

## 经典名方桃红四物汤化学指纹图谱及9种成分含量测定研究

成颜芬<sup>1</sup>, 江华娟<sup>1</sup>, 王琳<sup>1</sup>, 陈其艳<sup>1</sup>, 庞兰<sup>1</sup>, 韦迪<sup>2</sup>, 杨青波<sup>2</sup>, 傅超美<sup>1</sup>, 何瑶<sup>1\*</sup>, 章津铭<sup>1\*</sup>

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

2. 贵州益佰制药股份有限公司, 贵州 贵阳 550000

**摘要:** **目的** 建立15批桃红四物汤汤剂化学指纹图谱及多指标成分含量测定方法, 为桃红四物汤经典名方的质量控制及评价提供参考。**方法** 采用 Thermo Hypersil Gold C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-0.1%磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长 225 nm; 建立 HPLC 指纹图谱, 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件 (2012A 版) 进行相似度分析, 结合聚类分析评价 15 批样品的化学信息差异。进一步通过 HPLC 多成分波长切换法, 测定样品中 9 种指标成分的含量, 采用 SIMCA 14.1 软件进行偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA), 以寻找样品间的质量差异成分。**结果** 建立了 15 个批次桃红四物汤汤剂 HPLC 指纹图谱, 相似度均>0.96, 并确认 35 个共有峰, 指认出没食子酸、绿原酸、苦杏仁苷、芍药内酯苷、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、洋川芎内酯 I、苯甲酰芍药苷、藜本内酯 10 个色谱峰 (分别对应 2、8、9、13~16、25、31、32 号色谱峰)。含量测定显示, 没食子酸、5-羟甲基糠醛、绿原酸、芍药内酯苷、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、洋川芎内酯 I 9 种成分线性关系良好 ( $r \geq 0.9996$ ), 含量测定结果分别为 187.5~344.4、6.2~154.8、413.2~459.2、507.5~923.5、873.8~1 202.0、2 122.3~2 782.9、59.2~121.3、6.4~26.9、38.9~79.6 μg/g, 其中以芍药苷、羟基红花黄色素 A、芍药内酯苷等成分含量较高; 更进一步将 15 批不同产地的样品分为 3 类。通过 PLS-DA 分析含量测定结果, 发现芍药苷、芍药内酯苷、羟基红花黄色素 A 和 5-羟甲基糠醛是影响不同批次桃红四物汤汤剂质量贡献较大的 4 种成分。**结论** HPLC 指纹图谱结合多指标成分含量测定方法适用于桃红四物汤复方剂的质量控制与评价。

**关键词:** 桃红四物汤; 经典名方; HPLC; 指纹图谱; 偏最小二乘法-判别分析; 质量控制; 质量评价; 聚类分析; 没食子酸; 5-羟甲基糠醛; 绿原酸; 苦杏仁苷; 芍药内酯苷; 羟基红花黄色素 A; 芍药苷; 阿魏酸; 毛蕊花糖苷; 洋川芎内酯 I; 苯甲酰芍药苷; 藜本内酯

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)03-0653-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.03.015

## HPLC fingerprint and simultaneous determination of nine components in Taohong Siwu Decoction of classical prescriptions

CHENG Yan-fen<sup>1</sup>, JIANG Hua-juan<sup>1</sup>, WANG Lin<sup>1</sup>, Chen Qi-yan<sup>1</sup>, PANG Lan<sup>1</sup>, WEI Di<sup>2</sup>, YANG Qing-bo<sup>2</sup>, FU Chao-mei<sup>1</sup>, HE Yao<sup>1</sup>, ZHANG Jin-ming<sup>1</sup>

1. College Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Guizhou Yibai Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550000, China

**Abstract: Objective** To establish chemical fingerprint and multi-components determination of 15 batches of Taohong Siwu Decoction (TSD), and provide reference for the improvement of its quality control. **Methods** The separation was performed on Thermo Hypersil Gold C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) for gradient elution with methanol-0.1% phosphoric acid aqueous solution, flow rate 1.0 mL/min, column temperature 30 °C, and detection wavelength 225 nm. The HPLC fingerprint was established and evaluated by the similarity evaluation system of TCM (version 2012A), and the difference of chemical information between 15 batches of different samples was evaluated by cluster analysis. Furthermore, the content of the nine active components in the sample

收稿日期: 2019-09-18

基金项目: 四川省重点研发项目 (18ZDYF3528)

作者简介: 成颜芬, 在读硕士, 从事药剂学研究。Tel: 18408257834 E-mail: chengyanfen122@126.com

\*通信作者 何瑶, 副教授, 从事中药新制剂和新剂型研究。E-mail: 20660306@qq.com

章津铭, 副教授, 从事中药新制剂和新剂型研究。E-mail: cduetcmzjm@126.com

was determined by HPLC multi-component wavelength switching method, with the partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) by SIMCA 14.1 software to find significant components of the quality between the batches. **Results** The HPLC fingerprint of 15 batches of TSD was established. The similarity was greater than 0.96, and 35 common peaks were identified as gallic acid, chlorogenic acid, amygdalin, albiflorin, hydroxysafflor yellow A, paeoniflorin, ferulic acid, senkyunolide I, benzoylpaeoniflorin and ligustilide (corresponding to peaks 2, 8, 9, 13, 14, 15, 16, 25, 31, and 32). The linearity relationships of gallic acid, 5-hydroxymethylfurfural, chlorogenic acid, albiflorin, hydroxysafflor yellow A, paeoniflorin, ferulic acid, verbascoside, and senkyunolide I ( $r \geq 0.9996$ ) were good. The results of content determination respectively were 187.5—344.4, 6.2—154.8, 413.2—459.2, 507.5—923.5, 873.8—1 202.0, 2 122.3—2 782.9, 59.2—121.3, 6.4—26.9, and 38.9—79.6  $\mu\text{g/g}$ , respectively, including higher content of paeoniflorin, hydroxysafflor yellow A, and albiflorin. Furthermore, 15 batches of samples from different origins were classified into three categories. Using PLS-DA analysis, the content determination result showed that paeoniflorin, albiflorin, hydroxysafflor yellow A, and 5-hydroxymethylfurfural were the four components that affected the quality of different batches of TSD. **Conclusion** HPLC fingerprint combined with multi-components determination is suitable for quality control and evaluation of TSD preparation.

