

UPLC 测定经典名方金水六君煎中 11 种成分

董自亮^{1,2}, 李红亮², 原欢欢², 蒋燕霞², 李娟², 禹奇男², 吴瑞军^{1,2}, 冉亚东², 安太勇², 覃瑶^{1,2}, 彭世陆², 刘世琪², 彭涛², 秦少容², 罗维早^{1,2*}, 王欣^{1,2*}

1. 重庆市中药研究院, 重庆 400065
2. 太极集团有限公司, 重庆 400800

摘要: 目的 建立同时测定经典名方金水六君煎(JLD)中腺苷、鸟苷、5-羟甲基糠醛、阿魏酸、甘草苷、毛蕊花糖苷、芸香柚皮苷、橙皮苷、甘草酸铵、6-姜辣素、藁本内酯 11 种主要成分的 UPLC 方法。方法 采用 UPLC 法, 色谱柱为 Acquity UPLC HSS T3 C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 0.1%磷酸水溶液-乙腈为流动相, 梯度洗脱; 体积流量为 0.3 mL/min; 柱温 25 ℃; 进样量 1.0 μL; 检测波长: 腺苷、鸟苷、5-羟甲基糠醛、甘草酸铵为 248 nm, 阿魏酸为 330 nm, 甘草苷、毛蕊花糖苷、芸香柚皮苷、橙皮苷、6-姜辣素、藁本内酯为 281 nm。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, 同时采用 Hotelling's T^2 和 DModX 2 种统计量, 为不同批次样品的质量设定控制范围。结果 被测定的 11 种成分色谱峰均有良好的分离度, 方法精密度、重复性的 RSD 均小于 3%; 在室温条件下 24 h 内稳定; 各成分均有较宽的线性范围和良好的线性关系($r \geq 0.999$); 平均加样回收率 96.62%~103.15%, RSD 均小于 2%。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, 发现芸香柚皮苷、甘草酸铵、藁本内酯和阿魏酸是影响不同批次 JLD 物质基准质量贡献较大的 4 种成分。结论 建立的方法操作简便, 结果准确、可靠, 可用于 JLD 及其制剂的质量控制与评价。

关键词: 金水六君煎; UPLC; 偏最小二乘法-判别分析; 阿魏酸; 芸香柚皮苷; 藁本内酯; 甘草酸铵

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)03-0711-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.03.013

Determination of 11 components in Jinshui Liuju Decoction of classical prescriptions by UPLC

DONG Zi-liang^{1,2}, LI Hong-liang², YUAN Huan-huan², JIANG Yan-xia², LI Juan², YU Qi-nan², WU Rui-jun^{1,2}, RAN Ya-dong², AN Tai-yong², QIN Yao^{1,2}, PENG Shi-lu², LIU Shi-qi², PENG Tao², QIN Shao-rong², LUO Wei-zao^{1,2}, WANG Xin^{1,2}

1. Chongqing Institute of Chinese Medicine, Chongqing 400065, China
2. Taiji Group Co., Ltd., Chongqing 400800, China

Abstract: Objective To establish a UPLC method for the simultaneous determination of 11 components, including adenosine, guanosine, 5-hydroxymethylfurfural, ferulic acid, glycyrrhizin, verbascoside, rutin naringin, hesperidin, ammonium glycyrrhizinate, 6-gingerol, and ligustilide in Jinshui Liuju Decoction (金水六君煎, JLD). **Methods** The chromatographic separation was achieved on an Acquity UPLC HSS T3 C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) with 0.1% phosphate acid solution-acetonitrile as mobile phase at the flow rate of 0.3 mL/min for gradient elution; The column temperature was 25 ℃. The determination wavelengths were 248 nm for adenosine, guanosine, 5-hydroxymethylfurfural and ammonium glycyrrhizinate, 330 nm for ferulic acid, 281 nm for glycyrrhizin, verbascoside, rutin naringin, hesperidin, 6-gingerol, and ligustilide. The different samples were evaluated 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 11 compounds were well separated. The RSD values of precision and reproducibility were all less than 3%. The stability

收稿日期: 2020-09-20

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(2018ZX09721-005-003-006)

