

经典名方小承气汤物质基准的HPLC指纹图谱分析

孟岩, 李煜仪, 单家明, 陈海芳, 黄小英, 杨明, 杨武亮*
(江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

[摘要] 目的:建立小承气汤物质基准的高效液相色谱法(HPLC)指纹图谱,结合化学模式识别方法对其质量进行分析与评价。方法:采用Diamonsil C₁₈色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm),流动相甲醇(A)-0.1%磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~60 min, 20%~90%A; 60~70 min, 90%~100%A),流速1 mL·min⁻¹,柱温25 °C,检测波长254 nm。利用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012版)软件对15批小承气汤物质基准的HPLC指纹图谱进行相似度评价,同时,采用聚类分析、主成分分析及正交偏最小二乘法-判别分析对指纹图谱数据进行分析,评价不同批次间小承气汤物质基准的质量差异,并找寻造成批间质量差异的主要化学成分。结果:建立了小承气汤物质基准的HPLC指纹图谱,确定了31个共有峰,并对各共有峰进行药材归属,通过与对照品比对指认了其中18个成分;15批小承气汤物质基准的HPLC指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均>0.92;3种化学模式识别方法均可将样品分为两类;筛选出了包括大黄酸,大黄酚-8-O-β-D-葡萄糖苷,芦荟大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷,番泻苷A,大黄酚-1-O-β-D-葡萄糖苷,大黄酸-8-O-葡萄糖苷在内的9种主要差异成分。结论:建立的指纹图谱分析方法灵敏度高、稳定性强、数据准确可靠,基本体现了小承气汤物质基准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; 小承气汤; 物质基准; 指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析; 高效液相色谱法(HPLC)

[中图分类号] R22;R289;R917;R28;O657.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)04-0130-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202449

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20201019.1635.004.html>

[网络出版日期] 2020-10-20 11:26

HPLC Fingerprint Analysis of Substance Benchmark of Xiao Chengqitang

MENG Yan, LI Wu-yi, SHAN Jia-ming, CHEN Hai-fang, HUANG Xiao-ying,
YANG Ming, YANG Wu-liang*

(Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ministry of Education,
Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint of the substance benchmark of Xiao Chengqitang and evaluate its quality with chemical pattern recognition method. **Method:** Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm×150 mm, 5 μm) was used, mobile phase was consisted of methanol (A) -0.1% phosphoric acid solution (B) for gradient elution (0-60 min, 20%-90%A; 60-70 min, 90%-100%A), the flow rate was 1 mL·min⁻¹, the column temperature was 25 °C, and the detection wavelength was 254 nm. The similarity evaluation system of chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine (2012 edition) was used to evaluate the similarity of HPLC fingerprint of 15 batches of substance benchmark of Xiao Chengqitang, and the chromatographic data were analyzed by cluster analysis, principal component analysis and orthogonal partial least squares-discriminant analysis, in order to evaluate the quality difference between different batches of substance benchmarks of Xiao Chengqitang and find out the main chemical components that caused the quality difference. **Result:** The HPLC fingerprint of Xiao Chengqitang substance benchmarks was

[收稿日期] 20200818(020)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81760680,81460575)

[第一作者] 孟岩,在读硕士,从事中药药效物质基础与质量评价研究,E-mail:450220051@qq.com

[通信作者] *杨武亮,教授,从事中药质量评价与新药研究,Tel:0791-87118659,E-mail:yangwuliang@163.com

established, 31 common peaks were identified, and 18 components were identified by comparing with the reference substances. The similarities of 15 batches of HPLC fingerprint of Xiao Chengqitang substance benchmarks were >0.92. The samples could be divided into two categories by three chemical pattern recognition methods. Nine main components leading to the quality discrepancy of samples between batches were screened out, including rhein, chrysophanol-8-*O*- β -*D*-glucoside, aloe-emodin-8-*O*- β -*D*-glucoside, sennoside A, chrysophanol-1-*O*- β -*D*-glucoside, rhein-8-*O*-glucoside and others. **Conclusion:** The established fingerprint analysis method is accurate, stable and reproducible, which basically reflects the overall chemical composition characteristics of Xiao Chengqitang, and can be used for the quality control of Xiao Chengqitang preparations.

