

基于 HPLC 指纹图谱和化学模式识别的经典名方桃红四物汤制备过程质量评价研究

江华娟¹, 李敏敏¹, 何瑶^{1,2*}, 姜明光¹, 王升菊¹, 郭鑫², 李宇², 傅超美^{1*}

1. 西南特色中药资源国家重点实验室, 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 550001

摘要: 目的 基于中药复方化学成分群整体指纹信息, 考察桃红四物汤 (TSD) 汤剂制备过程中化学成分的变化, 并分析其影响质量的波动成分和主要贡献成分, 为其质量评控提供参考。方法 按照经典名方物质基准制备工艺, 制备 TSD 一次煎煮 (A 组)、二次煎煮 (B 组)、冷冻干燥 (C 组) 3 个制备过程样品, 建立 18 批药材 3 组样品的 HPLC 指纹图谱, 采用中药指纹图谱相似度评价系统进行数据处理, SPSS 20.0 进行系统聚类分析 (HCA) 和主成分分析 (PCA), SIMCA 14.1 软件进行偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA), 分析 3 组样品中化学指纹信息的动态变化。结果 选取 17 个色谱峰作为指纹图谱共有峰, 3 个组别各 18 批样品相似度分别均大于 0.900; 共指认出没食子酸、5-羟甲基糠醛、原儿茶酸、苦杏仁苷、咖啡酸、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、洋川芎内酯 A、藁本内酯共 10 个成分; HCA、PLS-DA 将 54 批样品分为 2 类, A 组样品一类, B、C 组样品一类; PLS-DA 分析筛选出 6 个差异性色谱峰; 根据 PCA 综合模型计算, 综合评分结果为 B 组 > C 组 > A 组, TSD 煎煮 2 次较为合理, 冷冻干燥能较好保留煎液中的成分, 色谱峰 16 (藁本内酯)、1 (没食子酸)、13、12 (阿魏酸)、7 (苦杏仁苷)、15 (洋川芎内酯 A) 是影响样品质量的标志性差异物质。结论 通过 HPLC 指纹图谱和化学模式识别较好地辨识制备过程中影响 TSD 质量的标志性成分, 为经典名方制备工艺评价和质量标志物辨识思路提供了参考。

关键词: 桃红四物汤; 经典名方; 指纹图谱; HPLC; 制备过程; 化学模式识别; 质量标志物; 质量评价; 中药复方化学成分群; 冷冻干燥; 聚类分析; 主成分分析; 偏最小二乘法-判别分析; 没食子酸; 5-羟甲基糠醛; 原儿茶酸; 苦杏仁苷; 咖啡酸; 羟基红花黄色素 A; 芍药苷; 阿魏酸; 洋川芎内酯 A; 藁本内酯

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)04-1000-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.04.012

Quality evaluation of Taohong Siwu Decoction preparation process based on fingerprint and chemical pattern recognition

JIANG Hua-juan¹, LI Min-min¹, HE Yao^{1,2}, JIANG Ming-guang¹, WANG Sheng-ju¹, GUO Xin², LI Yu², FU Chao-mei¹

1. State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Guizhou Yibai Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550001, China

Abstract: Objective Based on the overall fingerprint information of the chemical constituents of traditional Chinese medicine compound, the changes in the chemical constituents of Taohong Siwu Decoction (TSD, 桃红四物汤) in the preparation process were investigated, and the fluctuation and main contributing constituents affecting the quality were analyzed to provide references for its quality evaluation and control. **Methods** According to the standard preparation process of the classic prescriptions, three preparation process samples were prepared: one-time decoction (group A), secondary decoction (group B), and freeze-drying (group C) were prepared, and the HPLC fingerprint of 18 batches of medicinal materials were established in three groups and processed by

收稿日期: 2020-09-07

基金项目: 四川省科技计划项目 (2021YFS0256); 成都中医药大学杏林学者学科人才科研提升计划 (QNXZ2018027)

作者简介: 江华娟, 硕士研究生, 主要从事新制剂、新剂型和中药炮制工艺与机制研究。E-mail: 292956421@qq.com

*通信作者: 何瑶, 副教授, 主要从事新制剂、新剂型和中药炮制工艺与机制研究。E-mail: 20660306@qq.com

傅超美, 教授, 主要从事新制剂、新剂型和中药炮制工艺与机制研究。E-mail: chaomeifu@126.com

the fingerprint similarity evaluation system of traditional Chinese medicine, the SPSS 20.0 was used for systematic clustering analysis (HCA) and principal component analysis (PCA), and the SIMCA 14.1 software was used for partial least squares-discrimination analysis (PLS-DA), to analyze the dynamic changes of chemical fingerprint information in three groups of samples. **Results** Seventeen chromatographic peaks were selected as the common peaks of the fingerprint. The similarities of 18 batches of samples in each of the three groups were all greater than 0.900; Ten ingredients including gallic acid, 5-hydroxymethyl furfural, protocatechuic acid, amygdalin, caffeic acid, hydroxysafflor yellow A, paeoniflorin, ferulic acid, senkyunolide A, ligustilide were identified. HCA and PLS-DA divided 54 batches of samples into two types, one for group A, and one for group B and C; PLS-DA analysis screened out six different chromatographic peaks. According to the PCA comprehensive model calculation, the comprehensive scoring result was group B > group C > group A. It was reasonable to decoct TSD twice and freeze-drying can retain the components in the decoction. Chromatographic peaks 16 (ligustilide), 1 (gallic acid), 13, 12 (ferulic acid), 7 (amygdalin), and 15 (senkyunolide A) were the marked differential substances affecting the quality of the samples. **Conclusion** The HPLC fingerprint and chemical pattern recognition can better identify the iconic components that affect the quality of TSD during the preparation process. This paper provides a reference for the preparation process evaluation and identification of quality indicators of the classic prescriptions.

