

经典名方温经汤标准汤剂 HPLC 指纹图谱建立及 9 种成分含量测定

张 越^{1,2}, 陈 健^{1,2}, 李 洋^{1,2}, 王洪兰^{1,2*}, 李俊松^{1,2*}, 狄留庆^{1,2}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 江苏省中药高效给药系统工程技术研究中心, 江苏 南京 210023

摘要: **目的** 建立经典名方温经汤标准汤剂 HPLC 指纹图谱, 同时对其中 9 种成分进行含量测定, 为其质量控制提供参考。**方法** 采用 Kromasil C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 0.8 mL/min, 采用多波长切换法, 检测波长分别为 220、280、320、380 nm, 柱温 25 ℃, 对 15 批温经汤标准汤剂进样分析, 采用中药色谱指纹图谱相似度评价软件 (2012 年版) 并结合聚类分析 (CA)、主成分分析 (PCA) 与偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA) 对结果进行评价, 同时进行含量测定。**结果** 建立了温经汤标准汤剂 HPLC 指纹图谱, 15 批样品相似度在 0.902~0.992, 共标定出 18 个共有峰, 指出其中 9 个色谱峰 (即 2 号峰没食子酸、5 号峰芍药苷、7 号峰甘草苷、8 号峰阿魏酸、9 号峰芹糖异甘草苷、11 号峰异甘草苷、14 号峰桂皮醛、15 号峰甘草酸铵、16 号峰丹皮酚), CA、PCA 及 PLS-DA 将 15 批样品分为 2 类。定量分析条件方法学考察结果良好, 9 个成分加样回收率在 94.91%~108.16%; 15 批样品中没食子酸、芍药苷、甘草苷、阿魏酸、芹糖异甘草苷、异甘草苷、桂皮醛、甘草酸铵及丹皮酚的质量分数分别为 10.7~31.3、95.8~228.4、18.6~62.4、3.3~8.3、4.8~18.7、2.8~10.6、13.7~108.2、83.9~292.3、31.1~125.5 mg/g。**结论** 建立的 HPLC 指纹图谱结合多成分同时含量测定的分析方法简便稳定, 重复性好, 可为经典名方温经汤物质基准的质量评价提供依据。

关键词: 经典名方; 温经汤; 指纹图谱; 含量测定; 聚类分析; 主成分分析; 偏最小二乘法-判别分析; 质量评价; 桂皮醛; 阿魏酸; 丹皮酚; 芍药苷; 甘草苷; 甘草酸铵; 异甘草苷; 芹糖异甘草苷; 没食子酸

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)18-4664-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.18.009

Establishment of HPLC fingerprint and determination of nine components in Wenjing Decoction

ZHANG Yue^{1,2}, CHEN Jian^{1,2}, LI Yang^{1,2}, WANG Hong-lan^{1,2}, LI Jun-song^{1,2}, DI Liu-qing^{1,2}

1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Engineering Research Center for Efficient Delivery System of TCM, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint and simultaneously determinate nine components of the standard decoction of Wenjing Decoction, so as to provide reference for the quality control of Wenjing Decoction of classical prescriptions. **Methods** Fingerprints of 15 batches of the standard decoction of Wenjing Decoction were determined by HPLC-PDA, and the control fingerprint was established. All samples were analyzed by Kromasil C₁₈ chromatographic column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) maintained at 25 ℃, and eluted with acetonitrile-0.1% phosphoric acid at the flow rate of 0.8 mL/min, and the detection wavelength was 220, 280, 320 and 380 nm respectively. Combined with cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA), and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA), the quality of 15 batches of Wenjing Decoction was analyzed. At the same time, the contents of nine active components were determined. **Results** The similarity of 15 batches of standard decoction of Wenjing Decoction was between 0.902 and 0.992, and a total of 18 common peaks were identified and nine of them (2-gallic acid, 5-paeoniflorin, 7-liquiritin, 8-ferulic acid, 9-isoliquiritin apioside, 11-isoliquiritin, 14-cinnamaldehyde, 15-ammonium glycyrrhetate, 16-paeonol) were quantitative analyzed. CA, PCA and PLS-DA were used to classify the 15 batches of samples into two groups. The

收稿日期: 2020-04-23

基金项目: 国家中医药管理局中药标准化项目 (ZYBZH-C-JS-30); 江苏省科技成果转化专项资金项目 (BA2016104)

作者简介: 张 越 (1996—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药新剂型与新技术。Tel: (025)85811517 E-mail: yuezhang1996@yeah.net

*通信作者 王洪兰 (1977—), 副教授, 博士, 研究方向为中药及复方药效物质基础。Tel: (025)85811512 E-mail: honglanwang2004@163.com

李俊松 (1964—), 男, 博士, 教授, 研究方向为中药新制剂与新技术。Tel: (025)85811517 E-mail: Lijunsong1964@163.com

results of quantitative analysis were good, and the recovery rate of nine components was 94.91%—108.16%. The content of gallic acid, paeoniflorin, iquiritin, ferulic acid, isoliquiritin apioside, isoliquiritin, cinnamaldehyde, ammonium glycyrrhetate, paeonol in 15 batches of samples were in the range of 10.7—31.3, 95.8—228.4, 18.6—62.4, 3.3—8.3, 4.8—18.7, 2.8—10.6, 13.7—108.2, 83.9—292.3, and 31.1—125.5 mg/g, respectively. **Conclusion** The HPLC fingerprint combined with the simultaneous determination of multicomponent analysis method established in this experiment are stable and reliable, which can provide the theoretical guidance for the quality evaluation of Wenjing Decoction and its compound preparations.