作者简介: 董自亮, 男, 在站博士后, 博士, 副主任中药师, 从事中药新药开发研究。E-mail: dzlcutcm@163.com

*通信作者: 罗维早, 男, 研究员, 研究方向为中药、民族药化学成分及药效物质基础。Email: Loweivao@163.com

王欣, 男, 副研究员, 研究方向为中药、民族药化学成分及药效物质基础。Email: wangxin_cq386@sina.com

was good in 24 h. The linear relationship between the concentration and peak areas of the 11 compounds was all linear ($r \geq 0.9992$). The average recoveries were in range of 96.62%—103.15% and the RSD values were all less than 2%. Fifteen batches of samples from different origins were classified into three categories. Using PLS-DA analysis, the content determination result showed that rutin naringin, ammonium glycyrrhizinate, ligustilide, and ferulic acid were the four components that affected the quality of different batches of JLD. **Conclusion** The method is simple, reliable, and accurate, and could be used for the quality control and evaluation of JLD.

Key words: Jinshui Liujun Decoction; UPLC; PLS-DA; ferulic acid; rutin naringin; ligustilide; ammonium glycyrrhizinate

金水六君煎 (Jinshui Liujun Decoction, JLD) 出自明·张介宾《景岳全书》，为国家中医药管理局 2018 年公布的《古代经典名方目录（第一批）》的经典名方的第 58 首。原文：“当归二钱，熟地三五钱，陈皮一钱半，半夏二钱，茯苓二钱，炙甘草一钱，水二钟，生姜三五七片，煎七八分，食远温服”。方中半夏辛温，能燥湿化痰、和中止呕；陈皮芳香，理气运脾、燥湿化痰；茯苓甘淡，甘能补脾，淡可渗湿，使已聚之湿从小便渗利而去，更添甘草和中益脾，共奏理气健脾、燥湿化痰之效。主治肺肾虚寒、水泛为痰、或年迈阴虚、血气不足、外受风寒、咳嗽呕恶、喘逆多痰等症^[1]。近年来对该方的药效学研究较多，但对其化学成分的研究及定量测定报道较少。文献仅报道采用 HPLC 对 JLD 制剂中陈皮（橙皮苷）、当归（阿魏酸）药材进行定量测定^[2-3]，以及采用薄层扫描法、紫外分光光度法测定 JLD 胶囊中 β -谷甾醇和总生物碱的含量^[4]，但未能全面有效地控制该复方制剂的多种成分。本研究采用 UPLC 技术^[5-6]，首次建立了多波长同时测定 JLD 中腺苷、鸟苷、5-羟甲基糠醛、阿魏酸、甘草苷、毛蕊花糖苷、芸香柚皮苷、橙皮苷、甘草酸铵、6-姜辣素、藁本内酯 11 种主要成分的 UPLC 方法，此方法简便、快捷、准确，专属性强，同时结合偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA) 等化学识别模式^[7]，评价各批次样品之间的质量差异，在此基础上为 Hotelling's T^2 和 DModX 2 种统计量设定了控制限和警戒限，为 JLD 物质基准的关键质量属性的研究及其后续现代制剂质量的全面控制提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1290-UPLC DAD 检测器，美国 Agilent 公司；XSE205DU 型电子天平，精密度 0.01 mg/0.1 mg，Mettler Toled 公司；LGJ-10FD 型冷冻干燥机，北京松源华兴科技发展有限公司；KQ-500DE 超声波仪，昆山市超声仪器有限公司。

1.2 材料

JLD，实验室自制；对照品腺苷（批号 110879-

201703，质量分数 99.7%）、鸟苷（批号 111977-201501，质量分数 93.6%）、5-羟甲基糠醛（批号 111626-201912，质量分数 99.2%）、阿魏酸（批号 110773-201915，质量分数 99.4%）、甘草苷（批号 111610-201908，质量分数 95.0%）、毛蕊花糖苷（批号 111530-201914，质量分数 95.2%）、橙皮苷（批号 110721-201818，质量分数 96.2%）、甘草酸铵（批号 110731-201720，质量分数 97.7%）、6-姜辣素（批号 111833-201806，质量分数 99.9%）、藁本内酯（批号 111737-201910，质量分数 $\geq 98\%$ ），均购于中国食品药品检定研究院；对照品芸香柚皮苷，批号 18040301，质量分数 99.66%，购自上海诗丹德标准技术有限公司。乙腈、磷酸均为色谱纯，北京化标源科技有限公司；实验用水均为二次蒸馏水。

