

经典名方阳和汤基准样品的HPLC指纹图谱分析

张泽康, 王昌海, 赵玥瑛, 张晴, 彭警, 杜守颖, 白洁*, 陆洋*
(北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

[摘要] 目的:建立经典名方阳和汤基准样品的高效液相色谱法(HPLC)指纹图谱,结合化学计量学方法对其质量进行评价,为阳和汤基准样品的质量控制提供参考。方法:采用HPLC建立阳和汤基准样品指纹图谱,使用ZORBAX SB-C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相选择乙腈(A)-0.05%磷酸水溶液(含0.05%三乙胺溶液)(B)梯度洗脱(0~5 min, 2%~3%A; 5~15 min, 3%~5%A; 15~65 min, 5%~30%A; 65~90 min, 30%~70%A),流速1.0 mL·min⁻¹,柱温35 °C,检测波长210、260 nm。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012版)并结合聚类分析、主成分分析与偏最小二乘法-判别分析对指纹图谱结果进行分析,评价不同批次阳和汤基准样品的质量差异,并寻找造成质量差异的主要化学成分。结果:建立了阳和汤基准样品的HPLC指纹图谱,确定了13个共有峰,并对各共有峰进行归属,其中2、8号峰来自熟地黄,10、11号峰来自肉桂,1、3~6号峰来自炒白芥子,13号峰来自麻黄,7、9、12号峰来自甘草。通过对照品指认了8个成分,分别为2号峰5-羟甲基糠醛、4号峰芥子碱硫氰酸盐、7号峰甘草苷、8号峰毛蕊花糖苷、10号峰肉桂酸、11号峰桂皮醛、12号峰甘草酸、13号峰盐酸麻黄碱。15批阳和汤基准样品的HPLC指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均>0.80;3种化学计量学方法均可将样品分为两类,筛选出了8种主要差异性成分,其中已指认出的有5-羟甲基糠醛、芥子碱硫氰酸盐、毛蕊花糖苷、盐酸麻黄碱。结论:建立的HPLC指纹图谱分析方法灵敏度高、稳定性强,基本体现了阳和汤基准样品的整体化学成分特征,可为该经典名方复方制剂的质量标准建立提供依据。

[关键词] 经典名方; 阳和汤; 基准样品; 高效液相色谱法(HPLC)指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析(PCA); 偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)

[中图分类号] R22;R28;C37;O657 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2023)10-0013-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220759 [增强出版附件] 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220816.1222.015.html>

[网络出版日期] 2022-08-16 14:20:51

HPLC Fingerprint Analysis of Benchmark Sample of Yanghetang

ZHANG Zekang, WANG Changhai, ZHAO Yueying, ZHANG Qing, PENG Jing, DU Shouying,
BAI Jie*, LU Yang*

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a high performance liquid chromatography(HPLC) fingerprint of Yanghetang benchmark sample, and evaluate its quality with chemometric methods, so as to provide a reference for the quality control of this benchmark sample. **Method:** HPLC was used to establish the fingerprint of Yanghetang benchmark sample with ZORBAX SB-C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm), the mobile phase was consisted of acetonitrile(A) -0.05% phosphoric acid aqueous solution (containing 0.05% triethylamine solution) (B) for gradient elution (0-5 min, 2%-3%A; 5-15 min, 3%-5%A; 15-65 min, 5%-30%A; 65-90 min, 30%-70%A), the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the column temperature was 35 °C, and the detection wavelength was 210, 260 nm. Traditional Chinese Medicine (TCM) Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation

[收稿日期] 2022-07-13

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82173989)

[第一作者] 张泽康,在读硕士,从事中药新剂型、新技术研究,E-mail:2557158263@qq.com

[通信作者] *白洁,博士,副教授,从事中药新剂型、新技术研究,Tel:010-84738657,E-mail:baijie22811@163.com;

*陆洋,博士,教授,从事中药新剂型、新技术研究,Tel:010-53912123,E-mail:landocean28@163.com

System (2012 edition) combined with cluster analysis, principal component analysis (PCA) and partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) were used to evaluate the quality differences between different batches of Yanghetang benchmark samples, and to find the main chemical components responsible for the quality differences. **Result:** HPLC fingerprint of Yanghetang benchmark sample was established, 13 common peaks were identified and attributed to each common peak, including peaks 2 and 8 from *Rehmanniae Radix Praeparata*, peaks 10 and 11 from *Cinnamomi Cortex*, peaks 1, 3-6 from fried *Sinapis Semen*, peak 13 from *Ephedrae Herba*, and peaks 7, 9, 12 from *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*. Eight of them were identified by comparing with control substance, which were 5-hydroxymethylfurfural (peak 2), sinapine thiocyanate (peak 4), glycyrrhizin (peak 7), verbascoside (peak 8), cinnamic acid (peak 10), cinnamaldehyde (peak 11), glycyrrhizic acid (peak 12) and ephedrine hydrochloride (peak 13). The similarities of the HPLC fingerprints of 15 batches of Yanghetang benchmark samples with the control fingerprint were all greater than 0.80. The three chemometric methods could classify the samples into two categories. Eight differential components were screened out, among which 5-hydroxymethylfurfural, sinapine thiocyanate, verbascoside and ephedrine hydrochloride were identified. **Conclusion:** The established fingerprint analysis method is accurate, stable and reproducible, which basically reflects the overall chemical composition of Yanghetang benchmark sample, and can provide a basis for establishment of quality standards for compound preparations of this famous classical formula.

