

基于组方药味古今炮制工艺的经典名方桃红四物汤质量差异性研究

王升菊^{1,2}, 郑雨², 段赟², 江华娟^{1,2}, 王琳², 李固良², 何瑶², 章津铭^{2*}, 裴瑾^{1,2*}

1. 西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都 611137

2. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

摘要:目的 对比研究桃红四物汤(Taohong Siwu Decoction, TSD)组方药味分别为生品、药典“酒炙”和尊古“酒洗”时的质量差异性, 辨识差异标志物。方法 使用 Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(150 mm×3.0 mm, 1.8 μm), 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 进行梯度洗脱, 检测波长为 230 nm, 柱温 30 °C, 体积流量 0.3 mL/min, 进样体积 10 μL, 建立 UPLC 指纹图谱。采用中药指纹图谱相似度评价系统确定共有峰, 进行相似度评价, 运用层次聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析(principal component analysis, PCA)和偏最小二乘-判别分析(partial least square-discriminant analysis, PLS-DA)对不同组别的 TSD 进行质量评价, 筛选出对 TSD 整体质量贡献较大的成分, 并进行含量测定, 评价组方药味不同炮制工艺对 TSD 质量的影响。结果 选取了 20 个色谱峰作为指纹图谱共有峰, 生品、药典“酒炙”和尊古“酒洗”组内相似度均大于 0.996, 组间相似度均小于 0.980。通过与对照品比对, 指出 5-羟甲基糠醛(3 号峰)、没食子酸(4 号峰)、绿原酸(7 号峰)、羟基红花黄色素 A(8 号峰)、芍药内酯苷(9 号峰)、芍药苷(10 号峰)、阿魏酸(14 号峰)、苯甲酸(17 号峰)共 8 个成分。HCA、PCA 和 PLS-DA 可明显将生品、药典“酒炙”和尊古“酒洗”分为 3 类, 5-羟甲基糠醛、阿魏酸、羟基红花黄色素 A 等成分可能是影响三者质量的差异标志物。含量测定显示, 羟基红花黄色素 A 和阿魏酸在炮制后含量下降, 5-羟甲基糠醛在炮制后升高, 且相对于药典“酒炙”, 尊古“酒洗”后羟基红花黄色素 A 和阿魏酸含量增加, 5-羟甲基糠醛含量降低。结论 TSD 组方药味生品、药典“酒炙”以及尊古“酒洗”间存在质量差异, 值得深入研究; 为经典名方组方药味炮制研究提供依据。

关键词: 经典名方; 桃红四物汤; UPLC; 尊古炮制; 酒洗; 酒炙; 指纹图谱; 多元统计分析; 羟基红黄色素 A; 阿魏酸; 5-羟甲基糠醛

中图分类号: R283.1; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)14-4201-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.14.010

Quality difference of classical prescription Taohong Siwu Decoction based on ancient and modern processing

WANG Sheng-ju^{1, 2}, ZHENG Yu², DUAN Yun², JIANG Hua-juan^{1, 2}, WANG Lin², LI Gu-liang², HE Yao², ZHANG Jin-ming², PEI Jin^{1, 2}

1. State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, Chengdu 611137, China

2. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To study the quality difference of Taohong Siwu Decoction (TSD, 桃红四物汤) in the original medicinal materials, “stir-fried wine” recorded in Chinese Pharmacopoeia and ancient “wine washing”, and identify the differential markers. **Methods** The separation was performed on Eclipse Plus C₁₈ column (150 mm × 3.0 mm, 1.8 μm), with acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution, detection wavelength 225 nm, column temperature 30 and flow rate 0.3 mL/min for gradient elution, and the UPLC fingerprint was established. The similarity evaluation system of fingerprint of traditional Chinese medicine was used to determine the common peak for similarity evaluation. Hierarchical cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA) and partial least square-discriminant analysis (PLS-DA) were used to evaluate the quality of TSD in different processing groups, and the

收稿日期: 2021-03-09

基金项目: 国家中医药管理局全国名老中医药专家传承工作室建设项目(国中医药人函[2019]41号); 成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划(CXTD2018003)

作者简介: 王升菊(1994—), 硕士研究生, 研究方向为中药品种、品质与资源开发研究。Tel: 18482123586 E-mail: 1606391366@qq.com

***通信作者:** 章津铭, 教授, 从事中药新制剂和新剂型研究。Tel: 13551043885 E-mail: cdutcmzjm@126.com

裴瑾, 教授, 主要从事中药资源品种品质研究。Tel: 13880369322 E-mail: peixin@163.com

components which contributed greatly to the overall quality of TSD were selected and determined. Finally, the content was determined, and the effects of different processing techniques on the quality of TSD were evaluated. **Results** Twenty chromatographic peaks were selected as the common peaks of the fingerprint. The similarities within the groups were greater than 0.996, and the similarities between the groups were less than 0.980. By comparing with the reference substance, eight components of 5-hydroxymethyl furfural (peak 3), gallic acid (peak 4), chlorogenic acid (peak 7), hydroxysafflor yellow A (peak 8), albiflorin (peak 9), paeoniflorin (peak 10), ferulic acid (peak 14), benzoic acid (peak 17) were identified. HCA, PCA and PLS-DA can clearly divide the original medicinal materials, Pharmacopoeia “stir-fried wine” and respect for antiquity “wine washing” into three categories, and 5-hydroxymethyl furfural, ferulic acid, hydroxysafflor yellow A may be the differential markers affecting the quality of the three processing groups. The content determination showed that the content of hydroxysafflor yellow A and ferulic acid decreased after processing, while 5-hydroxymethylfurfural increased after processing; and compared with Pharmacopoeia “stir-fried wine”, the content of hydroxysafflor yellow A and ferulic acid increased after ancient “wine washing”, while the content of 5-hydroxymethylfurfural decreased. **Conclusion** There is quality difference between the original medicinal materials, the modern “stir-fried wine” and the ancient “wine washing”, which are worthy of in-depth study. This experiment provides a basis for the research on the processing of classical famous prescriptions.