[Key words] famous classical formulas; Xiao Chengqitang; substance benchmarks; fingerprint; cluster analysis; principal component analysis; high performance liquid chromatography (HPLC)

小承气汤出自东汉·张仲景著《伤寒论》^[1],由大黄(酒洗)四两、厚朴(炙,去皮)二两、枳实(大者,炙)三枚组成,功效轻下热结、除满消痞,常用于治疗阳明腑实轻证,现被收录于《古代经典名方目录(第一批)》^[2],已成为经典名方制剂研究的重要内容。

经典名方制剂研制主要分为经典名方物质基准研制和制剂研制2个阶段,经典名方物质基准是指依照古代医籍记载方法制得的中药药用物质的标准,其主要作用在于为制剂研制阶段提供参照,保证现代制剂与传统中医临床药用物质关键质量属性的一致性,从而使经典名方制剂兼具现代制剂使用便捷和传统经方“效如桴鼓”两方面的优点^[3-4]。因此,如何实现经典名方物质基准质量控制技术的突破,以建立起规范、完善的质量标准体系,是经典名方制剂研制面临的关键问题。小承气汤物质基准是在提取工艺尊古的基础上,由其煎液冷冻干燥制得,由于其化学成分复杂,且组方饮片的药材基原均为多品种多产地,使得质量控制难度较大。近年来对于小承气汤的研究主要集中在临床应用及药理作用方面,其中大部分是对肠梗阻、术后胃肠动力障碍患者临床疗效的研究以及治疗机制的探讨^[5-7]。而关于小承气汤质量方面的研究内容较少,采用的分析手段也较为常规,一般为多成分定量分析^[8]、薄层色谱定性鉴别^[9]等;另外,也有对小承气汤指纹图谱的研究,如王其田等^[10]建立了小承气汤高效液相色谱法(HPLC)指纹图谱,确定了10个共有峰并对各共有峰进行了药材归属;范妙璇^[11]建立小承气汤HPLC指纹图谱的测定方法,得到了包含27个色谱峰的小承气汤特征图谱,并结合HPLC-MS技术对图谱中包含的化学成分进行定性分析和指认。但上述研究均存在一定缺陷,如实验用小承气汤均为自制,处方药味基原、饮片炮制方法、处方

剂量等均缺乏考证,指纹图谱研究中未利用图谱涵盖的大量化学信息对药物质量进行综合评价等。

中药指纹图谱可以科学、系统、全面地反映中药的复杂化学成分组成^[12],化学模式识别技术可以将多个指标进行综合、降维和分类分析,对指纹图谱中的信息进行表达、识别和处理^[13],二者结合可以更加系统、全面地评价中药的质量,目前已被广泛用于经典名方质量控制。基于此,本实验拟建立小承气汤物质基准的HPLC指纹图谱,并对其进行相似度评价,同时结合聚类分析(HCA),主成分分析(PCA)及正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)等化学模式识别方法评价各批次样品间的质量差异,为完善小承气汤物质基准的质量标准和实现后续相关制剂的深度质量控制提供依据。

1 材料

1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司),BT224S型1/1万电子天平和BT25S型1/10万电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],H22-X3型电陶炉(九阳股份有限公司),SJIA-5FE型冷冻干燥机(宁波市双嘉仪器有限公司)。

芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、柚皮苷、新橙皮苷、厚朴酚、和厚朴酚和番泻苷A对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110795-201710,110757-201607,110756-201913,110796-201922,110758-201817,110772-201815,111857-201804,110729-201015,110730-201905,110824-201702,纯度依次为98.3%,99.3%,96.0%,99.4%,99.2%,91.7%,99.4%,99.0%,99.8%,95.2%),芦荟大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、芦荟大黄素-3-(羟甲基)-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、大黄酸-8-*O*-葡萄糖苷、大黄酚-1-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、大黄酚-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、大黄素甲醚-1-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷

对照品(成都普思生物科技股份有限公司,批号分别为 PS010709, PS010661, PS011174, PS010714, PS010712, PS010713, PS010715, PS010710, 纯度均>98%),水为双蒸水,甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。大黄(*Rheum palmatum*),厚朴(*Magnolia officinalis*),枳壳(*Citrus aurantium*)均由江西药都樟

树制药有限公司提供,经江西中医药大学药用植物学科组赖学文教授鉴定,依照2020年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)(一部)各药材项下饮片炮制要求,分别制成大黄、姜厚朴及麸炒枳壳,各饮片质量经本课题组前期检测均符合要求,药材产地信息见表1。

表1 15批小承气汤物质基准组方药材的产地信息

Table 1 Origin information of 15 batches of decoction pieces in Xiao Chengqitang substance benchmarks