JLD 中各饮片均采自 3 个产地，按《中国药典》2015 年版一部项下检测均合格。产地、批次等具体信息见表 1。经重庆市中药研究院罗维早研究员鉴定，各饮片均符合《中国药典》2015 年版一部相关项下的性状规定，鉴定结果地黄为玄参科地黄属植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch 的新鲜或干燥块根，当归为伞形科当归属植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根，陈皮为芸香科柑橘属植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 的干燥成熟果皮，半夏为天南星科半夏属植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎，茯苓为多孔菌科茯苓属

表 1 15 批次 JLD 样品各批次中所用饮片的产地信息

Table 1 Origin information of decoction pieces used in each batch of 15 batches of JLD samples

饮片	产地		
	S1~S5	S6~S10	S11~S15
地黄	河南温县	河南沁阳	河北邯郸
当归	甘肃岷县	甘肃陇西	甘肃渭源
半夏	甘肃西和	重庆大足	贵州威宁
陈皮	湖北枝江	湖北枣阳	湖南沅江
茯苓	云南永平	云南腾冲	云南昌宁
甘草	内蒙古杭锦旗	宁夏盐池	宁夏红寺堡
生姜	山东沂水	云南罗平	贵州长顺

真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核, 豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎, 姜科姜属植物姜 *Zingiber officinale* Rose. 的新鲜根茎。

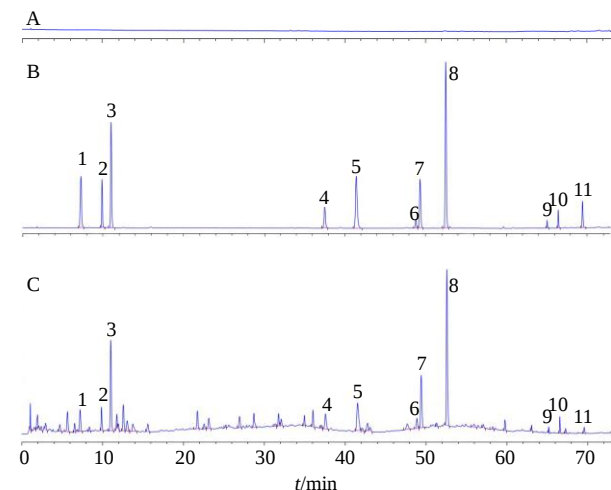
2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适应性

色谱柱为 Acquity UPLC HSS T3 C₁₈ 柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为 0.1%磷酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~2 min, 100% A; 2~7 min, 100%~98% A; 7~12 min, 98% A; 12~25 min, 98%~90.5% A; 25~32 min, 90.5%~85.5% A; 32~41 min, 85.5% A; 41~50 min, 85.5%~79% A; 50~58 min, 79%~71% A; 58~64 min, 71%~44% A; 64~70 min, 44%~35% A; 70~71 min, 35%~5% A; 72 min, 5% A; 72~73 min, 5%~100% A; 体积流量 0.3 mL/min; 检测波长: 248 nm (0~17 min、64~66 min)、330 nm (18~40 min)、281 nm (40~64 min、66~73 min) 切换; 柱温 25 °C; 进样量 1.0 μL。各峰分离度均大于 1.5。色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取腺苷、鸟苷、5-羟甲基糠醛、阿魏酸、甘草苷、毛蕊花糖苷、芸香柚皮苷、橙皮苷、甘草



1-腺苷 2-鸟苷 3-5-羟甲基糠醛 4-阿魏酸 5-甘草苷 6-毛蕊花糖苷 7-芸香柚皮苷 8-橙皮苷 9-甘草酸铵 10-6-姜辣素 11-藁本内酯, 图 5 同
1-adenosine 2-guanosine 3-5-hydroxymethylfurfural 4-ferulic acid 5-glycyrrhizin 6-mullein glycoside 7-rutile citronellside 8-hesperidin 9-ammonium glycyrrhizinate 10-6-gingerol 11-ligustilide, same as Fig. 5

图 1 空白溶剂 (A)、混合对照品溶液 (B)、供试品溶液 (C) UPLC 图

Fig. 1 UPLC of blank (A), standard solution (B) and sample solution (C)