Key words: classical prescription; Taohong Siwu Decoction; UPLC; antique processing; wine washing; stir-fried wine; fingerprint; multivariate statistical analysis; hydroxyred yellow A; ferulic acid; 5-hydroxymethyl furfural

桃红四物汤 (Taohong Siwu Decoction, TSD) 出自清代柴得华所著《妇科冰鉴》^[1], 是国家中医药管理局发布的《古代经典名方目录 (第一批)》^[2] 的经典名方品种之一 (编号 97)。古籍记载处方用量及制法为: “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。” TSD 具有养血、活血、逐瘀的功效, 主治血虚血瘀证, 症见妇女月经不调、血多有块、色紫质黏、腹痛腹胀等。被历代医家推崇为治疗妇科疾病的首选良方。临床多用于治疗痛经、月经不调、乳腺癌等诸多瘀血类妇科疾病^[3-4]。

地黄以酒为辅料进行炮制首见于梁代《本草经集注》^[5]: “地黄…得清酒良”。宋代《洪氏急救方》^[6]始载地黄“酒洗”。金元时期《世医得救方》^[7]记载地黄“酒炒”; 此外还沿用了“酒蒸”“酒煮”“酒浸”等。考证发现地黄酒洗本意为用酒将药材润, 润透后进行干燥的方法; 《雷公炮炙论》^[8]首载当归以酒为辅料炮制当归, 原文记载“凡使 (当归) …酒浸一宿”, 所用辅料为酒, 与现代使用辅料一致。唐宋时期除沿用酒浸及炒法外, 还新增酒洗。明代《药性会元》^[9]详细记载当归酒洗之法: “夏酒洗, 切, 焙干用”, 方法与今酒炙法类似。元代《汤液本草》^[10]记载当归“微炒黄”, 其炒制程度与现代一致, 并首次提到酒炙法理论。说明酒炒和酒洗是历代当归主流的炮制方法; 红花以酒为辅料的炮制方法始见于宋《开宝本草》^[11], 原文记载“并酒煮服”。明代也有“红花酒洗”的记载, 另有“慢火微

炒”“酒炒”, 即现代“酒炙”法。可见历代红花以酒处理后进行干燥为主流; 综上, 地黄、当归、红花的“酒洗”之意即为用酒将药材润透后烘干; “酒炙”之意即为用酒将药材润透后炒干。

“酒洗”一词始见于汉代张仲景《伤寒论》^[12]中, 原文记载大黄“去皮, 清酒洗”, 并用于调味承气汤中。《古代经典名方目录 (第一批)》目录中有 7 首方剂与“酒洗”相关, 涉及的药材有大黄 (汉)、当归 (金、明、清)、肉苁蓉 (明)、生地黄 (清)、红花 (清), 而古籍中并未明确“酒洗”的具体操作。TSD 复方中生地、当归、红花均为“酒洗”, 因此可代表方进行酒洗研究。

课题组前期通过参考《上海市炮制规范》2018 年版^[13]中当归、大黄“酒洗”标准, 研究确定了 3 个药味的最佳“酒洗”工艺。2020 年 11 月国家中医药管理局公布的《古代经典名方关键信息表 (7 首方剂)》^[14]中公布了 TSD 中 6 味药的炮制规格为酒地黄, 酒当归, 酒白芍, 生品川芎, 燀桃仁 (研泥), 酒红花。不再强调酒洗, 但并未明确如何酒制。其中还提到 TSD “鉴于古代酒洗炮制方法演变到现代, 与酒炙法内涵基本一致, 且有国家标准, 建议采用酒炙法”^[14]。但组方药物尊古“酒洗”与现代“酒炙”对经典名方制剂质量是否存在差异, 仍不清楚。因此, 本研究按照 TSD 制备方法制备了生品煎液、药典“酒炙”煎液以及尊古“酒洗”煎液。借助超高效液相色谱系统 (UPLC) 建立了 TSD 指纹图谱, 并通过多元统计分析和化学成分分析, 评价组方药物生品、药典“酒炙”、尊古“酒洗”的 TSD

之间的质量差异,筛选出对煎液整体质量贡献较大的成分,并检测其含量。为 TSD 的质量属性控制以及经典名方复方制剂炮制研究提供参考。

1 仪器与试药

UltiMate3000 超高效液相色谱仪,美国 Thermo Fisher 公司;色谱柱 Eclipse Plus C₁₈ (150 mm×3.0 mm, 1.8 μm),美国 Agilent 公司;XP26 型百万分之一电子天平,瑞士梅特勒-托利多有限公司;KQ-600DE 型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;FTS-10A 全自动煎药壶,潮州市一壶百饮电器实业有限公司。DGH-9000 电热鼓风干燥箱,上海一恒科学仪器有限公司。对照品羟基红花黄色素 A (批号 wkq18010407)、5-羟甲基糠醛 (批号 wkq19010805)、苦杏仁苷 (批号 wkq19012401)、芍药苷 (批号 wkq20041008)、苯甲酸 (批号 wkq18031305)、阿魏酸 (批号 wkq20010902)、绿原酸 (批号 wkq20010902)、芍药内酯苷 (批号 wkq18052205)、没食子酸 (批号 wkq20010902),质量分数均大于 99.0%,均购自四川省维克奇生物科技有限公司。炮制用黄酒,产品标准号:GB/T13662,浙江塔牌绍兴酒有限公司;甲醇、乙腈为色谱醇,赛默飞世尔科技有限公司;磷酸为色谱级,成都市科隆化学品有限公司;水为超纯水。

