

HPLC-DAD 波长切换法同时测定身痛逐瘀汤 物质基准中 8 种有效成分含量

成颜芬, 王升菊, 吴亿晗, 王潇, 王婷, 裴瑾, 章津铭*, 傅超美*

(成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川省中药资源系统研究与
开发利用重点实验室——省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

[摘要] **目的:**采用高效液相色谱-二极管阵列检测器(HPLC-DAD)波长切换法同时测定 15 批身痛逐瘀汤物质基准中肌苷, 马钱苷酸, 绿原酸, 苦杏仁苷, 羟基红花黄色素 A, 龙胆苦苷, 阿魏酸, 甘草苷 8 种有效成分的含量。**方法:**采用 Thermo Hypersil GOLD C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1% 磷酸水溶液为流动相梯度洗脱, 检测波长分别为 248 nm (0 ~ 11 min, 检测肌苷), 235 nm (11 ~ 14 min, 检测马钱苷酸), 324 nm (14 ~ 16 min, 检测绿原酸), 220 nm (16 ~ 19 min, 检测苦杏仁苷、羟基红花黄色素 A), 274 nm (19 ~ 26 min, 检测龙胆苦苷), 247 nm (26 ~ 54 min, 检测阿魏酸、甘草苷), 流速设定 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C。根据样品中 8 个成分的含量, 采用 SIMCA 14.1 软件对 15 批身痛逐瘀汤物质基准样品进行正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA), 以评价各批样品之间的质量差异。**结果:**各待测组分分离度良好, 肌苷, 马钱苷酸, 绿原酸, 苦杏仁苷, 羟基红花黄色素 A, 龙胆苦苷, 阿魏酸, 甘草苷的质量浓度分别在 2.1 ~ 67.2, 1.812 5 ~ 58, 1.937 5 ~ 62, 5.212 5 ~ 166.8, 8.45 ~ 270.4, 7.075 ~ 226.4, 1.775 ~ 56.8, 3.875 ~ 124 mg·L⁻¹ (r 均 ≥ 0.999 6) 与峰面积呈良好线性关系; 平均加样回收率分别为 99.23%, 100.09%, 99.33%, 98.85%, 99.15%, 98.75%, 99.42%, 98.96%; RSD 均 < 2%。15 批供试品中上述 8 种成分的质量分数依次为 0.183 5 ~ 0.250 3, 0.173 1 ~ 0.265 3, 0.069 5 ~ 0.169 8, 0.959 2 ~ 1.458 2, 1.905 4 ~ 2.553 3, 0.933 3 ~ 1.997 5, 0.084 6 ~ 0.143 4, 0.212 5 ~ 0.704 3 mg·g⁻¹。通过 OPLS-DA 发现甘草苷、阿魏酸、龙胆苦苷、羟基红花黄色素 A 是影响不同批次身痛逐瘀汤物质基准质量贡献较大的 4 种成分。**结论:**建立的多成分含量测定的方法结果可靠、操作简便且符合方法学验证要求, 适用于身痛逐瘀汤复方制剂研发的质量控制。

[关键词] 身痛逐瘀汤; 经典名方; 波长切换法; 有效成分; 羟基红花黄色素 A; 甘草苷; 正交偏最小二乘法-判别分析

[中图分类号] R22; R28; R94; R927.2; O657.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)04-0016-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191954

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190618.0931.008.html>

[网络出版时间] 2019-06-19 10:58

Simultaneous Determination of Eight Active Components in Material Benchmark of Shentong Zhuyutang by HPLC-DAD Wavelength Switching

CHENG Yan-fen, WANG Sheng-ju, WU Yi-han, WANG Xiao, WANG Ting, PEI Jin,
ZHANG Jin-ming*, FU Chao-mei*

(College Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Standardization of
Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Key Laboratory of Systematic Research, Development and
Utilization of Chinese Medicine Resources in Sichuan Province, Key Laboratory Breeding Base of Co-founded by
Sichuan Province and Ministry of Science and Technology, Chengdu 611137, China)

[收稿日期] 20190512(008)

[基金项目] 中国科协第四届青年人才托举工程项目(2018QNRC1-01); 四川省“千人计划”青年人才项目; 成都中医药大学“杏林学者”
学科拔尖人才科研提升计划项目

[第一作者] 成颜芬, 在读硕士, 从事药剂学研究, E-mail: chengyanfen122@126.com

[通信作者] * 章津铭, 副教授, 从事中药新制剂和新剂型研究, E-mail: edutcmzm@126.com;