物质基准编号	大黄	厚朴	枳壳
S1	甘肃礼县	湖北省恩施咸丰县忠堡镇	江西新干
S2	甘肃礼县	湖北省恩施咸丰县白果坝乡	江西新干
S3	甘肃礼县	湖北恩施咸丰县	江西新干
S4	甘肃礼县	湖北省利川市	江西新干
S5	甘肃礼县白河镇	湖北恩施咸丰县	江西新干
S6	甘肃礼县上坪乡	湖北恩施咸丰县	江西樟树市
S7	甘肃礼县	四川省平武县水晶镇	江西樟树市
S8	甘肃武都	四川省平武县古城镇	江西樟树市
S9	甘肃武都	四川都江堰	江西樟树市
S10	甘肃武都	四川省平武县安古镇	江西樟树市
S11	甘肃武都	四川都江堰	湖南沅江市南嘴镇百家沟村
S12	甘肃武都	四川都江堰	湖南沅江市新湾镇洪家嘴村
S13	甘肃宕昌	四川省平武县	湖南沅江市南嘴镇张家坪村
S14	甘肃宕昌南阳镇	湖南省道县	湖南沅江市新湾镇洪家嘴村
S15	甘肃宕昌狮子乡	湖南省安化县柘溪镇	湖南沅江市南嘴镇百家沟村

2 方法与结果

2.1 小承气汤物质基准的制备

2.1.1 饮片炮制及处方剂量折算 《伤寒论》^[1]中关于小承气汤制法的原文记载为“大黄四两(酒洗),厚朴二两(炙,去皮),枳实三枚(大者,炙),上三味,以水四升,煮取一升二合,去滓,分温二服。”大黄主产于甘肃,常于春末秋初采挖,此时产地多为阴雨天,药材块根不易干燥,通常为熏干后储存,故酒洗的作用仅为除去药材表面的烟泥^[14],以减少患者的不适反应。小承气汤主要取大黄的苦寒之性,以达到泻下攻积的目的,因而方中选用生大黄。现代研究表明厚朴姜炙可降低药材对口舌的刺激性并增强其温中之效^[15],且自《雷公炮炙论》首次记载以来,姜炙法一直是历代厚朴炮制方法的主流,故方中选用姜厚朴。根据本课题组前期考证^[14],推断《伤寒论》中小承气汤枳实应为现今芸香科植物酸橙的干燥成熟果实,枳壳酸性较强,易伤脾膈,用麦麸炒后可降低酸性,增强宽中理气之效,故方中选用麸炒枳壳。

根据《中国科学技术史·度量衡卷》^[16]记载,东汉一升约为现今200 mL,一合约20 mL。目前关于东汉与现代衡量量值之间的换算标准虽存在争议^[16-17],但越来越多的医家认同经方应为大剂量,并通过临床验证证实了经方大剂量的可行性与安全性^[18-19],因此,选用东汉一两约为现今13.75 g的换算标准。本课题组对江西新干、湖南怀化、重庆江津等地产枳壳(基原为酸橙)进行实测,结果枳壳1枚质量约12 g。综上所述,小承气汤现代折算处方为大黄55 g,姜厚朴27.5 g和麸炒枳壳36 g,煎煮时加水800 mL煎煮至约240 mL,滤过,挤压药渣,合并煎液,即得。

2.1.2 饮片煎煮及水煎液干燥 科学合理的制备工艺是保证小承气汤物质基准与原方质量一致性的关键。《伤寒论》中对小承气汤制法的记载较为粗略,对于煎药火候和煎煮时间等关键工艺参数未作出明确规定。古代煎药通常使用陶罐和柴火炉,一般是先用武火煎至汤液沸腾,再用文火煎煮至指定体积,以此来控制煎煮时间^[20],由于煎煮火候不易

控制,因而所得煎液质量不稳定,不适用于现代经方制剂的工业大生产。因此,本课题组以使用柴火炉、荣经陶罐制得的小承气汤水煎液的各项参数为参照,以君药大黄中蒽醌类成分的含量以及水煎液浸膏得率为指标,筛选与原方制法一致的实验室煎煮工艺参数,见表2。

表2 不同煎煮方法下小承气汤水煎液浸膏得率及蒽醌类成分含量的测定

Table 2 Determination of extract yield and anthraquinones of Xiao Chengqitang prepared by different decocting methods %

煎煮方法	游离蒽醌	总蒽醌	浸膏得率
《伤寒论》小承气汤原方制法(柴火炉)	0.091 1	0.205 0	11.87
实验室制 1 600 W+200 W	0.103 7	0.226 1	15.84
法(电陶炉) 1 600 W+400 W	0.110 9	0.239 2	15.08
1 600 W+600 W	0.102 8	0.263 2	15.05
1 600 W+800 W	0.105 4	0.234 4	12.38
1 600 W+1 000 W	0.099 9	0.216 6	11.69

