0.610 μ g 的混合溶液，作为游离蒽醌对照品母液。精密吸取游离蒽醌对照品母液 5mL、3mL、1mL、0.5mL、0.2mL，各置 10mL 量瓶中，分别制成每 1mL 含 0.071 μ g、0.179 μ g、0.357 μ g、1.071 μ g、1.785 μ g 的芦荟大黄素，每 1mL 含 0.411 μ g、1.028 μ g、2.057 μ g、6.170 μ g、10.283 μ g 的大黄酸，每 1mL 含 0.055 μ g、0.138 μ g、0.275 μ g、0.825 μ g、1.375 μ g 的大黄素，每 1mL 含 0.033 μ g、0.082 μ g、0.163 μ g、0.489 μ g、0.816 μ g 的大黄酚，每 1mL 含 0.012 μ g、0.030 μ g、0.061 μ g、0.183 μ g、0.305 μ g 的大黄素甲醚对照品溶液。

分别精密吸取上述 6 个不同浓度的对照品溶液 10 μ L，测试分析，记录色谱峰面积。以峰面积为纵坐标 (y)，对照品浓度为横坐标 (x)，并绘制标准曲线，其结果如图 6~图 10 所示。

由图 6 可以看出：芦荟大黄素的回归方程为： $y=66,512.6130x+128.8558$ ，其相关系数 $R^2=0.9994$ ，表明芦荟大黄素在进样浓度 0.071 μ g/mL~3.570 μ g/mL 的范围内进样质量与峰面积线性关系良好。

由图 7 可以看出，大黄酸的回归方程为： $y=49,694.7092x-1,493.7898$ ，其相关系数 $R^2=0.9998$ ，表明大黄酸在进样浓度 0.411 μ g/mL~20.565 μ g/mL 的范围内进样质量与峰面积线性关系良好。

由图 8 可以看出，大黄素的回归方程为： $y=50,043.3431x+269.0534$ ，其相关系数 $R^2=0.9995$ ，表明大黄素在进样浓度 0.055 μ g/mL~2.751 μ g/mL 的范围内进样质量与峰面积线性关系良好。

由图 9 可以看出，大黄酚的回归方程为 $y=68,915.3676x+180.1324$ ，其相关系数 $R^2=0.9995$ ，表明大黄酚在进样浓度 0.033 μ g/mL~1.631 μ g/mL 的范围内进样质量与峰面积线性关系良好。

由图 10 可以看出，大黄素甲醚的回归方程为： $y=51,006.3529x+707.5671$ ，其相关系数 $R^2=0.995$ ，表明大黄素甲醚在进样浓度 0.012 μ g/mL~0.610 μ g/mL 的范围内进样质量与峰面积线性关系良好。

(2) 总蒽醌含量测定线性关系考察

按照蒽醌对照品溶液制备方法制备每 1mL 含芦荟大黄素 15.807 μ g、大黄酸 30.167 μ g、大黄素 16.039 μ g、大黄酚 26.563 μ g、大黄素甲醚 5.221 μ g 的溶液, 作为总蒽醌对照品母液。精密吸取总蒽醌对照品母液 5mL、3mL、1mL、0.5mL、0.2mL, 各置 10mL 量瓶中, 分别制成每 1mL 含 0.316 μ g、0.790 μ g、1.581 μ g、4.742 μ g、7.903 μ g 的芦荟大黄素, 每 1mL 含 0.603 μ g、1.508 μ g、3.017 μ g、9.050 μ g、15.084 μ g 的大黄酸, 每 1mL 含 0.321 μ g、0.802 μ g、1.604 μ g、4.812 μ g、8.109 μ g 的大黄素, 每 1mL 含 0.531 μ g、1.328 μ g、2.656 μ g、7.969 μ g、13.282 μ g 的大黄酚, 每 1mL 含 0.104 μ g、0.261 μ g、0.522 μ g、1.566 μ g、2.611 μ g 的大黄素甲醚对照品溶液。

分别精密吸取上述 6 个不同浓度的对照品溶液 10 μ L, 测试分析, 记录色谱峰面积。以峰面积为纵坐标 (y), 对照品浓度为横坐标 (x), 并绘制标准曲线, 其结果如图 11~图 15 所示。

由图 11 可以看出, 芦荟大黄素的回归方程为: $y=58108.7967x-793.9060$, 其相关系数 $R^2=0.9999$, 表明芦荟大黄素在进样浓度 0.316 μ g/mL~15.807 μ g/mL 的范围内进样质量与峰面积线性关系良好。

由图 12 可以看出, 大黄酸的回归方程为: $y=50,539.6466x-3,498.3368$, 其相关系数 $R^2=1.0000$, 表明大黄酸在进样浓度 0.603 μ g/mL~30.167 μ g/mL 的范围内进样质量与峰面积线性关系良好。

由图 13 可以看出, 大黄素的回归方程为: $y=43,070.1473x-501.3586$, 其相关系数 $R^2=0.9999$, 表明大黄素在进样浓度 0.321 μ g/mL~16.039 μ g/mL 的范围内进样质量与峰面积线性关系良好。

由图 14 可以看出, 大黄酚的回归方程为: $y=61,967.3466x-2,584.2033$, 其相关系数 $R^2=0.9999$, 表明大黄酚在进样浓度 0.531 μ g/mL~26.563 μ g/mL 的范围内进样质量与峰面积线性关系良好。

由图 15 可以看出, 大黄素甲醚的回归方程为: $y=30,079.1466x+505.0118$, 其相关系数 $R^2=1.000$, 表明大黄素甲醚在进样浓度 0.104 μ g/mL~5.221 μ g/mL 的范围内进样质量与峰面积线性关系良好。

1.1.4 精密度考察

(1) 仪器精密度

精密吸取蒽醌对照品溶液 10 μ L，测试分析，以芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚峰面积计算，测定结果见表 2。

表 2 化湿败毒组合物游离蒽醌含量测定仪器精密度考察结果表					
序号	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
1	111142	479479	64168	52022	15608
2	111391	477684	64588	53850	15328
3	112571	486688	66415	52613	15397
4	111651	481380	64317	51998	15299
5	111983	479889	64464	52258	15535
RSD(%)	0.50	0.71	1.42	1.46	0.87

结果显示，同一份蒽醌对照品溶液连续进样 5 针，各指标峰面积 RSD 值均小于 3.0%，说明仪器精密度良好。

（2）中间精密度考察

选择不同实验人员在不同的时间、不同的高效液相色谱仪测定，取化湿败毒组合物适量，研细，取约 0.5g，精密称定，平行 6 份，分别制备游离蒽醌供试品溶液、总蒽醌供试品溶液，精密吸取蒽醌对照品溶液 10 μ L，测试分析，计算游离蒽醌、总蒽醌含量及 RSD 值，与重复性考察试验结果相比较，结果见表 3~4。

表 3 化湿败毒组合物游离蒽醌含量测定中间精密度考察结果表				
操作人员	序号	含量 (mg/g)	RSD (%)	RSD (%)
人员 1	1	0.262	0.29	
	2	0.262		
	3	0.261		
	4	0.260		
	5	0.261		
	6	0.261		0.45
人员 2	A	0.258	0.49	
	B	0.261		
	C	0.259		

D	0.261
E	0.261
F	0.260

表 4 化湿败毒组合物总蒽醌含量测定中间精密度考察结果表				
操作人员	序号	含量 (mg/g)	RSD (%)	RSD (%)
人员 1	1	0.613	1.00	0.92
	2	0.615		
	3	0.601		
	4	0.602		
	5	0.613		
	6	0.611		
人员 2	A	0.607	0.75	
	B	0.606		
	C	0.611		
	D	0.600		
	E	0.599		
	F	0.606		

结果显示，同一批样品由不同的人员于不同的时间在不同的仪器上操作，重复测定 6 次，游离蒽醌含量 RSD 值为 0.49%，与重复性试验 6 个数据的 RSD 值为 0.45%；总蒽醌含量 RSD 值为 0.75%，与重复性试验 6 个数据的 RSD 值为 0.92%，根据中国药典 2015 年版“药品质量标准分析方法验证指导原则”规定样品中待测成分含量在 0.01%~0.1%时，中间精密度 RSD 限度为<6%，因此，不同分析人员在不同日期和不同色谱仪下操作，该方法中间精密度良好。

1.1.5 稳定性考察

精密吸取游离蒽醌供试品溶液、总蒽醌供试品溶液 10μL，分别在 0、2.5、6、9.5、13、17、20.5、25.5 小时进样，测定供试品溶液中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的峰面积，计算峰面积 RSD 值，测定结果见表 5 和表 6。

表 5 化湿败毒组合物游离蒽醌含量测定稳定性考察结果表

时间 (h)	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
0.0	29543	116205	15515	11592	1265
2.5	29562	118081	15439	11864	1278
6.0	29504	117982	15389	11538	1230
9.5	29368	118249	15141	11623	1226
13.0	29490	118394	15246	11733	1191
17.0	29650	117034	15661	12141	1217
20.5	29373	118350	15601	11735	1241
25.5	29718	116945	15634	12487	1278
RSD(%)	0.41	0.69	1.21	2.73	2.50

表 6 化湿败毒组合物总蒽醌含量测定稳定性考察结果表

时间 (h)	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
0.0	89921	179284	88188	180938	54424
2.5	91698	181031	89780	183742	55829
6.0	93397	188114	91369	186257	57735
9.5	94029	190049	93235	189327	57738
13.0	95813	193462	94666	192953	57272
17.0	98259	196084	96092	196637	57064
20.5	100476	201969	98949	200577	56710
25.5	102913	205544	100982	206119	56986
13hRSD(%)	2.42	3.24	2.84	2.51	2.55
25.5hRSD(%)	4.65	4.83	4.70	4.51	1.96

结果显示，同一份游离蒽醌供试品溶液，分别在 0.0、2.5、6.0、9.5、13.0、17.0、20.5、25.5 小时进样测定，各指标成分峰面积 RSD 值均小于 3.0%，说明游离供试品溶液在 24 小时内稳定性良好。

同一份总蒽醌供试品溶液，分别在 0.0、2.5、6.0、9.5、13.0、17.0、20.5、25.5 小时进样测定，各指标成分除了大黄素甲醚峰面积 RSD 值小于 3.0%，其余成分均大于 3%，建议总蒽醌供试品溶液在 13 小时完成测定。

1.1.6 重复性考察

精密吸取游离蒽醌供试品溶液、总蒽醌供试品溶液 10μL，进行测试，计算

游离蒽醌、总蒽醌含量及 RSD 值，测定结果见表 7 和表 8。

表 7 化湿败毒组合物游离蒽醌含量测定重复性考察结果表

序号	含量 (mg/g)					
	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚	游离蒽醌
1	0.0307	0.1822	0.0275	0.0146	0.0069	0.2618
2	0.0306	0.1818	0.0276	0.0145	0.0072	0.2616
3	0.0305	0.1820	0.0271	0.0142	0.0071	0.2609
4	0.0304	0.1811	0.0271	0.0145	0.0070	0.2602
5	0.0308	0.1813	0.0275	0.0143	0.0074	0.2613
6	0.0308	0.1804	0.0275	0.0147	0.0074	0.2608
均值	0.0306	0.1815	0.0274	0.0145	0.0072	0.2611
RSD(%)	0.54	0.36	0.80	1.29	2.73	0.24