* 傅超美, 教授, 从事中药新制剂和新剂型研究, E-mail: chaomeifu@126.com

[Abstract] Objective: To develop high performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD) wavelength switching for simultaneously determining the contents of inosine, loganic acid, chlorogenic acid, amygdalin, hydroxysafflor yellow A, gentiopicoside, ferulic acid and liquiritin in 15 batches of material benchmarks of Shentong Zhuyutang. **Method:** The quantitative analysis was carried out on a Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution for gradient elution, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the detection wavelengths were set as 248 nm (0-11 min, inosine), 235 nm (11-14 min, loganic acid), 324 nm (14-16 min, chlorogenic acid), 220 nm (16-19 min, amygdalin and hydroxysafflor yellow A), 274 nm (19-26 min, gentiopicoside), 247 nm (26-54 min, ferulic acid and liquiritin), the column temperature was maintained at 25 °C. According to the contents of eight active components in 15 batches of material benchmarks, orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) in SIMCA 14.1 was used to evaluate the quality difference of each batch of samples. **Result:** Each component had good separations, the linear ranges of the above 8 components were 2.1-67.2, 1.812 5-58, 1.937 5-62, 5.212 5-166.8, 8.45-270.4, 7.075-226.4, 1.775-56.8, 3.875-124 mg·L⁻¹, respectively ($r \geq 0.999 6$). The average recoveries of them were 99.23%, 100.09%, 99.33%, 98.85%, 99.15%, 98.75%, 99.42%, 98.96%, respectively (RSD < 2%). The contents of the above eight components in 15 batches of material benchmarks were 0.183 5-0.250 3, 0.173 1-0.265 3, 0.069 5-0.169 8, 0.959 2-1.458 2, 1.905 4-2.553 3, 0.933 3-1.997 5, 0.084 6-0.143 4, 0.212 5-0.704 3 mg·g⁻¹, respectively. Liquiritin, ferulic acid, gentiopicoside and hydroxysafflor yellow A were determined to have significant impact on the quality of different batches of material benchmarks of Shentong Zhuyutang through OPLS-DA. **Conclusion:** The established method for simultaneous determination of multi-components is reliable, simple and in line with the requirements of methodological verification. It is suitable for the quality control of research and development of compound preparations of Shentong Zhuyutang.

[Key words] Shentong Zhuyutang; classical famous formulas; wavelength switching method; active ingredients; hydroxysafflor yellow A; liquiritin; orthogonal partial least squares discriminant analysis

经典名方是指目前仍广泛应用、疗效确切、具有明显特色与优势的清代及清代以前医籍所记载的方剂,是目前我国中药创新药物开发研究的热点之一^[1]。2019年3月22日国家药品监督管理局发布了“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),要求“提供不同批次饮片制备及同批次饮片制备的多批次对应实物的质量研究资料”,明确经典名方物质基准的关键质量属性。经典名方虽然免临床研究,但从研发和注册审评的角度,其在质量控制和评价方面要求甚高^[2]。因此,开展经典名方物质基准质量控制的研究,建立能全面反映经典名方化学质量概貌的质量控制标准,对于其复方制剂的研究和申报显得尤为重要。

身痛逐瘀汤出自清·王清任的《医林改错》,具活血祛瘀、祛风除湿、通痹止痛之功,主治瘀血闭阻经络所致肩臂痛、腰腿痛或周身疼痛、经久不愈者^[3],临床常用于风湿性关节炎、骨性关节炎、颈椎病、肩周炎、腰椎间盘突出、坐骨神经痛等疾病的治疗^[4-5]。该方由 12 味药物组成,方中桃仁、红花活血

祛瘀,当归、川芎、没药、五灵脂、地龙、牛膝、香附合用以活血理气、通络止痛、利关节,羌活、秦艽同用可祛风寒湿邪,甘草药性缓和、调和诸药^[6];被收录于 2018 年国家中医药管理局发布的《古代经典名方目录(第一批)》中。本课题组前期已对身痛逐瘀汤物质基准的制备工艺进行了考察,亟需对其物质基准建立一种专属性强、可反映处方质量整体的质量控制方法。经过分析后发现,身痛逐瘀汤中可测的主要成分有绿原酸、龙胆苦苷、马钱苷酸(源自秦艽),阿魏酸(源自川芎和当归),苦杏仁苷(源自桃仁),羟基红花黄色素 A(源自红花),甘草苷(源自甘草),肌苷(源自地龙)8 种,但这 8 种成分的最大吸收均在不同波长处,难以保证在最大吸收波长处检测所有成分,以免影响峰值响应和检测结果稳定性。