TSD 组方药味地黄、当归、白芍、川芎、桃仁、红花原药材产地信息见表 1,6 味药均收集 5 个批次,于 2020 年 7 月课题组统一购进。经成都中医药大学药学院裴瑾教授鉴定品种,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

表 1 TSD 中各药味产地信息

Table 1 Origin information of decoction pieces in TSD

药材	批号	产地
地黄	DHYC-1~5	河南省武陟县
当归	DGYC-1~5	甘肃省岷县
白芍	BSYC-1~5	四川省中江县
川芎	CXYC-1~5	四川省都江堰市
桃仁	TRYC-1~5	山东省平邑县
红花	HHYC-1~5	新疆自治区霍城县

地黄属植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的干燥块根。且课题组按照《中国药典》2020 年版一部项下规定的质量检查方法,对 6 个药味进行显微鉴别、薄层色谱鉴别和指标性成分含量测定,均符合《中国药典》2020 年版一部各药材项下规定。

2 方法与结果

2.1 饮片炮制

2.1.1 生品炮制方法 参照《中国药典》2020 年版第四部^[7]“炮制通则”“净制”项下规定,制定地黄、当归、白芍、川芎的切制方法。

2.1.2 药典“酒炙”法 参照《中国药典》2020 年版四部“炮制通则”项下“酒炙”法的规定,制定酒炙地黄、酒炙当归、酒炙白芍、酒炙红花的炮制方法。

2.1.3 尊古“酒洗”法 参照《上海市中药饮片炮制规范》2018 年版^[13]当归项下“酒洗”法的规定,制定酒洗地黄、酒洗当归、酒洗红花的炮制方法。

每个药味的具体炮制方法见表 2。

2.2 TSD 供试样品的制备

《妇科冰鉴》^[1]中记载 TSD 的用法和用量为“生地三钱 (酒洗),当归四钱 (酒洗),白芍一钱五分 (酒炒),川芎一钱,桃仁十四粒 (去皮尖研泥),红花一钱 (酒洗)”。《古代经典名方关键信息表 (7 首方剂)》^[14]公布其折合现代剂量为地黄 11.19 g,当归 14.92 g,白芍 5.60 g,川芎 3.73 g,桃仁 3.78 g,红花 3.73 g。取处方的 3 倍剂量,共 128.85 g,第 1 次加 10 倍量水,浸泡 30 min,煎煮 1 h,纱布滤过,第 2 次加 8 倍量水,煎煮 30 min,合并 2 次煎液,定容至约 2 L,静置,取上清液,0.22 μm 微孔滤膜滤过,制得 TSD 煎液。不同批次的组方按照对应的方法组合为复方 (如 S1 样品: DHYC-1、DGYC-1、BSYC-1、CXYC-1、TRYC-1、HHYC-1, S2~S5 以此类推),3 种炮制方法按照 5 个批次各制备 5 份煎液,共得 15 批 TSD 样品,生品组 5 份煎液按批次依次编号 S1~S5,药典“酒炙”组 5 份煎液按批次依次编号 S6~S10,尊古“酒洗”组 5 份煎液按批次依次编号 S11~S15,用于后续实验。

2.3 TSD 阴性样品的制备

按 3 倍处方量分别称取缺地黄、当归、川芎、白芍、桃仁、红花其他 5 味药,缺当归川芎其它 4 味药的饮片,按“2.2”项下制备方法制得缺地黄、缺当归、缺川芎、缺当归川芎、缺白芍、缺桃仁、缺红花 7 个阴性煎液。

表 2 各味药材炮制方法

Table 2 Processing method of medicinal materials

药材	生品	药典“酒炙”法	尊古“酒洗”法
生地黄	除去杂质，洗净，闷润，切厚片，晒干	取地黄厚片，用黄酒拌匀后闷润 45 min，用文火炒至略有焦斑，取出，放凉，每 100 kg 地黄片用黄酒 50 kg	取地黄厚片，用黄酒拌匀后闷润 45 min，置鼓风干燥箱中 45 ℃ 干燥 8 h。每 100 kg 地黄片用黄酒 50 kg
当归	除去杂质，洗净，闷润，切薄片，晒干	取当归薄片，用黄酒拌匀，闷润 45 min，用文火炒至微黄色，取出，放凉。每 100 kg 当归用黄酒 15 kg	取当归薄片，用黄酒拌匀，闷润 45 min 后，置 40 ℃ 鼓风干燥箱中 70 ℃ 干燥。每 100 kg 当归片用黄酒 15 kg
红花	除去杂质	取净红花，用黄酒拌匀，闷润 30 min，用文火炒至黄酒挥干，取出，放凉。每 100 kg 红花用黄酒 50 kg	取净红花，用黄酒拌匀，浸吸 30 min 后，再置烘箱 40 ℃ 烘干 3 h。每 100 kg 红花用黄酒 50 kg
桃仁	除去杂质。用时捣碎	取净桃仁投入沸水中，焯至种皮由皱缩至舒展、易搓去时，捞出，放入冷水中，除去种皮，55 ℃ 干燥，用时捣碎	
川芎	除去杂质，分开大小，洗净，润透，切厚片		
白芍	洗净，闷润，切薄片，晒干	取白芍薄片，用黄酒拌匀，润透，置炒制容器内，用文火炒至微黄色，取出，放凉。每 100 kg 白芍用黄酒 15 kg	

2.4 TSD 煎液特征图谱研究

2.4.1 对照品溶液的制备 取羟基红花黄色素 A、芍药内酯苷、没食子酸、5-羟甲基糠醛、芍药苷、苯甲酸、阿魏酸、绿原酸对照品，精密称定，加 50% 甲醇制成分别含羟基红花黄色素 A 504 μg/mL、芍药内酯苷 436 μg/mL、没食子酸 406 μg/mL、5-羟甲基糠醛 444 μg/mL、芍药苷 216 μg/mL、苯甲酸 160 μg/mL、阿魏酸 265 μg/mL、绿原酸 233 μg/mL 的对照品溶液，分别吸取 1 mL 上述对照品溶液，制得混合对照品溶液。