**Key words:** Taohong Siwu Decoction; classical prescriptions; HPLC; fingerprint; PLS-DA; quality control; quality evaluation; cluster analysis; gallic acid; 5-hydroxymethylfurfural; chlorogenic acid; amygdalin; albiflorin; hydroxysafflor yellow A; paeoniflorin; ferulic acid; verbascoside; senkyunolide I; benzoylpaeoniflorin; ligustilide

桃红四物汤 (Taohong Siwu Decoction, TSD) 出自清·柴得华的《妇科冰鉴》，临床疗效确切，为国家中医药管理局发布的《古代经典名方目录（第一批）》中的品种之一，处方由红花、桃仁、川芎、当归、白芍、地黄 6 味饮片组成，方中红花、桃仁活血化瘀，当归、地黄补血调经，白芍养血调经，川芎活血行气，该方具有活血、养血、逐瘀的功效，主治血瘀所致的月经不调、痛经以及眼底出血之暴盲者<sup>[1-3]</sup>。中药经典名方制剂质量易受其组成药味多基原、多产地、药材来源不稳定、成分复杂等因素影响，其质量的不一致性，不利于有效控制其疗效的稳定<sup>[4-5]</sup>。课题组前期基于“质量标志物”辨识思路，对 TSD 化学成分、药理作用、临床应用、质量控制等研究现状进行了详细综述<sup>[6]</sup>。目前，李双双等<sup>[7]</sup>采用 HPLC 法测定同一批次 TSD 中 9 种水溶性成分含量，并未验证该质控方式是否适宜于评价不同批次的 TSD 质量情况；李海英等<sup>[8]</sup>利用指纹图谱和数学模型对 TSD 的稳态投料量变化规律进行研究，但没有深入分析内在药效成分的差异对质量的影响。因此，目前还缺乏对 TSD 更为综合、全面的质量控制方式研究。化学指纹图谱技术和含量测定的方法从整体、局部控制到外在、内在分析，相辅相成，能够比较准确地对药材、饮片的鉴别和质量稳定性进行评价和控制，较全面反映中药复方的质量；中药汤剂中复杂的化学成分最佳吸收波长不一致，且互相干扰严重，在指纹图谱的基础上，采用波长切换法同时测定各成分含量，能更好地排除干扰，保证最佳峰强度、高灵敏度以及测定结果的准

确性和可靠性<sup>[9-10]</sup>。本研究采用化学指纹图谱结合多成分含量测定波长切换的质控方法快速、直观地辨识复杂中药汤剂体系中的药效物质基础；同时结合聚类分析 (HCA) 和偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA) 等化学识别模式<sup>[11]</sup>，评价各批次样品之间的质量差异，为 TSD 汤剂的关键质量属性研究提供参考，为后续相关制剂的制备工艺、质量控制以及产品安全性、稳定性的评价提供有益的参考。

## 1 材料

UltiMate 3000 型高效液相色谱仪，美国 Thermo Fisher 公司。对照品没食子酸 (批号 wkq18032304)、5-羟甲基糠醛 (批号 wkq19010805)、绿原酸 (批号 wkq18022809)、芍药内酯苷 (批号 wkq18052205)、羟基红花黄色素 A (批号 wkq18010407)、芍药苷 (批号 wkq16062205)、阿魏酸 (批号 wkq15121602)、毛蕊花糖苷 (批号 wkq16062004) 均购于四川省维克奇生物科技有限公司；对照品洋川芎内酯 I (批号 Y-085-170609) 购于成都瑞芬思生物科技有限公司，各对照品质量分数均  $\geq 98\%$ 。水为纯化水，甲醇、磷酸为色谱级，其他试剂均为分析纯。

TSD 中各饮片均产自 3 个产地，产地、批次信息见表 1，经成都中医药大学卢先明教授鉴定，各饮片均符合《中国药典》2015 年版（一部）相关项下的性状规定，鉴定结果依次为红花为菊科红花属植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花，桃仁为蔷薇科樱桃属植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch 的干燥成熟种子，川芎为伞形科藁本属植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎，当归为伞

表 1 15 批次 TSD 汤剂中各饮片的产地信息

Table 1 Origin information of 15 batches of decoction pieces of TSD

饮片	产地		
	S1~S5	S6~S10	S11~S15
红花	甘肃玉门	云南永善	新疆吉木萨
桃仁	山西朔州	河北张家口	山西大同
川芎	四川都江堰	云南鹤庆	甘肃华亭
当归	云南师宗	青海大通	甘肃岷县
白芍	安徽十九里	安徽礁东镇	安徽五马镇
地黄	山西襄汾	河南武陟	陕西西安

形科当归属植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根, 白芍为毛茛科芍药属植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根, 地黄为玄参科地黄属植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的干燥块根。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的配制