为了准确测定身痛逐瘀汤物质基准样品中多成分含量,本实验采用多成分指标结合 HPLC 波长切换法^[7-9],用于方中绿原酸、龙胆苦苷、马钱苷酸等 8 种成分的含量测定,保证多成分在最大吸收波长下的最佳吸收而互不干扰;同时结合正交偏最小二乘

法-判别分析(OPLS-DA)等化学模式识别方法,评价各批次样品含量测定结果的差异,为确定多批次身痛逐瘀汤物质基准的关键质量属性提供实验依据。

1 材料

UltiMate 3000 型高效液相色谱仪(美国 Thermo Fisher 公司)。肌苷(批号 wkq16090505),马钱苷酸(批号 wkq18011103),绿原酸(批号 wkq18022809),苦杏仁苷(批号 wkq16072002),羟基红花黄色素 A(批号 wkq18010407),龙胆苦苷(批号 wkq18051602),阿魏酸(批号 wkq15121602),甘草苷(批号 wkq16071504)对照品均购于四川省维克奇生物科技有限公司,纯度均 $\geq 98\%$;水为纯化水,乙腈、磷酸为色谱级,其他试剂均为分析纯。身痛逐瘀汤中 11 种饮片(秦艽、川芎、桃仁等)的 15 批样品均购于安徽亳州药材市场,没药的 15 批样品均购于浙江森虹医药有限公司,饮片产地信息见表 1;经成都中医药大学卢先明教授鉴定,各饮片均符合 2015 年版《中国药典》(一部)相关项下的规定。

表 1 身痛逐瘀汤中组方饮片的产地信息

Table 1 Origin information of 15 batches of decoction pieces in Shentong Zhuyutang

| 饮片 | 产地 | | |
|-----|--------|---------|----------|
| | 批次 1~5 | 批次 6~10 | 批次 11~15 |
| 秦艽 | 云南永善 | 内蒙古宁城 | 甘肃陇西 |
| 川芎 | 四川都江堰 | 云南鹤庆 | 甘肃华亭 |
| 桃仁 | 山西朔州 | 河北张家口 | 山西大同 |
| 红花 | 甘肃玉门 | 云南永善 | 新疆吉木萨 |
| 甘草 | 宁夏利通区 | 内蒙古松山区 | 甘肃民勤县 |
| 羌活 | 甘肃合作 | 四川黑水 | 青海互助 |
| 当归 | 云南师宗 | 青海大通 | 甘肃岷县 |
| 五灵脂 | 陕西商州 | 湖北郧西 | 广西金城江 |
| 香附 | 广东城月 | 广东界炮 | 广东岭北 |
| 牛膝 | 河南温县 | 河南孟州 | 河南武陟 |
| 地龙 | 广西河甫 | 广西博白 | 广西陆川 |
| 没药 | 埃塞俄比亚 | 埃塞俄比亚 | 埃塞俄比亚 |

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Thermo Hypersil GOLD C₁₈ 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(0~15 min, 5%~13% A; 15~27 min, 13%~19% A; 27~32 min, 19% A; 32~40 min, 19%~25% A; 40~45 min, 25%~37% A; 45~54 min, 37% A), 柱温 25 °C, 流速 1 mL·min⁻¹,

进样量 10 μL; 检测波长分别为 248 nm(0~11 min, 检测肌苷), 235 nm(11~14 min, 检测马钱苷酸), 324 nm(14~16 min, 检测绿原酸), 220 nm(16~19 min, 检测苦杏仁苷、羟基红花黄色素 A), 274 nm(19~26 min, 检测龙胆苦苷), 247 nm(26~54 min, 检测阿魏酸、甘草苷)。

2.2 溶液的配制

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取肌苷对照品适量,加水定容至 10 mL,得 672 mg·L⁻¹对照品储备液;精密称取马钱苷酸、苦杏仁苷、龙胆苦苷对照品适量,分别加甲醇定容至 10 mL,得质量浓度依次为 580, 1 112, 1 132 mg·L⁻¹的对照品储备液;精密称取绿原酸,羟基红花黄色素 A,阿魏酸,甘草苷对照品适量,分别加 70% 甲醇定容至 10 mL,得质量浓度依次为 620, 1 352, 1 136, 1 240 mg·L⁻¹的对照品储备液。分别精密量取上述 8 种对照品储备液适量,置于同一 10 mL 量瓶中,制成肌苷,马钱苷酸,绿原酸,苦杏仁苷,羟基红花黄色素 A,龙胆苦苷,阿魏酸,甘草苷质量浓度依次为 67.2, 58, 62, 166.8, 270.4, 226.4, 56.8, 124 mg·L⁻¹的混合对照品溶液。