[Keywords] famous classical formulas; Yanghetang; benchmark sample; high performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint; cluster analysis; principal component analysis (PCA); partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA)

阳和汤出自清代王洪绪《外科证治全生集》^[1],由熟地黄、鹿角胶、肉桂、炒白芥子、麻黄、姜炭、甘草7味中药组成,功效温阳补血、散寒通滞,主治阴疽。在现代临床中,阳和汤及其加减方常用于治疗恶性肿瘤,效果显著^[2-3]。《中药注册分类及申报资料要求》^[4]明确提出,为加强对古典医籍精华的梳理和挖掘,将中药注册分类中的第三类古代经典名方中药复方制剂细分为“3.1按古代经典名方目录管理的中药复方制剂”及“3.2其他来源于古代经典名方的中药复方制剂(以下简称‘3.2类’)”。其中3.2类包括未按古代经典名方目录管理的古代经典名方中药复方制剂和基于古代经典名方加减化裁的中药复方制剂,对阳和汤进行经典名方中药复方制剂开发具有一定的指导意义。

阳和汤基准样品是在提取工艺“尊古不泥古”的基础上,由其水煎液冷冻干燥制得。由于中药复方化学成分复杂,且其组方药材基原存在多品种、多产地的情况,使得质量控制难度较大。近年来对阳和汤的研究集中在临床应用及药理作用方面^[5-14],而关于其质量方面的研究较少,仅极少文献采用成分定量分析、薄层色谱定性鉴别等方法对方中部分药材进行了质量研究,但采用的分析手段较为常规且存在一定缺陷,如处方药味基原、饮片炮制方法、处方剂量等均缺乏考证,质量控制研究仅

从单味药材出发,缺乏对中药复方多成分、多靶点综合作用的考虑^[15-18]。

阳和汤组方药味众多,检测其中任何1种有效成分均不能代表其整体药效,而高效液相色谱法(HPLC)指纹图谱能全面呈现中药复方所包含的化学成分,是最常见的质量控制方法^[19-21];同时,化学计量学方法可以对指纹图谱中的信息进行综合分析和处理^[22],二者目前已被广泛用于经典名方的质量控制。基于此,本研究拟通过HPLC建立阳和汤基准样品指纹图谱,并对其进行相似度评价,同时结合聚类分析、主成分分析(PCA)及偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)等化学计量学方法评价批间质量差异,为阳和汤的基准样品质量标准建立和中药复方制剂开发提供参考。

1 材料

BSA224S型万分之一电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],JM-B100002型十万分之一电子天平(余姚市纪铭称重校验设备有限公司),陶瓷锅(体积1 L,长12 cm×宽12 cm×高10 cm,材质为高岭土/锂辉石,九龙家居陶瓷馆),H22-X3型九阳电陶炉(杭州九阳生活电器有限公司),UltiMate 3000型高效液相色谱仪[(赛默飞世尔科技(中国)有限公司,包含二极管阵列检测器(DAD)和Chromleon 7.2色谱工作站],FD-2A型真空冷冻

干燥机(北京博医康实验仪器有限公司)。

毛蕊花糖苷、桂皮醛、肉桂酸、芥子碱硫氰酸盐、盐酸麻黄碱、6-姜辣素、甘草苷和甘草酸铵对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为111530-201914、110710-202022、110786-201604、111702-202006、171241-201809、111833-202007、111610-201908、110731-202021,纯度依次为95.2%、98.7%、98.8%、99.0%、100.0%、99.3%、95.0%、96.2%),5-羟甲基糠醛对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号67-47-0,纯度 $\geq 98.0\%$),水为娃哈哈纯净水,乙腈、磷酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

饮片熟地黄、鹿角胶和药材肉桂、白芥子、麻黄、干姜和甘草均由健民药业集团股份有限公司提供,经北京中医药大学刘春生教授鉴定,分别为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* 的新鲜或干燥块根的炮制加工品、鹿科动物梅花鹿 *Cervus nippon* 已骨化的角或锯茸后翌年春季脱落的角基制成的固体胶、樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* 的干燥树皮、十字花科植物白芥 *Sinapis alba* 的干燥成熟种子、麻黄科植物草麻黄 *Ephedra sinica* 的干燥草质茎、姜科植物姜 *Zingiber officinale* 的干燥根茎、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 的干燥根和根茎,5味药材依照2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)(一部)相应项下饮片炮制要求,制成肉桂、炒白芥子、麻黄、姜炭及甘草饮片,各药材、饮片质量经本课题组前期检测均符合要求,采用随机数表法将不同批次饮片进行组合[姜炭、甘草饮片分别有13、10批,均不足15批次,故随机选定姜炭饮片2个批次(批号20210706、20210711)、甘草饮片5个批次(批号20210801~20210804、20210806)重复使用],饮片批号及产地组合信息见增强出版附加材料。