Key words: classical prescriptions; Wenjing Decoction; fingerprint; content determination; cluster analysis; principal component analysis; partial least squares discriminant analysis; quality evaluation; cinnamic aldehyde; ferulic acid; paeonol; paeoniflorin; liquiritin; ammonium glycyrrhetate; isoliquiritin; isoliquiritin apioside; gallic acid

温经汤出自南宋陈自明的《妇人大全良方》，又称良方温经汤，收录于《古代经典名方目录（第一批）》^[1]。全方由当归、川芎、白芍、肉桂、牡丹皮、莪术、人参、牛膝、甘草 9 味药组成，方中肉桂温经散寒，通脉调经为君药；当归、川芎养血活血，调经止痛，人参甘温补气，助肉桂通阳散寒，共为臣药；莪术、牡丹皮、牛膝活血祛瘀，助当归、川芎通行血滞，白芍缓急止痛，共为佐药；甘草调和诸药为使药。全方温经散寒、活血化瘀、调经止痛^[2-3]。临床上主要用于治疗痛经、闭经、月经量少、不孕症、子宫内膜异位症、调节内分泌系统等^[4-6]。温经汤是治疗寒凝血瘀型痛经的经典方，是妇科调经之要方，临床应用广泛，具有很好的开发价值。

经典名方是我国中医药宝库中的伟大财富和智慧结晶，历史悠久，源远流长，其研制分为物质基准研制和制剂研制 2 个阶段。然而中药成分的复杂性使得保持其质量一致性成为质量控制的难点。鉴于中药组成的多样性和辨证施治的治疗方案，检测任何一种活性成分均不能代表其整体药效，中药指纹图谱能全面、定量地反映中药所包含的化学信息，是中药质量控制的有效手段，HPLC 指纹图谱法也成为最常见的质量控制手段^[7-8]。

目前，尚未见有关建立温经汤指纹图谱同时进行含量测定的研究报道，因此本研究通过 HPLC 法建立了温经汤标准汤剂指纹图谱，并采用相似度评价结合聚类分析（CA）、主成分分析（PCA）与偏最小二乘法-判别分析（PLS-DA）等化学模式识别方法进行分析，同时对其中 9 种有效成分进行含量测定，从定性与定量两个角度对温经汤标准汤剂进行评价和控制，以期对温经汤物质基准和质量控制的研究提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters 2695 高效液相色谱仪，美国 Waters 公

司；XP-6 型百万分之一精密天平，瑞士梅特勒-托利多国际股份有限公司；KH-500DE 型数控超声波清洗器，昆山禾创超声仪器有限公司；TGL-18C-C 型台式高速离心机，上海安亭科学仪器厂；FTS-10A 自动煎药壶，潮州市一壶百饮电器实业有限公司。

1.2 材料

对照品阿魏酸（批号 110773-201614，质量分数≥99.0%）、芍药苷（批号 110736-201842，质量分数≥97.4%）、丹皮酚（批号 110708-201407，质量分数≥99.9%）、没食子酸（批号 110831-201605，质量分数≥90.8%）、桂皮醛（批号 110710-201821，质量分数≥99.6%）、甘草苷（批号 111610-201607，质量分数≥93.1%）、甘草酸铵（批号 110731-201720，质量分数≥97.7%）购自中国药品食品检定研究院；对照品异甘草苷（批号 18101805，质量分数≥98%）、芹糖异甘草苷（批号 18121104，质量分数≥98%）均购于南京金益柏有限公司。乙腈，色谱纯，美国天地有限公司；甲醇、磷酸，分析纯，国药集团化学试剂有限公司；水为超纯水。

当归、川芎、白芍、肉桂、牡丹皮、莪术、人参、牛膝、甘草 9 味药材均购于其道地产地或主产区，经南京中医药大学药学院刘训红教授鉴定分别为当归为伞形科当归属植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. 的干燥根，川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎，白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根，肉桂为樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥树皮，毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮，牛膝为苋科植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl. 的干燥根，人参为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根和根茎，甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎；莪术经南京中医药大学药学院巢建国教授鉴定为姜科植物蓬莪术 *Curcuma phaeocaulis* Val.、

广西莪术 *Curcuma kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. 批次为 2019111501~2019111515, 配伍药材产地信息见 Liang 的干燥根茎。15 批温经汤编号为 S1~S15, 息见表 1。

表 1 15 批温经汤配伍药材产地信息

Table 1 Origin information of 15 batches of Wenjing Decoction compatibility medicinal materials

编号	产地								
	当归	川芎	牡丹皮	牛膝	莪术	肉桂	人参	白芍	甘草
S1	甘肃民乐	四川隐峰	安徽铜陵	河南大封	云南楚雄	广西防城港	吉林抚松	安徽亳州	甘肃民勤
S2	甘肃岷县	四川彭州	安徽亳州	河北安国	广西灵山	广西岑溪	黑龙江饶河	安徽谯东	甘肃泉山
S3	甘肃渭源	四川彭山	山西运城	内蒙赤峰	广西南宁	广东肇庆	吉林临江	四川中江	内蒙赤峰
S4	甘肃渭源	四川夹江	陕西商洛	河南西陶	广西南宁	广西灵山	吉林长白	浙江金华	新疆乌什
S5	甘肃民乐	四川彭州	山西运城	河南西陶	云南楚雄	广西岑溪	吉林临江	浙江金华	甘肃民勤
S6	甘肃岷县	四川彭山	陕西商洛	河南大封	广西灵山	广东肇庆	吉林长白	安徽亳州	甘肃民勤
S7	甘肃渭源	四川夹江	安徽铜陵	河北安国	广西灵山	广西灵山	吉林抚松	安徽谯东	内蒙赤峰
S8	甘肃民乐	四川隐峰	安徽亳州	内蒙赤峰	云南楚雄	广西防城港	黑龙江饶河	四川中江	新疆乌什
S9	甘肃岷县	四川彭州	山西运城	河南西陶	广西南宁	广西岑溪	吉林临江	浙江金华	甘肃民勤
S10	甘肃渭源	四川彭山	陕西商洛	河南大封	广西南宁	广东肇庆	吉林长白	安徽亳州	甘肃泉山
S11	甘肃民乐	四川夹江	安徽铜陵	河北安国	云南楚雄	广西灵山	吉林长白	安徽谯东	内蒙赤峰
S12	甘肃岷县	四川隐峰	安徽亳州	内蒙赤峰	广西灵山	广西防城港	黑龙江饶河	四川中江	新疆乌什
S13	甘肃渭源	四川彭州	山西运城	河南西陶	广西南宁	广西岑溪	吉林临江	浙江金华	甘肃民勤
S14	甘肃民乐	四川彭山	陕西商洛	河南大封	广西灵山	广东肇庆	吉林抚松	安徽亳州	甘肃民勤
S15	甘肃岷县	四川夹江	安徽铜陵	河北安国	云南楚雄	广西灵山	吉林抚松	安徽谯东	内蒙赤峰