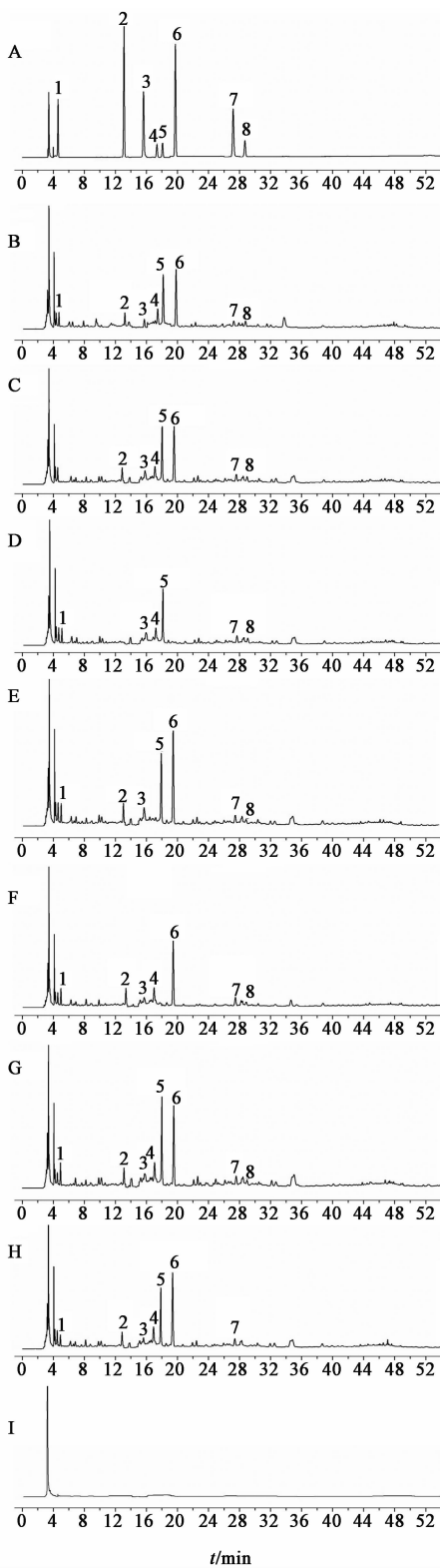
2.2.2 供试品溶液 按照国家公布的《古代经典名方目录(第一批)》中身痛逐瘀汤的处方组成及清代剂量换算(一钱=3.73 g)^[10],即秦艽 3.73 g,川芎 7.46 g,桃仁 11.19 g,红花 11.19 g,甘草 7.46 g,羌活 3.73 g,没药 7.46 g,当归 11.19 g,灵脂(炒) 7.46 g,香附 3.73 g,牛膝 11.19 g,地龙(去土) 7.46 g。基于古法记载,结合本课题组前期工艺研究,称取全方饮片量约 93.25 g,浸泡 30 min,加 8 倍量水煎煮 30 min,纱布过滤,将滤液减压浓缩至 200 mL,冷冻干燥成粉末。精密称取冻干粉约 0.2 g,置于 10 mL 量瓶中,加 70% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,过 0.22 μm 微孔滤膜,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性样品溶液 按照 2.2.2 项下供试品溶液制备方法,分别制备缺地龙、缺秦艽、缺桃仁、缺红花、缺川芎和当归、缺甘草的阴性样品溶液。

2.3 系统适应性试验 按照 2.1 项下色谱条件测定混合对照品溶液、供试品溶液和 6 种阴性样品溶液,结果表明样品中各成分均能达到基线分离,分离度和理论板数均较好,且阴性无干扰;但缺川芎和当归阴性样品中 7 号峰(阿魏酸)不具备专属性,且该色谱峰的峰面积较全方及其他阴性样品低。见图 1。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 取 2.2.1 项下混合对照品



A. 混合对照品; B. 供试品; C. 缺地龙阴性样品; D. 缺秦艽阴性样品; E. 缺桃仁阴性样品; F. 缺红花阴性样品; G. 缺川芎和当归阴性样品; H. 缺甘草阴性样品; I. 空白阴性; 1. 肌苷; 2. 马钱苷酸; 3. 绿原酸; 4. 苦杏仁苷; 5. 羟基红花黄色素 A; 6. 龙胆苦苷; 7. 阿魏酸; 8. 甘草苷

图 1 身痛逐瘀汤物质基准的 HPLC
Fig. 1 HPLC chromatograms of material benchmark of Shentong Zhuyutang

溶液,分别稀释 0,2,4,8,16,32 倍,按照 2.1 项下色谱条件进行测定。以各成分对照品质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得各成分回归方程,见表 2。