2 方法与结果

2.1 阳和汤基准样品的制备 《外科证治全生集》记载阳和汤原方为“熟地一两,鹿角胶三钱,肉桂一钱,白芥子二钱,麻黄五分,姜炭五分,生甘草一钱,治疗贴骨疽,鹤膝风等阴疽,如治乳癖和乳岩,加土贝五钱。”参照《中医名词术语选释》^[23]和《古今中药超大剂量应用集萃》^[24]等文献,折算阳和汤全方现代临床用药剂量。根据《古代经典名方中药复方制剂简化注册审批管理规定》中的相关要求^[25],经典名方的制备方法要与古代医籍中记载的一致。查阅《外科证治全生集》及不同年代记载阳和汤的书籍及相关文献,均未记录其具体的煎煮方法。因

此,基准样品的煎煮方式参照2009年版《医疗机构中药煎药室管理规范》的相关规定进行^[26]。鹿角胶处方用量11.2 g,作为胶类中药且属于极贵细药材,以烊化的方式加至基准样品煎液中,前期考察了鹿角胶加入前后对基准样品指纹图谱的影响,结果表明鹿角胶烊化后加入与否,基准样品指纹图谱相似度均为1.00,各特征峰峰面积差异均无统计学意义,故在实验室研究过程中选择不加入鹿角胶。分别称取熟地黄37.3 g、肉桂3.7 g、炒白芥子7.5 g、麻黄1.9 g、姜炭1.9 g、甘草3.7 g,加入约8倍量(450 mL)水,武火(电陶炉火锅档600 W)加热煮沸后,文火(电陶炉火锅档200 W)煎煮30 min,放置待煎液温度降至50℃左右,300目无纺布过滤,药渣再加6倍量水(336 mL),同法煎煮30 min,300目无纺布过滤,合并2次滤液,放凉后加水至600 mL,精密移取煎液5 mL于25 mL西林瓶中,置于-80℃预冷2 h的冷冻干燥机,冻干温度-80℃,真空度(5 \pm 1) Pa,冷冻干燥48 h,取出压盖密封,得阳和汤基准样品冻干粉S1~S15。同法制备单味饮片单煎液及缺单味饮片阴性样品。

2.2 阳和汤基准样品指纹图谱检测方法的建立

2.2.1 色谱条件 采用ZORBAX SB-C₁₈色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m),流动相选择乙腈(A)-0.05%磷酸水溶液(含0.05%三乙胺溶液)(B)梯度洗脱(0~5 min, 2%~3%A; 5~15 min, 3%~5%A; 15~65 min, 5%~30%A; 65~90 min, 30%~70%A),流速1.0 mL \cdot min⁻¹,柱温35℃,检测波长210、260 nm,进样量10 μ L。

2.2.2 混合对照品溶液的制备 精密称定各对照品适量,加50%甲醇定容至刻度,摇匀,得5-羟甲基糠醛、毛蕊花糖苷、桂皮醛、肉桂酸、芥子碱硫氰酸盐、盐酸麻黄碱、6-姜辣素、甘草苷、甘草酸质量浓度分别为17.9、17.72、22.64、13.47、19.88、19.78、20.06、15.60、14.60 mg \cdot L⁻¹的混合对照品溶液。

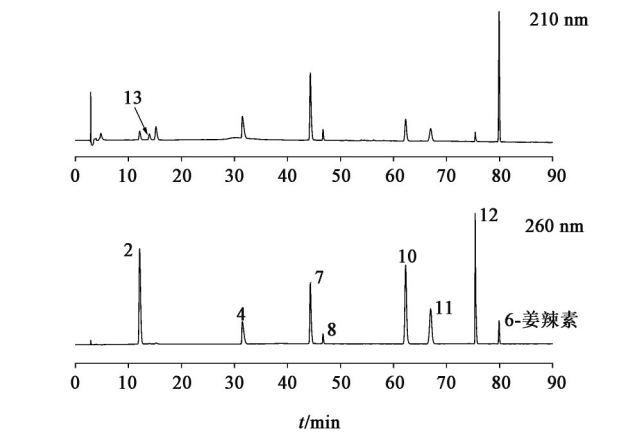
2.2.3 供试品溶液的制备 精密称取阳和汤基准样品冻干粉约0.15 g,精密加入50%甲醇10 mL,摇匀,室温静置10 min,于10 000 r \cdot min⁻¹离心5 min(离心半径5.79 cm),取上清液过0.22 μ m微孔滤膜,即得。

2.2.4 精密度试验 取样品S1的供试品溶液适量,按2.2.1项下色谱条件连续进样6次,以11号峰(桂皮醛)为参照,计算各共有峰相对保留时间、相对峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为 $<0.2\%$ 、 $<2.6\%$,表明仪器精密度良好。