**2.1.1 混合对照品溶液** 取没食子酸、5-羟甲基糠醛、绿原酸、芍药内酯苷、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、洋川芎内酯 I 对照品适量, 精密称定, 置于 9 个量瓶中, 分别加甲醇配制成质量浓度依次为 1 284.0、1 524.0、1 528.8、1 435.0、1 680.0、1 355.0、1 247.0、1 328.0、640.0 mg/L 的对照品储备液。分别取上述 9 种对照品储备液适量, 加入 10 mL 量瓶中, 制得没食子酸、5-羟甲基糠醛、绿原酸、芍药内酯苷、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、洋川芎内酯 I 各成分质量浓度分别为 51.36、30.48、76.44、114.80、504.00、542.00、49.88、26.56、32.00 mg/L 的混合对照品溶液。

**2.1.2 全方供试品溶液** 按照国家公布的《古代经典名方目录(第一批)》中 TSD 的处方组成以及剂量换算<sup>[12]</sup>, 称取全方饮片 3 倍剂量合计 118.14 g, 并根据前期课题组研究结果, 经一定煎煮工艺制得 TSD 汤剂, 将其减压浓缩至 200 mL, 冷冻干燥成粉末。用于 15 批次 TSD 汤剂制备的饮片组成如表 1 所示。精密称取冻干粉约 0.2 g, 置于 10 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇溶解, 称定质量, 超声 30 min 后, 补足减失的质量, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

**2.1.3 阴性样品溶液** 按照“2.1.2”项下供试品溶液制备方法, 分别制备缺地黄、缺当归和川芎、缺白芍、缺红花的阴性样品溶液。

### 2.2 TSD 汤剂化学指纹图谱的建立<sup>[13]</sup>

**2.2.1 色谱条件** Thermo Hypersil Gold C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.1% 磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~5 min, 3% 甲醇; 5~65 min, 3%~33% 甲醇; 65~75 min, 33%~37% 甲醇; 75~85 min, 37%~46% 甲醇; 85~115 min, 46%~90% 甲醇; 柱温 30 °C; 体积流量 1 mL/min; 检测波长 225 nm; 进样量 10 μL。

**2.2.2 精密度试验** 取同一批 TSD 汤剂冻干粉 (S1) 的供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 以 4 号峰为参照峰, 计算得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 2%, 表明仪器精密度良好。

**2.2.3 重复性试验** 平行制备同一批 TSD 汤剂冻干粉 (S1) 的供试品溶液 6 份, 按“2.2.1”项下色谱条件进样, 以 4 号峰为参照峰, 计算得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 2%, 表明该方法重复性较好。

**2.2.4 稳定性试验** 取 TSD 汤剂冻干粉 (S1) 的供试品溶液放置 0、2、4、8、12、24 h 后, 分别按“2.2.1”项下色谱条件测定, 以 4 号峰为参照峰, 计算得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 2%, 表明该供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.2.5 化学指纹图谱的建立及相似度评价** 根据“2.2.1”项色谱条件对 15 批次 TSD 汤剂冻干粉的供试品溶液进行检测, 记录各样品色谱图。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012A 版), 设定 S1 色谱图为参照图谱, 利用中位数法, 时间窗宽度设置 0.1 min, 进行相似度计算。结果其相似度均 > 0.96, 并确定 35 个共有峰, 根据对照品指认出 10 个色谱峰, 分别是 2 号峰(没食子酸)、8 号峰(绿原酸)、9 号峰(苦杏仁苷)、13 号峰(芍药内酯苷)、14 号峰(羟基红花黄色素 A)、15 号峰(芍药苷)、16 号峰(阿魏酸)、25 号峰(洋川芎内酯 I)、31 号峰(苯甲酰芍药苷)、32 号峰(藁本内酯)。见图 1 和表 2。

**2.2.6 聚类分析** 以峰的相对保留时间和相对标准偏差为参考指标, 选取保留时间和峰面积均较稳定的有效成分峰以减小实验结果误差, 即选取化学性质较稳定且峰强度适中的 4 号峰作为参照峰。做归一化值处理后, 运用 SPSS 22.0 统计分析软件对 15 批样品进行聚类分析, 以组间联接法聚类, 平方 Euclidean 距离为指标, 聚类结果见图 2。结果显示,