2.4.2 精密度试验 取 2.2.1 项下混合对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,计算肌苷,马钱苷酸,绿原酸,苦杏仁苷,羟基红花黄色素 A,龙胆苦苷,阿魏酸,甘草苷峰面积的 RSD 分别为 0.4%,0.3%,0.5%,0.7%,0.2%,0.1%,1.0%,0.7%,表明仪器精密度良好。

2.4.3 重复性试验 同一批次样品(批次 6),按 2.2.2 项下方法平行制备供试品溶液 6 份,按 2.1 项下条件测定,结果肌苷,马钱苷酸,绿原酸,苦杏仁苷,羟基红花黄色素 A,龙胆苦苷,阿魏酸,甘草苷的平均质量分数分别为 0.223 9,0.186 2,0.099 2,1.021 4,2.126,2.016,0.127 2,0.263 8 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD 依次为 0.6%,0.2%,0.3%,0.6%,0.2%,0.1%,0.9%和 0.7%,表明该方法重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于制备后 0,2,4,8,12,24 h 按 2.1 项下色谱条件测定,结果肌苷,马钱苷酸,绿原酸,苦杏仁苷,羟基红花黄色素 A,龙胆苦苷,阿魏酸,甘草苷峰面积的 RSD 分别为 0.5%,0.3%,0.4%,0.7%,0.2%,0.1%,0.9%和 0.7%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.5 加样回收率试验 精密量取已知 8 种指标成分含量的身痛逐瘀汤物质基准冻干粉约 0.2 g,置 10 mL 量瓶中,精密加入一定量对照品(肌苷,马钱苷酸,绿原酸,苦杏仁苷,羟基红花黄色素 A,龙胆苦苷,阿魏酸,甘草苷质量分别为 0.211 3,0.169 7,0.089 7,0.936 5,1.975 3,1.863 2,0.112 0,0.251 1 mg),平行制备 6 份供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,计算各指标成分的回收率。结果肌苷,马钱苷酸,绿原酸,苦杏仁苷,羟基红花黄色素 A,龙胆苦苷,阿魏酸,甘草苷的平均加样回收率分别为 99.23%,100.09%,99.33%,98.85%,99.15%,98.75%,99.42%,98.96%;RSD 分别为 0.5%,1.2%,1.0%,1.2%,1.4%,1.1%,0.9%,0.7%。表明该方法准确可靠。

2.5 样品测定 称取 15 批饮片样品,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,采用外标一点法进行计算,见表 3。

由表 3 可知,15 批身痛逐瘀汤物质基准冻干粉中肌苷,马钱苷酸,绿原酸,苦杏仁苷,羟基红花黄色素 A,龙胆苦苷,阿魏酸,甘草苷质量分数分别为

表 2 身痛逐瘀汤物质基准中 8 种成分的线性关系考察

Table 2 Linear relationship of eight components in material benchmark of Shentong Zhuyutang

| 成分 | 回归方程 | r | 线性范围/mg·L ⁻¹ |
|-----------|--------------------|--------|-------------------------|
| 肌苷 | $Y=0.2134X-0.0555$ | 0.9998 | 2.1~67.2 |
| 马钱苷酸 | $Y=0.2463X+0.0193$ | 0.9999 | 1.8125~58 |
| 绿原酸 | $Y=0.4683X-0.3588$ | 0.9999 | 1.9375~62 |
| 苦杏仁苷 | $Y=0.0745X+0.0486$ | 0.9999 | 5.2125~166.8 |
| 羟基红花黄色素 A | $Y=0.1197X-0.7470$ | 0.9996 | 8.45~270.4 |
| 龙胆苦苷 | $Y=0.2233X+0.2434$ | 0.9999 | 7.075~226.4 |
| 阿魏酸 | $Y=0.4569X-0.0517$ | 0.9999 | 1.775~56.8 |
| 甘草苷 | $Y=0.1054X+0.0502$ | 0.9999 | 3.875~124 |