酸铵、6-姜辣素、藁本内酯对照品适量, 加甲醇溶解后配制成质量浓度分别为 40.12、69.16、738.80、39.88、193.80、58.75、164.60、421.80、218.90、134.90、25.20 μg/mL 的混合对照品储备液, 保存于 4 °C 冰箱中备用。

2.3 供试品溶液的制备

采用随机数表法, 分别对熟地黄、当归、陈皮、半夏、茯苓、炙甘草、生姜各 15 批饮片进行编号及排序。根据原方记载及本方考证的剂量折算关系, 称取一个处方量的 JLD (当归 7.46 g、熟地黄 14.92 g、陈皮 5.60 g、半夏 7.46 g、茯苓 7.46 g、炙甘草 3.73 g、生姜 15 g), 加水 400 mL, 加热至沸腾转小火, 保持沸腾 30~60 min, 滤过, 滤液冷冻干燥 (-50 °C 干燥 72 h, 5 Pa), 即得 JLD 干粉。

取本品约 0.5 g, 加 70% 甲醇 15 mL, 置于密塞锥形瓶中, 精密称定质量, 超声提取 45 min, 放冷, 用 70% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 即得供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 取“2.2”项下混合对照品储备液, 分别精密吸取 1、2、3、5、10、20 mL 置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得不同质量浓度的混合对照品溶液; 按“2.1”项色谱条件进样测定。以对照品的质量为横坐标 (X), 峰面积分值为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得到回归方程和相关系数 (r), 结果见表 2。

2.4.2 精密度试验 取“2.4.1”项下混合对照品溶液, 按“2.1”项色谱条件连续进样 6 次, 结果腺苷、鸟苷、5-羟甲基糠醛、阿魏酸、甘草苷、毛蕊花糖苷、芸香柚皮苷、橙皮苷、甘草酸铵、6-姜辣素、藁本内酯峰面积的 RSD 值分别为 1.26%、1.45%、1.06%、0.17%、0.95%、1.43%、0.86%、1.24%、0.23%、1.26%、0.95%。11 种成分峰面积的 RSD 值均小于 2.0%, 表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 取 1 份批号为 S1 的样品, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 分别于第 0、6、12、18、24 h 按“2.1”项下色谱条件进行测定。结果腺苷、鸟苷、5-羟甲基糠醛、阿魏酸、甘草苷、毛蕊花糖苷、芸香柚皮苷、橙皮苷、甘草酸铵、6-姜辣素、藁本内酯峰面积的 RSD 值分别为 1.92%、2.68%、0.98%、1.18%、0.90%、1.23%、0.51%、1.43%、0.85%、1.55%、0.95%, 结果发现 11 种成分峰面积的 RSD 值均小于 3.0%, 表明 JLD 供试品溶液在

表2 11种成分的线性回归方程、线性范围、相关系数

Table 2 Regression equation, linear range and correlation coefficient of 11 active ingredients

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ μg	成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ μg
腺苷	$Y=43\,311\,X-0.535\,5$	0.999 9	1.605~802.5	芸香柚皮苷	$Y=33\,142\,X-13.782$	0.999 9	6.585~3 292.5
鸟苷	$Y=45\,235\,X-0.464\,1$	1.000 0	2.766~1 382.5	橙皮苷	$Y=34\,318\,X+0.719\,0$	1.000 0	16.87~8 435
5-羟甲基糠醛	$Y=16\,563\,X-36.267$	0.999 3	29.55~14 775	甘草酸铵	$Y=1\,492.4\,X+0.502\,6$	0.999 5	8.755~4 377.5
阿魏酸	$Y=58\,310\,X-0.982\,6$	1.000 0	1.595~798	6-姜辣素	$Y=1\,1413\,X+2.972\,5$	0.999 2	5.395~2 697.5
甘草苷	$Y=34\,352\,X+0.444\,9$	0.999 8	7.75~3875	藁本内酯	$Y=30\,251\,X-1.272\,5$	1.000 0	1.008~504
毛蕊花糖苷	$Y=20\,055\,X-1.903\,4$	1.000 0	2.35~1175				