2.2.5 重复性试验 取样品 S1 适量,按 2.2.3 项下方法制备 6 份供试品溶液,按 2.2.1 项下条件测定,以 11 号峰(桂皮醛)为参照,计算各共有峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD 分别为 <1.0%、<1.4%,表明该方法重复性良好。

2.2.6 稳定性试验 取样品 S1 的供试品溶液适量,分别于制备后 0、2、4、6、8、10、12、24 h 按 2.2.1 项下条件测定,以 11 号峰为参照,计算各共有峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD 分别为 <0.7%、<3.1%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3 阳和汤指纹图谱的建立 取 15 批阳和汤基准样品的供试品溶液适量,按 2.2.1 项下色谱条件测定,将色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版),以样品 S1 为参照图谱,时间窗设为 0.1 min,采用中位数法进行全谱峰匹配,生成阳和汤 HPLC 指纹图谱及对照指纹图谱,样品 S1~S15 的指纹图谱及其共有模式见增强出版附加材料。结果共标定 13 个共有峰,通过对照品指认,确定了其中 8 个共有峰,见图 1。



注:2.5-羟甲基糠醛;4.芥子碱硫酸盐;7.甘草苷;8.毛蕊花糖苷;10.肉桂酸;11.桂皮醛;12.甘草酸;13.盐酸麻黄碱(图2同)

图1 混合对照品的 HPLC

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances

2.4 共有峰的归属 精密量取阳和汤基准样品,以及缺熟地黄、缺肉桂、缺炒白芥子、缺麻黄、缺姜炭、缺甘草的阴性样品适量,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,记录色谱图,见图 2。对 13 个共有峰进行归属,其中 2、8 号峰来自熟地黄,10、11 号峰来自肉桂,1、3~6 号峰来自炒白芥子,13 号峰来自麻黄,7、9、12 号峰来自甘草。

2.5 相似度分析 样品 S1~S15 与其对照指纹图谱的相似度分别为 0.860、0.917、0.918、0.929、0.838、0.855、0.958、0.983、0.908、0.971、0.946、0.926、

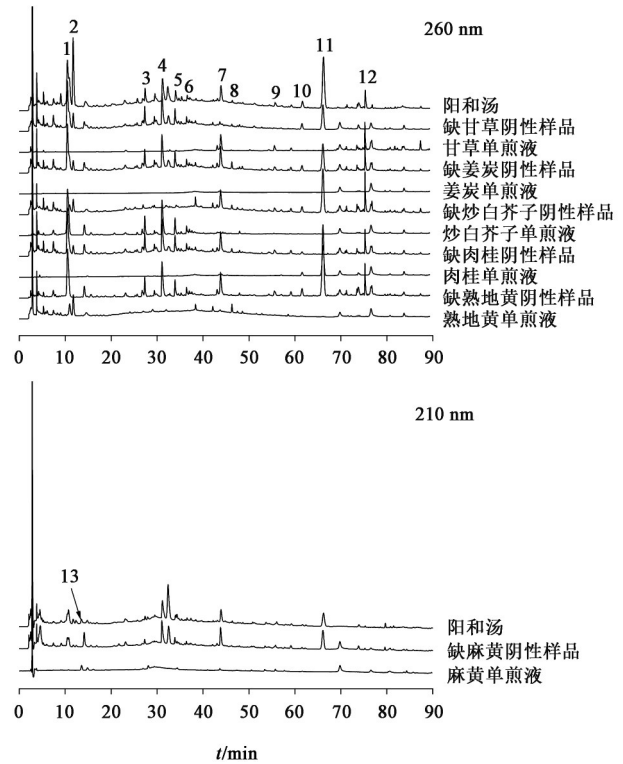


图2 阳和汤基准样品的特征峰归属

Fig. 2 Attribution of characteristic peaks in benchmark samples of Yanghetang

0.912、0.905、0.879。其中样品 S1、S5、S6、S15 的相似度较低,结合指纹图谱发现,5-羟甲基糠醛峰面积偏高(样品 S1、S5)或偏低(样品 S6、S15),溯源本课题组前期检测的熟地黄饮片中 5-羟甲基糠醛含量测定数值,发现对应批次的熟地黄饮片中 5-羟甲基糠醛含量也明显高于或低于 5-羟甲基糠醛含量均值。熟地黄以补血滋阴为主,其中活性成分 5-羟甲基糠醛被认为是快速区分生地黄与熟地黄的标志物^[27]。现代药理研究表明,5-羟甲基糠醛在治疗镰状细胞贫血症和改善血液流变学方面有一定疗效^[28-29]。此外,不同批次、不同产地熟地黄间的 5-羟甲基糠醛含量差异较大,甚至同一产地不同采购地点该成分含量差异也较大^[30-32]。综上分析,熟地黄作为阳和汤的君药,处方占比大,说明该饮片的质量差异性能够直接影响阳和汤基准样品的指纹图谱相似度评价。