表 3 15 批身痛逐瘀汤物质基准中 8 种成分的质量分数

Table 3 Contents of eight components in 15 batches of material benchmark of Shentong Zhuyutang

| 样品 | 肌苷 | 马钱苷酸 | 绿原酸 | 苦杏仁苷 | 羟基红花黄色素 A | 龙胆苦苷 | 阿魏酸 | 甘草苷 |
|-----|--------|--------|--------|--------|-----------|--------|--------|--------|
| S1 | 0.2029 | 0.1790 | 0.0733 | 1.4582 | 2.4447 | 0.9927 | 0.0891 | 0.5164 |
| S2 | 0.2245 | 0.2190 | 0.1017 | 1.4382 | 2.4007 | 1.0707 | 0.1182 | 0.5642 |
| S3 | 0.2155 | 0.1761 | 0.1680 | 0.9892 | 2.2320 | 1.3751 | 0.1079 | 0.4213 |
| S4 | 0.2503 | 0.2174 | 0.0854 | 1.3713 | 2.5533 | 1.0852 | 0.1042 | 0.7043 |
| S5 | 0.2169 | 0.1871 | 0.0860 | 1.1191 | 2.2497 | 0.9333 | 0.1434 | 0.2125 |
| S6 | 0.2258 | 0.1835 | 0.0962 | 1.0045 | 2.1192 | 1.9975 | 0.1200 | 0.2695 |
| S7 | 0.2393 | 0.2212 | 0.1045 | 0.9684 | 1.9054 | 1.7347 | 0.1180 | 0.3760 |
| S8 | 0.1835 | 0.2335 | 0.1698 | 0.9592 | 2.0882 | 1.8322 | 0.1386 | 0.2787 |
| S9 | 0.1856 | 0.2528 | 0.1010 | 1.0000 | 1.9783 | 1.9744 | 0.1177 | 0.2825 |
| S10 | 0.2211 | 0.2653 | 0.1099 | 1.0745 | 2.0832 | 1.8021 | 0.1055 | 0.3902 |
| S11 | 0.2049 | 0.2194 | 0.0873 | 1.2430 | 2.4852 | 1.3162 | 0.0846 | 0.2783 |
| S12 | 0.2061 | 0.1755 | 0.0695 | 1.1316 | 2.3416 | 1.3951 | 0.0861 | 0.3302 |
| S13 | 0.2076 | 0.2134 | 0.0728 | 1.2612 | 2.1693 | 1.3994 | 0.0872 | 0.3939 |
| S14 | 0.2040 | 0.1811 | 0.0818 | 1.3174 | 2.2933 | 1.0020 | 0.1057 | 0.4106 |
| S15 | 0.2236 | 0.1731 | 0.0948 | 0.9613 | 2.5459 | 1.2724 | 0.0855 | 0.3128 |

0.1835~0.2503, 0.1731~0.2653, 0.0695~0.1698, 0.9592~1.4582, 1.9054~2.5533, 0.9333~1.9975, 0.0846~0.1434, 0.2125~0.7043 mg·g⁻¹。

2.6 OPLS-DA 处理 为了更好地分析不同产地样品之间的成分含量差异,采用有监督的 OPLS-DA 模型进行分析^[11-15]。以样品 S1~S15 为 Y 变量,8 种成分的含量为 X 变量,利用 SIMCA 14.1 软件进行 OPLS-DA 处理,见图 2~4。结果发现在置信区间(95%)内,15 批样品存在一定差异性,根据分布可将样品 S1~S15 分为 3 类,样品 S3, S5, S6~S10 为 I 类,样品 S2 和 S4 为 II 类,样品 S1, S11~S15 为 III 类;对样品分类贡献较大[变量重要性投影(VIP)

值>1]的有 4 种成分,依次为甘草苷、阿魏酸、龙胆苦苷和羟基红花黄色素 A,说明这 4 种成分是影响不同批次样品之间质量差异贡献较大的成分。

3 讨论

3.1 测定指标确定 依据 2015 年版《中国药典》对身痛逐瘀汤所含 12 味饮片中含有测定的法定指标成分^[16]以及相关文献资料,确定了该方物质基准质量评价的指标性成分,采用 HPLC 波长切换法测定这些成分的含量。绿原酸具有抗骨质疏松作用,可促进大鼠成骨细胞增殖^[17];杯苋甾酮具有抗骨质疏松等作用^[18];肌苷具有抗关节痹痛等活性^[19];阿魏酸具有抗炎止痛、抗血小板凝聚等活性^[20];羟基红花黄色素 A 联合苦杏仁苷可缓解椎间盘退变^[21];

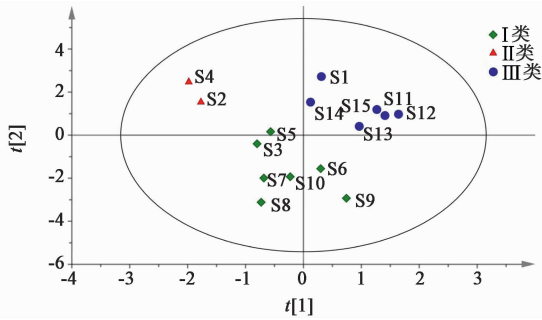


图 2 15 批身痛逐瘀汤物质基准 OPLS-DA 的得分
Fig. 2 OPLS-DA score plot of 15 batches of material benchmark of Shentong Zhuyutang