表 8 化湿败毒组合物总蒽醌含量测定重复性考察结果表

序号	含量 (mg/g)					
	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚	总蒽醌
1	0.0838	0.2323	0.0917	0.1356	0.0693	0.6126
2	0.0827	0.2358	0.0917	0.1348	0.0700	0.6150
3	0.0829	0.2253	0.0914	0.1321	0.0693	0.6010
4	0.0823	0.2261	0.0916	0.1328	0.0694	0.6021
5	0.0818	0.2367	0.0922	0.1329	0.0696	0.6132
6	0.0819	0.2339	0.0915	0.1335	0.0701	0.6110
均值	0.0826	0.2317	0.0917	0.1336	0.0696	0.6091
RSD(%)	0.87	2.11	0.33	0.99	0.51	0.99

结果显示，同一批样品重复测定 6 次，游离蒽醌及总蒽醌各指标含量 RSD 值均小于 3%，说明该分析方法的重复性良好。

1.1.7 准确度考察

精密称定芦荟大黄素对照品 2.455mg、大黄酸对照品 2.485mg、大黄素对照品 1.625mg、大黄酚对照品 1.950mg、大黄素甲醚对照品 0.845mg，分别置 250、50、250、500、500mL 量瓶中，加甲醇分别制成每 1mL 含芦荟大黄素 0.00982mg、大黄酸 0.04969mg、大黄素 0.00650mg、大黄酚 0.00390mg、大黄素甲醚 0.00169mg

的溶液，作为加样回收母液。精密吸取上述母液各 1mL 于锥形瓶中，平行 6 份，挥干溶剂；再取化湿败毒组合物，制备游离蒽醌供试品溶液，测定供试品中游离蒽醌含量，计算加样回收率，结果见表 9~13。

表 9 化湿败毒组合物游离蒽醌芦荟大黄素测定加样回收率考察结果表

序号	样品称样量(g)	样品含量(mg)	测定总量(mg)	标准品加入量(mg)	回收率(%)	均值	RSD(%)
1	0.2549	0.00781	0.018735	0.00982	111.28	112.08	1.47
2	0.2533	0.00776	0.018614	0.00982	110.54		
3	0.2548	0.00780	0.019044	0.00982	114.45		
4	0.2538	0.00777	0.018704	0.00982	111.31		
5	0.2532	0.00776	0.018655	0.00982	110.99		
6	0.2527	0.00774	0.018923	0.00982	113.88		

表 10 化湿败毒组合物游离蒽醌大黄酸测定加样回收率考察结果表

序号	样品称样量(g)	样品含量(mg)	测定总量(mg)	标准品加入量(mg)	回收率(%)	均值	RSD(%)
1	0.2549	0.0463	0.088835	0.04969	85.69	86.17	0.70
2	0.2533	0.0460	0.088764	0.04969	86.13		
3	0.2548	0.0462	0.089066	0.04969	86.19		
4	0.2538	0.0461	0.088813	0.04969	86.04		
5	0.2532	0.0459	0.088515	0.04969	85.66		
6	0.2527	0.0459	0.089243	0.04969	87.31		

表 11 化湿败毒组合物游离蒽醌大黄素测定加样回收率考察结果表

序号	样品称样量(g)	样品含量(mg)	测定总量(mg)	标准品加入量(mg)	回收率(%)	均值	RSD(%)
1	0.2549	0.0070	0.013869	0.00650	106.02	107.31	0.91
2	0.2533	0.0069	0.013857	0.00650	106.52		
3	0.2548	0.0070	0.013982	0.00650	107.81		
4	0.2538	0.0069	0.014019	0.00650	108.79		
5	0.2532	0.0069	0.013911	0.00650	107.39		
6	0.2527	0.0069	0.013894	0.00650	107.33		

表 12 化湿败毒组合物游离蒽醌大黄酚测定加样回收率考察结果表

序号	样品称样量(g)	样品含量(mg)	测定总量(mg)	标准品加入量(mg)	回收率(%)	均值	RSD(%)
----	----------	----------	----------	------------	--------	----	--------

	量(g)	(mg)	(mg)	入量(mg)	(%)		
1	0.2549	0.0037	0.007457	0.00390	96.72		
2	0.2533	0.0037	0.007457	0.00390	97.29		
3	0.2548	0.0037	0.007541	0.00390	98.88	97.79	0.78
4	0.2538	0.0037	0.007478	0.00390	97.65		
5	0.2532	0.0037	0.007478	0.00390	97.87		
6	0.2527	0.0037	0.007488	0.00390	98.32		

表 13 化湿败毒组合物游离蒽醌大黄素甲醚测定加样回收率考察结果表

序号	样品称样 量(g)	样品含量 (mg)	测定总量 (mg)	标准品加 入量(mg)	回收率 (%)	均值	RSD(%)
1	0.2549	0.0018	0.003557	0.00169	102.29		
2	0.2533	0.0018	0.003586	0.00169	104.70		
3	0.2548	0.0018	0.003614	0.00169	105.71	105.93	2.10
4	0.2538	0.0018	0.003641	0.00169	107.75		
5	0.2532	0.0018	0.003647	0.00169	108.36		
6	0.2527	0.0018	0.003617	0.00169	106.77		

从表中可以看出，芦荟大黄素回收率为 112.08%，大黄酸回收率为 86.17%，大黄素回收率为 107.31%，大黄酚回收率为 97.79%，大黄素甲醚回收率为 105.93%，根据中国药典 2015 年版“药品质量标准分析方法验证指导原则”规定样品中待测成分含量在 0.001%~0.01%时，回收率限度为 80%~115%，本发明测定方法准确度良好。

(2) 总蒽醌含量测定准确度考察

精密称定芦荟大黄素对照品 2.497mg、大黄酸对照品 3.960mg、大黄素对照品 2.707mg、大黄酚对照品 2.313mg、大黄素甲醚对照品 1.995mg，分别置 50mL 量瓶中，加甲醇分别制成每 1mL 含芦荟大黄素 0.04994mg、大黄酸 0.07920mg、大黄素 0.05414mg、大黄酚 0.04625mg、大黄素甲醚 0.03990mg 的溶液，作为加样回收母液。精密吸取上述芦荟大黄素、大黄素、大黄素甲醚母液各 1mL，大黄酸、大黄酚各 2mL 于锥形瓶中，平行 6 份，挥干溶剂；再取化湿败毒组合物（批号：J2004007）适量，研细，分别取 0.25g 于上述 6 个锥形瓶中，制备总蒽醌供试品溶液，并测定供试品中总蒽醌含量，计算加样回收率，结果见表 14~18。

表 14 化湿败毒组合物总蒽醌芦荟大黄素测定加样回收率考察结果表

序号	样品称 样量(g)	样品含 量(mg)	测定总 量(mg)	标准品加 入量(mg)	回收率 (%)	均值	RSD(%)
1	0.2509	0.02072	0.068049	0.04994	94.78	95.05	1.11
2	0.2523	0.02083	0.068032	0.04994	94.51		
3	0.2552	0.02107	0.067766	0.04994	93.50		
4	0.2508	0.02071	0.068443	0.04994	95.58		
5	0.2502	0.02066	0.068253	0.04994	95.30		
6	0.2507	0.02070	0.068956	0.04994	96.63		

表 15 化湿败毒组合物总蒽醌大黄酸测定加样回收率考察结果表

序号	样品称样 量(g)	样品含 量(mg)	测定总 量(mg)	标准品加 入量(mg)	回收率 (%)	均值	RSD(%)
1	0.2509	0.0581	0.195512	0.15840	86.73	88.68	4.39
2	0.2523	0.0585	0.196415	0.15840	87.10		
3	0.2552	0.0591	0.211054	0.15840	95.92		
4	0.2508	0.0581	0.201037	0.15840	90.24		
5	0.2502	0.0580	0.193288	0.15840	85.43		
6	0.2507	0.0581	0.195306	0.15840	86.63		

表 16 化湿败毒组合物总蒽醌大黄素测定加样回收率考察结果表

序号	样品称 样量(g)	样品含 量(mg)	测定总 量(mg)	标准品加 入量(mg)	回收率 (%)	均值	RSD(%)
1	0.2509	0.0230	0.076980	0.05414	99.70	101.25	2.95
2	0.2523	0.0231	0.077717	0.05414	100.82		
3	0.2552	0.0234	0.077414	0.05414	99.77		
4	0.2508	0.0230	0.079416	0.05414	104.22		
5	0.2502	0.0229	0.075750	0.05414	97.55		
6	0.2507	0.0230	0.080058	0.05414	105.42		

表 17 化湿败毒组合物总蒽醌大黄酚测定加样回收率考察结果表

序号	样品称 样量(g)	样品含 量(mg)	测定总 量(mg)	标准品加 入量(mg)	回收 率(%)	均值	RSD(%)
1	0.2509	0.0335	0.128539	0.09250	102.73	98.83	4.94
2	0.2523	0.0337	0.125536	0.09250	99.28		
3	0.2552	0.0341	0.128972	0.09250	102.58		

4	0.2508	0.0335	0.127569	0.09250	101.69
5	0.2502	0.0334	0.116740	0.09250	90.07
6	0.2507	0.0335	0.122857	0.09250	96.61

表 18 化湿败毒组合物总蒽醌大黄素甲醚测定加样回收率考察结果表

序号	样品称 样量(g)	样品含 量(mg)	测定总 量(mg)	标准品加 入量(mg)	回收率 (%)	均值	RSD(%)
1	0.2509	0.0175	0.057446	0.03990	100.20	101.53	2.73
2	0.2523	0.0176	0.060102	0.03990	106.61		
3	0.2552	0.0178	0.057701	0.03990	100.09		
4	0.2508	0.0175	0.057159	0.03990	99.50		
5	0.2502	0.0174	0.057273	0.03990	99.89		
6	0.2507	0.0175	0.058500	0.03990	102.88		

结果显示，芦荟大黄素回收率为 95.05%，大黄酸回收率为 88.68%，大黄素回收率为 101.25%，大黄酚回收率为 98.83%，大黄素甲醚回收率为 101.53%，根据中国药典 2015 年版“药品质量标准分析方法验证指导原则”规定样品中待测成分含量在 0.001%~0.01%时，回收率限度为 80%~115%，该方法准确度良好。

1.1.8 耐用性考察

(1) 不同色谱柱考察

选用三种色谱柱，分别是菲罗门 Kinetex-EVO C18 色谱柱（4.6mm×150mm，5μm；编号：JS-091），Waters HSS T3 色谱柱（4.6mm×150mm，5μm；编号：JS-136），Waters X-bridge C18 色谱柱（4.6mm×150mm，5μm；编号：JS-154）。

取游离蒽醌供试品溶液、总蒽醌供试品溶液各 10μL，分别采用以上三种色谱柱进行测定，计算游离蒽醌及总蒽醌含量及 RSD 值，实验结果见表 19。

表 19 化湿败毒组合物总/游离蒽醌含量测定不同色谱柱考察结果表

色谱柱	游离蒽醌含量（mg/g）	总蒽醌含量（mg/g）
JS-091	0.297	0.615
JS-154	0.283	0.665
JS-136	0.313	0.645
RSD（%）	5.0	3.9

结果显示，各色谱柱分离效果良好，含量 RSD 值≤5%，表明该分析方法在

不同色谱柱下分析耐用性良好。

(2) 不同柱温考察

分别设定柱温为 28℃、30℃和 32℃，考察柱温对对化湿败毒组合物游离蒽醌含量及总蒽醌含量测定的影响。

取游离蒽醌供试品溶液、总蒽醌供试品溶液各 10μL，分别采用以上柱温进行测定，计算游离蒽醌及总蒽醌含量及 RSD 值，实验结果见表 20。

表 20 化湿败毒组合物总/游离蒽醌含量测定不同柱温考察结果表		
柱温 (°C)	游离蒽醌含量 (mg/g)	总蒽醌含量 (mg/g)
28	0.261	0.596
30	0.283	0.665
32	0.299	0.578
RSD (%)	6.8	7.5