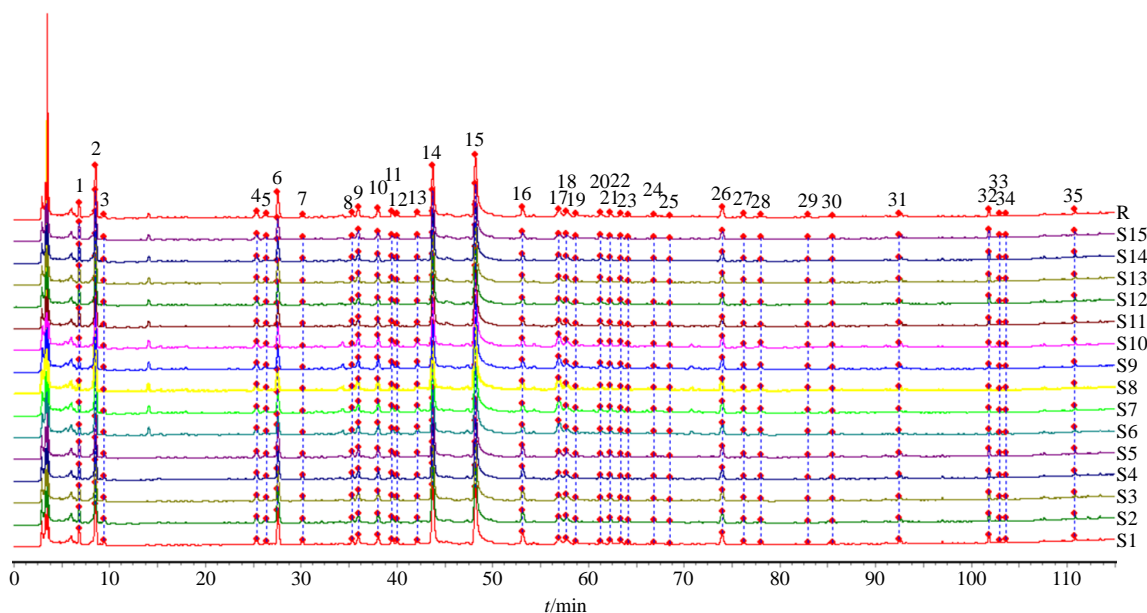


图 1 15 批 TSD 汤剂的 HPLC 指纹图谱及对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 HPLC chromatogram fingerprint of 15 batches of TSD and its control fingerprint (R)

表 2 TSD 汤剂指纹图谱的相似度结果

Table 2 HPLC chromatograms similarity evaluation results of 15 batches of TSD

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	R
S1	1.000	1.000	1.000	0.999	1.000	0.976	0.966	0.976	0.975	0.975	0.992	0.992	0.992	0.990	0.993	0.993
S2	1.000	1.000	1.000	0.999	1.000	0.975	0.966	0.975	0.975	0.974	0.991	0.992	0.992	0.990	0.993	0.993
S3	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.978	0.967	0.978	0.978	0.977	0.993	0.994	0.993	0.992	0.994	0.994
S4	0.999	0.999	1.000	1.000	1.000	0.979	0.967	0.979	0.979	0.978	0.994	0.994	0.994	0.992	0.995	0.995
S5	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.977	0.967	0.977	0.977	0.976	0.993	0.993	0.993	0.991	0.994	0.994
S6	0.976	0.975	0.978	0.979	0.977	1.000	0.984	1.000	1.000	1.000	0.991	0.991	0.991	0.992	0.990	0.994
S7	0.966	0.966	0.967	0.967	0.967	0.984	1.000	0.984	0.983	0.983	0.972	0.974	0.974	0.975	0.974	0.982
S8	0.976	0.975	0.978	0.979	0.977	1.000	0.984	1.000	1.000	1.000	0.992	0.992	0.992	0.992	0.991	0.994
S9	0.975	0.975	0.978	0.979	0.977	1.000	0.983	1.000	1.000	1.000	0.991	0.991	0.991	0.992	0.991	0.994
S10	0.975	0.974	0.977	0.978	0.976	1.000	0.983	1.000	1.000	1.000	0.991	0.991	0.991	0.992	0.990	0.994
S11	0.992	0.991	0.993	0.994	0.993	0.991	0.972	0.992	0.991	0.991	1.000	1.000	1.000	0.999	0.999	0.998
S12	0.992	0.992	0.994	0.994	0.993	0.991	0.974	0.992	0.991	0.991	1.000	1.000	1.000	0.999	1.000	0.999
S13	0.992	0.992	0.993	0.994	0.993	0.991	0.974	0.992	0.991	0.991	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999
S14	0.990	0.990	0.992	0.992	0.991	0.992	0.975	0.992	0.992	0.992	0.999	0.999	1.000	1.000	1.000	0.998
S15	0.993	0.993	0.994	0.995	0.994	0.990	0.974	0.991	0.991	0.990	0.999	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999
R	0.993	0.993	0.994	0.995	0.994	0.994	0.982	0.994	0.994	0.994	0.998	0.999	0.999	0.998	0.999	1.000

15 批 TSD 汤剂可分为 2 类, 其中 S1~S5、S11~S15 聚为一类, S6~S10 为一类, 表明不同产地的样品属不同类别, 饮片的产地归属和内在质量差异均待进一步分析。

### 2.3 TSD 汤剂波长切换法多成分含量测定<sup>[7,14]</sup>

**2.3.1 色谱条件** Thermo Hypersil GOLD C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1%

磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~10 min, 5%~13% 甲醇; 10~15 min, 13%~22% 甲醇; 15~20 min, 22% 甲醇; 20~40 min, 22%~34% 甲醇; 40~55 min, 34%~46% 甲醇; 55~60 min, 46%~54% 甲醇; 柱温 30 ℃; 体积流量 1 mL/min; 进样量 10 μL; 检测波长分别为 220 nm (0~9 min, 检测没食子酸; 14~22 min, 检测绿原酸)、285 nm (9~14 min,