由表2可知,与《伤寒论》小承气汤原方制法相一致的实验室煎煮工艺为取姜厚朴27.5 g,麸炒枳壳36 g和大黄55 g,加水800 mL浸泡约30 min,使用电陶炉煎煮,先以武火1.6 kW加热约10 min至水沸,再以文火1 kW煎煮约25 min,滤过并挤压药渣,合并煎液,即得。取该水煎液进行冷冻干燥,得小承气汤物质基准;冻干工艺为取液层厚度约1 cm的水煎液,提前放入-80℃冰箱完全冻实后,直接放入已降温至-25℃的冻干机中预冻8 h,设置升华温度-10℃,运行6 h,设置温度0℃,运行3 h,设置解析干燥温度20℃,运行6 h,将干粉取出密封即可。

2.2 供试品溶液的制备 精密称取小承气汤冻干粉1.0 g,置于锥形瓶中,加入甲醇25 mL,称重,超声15 min(480 W,40 kHz),加甲醇补足减失的质量,过0.45 μm微孔滤膜,取续滤液,即得。

2.3 混合对照品溶液的制备 分别称取减压干燥至恒重的各对照品适量,精密称定,分别置于量瓶中配制成母液;精密吸取上述各对照品母液适量,置于同一25 mL量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,得芦荟大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷,大黄酸-8-O-葡萄糖苷,大黄酚-1-O-β-D-葡萄糖苷,大黄酚-8-O-β-D-葡萄糖苷,芦荟大黄素-3-(羟甲基)-O-β-D-葡萄糖苷,大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷,大黄素甲醚-1-O-β-D-葡萄糖苷,大黄素甲醚-8-O-β-D-葡萄糖苷,芦荟大黄素,大黄酸,大黄素,大黄酚,大黄素甲醚,番泻苷A,柚皮苷,新橙皮苷,厚朴酚,和厚朴酚质量浓度

分别为21.36,8.22,10.15,30.27,13.75,7.41,15.51,5.44,9.31,4.65,7.99,5.04,6.21,6.11,12.23,10.78,11.36,9.77 mg·L⁻¹的混合对照品溶液,备用。

2.4 色谱条件 实验检测用Diamonsil C₁₈色谱柱(4.6 mm×150 mm,5 μm),流动相甲醇(A)-0.1%磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~60 min,20%~90%A;60~70 min,90%~100%A),流速1.0 mL·min⁻¹,检测波长254 nm,柱温25℃,进样量10 μL。

2.5 方法学考察

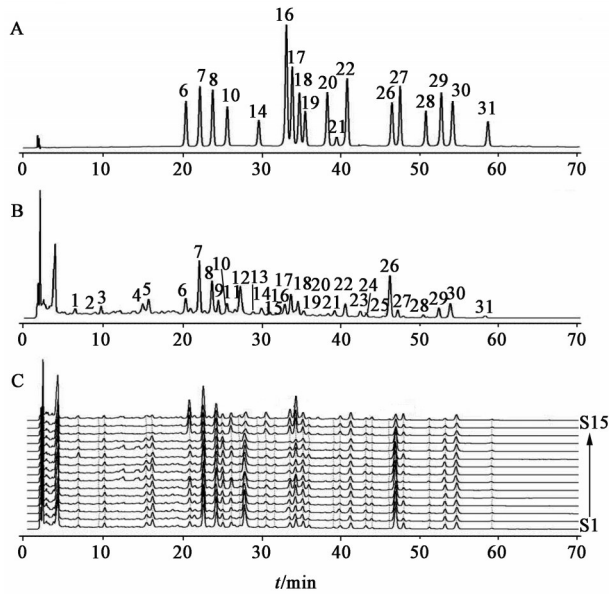
2.5.1 稳定性试验 取样品S5的供试品溶液适量,分别在制备后0,2,4,8,12,24 h按2.4项下条件测定,以7号峰(柚皮苷)为参照,结果各共有峰相对保留时间的RSD均<0.5%,相对峰面积的RSD均<3.0%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.5.2 精密度试验 取样品S5的供试品溶液,按2.4项下色谱条件连续进样6次,以7号峰(柚皮苷)为参照,计算各共有峰相对保留时间的RSD均<0.5%,相对峰面积的RSD均<3.0%,表明仪器精密度良好。

2.5.3 重复性试验 取样品S5适量,按2.2项下方法平行制备6份供试品溶液,按2.4项下色谱条件测定,以7号峰(柚皮苷)为参照,结果各共有峰相对保留时间的RSD均<0.5%,相对峰面积的RSD均<3.0%,表明该方法重复性较好。