结果显示，同柱温的化湿败毒组合物游离蒽醌及总蒽醌含量值，其 RSD 值均大于 5%，表明该分析方法对柱温较为敏感，因此，严格控制柱温在 30℃。

(3) 不同流速考察

分别设定流速为 0.7mL/min、0.8mL/min 和 0.9mL/min，考察流速对对化湿败毒组合物游离蒽醌含量及总蒽醌含量测定的影响。

取游离蒽醌供试品溶液、总蒽醌供试品溶液各 10μL，分别采用以上流速进行测定，计算游离蒽醌及总蒽醌含量及 RSD 值，实验结果见表 21。

表 21 化湿败毒组合物总/游离蒽醌含量测定不同流速考察结果表		
流速 (mL/min)	游离蒽醌含量 (mg/g)	总蒽醌含量 (mg/g)
0.7	0.279	0.621
0.8	0.283	0.665
0.9	0.285	0.655
RSD (%)	1.1	3.6

结果显示，三种不同流速的化湿败毒组合物游离蒽醌及总蒽醌含量值，其 RSD 值均小于 5%。但当流速为 0.7mL/min 时，总蒽醌中的大黄素甲醚出现裂峰，建议分析时控制流速应不低于 0.8mL/min。

1.1.9 不同批次化湿败毒组合物供试品的含量测定

取 10 批化湿败毒组合物，分别制备游离蒽醌供试品溶液及总蒽醌供试品溶液，并测定 10 批化湿败毒组合物中游离蒽醌含量及总蒽醌含量，并计算结合蒽醌含量；实验结果见表 22。

表 22 化湿败毒组合物结合蒽醌含量测定结果表			
批号	游离蒽醌 (mg/g)	总蒽醌 (mg/g)	结合蒽醌 (mg/g)
S1	0.202	0.445	0.243
S2	0.153	0.456	0.303
S3	0.105	0.284	0.179
S4	0.241	0.494	0.253
S5	0.248	0.441	0.193
S6	0.240	0.443	0.203
S7	0.235	0.534	0.299
S8	0.232	0.528	0.296
S9	0.244	0.560	0.316
S10	0.233	0.541	0.308

1.2 盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱总含量的测定方法

1.2.1 测定方法

本发明通过高效液相色谱法测定化湿败毒组合物中的盐酸麻黄碱含量和盐酸伪麻黄碱的总含量。具体的，测定方法包括：

(1) 色谱条件：以极性乙醚连接苯基键合硅胶为填充剂，以甲醇-0.092 vol% 磷酸（含 0.04 vol%三乙胺和 0.02 vol%二乙胺）（1.5：98.5）的混合溶液为流动相，流速为 0.8mL/min，检测波长为 210nm，柱温为 35℃，理论板数按盐酸麻黄碱计算不低于 3000。

需要说明的是，一般在测定麻黄中盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱含量时，采用甲醇与 0.092 vol%磷酸（含 0.04%三乙胺和 0.02%二正丁胺）（1.5：98.5）的混合溶液作为流动相，本发明将二正丁胺替换为二乙胺。实验表明，本发明中的流动相对目标物质的保留能力更强，可有效延长保留时间，优化盐酸麻黄碱峰和盐酸伪麻黄碱峰分离效果（图 16）。

(2) 麻黄碱供试品溶液制备：取约 0.5g 化湿败毒组合物，研细，称定，置具塞锥形瓶中，加入 0.1mol/L 盐酸溶液 50mL，密塞，称定重量，超声处理（功

率 250W，频率 40kHz) 30 分钟，放冷，再称定重量，用 0.1mol/L 盐酸溶液补足减失的重量，摇匀，离心 5 分钟（每分钟 4000 转），取上清液，滤过，量取续滤液 25mL，加在固相萃取柱（以混合型阳离子交换反相吸附剂为填充剂，150mg，6mL，用甲醇、水各 6mL 预洗）上，依次用 0.1mol/L 盐酸溶液、甲醇各 6mL 洗脱，弃去洗脱液，继用新制的乙腈-浓氨试液（95:5）混合溶液 10mL 洗脱，收集洗脱液置 10mL 量瓶中，加上述混合溶液稀释至刻度，摇匀，即得；

(3) 麻黄碱对照品溶液制备：取盐酸麻黄碱对照品、盐酸伪麻黄碱对照品适量，称定，加甲醇分别制成每 1mL 各含 10μg 的混合溶液，即得；

(4) 吸取步骤 (2) 和 (3) 所制备的麻黄碱供试品溶液、麻黄碱对照品溶液各 10μL，注入液相色谱仪，测定得到化湿败毒组合物中盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的总含量。

以下对本发明中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱的测定方法进行方法学验证：

1.2.2 专属性考察

取麻黄阴性样品按麻黄碱供试品溶液制备方法分别制备麻黄碱阴性样品溶液；将麻黄碱供试品溶液、麻黄碱阴性样品溶液、麻黄碱对照品溶液各 10μL 分别注入液相色谱仪，进行测试，其结果参见图 17~图 19。其中，各个对照品的出峰位置如下表所示：

表 23 化湿败毒组合物盐酸麻黄碱/盐酸伪麻黄碱含量测定专属性试验结果

名称	样品名称	保留时间 (min)	面积 (μV·s)	高度 (μV)	理论塔板数
盐酸麻黄碱	对照品溶液	11.385	285600	14482	7092
	供试品溶液	11.578	313434	24718	19516
	阴性样品	11.731	/	/	/
盐酸伪麻黄碱	对照品溶液	13.055	298993	13565	7515
	供试品溶液	13.207	368439	25660	19449
	阴性样品	13.460	/	/	/

从图 17~图 19 和表 23 可以看出，麻黄碱阴性样品溶液在盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的相应保留时间无明显的色谱峰，故无干扰，该方法专属性良好。

1.2.3 线性关系考察

取盐酸麻黄碱对照品 2.115mg、盐酸伪麻黄碱对照品 2.196mg，置于 10mL

量瓶中，加甲醇制成每 1mL 含盐酸麻黄碱 211.500μg、盐酸伪麻黄碱 219.161μg 的混合对照品贮备溶液；精密量取不同体积上述对照品贮备溶液，逐级稀释，得到不同浓度级别盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱的混合对照品溶液。

分别精密吸取不同浓度盐酸麻黄碱对照品溶液（每 1mL 中含盐酸麻黄碱分别为 1.058μg、2.115μg、4.230μg、10.575μg、21.150μg、52.875μg、105.750μg，盐酸伪麻黄碱分别为 1.096μg、2.192μg、4.383μg、10.958μg、21.916μg、54.790μg、109.580μg）10μL 进行色谱测定，按上述色谱条件测定峰面积，并以峰面积（y）对盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱（x）进行回归，绘制标准曲线，其结果如图 19、20 所示。

由图 19 可以看出，盐酸麻黄碱的线性曲线为： $y=26,038.4703x+198.2720$ ， $R^2=0.9999$ ；

由图 20 可以看出，盐酸伪麻黄碱的线性曲线为： $y=26,339.9956x-1,062.3701$ ， $R^2=1.0000$ ；

结果表明盐酸麻黄碱在 1.058~105.750μg/mL 浓度范围内，峰面积与浓度线性关系良好；盐酸伪麻黄碱在 1.096~109.580μg/mL 浓度范围内，峰面积与浓度线性关系良好。

1.2.4 精密度考察

精密吸取麻黄碱对照品溶液（盐酸麻黄碱浓度为：10.575μg/mL；盐酸伪麻黄碱浓度为：10.958μg/mL）10μL 重复进样 6 次，以盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱峰面积计算，测定结果见表 24。

表 24 化湿败毒组合物盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱总含量测定精密度试验结果

序号	盐酸麻黄碱峰面积	盐酸伪麻黄碱峰面积
1	292091	302935
2	287501	296438
3	299576	307634
4	296466	302093
5	294594	302923
6	302215	311631
RSD (%)	1.78	1.71

结果显示，同一份麻黄碱对照品溶液连续进样 6 次，各指标峰面积 RSD 值

均<2.0%，说明仪器精密度良好。

1.2.5 稳定性考察

精密吸取同一麻黄碱供试品溶液 10μL，分别于 0，2，4，8，12，14h 进样 1 次，测定盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱的峰面积，计算峰面积 RSD 值，结果见表 25。

表 25 化湿败毒组合物盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱总含量测定稳定性试验结果

时间	盐酸麻黄碱	盐酸伪麻黄碱
0h	313091	363362
2h	317516	371638
4h	320644	374812
8h	320237	371977
12h	319730	368706
14h	313434	368439
RSD (%)	1.08	1.07

从表中可以看出，盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱的相对标准偏差 RSD (n=6) 分别为 1.08%、1.07%，均小于 3.0%，表明样品 14 小时内稳定性良好。

1.2.6 重复性考察

取同批样品制备麻黄碱供试品溶液，进行测定。计算盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱含量及 RSD 值，结果见表 26。

表 26 化湿败毒组合物盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱总含量测定重复性试验 (n=2)

序号	盐酸麻黄碱 (mg/g)	盐酸伪麻黄碱 (mg/g)
1	0.471	0.553
2	0.470	0.552
3	0.469	0.555
4	0.480	0.565
5	0.482	0.568
6	0.479	0.563
平均值	0.475	0.559
RSD (%)	1.22	1.21

结果显示，盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱含量的相对标准偏差 RSD 均小于 2.0%，表明该方法重复性良好。

1.2.7 准确度考察

采用加样回收法，取已知含量的样品约 0.25g，精密称定，平行称定 9 份，3 份一组，分别按照样品含量 0.5:1.0、1.0:1.0、1.5:1.0 加入盐酸麻黄碱及盐酸伪麻黄碱对照品，按麻黄碱供试品制备方法制备麻黄碱供试品溶液 9 份，并分别测定，计算加样回收率，结果见表 27。

表 27 化湿败毒组合物盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱总含量测定加样回收率考察结果表

成分	序号	样重 (g)	样品中的量 (mg)	加入量 (mg)	检出量 (mg)	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
盐酸麻黄碱	1	0.2519	0.120	0.063	0.178	93.02	94.96	2.66
	2	0.2536	0.120	0.063	0.182	97.31		
	3	0.2576	0.122	0.063	0.179	90.30		
	4	0.2546	0.121	0.125	0.238	93.32		
	5	0.2506	0.119	0.125	0.237	94.03		
	6	0.2566	0.122	0.125	0.244	97.34		
	7	0.2580	0.123	0.188	0.305	96.96		
	8	0.2508	0.119	0.188	0.298	94.79		
	9	0.2514	0.119	0.188	0.303	97.56		
盐酸伪麻黄碱	1	0.2519	0.141	0.072	0.210	95.76	96.59	2.24
	2	0.2536	0.142	0.072	0.214	100.01		
	3	0.2576	0.144	0.072	0.211	92.71		
	4	0.2546	0.142	0.143	0.279	94.92		
	5	0.2506	0.140	0.143	0.278	95.78		
	6	0.2566	0.143	0.143	0.284	97.63		
	7	0.2580	0.144	0.216	0.354	96.97		
	8	0.2508	0.140	0.210	0.344	96.67		
	9	0.2514	0.141	0.211	0.349	98.89		

从表中可以看出，盐酸麻黄碱的平均加样回收率为 94.96%，盐酸伪麻黄碱

的平均加样回收率为 96.59%，符合中国药典的相关规定，本发明的测定方法准确度良好。

1.2.8 不同批次化湿败毒组合物供试品的测定

取 3 批化湿败毒组合物，分别制备供试品，并精密吸取麻黄碱供试品溶液 10μL，测定盐酸麻黄碱含量、盐酸伪麻黄碱含量，并计算总含量，结果如表 28 所示。

表 28 不同批次化湿败毒组合物中盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱总含量测定结果(n=2)