2.6 聚类分析 采用 SPSS 20.0 对 15 批阳和汤基准样品共有峰的相对峰面积进行聚类分析,见增强出版附加材料。结果发现当欧氏距离为 3 时,15 批样品聚为两类,样品 S1~S10、S14、S15 为第 1 类,样品 S11~S13 为第 2 类;当欧氏距离为 2 时,15 批基准样品聚为三类,样品 S1、S5、S14 为第 1 类,样品

S2~S4、S6~S10、S15为第2类,样品S11~S13为第3类。说明不同批次阳和汤基准样品存在质量差异。对15批熟地黄饮片共有峰的相对峰面积进行聚类分析,见增强出版附加材料。结果发现当欧氏距离为0.2时,15批熟地黄饮片聚为三类,样品S1、S5、S14为第1类,样品S3、S4、S6~S10、S15为第2类,样品S2、S11~S13为第3类,其聚类结果与15批基准样品的聚类结果一致性较高。将阳和汤组方中其他单味饮片使用同种聚类方法,聚类结果均与15批基准样品的聚类结果差异较大。说明基准样品的质量与熟地黄饮片的质量属性关系紧密,与相似度结果互相印证。

2.7 PCA 将15批基准样品的13个共有峰峰面积导入SIMCA-P 14.1软件进行PCA处理,其得分矩阵图见增强出版附加材料。结果发现15批基准样品分为2组,样品S1~S10、S14、S15为第1组,样品S11~S13为第2组,与聚类分析结果一致。主成分特征值与方差贡献率见表1。以特征值>1为标准,共确定4个主成分,累计贡献率达85.701%,能够较好地反映基准样品成分特征群。对主成分载荷值进行计算,并根据公式综合得分(F)= $0.39675F_1+0.18189F_2+0.16552F_3+0.11285F_4$ ($F_1、F_2、F_3、F_4$ 为4个主成分的得分)计算 F ,见表2。结果发现不同批次基准样品综合得分-1.14~2.08分,若以13个共有峰为综合评价指标,样品S11~S13的总体评分较高,说明13个共有峰在这3批基准样品中有较大的权重值,对主成分的贡献率最大。

表1 15批阳和汤基准样品的主成分特征值和贡献率

Table 1 Principal component eigenvalues and contribution rates of 15 batches of Yanghetang benchmark samples

主成分	特征值	贡献率/%	累积贡献率/%
1	5.158	39.675	39.675
2	2.365	18.189	57.864
3	2.152	16.552	74.415
4	1.467	11.285	85.701
5	0.681	5.240	90.940
6	0.371	2.857	93.797
7	0.327	2.513	96.311
8	0.229	1.762	98.073
9	0.131	1.008	99.081
10	0.087	0.670	99.751
11	0.020	0.157	99.908
12	0.012	0.090	99.997
13	0.000	0.003	100.000

表2 不同批次阳和汤基准样品的主成分得分和综合得分

Table 2 Principal component scores and comprehensive scores of benchmark samples of Yanghetang from different batches

编号	F_1	F_2	F_3	F_4	F	排序
S1	-2.40	-0.80	1.87	-1.05	-0.91	12
S2	1.80	-2.76	0.29	1.33	0.41	6
S3	0.06	1.94	0.40	1.63	0.63	5
S4	0.42	2.66	-0.01	0.79	0.74	3
S5	-1.19	0.07	2.97	1.18	0.17	7
S6	-2.13	-0.37	-1.89	0.84	-1.13	14
S7	-1.48	-0.23	-0.40	-1.14	-0.82	11
S8	-2.51	1.23	-1.53	0.05	-1.02	13
S9	0.56	-0.99	-0.39	1.00	0.09	8
S10	-1.37	-2.84	0.06	-0.85	-1.14	15
S11	2.80	0.59	-1.83	-2.08	0.68	4
S12	4.34	0.86	1.41	-0.24	2.08	1
S13	3.79	-0.45	0.05	-0.64	1.36	2
S14	-2.31	1.37	1.14	-1.84	-0.69	10
S15	-0.37	-0.27	-2.15	1.03	-0.44	9

2.8 PLS-DA 将15批基准样品的13个共有峰峰面积导入SIMCA-P 14.1软件进行PLS-DA处理,其得分矩阵图见增强出版附加材料。结果发现15批样品聚为三类,其中样品S1、S5、S14为第1类,样品S2~S4、S6~S10、S15为第2类,样品S11~S13为第3类,分离显著,与聚类分析结果一致。图3中的点离原点越远,表明对应色谱峰权重越大,结合变量重要性投影(VIP)值筛选标志性差异成分,见图4。结果筛选出了8个差异性成分,按VIP值大小排序分别为色谱峰1~6、8、13。说明这8个成分是影响阳和汤基准样品质量的差异性成分,是阳和汤基准样品质量稳定的关键。