Key words: Taohong Siwu Decoction; classical prescriptions; fingerprints; HPLC; preparation process; chemical pattern recognition; quality markers; quality evaluation; chemical composition group of Chinese medicine prescriptions; freeze-drying; cluster analysis; principal component analysis; partial least squares-discriminant analysis; gallic acid; 5-hydroxymethyl furfural; protocatechuic acid; amygdalin; caffeic acid; hydroxysafflor yellow A; paeoniflorin; ferulic acid; senkyunolide A; ligustilide

桃红四物汤 (Taohong Siwu Decoction, TSD) 出自于清代柴得华所著《妇科冰鉴》，是《古代经典名方目录 (第一批)》收录方剂。公布处方为生地三钱 (酒洗)，当归四钱 (酒洗)，白芍钱五分 (酒炒)，川芎一钱，桃仁十四粒 (去皮尖研泥)，红花一钱 (酒洗)，水煎温服，用于血多有块，色紫稠粘者，有瘀停也，TSD 随其流以逐之^[1-2]。TSD 传统应用于妇科血瘀月经不调等，后被广泛用于各种血瘀、血虚之证，对于中医治疗的优势病种如心脑血管疾病^[3-4]、妇科疾病^[5-6]、骨科疾病等^[7]均有较好的疗效，将该方剂开发为中药经典名方复方制剂有较好的临床价值和应用前景。

中药质量评价标准不科学、质量追溯性差、质量均一性差等问题一直是亟待解决的技术瓶颈，已成为行业发展的重中之重，经典名方复方制剂研发成为中成药质量提升的突破口。经典名方复方制剂研发过程中，首先需要开展“物质基准”质量研究。“经典名方物质基准”^[8]是指以古代医籍中记载的经典名方制备方法为依据制备而得的中药药用物质的标准，除成型工艺外，其余制备方法应当与古籍记载基本一致。经典名方复方制剂的所有药学研究均须与物质基准进行对比，以确保与物质基准的关键质量属性一致。由此可见，建立以关键质量属性辨识和量值传递为核心的制剂过程质量控制体系，是高品质经典名方的研发核心。

课题组前期基于质量标志物辨识思路，对 TSD

的质量控制研究现状和质量标志物预测进行了详细综述^[9]；并进行了 TSD 物质基准的研究工作，在古籍溯源和遵古宜今的思路下，根据阿魏酸、羟基红花黄色素 A 和芍药苷 3 个指标成分的含量选择了煎煮 2 次，采用冷冻干燥法制成了物质基准对应实物。但是其工艺路线选择的合理性，以及方中的化学成分群在煎煮、冷冻干燥过程中的动态变化仍需进一步研究。因此，本实验基于 TSD 化学特质群在制剂过程的传递特性，按照 TSD 经典名方物质基准的制备过程，制备一煎液、二煎液、冻干粉 3 组样品，通过建立 18 批次药材的 3 组共 54 个样品 HPLC 指纹图谱，进行指纹图谱分析和化学模式识别，整体评价 TSD 物质基准制备过程中煎煮次数、冷冻干燥对汤液质量的影响，并筛选出制备过程中波动较大的成分、对汤液整体质量贡献成分，为 TSD 制剂过程质量控制指标选择和经典名方物质基准质量研究思路提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Thermo Dionex ULtiMate 3000 高效液相色谱系统，包括 8154930 四元梯度泵、6022020 进样器、8155307 柱温箱、8149920 DAD 检测器、7313241 在线脱气机和 Chromelon Console 工作站，赛默飞世尔科技有限公司；DL-720D 数控超声波清洗器，上海之信仪器有限公司；FTS-10A 液体加热器，潮州市一壶百饮电器实业有限公司；SCIENTZ-10N 冷

冻干燥机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; UPK-I-10T 型优普系列超纯水器, 四川优普超纯科技有限公司; SHB-III A 循环水式真空泵, 北京中兴伟业有限公司; DD5 台式大容量低速离心机, 湖南赫西仪器装备有限公司。

1.2 药品与试剂

对照品没食子酸(批号 wkq19032208)、原儿茶酸(批号 wkq18041907)、羟基红花黄色素 A (批号 wkq18041907)、苦杏仁苷(批号 wkq19070210)、咖啡酸(批号 wkq16081501)、5-羟甲基糠醛(批号 wkq19092704)、芍药苷(批号 wkq18032104)、阿魏酸(批号 wkq16080209)、洋川芎内酯 A (批号 wkq18041907)、藁本内酯(批号 wkq18041907), 质量分数均 $\geq 98\%$, 购于四川省维克奇生物科技有限公司。甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。

1.3 药材

试验用药材均购于包含道地产区和主产区的 3 个产地, 经成都中医药大学药学院中药鉴定方向裴瑾教授鉴定, 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, 地黄为玄参科地黄属植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的新鲜或干燥块根, 白芍为毛茛科芍药属植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根, 川芎为伞形科藁本属植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎, 当归为伞形科当归属植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根。TSD 6 味药材, 每味药材 3 个产地, 经 6 因素 3 水平的正交实验设计, 得到 18 批样品如表 1 所示。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液的制备 参考经典名方目录中 TSD 的处方和制备方法, 处方中各味药材按照古籍记载的炮制要求及实验室研究得到的炮制工艺进行炮制得到饮片。处方剂量按古籍记载 2.68 倍量, 称取酒炙地黄 30 g、酒炙当归 40 g、酒炙白芍 15 g、川芎 10 g、酒炙红花 10 g、燀桃仁 10 g, 加 8 倍量水浸泡 30 min, 第 1 次煎煮 1 h, 第 2 次煎煮 1.5 h, 合并煎液, 定容到适当浓度, 取 10 mL, 4000 r/min 离心 10 min, 取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得 TSD 供试品溶液。

表 1 TSD 药材产地批号

Table 1 Origin and batch number of TSD

编号	产地					
	生地黄	当归	白芍	川芎	桃仁	红花
1	山西襄汾	云南师宗	安徽樵东	四川彭州	北京密云	云南永善
2	河南温县	甘肃岷县	安徽樵东	四川彭州	云南昭阳	云南永善
3	河南温县	云南师宗	浙江磐安	四川都江堰	北京密云	新疆吉木萨
4	河南武陟	甘肃岷县	安徽樵东	四川都江堰	北京密云	新疆吉木萨
5	河南武陟	甘肃汇川	河北辛集	云南鹤庆	北京密云	云南永善
6	山西襄汾	甘肃岷县	河北辛集	四川都江堰	陕西千阳	云南永善
7	河南温县	甘肃汇川	河北辛集	四川彭州	云南昭阳	新疆吉木萨
8	河南武陟	云南师宗	浙江磐安	云南鹤庆	云南昭阳	云南永善
9	河南温县	甘肃岷县	河北辛集	云南鹤庆	北京密云	甘肃玉门
10	河南温县	甘肃汇川	浙江磐安	四川都江堰	陕西千阳	云南永善
11	河南温县	云南师宗	安徽樵东	云南鹤庆	陕西千阳	甘肃玉门
12	河南武陟	甘肃汇川	安徽樵东	四川都江堰	云南昭阳	甘肃玉门
13	山西襄汾	甘肃汇川	浙江磐安	四川彭州	北京密云	甘肃玉门
14	河南武陟	云南师宗	河北辛集	四川彭州	陕西千阳	新疆吉木萨
15	山西襄汾	云南师宗	河北辛集	四川都江堰	云南昭阳	甘肃玉门
16	山西襄汾	甘肃汇川	安徽樵东	云南鹤庆	陕西千阳	新疆吉木萨
17	河南武陟	甘肃岷县	浙江磐安	四川彭州	陕西千阳	甘肃玉门
18	山西襄汾	甘肃岷县	浙江磐安	云南鹤庆	云南昭阳	新疆吉木萨