24 h 内稳定性良好。

2.4.4 重复性试验 取 JLD 样品 (批号为 S1), 按“2.3”项下方法制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果腺苷、鸟苷、5-羟甲基糠醛、阿魏酸、甘草苷、毛蕊花糖苷、芸香柚皮苷、橙皮苷、甘草酸铵、6-姜辣素、藁本内酯质量分数的 RSD 值分别为 2.88%、1.69%、2.35%、0.95%、0.53%、1.05%、0.56%、1.85%、0.40%、0.36%、1.81%, 11 种成分质量分数的 RSD 值均小于 3.0%, 表明该分析方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验 取已测定含量的 JLD 样品 (批号为 S1), 称取约 0.25 g, 精密称取 6 份, 分别加入约为样品中等量的各对照品, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算各成分质量浓度, 计算加样

回收率。结果腺苷、鸟苷、5-羟甲基糠醛、阿魏酸、甘草苷、毛蕊花糖苷、芸香柚皮苷、橙皮苷、甘草酸铵、6-姜辣素、藁本内酯的平均加样回收率分别 97.70%、103.15%、100.71%、97.79%、99.74%、102.72%、96.62%、101.43%、102.35%、97.65%、98.11%, RSD 值分别为 0.78%、1.67%、1.04%、0.50%、1.60%、0.68%、0.98%、0.56%、0.19%、1.54%、0.23%。

2.5 样品测定

按“2.3”项下样品处理方法, 制备 15 批供试品溶液, 按照“2.1”项下色谱条件进行测定, 采用外标法计算 JLD 中腺苷、鸟苷、5-羟甲基糠醛、阿魏酸、甘草苷、毛蕊花糖苷、芸香柚皮苷、橙皮苷、甘草酸铵、6-姜辣素、藁本内酯的质量分数, 结果见表 3。

表3 15批 JLD 样品中 11 种成分测定结果

Table 3 Content of 11 components in 15 batches of JLD

批号	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)										
	腺苷	鸟苷	5-羟甲基糠醛	阿魏酸	甘草苷	毛蕊花糖苷	芸香柚皮苷	橙皮苷	甘草酸铵	6-姜辣素	藁本内酯
S1	0.205	0.247	2.894	0.233	0.855	0.229	1.017	2.591	1.310	0.462	0.091
S2	0.189	0.180	2.460	0.199	0.933	0.253	1.433	2.416	1.606	0.385	0.112
S3	0.192	0.165	2.621	0.190	0.892	0.260	1.402	2.798	1.400	0.396	0.098
S4	0.193	0.150	2.665	0.187	0.886	0.249	1.373	2.523	1.615	0.379	0.113
S5	0.193	0.163	2.526	0.192	0.928	0.260	1.408	2.202	1.359	0.397	0.095
S6	0.310	0.374	2.712	0.276	0.700	0.311	0.961	3.761	1.308	0.473	0.076
S7	0.316	0.370	2.733	0.268	0.694	0.310	0.964	4.113	1.075	0.472	0.075
S8	0.320	0.374	2.729	0.274	0.694	0.314	0.931	3.364	1.067	0.478	0.095
S9	0.319	0.376	2.688	0.273	0.692	0.304	0.901	2.737	1.061	0.463	0.094
S10	0.327	0.375	2.729	0.275	0.698	0.305	0.876	2.217	1.049	0.464	0.073
S11	0.226	0.292	2.495	0.163	0.786	0.263	0.729	1.468	0.789	0.400	0.055
S12	0.229	0.282	2.489	0.157	0.773	0.252	0.754	1.621	0.842	0.383	0.059
S13	0.232	0.277	2.499	0.164	0.776	0.258	0.755	1.590	0.866	0.392	0.061
S14	0.234	0.267	2.497	0.152	0.755	0.267	0.740	2.446	0.868	0.376	0.061
S15	0.236	0.260	2.477	0.151	0.746	0.249	0.713	2.752	0.870	0.365	0.061

2.6 PLS-DA 模型的建立及相关分析

采用 SIMCA 14.1 软件 (Umetrics, MKS Instruments Inc., Sweden) 对 15 批 JLD 样品中的多指标含量测定数据进行主成分分析 (PCA)。应用 Hotelling's T^2 和 DModX 2 种控制图对不同批次的样品质量进行监测, 进而采用有监督的 PLS-DA 模型进行分析。