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Kromasil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~5 min, 3%乙腈; 5~17 min, 3%~15%乙腈; 17~21 min, 15%乙腈; 21~27 min, 15%~21%乙腈; 27~31 min, 21%乙腈; 31~56 min, 21%~45%乙腈; 56~72 min, 45%~65%乙腈; 72~82 min, 65%~95%乙腈; 82~87 min, 95%乙腈; 87~89 min, 95%~3%乙腈; 89~95 min, 3%乙腈; 柱温 25 ℃; 体积流量 0.8 mL/min; 进样量 10 μL; 检测波长: 0~31 min, 220 nm; 31~38 min, 320 nm; 38~47 min, 380 nm; 47~65 min, 220 nm; 65~95 min, 280 nm。

2.2 溶液制备

2.2.1 温经汤标准汤剂的制备 《妇人大全良方》记载温经汤原方为“当归、川芎、芍药、桂心、牡丹皮、莪术各半两, 人参、甘草、牛膝各一两, 右咬咀, 每服五钱。水一盞半, 煎至八分, 去滓温服”。课题组前期文献考证后认为 1 两可确定为当今 40 g^[9-10], 1 盞约为 100 mL。因此确定温经汤标准汤剂的制备方法为取当归、川芎、白芍、肉桂、牡丹皮、

莪术各 20 g, 人参、甘草、牛膝各 40 g, 粉碎, 过 1 号筛, 混匀, 取 20 g, 加水 150 mL 煎煮, 武火煮沸, 文火保持微沸, 煎至 120 mL, 停止加热, 趁热滤过(200 目), 即得。

2.2.2 混合对照品溶液制备 取没食子酸、芍药苷、甘草苷、阿魏酸、芹糖异甘草苷、异甘草苷、桂皮醛、甘草酸铵、丹皮酚对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成质量浓度分别为 37.95、280.30、126.70、15.90、53.30、20.10、181.10、452.00、207.40 mg/L 的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液制备 精密量取“2.2.1”项下制备的温经汤标准汤剂 5 mL, 加甲醇定容至 10 mL, 混匀, 14 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 即得供试品溶液。

2.3 温经汤指纹图谱的建立^[11-14]

2.3.1 精密度试验 取同一份温经汤供试品溶液(S15), 按“2.1”项下色谱条件, 连续进样 6 次, 记录 HPLC 图, 以桂皮醛为参照峰, 计算得到各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值分别为 0.024%~1.000%和 0.69%~2.90%, 表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取同一份温经汤供试品溶液 (S15), 按“2.1”项下色谱条件, 分别于 0、3、6、14、19、24 h 进样, 记录 HPLC 图, 以桂皮醛为参照峰, 计算得到各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值分别为 0.027%~1.900%和 0.91%~1.20%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 取 S15 批次温经汤标准汤剂, 按“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 记录 HPLC 图, 以桂皮醛为参照峰, 计算得到各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值分别为 0.011%~1.600%和 0.73%~2.90%, 表明该方法重复性良好。

2.3.4 指纹图谱建立及相似度评价 取 15 批温经汤供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样检测, 记录色谱图。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”进行数据分析, 以 S1 为参照图谱,

时间窗宽度设定为 0.1 min, 采用中位数法, 进行多点校正和全谱峰匹配, 生成温经汤指纹图谱及对照指纹图谱, 见图 1。共标定 18 个共有峰, 其中指认 9 个色谱峰, 分别是 2 号峰没食子酸、5 号峰芍药苷、7 号峰甘草苷、8 号峰阿魏酸、9 号峰蔗糖异甘草苷、11 号峰异甘草苷、14 号峰桂皮醛、15 号峰甘草酸铵、16 号峰丹皮酚。以对照指纹图谱为参照, 计算 15 批温经汤样品图谱相似度分别为 0.978、0.973、0.966、0.970、0.936、0.975、0.967、0.969、0.902、0.976、0.929、0.934、0.992、0.941、0.944, 相似度良好, 均在 0.90 以上, 表明所建立的温经汤标准汤剂指纹图谱质量稳定, 可以反映其指纹特征。