一次煎煮样品制备(A组): 分别于煎煮1次后取一半煎液,加水稀释至1150 mL(生药量0.05 g/mL),按表1药材产地批号组合制样得到A1~A18共18批样品。

二次煎煮样品制备(B组): 取第1次煎煮的一半煎液与第2次煎煮得到的另一半煎液混合,加水稀释至1150 mL(生药量0.05 g/mL),制样得到B1~B18共18批样品。

冷冻干燥样品制备(C组): 取二次煎煮样品10 mL置于培养皿中,预冻24 h后,于冷冻干燥机中冻干48 h,加超纯水溶解,定容至10 mL(生药量0.05 g/mL),制样得到C1~C18共18批样品。

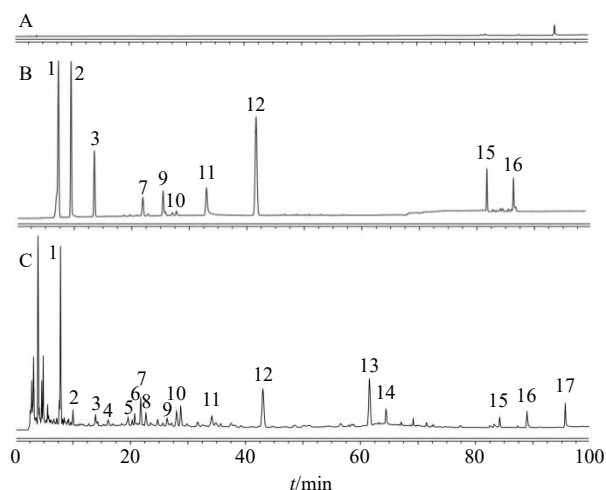
2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取没食子酸、原儿茶酸、苦杏仁苷、羟基红花黄色素A、芍药苷、阿魏酸、咖啡酸、5-羟甲基糠醛、洋川芎内酯A、藁本内酯,置于10个量瓶中,分别加甲醇配制成质量浓度依次为1.218、1.058、1.212、1.079、1.248、1.367、1.534、1.325、1.245、1.308 mg/mL的对照品储备液,分别取上述10种对照品储备液适量,加入10 mL量瓶中,加甲醇使溶解并稀释至刻度,摇匀,制得没食子酸、原儿茶酸、苦杏仁苷、羟基红花黄色素A、芍药苷、阿魏酸、咖啡酸、5-羟甲基糠醛、洋川芎内酯A、藁本内酯各成分质量浓度分别为0.609、0.529、0.606、0.270、0.312、0.684、0.384、0.662、0.622、0.327 mg/mL的混合对照品溶液。

2.2 色谱条件及系统适应性试验

色谱柱为Agilent HC-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.5%磷酸水溶液,梯度洗脱:0~20 min, 5%~13%乙腈;20~45 min, 13%~17%乙腈;45~55 min, 17%~21%乙腈;55~85 min, 21%~65%乙腈;85~95 min, 65%~80%乙腈;95~100 min, 80%乙腈;体积流量为1.0 mL/min;柱温为30 ℃;进样量为10 μL;检测波长280 nm。精密吸取空白溶液、混合对照品溶液和供试品溶液各10 μL,注入液相色谱仪,测定,记录色谱图,结果见图1。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 按照“2.1.1”项方法取第1批次药材组合制得的同一供试品溶液,按照“2.2”项下色谱条件进行检测,连续进样6次,记录指纹图谱,选择出峰稳定、响应值高、峰面积较大的阿魏酸为参照峰,各共有峰保留时间的RSD为0.088%,



1-没食子酸 2-5-羟甲基糠醛 3-原儿茶酸 7-苦杏仁苷 9-咖啡酸 10-羟基红花黄色素 A 11-芍药苷 12-阿魏酸 15-洋川芎内酯 A 16-藁本内酯
1-gallic acid 2-5-hydroxymethyl furfural 3-protocatechuic acid 7-amygdalin 9-caffeic acid 10-hydroxysafflor yellow A 11-paeoniflorin 12-ferulic acid 15-senkyunolide A 16-ligustilide

图1 空白对照(A)、混合对照品(B)、供试品溶液(C)的HPLC图

Fig. 1 HPLC of blank control (A), mixed reference substances (B) and test solution substances (C)

峰面积RSD为1.00%,表明本方法精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取第1批次药材组合制得的同一供试品溶液,分别于0、4、8、12、16、24、48 h进行检测,记录指纹图谱,以阿魏酸为参照峰,各共有峰保留时间的RSD为0.15%,峰面积的RSD为1.24%,表明供试品溶液在48 h内稳定。

2.3.3 重复性试验 取第1批次药材组合制备的供试品溶液6份,记录指纹图谱,以阿魏酸为参照峰,各共有峰保留时间的RSD均小于2.17%,峰面积RSD均小于2.03%,表明方法重复性良好。

2.4 TSD指纹图谱建立及相似度评价

按“2.1.1”项下方法制备18批药材的3组共54个样品供试品溶液,在“2.2”项下色谱条件分别进样测定,记录色谱图。将得到的HPLC图谱数据导入中药指纹图谱相似度评价系统(2012版本),以夹角余弦为测度对上述指纹图谱进行相似度分析。采用平均数法,时间窗为0.1 min,进行色谱峰匹配及相似度分析,结果见图2和表2、3。指纹图谱相似度计算结果以对照图谱为参照,各批样品与对照图谱进行比较,分别计算出各组别相似度均>0.900,如表2所示,表明不同产地、不同批次供试品的主要物质群差异较小。