批号	含量 (mg/g)		总和 (mg/g)
	盐酸麻黄碱	盐酸伪麻黄碱	盐酸麻黄碱+盐酸伪麻黄碱
S8	0.554	0.658	1.212
S9	0.594	0.698	1.292
S10	0.568	0.667	1.235

1.3 芍药苷含量的测定方法

1.3.1 测定方法

本发明通过高效液相色谱法测定化湿败毒组合物中的芍药苷的含量。具体的，测定方法包括：

(1) 色谱条件：以十八烷基键合硅胶为填充剂,以甲醇-0.05mol/L 磷酸二氢钾溶液(35:65)为流动相，流速为 1.0 mL/min，检测波长为 230nm，柱温为 30℃；

(2) 芍药苷供试品溶液制备：取约 1.0g 化湿败毒组合物，称定，置具塞锥形瓶中，加入甲醇 25mL，称定重量，加热回流 30 分钟，放冷，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得；

(3) 芍药苷对照品溶液制备：取芍药苷对照品适量，称定，加甲醇制成每 1mL 含 0.13mg 的溶液，即得；

(4) 吸取步骤 (2) 和 (3) 所制备的芍药苷供试品溶液、芍药苷对照品溶液各 10μL，注入液相色谱仪，测定得到化湿败毒组合物中芍药苷的含量。

以下对本发明中芍药苷的测定方法进行方法学验证：

1.3.2 专属性考察

取赤芍阴性样品按芍药苷供试品溶液制备方法制备芍药苷阴性样品溶液；将芍药苷供试品溶液、芍药苷对照品溶液、芍药苷阴性试品溶液各 10μL 分别注

入液相色谱仪，进行测试，其结果参见图 22~图 24。由图中可以看出，芍药苷阴性样品溶液在与芍药苷相同的保留时间无明显的色谱峰，故认为阴性无干扰。

1.3.3 线性关系考察

取芍药苷对照品适量，精密称定，加甲醇制成每 1mL 含 0.53mg 的芍药苷对照品溶液。将溶液稀释 2、4、8、16、32、64 倍，制成系列不同浓度的芍药苷对照品溶液。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，计算得出回归方程，结果见图 25。

芍药苷的线性曲线为： $y=12,804,471.2418x-1,628.2577$ ， $R^2=0.9996$ ；峰面积与浓度线性关系良好。

1.3.4 精密度考察

精密吸取芍药苷对照品溶液 10 μL，重复进样测定 6 次，以芍药苷峰面积计算偏差，测定结果见表 29。

表 29 化湿败毒组合物芍药苷含量测定精密度试验结果			
编号	峰面积	均值	RSD (%)
1	1716712	1709821	1.08
2	1726584		
3	1719349		
4	1723590		
5	1686364		
6	1686326		

结果表明，相对标准偏差为 1.08%，表明仪器精密度良好。

1.3.5 稳定性考察

精密吸取同一芍药苷供试品溶液 10μL，分别于 0，4，8，12，18，24h 进样 1 次，测定芍药苷的峰面积，计算相对标准偏差，其结果见表 30。

表 30 化湿败毒组合物芍药苷含量测定稳定性试验结果			
时间 (h)	峰面积	均值	RSD(%)
0	2257654	2265685	0.84
4	2256174		
8	2253862		

12	2254709
18	2269094
24	2302619

结果表明，相对标准偏差为 0.84%，表明芍药苷供试品溶液在 24h 内稳定。

1.3.6 重复性试验

取同一批样品按芍药苷供试品溶液制备方法制成 6 份芍药苷供试品溶液，进行测定，求芍药苷含量的相对标准偏差，结果见表 31。

表 31 化湿败毒组合物芍药苷含量测定重复性试验结果

编号	峰面积	含量 (mg/g)	均值	RSD (%)
1	2224804	4.31	4.40	1.10
2	2266635	4.38		
3	2273537	4.40		
4	2302670	4.45		
5	2283757	4.40		
6	2295827	4.43		

结果表明，相对标准偏差为 1.1%，远小于标准要求的 5%，可见本发明芍药苷测定方法重复性良好。

1.3.7 准确度考察

采用加样回收法，取 0.5g 的样品，按 1:1 的比例分别加入芍药苷对照品溶液，按芍药苷供试品溶液的制备方法制样，平行 6 份进行测定，并计算加样回收率。结果见表 32。

表 32 化湿败毒组合物芍药苷含量测定准确度试验结果

序号	峰面积	测得量 (mg)	样品 (mg)	对照品 (mg)	回收率 (%)	均值	RSD (%)
1	2239653	4.34	2.20	2.20	97.27	98.86	2.69
2	2257450	4.37	2.20	2.20	98.64		
3	2263223	4.38	2.21	2.20	98.64		
4	2217293	4.29	2.20	2.20	95.00		
5	2287294	4.43	2.20	2.20	101.36		

6	2300603	4.45	2.20	2.20	102.27
---	---------	------	------	------	--------

从表中可以看出，芍药苷的平均加样回收率为 98.86%，符合中国药典的相关规定，本发明的测定方法准确度良好。

1.3.8 不同批次化湿败毒组合物供试品的测定

取 3 批化湿败毒组合物，分别制备芍药苷供试品溶液，并精密吸取芍药苷供试品溶液 10μL，测定芍药苷的含量，结果如表 33 所示。

表 33 不同批次化湿败毒组合物芍药苷含量测定结果

批号	芍药苷含量 (mg/g)
S8	4.00
S9	4.20
S10	4.20

二、化湿败毒组合物的薄层色谱鉴别方法

2.1 麻黄的薄层色谱鉴别方法

2.1.1 鉴别方法、

(1)麻黄供试品溶液制备:取化湿败毒组合物 5g,研细,加浓氨试液 3~5mL 使润湿,再加三氯甲烷 25mL,加热回流 30 分钟,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 1mL 使溶解,即得;

(2)麻黄对照品溶液制备:取盐酸麻黄碱对照品,加甲醇制成每 1mL 含 1mg 的溶液,即得;

(3)吸取上述两种溶液各 3μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-浓氨试液(20: 5: 0.5)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以茚三酮试液,加热至斑点显色清晰;供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。

2.1.2 方法学验证

(1)专属性

取麻黄阴性样品按照麻黄供试品溶液制备方法制备缺麻黄阴性样品溶液;将 3μL 麻黄供试品溶液、3μL 缺麻黄阴性样品溶液、3μL 麻黄对照品溶液点样于同一硅胶 G 薄层板(海洋硅胶 G 板)上,以三氯甲烷-甲醇-浓氨试液(20: 5: 0.5)为展开剂,在常温常湿(T: 21.1℃, RH: 47%)条件下展开,取出,晾干,

喷以茛三酮试液，加热至斑点显色清晰，在日光下检视。实验结果见图 26。由图中可以看出，本发明的薄层色谱鉴别方法阴性无干扰，方法专属性良好。

(2) 耐用性考察：

1) 不同温度的比较

分别吸取 3 μ L 麻黄供试品溶液、3 μ L 麻黄对照品溶液点样于同一硅胶 G 薄层板（海洋硅胶 G 板）上，以三氯甲烷-甲醇-浓氨试液（20：5：0.5）为展开剂，分别在常温（T：21.1℃，RH：47%）和低温（T：6.4℃，RH：90%）条件下展开，取出，晾干，喷以茛三酮试液，加热至斑点显色清晰，在日光下检视。实验结果见图 27 和图 28。

由图 27 和图 28 可见，在常温和低温条件下，分离效果均较好，且化湿败毒组合物色谱在与对照品色谱相应的位置处，均显示相同颜色的主斑点。实验结果表明，温度对化湿败毒组合物中麻黄的薄层鉴别影响较小，说明该薄层鉴别方法对不同温度耐用性好。

2) 不同湿度的比较

分别吸取 3 μ L 麻黄供试品溶液、3 μ L 麻黄对照品溶液点样于同一硅胶 G 薄层板（海洋硅胶 G 板）上，以三氯甲烷-甲醇-浓氨试液（20：5：0.5）为展开剂，分别在常湿（T：21.1℃，RH：47%）、低湿（T：21.1℃，RH：36%）和高湿（T：21.1℃，RH：79%）条件下展开，取出，晾干，喷以茛三酮试液，加热至斑点显色清晰，在日光下检视。实验结果见图 27、图 29 和图 30。

由图 27、图 29 和图 30 可见，常湿、低湿和高湿条件下，分离效果均较好，且化湿败毒组合物色谱在与对照品色谱相应的位置处，显示相同颜色的主斑点。实验结果表明，湿度对化湿败毒组合物中麻黄的薄层鉴别影响较小，说明该薄层鉴别方法对不同湿度耐用性好。

3) 不同点样量的比较

分别吸取麻黄供试品溶液、麻黄对照品溶液点样于同一硅胶 G 薄层板（海洋硅胶 G 板）上，以三氯甲烷-甲醇-浓氨试液（20：5：0.5）为展开剂，展开，取出，晾干，喷以茛三酮试液，加热至斑点显色清晰，在日光下检视。实验结果见图 31。

由图 31 可见，当麻黄供试品溶液点样量为 3 μ L、麻黄对照品溶液点样量为 3 μ L 时，供试品色谱在与对照品色谱相应的位置处主斑点清晰，无其他干扰。因

此，本发明的麻黄鉴别方法选择麻黄供试品溶液点样量为 3 μ L、麻黄对照品溶液点样量为 3 μ L。

4) 不同厂家薄层板的比较

分别吸取 3 μ L 麻黄供试品溶液、3 μ L 麻黄对照品溶液点样于不同厂家硅胶 G 薄层板（海洋硅胶 G 板、谱科硅胶 G 板、默克硅胶 G 板）上，以三氯甲烷-甲醇-浓氨试液（20: 5: 0.5）为展开剂，分别在同一温湿度（T: 21.1 $^{\circ}$ C, RH: 47%）条件下展开，取出，晾干，喷以茚三酮试液，加热至斑点显色清晰，在日光下檢視。实验结果见图 27、图 32 和图 33。

其中，海洋硅胶 G 板为青岛海洋化工有限公司生产的薄层板；谱科硅胶 G 板为青岛谱科分离材料有限公司生产的薄层板；默克硅胶 G 板为默克股份有限公司生产的薄层板；上述薄层板的规格均为 10cm $\times$ 10cm，厚度为 0.20~0.25mm。

结果表明：不同厂家硅胶 G 薄层板（海洋硅胶 G 板、谱科硅胶 G 板、默克硅胶 G 板）对化湿败毒组合物中麻黄的薄层鉴别无显著影响，说明该薄层鉴别方法对不同厂家硅胶 G 薄层板的耐用性良好。

2.2 甘草的薄层色谱鉴别方法

2.2.1 鉴别方法

（1）甘草供试品溶液制备：取化湿败毒组合物 5g，研细，加乙醚 40mL，加热回流 1 小时，滤过，弃去醚液，残渣加甲醇 30mL，加热回流 1 小时，滤过，滤液蒸干，残渣加水 40mL 使溶解，用正丁醇振摇提取 3 次，每次 20mL，合并正丁醇液，用水洗涤 3 次，弃去水液，正丁醇液蒸干，残渣加甲醇 5mL 使溶解，即得；

（2）甘草对照药材溶液制备：取甘草对照药材 1g，采用甘草供试品溶液制备方法制备，即得；

（3）吸取上述两种溶液各 4 μ L，分别点于同一用 1%氢氧化钠溶液制备的硅胶 G 薄层板上，以乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水(15: 1: 1: 2)为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 10%硫酸乙醇溶液，在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰；供试品色谱中，在与对照药材色谱相应的位置上，显相同颜色的斑点。