2.3.5 CA CA 常用于数据的初步探索性分析, 具有直观、结论形式简明的优点^[15-16]。采用 SPSS 24.0 数据分析软件, 对 15 批样品的共有峰的相对峰面积进行系统聚类, 采用组间连接法, 测量区间为平方

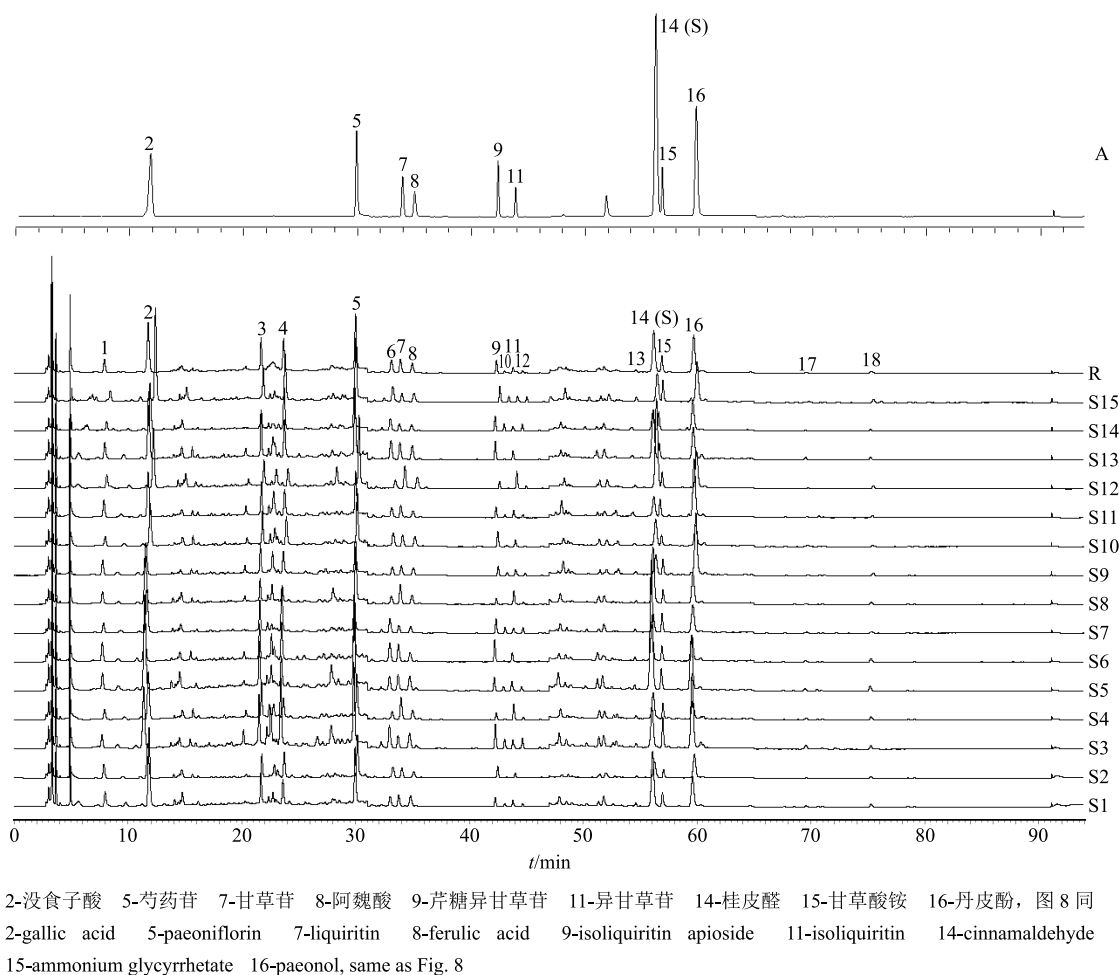


图 1 混合对照品 HPLC 图 (A)、温经汤标准汤剂 HPLC 对照指纹图谱 (R) 以及 15 批温经汤标准汤剂 HPLC 指纹图谱 (S1~S15)

Fig. 1 HPLC of mixed control solution (A), HPLC reference fingerprint of Wenjing Decoction (R) and HPLC fingerprint of 15 batches of Wenjing Decoction (S1—S15)

欧氏距离, 聚类结果见图 2。当平方欧氏距离为 15 时, 可将 15 批温经汤标准汤剂样品分为 2 类, 其中 S1、S4~S6、S8、S10、S12、S13 聚为一类, S2、S3、S7、S9、S11、S14、S15 聚为一类。聚类结果表明, 不同批次样品间存在差异, 与来自不同产地的配伍药材具有一定相关性, 如聚为一类的 S1、S8、S12 中肉桂的产地均为其主产地广西防城港, 不同产地间药材质量的差异对标准汤剂的质量控制产生一定影响。

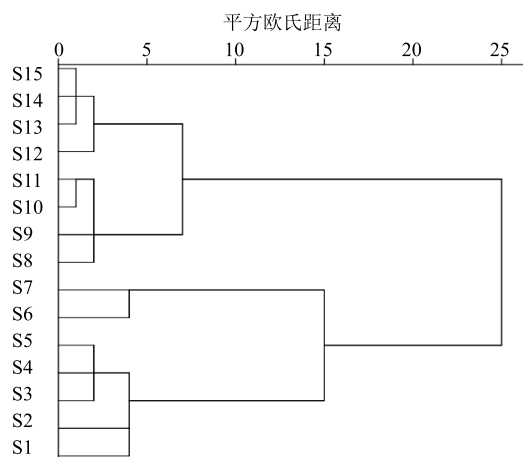


图 2 15 批样品 CA 树状图

Fig. 2 CA of 15 batches of samples

2.3.6 PCA PCA 是一种变量约简的探索性数据分析方法^[17], 具有可信度高、灵活性强, 侧重于综合评价信息的贡献影响力的特点^[15]。采用 SPSS 24.0 数据分析软件对 15 批样品共有峰峰面积标准化处理, 再进行 PCA。以特征值大于 1 为提取原则, 得到前 2 个成分的累积贡献率为 93.844%, 能够概括样品数据的绝大部分信息, 见表 2。PCA 碎石图显示, 在特征值 > 1 时曲线陡峭, 特征值 < 1 后趋于平缓, 说明提取 2 个主成分合理, 见图 3。PCA 将 15 批样品分为 2 类: S2、S3、S7、S9、S11、S14、S15 为主成分 1; S1、S4~S6、S8、S10、S12、S13 为主成分 2, 见图 4, 与 CA 结果一致。

2.3.7 PLS-DA^[18-20] PLS-DA 是一种有监督的模式识别方法, 具有直观、清晰的分析效果及较高的

表 2 特征值及累积方差贡献率

Table 2 Eigenvalues and contribution rates of cumulative variance

成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	12.859	48.444	48.444
2	1.237	45.529	93.973