2.6 小承气汤的HPLC指纹图谱建立与共有峰指认 取15批小承气汤物质基准样品适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.4项下色谱条件测定,记录色谱图。将上述色谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012版),以样品S5的色谱图为参照,经多点校正和自动匹配生成小承气汤物质基准指纹图谱共有模式,其指纹图谱匹配图见图1。结果在15批小承气汤物质基准的HPLC指纹图谱共标定了31个共有峰,通过与混合对照品溶液比对,指认了其中18个成分。

2.7 共有峰归属 取小承气汤物质基准样品S5以及缺大黄、缺姜厚朴、缺麸炒枳壳的阴性样品,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.4项下色谱条件测定,记录色谱图。结合色谱峰的保留时间及紫外吸收图,通过对比分析,对31个共有峰进行归属,见图2。结果发现3味组方饮片对小承气汤物质基准指纹图谱均有贡献,其中1~6,9~12,14~23,26,29~31号峰来自大黄;7,8,13,14,24,25号峰来自麸炒枳壳;27和28号峰来自姜厚朴。在31个共有峰中,大黄占据23个,表明君药大黄对于该复方的化学成分



A. 混合对照品; B. 共有模式; C. 供试品; 6. 芦荟大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷; 7. 柚皮苷(S); 8. 新橙皮苷; 10. 大黄酸-8-O-葡萄糖苷; 14. 番泻苷A; 16. 大黄酚-1-O-β-D-葡萄糖苷; 17. 大黄酚-8-O-β-D-葡萄糖苷; 18. 芦荟大黄素-3-(羟甲基)-O-β-D-葡萄糖苷; 19. 大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷; 20. 大黄素甲醚-1-O-β-D-葡萄糖苷; 21. 大黄素甲醚-8-O-β-D-葡萄糖苷; 22. 芦荟大黄素; 26. 大黄酸; 27. 和厚朴酚; 28. 厚朴酚; 29. 大黄素; 30. 大黄酚; 31. 大黄素甲醚

图1 15批小承气汤物质基准的HPLC指纹谱

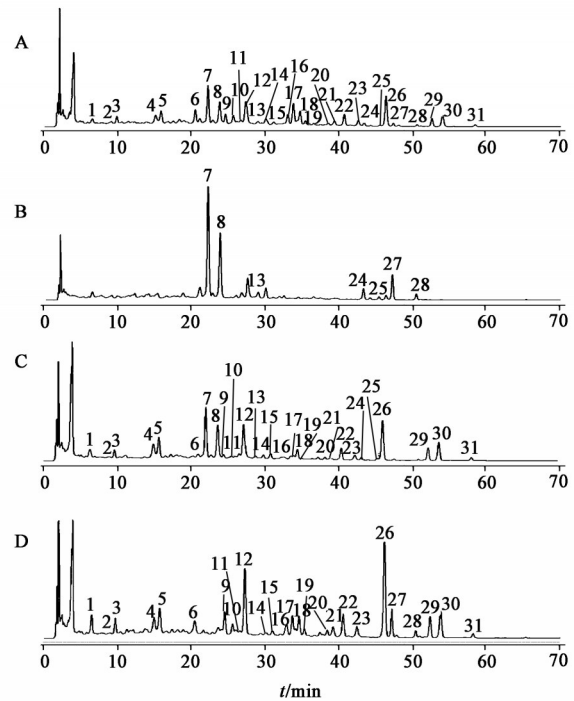
Fig. 1 HPLC fingerprints of 15 batches of substance benchmarks of Xiao Chengqitang

表征非常重要。

2.8 相似度分析 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012版)计算样品S1~S15与对照图谱的相似度,结果分别为0.987, 0.973, 0.969, 0.979, 0.986, 0.985, 0.981, 0.982, 0.987, 0.960, 0.983, 0.982, 0.933, 0.935, 0.926。说明15批小承气汤物质基准的化学成分基本稳定,符合指纹图谱研究要求;样品S1~S12与对照图谱的相似度均≥0.960,较样品S13~S15略高,说明不同批次物质基准间仍存在一定质量差异。

2.9 HCA^[21] 以15批小承气汤物质基准的31个共有峰的峰面积为变量,将其导入SPSS 21.0软件,采用组间连接法,以欧氏距离为测度对样品进行HCA,见图3。结果发现当欧氏距离为10时,15批小承气汤物质基准可分为两类,即样品S1~S12为第一类,样品S13~S15为第二类,此结果可与相似度评价结果相互印证。