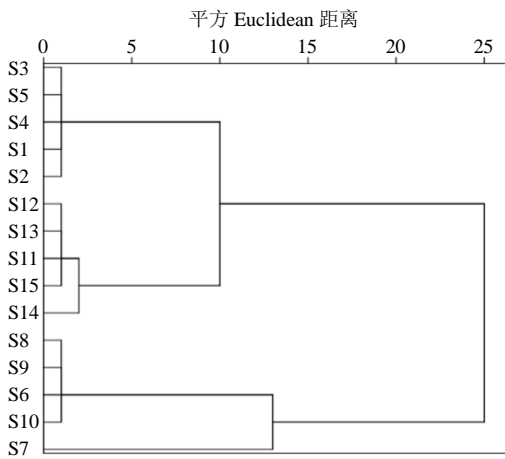
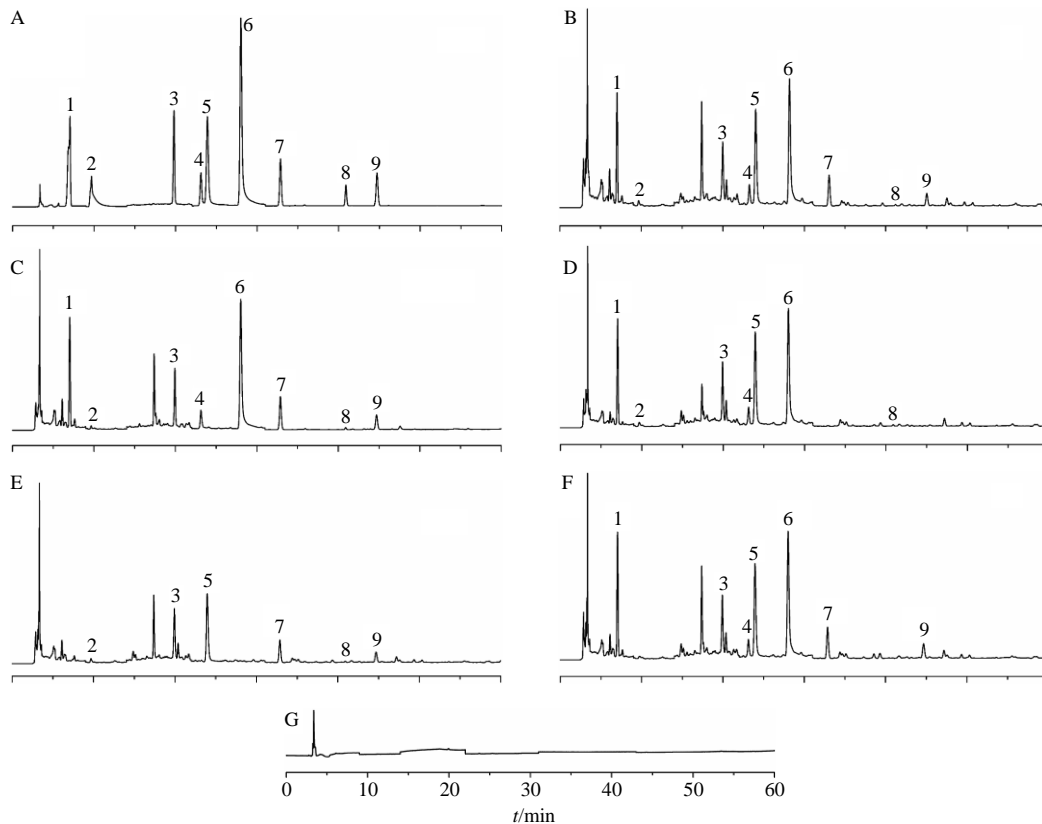


图 2 15 批 TSD 汤剂聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis result of 15 batches of TSD



A-混合对照品 B-TSD 全方供试品 C-缺红花阴性样品 D-缺川芎和当归阴性样品 E-缺白芍阴性样品 F-缺地黄阴性样品 G-空白阴性  
1-没食子酸 2-5-羟甲基糠醛 3-绿原酸 4-芍药内酯苷 5-羟基红花黄色素 A 6-芍药苷 7-阿魏酸 8-毛蕊花糖苷 9-洋川芎内酯 I  
A-mixed reference substances B-TSD sample C-negative sample without *Carthami Flos* D-negative sample without *Chuanxiong Rhizoma* and *Angelicae Sinensis Radix* E-negative sample without *Paeoniae Radix Alba* F-negative sample without *Rehmanniae Radix* G-blank sample  
1-gallic acid 2-5-hydroxymethylfurfural 3-chlorogenic acid 4-albiflorin 5-hydroxysafflor yellow A 6-paeoniflorin 7-ferulic acid 8-verbascoside 9-senkyunolide I

图 3 TSD 汤剂中 9 种成分 HPLC 图

Fig. 3 HPLC chromatograms of nine ingredients of TSD

为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 得各成分回归方程, 结果分别为没食子酸  $Y=1.2974 X+0.3827$ ,  $r=0.9997$ , 线性范围 1.605~

检测 5-羟甲基糠醛)、232 nm (22~31 min, 检测芍药内酯苷、羟基红花黄色素 A、芍药苷)、322 nm (31~38 min, 检测阿魏酸)、330 nm (38~43 min, 检测毛蕊花糖苷)、278 nm (43~60 min, 检测洋川芎内酯 I)。理论塔板数以各检测成分峰计算均大于 10 000。

**2.3.2 系统适应性试验** 按照“2.3.1”项下色谱条件测定混合对照品溶液、TSD 供试品溶液和 4 种阴性样品溶液, 结果表明样品中各成分分离度和理论板数均较好, 且阴性无干扰。见图 3。

**2.3.3 线性关系考察** 取“2.1.1”项下混合对照品溶液, 分别稀释 0、2、4、8、16、32 倍, 按照“2.3.1”项下色谱条件进行测定。以各成分对照品质量浓度

51.36 mg/L; 5-羟甲基糠醛  $Y=1.2262 X+0.2788$ ,  $r=0.9996$ , 线性范围 0.9525~30.48 mg/L; 绿原酸  $Y=0.391 X-0.2659$ ,  $r=0.9999$ , 线性范围