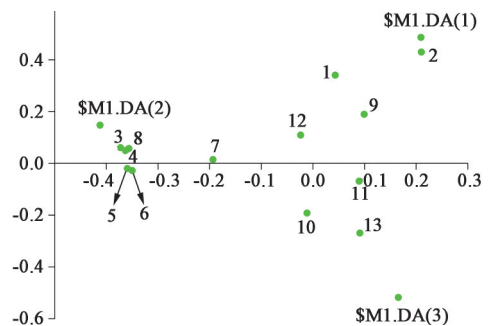


图3 阳和汤基准样品的PLS-DA载荷散点

Fig. 3 PLS-DA loading plots of Yanghetang benchmark samples

3 讨论与总结

3.1 鹿角胶对阳和汤基准样品的影响 本课题组

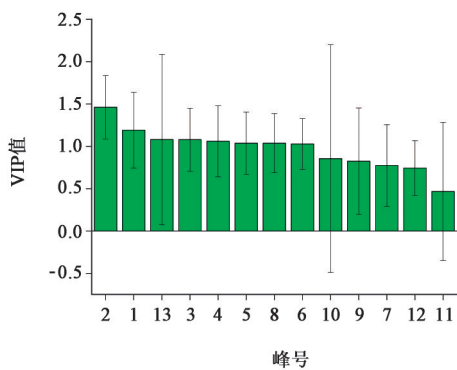


图4 阳和汤基准样品 PLS-DA 模型的VIP值分析

Fig. 4 VIP values of PLS-DA model of Yanghetang benchmark samples

在前期研究中明确了鹿角胶烊化后加入与否对基准样品并无影响,建立的色谱条件和供试品溶液制备方法既能全面反映全方色谱信息,又能稳定考察其质量。此外,鹿角胶中主要成分为氨基酸^[33],属于大极性分子,表征难度大,不具备HPLC紫外检测的结构特点^[20,34-35],故在实验室研究过程中选择不加入鹿角胶来制备基准样品。

3.2 供试品溶液制备方法考察 本研究对提取溶剂(水、25%甲醇、50%甲醇、75%甲醇)、提取时间(5、10、15、20 min)和溶剂用量(5、10、15、20 mL)等影响因素进行了考察,从提取化学成分的全面性、操作便捷性及方法稳定性等方面考虑,确定供试品溶液最佳制备方法为加50%甲醇10 mL,摇匀后室温静置10 min。

3.3 色谱条件分析 本研究分别考察了在乙腈-水、甲醇-水、甲醇-0.05%磷酸水溶液(含0.05%三乙胺溶液)及乙腈-0.05%磷酸水溶液(含0.05%三乙胺溶液)4种不同的流动相体系和比例下色谱峰分离情况,结果发现乙腈-0.05%磷酸水溶液(含0.05%三乙胺溶液)为流动相时,基线平稳、色谱峰分离良好;同时,对检测波长进行了考察,结果全波长扫描显示,在260 nm时各成分色谱行为良好,在210 nm时盐酸麻黄碱色谱峰响应较好,杂质干扰小;另外,考察了柱温(25、30、35 °C)对色谱峰分离度的影响,结果发现在35 °C时,各色谱峰分离度较好。

3.4 指标成分的选择 指标成分的选择应具有代表性并能全面反映复方质量,从而保证经典名方的质量^[36-38]。阳和汤由熟地黄、鹿角胶、肉桂等7味中药组成,其中熟地黄、鹿角胶为君药,具有养血滋阴、填精益髓的功效。肉桂、姜炭为臣药,肉桂大辛大热,既能温阳还能行血通脉,姜炭既能温阳又可通利血脉。白芥子、麻黄为佐药,白芥子性温味辛,

除皮里膜外之痰,麻黄宣肺解表。甘草为使药,解毒并调和诸药。诸药合用,温阳补血、寒散痰消。本研究通过对照品比对,从15批阳和汤基准样品中指出了8个共有成分,其中包括熟地黄中主要有效成分5-羟甲基糠醛、毛蕊花糖苷,肉桂中主要有效成分桂皮醛、肉桂酸,白芥子中主要有效成分芥子碱硫氰酸盐,麻黄中主要有效成分盐酸麻黄碱,甘草中主要有效成分甘草苷、甘草酸铵。5-羟甲基糠醛是快速区分生地黄与熟地黄的潜在质量标志物,结合补血止血的药理作用,能被选择为指标成分之一^[39-42];毛蕊花糖苷为2015年版《中国药典》所规定的地黄与熟地黄的指标性成分。肉桂中主要含有桂皮醛、肉桂酸等成分,具有解热、镇痛、抑菌、抗病毒作用^[43-45]。芥子碱硫氰酸盐、盐酸麻黄碱、甘草苷、甘草酸铵分别为2020年版《中国药典》白芥子、麻黄和甘草项下规定的指标性成分。然而,本研究亦存在不足之处,地黄苷D、盐酸伪麻黄碱分别是2020年版《中国药典》熟地黄、麻黄项下的指标性成分,在全波长扫描过程中发现两者最佳吸收波长一致,重新建立色谱条件后,这2种成分出峰时间仍十分接近且均属于末端吸收,未能检测;姜炭中的6-姜辣素在2.4项下共有峰归属中未被指认,但其对照品在上述色谱条件下可出峰,分析原因可能是姜酚类物质化学性质活泼,在炒炭高温过程中极其不稳定,随炮制时间的增加和温度的升高会逐渐减少^[46-51]。此外,姜炭的处方用量占比很低,可能是由于在本研究的实验条件下,姜炭中的6-姜辣素含量较低达不到定量限或洗脱程序不适合等因素导致。针对上述问题,本课题组后续将采用液相色谱-质谱法(LC-MS)、气相色谱-质谱法(GC-MS)、薄层色谱法(TLC)等技术进行分析,以期对阳和汤进行全方位的质量评价。