2.4.2 色谱条件 色谱仪为 UltiMate3000 超高效液相色谱仪；色谱柱为 SunFireC₁₈ 柱（150 mm×3.0 mm，3.5 μm）；流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液，梯度洗脱：0~3 min，5%乙腈；3~10 min，5%~15%乙腈；10~25 min，15%~25%乙腈；25~35 min，25%~85%乙腈；35~37 min，85%乙腈；37~40 min，85%~5%乙腈；40~45 min，5%乙腈；检测波长为 230 nm；柱温 30 ℃；体积流量 0.3 mL/min；进样体积 10 μL。

2.4.3 精密度试验 取同一供试品溶液（S1），按“2.4.2”项下色谱条件测定，连续进样 6 次，计算 5-羟甲基糠醛、没食子酸、绿原酸、羟基红花黄色素 A、芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸、苯甲酸峰面积的 RSD 分别为 3.17%、8.09%、2.74%、4.2%、3.26%、1.74%、1.7%、0.92%；以《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件》（2012.130723 版）评价，6 次进样相似度为 1，表明该仪器精密度良好。

2.4.4 重复性试验 取同一批次样品（S1），按照

“2.2”项下样品制备方法平行制备 6 份，按照“2.4.2”项下色谱条件测定，计算 5-羟甲基糠醛、没食子酸、绿原酸、羟基红花黄色素 A、芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸、苯甲酸质量分数的 RSD 依次为 0.76%、4.59%、0.94%、0.75%、3.42%、3.83%、4.28%、1.34%；以《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件》（2012.130723 版）评价，6 次进样相似度为 1，表明该方法重复性良好。

2.4.5 稳定性试验 取同一供试品溶液（S6），分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 按照“2.4.2”项下色谱条件进样测定，结果 5-羟甲基糠醛、没食子酸、绿原酸、羟基红花黄色素 A、芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸、苯甲酸峰面积的 RSD 分别为 1.26%、1.59%、0.77%、0.85%、4.33%、4.13%、3.15%、4.84%；以《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件》（2012.130723 版）评价，6 次进样相似度为 1，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.6 特征图谱相似度评价 将生品、药典“酒炙”和尊古“酒洗”煎液特征图谱的 cdf 格式导入国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件》（2012.130723 版）进行分析。以 S1 号样品的 UPLC 特征图谱作为参照图谱进行指纹匹配，利用平均数法，设置时间窗口为 0.1 min，共确定了 20 个共有峰、15 批 TSD 的特征图谱叠加图（图 1），并进行相似度计算（表 1），结果发现 S1~S5、S6~S10、S11~S15 组内的相似度均≥0.996，说明同一炮制方法制备样品差异较小。但 3 个炮制组间的相似度均≤0.980，表明生品、药典“酒炙”和尊古“酒

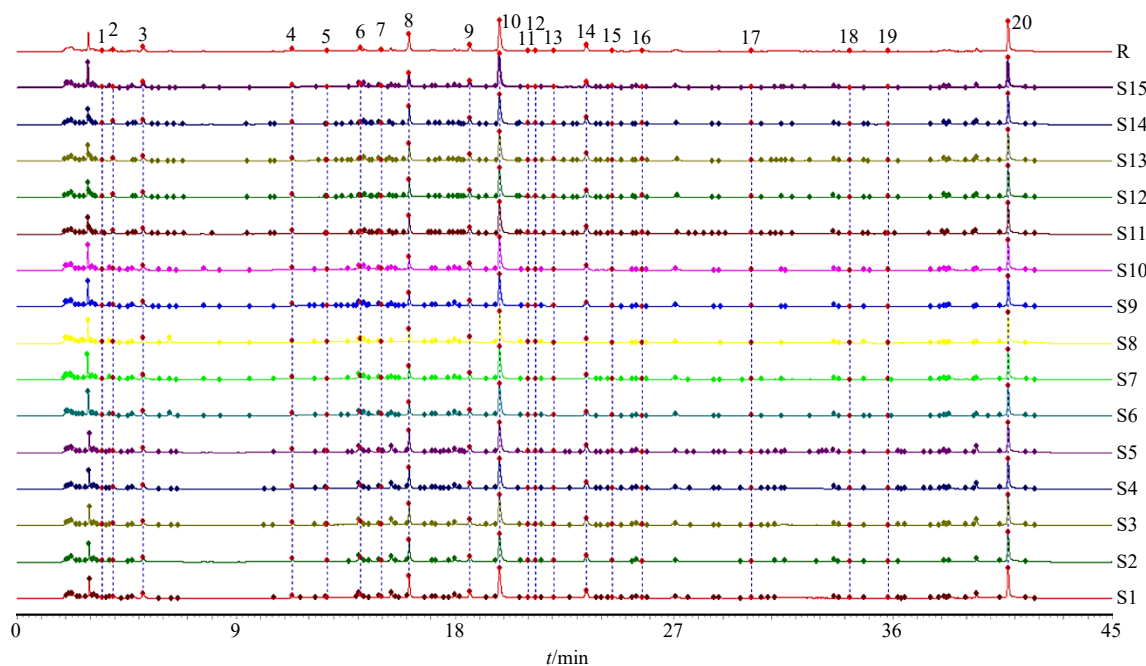


图 1 15 批 TSD 的 UPLC 特征图谱与对照特征图谱 (R)

Fig. 1 UPLC characteristic map and control characteristic map (R) of 15 batches of TSD