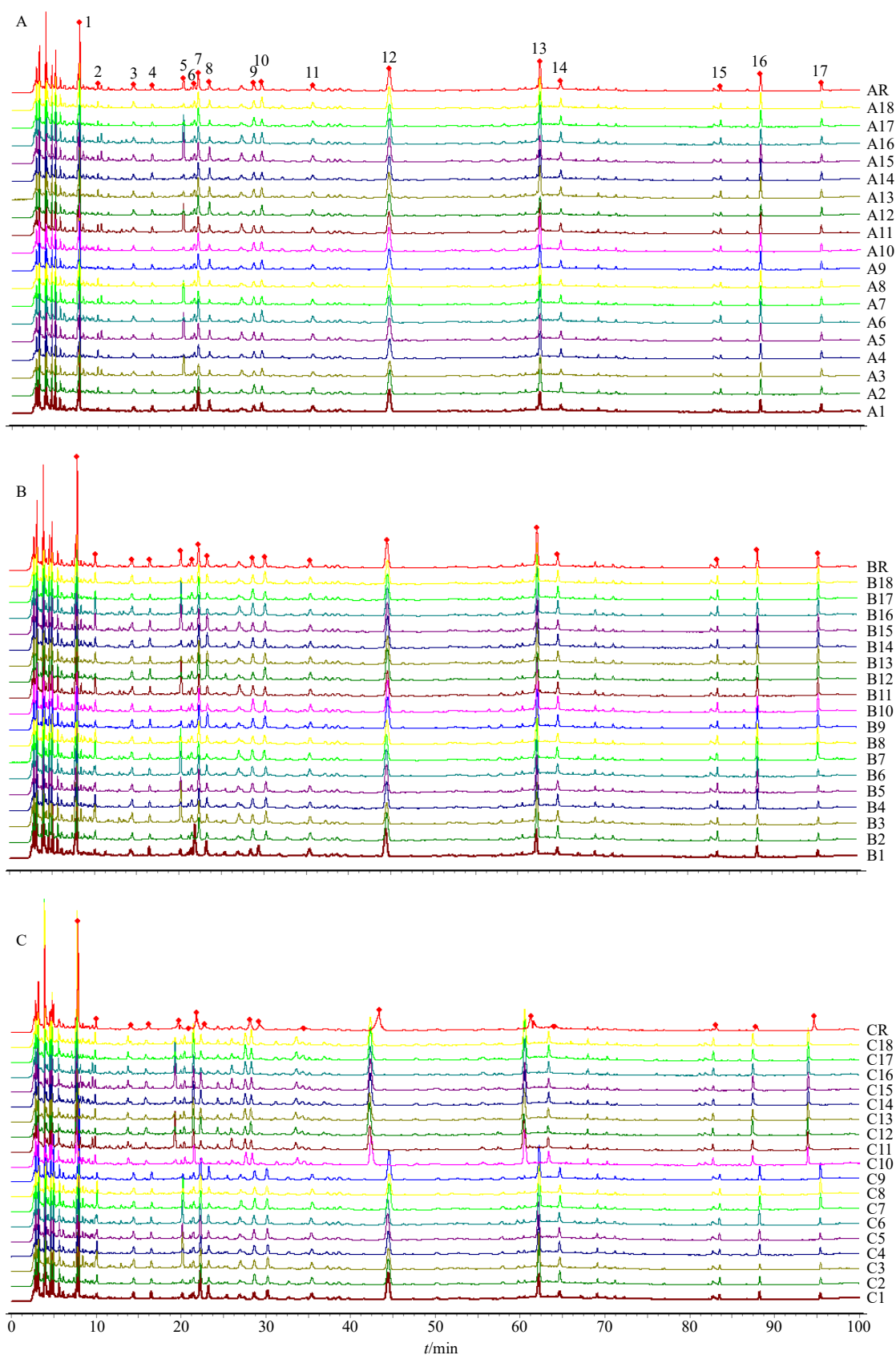


图2 TSD 一次煎煮 (A)、二次煎煮 (B) 和冷冻干燥 (C) 3 组样品指纹图谱共有模识

Fig. 2 Fingerprint common modeling for three groups of samples of TSD: one-time decocting (A), two-time decocting (B) and freeze drying (C)

表 2 TSD 3 组样品指纹图谱相似度分析结果

Table 2 Fingerprint similarity analysis results of three groups of TSD

编号	相似度			编号	相似度			编号	相似度		
	一煎液	二煎液	冷冻干燥样品		一煎液	二煎液	冷冻干燥样品		一煎液	二煎液	冷冻干燥样品
S1	0.980	0.976	0.982	S7	0.987	0.987	0.987	S13	0.997	0.996	0.996
S2	0.990	0.985	0.988	S8	0.993	0.984	0.990	S14	0.994	0.991	0.992
S3	0.982	0.976	0.975	S9	0.991	0.991	0.989	S15	0.984	0.974	0.988
S4	0.994	0.986	0.984	S10	0.993	0.993	0.994	S16	0.967	0.969	0.968
S5	0.989	0.994	0.991	S11	0.968	0.975	0.954	S17	0.990	0.987	0.990
S6	0.995	0.995	0.995	S12	0.975	0.980	0.976	S18	0.995	0.992	0.994

表 3 TSD 3 组样品特征峰保留时间和峰面积

Table 3 Relative retention time and relative peak area of characteristic peaks in three groups of TSD

峰号	t/min	峰面积			峰号	t/min	峰面积		
		一煎液	二煎液	冷冻干燥样品			一煎液	二煎液	冷冻干燥样品
1	7.935	8.436 4±1.542 4	14.482 3±2.111 0	14.968 2±2.368 6	10	29.599	1.846 7±0.399 3	2.760 4±0.542 5	3.057 0±0.432 5
2	10.073	1.021 9±0.317 8	2.259 0±0.979 4	2.107 2±0.758 9	11	35.136	1.666 9±0.251 9	2.703 2±0.383 5	2.845 1±0.384 6
3	14.285	1.134 1±0.195 3	1.990 8±0.539 8	2.017 9±0.525 8	12	44.124	7.406 9±0.932 5	10.201 7±1.060 6	10.704 6±1.276 8
4	16.422	0.872 9±0.270 0	1.594 3±0.534 5	1.726 3±0.676 2	13	61.933	6.495 9±1.439 2	10.001 9±1.652 9	10.237 3±1.651 8
5	20.057	1.780 4±1.553 9	2.912 7±2.227 1	3.152 5±2.412 9	14	64.451	1.662 2±0.354 9	2.861 5±0.548 2	2.900 1±0.485 1
6	21.314	1.268 6±0.195 5	1.873 0±0.396 1	1.845 3±0.410 7	15	83.389	0.750 1±0.209 3	1.400 4±0.214 3	1.189 1±0.208 3
7	22.040	3.135 2±0.555 1	4.670 9±0.819 9	4.657 5±0.625 9	16	88.100	2.637 4±0.459 8	2.993 2±0.729 3	2.204 6±0.534 4
8	23.125	1.534 0±0.505 0	2.306 7±1.037 8	2.396 6±0.827 4	17	95.152	1.337 9±0.010 9	2.635 7±0.9833	2.843 2±1.149 2
9	28.432	1.709 5±0.326 8	2.856 0±0.616 8	3.088 4±0.571 0	峰面积总和	—	44.697 0	70.507 3	71.940 9