3.5 总结 本研究借鉴经典名方中的相关概念^[52-55],建立的阳和汤基准样品HPLC指纹图谱可较为全面地反映该方的化学成分信息,且检测方法简便可行、重复性好;结合化学计量学方法对指纹图谱信息进行综合评价,使分析结果更加科学、全面,可为完善阳和汤基准样品及后续复方制剂的质量控制标准提供实验依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 王洪绪. 外科全生集:卷四[M]. 上海:上海卫生出版社,1956:2.

- [2] 韩懿存,武颖烁,尚艺婉,等. 阳和汤治疗恶性肿瘤的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(7): 109-117.
- [3] 姚嘉良,安君君,杨亚琴,等. 阳和汤治疗恶性肿瘤的临床应用与实验研究进展[J]. 中国中医药现代远程教育, 2018, 16(11):156-158.
- [4] 国家药品监督管理局. 关于发布《中药注册分类及申报资料要求》的通告(2020年第68号)[EB/OL]. (2020-09-27)[2022-07-12]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/qtggtg/20200928164311143.html>.
- [5] 陈晶,刘欣欣,李瑒,等. 阳和汤的临床应用和基础研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(8): 10-13.
- [6] 任翠翠,叶凯,余骁,等. 基于p38/p-STAT1(s727)信号通路探讨阳和汤对人乳腺癌细胞的影响[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(9):112-115, 272.
- [7] 孙忠强. 阳和汤加减合鳖甲煎丸治疗乳腺结节验案[J]. 中国民间疗法, 2021, 29(17):94-98.
- [8] 张理卓. 加味阳和汤治疗乳腺癌骨转移的临床疗效[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(27):158-159.
- [9] 郭建清. 分析阳和汤治疗早期糖尿病足的临床价值[J]. 糖尿病新世界, 2021, 24(3):186-188.
- [10] 龙念,梁子聪. 阳和汤联合中医护理治疗早期糖尿病足(阳虚寒凝证)的疗效观察[J]. 黔南民族医学学报, 2019, 32(1):63-65.
- [11] 曲争艳,张利敏,率中泰. 加味阳和汤治疗心力衰竭20例[J]. 光明中医, 2016, 31(19):2822-2825.
- [12] 卢霞,刘凯. 阳和汤联合化疗治疗惰性淋巴瘤30例疗效观察[J]. 湖南中医杂志, 2016, 32(5):62-64.
- [13] 高伟华,李玉杰,杨鸿冉,等. 加味阳和汤对膝骨性关节炎软骨细胞凋亡的影响研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2021, 29(1):1-5, 10.
- [14] 洪振强,高弘建,何俊君,等. 阳和汤对兔膝关节炎木瓜蛋白酶模型IL-1、TNF- α 的影响[J]. 康复学报, 2020, 30(4):293-298.
- [15] 窦建卫,尚荣国,彭湃,等. 提高阳和汤质量标准研究[J]. 中医药信息, 2018, 35(1):27-29.
- [16] 窦建卫,朱宇红,王红英,等. 阳和汤的质量标准研究[J]. 陕西中医, 2017, 38(11):1598-1599.
- [17] 朱宇红,刘甲平,尚荣国,等. 阳和汤质量控制研究[J]. 陕西中医, 2017, 38(9):1286-1287, 1297.
- [18] 任晋茹,李康乐,尚荣国,等. 高效液相色谱法测定阳和汤中毛蕊花糖苷和甘草苷两种成分[J]. 西部中医药, 2019, 32(12):20-22.
- [19] 李宝鑫,郝丽霞,代云桃,等. 基于含量测定和指纹图谱的不同基原地骨皮药材异同点考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(24):179-185.
- [20] 崔锦鹏,耿晓桐,程梦娟,等. 基于指纹图谱及抗氧化活性考察不同杀青方法地黄叶的质量特征[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(23):197-204.
- [21] 姜文月,韩淑丽,唐明哲,等. 贞芪扶正颗粒HPLC指纹图谱与其增强免疫功能的谱效关系分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(8):123-130.
- [22] 郑振兴,胡瀚文,曾利,等. 基于HPLC指纹图谱结合化学计量学评价不同产地佛手药材质量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(21):174-180.
- [23] 广东中医学院,中医研究院. 中医名词术语选释[M]. 北京:人民卫生出版社, 1973:509.
- [24] 许国振,谢守敬. 古今中药超大剂量应用集萃[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2005.
- [25] 国家药品监督管理局. 关于发布古代经典名方中药复方制剂简化注册审批管理规定的公告(2018年第27号)[EB/OL]. (2018-05-29)[2022-07-12]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/qtggtg/20180601163901361.html>.
- [26] 国家中医药管理局,中华人民共和国卫生部. 关于印发医疗机构中药煎药室管理规范的通知(国中医药发[2009]3号)[J]. 中华人民共和国卫生部公报, 2009(6):29-31.
- [27] 周丽,徐金娣,毛茜,等. 地黄加工炮制研究新进展及展望[J]. 中药材, 2016, 39(5):1184-1190.
- [28] XU G G, PAGARE P P, GHATGE M S, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of ester and ether derivatives of antisickling agent 5-HMF for the treatment of sickle cell disease[J]. Mol Pharm, 2017, 14(10):3499-3511.
- [29] LIN A S, QIAN K, USAMI Y, et al. 5-Hydroxymethyl-2-furfural, a clinical trials agent for sickle cell anemia, and its mono/di-glucosides from classically processed steamed Rehmanniae Radix[J]. J Nat Med, 2008, 62(2):164-167.
- [30] 黄洪新,徐道华,刘俊臣,等. 地黄炮制前后5-羟甲基糠醛含量的研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(4):938-939.
- [31] 王梅,王越欣,武英茹,等. 5-羟甲基糠醛在中药加工过程中的变化及药理作用研究概况[J]. 药物评价研究, 2020, 43(11):2319-2327.
- [32] 石岩. 不同种植产地地黄中5-羟甲基糠醛的含量测定[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(61):204-205.
- [33] 李娜,胡亚楠,王晓雪,等. 鹿角胶化学成分、药理作用及质量控制研究进展[J]. 中药材, 2021, 44(7):1777-1783.
- [34] 彭梅梅,郭爽,陈琪,等. 基于特征图谱和网络药理学的经典名方黄连汤质量标志物(Q-Marker)预测分析[J]. 中草药, 2021, 52(18):5514-5523.
- [35] 万鑫浩,朱卫丰,杨丽娜,等. 经典名方桂枝加葛根汤