表 3 15 批 TSD 的相似度结果

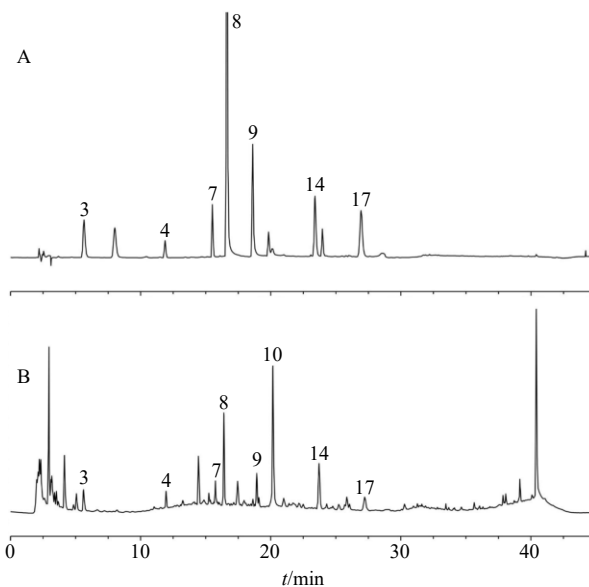
Table 3 Similarity results of 15 batches of TSD

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.996	S6	0.997	S11	0.998
S2	0.995	S7	0.996	S12	0.998
S3	0.997	S8	0.996	S13	0.998
S4	0.997	S9	0.996	S14	0.998
S5	0.997	S10	0.996	S15	0.997

洗”煎液间存在差异。

2.4.7 色谱峰化学成分指认及归属 通过与对照品比对 (图 2), 共指认了 8 个色谱峰, 色谱峰依次为 5-羟甲基糠醛 (3 号峰)、没食子酸 (4 号峰)、绿原酸 (7 号峰)、羟基红花黄色素 A (8 号峰)、芍药内酯苷 (9 号峰)、芍药苷 (10 号峰)、阿魏酸 (14 号峰)、苯甲酸 (17 号峰); 根据阴性物质基准色谱图 (图 3), 确定羟基红花黄色素 A 为红花的专属性成分; 5-羟甲基糠醛归属于地黄; 芍药苷、芍药内酯苷、没食子酸为白芍的专属性成分; 阿魏酸归属于当归和川芎。

2.4.8 层次聚类分析 (hierarchical clustering analysis, HCA) 运用 SPSS 21 软件对 S1~S15 批次样品进行 HCA, 以 20 个共有峰作为分类依据, 选择系统聚类分析, 采用组间连接法, 欧式距离为度量标准, 聚类结果如图 4 所示, 生品聚为一类,



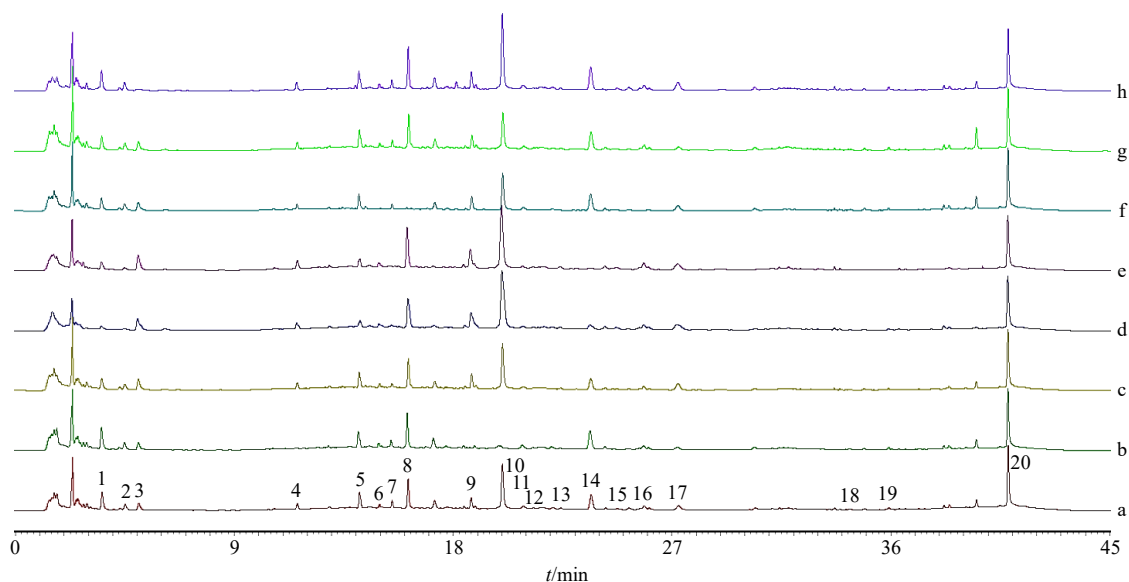
A-混合对照品 B-TSD 样品 3-5-羟甲基糠醛 4-没食子酸 7-绿原酸 8-羟基红花黄色素 A 9-芍药内酯苷 10-芍药苷 14-阿魏酸 17-苯甲酸

A-mixed reference substances B-TSD sample solution 3-5-hydroxymethylfurfural 4-gallic acid 7-chlorogenic acid 8-hydroxy safflower yellow A 9-albiflorin 10-paeoniflorin 14-ferulic acid 17-benzoic acid

图 2 TSD 中各单味药主要成分指认

Fig. 2 Identification of characteristic components of each single medicine in TSD

药典“酒炙”聚为一类, 尊古“酒洗”聚为一类, 且药典“酒炙”和尊古“酒洗”聚为一个大类。



a-TSD 样品 b-缺白芍阴性样品 c-缺川芎阴性样品 d-缺当归阴性样品 e-缺川芎、当归阴性样品 f-缺红花阴性样品 g-缺桃仁阴性样品 h-缺生地黄阴性样品
a-TSD sample b-negative sample without *Paeoniae Radix Alba* c-negative sample without *Chuanxiong Rhizoma* d-negative sample without *Angelicae Sinensis Radix* e-negative sample without *Chuanxiong Rhizoma* and *Angelicae Sinensis Radix* f-negative sample without *Carthami Flos* g-negative sample without *Persicae Semen* h-negative sample without *Rehmanniae Radix*