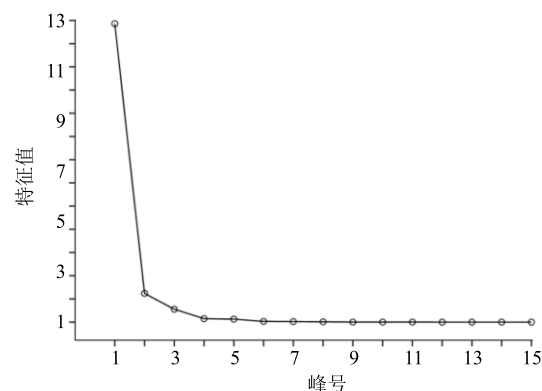


图 3 主成分碎石图

Fig. 3 PCA gravel map

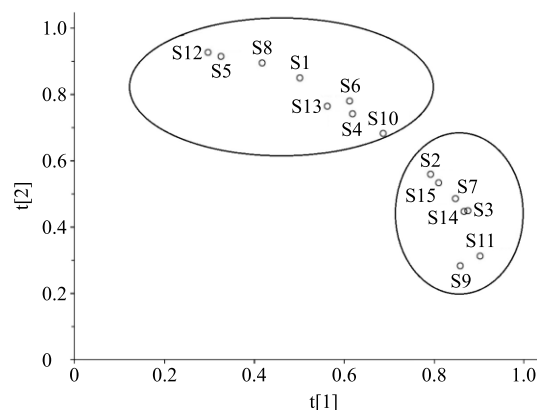


图 4 主成分载荷图

Fig. 4 Principal component load diagram

预测精度和强大的解释能力。将 15 批样品 18 个共有峰峰面积导入 SIMCA-P 13.0 分析软件, 启动 PLS-DA 分析程序, 分别生成得分散点图、载荷图和变量重要性投影 (Variable Importance in Projection, VIP) 值图, 见图 5~7。由图 5 可知, 15 批样品数据点均落在置信区间 (95%) 内, 根据分布可分为 2 类, 与 CA、PCA 分类结果一致。PLS-DA 载荷图 (图 6) 上每 1 个点代表 1 个变量, 距离原点越远, 表明权重值越大, 对样品的区分能力越强。结合 VIP 图可更直观得出各色谱峰影响程度排序依次为峰

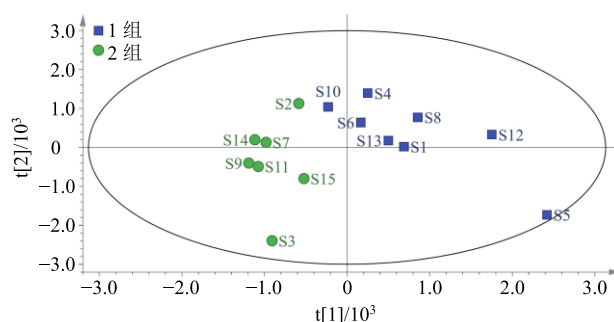


图 5 PLS-DA 得分散点图

Fig. 5 PLS-DA score plots

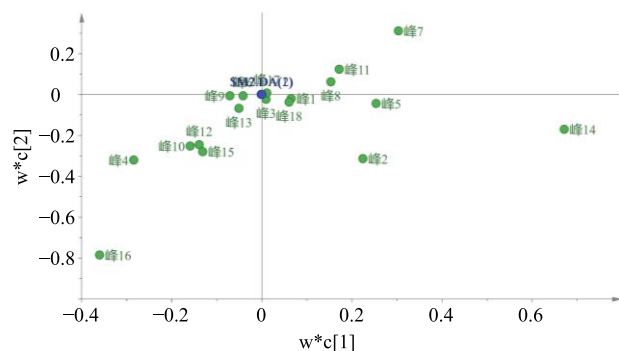


图 6 PLS-DA 载荷散点图

Fig. 6 PLS-DA loading plots

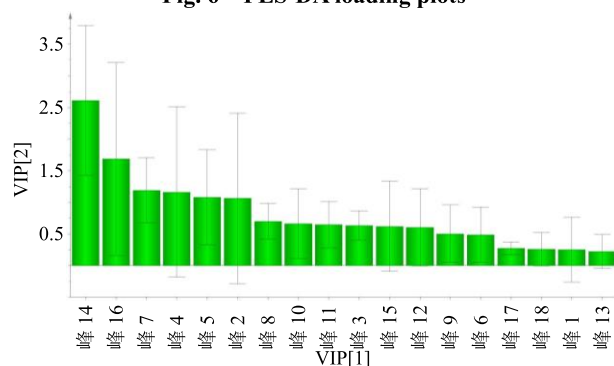


图 7 PLS-DA VIP 值图

Fig. 7 VIP plot of PLS-DA

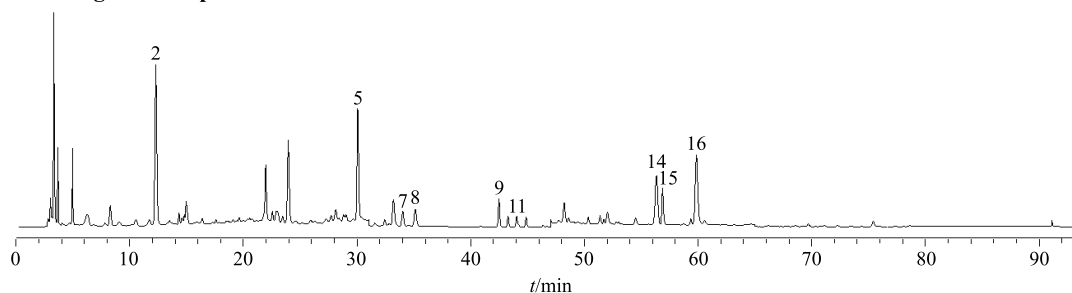


图 8 温经汤标准汤剂 (S15) 供试品溶液 HPLC 色谱图

Fig. 8 HPLC fingerprint of Wenjing Decoction (S15) sample

合对照品溶液，用倍比稀释法配制成系列混合对照品溶液，按“2.4.1”项下色谱条件分别进样测定，记录峰面积，以对照品质量浓度为横坐标 (X)，以峰面积为纵坐标 (Y)，绘制标准曲线，结果见表 3。