根据评价系统生成的指纹图谱和对照指纹图谱进行比对, 标定 A、B、C 3 组样品共有峰, 综合 3 组样品指纹图谱信息, 选择特征明显、重复性好、稳定性好的色谱峰为共有峰, 共标定出 17 个色谱峰。经混合对照品溶液色谱图 (图 1) 的保留时间比对, 17 个色谱峰中辨认出 10 个成分, 分别是 1 号峰 (没食子酸)、2 号峰 (5-羟甲基糠醛)、3 号峰 (原儿茶酸)、7 号峰 (苦杏仁苷)、9 号峰 (咖啡酸)、10 号峰 (羟基红花黄色素 A)、11 号峰 (芍药苷)、12 号峰 (阿魏酸)、15 号峰 (洋川芎内酯 A)、16 号峰 (藁本内酯)。54 个样本保留时间和峰面积结果见表 3, 结果显示一煎液的相对峰面积明显小于二煎液, 说明煎煮次数对成分含量影响大; 二煎液和冷冻干燥样品相对峰面积无明显变化, 可见冷冻干燥过程很好地保留了主要物质群。

2.5 化学模式识别研究

2.5.1 聚类分析 (HCA) 将指纹图谱的 17 个共有峰峰面积, 处理成量化特征峰数据。运用 SPSS 20.0 分析软件对其进行 HCA 分析, 采用组间连接

法, 以欧式平方距离为测度, Z 标准化, 将 54 个样本进行分类, 结果由图 3 所示。总体来看, 54 个样本分为 2 类, A1~A18 单独为一类, B1~B18 和 C1~C18 为一类, 由此可见且煎煮次数对质量的影响远超过药材产地批次的影响。B、C 组内部由于药材产地批次不同又分为 2 类, 第 1~6 批次药材制备的样品归为一类, 其余批次为一类。

2.5.2 偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA) 提取各样品的色谱指纹峰信息, 将归一化的数据导入 SIMCA-PV11.0 (Umetrics, Sweden) 软件中, 经过中心化、标准化后再进行 PLS-DA 等多变量统计分析。根据 PLS-DA 模型第 1 主成分的 VIP 值 (阈值 >1) 并同时结合 *t* 检验的 *P* 值 (阈值 0.05) 来寻找差异性关键成分。在置信区间 (95%) 内, 54 个样品存在一定差异性, 根据分布可将 54 批样品分为 2 类, 如图 4 所示, 样品 A1~A18 为一类, B1~B18 和 C1~C18 为一类, 其分类结果与 HCA 分析结果一致。

利用 PLS-DA 模型第 1 主成分的变量重要性投

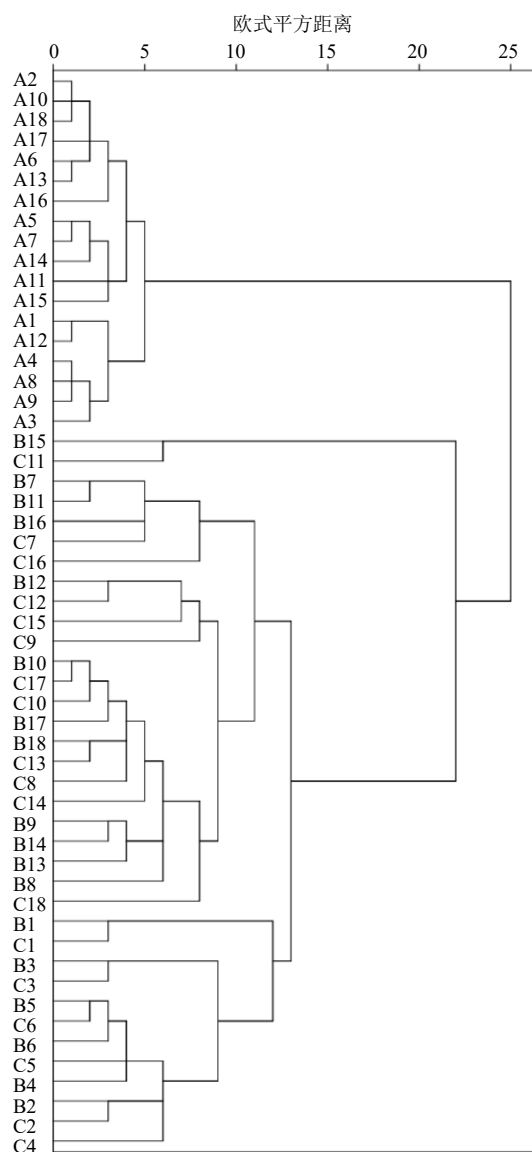


图 3 TSD 3 组样品聚类树状图
Fig. 3 Cluster tree of three groups of TSD

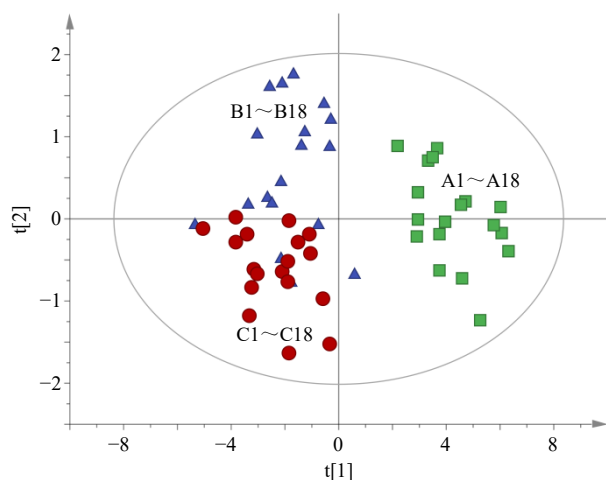


图 4 TSD 指纹图谱共有峰 PLS-DA 得分结果图
Fig. 4 Common peak PLS-DA score of TSD fingerprint

影 (VIP) 值 (阈值 >1) 并同时结合 t 检验的 P 值 (阈值 0.05) 寻找到 3 组样品间的标志性差异成分, 如图 5、6 所示。由图 5 得分图可知, 17 个成分数据点均落在 95% 置信区间内, 说明 3 组样品化学成分相似。质量稳定 VIP 值越大, 表明对样品分类贡献越大, 由图 6 可见, VIP 值 >1 的有 6 种成分, 依次是色谱峰 16 (藁本内酯)、1 (没食子酸)、13、12 (阿魏酸)、7 (苦杏仁苷)、15 (洋川芎内酯 A), 说明这 6 种成分是影响不同批次、组别样品质量的差异性物质, 在制备过程中应重点关注。