2.2.2 方法学验证

（1）专属性考察

取甘草阴性样品按照甘草供试品溶液制备方法制备缺甘草阴性样品溶液；

将 4 μ L 甘草试品溶液、4 μ L 甘草对照药材溶液、4 μ L 缺甘草阴性样品溶液分别点样于同一硅胶 G 薄层板(海洋硅胶 G 板)上,以乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水(15: 1: 1: 2)为展开剂,在常温常湿(T: 21.1°C, RH: 47%)条件下展开,取出,晾干,喷以 10%硫酸乙醇溶液,在 105°C 加热至斑点显色清晰,在日光下检视。实验结果见图 34。由图中可以看出,本发明的薄层色谱鉴别方法阴性无干扰,方法专属性良好。

(2) 耐用性考察

1) 不同温度的比较

分别吸取 4 μ L 甘草供试品溶液、4 μ L 甘草对照药材溶液点样于同一硅胶 G 薄层板(海洋硅胶 G 板)上,以乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水(15: 1: 1: 2)为展开剂,分别在常温(T: 21.1°C, RH: 47%)和低温(T: 6.4°C, RH: 90%)条件下展开,取出,晾干,喷以 10%硫酸乙醇溶液,在 105°C 加热至斑点显色清晰,在日光下检视。实验结果见图 35 和图 36。

由图 35 和图 36 可见,在常温和低温条件下,分离效果均较好,且化湿败毒组合物色谱在与对照品色谱相应的位置处,均显示相同颜色的主斑点。实验结果表明,温度对化湿败毒组合物中甘草的薄层鉴别影响较小,说明该薄层鉴别方法对不同温度耐用性好。

2) 不同湿度的比较

分别吸取 4 μ L 甘草供试品溶液、4 μ L 甘草对照药材溶液点样于同一硅胶 G 薄层板(海洋硅胶 G 板)上,以乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水(15: 1: 1: 2)为展开剂,分别在常湿(T: 21.1°C, RH: 47%)、低湿(T: 21.1°C, RH: 36%)和高湿条件(T: 21.1°C, RH: 79%)下展开,取出,晾干,喷以 10%硫酸乙醇溶液,在 105°C 加热至斑点显色清晰,在日光下检视。实验结果见图 35、图 37 和图 38:

由图 35、图 37 和图 38 可见,常湿、低湿和高湿条件下,分离效果均较好,且化湿败毒组合物色谱在与对照品色谱相应的位置处,显示相同颜色的主斑点。实验结果表明,湿度对化湿败毒组合物中甘草的薄层鉴别影响较小,说明该薄层鉴别方法对不同湿度耐用性好。

3) 不同点样量的比较

分别吸取甘草供试品溶液、甘草对照药材溶液点样于同一硅胶 G 薄层板(海

洋硅胶 G 板) 上, 以乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水 (15: 1: 1: 2) 为展开剂, 在常温常湿 (T: 21.1°C, RH: 47%) 条件下展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105°C 加热至斑点显色清晰, 在日光下检视。实验结果见图 39。

由图 39 可见, 当甘草供试品溶液点样量为 4 μ L、甘草对照药材溶液点样量为 4 μ L 时, 供试品色谱在与对照品色谱相应的位置处主斑点清晰, 无其他干扰。因此, 本发明的甘草鉴别方法选择甘草供试品溶液点样量为 4 μ L、甘草对照药材溶液点样量为 4 μ L。

4) 不同厂家薄层板的比较

分别吸取甘草供试品溶液、甘草对照药材溶液点样于不同厂家硅胶 G 薄层板 (海洋硅胶 G 板、谱科硅胶 G 板、默克硅胶 G 板) 上, 以乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水 (15: 1: 1: 2) 为展开剂, 在常温常湿条件下 (T: 21.1°C, RH: 47%) 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105°C 加热至斑点显色清晰, 在日光下检视。实验结果见图 35、图 40 和图 41。

其中, 海洋硅胶 G 板为青岛海洋化工有限公司生产的薄层板; 谱科硅胶 G 板为青岛谱科分离材料有限公司生产的薄层板; 默克硅胶 G 板为默克股份有限公司生产的薄层板; 上述薄层板的规格均为 10cm $\times$ 10cm, 厚度为 0.20~0.25mm。

结果表明: 不同厂家硅胶 G 薄层板 (海洋硅胶 G 板、谱科硅胶 G 板、默克硅胶 G 板) 对化湿败毒组合物中甘草的薄层鉴别无显著影响, 说明该薄层鉴别方法对不同厂家硅胶 G 薄层板的耐用性良好。

2.3 厚朴的薄层色谱鉴别方法

2.3.1 鉴别方法

(1) 厚朴供试品溶液制备: 取化湿败毒组合物 5g, 研细, 加甲醇 20mL, 超声处理 30 分钟, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 40mL 使溶解, 用乙酸乙酯振摇提取 2 次, 每次 30mL, 合并乙酸乙酯液, 蒸干, 残渣加甲醇 1mL 使溶解, 即得;

需要说明的是, 传统的厚朴供试品溶液制备方法, 一般仅采用甲醇提取, 而本发明增加了乙酸乙酯提取工序, 其可更好地除去化湿败毒组合物中的其他杂质, 去除对目标斑点 (厚朴酚、和厚朴酚) 的干扰。

(2) 厚朴酚对照品溶液制备: 取厚朴酚对照品, 加甲醇制成每 1mL 含 1mg 的溶液, 即得;

(3) 和厚朴酚对照品溶液制备：取和厚朴酚对照品，加甲醇制成每 1mL 含 1mg 的溶液，即得；

(4) 吸取上述三种溶液各 4 μ L，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以甲苯-乙酸乙酯-甲醇(17: 3: 3)为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 5%香草醛硫酸溶液，加热至斑点显色清晰；供试品色谱中，在与对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的斑点。

2.3.2 方法学验证

(1) 专属性

取厚朴阴性样品按照厚朴供试品溶液制备方法制备缺厚朴阴性样品溶液；分别吸取 4 μ L 厚朴供试品溶液、4 μ L 厚朴酚对照品溶液、4 μ L 和厚朴酚对照品溶液和 4 μ L 缺厚朴阴性样品溶液，点样于同一硅胶 G 薄层板（默克硅胶 G 板）上，以甲苯-乙酸乙酯-甲醇（17: 3: 3）为展开剂，在常温常湿（T: 26.1℃，RH: 48%）条件下展开，取出，晾干，喷以 5%香草醛硫酸溶液，加热至斑点显色清晰，在日光下检视。实验结果见图 42。由图中可以看出，本发明的薄层色谱鉴别方法阴性无干扰，方法专属性良好。

(2) 耐用性考察：

1) 不同温度的比较

分别吸取 4 μ L 厚朴供试品溶液、4 μ L 厚朴酚对照品溶液、4 μ L 和厚朴酚对照品溶液点样于同一硅胶 G 薄层板（默克硅胶 G 板）上，以甲苯-乙酸乙酯-甲醇（17: 3: 3）为展开剂，分别在常温（T: 26.1℃，RH: 48%）和低温（T: 3.1℃，RH: 91%）条件下展开，取出，晾干，喷以 5%香草醛硫酸溶液，加热至斑点显色清晰，在日光下检视。实验结果见图 43 和图 44。

由图 43 和图 44 可见，在常温和低温条件下，分离效果均较好，且化湿败毒组合色谱在与对照品色谱相应的位置处，均显示相同颜色的主斑点。实验结果表明，温度对化湿败毒组合中厚朴的薄层鉴别影响较小，说明该薄层鉴别方法对不同温度耐用性好。

2) 不同湿度的比较

分别吸取 4 μ L 厚朴供试品溶液、4 μ L 厚朴酚对照品溶液、4 μ L 和厚朴酚对照品溶液点样于同一硅胶 G 薄层板（默克硅胶 G 板）上，以甲苯-乙酸乙酯-甲醇（17: 3: 3）为展开剂，分别在常湿（T: 26.1℃，RH: 48%）、低湿（T: 26.1℃，

RH: 36%) 和高湿条件 (T: 26.1°C, RH: 78%) 下展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 香草醛硫酸溶液, 加热至斑点显色清晰, 在日光下检视。实验结果见图 43、图 45 和图 46。

由图 43、图 45 和图 46 可见, 常湿、低湿和高湿条件下, 分离效果均较好, 且化湿败毒组合物色谱在与对照品色谱相应的位置处, 显示相同颜色的主斑点。实验结果表明, 湿度对化湿败毒组合物中厚朴的薄层鉴别影响较小, 说明该薄层鉴别方法对不同湿度耐用性好。

3) 不同点样量的比较

分别吸取厚朴供试品溶液、厚朴酚对照品溶液、和厚朴酚对照品溶液点样于同一硅胶 G 薄层板 (默克硅胶 G 板) 上, 以甲苯-乙酸乙酯-甲醇 (17: 3: 3) 为展开剂, 在常温常湿 (T: 26.1°C, RH: 48%) 条件下展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 香草醛硫酸溶液, 加热至斑点显色清晰, 在日光下检视。实验结果见图 47。

由图 47 可见, 当厚朴供试品溶液点样量为 4 μ L、厚朴酚对照品溶液点样量为 4 μ L、和厚朴酚对照品溶液点样量为 4 μ L 时, 供试品色谱在与对照品色谱相应的位置处主斑点清晰, 无其他干扰。因此, 本发明的厚朴鉴别方法选择厚朴供试品溶液点样量为 4 μ L、厚朴酚对照品溶液点样量为 4 μ L、和厚朴酚对照品溶液点样量为 4 μ L。

4) 不同厂家薄层板的比较

分别吸取 4 μ L 厚朴供试品溶液、4 μ L 厚朴酚对照品溶液、4 μ L 和厚朴酚对照品溶液点样于不同厂家硅胶 G 薄层板 (海洋硅胶 G 板、谱科硅胶 G 板、默克硅胶 G 板) 上, 以甲苯-乙酸乙酯-甲醇 (17: 3: 3) 为展开剂, 在常温常湿 (T: 26.1°C, RH: 48%) 条件下展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 香草醛硫酸溶液, 加热至斑点显色清晰, 在日光下检视。其结果见图 43、图 48 和图 49。

其中, 海洋硅胶 G 板为青岛海洋化工有限公司生产的薄层板; 谱科硅胶 G 板为青岛谱科分离材料有限公司生产的薄层板; 默克硅胶 G 板为默克股份有限公司生产的薄层板; 上述薄层板的规格均为 10cm $\times$ 10cm, 厚度为 0.20~0.25mm。

结果表明: 不同厂家硅胶 G 薄层板 (海洋硅胶 G 板、谱科硅胶 G 板、默克硅胶 G 板) 对化湿败毒组合物中厚朴的薄层鉴别无显著影响, 说明该薄层鉴别方法对不同厂家硅胶 G 薄层板的耐用性良好。

2.4 黄芪的薄层色谱鉴别方法

2.4.1 鉴别方法

(1) 黄芪供试品溶液制备：取化湿败毒组合物适量，研细，取约 5g，加甲醇 30mL，超声处理 30 分钟，放冷，滤过，滤液蒸干，残渣加水 20mL 使溶解，用水饱和正丁醇振摇提取 2 次，每次 20mL，合并正丁醇液，用氨试液洗涤 2 次，每次 20mL，弃去氨试液，正丁醇液蒸干，残渣加甲醇 1mL 使溶解，即得。