2.10 PCA^[22] 选择15批小承气汤物质基准的31个共有峰的峰面积为变量,导入SIMCA-P+14.1(Demo)软件进行PCA处理,得分矩阵图见图4。结



A. 供试品; B. 缺镁阴性样品; C. 缺姜厚朴阴性样品; D. 缺麸炒枳壳阴性样品

图2 小承气汤物质基准的特征峰归属

Fig. 2 Attribution of characteristic peaks in substance benchmarks of Xiao Chengqitang

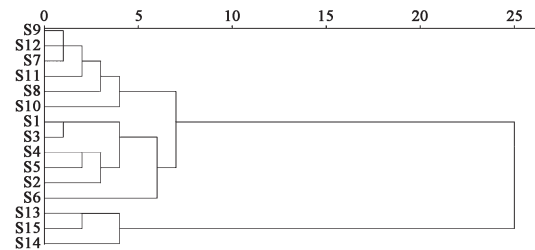


图3 15批小承气汤物质基准的HCA树状分析

Fig. 3 Dendrogram of 15 batches of Xiao Chengqitang substance benchmarks by hierarchical cluster analysis (HCA)

果发现15批小承气汤物质基准可分为2组,其中样品S1~S12归为一组,样品S13~S15归为另一组,此分类结果与HCA结果一致。

2.11 OPLS-DA 将15批小承气汤物质基准的31个共有峰的峰面积导入SIMCA-P+14.1(Demo)软件进行OPLS-DA处理,得分矩阵图见图5。结果发现15批样品聚为两类,样品S1~S12归为一组,样品S13~S15归为另一组,两类样品聚类效果良好,且与PCA和HCA结果一致。以变量重要性投影(VIP)值>1为判定标准,筛选差异组分,见图6。结果共找到了9个成分,按VIP值大小排序分别为26号峰(大黄酸),17号峰(大黄酚-8-O-β-D-葡萄糖苷),6号峰(芦荟大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷),12号峰,14号峰

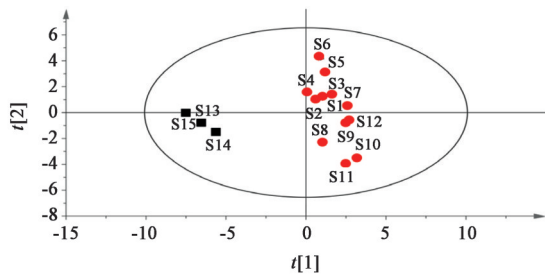


图4 15批小承气汤物质基准的PCA得分
Fig. 4 PCA scoring plots of 15 batches of substance benchmarks of Xiao Chengqitang

(番泻苷A), 5号峰, 4号峰, 16号峰(大黄酚-1-O-β-D-葡萄糖苷), 10号峰(大黄酸-8-O-葡萄糖苷)。上述9个主要差异成分均源于大黄, 进一步说明严格控制大黄药材质量是确保小承气汤物质基准质量稳定的关键。

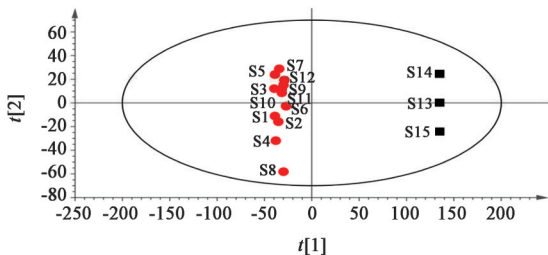


图5 15批小承气汤物质基准 OPLS-DA 的得分矩阵
Fig. 5 OPLS-DA scoring plots of 15 batches of substance benchmarks of Xiao Chengqitang

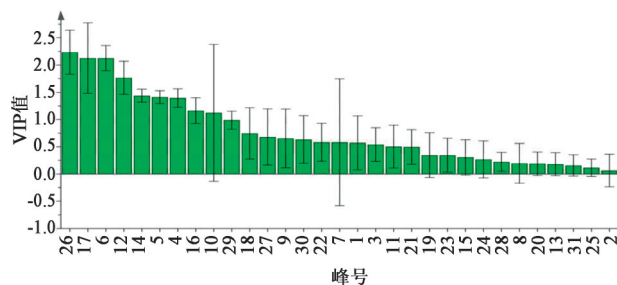


图6 小承气汤物质基准 OPLS-DA 的VIP值
Fig. 6 VIP values of OPLS-DA of Xiao Chengqitang substance benchmarks

3 讨论与总结

3.1 供试品溶液制备方法考察 预试验对超声提取法的提取溶剂(乙醇, 甲醇, 70% 甲醇), 提取时间(15, 30, 45 min)和溶剂用量(10, 25, 50 倍量)等影响因素进行了考察, 从提取化学成分的全面性、操作便捷性以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25倍量甲醇超声提取15 min。