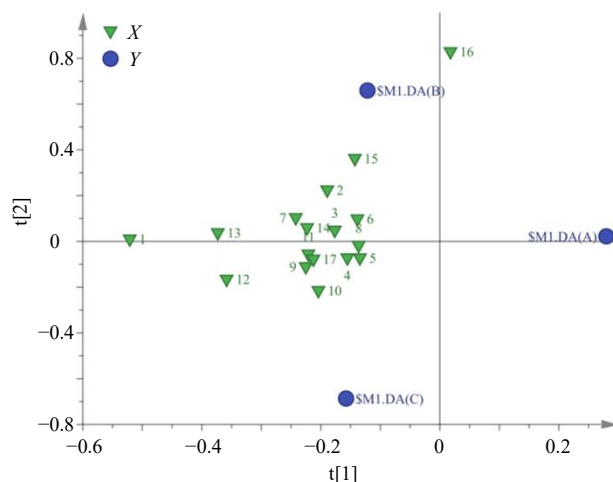


图 5 TSD 中 17 个成分载荷图

Fig. 5 Loading diagram of 17 components in TSD

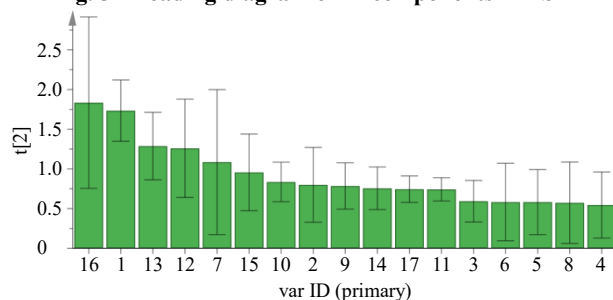


图 6 TSD 中 17 个成分 VIP 值图

Fig. 6 VIP values of 17 components in TSD

2.5.3 主成分分析 (PCA) 将指纹图谱的 17 个共有峰峰面积分别导入 SPSS 20.0 软件, 进行 PCA。对共有峰峰面积 Z 标准化处理后, 计算主成分特征值、累积贡献率及因子荷载矩阵, 结果见表 4 和图 7。主成分特征值、累积方差贡献率以特征值 >1 为提取标准, 共提取出 4 个主成分, 得到主成分的累积方差贡献率 82.782%, 故选取前 4 个主成分进行评价, 它代表了 17 个成分量的 82.782% 的信息量, 可较好地反映总体成分信息。在 4 个主成分中特征值较大的是主成分 1, 其累积方差贡献率达 54.469%,

表 4 主成分因子的特征值和方差贡献率

Table 4 Eigenvalue and variance contribution rate of principal component factors

主成分	初始特征值			提取平方和载入		
	合计	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%	合计	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	9.260	54.469	54.469	9.260	54.469	54.469
2	1.964	11.555	66.024	1.964	11.555	66.024
3	1.640	9.650	75.674	1.640	9.650	75.674
4	1.208	7.108	82.782	1.208	7.108	82.782
5	0.688	4.047	86.829			
6	0.424	2.494	89.322			
7	0.406	2.387	91.710			
8	0.294	1.727	93.437			
9	0.282	1.658	95.094			
10	0.197	1.160	96.254			
11	0.167	0.980	97.234			
12	0.134	0.790	98.024			
13	0.107	0.632	98.656			
14	0.089	0.523	99.179			
15	0.069	0.403	99.582			
16	0.051	0.301	99.884			
17	0.020	0.116	100.000			

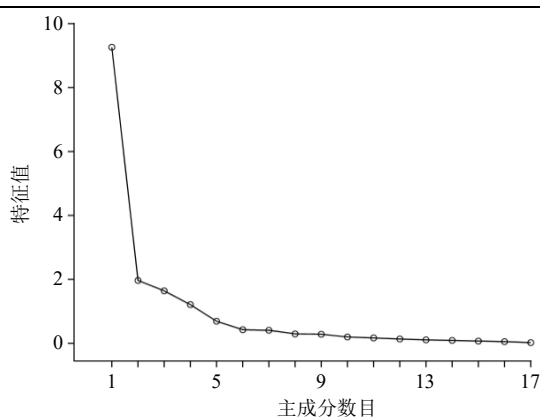


图 7 公共因子碎石图

Fig. 7 Common factor gravel map

是信息量较全面的指标。

从表 5 和图 8 中可以看出,根据因子载荷矩阵,在主成分 1 中,除了 17、8、5、16 号色谱峰以外,其余 13 个成分的因子载荷非常接近,均是主成分 1 的重要贡献成分,说明主成分 1 很好地表达了 TSD 多成分物质(群)。

2.5.4 综合评价分析 用计算得到的主成分对 54 个样品进行综合评价,将得到的特征向量与标准化

表 5 初始因子载荷矩阵

Table 5 Initial factor load matrix

峰号	主成分 1	主成分 2	主成分 3	主成分 4
11	0.906	0.006	-0.092	-0.034
9	0.893	-0.200	0.104	-0.101
10	0.839	0.232	0.051	-0.074
1	0.833	-0.131	-0.269	-0.065
14	0.820	-0.404	0.125	-0.169
12	0.818	-0.065	-0.412	0.122
3	0.817	0.085	0.347	0.075
13	0.790	-0.519	0.096	-0.184
6	0.758	0.274	-0.138	-0.180
7	0.748	0.384	-0.320	-0.190
4	0.735	0.504	0.209	0.125
2	0.724	-0.101	0.506	0.121
15	0.722	-0.526	-0.229	0.012
17	0.676	-0.083	-0.159	0.373
8	0.528	0.702	-0.313	0.251
5	0.392	0.232	0.791	0.130
16	0.017	-0.305	-0.088	0.887