2.6.1 Hotelling's T^2 和 DModX 控制限的建立
Hotelling's T^2 和 DModX 控制图是为了监测不同批次产品而开发的, 是 2 个互补的多变量分析手段。Hotelling's T^2 表示的是每个选定观察点与模型平面中原点的距离, 为模型的内部变化度量, 代表样品中信息与主成分模型中其他样品差异; DModX 表示数据在变量 X 空间到主成分模型的距离, 为模型外部的数据变化度量, 代表样品中未被模型解释的变化。通常认为在控制限度以下的产品为正常批次产品, 超出控制限的为异常批次样品。Hotelling's T^2 和 DModX 统计量作为批间差异性评价指标, 两者具有不同的监控作用, 互为补充。当发现某个批次超出或控制限时, 在贡献图上可以分析批次过程的异常波动受哪些变量的影响^[8]。

Hotelling's T^2 和 DModX 的控制图如图 2、3, 图中的 T^2 Crit (99%) 和 DCrit 为控制限, 其控制上限

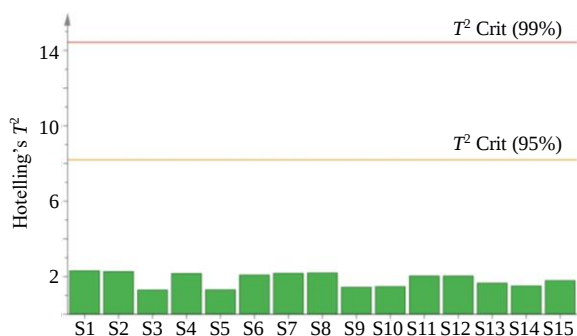


图 2 15 批 JLD 样品 Hotelling's T^2 控制图

Fig. 2 Hotelling's T^2 control chart of 15 batches of JLD

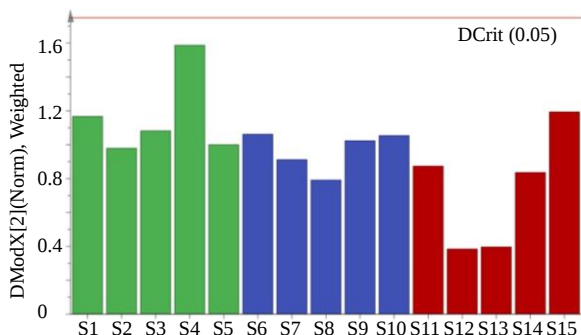


图 3 15 批 JLD 样品的 DModX 控制图

Fig. 3 DModX control chart of 15 batches of JLD

分别为 14.43 和 1.75; T^2 Crit (95%) 为警戒限, 上限为 8.20。这 15 批物质基准样品在控制限之下, 均为正常批次产品, 在 2 张控制图上处于受控状态, 这也证明所建立的 PCA 模型较好的表征了样品的正常波动。说明这 15 批物质基准样品批次质量差异性较好, 与相似度评价结果相对应, 并且较于相似度阈值解释性更强。

2.6.2 偏最小二乘判别分析 (PLS-DA) 为评价不同批次 JLD 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^[9]。以样品 S1~S15 为 Y 变量, 11 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, 表明这 11 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, 依次为芸香柚皮苷、甘草酸铵、藁本内酯和阿魏酸, 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 JLD 物质基准及复方制剂质量控制的关键成分。