(2) 黄芪对照品溶液制备：取黄芪甲苷对照品，加甲醇制成每 1mL 含 1mg 的溶液，即得。

(3) 分别吸取上述黄芪供试品溶液 5~8 μ L，黄芪对照品溶液 2 μ L，点样于同一硅胶 G 薄层板上，以三氯甲烷-甲醇-水 (13:7:2) 的下层溶液为展开剂，在 4~10 $^{\circ}$ C 条件下展开，取出，晾干，喷以 10% 硫酸乙醇溶液，在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰，在紫外光 (365nm) 下检视。供试品色谱中，在与对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的荧光斑点；

2.4.2 方法学验证

(1) 专属性考察

取黄芪阴性样品按照黄芪供试品溶液制备方法制备缺黄芪阴性样品溶液；将供试品溶液、缺黄芪阴性样品溶液、黄芪对照品溶液点样于同一硅胶 G 薄层板（默克硅胶 G 板）上，按拟定的方法进行试验。结果见图 50，由图中可以看出，本发明的薄层色谱鉴别方法阴性无干扰，方法专属性良好。

(2) 耐用性考察

1) 不同温度的比较

取点样后的硅胶 G 板（默克硅胶 G 板），在常温 (T: 25 $^{\circ}$ C, RH: 75%)、低温 (T: 9 $^{\circ}$ C, RH: 89%) 的环境下展开，按照拟定方法进行检视，结果见图 26 和图 27。结果表明，在常温下，供试品色谱和对照品色谱中斑点的 R_f 值过高，且分离度较差 (图 51)；而在低温下，供试品色谱斑点 R_f 值适中，分离良好 (图 52)，与对照品色谱相应的位置斑点对应良好。因此，本发明方法中确定展开温度为 4~10 $^{\circ}$ C。

2) 不同湿度的比较

取点样后的硅胶 G 板（默克硅胶 G 板）上，分别低温低湿 (T: 8.9 $^{\circ}$ C, RH: 41%)、低温高湿 (T: 8.9 $^{\circ}$ C, RH: 92%) 环境下展开，按拟定方法进行检视，结果见图 53 和图 54；结果表明，湿度对化湿败毒组合物中黄芪的薄层鉴别影响

较小,说明该薄层鉴别方法对不同湿度耐用性好。

3) 不同点样量的比较

取黄芪供试品溶液、黄芪对照品溶液以不同体积点样于同一硅胶 G 薄层板(默克硅胶 G 板)上,按拟定的方法进行试验。结果见图 55,从图中可以看出,当黄芪供试品溶液点样量为 5~8 μ L,黄芪对照品溶液点样量为 2~3 μ L 时,供试品色谱中与对照品相应位置荧光斑点清晰。因此,本发明方法中,选择点样量为黄芪供试品溶液 5~8 μ L,黄芪对照品溶液 2~3 μ L。

4) 不同薄层板的比较

取黄芪供试品溶液、黄芪对照品溶液点样于不同厂家硅胶 G 薄层板(默克硅胶 G 板、海洋硅胶 G 板、银龙硅胶 G 板)上,按拟定方法进行试验,结果见图 52、图 56、图 57。

其中,默克硅胶 G 板为默克股份有限公司生产的薄层板;海洋硅胶 G 板为青岛海洋化工有限公司生产的薄层板;银龙硅胶 G 板为烟台市化学工业研究所生产的薄层板;上述薄层板的规格均为 10cm $\times$ 10cm,厚度为 0.20~0.25mm。

结果表明:从图中可以看出,3 种硅胶 G 薄层板都可以达到较好的分离效果,说明该薄层鉴别方法对不同厂家硅胶 G 薄层板的耐用性良好。

2.5 葶苈子的薄层色谱鉴别方法

2.5.1 鉴别方法

具体的,葶苈子的薄层色谱鉴别方法如下:

(1) 葶苈子供试品溶液制备:取化湿败毒组合物适量,研细,取约 5g,加 70%甲醇 30mL,超声处理 30 分钟,放冷,滤过,滤液蒸干,残渣加水 5mL 使溶解,通过 D101 大孔树脂柱(内径为 1.5cm,柱高为 12cm),先用水洗脱至洗脱液无颜色,再用 70%甲醇洗脱至洗脱液无颜色,收集 70%甲醇洗脱液,蒸干,残渣加甲醇 1mL 使溶解,即得。

(2) 葶苈子对照品溶液制备:取槲皮素-3-O- β -D-葡萄糖-7-O- β -D-龙胆双糖苷对照品,加 30%甲醇制成每 1mL 含 0.1mg 的溶液,即得。

(3) 吸取上述两种溶液各 2 μ L,分别点于同一聚酰胺薄膜上,以乙酸乙酯-甲醇-水(7:2:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 2%三氯化铝乙醇溶液,热风吹干,置紫外光灯(365nm)下检视。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点。

需要说明的是，在现有的葶苈子的薄层色谱鉴别过程中，一般直接采用甲醇溶解相关样品，加热回流，滤过的方法制备供试品溶液。然而，由于本发明中化湿败毒组合物中组分较多，其对于鉴别方法影响较大。因此，本发明增加了大孔树脂纯化的步骤。

2.5.2 方法学验证

(1) 专属性考察

取葶苈子阴性样品按照葶苈子供试品溶液制备方法制备缺葶苈子阴性样品溶液；分别吸取 2 μ L 葶苈子供试品溶液、2 μ L 缺葶苈子阴性样品溶液、2 μ L 葶苈子对照品溶液点样于同一聚酰胺薄膜上，按拟定的方法进行试验，其结果如图 58 所示。由图中可以看出，本发明的薄层色谱鉴别方法阴性无干扰，专属性良好。

(2) 耐用性考察：

1) 不同温度的比较

分别吸取 2 μ L 葶苈子供试品溶液、2 μ L 葶苈子对照品溶液点样于聚酰胺薄膜上，以乙酸乙酯-甲醇-水 (7: 2: 1) 为展开剂，分别在常温 (T: 25°C, RH: 75%) 和低温 (T: 9°C, RH: 89%) 条件下展开，取出，晾干，喷以 2% 三氯化铝乙醇溶液，热风吹干，置紫外光灯(365nm)下检视。实验结果见图 59 和图 60。

由图 59 和图 60 可见，在常温和低温条件下，分离效果均较好，且化湿败毒组合物色谱在与对照品色谱相应的位置处，均显示相同颜色的主斑点。实验结果表明，温度对化湿败毒组合物中葶苈子的薄层鉴别影响较小，说明该薄层鉴别方法对不同温度耐用性好。

2) 不同湿度的比较

分别吸取 2 μ L 葶苈子供试品溶液、2 μ L 葶苈子对照品溶液点样于聚酰胺薄膜上，以乙酸乙酯-甲醇-水 (7: 2: 1) 为展开剂，分别在常湿 (T: 25°C, RH: 75%)、低湿 (T: 25°C, RH: 41%) 和高湿条件 (T: 25°C, RH: 92%) 下展开，取出，晾干，喷以 2% 三氯化铝乙醇溶液，热风吹干，置紫外光灯(365nm)下检视。实验结果见图 59、图 61 和图 62。

由图 59、图 61 和图 62 可见，常湿、低湿和高湿条件下，分离效果均较好，且化湿败毒组合物色谱在与对照品色谱相应的位置处，显示相同颜色的主斑点。实验结果表明，湿度对化湿败毒组合物中葶苈子的薄层鉴别影响较小，说明该

薄层鉴别方法对不同湿度耐用性好。

3) 不同点样量的比较

取葶苈子供试品溶液、葶苈子对照品溶液以不同体积点样于同一聚酰胺薄膜上,按拟定的方法进行试验,其结果如图 63 所示。由图中可以看出:当葶苈子供试品溶液和葶苈子对照品溶液点样量为 2 μ L,供试品色谱中与对照品相应位置荧光斑点清晰,因此选择点样量 2 μ L。

2.6 赤芍的薄层色谱鉴别方法

2.6.1 鉴别方法

(1) 赤芍供试品溶液的制备:取化湿败毒组合物 3g,研细,加甲醇 25mL,超声处理 30 分钟,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 2mL 使溶解,即得;

(2) 赤芍对照品溶液制备:取芍药苷对照品,加甲醇制成每 1mL 含 1mg 的溶液,即得;

(3) 吸取上述两种溶液各 3 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(40:5:10:0.2)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 5%香草醛硫酸溶液,加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。

2.6.2 方法学验证

(1) 专属性

取赤芍阴性样品按照赤芍供试品溶液制备方法制备缺赤芍阴性样品溶液;将 3 μ L 赤芍供试品溶液、3 μ L 缺赤芍阴性样品溶液、3 μ L 赤芍对照品溶液点样于同一硅胶 G 薄层板(海洋硅胶 G 板)上,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(40:5:10:0.2)为展开剂,在常温常湿条件(T: 21.1 $^{\circ}$ C, RH: 47%)下展开,取出,晾干,喷以 5%香草醛硫酸溶液,加热至斑点显色清晰,在日光下检视。实验结果见图 64。由图中可以看出,本发明的薄层色谱鉴别方法阴性无干扰,方法专属性良好。

(2) 耐用性考察:

1) 不同温度的比较

分别吸取 3 μ L 赤芍供试品溶液、3 μ L 赤芍对照品溶液点样于同一硅胶 G 薄层板(海洋硅胶 G 板)上,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(40:5:10:0.2)为展开剂,分别在常温(T: 21.1 $^{\circ}$ C, RH: 47%)和低温(T: 6.4 $^{\circ}$ C, RH: 90%)

条件下展开，取出，晾干，喷以 5% 香草醛硫酸溶液，加热至斑点显色清晰，在日光下检视。实验结果见图 65 和图 66。

由图 65 和图 66 可见，在常温和低温条件下，分离效果均较好，且化湿败毒组合物色谱在与对照品色谱相应的位置处，均显示相同颜色的主斑点。实验结果表明，温度对化湿败毒组合物中赤芍的薄层鉴别影响较小，说明该薄层鉴别方法对不同温度耐用性好。

2) 不同湿度的比较

分别吸取 3 μ L 赤芍供试品溶液、3 μ L 赤芍对照品溶液点样于同一硅胶 G 薄层板（海洋硅胶 G 板）上，以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸（40：5：10：0.2）为展开剂，分别在常湿（T：21.1 $^{\circ}$ C，RH：47%）、低湿（T：21.1 $^{\circ}$ C，RH：36%）和高湿（T：21.1 $^{\circ}$ C，RH：79%）条件下展开，取出，晾干，喷以 5% 香草醛硫酸溶液，加热至斑点显色清晰，在日光下检视。实验结果见图 65、图 67 和图 68。

由图 65、图 67 和图 68 可见，常湿、低湿和高湿条件下，分离效果均较好，且化湿败毒组合物色谱在与对照品色谱相应的位置处，显示相同颜色的主斑点。实验结果表明，湿度对化湿败毒组合物中赤芍的薄层鉴别影响较小，说明该薄层鉴别方法对不同湿度耐用性好。

3) 不同点样量的比较

分别吸取赤芍供试品溶液、赤芍对照品溶液点样于同一硅胶 G 薄层板上，以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸（40：5：10：0.2）为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 5% 香草醛硫酸溶液，加热至斑点显色清晰，在日光下检视。实验结果见图 69。

由图 69 可见，当赤芍供试品溶液点样量为 3 μ L、赤芍对照品溶液点样量为 3 μ L 时，供试品色谱在与对照品色谱相应的位置处主斑点清晰，无其他干扰。因此，本发明的赤芍鉴别方法选择赤芍供试品溶液点样量为 3 μ L、赤芍对照品溶液点样量为 3 μ L。