2.4.4 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 (S15)，按“2.4.1”项下色谱条件连续进样 6 次，测定没食子酸、芍药苷、甘草苷、阿魏酸、芹糖异甘草苷、异甘草苷、桂皮醛、甘草酸铵、丹皮酚，各成分峰面积的 RSD 依次为 0.69%、0.55%、1.1%、0.74%、0.61%、0.81%、0.89%、1.5%、1.0%，表明仪器精密度良好。

2.4.5 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 (S15)，分别于 0、3、6、14、19、24 h 按“2.4.1”

14>峰 16>峰 7>峰 4>峰 5>峰 2>峰 8>峰 10>峰 11>峰 3>峰 15>峰 12>峰 9>峰 6>峰 17>峰 18>峰 1>峰 13。其中，峰 14 (桂皮醛)、峰 16 (丹皮酚)、峰 7 (甘草苷)、峰 4、峰 5 (芍药苷)、峰 2 (没食子酸) VIP 值大于 1，说明变量对模型分类的贡献具有统计学意义，可作为差异标志物，其次为峰 8 (阿魏酸)、峰 10、峰 11 (异甘草苷)、峰 3、峰 15 (甘草酸铵)、峰 12、峰 9 (芹糖异甘草苷)，故选取差异性较大且已知的 9 个成分进一步进行含量测定。

2.4 多成分含量测定

2.4.1 色谱条件 色谱柱、流动相、梯度洗脱程序、柱温、体积流量、进样量及检测波长均同“2.1”项。

2.4.2 专属性试验 精密吸取混合对照品溶液和供试品溶液 (S15) 各 10 μ L，按“2.4.1”项下色谱条件分别进样。在没食子酸、芍药苷、甘草苷、阿魏酸、芹糖异甘草苷、异甘草苷、桂皮醛、甘草酸铵和丹皮酚对照品相应位置上，供试品溶液中均有相同保留时间的色谱峰出现，混合对照品色谱图见图 1-A，供试品色谱图见图 8。

2.4.3 线性关系考察 精密吸取“2.2.2”项下的混

项下色谱条件进样，测定没食子酸、芍药苷、甘草苷、阿魏酸、芹糖异甘草苷、异甘草苷、桂皮醛、甘草酸铵、丹皮酚，各成分峰面积的 RSD 依次为 1.4%、1.7%、2.8%、1.9%、1.3%、2.0%、0.69%、2.3%、0.94%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.6 重复性试验 取 S15 批次温经汤标准汤剂，按“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.4.1”项下色谱条件进样，测得没食子酸、芍药苷、甘草苷、阿魏酸、芹糖异甘草苷、异甘草苷、桂皮醛、甘草酸铵、丹皮酚的平均含量 RSD 分别为 1.1%、1.4%、2.0%、2.1%、1.1%、1.2%、2.2%、2.2%、2.1%，表明该方法重复性良好。

表 3 线性关系考察结果
Table 3 Results of linear relationship

成分	回归方程	r^2	线性范围/(mg·L ⁻¹)
没食子酸	$Y=95\ 869 X-7\ 739.3$	0.999 9	0.59~ 37.95
芍药苷	$Y=9\ 105.2 X+3\ 831.6$	0.999 9	4.38~280.30
甘草苷	$Y=10\ 254 X+3\ 802$	0.999 9	3.96~126.70
阿魏酸	$Y=59\ 916 X+1\ 677.5$	0.999 9	0.50~ 15.90
芹糖异甘草苷	$Y=25\ 704 X+4\ 595.3$	0.999 9	1.67~ 53.30
异甘草苷	$Y=35\ 838 X+2\ 997.2$	0.999 9	1.26~ 20.10
桂皮醛	$Y=47\ 546 X+14\ 181$	1.000 0	1.41~181.10
甘草酸铵	$Y=2\ 320.9 X+4\ 812.8$	0.999 8	14.13~452.00
丹皮酚	$Y=22\ 895 X+8\ 939.6$	1.000 0	1.62~207.40

2.4.7 加样回收率试验 精密吸取已知含量的温经汤标准汤剂(S15) 6 份, 每份 0.5mL, 加入质量浓度分别为 44.11、292.09、39.65、11.33、19.64、6.30、32.47、339.63、99.45 μg/mL 的没食子酸、芍药苷、甘草苷、阿魏酸、芹糖异甘草苷、异甘草苷、桂皮醛、甘草酸铵、丹皮酚混合对照品溶液 0.25 mL, 按“2.2.3”项下制备供试品溶液, 按“2.4.1”项下色谱条件进样, 计算没食子酸、芍药苷、甘草苷、阿魏酸、芹糖异甘草苷、异甘草苷、桂皮醛、甘草酸铵、丹皮酚的平均加样回收率, 结果分别为

100.06%、101.81%、100.15%、108.16%, RSD 分别为 0.23%、1.08%、0.62%、2.86%、0.40%、0.63%、2.36%、1.27%、2.63%。

2.4.8 样品含量测定 取 15 批温经汤供试品溶液, 按“2.4.1”项下色谱条件进样测定, 计算没食子酸、芍药苷、甘草苷、阿魏酸、芹糖异甘草苷、异甘草苷、桂皮醛、甘草酸铵、丹皮酚的质量分数, 结果见表 4。结果表明, 15 批样品中没食子酸、芍药苷、甘草苷、阿魏酸、芹糖异甘草苷、异甘草苷、桂皮醛、甘草酸铵及丹皮酚的质量分数依次为 10.7~31.3、95.8~228.4、18.6~62.4、3.3~8.3、4.8~18.7、

表 4 15 批温经汤标准汤剂中 9 种成分质量分数
Table 4 Content of nine compounds in 15 batches of Wenjing Decoction