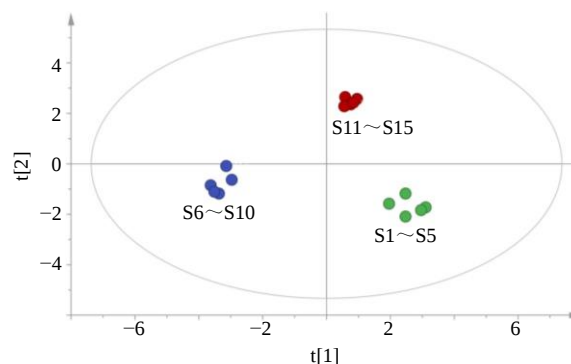


图 4 15 批 JLD PLS-DA 的得分

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

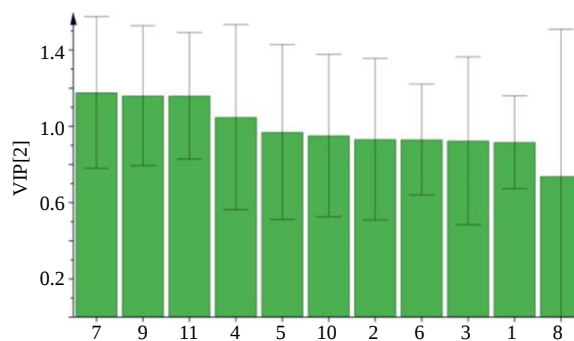


图 5 JLD 中 11 种成分的 VIP 值

Fig. 5 VIP value of 11 components of JLD

3 讨论

3.1 指标成分的确定

本研究在《中国药典》对 JLD 各药味明确规定的甘草苷、甘草酸、毛蕊花糖苷、橙皮苷、阿魏酸、6-姜辣素等 6 个定量指标的基础上增加了与该方药效相关的腺苷、鸟苷、5-羟甲基糠醛、芸香柚皮苷、藁本内酯 5 个关键成分的定量控制。地黄为本方君药,其中毛蕊花糖苷、5-羟甲基糠醛等活性成分具有免疫调节、肝脏保护以及神经保护等作用^[10]。陈皮的主要活性成分是橙皮苷、芸香柚皮苷、柚皮苷,具有较好的抗氧化能力、抗炎、促胃动力作用、抗肿瘤活性^[11-14]。当归中阿魏酸、藁本内酯等活性成分具有抗炎止痛、抗血小板凝聚等活性^[15];甘草中的甘草酸、甘草黄酮为生物活性较强的物质,现代药理学研究表明甘草酸具有较强的保肝活性和肾上腺皮质激素样作用,可增强内耳听觉,能够抗炎、抗变态反应、解毒止咳、抗肿瘤等作用。甘草中的甘草苷具有抗溃疡、抗菌、抗炎、解痉、镇痛等作用^[16-20]。尿苷、鸟苷、腺苷等核苷类成分能够干扰病毒核酸的合成,通常为中成药抗病毒的活性成分^[21]。综合药理作用与色谱分离效果,最终确定该 11 个成分为指标成分。

3.2 色谱条件的选择

中药复方化学成分较为复杂,选择梯度洗脱能更有利于成分整体信息的获得。考察供试品溶液制备时不同提取溶剂(甲醇、乙醇及水)、不同体积分数(30%、50%、70%、100%)甲醇和水的配比、不同提取时间(30、45、60 min)、提取溶剂体积(10、15、20、25 mL)对 JLD 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 JLD 干粉的提取溶剂。

考察了乙腈和甲醇作为有机相对提取效果的影响,结果甲醇作有机相基线漂移,峰形不对称,因此选择乙腈作有机相;为改善峰形,在水相中加入不同浓度的甲酸、乙酸和磷酸,结果表明加入 0.1% 磷酸时,分离效果好,基线平稳;考察了梯度洗脱和等度洗脱,梯度洗脱时各物质分离度高。

根据对照品预试验初步考察,腺苷、鸟苷、5-羟甲基糠醛、阿魏酸、甘草苷、毛蕊花糖苷、芸香柚皮苷、橙皮苷、甘草酸铵、6-姜辣素、藁本内酯的最佳吸收波长分别为 260、256、285、322、276、330、283、283、252、280、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。

3.3 结果分析

本研究在 UPLC 多成分含量测定基础上,结合 PCA、PLS-DA 等相关化学计量学方法对不同批次 JLD 物质基准的质量的批间差异性进行了深入的分析,并在 PCA 模型基础上设定了 Hotelling's T^2 和 DModX 控制限,实现对批次物质基准质量进行监测。该 15 批物质基准均为正常批次样品,其有效成分含量变化都没有明显的差异,但通过 PCA 后可以看出,15 批样品所用原药材产地的差异在多指标成分的含量上予以体现;进一步通过 PLS-DA 中的 VIP 值可以判断出,芸香柚皮苷(源于陈皮)、甘草酸铵(源于甘草)、藁本内酯(源于当归)和阿魏酸(源于当归、陈皮)是造成这些差异存在的主要原因,提示对这 4 个成分进行质量控制,有利于有效反映 JLD 物质基准及其复方制剂的质量变化属性。