2.388 6~76.44 mg/L; 芍药内酯苷  $Y=0.092 5 X-0.038 6$ ,  $r=0.999 9$ , 线性范围 3.587 5~114.8 mg/L; 羟基红花黄色素 A  $Y=0.292 1 X+0.069$ ,  $r=0.999 9$ , 线性范围 15.75~504 mg/L; 芍药苷  $Y=0.229 9 X-0.359 5$ ,  $r=0.999 6$ , 线性范围 16.937 5~542 mg/L; 阿魏酸  $Y=0.894 5 X+0.292 5$ ,  $r=0.999 7$ , 线性范围 1.558 7~49.88 mg/L; 毛蕊花糖苷  $Y=0.269 8 X+0.051 3$ ,  $r=0.999 7$ , 线性范围 0.83~26.56 mg/L; 洋川芎内酯 I  $Y=0.561 6 X+0.124 8$ ,  $r=0.999 6$ , 线性范围 1.00~32.00 mg/L。

**2.3.4 精密度试验** 取“2.1.1”项下混合对照品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 计算没食子酸、5-羟甲基糠醛、绿原酸、芍药内酯苷、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、洋川芎内酯 I 峰面积的 RSD 分别为 0.4%、1.3%、0.6%、0.7%、0.8%、0.3%、0.5%、0.2%、0.1%, 表明仪器精密度良好。

**2.3.5 重复性试验** 同一批次样品(S1), 按“2.1.2”项下方法平行制备供试品溶液 6 份, 按“2.3.1”项下色谱条件测定, 结果没食子酸、5-羟甲基糠醛、绿原酸、芍药内酯苷、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、洋川芎内酯 I 的 RSD 依次为 0.3%、1.1%、0.4%、0.2%、0.9%、0.3%、0.3%、0.2%、0.1%, 表明该方法重复性良好。

**2.3.6 稳定性试验** 取同一供试品溶液(S1), 分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h, 按“2.3.1”项下色谱条件测定, 结果没食子酸、5-羟甲基糠醛、绿原酸、芍药内酯苷、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、洋川芎内酯 I 峰面积的 RSD 分别为 0.5%、1.6%、0.8%、0.9%、1.3%、0.4%、0.7%、0.2%、0.1%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.3.7 加样回收率试验** 取同一批次样品冻干粉(S1) 6 份, 分别精密称取约 0.2 g, 置 10 mL 量瓶中, 分别按 TSD 汤剂中指标成分已知含量的 100% 加入没食子酸、5-羟甲基糠醛、绿原酸、芍药内酯苷、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、洋川芎内酯 I 9 种对照品, 按“2.1.2”项下方法分别制备供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件测定, 计算各指标成分的回收率。结果 9 种成分的平均加样回收率分别为 99.0%、99.2%、98.5%、98.4%、99.5%、99.1%、98.8%、98.6%、99.2%, RSD 分别为 0.9%、0.6%、1.4%、1.2%、1.0%、0.7%、0.7%、1.0%、0.7%, 结果表明该方法准确可靠。

**2.3.8 TSD 汤剂中多种成分含量测定** 取 15 批 TSD 汤剂, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件测定, 采用外标一点法进行计算, 见表 3。结果发现 15 批 TSD 冻干粉中没食子酸、5-羟甲基糠醛、绿原酸、芍药内酯苷、羟

表 3 15 批 TSD 汤剂中 9 种成分的质量分数

Table 3 Content of nine components in 15 batches of TSD

样品	质量分数/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )								
	没食子酸	5-羟甲基糠醛	绿原酸	芍药内酯苷	羟基红花黄色素 A	芍药苷	阿魏酸	毛蕊花糖苷	洋川芎内酯 I
S1	187.5	8.2	415.8	668.2	1 202.0	2 259.5	121.3	11.8	78.5
S2	199.3	7.4	413.2	665.0	1 179.0	2 244.1	118.9	15.8	79.2
S3	202.1	6.8	440.4	635.2	1 127.0	2 306.1	116.4	18.3	79.3
S4	203.2	6.2	447.8	626.8	1 119.4	2 204.3	114.0	16.5	79.6
S5	203.0	6.7	424.3	642.2	1 171.7	2 308.5	116.9	14.4	79.2
S6	326.4	154.0	455.6	923.5	884.7	2 756.4	79.8	24.6	53.4
S7	333.1	152.5	459.2	898.5	875.9	2 748.9	80.0	26.9	53.0
S8	337.3	154.2	458.5	918.2	876.6	2 782.9	77.3	22.0	52.6
S9	336.6	154.8	451.5	913.4	873.8	2 695.6	74.8	17.9	52.3
S10	344.4	154.6	458.5	919.7	881.9	2 699.3	72.7	14.5	51.7
S11	238.1	120.3	419.1	547.4	992.5	2 327.1	60.5	9.6	38.9
S12	241.5	116.3	418.2	526.7	976.9	2 231.8	62.6	10.6	41.5
S13	244.3	114.0	419.8	550.7	980.2	2 282.4	62.7	10.4	42.7
S14	246.8	109.8	419.5	510.8	953.1	2 188.5	61.4	6.4	42.8
S15	248.5	107.0	416.2	507.5	942.4	2 122.3	59.2	8.3	42.9

基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、洋川芎内酯 I 质量分数分别为 187.5~344.4、6.2~154.8、413.2~459.2、507.5~923.5、873.8~1 202.0、2 122.3~2 782.9、59.2~121.3、6.4~26.9、38.9~79.6 μg/g，以芍药苷、羟基红花黄色素 A、芍药内酯苷等成分含量较高。

### 2.4 PLS-DA 化学模式分析

为评价不同产地样品之间的成分含量差异，采用有监督的 PLS-DA 模型进行分析<sup>[15]</sup>。以样品 S1~S15 为 Y 变量，9 种成分的含量为 X 变量，利用 SIMCA 14.1 软件进行 PLS-DA 处理，见图 4、5。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 S1~S5 为一类，S6~S10 为一类，S11~S15 为一类，更进一步对化学指纹图谱中聚类分析结果进行分类，同时表明这 9 种成分在评价样品产地之间的质量差异具有重要参考价值。同时，变量重要性投影（VIP）值越大，表明对样品分类贡献较大；其中 VIP>1 的有 4 种成分，依次为芍药苷、芍药内酯苷、羟基红花黄色素 A 和 5-羟甲基糠醛，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，可作为指导经典名方 TSD 物质基准及复方制剂质量控制的关键成分。