4) 不同厂家薄层板的比较

分别吸取赤芍供试品溶液、赤芍对照品溶液点样于不同厂家硅胶 G 薄层板（海洋硅胶 G 板、谱科硅胶 G 板、默克硅胶 G 板）上，以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸（40：5：10：0.2）为展开剂，在常温常湿（21.1 $^{\circ}$ C，RH：47%）条

件下展开，取出，晾干，喷以 5% 香草醛硫酸溶液，加热至斑点显色清晰，在日光下检视。结果见图 65、图 69 和图 70。

其中，海洋硅胶 G 板为青岛海洋化工有限公司生产的薄层板；谱科硅胶 G 板为青岛谱科分离材料有限公司生产的薄层板；默克硅胶 G 板为默克股份有限公司生产的薄层板；上述薄层板的规格均为 10cm×10cm，厚度为 0.20~0.25mm。

结果表明：不同厂家硅胶 G 薄层板对化湿败毒组合物中赤芍的薄层鉴别无显著影响，说明该薄层鉴别方法对不同厂家硅胶 G 薄层板的耐用性良好。

2.7 大黄的薄层色谱鉴别方法

2.7.1 鉴别方法

(1) 大黄供试品溶液制备：取化湿败毒组合物 5g，研细，加甲醇 20mL，超声处理 30 分钟，滤过，取滤液 5mL，蒸干，残渣加水 10mL 使溶解，再加盐酸 1mL，加热回流 30 分钟，立即冷却，用乙醚振摇提取 2 次，每次 20mL，合并乙醚液，蒸干，残渣加三氯甲烷 1mL 使溶解，即得；

(2) 大黄对照药材溶液制备：取大黄对照药材 0.1g，采用大黄供试品溶液制备方法制备，即得；

(3) 吸取上述两种溶液各 2μL，分别点于同一硅胶 H 薄层板上，以石油醚(30~60℃)-甲酸乙酯-甲酸(15: 5: 1)的上层溶液为展开剂，展开，取出，晾干，在紫外光下检视；供试品色谱中，在与对照药材色谱相应的位置上，显相同颜色的荧光斑点。

2.7.2 方法学验证

(1) 专属性考察

取大黄阴性样品按照大黄供试品溶液制备方法制备缺大黄阴性样品溶液；将 2μL 大黄供试品溶液、2μL 缺大黄阴性样品溶液、2μL 大黄对照药材溶液点样于硅胶 H 薄层板（海洋硅胶 H 板）上，以石油醚(30~60℃)-甲酸乙酯-甲酸(15: 5: 1)的上层溶液为展开剂，在常温常湿（T: 26.1℃，RH: 48%）条件下展开，取出，晾干，在紫外光下检视。结果见图 72，由图中可以看出，本发明的薄层色谱鉴别方法阴性无干扰，方法专属性良好。

(2) 耐用性考察：

1) 不同温度的比较

分别吸取 2μL 大黄供试品溶液、2μL 大黄对照药材溶液点样于同一硅胶 H

薄层板（海洋硅胶 H 板）上，以石油醚（30~60℃）-甲酸乙酯-甲酸（15: 5: 1）的上层溶液为展开剂，分别在常温（T: 26.1℃, RH: 48%）和低温条件（T: 3.1℃, RH: 91%）下展开，取出，晾干，置紫外灯（365nm）下检视。实验结果见图 73 和图 74。

由图 73 和图 74 可见，在常温和低温条件下，分离效果均较好，且化湿败毒组合物色谱在与对照品色谱相应的位置处，均显示相同颜色的主斑点。实验结果表明，温度对化湿败毒组合物中大黄的薄层鉴别影响较小，说明该薄层鉴别方法对不同温度耐用性好。

2) 不同湿度的比较

分别吸取 2μL 大黄供试品溶液、2μL 大黄对照药材溶液点样于同一硅胶 H 薄层板（海洋硅胶 H 板）上，以石油醚（30~60℃）-甲酸乙酯-甲酸（15: 5: 1）的上层溶液为展开剂，分别在（T: 26.1℃, RH: 48%）、低湿（T: 26.1℃, RH: 36%）和高湿条件（T: 26.1℃, RH: 78%）下展开，取出，晾干，置紫外灯（365nm）下检视。实验结果见图 73、图 75 和图 76。

由图 73、图 75 和图 76 可见，常湿、低湿和高湿条件下，分离效果均较好，且化湿败毒组合物色谱在与对照品色谱相应的位置处，显示相同颜色的主斑点。实验结果表明，湿度对化湿败毒组合物中大黄的薄层鉴别影响较小，说明该薄层鉴别方法对不同湿度耐用性好。

3) 不同点样量的比较

分别吸取 2μL 大黄供试品溶液、2μL 大黄对照药材溶液点样于同一硅胶 H 薄层板（海洋硅胶 H 板）上，以石油醚（30~60℃）-甲酸乙酯-甲酸（15: 5: 1）的上层溶液为展开剂，在常温常湿（T: 26.1℃, RH: 48%）条件下展开，取出，晾干，置紫外灯（365nm）下检视。实验结果见图 77。

由图 77 可见，当大黄供试品溶液点样量为 2μL、大黄对照药材溶液点样量为 2μL 时，供试品色谱在与对照品色谱相应的位置处主斑点清晰，无其他干扰。因此，本发明的大黄鉴别方法选择大黄供试品溶液点样量为 2μL、大黄对照药材溶液点样量为 2μL。

4) 不同厂家薄层板的比较

分别吸取 2μL 大黄供试品溶液、2μL 大黄对照药材溶液点样于不同厂家硅胶 H 薄层板（海洋硅胶 H 板、谱科硅胶 H 板、银龙硅胶 H 板）上，以石油醚

(30~60℃)-甲酸乙酯-甲酸(15:5:1)的上层溶液为展开剂,在常温常湿(T:26.1℃,RH:48%)条件下展开,取出,晾干,置紫外灯(365nm)下检视,结果见图73、图78和图79。

其中,海洋硅胶H板为青岛海洋化工有限公司生产的薄层板;谱科硅胶H板为青岛谱科分离材料有限公司生产的薄层板;银龙硅胶H板为烟台市化学工业研究所生产的薄层板;上述薄层板的规格均为10cm×10cm,厚度为0.20~0.25mm。

结果表明:不同厂家硅胶H薄层板(海洋硅胶H板、谱科硅胶H板、银龙硅胶H板)对化湿败毒组合物中大黄的薄层鉴别无显著影响,说明该薄层鉴别方法对不同厂家硅胶H薄层板的耐用性良好。

综上所述,本发明基于对化湿败毒组合物分子作用机制的研究,大生产具体情况的分析以及大量的试验研究,在化湿败毒组合物的质量控制方法中,选择了对麻黄、甘草、厚朴、黄芪、葶苈子、赤芍和大黄进行薄层色谱鉴别;对结合蒽醌、盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、芍药苷含量进行测定。通过以上两个方面的测定,为化湿败毒组合物大生产质量控制提供了数据基础。

本发明中化湿败毒组合物的各个成分测定方法,均具有较优的专属性和耐用性,其准确性、稳定性均可达到大规模生产的要求,为保证化湿败毒组合物中活性组分的稳定性提供良好基础。

本发明中的各个薄层色谱鉴别方法,分离度较好,阴性无干扰,鉴别方法可行;且展开时间短,检视清晰,具有较强的专属性和良好的重现性,能更好地控制大生产过程中药品的质量。

以上所述是发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也视为本发明的保护范围。

权 利 要 求 书

1. 一种化湿败毒组合物的质量控制方法，其特征在于，所述化湿败毒组合物主要包括以下组分：麻黄，炒苦杏仁，生石膏，甘草，广藿香，厚朴，麸炒苍术，炒草果仁，法半夏，茯苓，大黄，黄芪，葶苈子，赤芍，辅料；

所述化湿败毒组合物的质量控制方法包括：

(1) 采用薄层色谱对麻黄、甘草、厚朴进行鉴别；

(2) 采用高效液相色谱法测定化湿败毒组合物中总蒽醌含量、游离蒽醌含量、盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱总含量以及芍药苷含量，并计算结合蒽醌含量；

其中，结合蒽醌含量=总蒽醌含量-游离蒽醌含量。

2. 如权利要求 1 所述的化湿败毒组合物的质量控制方法，其特征在于，所述化湿败毒组合物的质量控制方法还包括：

(3) 采用薄层色谱对黄芪、葶苈子、赤芍和大黄进行鉴别。

3. 如权利要求 1 所述的化湿败毒组合物的质量控制方法，其特征在于，所述总蒽醌含量的测定方法包括：

(1) 取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚适量，加甲醇制成混合溶液，制得蒽醌对照品溶液；

(2) 取化湿败毒组合物，利用甲醇提取，制得总蒽醌供试品溶液；

(3) 吸取蒽醌对照品溶液和总蒽醌供试品溶液，注入液相色谱仪，所述液相色谱仪以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂，以乙腈为流动相 A，磷酸水溶液为流动相 B 进行梯度洗脱，测定得到化湿败毒组合物中总蒽醌含量。

4. 如权利要求 1 所述的化湿败毒组合物的质量控制方法，其特征在于，所述游离蒽醌含量的测定方法包括：

(1) 取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚适量，加甲醇制成混合溶液，制得蒽醌对照品溶液；

(2) 取化湿败毒组合物，利用甲醇提取，制得游离蒽醌供试品溶液；

(3) 吸取蒽醌对照品溶液和游离蒽醌供试品溶液，注入液相色谱仪，所述液相色谱仪以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂，以乙腈为流动相 A，磷酸水溶液为流动相 B 进行梯度洗脱，测定得到化湿败毒组合物中游离蒽醌含量。

5. 如权利要求 3 或 4 所述的化湿败毒组合物的质量控制方法，其特征在于，所述总蒽醌含量的测定方法和游离蒽醌含量的测定方法均采用以下洗脱程序进行：

0~10min，流动相 A 从 35%→40%，流动相 B 从 65%→60%；

10~38min, 流动相 A 从 40%→60%, 流动相 B 从 60%→40%;

38~48min, 流动相 A 为 60%, 流动相 B 为 40%。

6. 如权利要求 3 或 4 所述的化湿败毒组合物的质量控制方法, 其特征在于, 所述总蒽醌含量和游离蒽醌含量的测定方法中, 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂, 以乙腈为流动相 A, 0.1 vol%磷酸水溶液为流动相 B 进行梯度洗脱, 流速为 0.6~1 mL/min, 检测波长为 253~256nm, 柱温为 25~35℃。

7. 如权利要求 3 所述的化湿败毒组合物的质量控制方法, 其特征在于, 所述总蒽醌供试品溶液由下述方法制得:

取化湿败毒组合物 0.2~0.5g, 置具塞锥形瓶中, 加入甲醇 20~30mL, 加热回流提取 20~30 分钟, 取出, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液

10~15mL, 减压回收溶剂至干, 加 8%盐酸溶液 10~15mL, 超声处理 2~5 分钟, 再加三氯甲烷 10~20mL, 加热回流 1~3 小时, 放冷, 置分液漏斗中, 用少量三氯甲烷洗涤容器, 并入分液漏斗中, 分取三氯甲烷层, 酸液再用三氯甲烷提取 2~5 次, 每次 10~15mL, 合并三氯甲烷液, 减压回收溶剂至干, 残渣加甲醇使溶解, 转移至 10mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

8. 如权利要求 4 所述的化湿败毒组合物的质量控制方法, 其特征在于, 所述游离蒽醌供试品溶液由下述方法制得:

取化湿败毒组合物 0.2~0.5g, 置具塞锥形瓶中, 加入甲醇 25~30mL, 称定重量, 加热回流 20~60 分钟, 取出, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