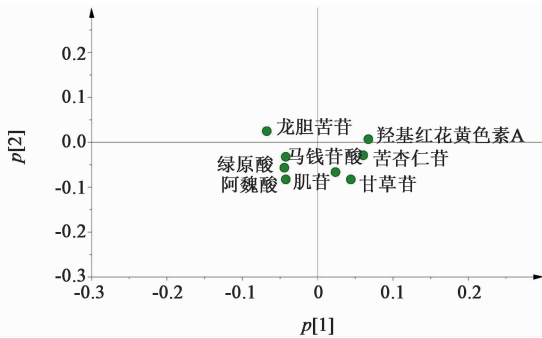
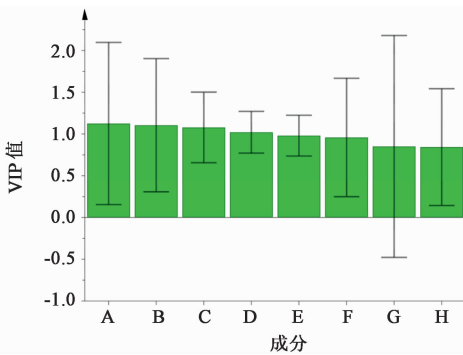


图 3 15 批身痛逐瘀汤物质基准 OPLS-DA 的载荷
Fig. 3 Loading plot of 15 batches of material benchmark of Shentong Zhuyutang by OPLS-DA



A. 甘草苷; B. 阿魏酸; C. 龙胆苦苷; D. 羟基红花黄色素 A; E. 苦杏仁苷; F. 绿原酸; G. 肌苷; H. 马钱苷酸

图 4 身痛逐瘀汤物质基准中 8 种成分的 VIP 值
Fig. 4 Variable importance in the projection (VIP) values of eight components in material benchmark of Shentong Zhuyutang

龙胆苦苷、马钱苷酸等环烯醚萜类具有抗炎镇痛等活性,可用于治疗风湿性关节炎^[22];甘草苷具有神经保护和治疗心血管系统疾病等活性^[23]。预试验同时测定了秦艽(龙胆苦苷、马钱苷酸),川芎和当归(阿魏酸),桃仁(苦杏仁苷),红花(羟基红花黄色素 A),甘草(甘草苷、甘草酸),羌活(羌活醇、异欧前胡素),香附(α -香附酮),牛膝(β -蜕皮甾酮、杯苋

甾酮),地龙(肌苷、尿苷)中各成分含量,结果发现绿原酸,龙胆苦苷,马钱苷酸,阿魏酸,苦杏仁苷,羟基红花黄色素 A,甘草苷,肌苷 8 种成分含量较高,其他成分含量均较低,不具有代表意义。因此,选择以上 8 种与药效相关联的化学成分共同控制身痛逐瘀汤的质量,可为其他经典名方物质基准及制剂质量的评价提供参考。

3.2 供试品提取溶剂和流动相的选择 供试品溶液制备时分别考察了水和不同体积分数(25%, 50%, 70%, 100%)甲醇对物质基准中有效成分的影响,综合考虑各待测成分的色谱峰峰形及分离度,最终选择 70% 甲醇为提取溶剂。流动相系统分别考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1% 磷酸水溶液、乙腈-0.5% 乙酸水溶液、乙腈-0.1% 磷酸水溶液等,结果表明乙腈-0.1% 磷酸水溶液在色谱峰峰形、分离度及出峰数量等方面较优。

3.3 检测波长的选择 身痛逐瘀汤所含药味众多、化学成分复杂,由于待测 10 种指标成分具有不同的最大吸收波长,同一检测波长难以保证每个成分的最佳吸收,进而会影响测定结果,故本实验采用波长切换法进行测定^[8]。采用 DAD 在 190 ~ 400 nm 处对 10 种成分进行全扫描,结果显示肌苷,马钱苷酸,绿原酸,苦杏仁苷,羟基红花黄色素 A,龙胆苦苷,阿魏酸, β -蜕皮甾酮,甘草苷,杯苋甾酮的最大吸收波长分别为 248, 235, 324, 210, 226, 274, 322, 247, 276, 247 nm。结合 HPLC 色谱图,最终设定各指标成分的检测波长为 248 nm(肌苷),235 nm(马钱苷酸),324 nm(绿原酸),220 nm(苦杏仁苷、羟基红花黄色素 A),274 nm(龙胆苦苷),247 nm(阿魏酸、甘草苷、杯苋甾酮和 β -蜕皮甾酮);但 β -蜕皮甾酮和杯苋甾酮的含量低,且仅存在于部分批次样品中,故未作为指标成分。