图 3 TSD 中各成分归属

Fig. 3 Attribution of components in TSD

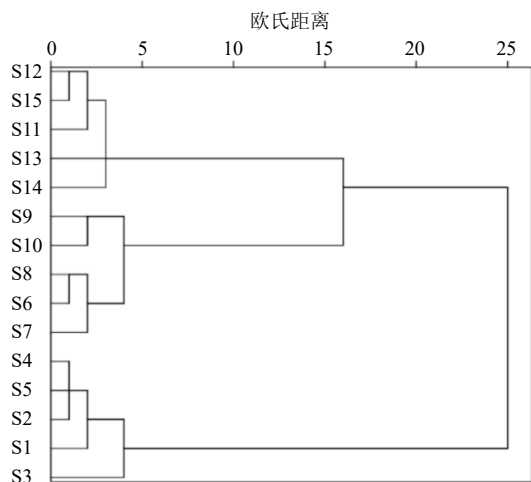


图 4 生品 (S1~S5)、药典“酒炙”法 (S6~S10)、尊古“酒洗”法 (S11~S15) 样品的 HCA

Fig. 4 HCA result of original medicinal materials (S1—S5), Pharmacopoeia “stir-fried wine” (S6—S10), and ancient “wine washing” (S11—S15)

2.4.9 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 以 15 批次生品煎液、药典“酒炙”和尊古“酒洗”为研究对象, 将 20 个共有峰的数据导入 SPSS 21 统计软件进行无监督的 PCA, 通过降维处理后提取主成分特征值、累积贡献率和主成分因子载荷值。前 4 个主成分的累积方差贡献率值为

92.898%, 说明该模型预测能力较好, 其中 PC1 方差贡献率为 55.264%, 说明成分 1 所含信息量较大。主成分因子的特征值和方差贡献率见表 4。主成分载荷值可代表各色谱峰对主成分的贡献率, 载荷的绝对值越大, 对主成分的贡献越大, 从表 5 可知, 第 1 主成分的信息主要来自于色谱峰 20、8 (羟基红黄色素 A)、14 (阿魏酸)、2、3 (5-羟甲基糠醛)、18。第 2 主成分的信息主要来自于色谱峰 16、12、10、9 (绿原酸)、5。第 3 主成分信息主要来自于色谱峰 6。第 4 主成分的信息主要来自于色谱峰 1。主成分 3D 图见图 5。

2.4.10 偏最小二乘-判别分析 (partial least square-

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 factor

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	11.053	55.264	55.264	11.053	55.264	55.264
2	4.586	22.928	78.193	4.586	22.928	78.193
3	1.746	8.731	86.924	1.746	8.731	86.924
4	1.195	5.974	92.898	1.195	5.974	92.898

表 5 主成分载荷

Table 5 Principal component load

峰号	PC1	PC2	PC3	PC4	峰号	PC1	PC2	PC3	PC4	峰号	PC1	PC2	PC3	PC4
1	-0.470	0.275	-0.487	0.569	8	0.978	-0.179	-0.026	-0.071	15	0.499	0.537	0.490	0.390
2	-0.916	-0.241	0.241	0.125	9	0.318	-0.850	-0.040	0.335	16	-0.578	0.792	-0.081	0.101
3	0.919	0.249	-0.201	-0.190	10	-0.543	0.602	0.180	-0.230	17	0.765	0.269	0.449	0.321
4	0.891	0.194	-0.153	-0.250	11	-0.741	0.298	0.470	0.242	18	0.909	0.106	0.301	0.205
5	0.607	-0.773	0.059	0.154	12	0.221	0.935	-0.221	-0.038	19	0.795	0.306	0.212	-0.014
6	0.281	0.196	-0.694	0.434	13	0.841	0.505	-0.021	0.025	20	0.986	0.005	0.043	0.041
7	0.895	-0.426	-0.002	0.024	14	0.922	0.329	-0.103	-0.056					

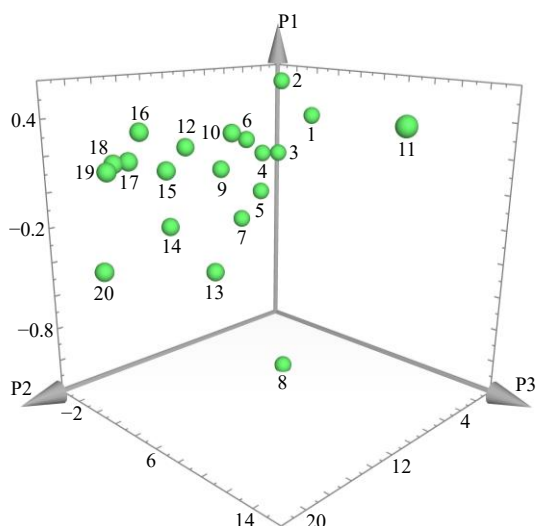


图 5 主成分 3D 图

Fig. 5 3D diagram of principal components

discriminant analysis, PLS-DA) 本研究进一步采用有监督的 PLS-DA 对 15 批次样品进行分析, 通过《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》软件得到 15×20 阶矩阵, 将数据导入 SIMCA 14.1 软件, 选取 20 个色谱峰的相对峰面积值作为变量, PLS-DA 结果见图 6。结果显示, 在置信区间 (95%) 内, 生品汤剂、现代汤剂和尊古汤剂能明显分开, 根据分布将 S1~S5 分为一类, S6~S10 分为一类, S11~S15 分为一类, 即同种炮制方法所得煎液样品差异较小, 不同炮制方法所得煎液样品差异较大。