3.2 色谱条件选择 预试验比较了甲醇-水(冰乙酸调pH 3), 甲醇-水(磷酸调pH 3), 乙腈-水(冰乙酸

调pH 3)3种不同流动相系统, 结果表明以甲醇-水(磷酸调pH 3)为流动相进行梯度洗脱时, 分离效果较好, 特征峰明显, 整体基线较平稳; 同时, 对254, 283, 296, 330, 360 nm等不同检测波长进行了考察, 发现在254 nm处, 图谱信息较为全面, 各峰响应值较高; 另外, 考察了柱温(20, 25, 30 °C)对色谱峰分离度的影响, 结果发现在25 °C条件下, 各色谱峰分离度较好。

3.3 指标成分选择 中药复方的化学成分相对复杂, 药效的发挥并非是单一有效成分的作用, 而是不同药物之间经过合适的配伍, 相互制约, 相互促进, 协同起效, 是多成分综合作用的结果^[23], 因而建立经典名方物质基准指纹图谱时应综合考虑全方, 选择具有代表性且与药效相关性强的成分作为质控指标, 使物质基准能准确反映原方质量, 以助于更好地发挥物质基准的参照物功能, 保证经典名方制剂的质量。小承气汤由大黄、姜厚朴、麸炒枳壳3味饮片组成, 其中大黄泻下攻积, 为君药, 麸炒枳壳理气宽中、行滞消胀, 为臣药, 姜厚朴温中和胃、下气除满, 为佐药, 诸药并用, 共奏轻下热结、除满消痞之效。大黄中致泻的主要成分为蒽醌及蒽酮类衍生物, 二者均包括结合型和游离型^[24-25], 其中泻下作用最强的成分为结合型蒽酮番泻苷A, 游离蒽醌类除具有泻下作用外, 也可抗菌消炎^[26]; 柚皮苷和新橙皮苷是枳壳发挥理气、行滞、祛痰和平喘作用的重要成分^[27], 且在麸炒枳壳中含量相对较高^[28]; 姜厚朴中厚朴酚与和厚朴酚均有促进小鼠胃排空和肠推进的作用^[29]。因此, 本文对小承气汤物质基准HPLC指纹图谱中5个游离蒽醌类成分, 8个结合蒽醌类成分, 番泻苷A, 柚皮苷, 新橙皮苷, 厚朴酚以及和厚朴酚色谱峰进行了指认, 可为后续含量测定等关键质控环节研究奠定基础。

3.4 大黄药材产地选择 药材及投料用饮片是影响经典名方产品质量的重要因素之一。本研究造成小承气汤物质基准组间质量差异的9个主要化学成分均源于大黄, 提示厂家在药物生产时应从药材源头入手, 重点关注9个主要差异成分的含量变化, 严格控制大黄药材质量。作为典型的多基原、多道地产区药材, 大黄在甘肃、青海、云南、四川等地均有分布, 由于受地域、气候及环境等因素的影响, 不同产区大黄药材质量存在一定差异^[30], 其中甘肃产大黄质量最佳, 特别是甘肃礼县产大黄, 其品质和产量均为全国之最^[31-32]。因此, 本研究选用的大黄均为甘肃产, 以降低小承气汤物质基准批间

质量差异。指纹图谱研究结果表明,制得的15批物质基准质量均一稳定,可用于小承气汤制剂研制。

3.5 总结 经典名方作为中药方剂的杰出代表,是历代医家临床经验的总结,是中医药宝库中最精华的部分。其开发的关键在于建立从药材到饮片、中间体、制剂全链条的质量控制体系,严格把控制备过程中的质量情况。本文建立的小承气汤物质基准HPLC指纹图谱可较为全面地反映小承气汤中化学成分信息,且检测方法简便可行、重复性好;结合化学模式识别技术对指纹图谱进行综合评价,使分析结果更加科学、全面,可为完善小承气汤物质基准及其制剂的质量控制标准提供实验依据。

[参考文献]

[1] 张仲景. 伤寒论[M]. 北京:中国中医药出版社, 2009:55.

[2] 国家中医药管理局. 关于发布《古代经典名方目录(第一批)》的通知[EB/OL]. (2018-04-13)[2020-08-10]. [http://kjs. satcm. gov. cn/zhengcewenjian/2018-04-16/7107. html](http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2018-04-16/7107.html).

[3] 刘艳,章军,陈士林,等. 经典名方复方制剂研发策略[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(24):166-172.