3.4 测定结果分析 同批身痛逐瘀汤物质基准中羟基红花黄色素 A 和龙胆苦苷、苦杏仁苷的含量相对较高,通过对样品进行 OPLS-DA 处理,结果发现 15 批身痛逐瘀汤物质基准在一些主要成分的含量上存在差异,其中甘草苷(源自甘草),阿魏酸(主要源自川芎、当归),龙胆苦苷(源自秦艽)以及羟基红花黄色素 A(源自红花)是区分不同批次样品质量的关键成分,但导致含量差异的主要因素可能是复方中各单味药的剂量不同和有效成分的水溶性不同。因此,提高身痛逐瘀汤质量的首要任务是重点控制上述 4 种成分的含量,可通过优选源于道地产区或者主产区的药材,减少批次间的质量差异,这

对于提高身痛逐瘀汤物质基准的质量一致性具有重要意义。同时,这也为确定经典名方物质基准及复方制剂的关键质量属性提供了依据,有利于建立中药质量控制溯源体系并保证质量控制的均一性。

[参考文献]

[1] 杨洪军,黄璐琦.经典名方的研发——中医药传承发展的突破口之一[J].中国现代中药,2018,20(7):775-779.

[2] 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.

[3] 刘晓霞,王继龙,魏舒畅,等.超滤对身痛逐瘀汤镇痛抗炎效果的影响[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(2):14-16.

[4] 阮洪生,刘树民.身痛逐瘀汤治疗骨伤科疾病临床研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(9):275-277.

[5] 阮洪生,刘树民.身痛逐瘀汤现代临床新用[J].中医学报,2013,28(3):435-437.

[6] 韦小双.冯兴华教授运用身痛逐瘀汤治疗痹病经验探析[D].北京:北京中医药大学,2012.

[7] 林林,刘广楨,郭东晓,等.UPLC波长切换法测定复方大青叶合剂中10种成分[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(12):47-51.

[8] 姜玉霞,李向阳,李振国.HPLC同时测定清肝利胆口服液液中7种成分[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(8):128-132.

[9] 李静,张青,肖春霞,等.HPLC波长切换法同时测定排毒养颜胶囊中10种成分[J].中草药,2018,49(20):4824-4830.

[10] 邱隆.中国历代度量衡单位量值表及说明[J].中国计量,2006(10):46-48,76.

[11] 潘玄玄,宋粉云,林秀莲,等.沉香化气丸的UPLC指纹图谱与化学模式识别[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(19):105-110.

[12] Bylesjö M, Rantalainen M, Cloarec O, et al. OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification[J]. J Chemometr, 2006, 20(8/10):341-351.

[13] 郝敏,陆兔林,毛春芹,等.3种温郁金根茎炮制品的UPLC指纹图谱与多成分含量测定研究[J].中国中药杂志,2018,43(11):2288-2294.

[14] 郭威,孙蓉,王亮,等.基于指纹图谱和OPLS-DA的越南和国产土茯苓差异性化合物探索[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(14):70-75.

[15] 曾鸿莲,刘振丽,宋志前,等.不同品种枳实HPLC指纹图谱及成分含量差异性研究[J].中国中药杂志,2016,41(17):3272-3278.

[16] 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,2015.

[17] 杨晓丽,张君利,王京峰,等.绿原酸抗肿瘤作用及机制研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(19):229-234.

[18] 纪亲龙,孔祥东,戚珊红,等.杯苋甾酮抑制破骨分化和促进成骨分化的双向作用治疗骨质疏松症[J].昆明医科大学学报,2018,39(5):21-28.

[19] 黄庆,李志武,马志国,等.地龙的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(13):220-226.

[20] 熊婷,封传华,李刚,等.高效液相色谱法测定跌打活血酊中羟基红花黄色素A和阿魏酸的含量[J].中南药学,2016,14(12):1365-1368.

[21] 牛凯,赵永见,张雷,等.苦杏仁苷联合羟基红花黄色素A对IL-1 β 诱导的大鼠椎间盘软骨终板细胞的影响[J].药学报,2014,49(8):1136-1142.

[22] 聂安政,林志健,王雨,等.秦艽化学成分及药理作用研究进展[J].中草药,2017,48(3):597-608.

[23] 苏国林,刘刚,刘育辰,等.甘草苷的提取纯化方法和药理作用研究进展[J].中国现代中药,2011,13(10):48-51.

[责任编辑 刘德文]