- 的基准样品量值传递分析[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(9):2430-2439.
- [36] 王彦,高艳,罗菊元,等. 泻白散的物质基准量值传递分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(21):1-9.
- [37] 毕嘉谣,田湾湾,张翼,等. 经典名方易黄汤物质基准的量值传递分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(16):24-31.
- [38] 薛晓霞,靳如娜,王学圆,等. 经典名方二冬汤基准样品的指标成分含量测定及量值传递规律探索[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(11):1-7.
- [39] 杜珂,高晓霞,王锋,等. 基于药效物质基础的熟地黄质-效评价研究进展[J]. 中草药, 2019, 50(6):1477-1484.
- [40] 杨雨. 地黄炮制品成分分析的研究进展[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(7):1332-1335.
- [41] 周丽,徐金娣,毛茜,等. 地黄加工炮制研究新进展及展望[J]. 中药材, 2016, 39(5):1184-1190.
- [42] 陈金鹏,张克霞,刘毅,等. 地黄化学成分和药理作用的研究进展[J]. 中草药, 2021, 52(6):1772-1784.
- [43] 高铭哲,李婷,田晨琪,等. 肉桂化学成分与药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2021, 17(11):201-205.
- [44] 杨亚玲,罗碧,张红,等. 肉桂质量研究进展[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(12):2792-2799.
- [45] 邓淑蓉,潘宇政. 肉桂主要化学成分及药理作用研究概况[J]. 现代中西医结合杂志, 2018, 27(4):448-451.
- [46] 杜晶,黄传辉. 姜炭的研究进展[J]. 云南化工, 2021, 48(2):8-11.
- [47] 张永鑫,李俊松,陈丽华,等. 高效液相色谱法同时测定姜及其不同炮制品中5种姜辣素的含量[J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(6):471-474.
- [48] 于江泳,陈求芳,卢国勇. 运用HPLC结合PCA技术对不同炮制程度的姜炭中5个姜辣素成分的含量比较研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(21):4200-4204.
- [49] 孙璐,王萌,赵晓燕,等. 加工过程对生姜主要成分、功效和应用影响的研究进展[J]. 粮油食品科技, 2021, 29(2):193-199.
- [50] 蒋苏贞,宓穗卿,王宁生. 姜辣素的化学成分研究概述[J]. 中药新药与临床药理, 2006, 17(5):386-389.
- [51] 石宇华. 干姜质量标准及干姜、炮姜和姜炭的化学成分比较研究[D]. 成都:成都中医药大学, 2008.
- [52] 樊启猛,贺鹏,李海英,等. 经典名方基准样品研制的关键技术分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(15):202-209.
- [53] 王延涛,王春艳,齐晓丹,等. 经典名方两地汤基准样品的质量标准建立[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(20):27-36.
- [54] 吴革林,滕菲,杨丹,等. 经典名方温经汤的基准样品特征图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(22):7-14.
- [55] 李明明,朱志军,党晓月,等. 经典名方温胆汤物质基准量值传递分析[J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(12):1225-1231, 1258.
- [责任编辑 刘德文]