### 3 讨论

#### 3.1 色谱条件的选择

中药复方化学成分复杂，选择梯度洗脱能更有利于成分信息的获得。考察供试品溶液制备时不同体积分数（25%、50%、75%、100%）甲醇和水的配比对汤剂中有效成分的影响，综合考虑各待测成分的色谱峰峰形及分离度，最终选择 50% 甲醇为汤剂冻干粉的提取溶剂。

指纹图谱色谱条件综合考察了流动相、波长、柱温、体积流量、色谱柱等，结果表明甲醇-0.1% 磷酸水溶液、波长 225 nm、30 ℃ 等条件下色谱峰峰形、分离度及出峰数量等方面较优。根据对照品预试验初步考察，没食子酸、5-羟甲基糠醛、绿原酸、苦杏仁苷、芍药内酯苷、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、洋川芎内酯 I、苯甲酰芍药苷、藁本内酯的最佳吸收波长分别为 215、285、325、210、232、403、232、322、330、278、281、281 nm，由于本研究测定成分较多，成分间波长差异较大，为实现多成分含量同时测定，在综合考察峰形、基线、吸收差异等多项干扰因素下，最终确定最佳的波长切换法对多成分进行含量测定。

#### 3.2 指标成分的确定

结合相关文献报道<sup>[16]</sup>，参照《中国药典》2015 年版<sup>[17]</sup>中对 TSD 各饮片明确规定的羟基红花黄色素 A、苦杏仁苷、阿魏酸、芍药苷、毛蕊花糖苷 5 个定量指标，并采用化学指纹图谱与多成分含量测定相结合进一步确定该方与药效相关联的关键成分。红花中含有的羟基红花黄色素 A 是发挥活血化瘀的主要成分，治疗痛经、产后出血、骨质疏松等疾病<sup>[18]</sup>；桃仁中苦杏仁苷等成分具有血管保护、神经保护、免疫调节、抗肿瘤等作用<sup>[19]</sup>；川芎与当归是活血化瘀常见药对，阿魏酸、洋川芎内酯 I、藁本内酯等活性成分具有抗炎止痛、抗血小板凝聚等活性<sup>[20]</sup>；白芍中含有芍药苷、芍药内酯苷、没食子酸、苯甲酰芍药苷等主要活性成分，具有抗血小板聚集、镇痛抗炎等作用，可调节急性血瘀模型大鼠的血液流变性、凝血功能以及血小板数<sup>[21]</sup>；地黄中毛蕊花糖苷、5-羟甲基糠醛、梓醇等活性成分具有免疫调节、肝脏保护以及神经保护作用<sup>[22]</sup>。绿原酸具有抗骨质疏松作用，

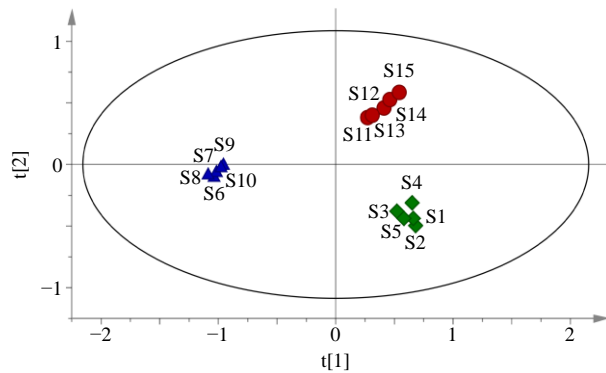


图 4 15 批 TSD 汤剂 PLS-DA 的得分

Fig. 4 PLS-DA score plot of 15 batches of TSD

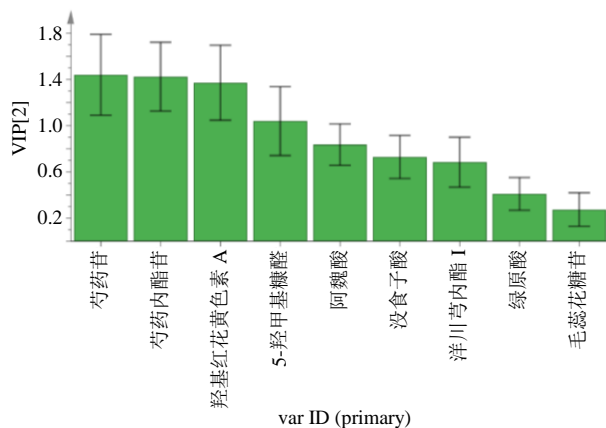


图 5 TSD 汤剂中 9 种成分的 VIP 值

Fig. 5 VIP value of nine components of TSD



可促进大鼠成骨细胞增殖<sup>[23]</sup>；其中，梓醇、苦杏仁苷等成分因炮制加工易损失使含量降低，藁本内酯等挥发性成分受热不稳定，均不宜作为指标性成分。因此，选择测定没食子酸、5-羟甲基糠醛、绿原酸、芍药内酯苷、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、洋川芎内酯 I 9 种与药效相关且较稳定的指标成分的含量，能进一步提升对 TSD 内在质量的控制。