9. 如权利要求 3 或 4 所述的化湿败毒组合物的质量控制方法, 其特征在于, 所述蒽醌对照品溶液由下述方法制得:

称定芦荟大黄素对照品 1.581mg、大黄酸对照品 3.017mg、大黄素对照品 1.604mg、大黄酚对照品 2.656mg、大黄素甲醚对照品 5.221mg, 置 100mL 量瓶中, 加甲醇分别制成每 1mL 含芦荟大黄素 15.807 μ g、大黄酸 30.167 μ g、大黄素 16.039 μ g、大黄酚 26.563 μ g、大黄素甲醚 52.213 μ g 的母液; 分别精密吸取上述芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚母液各 1mL, 大黄素甲醚母液 0.1mL, 置 10mL 量瓶中, 加甲醇制成每 1mL 含芦荟大黄素 1.581 μ g、大黄酸 3.017 μ g、大黄素 1.604 μ g、大黄酚 2.656 μ g、大黄素甲醚 0.522 μ g 的混合溶液, 即得。

10. 如权利要求 1 所述的化湿败毒组合物的质量控制方法, 其特征在于, 所述盐酸麻黄碱和

盐酸伪麻黄碱总含量的测定方法包括：

- (1) 取盐酸麻黄碱对照品、盐酸伪麻黄碱对照品适量，称定，加甲醇分别制成每 1mL 各含 10 μ g 的混合溶液，制得麻黄碱对照品溶液；
- (2) 取化湿败毒组合物，利用盐酸溶液提取，制得麻黄碱供试品溶液；
- (3) 吸取麻黄碱对照品溶液和麻黄碱供试品溶液，注入液相色谱仪，所述液相色谱仪以极性乙醚连接苯基键合硅胶为填充剂，以甲醇和磷酸水溶液的混合溶液为流动相，流速为 0.6~1mL/min，柱温为 25~35℃，检测波长为 205~215nm；测定得到化湿败毒组合物中盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的总含量。

11. 如权利要求 10 所述的化湿败毒组合物的质量控制方法，其特征在于，所述盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱总含量的测定方法中，以甲醇和磷酸水溶液的混合溶液为流动相；

所述磷酸水溶液为磷酸、二乙胺、三乙胺和水的混合溶液；其中，磷酸的体积分数为 0.090~0.094%，二乙胺的体积分数为 0.01~0.04%，三乙胺的体积分数为 0.02~0.06%。

12. 如权利要求 1 所述的化湿败毒组合物的质量控制方法，其特征在于，所述芍药苷含量的测定方法包括：

- (1) 取芍药苷对照品适量，称定，加甲醇制成每 1mL 含 0.13mg 的溶液，制得芍药苷对照品溶液；
- (2) 取化湿败毒组合物，利用甲醇提取，制得芍药苷供试品溶液；
- (3) 吸取芍药苷对照品溶液和芍药苷供试品溶液，注入液相色谱仪；所述液相色谱仪以十八烷基键合硅胶为填充剂，以甲醇-0.05mol/L 磷酸二氢钾水溶液为流动相，流速为 0.8~1.2 mL/min，检测波长为 225~230nm，柱温为 30~35℃；测定得到化湿败毒组合物中芍药苷的含量。

13. 如权利要求 1 所述的化湿败毒组合物的质量控制方法，其特征在于，所述麻黄的薄层色谱鉴别方法为：

- (1) 取化湿败毒组合物 5~10g，研细，加浓氨试液 3~5 mL 使润湿，再加三氯甲烷 25~30 mL，加热回流 0.5~1 小时，滤过，滤液蒸干，残渣加甲醇 1~2mL 溶解，制得麻黄供试品溶液；
- (2) 取盐酸麻黄碱对照品，加甲醇制成每 1mL 含 1mg 的溶液，得到麻黄对照品溶液；
- (3) 吸取麻黄供试品溶液和麻黄对照品溶液各 1~5 μ L，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以体积比为 20:5:0.5 的三氯甲烷、甲醇、浓氨溶液的混合溶液为展开剂，展开，取出，晾干，喷以茚三酮试液，加热至斑点显色清晰；供试品色谱中，在与对照品色谱相应的位置

上，显相同颜色的斑点。

14. 如权利要求 1 所述的化湿败毒组合物的质量控制方法，其特征在于，所述甘草的薄层色谱鉴别方法为：

(1) 取化湿败毒组合物 5~10g，研细，加乙醚 40~50mL，加热回流 1~2 小时，滤过，弃去醚液，残渣加甲醇 30~50mL，加热回流 0.5~1.5 小时，滤过，滤液蒸干，残渣加水 40~50mL 使溶解，用正丁醇振摇提取 1~3 次，每次 20~40mL，合并正丁醇液，用水洗涤 1~3 次，弃去水液，正丁醇液蒸干，残渣加甲醇 5~10mL 使溶解，制得甘草供试品溶液；

(2) 取甘草对照药材 1~3g，按照步骤 (1) 中的甘草供试品溶液制备，得到甘草对照药材溶液；

(3) 吸取甘草供试品溶液、甘草对照药材溶液各 2~5 μ l，分别点于同一用 1%氢氧化钠溶液制备的硅胶 G 薄层板上，以体积比为 15:1:1:2 的乙酸乙酯、甲酸、冰醋酸和水的混合溶液为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 10%硫酸乙醇溶液，在 100~110℃加热至斑点显色清晰；供试品色谱中，在与对照药材色谱相应的位置上，显相同颜色的斑点。

15. 如权利要求 1 所述的化湿败毒组合物的质量控制方法，其特征在于，所述厚朴的薄层色谱鉴别方法为：

(1) 取化湿败毒组合物 5~10g，研细，加甲醇 15~25mL，超声处理 0.5~1 小时，滤过，滤液蒸干，残渣加水 40~50mL 使溶解，用乙酸乙酯振摇提取 1~3 次，每次 20~30mL，合并乙酸乙酯液，蒸干，残渣加甲醇 1~2mL 使溶解，制得厚朴供试品溶液；

(2) 取厚朴酚对照品，加甲醇制成每 1mL 含 1mg 的溶液，制得厚朴酚对照品溶液；另取和厚朴酚对照品，加甲醇制成每 1mL 含 1mg 的溶液，制得和厚朴酚对照品溶液；

(3) 吸取厚朴供试品溶液、厚朴酚对照品溶液和和厚朴酚对照品溶液各 2~5 μ l，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以体积比为 17:3:3 的甲苯、乙酸乙酯、甲醇混合溶液为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 5%香草醛硫酸溶液，加热至斑点显色清晰；供试品色谱中，在与对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的斑点。

16. 如权利要求 2 所述的化湿败毒组合物的质量控制方法，其特征在于，所述黄芪的薄层色谱鉴别方法为：

(1) 取化湿败毒组合物 5~10g，加甲醇 25~30mL，超声处理 0.5~1 小时，放冷，滤过，滤液蒸干，残渣加水 20~30mL 使溶解，用水饱和正丁醇振摇提取 1~3 次，每次 15~30mL，合并正丁醇液，用氨试液洗涤 1~3 次，每次 20~30mL，弃去氨试液，正丁醇液蒸干，残渣加甲醇 1~3mL 使溶解，制得黄芪供试品溶液；

(2) 取黄芪甲苷对照品，加甲醇制成每 1mL 含 1mg 的溶液，制得黄芪对照品溶液；

(3) 吸取黄芪供试品溶液 5~8 μ l，黄芪对照品溶液 2~3 μ l，点样于同一硅胶 G 薄层板上，以体积比为 13:7:2 的三氯甲烷、甲醇、水的混合溶液为展开剂，在 4~10℃ 条件下展开，取出，晾干，喷以 10% 硫酸乙醇溶液，在 100~105℃ 加热至斑点显色清晰；在紫外光下检视，供试品色谱中，在与对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的荧光斑点。

17. 如权利要求 2 所述的化湿败毒组合物的质量控制方法，其特征在于，所述葶苈子的薄层色谱鉴别方法为：

(1) 取化湿败毒组合物 5~10g，研细，加 70% 甲醇 20~30mL，超声处理 0.5~1 小时，放冷，滤过，滤液蒸干，残渣加水 5~10mL 使溶解，通过 D101 大孔树脂柱，先用水洗脱至洗脱液无颜色，再用 70% 甲醇洗脱至洗脱液无颜色，收集 70% 甲醇洗脱液，蒸干，残渣加甲醇 1~2mL 使溶解，制得葶苈子供试品溶液；

(2) 取槲皮素-3-O- β -D-葡萄糖-7-O- β -D-龙胆双糖苷对照品，加 30% 甲醇制成每 1mL 含 0.1mg 的溶液，制得葶苈子对照品溶液；

(3) 吸取葶苈子供试品溶液和葶苈子对照品溶液各 1~5 μ L，分别点于同一聚酰胺薄膜上，以体积比为 7:2:1 的乙酸乙酯、甲醇、水的混合溶液为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 2% 三氯化铝乙醇溶液，热风吹干，置紫外光灯下检视；供试品色谱中，在与对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的荧光斑点。

18. 如权利要求 2 所述的化湿败毒组合物的质量控制方法，其特征在于，所述赤芍的薄层色谱鉴别方法为：

(1) 取化湿败毒组合物 3~5g，研细，加甲醇 25~40mL，超声处理 0.5~1 小时，滤过，滤液蒸干，残渣加甲醇 1~2mL 使溶解，制得赤芍供试品溶液；

(2) 取芍药苷对照品，加甲醇制成每 1mL 含 1mg 的溶液，制得赤芍对照品溶液；

(3) 吸取赤芍供试品溶液、赤芍对照品溶液各 2~5 μ L，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以体积比为 40:5:10:0.2 的三氯甲烷、乙酸乙酯、甲醇、甲酸的混合溶液为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 5% 香草醛硫酸溶液，加热至斑点显色清晰；供试品色谱中，在与对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的斑点。

19. 如权利要求 2 所述的化湿败毒组合物的质量控制方法，其特征在于，所述大黄的薄层色谱鉴别方法为：

(1) 取化湿败毒组合物 5~10g，研细，加甲醇 20~30mL，超声处理 20~30 分钟，滤过，取滤液 3~10mL，蒸干，残渣加水 5~15mL 使溶解，再加盐酸 1~3mL，加热回流 20~60 分钟，

立即冷却，用乙醚振摇提取 2~3 次，每次 20~30mL，合并乙醚液，蒸干，残渣加三氯甲烷 1~3mL 使溶解，制得大黄供试品溶液；

(2) 取大黄对照药材 0.1g，按照步骤 (1) 中的大黄供试品溶液的制备方法制备，制得大黄对照药材溶液；

(3) 吸取上述两种溶液各 1~5 μ L，分别点于同一硅胶 H 薄层板上，以体积比为 15:5:1 的石油醚、甲酸乙酯、甲酸的混合溶液为展开剂，展开，取出，晾干，在紫外光下检视；供试品色谱中，在与对照药材色谱相应的位置上，显相同颜色的荧光斑点。

20. 如权利要求 1 所述的化湿败毒组合物的质量控制方法，其特征在于，所述化湿败毒组合物主要包括下述组分：麻黄 3-60 份，炒苦杏仁 4.5-90 份，生石膏 7.5-150 份，甘草 1.5-30 份，广藿香 5-100 份，厚朴 5-100 份，麸炒苍术 7.5-150 份，炒草果仁 5-100 份，法半夏 4.5-90 份，茯苓 7.5-150 份，大黄 2.5-50 份，黄芪 5-100 份，葶苈子 5-100 份，赤芍 5-100 份，辅料适量；

所述化湿败毒组合物被制成中药制剂，所述中药制剂为颗粒剂、汤剂、散剂、胶囊剂、口服液、片剂或丸剂。