编号	质量分数/(μg·g ⁻¹)								
	没食子酸	芍药苷	甘草苷	阿魏酸	芹糖异甘草苷	异甘草苷	桂皮醛	甘草酸铵	丹皮酚
S1	23.1	153.5	29.2	5.8	7.4	3.9	46.6	144.7	53.1
S2	10.9	115.7	26.9	3.3	9.6	2.8	13.7	83.9	40.4
S3	20.6	228.4	32.1	8.3	20.1	6.1	33.6	292.3	125.5
S4	14.4	117.2	57.2	5.0	5.7	9.6	21.9	147.7	31.1
S5	31.3	224.0	40.4	7.9	11.1	6.3	108.2	215.1	93.0
S6	14.4	181.5	45.7	5.0	18.7	5.7	30.7	147.2	44.6
S7	15.0	106.0	20.2	3.7	11.9	3.7	16.2	185.2	51.1
S8	15.9	151.9	49.9	5.0	4.8	8.2	46.7	130.8	51.5
S9	10.7	95.8	25.8	4.5	7.8	4.1	17.3	154.7	105.5
S10	12.7	139.7	32.0	5.7	13.1	3.9	20.7	105.3	36.6
S11	13.9	113.1	31.5	3.8	8.9	4.8	15.6	179.9	99.5
S12	17.4	187.1	62.4	6.9	6.2	10.6	71.7	134.0	63.0
S13	20.2	175.3	45.1	8.1	15.6	5.6	38.7	142.7	54.9
S14	13.1	112.5	18.6	3.5	12.9	3.5	13.9	170.9	48.9
S15	24.4	169.0	23.3	5.8	13.5	4.4	22.4	197.3	69.2

2.8~10.6、13.7~108.2、83.9~292.3、31.1~125.5 $\mu\text{g/g}$ ，其中芍药苷、桂皮醛、甘草酸铵、丹皮酚等成分含量较高，不同批次间各成分含量存在差异，主要受原药材质量的影响。

3 讨论

3.1 色谱条件分析

本实验采用分别考察了在水-甲醇、水-乙腈、0.1%磷酸水溶液-乙腈以及 0.1%甲酸水溶液-乙腈 4 种不同的流动相体系下色谱峰的分离情况，结果显示流动相为 0.1%磷酸水溶液-乙腈时，有较好的色谱峰峰形，分离度较好，无明显拖尾，因此选择 0.1%磷酸水溶液-乙腈为流动相。

采用紫外检测器在 190~400 nm 进行全波长扫描，以获取最大化指纹图谱信息。综合考虑基线、峰形、峰数、指标成分分离度及响应值等因素，为实现指纹图谱信息丰富且多成分含量同时测定，最终确定多波长切换法，分别为 220 nm (0~31 min，检测没食子酸、芍药苷)；47~65 min，检测桂皮醛、甘草酸、丹皮酚)；320 nm (31~38 min，检测甘草苷、阿魏酸)；380 nm (38~47 min，检测芹糖异甘草苷、异甘草苷)；280 nm (65~95 min，色谱峰数多)。

3.2 温经汤标准汤剂指纹图谱及模式识别分析

桂皮醛是君药肉桂的主要有效成分，且桂皮醛色谱峰响应值较高，平均峰面积占共有峰峰面积的 14%，出峰时间稳定、适中，因此选择桂皮醛为参照峰。本实验建立了 15 批不同产地的温经汤标准汤剂指纹图谱，相似度在 0.902~0.992，说明重现性好，质量稳定。聚类分析将 15 批样品分为 2 类，与配伍药材产地具有一定相关性，如含有产地为新疆乌什的甘草均聚为一类。PCA 结果表明，抽样适应性检验值 (KMO 值) 大于 0.65，巴特利特检验 $P < 0.05$ ，说明数据可用于进行主成分分析，结果有效可靠。PLS-DA 分析结果显示，模型解释率参数 $R^2_Y = 0.85$ ，预测能力参数 $Q^2 = 0.657$ ，均高于 0.5，且两者之差小于 0.3，说明模型拟合程度较好，具有较强的稳定性和预测性。设置分类 Y 矩阵变量随机排列 200 次做置换检验，得 Q^2 拟合直线截距为 -0.295，小于 0.05，说明不存在过度拟合情况现象，所建立模型可靠。

3.3 定量指标的选择

本实验通过对照品指认出 9 个成分，其中包括君药肉桂的主要有效成分桂皮醛；臣药当归、川芎

的主要有效成分阿魏酸；佐药白芍、牡丹皮的主要有效成分芍药苷、丹皮酚；使药甘草的主要有效成分甘草苷、甘草酸铵等，均为《中国药典》2015 年版单味药项下规定的指标性成分。桂皮醛是肉桂的主要活性成分，具有镇痛、扩张血管、促进血液循环、升高体表温度等作用，是温经散寒、通络止痛的作用基础^[21-22]。当归与川芎均含有阿魏酸，白芍与牡丹皮均含有芍药苷，故选择两者加和法进行含量测定。阿魏酸作为当归、川芎的有效成分，具有抗血栓、抑制子宫收缩、促进血管舒张、延缓动脉粥样硬化等作用^[23-26]，发挥活血化瘀的功效。芍药苷有扩张血管、改善血液流变性、改善微循环、抗血小板聚集、抗惊厥等作用，是白芍养血敛阴、柔肝止痛的功效基础^[27-29]。丹皮酚有扩张血管、改善血液循环、保肝护肾、抗炎、镇痛等基于活血化瘀疗效的药理作用^[30-33]。甘草中含有甘草苷、甘草酸、芹糖异甘草苷、异甘草苷等主要有效成分，在中药复方中与化学成分间的协同作用、沉淀作用、增溶作用，能增强其他药物的疗效，降低某些药物的毒副作用，且能矫味、解毒，发挥调和诸药的功效^[34-35]。结合 PLS-DA 分析结果，选择与功效相关且差异性较大的没食子酸、芍药苷、甘草苷、阿魏酸、芹糖异甘草苷、异甘草苷、桂皮醛、甘草酸铵和丹皮酚 9 种成分进行含量测定。