### 3.3 测定结果分析

采用指纹图谱结合多指标成分含量测定是目前既兼顾“质量概貌”，又体现“质量属性”的中药复方制剂质量控制的有效方法，有利于体现中药基原采收、炮制加工、煎煮制备等全过程多环节复杂影响因素，实现中药源头到制剂成型的全过程质量把关，保证质量的均一可控性，提升经典名方复方制剂的品质与疗效。

指纹图谱结果表明，在 225 nm 波长下，15 批 TSD 汤剂相似度值均大于 0.96，一致性良好；匹配结果显示共有 35 个共有峰，指出 2、8、9、13~16、25、31、32 号峰，依次为没食子酸、绿原酸、苦杏仁苷、芍药内酯苷、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、洋川芎内酯 I、苯甲酰芍药苷、藁本内酯，该波长下能更好地评价样品中化学成分差异；然而，该波长下样品 S1~S5 中的 5-羟甲基糠醛未被检测出，但样品 S6~S15 中的能被检测出且响应吸收值较高；样品中的毛蕊花糖苷在该波长下也未被检测出；故 5-羟甲基糠醛和毛蕊花糖苷未作为指纹图谱条件共有模式下的共有峰，但样品中该 2 种成分分别在最佳吸收波长时均有明显的色谱峰吸收，故可通过最佳波长切换法测定其在汤剂中的含量。

为进一步考察不同批次 TSD 汤剂之间的质量差异，测定该样品中 9 种有效成分的含量，同批次中以芍药苷、羟基红花黄色素 A、芍药内酯苷的含量较高，通过 PLS-DA 处理，发现芍药苷（源于白芍）、芍药内酯苷（源于白芍）、羟基红花黄色素 A（源于红花）和 5-羟甲基糠醛（源于地黄）4 种成分是有利于区分不同批次样品质量贡献较大的几个主要成分。因此，本实验通过多批次指纹图谱结合主成分分析法，提示芍药苷、芍药内酯苷、羟基红花黄色素 A、5-羟甲基糠醛是对 TSD 批次间影响较大的成分，对这些成分进行质量控制，有利于有效反映 TSD 的质量变化属性。

### 参考文献

- [1] 李双双, 郭春燕. 桃红四物汤化学成分及药理作用研究进展 [J]. 神经药理学报, 2016, 6(4): 42-49.
- [2] 张东龙. 桃红四物汤临床应用研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(11): 217-219.
- [3] 徐龙进, 唐吉友, 周晓娟, 等. 桃红四物汤抗癫痫作用机制研究 [J]. 中草药, 2017, 48(15): 3117-3121.
- [4] 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.
- [5] 周 菲, 林美斯, 王 琳, 等. 经典名方百合地黄汤物质基准制备及过程质量控制研究 [J]. 中草药, 2019, 50(16): 3824-3832.
- [6] 聂 欣, 成颜芬, 王 琳, 等. 桃红四物汤化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及质量标志物的预测分析 [J/OL]. 中国实验方剂学杂志, 2019-09-18. <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20191953>.
- [7] 李双双, 李 双, 杨建明, 等. RP-HPLC 法测定桃红四物汤提取物中 9 种水溶性活性成分的含量 [J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(3): 364-367.
- [8] 李海英, 贺 鹏, 樊启猛, 等. 桃红四物汤 HPLC 指纹图谱的总量统计矩及一次稳态投料量分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(15): 37-43.
- [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] 陈 蒙, 林龙飞, 刘宇灵, 等. 经典名方苓桂术甘汤 HPLC 指纹图谱的建立及 3 种成分含量测定 [J]. 中草药, 2019, 50(17): 4152-4157.
- [11] 位恒超, 刘雅敏, 韩德恩, 等. 基于多成分同时定量和统计学分析的大黄利胆片质量评价研究 [J]. 中草药, 2019, 50(17): 4158-4163.
- [12] 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.
- [13] 侯一哲, 黎 翩, 肖红敏, 等. 血塞通滴丸皂苷类成分含量测定及批次一致性评价研究 [J]. 中草药, 2019, 50(11): 2552-2559.
- [14] 杨冰月, 彭 亮, 颜永刚, 等. HPLC 指纹图谱结合化学模式识别分析不同产地款冬花生品与蜜炙品 [J]. 中草药, 2018, 49(21): 4991-4997.
- [15] Ye J, Zhang X, Dai W, *et al.* Chemical fingerprinting of Liuwei Dihuang Pill and simultaneous determination of its major bioactive constituents by HPLC coupled with multiple detections of DAD, ELSD and ESI-MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 49(3): 638-645.
- [16] 居一春, 李 祥. 桃红四物汤化学成分研究进展 [J].



- 医药导报, 2008, 27(5): 575-577.
- [17] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [18] Asgarpanah J, Kazemivash N. Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of *Carthamus tinctorius* L. [J]. *Chin J Integr Med*, 2013, 19(2): 153-159.
- [19] 许筱凰, 李 婷, 王一涛, 等. 桃仁的研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(17): 2649-2655.
- [20] 李伟霞, 王晓艳, 唐进法, 等. 基于 PLS-DA 和多指标综合指数法研究当归-川芎药对对急性血瘀大鼠血清中血管活性物质和黏附分子的影响 [J]. 药学学报, 2019, 54(11): 1909-1917.
- [21] 章 丽, 赵冰洁, 袁嘉瑞, 等. 牡丹皮、赤芍与白芍对急性血瘀模型大鼠活血功效的比较研究 [J]. 中草药, 2016, 47(15): 2676-2683.
- [22] 张振凌, 吴若男, 于文娜, 等. 生地黄产地加工炮制一体化工艺研究 [J]. 中草药, 2018, 49(20): 4767-4772.
- [23] 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.