为进一步搜寻出对上述样品分类贡献值较大的成分, 采用变量重要性投影 (variable importance in project, VIP) 进行分析 (VIP 值越大, 表明对样品分类贡献越大), 其中有 10 个成分 VIP 值 >1, 按照 VIP 值由大到小分别对应峰号为 12、5、16、9 (绿原酸)、13、3 (5-羟甲基糠醛)、7、14 (阿魏酸)、4、8 (羟基红黄色素 A), 以上 10 个成分可能是不

同炮制方法的重要差异性成分, 也是酒炙与酒洗的差异质量标志性成分。见图 7。

2.5 羟基红花黄色素 A、阿魏酸、5-羟甲基糠醛的含量测定

2.5.1 线性关系考察 精密称取羟基红花黄色素 A 4.35 mg、阿魏酸 4.36 mg、5-羟甲基糠醛 8.08 mg,

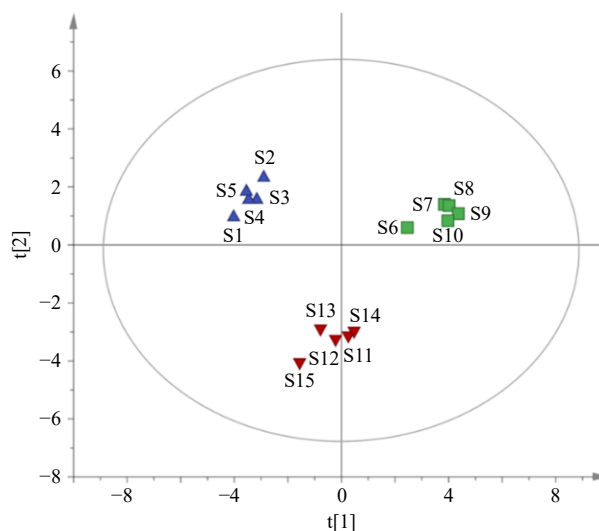


图 6 生品 (S1~S5)、药典“酒炙” (S6~S10)、尊古“酒洗” (S11~S15) 的 PLS-DA 得分图

Fig. 6 PLS-DA score plot of original medicinal materials (S1—S5), Pharmacopoeia “stir-fried wine” (S6—S10) and ancient “wine washing” (S11—S15)

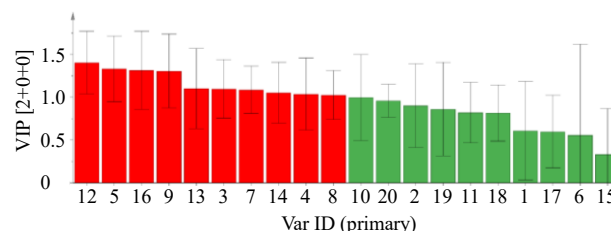


图 7 TSD 煎液中 20 个共有成分的 VIP 值

Fig. 7 VIP values of 20 common components in material reference of TSD

加 50% 甲醇稀释通过二倍稀释法制得 6 个不同质量浓度的对照品溶液, 以峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X), 进行线性回归, 得到回归方程分别为羟基红花黄色素 A $Y=0.102 X+3.021 7$, $r=0.999 1$, 线性范围 13.594~435 $\mu\text{g/mL}$; 阿魏酸 $Y=0.270 8 X+2.667 3$, $r=0.999 3$, 线性范围 13.593 8~436 $\mu\text{g/mL}$; 5-羟甲基糠醛 $Y=0.234 6 X+1.778 2$, $r=0.999 2$, 线性范围 12.625~404 $\mu\text{g/mL}$; 结果表明, 各个对照品的线性关系良好, r 均大于 0.999。

2.5.2 加样回收率考察 取 S1 批次样品约 0.2 g, 分别精密添加已知各成分质量浓度的对照品溶液适量, 按照“2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按照按照“2.4.2”项色谱条件进样, 测定峰面积, 计算羟基红花黄色素 A、阿魏酸、5-羟甲基糠醛的加样回收率。结果显示, 3 个成分的平均加样回收率依次为 99.62%、100.46%、99.47%, RSD 分别为 1.26%、1.66%、0.89%。结果表明含量测定方法准确可靠。

2.5.3 含量测定结果 取 S1~S5 生品、S6~S10 药典“酒炙”和 S11~S15 尊古“酒洗”供试品, 按照“2.4.2”项色谱条件检测, 含量测定结果见表 7, 结果显示羟基红花黄色素 A 和阿魏酸在炮制后含量下降, 而 5-羟甲基糠醛在炮制后升高。相对于药典“酒炙”, 尊古“酒洗”中羟基红花黄色素 A 含量增加 3.84%; 阿魏酸含量增加 2.47%, 而 5-羟甲基糠醛含量降低 9.07%。

3 讨论

本实验在流动相洗脱系统考察时, 对比了乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.5%磷酸水溶液等不同体积分数、不同洗脱梯度, 结果发现, 乙腈-0.1%磷酸水溶液作为流动相梯度洗脱时, 峰形较佳, 各峰分离度较好。实验采用 UPLC-DAD 法对供试品进行全波长扫描, 分析 3D 图谱, 发现 230 nm 波长下出峰较多, 基线平稳且各色谱峰响应值较高。实验还比较了 25、30、35 $^{\circ}\text{C}$ 下色谱峰的分离效果, 结果显示以 30 $^{\circ}\text{C}$ 分离效果最佳。最终确定色谱条件以乙腈-0.1%磷酸水溶液作为流动相, 体积流量为 0.3 mL/min, 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量为 10 μL 。

《古代经典名方关键信息考证原则》^[15]指出“信息考证在尊古的基础上充分考虑当前临床和生产实际, 传承不泥古, 用历史和发展的角度去认识经典名方中药物炮制等关键共性问题”。本次研究对生品

表 7 羟基红花黄色素 A、阿魏酸、5-羟甲基糠醛含量测定结果

Table 7 Determination of hydroxysafflor yellow A, ferulic acid and 5-hydroxymethylfurfural