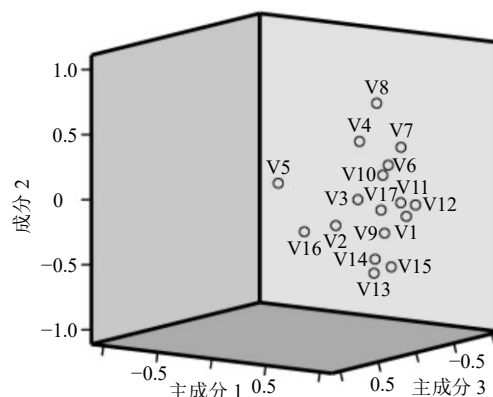


图 8 旋转后主成分空间图

Fig. 8 Principal component space after rotation

后的数据相乘,得到主成分表达式,再以每个主成分所对应的特征值占提取主成分总的特征值之和的比例作为权重得到主成分综合模型,根据主成分综合模型计算 54 个样品的主成分得分及综合得分值^[10],如表 6 所示。综合得分结果显示,A 组的综合得分全部位列 36 位之后,说明煎煮 2 次较为适宜;B、C 组由产地批次造成排名差异,说明冷冻干燥可较好地保留汤液中的有效成分。

3 讨论

经典名方研究的核心内容是系统开展“药材-饮片-中间体-物质基准”的质量研究与相关性研究,

表 6 主成分得分、综合得分排序

Table 6 Ranking of principal component score and comprehensive score

编号	主成分 1	主成分 2	主成分 3	主成分 4	综合得分	排名	编号	主成分 1	主成分 2	主成分 3	主成分 4	综合得分	排名
B15	3.818	-0.173	0.010	0.149	2.071	1	C4	2.953	-0.505	-0.174	-0.018	1.532	28
C18	3.698	-0.550	-0.316	0.059	1.924	2	C16	2.872	-0.526	-0.081	0.099	1.503	29
C11	3.444	-0.236	0.160	0.132	1.873	3	C8	2.912	-0.491	-0.333	-0.003	1.497	30
C7	3.489	-0.626	-0.044	0.076	1.829	4	B17	2.867	-0.600	-0.334	0.016	1.461	31
C15	3.330	-0.335	-0.149	0.174	1.773	5	B8	2.821	-0.438	-0.378	0.125	1.459	32
C17	3.446	-0.699	-0.412	0.023	1.758	6	B6	2.796	-0.470	-0.206	0.089	1.455	33
B13	3.319	-0.468	-0.284	0.115	1.735	7	C1	2.776	-0.230	-0.376	-0.007	1.449	34
C14	3.351	-0.629	-0.421	0.075	1.718	8	B4	2.785	-0.602	-0.246	0.052	1.427	35
B10	3.349	-0.671	-0.436	0.020	1.706	9	B1	2.601	-0.206	-0.374	0.024	1.358	36
B16	3.245	-0.613	0.004	0.073	1.702	10	A6	2.307	-0.428	-0.310	0.081	1.183	37
C10	3.328	-0.654	-0.405	0.013	1.699	11	A15	2.199	-0.181	-0.092	0.127	1.177	38
C2	3.320	-0.623	-0.335	-0.094	1.698	12	A11	2.071	-0.310	-0.001	0.134	1.102	39
B14	3.210	-0.526	-0.419	0.169	1.659	13	A10	2.157	-0.464	-0.287	0.051	1.097	40
B12	3.135	-0.197	-0.387	0.115	1.656	14	A2	2.157	-0.470	-0.289	0.027	1.095	41
C3	3.108	-0.317	0.023	-0.041	1.656	15	A13	2.101	-0.354	-0.232	0.110	1.089	42
B3	3.097	-0.429	0.018	-0.008	1.639	16	A16	2.037	-0.370	-0.081	0.071	1.064	43
B7	3.090	-0.539	-0.067	0.174	1.627	17	A14	2.060	-0.371	-0.246	0.118	1.064	44
B2	3.206	-0.729	-0.384	-0.063	1.620	18	A5	1.993	-0.278	-0.085	0.117	1.054	45
C6	3.094	-0.470	-0.164	0.043	1.618	19	A18	2.015	-0.364	-0.229	0.054	1.037	46
C9	3.093	-0.353	-0.328	0.074	1.618	20	A1	1.854	-0.131	-0.269	0.066	0.974	47
B5	3.125	-0.535	-0.307	0.084	1.617	21	A7	1.850	-0.371	-0.081	0.098	0.964	48
B18	3.137	-0.606	-0.302	0.051	1.613	22	A17	1.856	-0.430	-0.251	0.051	0.941	49
C5	3.110	-0.487	-0.326	-0.033	1.604	23	A12	1.721	-0.097	-0.245	0.073	0.908	50
C13	3.086	-0.480	-0.338	0.069	1.598	24	A9	1.634	-0.227	-0.208	0.113	0.852	51
B11	3.013	-0.509	0.032	0.138	1.595	25	A3	1.546	-0.225	-0.044	0.096	0.819	52
C12	3.015	-0.254	-0.396	0.176	1.587	26	A4	1.576	-0.288	-0.191	0.083	0.813	53
B9	2.997	-0.401	-0.341	0.164	1.565	27	A8	1.574	-0.274	-0.231	0.089	0.810	54

在煎煮、冷冻干燥过程中,“标准汤液(中间体)-物质基准对应实物”之间的化学成分群动态传递特性是经典名方物质基准能否有效表达经典名方制剂质量的关键。因此,本实验对标准煎液-物质基准的化学成分群进行指纹信息和多元统计分析,从质量传递特评价制备工艺的合理性。研究建立了 TSD 指纹图谱,对一煎液(A组)、二煎液(B组)、冷冻干燥样品(C组)共 3 组 18 批药材的 54 个样品进行指纹图谱分析,进行中药指纹图谱相似度评价,发现 A 组样品的 17 个共有峰面积明显小于 B 组和 C 组, B 组和 C 组差别不大;进行 HCA 发现 A 组单独归为一类, B、C 组归为一类;采用 PLS-DA,找出色谱峰 16(藁本内酯)、1(没食子酸)、13、

12(阿魏酸)、7(苦杏仁苷)、15(洋川芎内酯 A)这 6 种成分是影响不同批次、组别样品质量的标志性差异物质,在制备过程中应重点关注。并采用 PCA,选取代表 TSD 82.782%质量信息的 4 个主成分,根据主成分综合模型计算 54 个样本综合得分值进行排序, A 组的综合得分全部位列 36 位之后。研究表明,煎煮次数对质量的影响明显大于药材的产地和批次的影响,煎煮 2 次更能有效提取出化学成分;冷冻干燥能较好的保留煎液中化学物质群,质量与煎液保持基本一致。

本实验经古籍溯源, TSD 的服用方法为水煎温服,一般认为是煎煮 1 次,也有专家认为煎煮 1 次不能完全有效提取出方中有效物质;根据《医疗机

构中药煎药室管理规范》，中药复方一般煎煮 2 次，课题组前期依据阿魏酸、羟基红花黄色素 A 和芍药苷 3 个指标成分的含量选择了煎煮 2 次；同时，课题组对比了常压干燥、减压干燥、冷冻干燥等方法，发现冷冻干燥对指标成分含量影响较小，现有研究表明冷冻干燥法是最常用的经典名方物质基准对应实物干燥方法^[11-12]。