最后,本研究以 JLD 中腺苷、鸟苷、5-羟甲基糠醛、阿魏酸、甘草苷、毛蕊花糖苷、芸香柚皮苷、橙皮苷、甘草酸铵、6-姜辣素、藁本内酯等 11 种主要成分为研究对象,首次建立了 UPLC 同时测定 JLD 中 11 种成分的方法,同时对其提取条件、色谱条件等参数进行了优化,并通过对 15 批不同产地的药材进行对比分析,发现了影响 JLD 物质基准质量较大的 4 种成分。

方法学考察结果表明,所建立的方法满足定量要求,且简单易行,为 JLD 的多指标质量控制提供了方法基础,同时也为后续的制剂、药效学研究提供了参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] (明) 张介宾. 景岳全书 [M]. 新 1 版. 上海: 上海科学技术出版社, 1959: 1584.
- [2] 刘慧琼, 胡小刚, 沈英森, 等. 金水六君煎胶囊质量标准研究 (II): 橙皮苷和阿魏酸的分析测定 [J]. 暨南大学学报: 自然科学与医学版, 2003, 24(1): 59-62.
- [3] 郭书好, 胡小刚, 白燕, 等. RP-HPLC 法测定金水六君煎中橙皮苷的含量 [J]. 中成药, 2001, 23(12): 877-879.
- [4] 郭书好, 潘珊珊, 刘慧琼, 等. 金水六君煎胶囊多指标成分分析 [J]. 光谱实验室, 2004, 21(2): 383-386.
- [5] 杜正彩, 夏中尚, 韦曼, 等. 基于 UPLC 结合比色法的葛桑降糖胶囊质量控制研究 [J]. 中草药, 2019, 50(21): 5266-5272.

- [6] Han X, Zhang Y, Pi J X, *et al.* Pharmacokinetic study of ginsenoside Re after vaginal administration in rabbits by UPLC-MS/MS determination [J]. *Chin Herb Med*, 2018, 10(3): 304-309.
- [7] 王琪, 李晓琦, 黄萌萌, 等. 基于指纹图谱及多成分含量的化学模式识别法评价不同产地栀子药材的质量 [J]. *中草药*, 2019, 50(11): 2690-2699.
- [8] 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.
- [9] Ye J, Zhang X, Dai W X, *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.
- [10] 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.
- [11] Huang Y S, Ho S C. Polymethoxy flavones are responsible for the anti-inflammatory activity of *Citrus fruit peel* [J]. *Food Chem*, 2010, 119(3): 868-873.
- [12] Yi Z B, Yu Y, Liang Y Z, *et al.* *In vitro* antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* of a new *Citrus* cultivar and its main flavonoids [J]. *LWT - Food Sci Technol*, 2008, 41(4): 597-603.
- [13] 李庆耀, 梁生林, 褚洪标, 等. 陈皮促胃肠动力有效部位的筛选研究 [J]. *中成药*, 2012, 34(5): 941-943.
- [14] Du Q Z, Chen H. The methoxyflavones in *Citrus reticulata* Blanco cv. Ponkan and their antiproliferative activity against cancer cells [J]. *Food Chem*, 2010, 119(2): 567-572.
- [15] 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.
- [16] 邢国秀, 李楠, 王童, 等. 甘草中黄酮类化学成分的研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2003, 28(7): 593-597.
- [17] 高雪岩, 王文全, 魏胜利, 等. 甘草及其活性成分的药理活性研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(21): 2695-2700.
- [18] 田庆来, 官月平, 张波, 等. 甘草有效成分的药理作用研究进展 [J]. *天然产物研究与开发*, 2006, 18(2): 343-347.
- [19] 季宇彬, 姜薇, 范玉玲, 等. 甘草黄酮的研究进展 [J]. *中草药*, 2004, 35(9): 1081-1082.
- [20] 李薇, 宋新波, 张丽娟, 等. 甘草中化学成分研究进展 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2012, 14(7): 40-44.
- [21] 肖珊珊, 金郁, 孙毓庆. 板蓝根化学成分、药理及质量控制研究进展 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2003, 20(6): 455-459.

[责任编辑 郑礼胜]