[4] 刘艳,章军,杨林勇,等. 经典名方物质基准研制策略及关键问题分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(1):1-9.

[5] 安继辉. 观察小承气汤加减治疗术后早期炎性肠梗阻的临床疗效[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2019,7(30):167-168.

[6] 陈敏捷,许云帆,曹扶胜,等. 小承气汤保留灌肠对胃癌术后胃肠功能恢复的影响[J]. 湖北中医药大学学报,2018,20(3):60-62.

[7] 王璐颖,张萌,焦圣军,等. 小承气汤、厚朴三物汤、厚朴大黄汤对阳明腑实证模型大鼠胃肠动力的影响[J]. 广州中医药大学学报,2019,36(1):94-98.

[8] 陈立,李涛,王彦礼,等. 小承气汤、厚朴三物汤及厚朴大黄汤中蒽醌类、木脂素类和黄酮类成分含量测定[J]. 药科学报,2015,50(7):887-892.

[9] 孙兆姝,李峰,袁昌鲁. 大、小承气汤质量控制方法的研究[J]. 吉林中医药,2005,25(4):46-47.

[10] 王其田,杨西晓,郭丹. 小承气汤的高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中国药业,2007,16(20):28-29.

[11] 范妙璇. 复方小承气汤化学成分及指纹图谱研究[D]. 北京:中国中医科学院,2008.

[12] 祝明,陈碧莲,石上梅. 中药指纹图谱技术在中国药典2015年版一部中的应用[J]. 中国现代应用药学, 2016,33(5):611-614.

[13] 孙立丽,王萌,任晓亮. 化学模式识别方法在中药质

量控制研究中的应用进展[J]. 中草药,2017,48(20):4339-4345.

[14] 李焜仪,孟岩,陈欢,等. 小承气汤的研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(2):241-250.

[15] 崔国静,刘芳,贺蔷. 姜炙厚朴的功效与炮制[J]. 首都医药,2009,16(7):51.

[16] 丘光明,邱隆,杨平. 中国科学技术史·度量衡卷[M]. 北京:科学出版社,2001:217,447.

[17] 范吉平,程先宽. 经方剂量揭秘[M]. 北京:中国中医药出版社,2009:117.

[18] 李可. 李可老中医急危重症疑难病经验专辑[M]. 太原:山西科学技术出版社,2002:403.

[19] 李宇铭. 经方原方剂量应用临床体会[J]. 国医论坛, 2013,28(1):3-6.

[20] 刘恬佳,黄晓巍. 古今中药煎煮方法的影响因素[J]. 长春中医药大学学报,2016,32(1):43-44.

[21] 樊岩,黎阳,刘素香. 数理统计方法在中药质量评价中的应用[J]. 中草药,2009,40(5):836-840.

[22] 刘娜,李军,李宝国. 多元统计分析在中药质量控制中的应用和思考[J]. 中国中药杂志,2014,39(21):4268-4271.

[23] 郭红军,张翼,曾凤英. 中药复方制剂质量控制中含量测定指标的选择思路[J]. 中华中西医杂志, 2008,6(6):68-69.

[24] 张丹丹. 大黄的临床药理研究[J]. 中国中医药现代远程教育,2011,9(17):68-69.

[25] 刘喜纲,刘沛,陈大为,等. 优选大黄总蒽醌结肠定位壳聚糖微球的制备工艺[J]. 中草药,2015,46(1):38-42.

[26] 聂克. 大黄药理作用研究及思考[J]. 山东中医药大学学报,2009,33(3):239-240,262.

[27] 杨武亮,杨世林,张敏,等. RP-HPLC法测定枳壳中柚皮苷和新橙皮苷的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2005,16(4):261-263.

[28] 张金莲,曾昭君,李志强,等. HPLC法测定枳壳不同炮制品中活性成分[J]. 中成药,2014,36(11):2355-2358.

[29] 王颖,陈文强,邓百万,等. 厚朴酚与和厚朴酚的药理作用及提取合成研究进展[J]. 陕西理工大学学报:自然科学版,2018,34(2):58-64,78.

[30] 师霞,郭玫,余晓晖,等. 产地对大黄药材质量的影响[J]. 时珍国医国药,2004,15(7):401-402.

[31] 何英梅,贺军权,马潇,等. 不同商品规格的甘肃大黄的綜合质量考察[J]. 中国药事,2006,20(10):621-623.

[32] 吕铎,晋小军,杨舟,等. 礼县大黄生产现状分析与发展对策[J]. 农业科技与信息,2016(1):8-9,12.

[责任编辑 刘德文]