在指纹图谱方法学考察时，实验中比较不同生产厂家（Waters、Agilent、Thermo Fisher）色谱柱的分离效果，对流动相、柱温、体积流量等色谱条件进行了反复考察，根据色谱峰的数量、峰形及分离度，最终确定选取 Agilent HC-C₁₈ 色谱柱，体积流量为 1.0 mL/min，柱温为 30 °C，进样量为 10 μL。采用二极管阵列检测器（DAD 检测器）对物质基准供试品进行全波长扫描（190~400 nm），分析三维图谱，比较了 237、254、280、310 nm 波长下的色谱图，发现在 280 nm 波长条件下，供试品指纹图谱出现的峰数量最多，且响应值较高，故选择 280 nm 为指纹图谱检测波长；研究对比了乙腈、甲醇作为有机相与不同浓度磷酸水溶液作为水相之间的组合，最终确定乙腈与 0.5% 磷酸水溶液作为流动相，并对洗脱梯度进行优化，确定了指纹图谱的洗脱梯度；在中药指纹图谱相似度评价时，选取了特征明显、重复性好、稳定性好的 17 个色谱峰作为指纹图谱共有峰，可较好地反映指纹图谱概貌，其中 10 个成分进行了对照品标定，其余 7 个成分未找到对照品标定其成分，需进一步结合质谱技术对较多未知成分的结构进行确定。

通过 PLS-DA 分析发现色谱峰 16（藁本内酯）、1（没食子酸）、13、12（阿魏酸）、7（苦杏仁苷）、15（洋川芎内酯 A）6 种成分是影响 54 个样品质量的标志性差异物质。通过 PCA，对于代表 TSD 54% 质量信息的主成分 1，色谱峰 11（芍药苷）、9（咖啡酸）、10（羟基红花黄色素 A）、1（没食子酸）、14、12（阿魏酸）、3（原儿茶酸）、13、6、7（苦杏仁苷）、4、2（5-羟甲基糠醛）、15（洋川芎内酯 A）均是主要的质量贡献成分。课题组前期基于中药质量标志物的五原则对 TSD 质量标志物进行文献综述预测分析，提示阿魏酸、芍药苷、苦杏仁苷、芍药内酯苷、梓醇、没食子酸、羟基红花黄色素 A 可作为该复方的质量标志物^[9]。而《中国药典》2015 年版中对 TSD 中 6 个饮片明确规定了 5 个定量检测指标是羟基红花黄色素 A、苦杏仁苷、阿魏酸、芍

药苷、毛蕊花糖苷^[13]。由于毛蕊花糖苷在 280 nm 波长下出峰小，本实验没有进行标定。

对于质量标志物的选择，从制剂过程来看，本实验找出 6 种标志性差异性成分。其中阿魏酸、苦杏仁苷是《中国药典》检测成分，作为质量标志物的理论依据充分。没食子酸在白芍、川芎、当归等很多药材中均存在，成分特有性较差，但是其在 TSD 中的含量较高，可测性好，且具有抗炎、抗氧化等多种生物活性，对心血管系统疾病、神经系统疾病、肿瘤等具有防治作用^[14]，可以考虑作为质量标志物。藁本内酯、洋川芎内酯 A 是川芎和当归挥发油的主要成分，从指纹图谱中看出，冻干样品中这 2 种成分的含量均显著低于二煎样品，而且洋川芎内酯 A 也是质量的主要贡献成分，现代研究表明其在抗氧化损伤、抗炎镇痛、抗凝及抗血小板聚集、舒张血管等方面具有显著的疗效^[15-16]，因此，建议将洋川芎内酯 A 作为质量标志物进行含量测定。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张鹏, 刘安, 邬兰, 等. 经典名方概述与开发探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(15): 183-194.
- [2] 梁茂新, 范颖. 古代经典名方和证候类复方制剂研制可行性分析 [J]. 浙江中医药大学学报, 2010, 34(1): 19-20.
- [3] Tao T Q, He T, Mao H M, *et al.* Non-targeted metabolomic profiling of coronary heart disease patients with Taohong Siwu Decoction treatment [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 651.
- [4] Luo Z R, Li H, Xiao Z X, *et al.* Taohong Siwu Decoction exerts a beneficial effect on cardiac function by possibly improving the microenvironment and decreasing mitochondrial fission after myocardial infarction [J]. *Cardiol Res Pract*, 2019, 2019: 1-13.
- [5] Zuo C J, Zhang Y Y, Wang J C, *et al.* Deciphering the intervention mechanism of Taohong Siwu Decoction following the abnormal uterine bleeding rats based on serum metabolic profiles [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 170: 204-214.
- [6] Zhang Y Y, Wang J C, Zuo C J, *et al.* Protective effect of Taohong Siwu Decoction on abnormal uterine bleeding induced by incomplete medical abortion in rats during early pregnancy [J]. *Chem Pharm Bull*, 2018, 66: 708-713.
- [7] Chen G M, Xie Y Y, Liu Y Y, *et al.* Taohong Siwu Decoction for femoral head necrosis: A protocol for

- systematic review [J]. *Medicine* (Baltimore), 2020, 99: e19368.
- [8] 代云桃, 靳如娜, 吴治丽, 等. 基于标准汤剂(物质基准)的经典名方制备工艺和质量标准研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(2): 164-174.
- [9] 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]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(4): 226-234.
- [10] 徐男, 孙蓉, 李元媛, 等. 基于 HPLC 指纹图谱、多成分定量结合化学计量学方法评价不同产地三棱药材的质量 [J]. 中草药, 2019, 50(7): 1682-1689.
- [11] 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.
- [12] 施崇精, 李希, 冯建安, 等. 古代经典名方济川煎物质基准 HPLC 特征指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2020, 51(15): 3930-3936.
- [13] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 41-278.
- [14] 郑雪花, 杨君, 杨跃辉. 没食子酸药理作用的研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(1): 94-98.
- [15] 张丽娟, 刘继勇, 姚翀, 等. 洋川芎内酯类化合物药理作用研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2015, 50(13): 1081-1084.
- [16] Gong S L, Zhang J, Guo Z K, *et al.* Senkyunolide A protects neural cells against corticosterone-induced apoptosis by modulating protein phosphatase 2A and α -synuclein signaling [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 1865-1879.

[责任编辑 郑礼胜]