综上，本研究采用 HPLC 法建立温经汤指纹图谱同时测定多成分含量，并结合多元统计分析，能够较为全面的对温经汤标准汤剂进行质量评价，为温经汤物质基准及后续复方制剂的质量控制研究提供参考。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局. 古代经典名方目录 (第一批) [EB/OL]. [2020-04-21]. <http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2018-04-16/7107.html>.
- [2] 马佳维, 叶明, 李荣群. 《金匱要略》与《妇人大全良方》温经汤之异同 [J]. 陕西中医药大学学报, 2016, 39(4): 82-84.
- [3] 王雨莎. 温经汤联合热敏灸治疗寒凝血瘀型子宫腺肌症痛经的临床研究 [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2019.
- [4] 陈艳芬, 彭宇, 吴春秀, 等. 温经汤治疗经产妇女月经病实寒证的临床疗效与安全性考察 [J]. 中国医药科学, 2019, 9(17): 84-87.
- [5] 韩梦璐. 温经汤加减配合灸治疗原发性痛经 (寒凝血瘀证) 的临床研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2019.

- [6] 曹 阳, 曹莉莉, 王唯迪, 等. 良方温经汤治疗子宫内膜异位症浅析 [J]. 河北中医, 2017, 39(3): 449-452.
- [7] 赵 娟, 谢世静, 赵兴华, 等. 中药指纹图谱质控方法研究进展 [J]. 云南中医中药杂志, 2020, 41(1): 82-86.
- [8] 吕 玥, 汤 湧, 李立言, 等. 中药复方制剂质量控制体系的研究进展 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2020, 26(1): 170-172.
- [9] 郭正忠. 三至十四世纪中国的权衡度量 [M]. 北京: 中国社会科学出版社, 2008.
- [10] 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.
- [11] 陈 健, 张 越, 王洪兰, 等. 当归标准汤剂 HPLC 指纹图谱及多指标成分定量研究 [J]. 中草药, 2019, 50(20): 4942-4949.
- [12] 成颜芬, 江华娟, 王 琳, 等. 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 [J]. 中草药, 2020, 51(3): 653-661.
- [13] 高 尚, 陈 秧, 彭彩云, 等. 止血调经颗粒 HPLC 指纹图谱研究及其主成分定量测定 [J]. 中草药, 2019, 50(15): 3642-3647.
- [14] 蒋 爱, 陈 健, 韩加伟, 等. 小儿退热洗剂 HPLC 指纹图谱及指标成分测定 [J]. 中草药, 2019, 50(13): 3077-3083.
- [15] 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.
- [16] 李新蕊. 主成分分析、因子分析、聚类分析的比较与应用 [J]. 山东教育学院学报, 2007(6): 23-26.
- [17] Gad H A, El-Ahmady S H, Abou-Shoer M I, *et al.* Application of chemometrics in authentication of herbal medicines: A review [J]. *Phytochem Analysis*, 2013, 24(1): 1-24.
- [18] 项 锋, 叶继锋, 侯齐书. 基于 PCA 和 PLS-DA 算法的不同生长阶段贯叶金丝桃药材 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2020, 40(3): 568-576.
- [19] 袁 静, 戴文科, 李京华. HPLC 指纹图谱技术结合 PLS-DA 在辛芩颗粒质量控制中的应用 [J]. 药物分析杂志, 2020, 40(2): 304-311.
- [20] 陈黎文, 宋粉云, 李 华, 等. 安胎丸 UPLC 指纹图谱及模式识别研究 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(3): 465-472.
- [21] 李 萍, 刘 欣, 梁代英, 等. 肉桂提取物及桂皮醛对人体表微循环及局部温度相关变化的影响 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(3): 262-264.
- [22] 侯小涛, 郝二伟, 秦健峰, 等. 肉桂的化学成分、药理作用及质量标志物 (Q-marker) 的预测分析 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 20-34.
- [23] 李 芊, 吴效科. 川芎化学成分及药理作用研究新进展 [J]. 化学工程师, 2020, 34(1): 62-64.
- [24] 夏青松, 孔靖玮, 李德顺, 等. 不同配比当归-川芎药对的抗炎、镇痛作用实验研究 [J]. 湖北中医药大学学报, 2015, 17(6): 1-4.
- [25] 陈志民, 刘建清, 郭莹莹, 等. 川芎促血管舒张有效部位中阿魏酸的含量测定 [J]. 中国药业, 2018, 27(7): 11-13.
- [26] 张 欣, 高增平. 阿魏酸的研究进展 [J]. 中国现代中药, 2020, 22(1): 138-147.
- [27] 王成龙. 基于白芍养血柔肝功效的芍药苷、芍药内酯苷药理作用研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [28] 张 利. 白芍的药理作用及现代研究进展 [J]. 中医临床研究, 2014, 6(29): 25-26.
- [29] 郑世存, 李晓宇, 欧阳兵, 等. 芍药苷药理作用研究新进展 [J]. 中国药物警戒, 2012, 9(2): 100-103.
- [30] 欧叶涛. 牡丹皮有效成分丹皮酚的提取及其药理作用的研究 [D]. 秦皇岛: 燕山大学, 2015.
- [31] 杨正生, 彭振辉, 姚青海, 等. 丹皮酚的药理作用研究进展 [J]. 中国药物与临床, 2011, 11(5): 545-547.
- [32] 胡云飞, 徐国兵. 牡丹皮及其主要成分丹皮酚的药理作用研究进展 [J]. 安徽医药, 2014, 18(4): 589-592.
- [33] 李方军. 牡丹皮化学成分及药理作用研究进展 [J]. 安徽医药, 2004(1): 9-10.
- [34] 赵海峰. “甘草和百药”配伍原理初探 [J]. 陕西中医学院学报, 1994(2): 28-29.
- [35] 冯 月, 吴文夫, 魏建华, 等. 甘草酸及甘草苷的提取纯化方法和药理作用研究进展 [J]. 人参研究, 2012, 24(3): 46-50.