炮制组	质量分数/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$		
	羟基红花黄色素 A	阿魏酸	5-羟甲基糠醛
S1	792.64	287.63	65.07
S2	728.80	311.85	58.20
S3	728.11	288.69	52.16
S4	732.49	325.91	55.60
S5	728.44	326.44	60.17
S1~S5 均值	742.10	308.10	56.24
S6	714.07	285.61	64.52
S7	707.39	276.60	68.17
S8	701.50	279.22	69.25
S9	711.49	290.09	67.23
S10	722.71	287.45	66.20
S6~S10 均值	711.43	283.79	67.07
S11	735.01	300.15	61.38
S12	755.01	308.61	62.17
S13	735.02	286.08	59.33
S14	728.93	278.19	61.39
S15	739.79	280.95	63.22
S11~S15 均值	738.75	290.80	61.50

煎液、药典“酒炙”、尊古“酒洗”进行了相似度评价、聚类分析、PLS-DA 分析以及 PCA, 结果发现, 3 种汤剂批次内相似度大于 0.996, 说明物质基准制备的均一性与稳定性。而组间相似度均小于 0.980, 且多元统计分析结果显示, 3 个组能有效聚为 3 类, 说明炮制组间存在差异。对 20 个共有峰进行主成分分析, 前 4 个主成分的累积方差贡献率值为 92.898%。其中第 1 主成分载荷值较大的成分有羟基红黄色素 A、阿魏酸、5-羟甲基糠醛等已被识别的化合物。第 2 主成分载荷值较大的有被指认的绿原酸等。采用 PLS-DA 分析对分类贡献值较大的成分, 发现已被指认的绿原酸、5-羟甲基糠醛、阿魏酸、羟基红黄色素 A 等成分的 VIP 值大于 1, 2 种统计分析方法结论趋于一致, 其统计结果说明以上 4 种成分可能是影响不同炮制组别质量的标志性差异物质。本次研究对质量标志性物质羟基红花黄色素 A、阿魏酸、5-羟甲基糠醛进行含量测定。羟基红花黄色素 A 属于查耳酮类化合物, 是《中国药典》2020 年版规定的红花指标性成分, 也是红花发挥活

血化瘀药效的主要成分^[16]。研究表明^[17-18], 羟基红花黄色素 A 是热不稳定性成分, 遇热易分解。结果显示红花酒制后煎液中羟基红花黄色素 A 含量降低, 且酒炙后下降更为明显, 说明酒洗低温干燥更利于红花的质量。阿魏酸来源于当归, 具有抗炎活性^[19]。研究表明^[20], 阿魏酸会随着温度的升高, 含量降低。5-羟甲基糠醛归属于地黄, 有研究认为, 5-羟甲基糠醛受高温和加热影响, 在高温条件下, 药材中的葡萄糖、果糖等单糖化合物发生美拉德反应, 脱水生成 5-羟甲基糠醛^[21]。所以地黄“酒炙”后 5-羟甲基糠醛含量会明显升高。绿原酸因专属性不强, 所以剔除。综上, 提示羟基红黄色素 A、阿魏酸、5-羟甲基糠醛化合物可作为质量标志性差异物质对 TSD 进行质量控制。

本次研究综合评价了 TSD 组方药味生品煎液, “酒炙”煎液以及“酒洗”煎液间的质量差异。结果显示相对于生品, 药典“酒炙”与尊古“酒洗”2 种不同炮制工艺均导致 TSD 样品质量的差异, 且“酒炙”和“酒洗”炮制品二者间也存在质量差异。因此现代“酒炙”与尊古“酒洗”之间的差异性值得深入探讨, 后续课题组将综合药效学研究综合评价炮制工艺的合理性。本次研究结果为 TSD 的质量属性控制提供基础, 以及为经典名方复方制剂炮制研究提供实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 柴得华. 妇科冰鉴 [M]. 于峥, 魏民, 杨威校注. 北京: 人民军医出版社, 2012: 5.
- [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]. <http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2018-04-16/7107.html>.
- [3] 刘立, 段金廛, 刘培, 等. 桃红四物汤及配伍药对桃仁-红花与四物汤用于原发性痛经作用的比较研究 [J]. 中药药理与临床, 2012, 28(1): 2-6.
- [4] 王升菊, 刘倩倩, 江华娟, 等. 基于网络药理学和分子对接技术探讨桃红四物汤治疗原发性痛经的有效成分及作用机制 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(22): 5373-5382.
- [5] 陶弘景. 本草经集注: 叙录一卷 [M]. 影印本. 上海: 群联出版社, 1955: 44.
- [6] 洪遵. 洪氏急验方 [M]. 北京: 商务印书馆, 1956: 25.
- [7] 危亦林. 世医得效方 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1964: 336.
- [8] 雷公. 雷公炮炙论 [M]. 芜湖: 皖南医学院科研科, 1983: 16-98.
- [9] 梅得春. 药性会元 [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2018: 2.
- [10] 王好古. 汤液本草 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1956.
- [11] 卢多逊. 尚志钧辑校. 开宝本草 辑复本 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1998: 218.
- [12] 张仲景. 伤寒论 [M]. 北京: 中医中医药出版社, 2004: 131, 189.
- [13] 上海市药品监督管理局. 上海市中药饮片炮制规范: 2018 年版 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2019: 11-71.
- [14] 国家中医药管理局. 《古代经典名方关键信息表(7 首方剂)》 [EB/OL]. <http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2020-11-10/18132.html>.
- [15] 国家中医药管理局. 关于发布《古代经典名方关键信息考证原则》 [J]. [EB/OL]. <http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2020-11-10/18132.html>.
- [16] Asgarpanah J, Kazemivash N. Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of *Carthamus tinctorius* L. [J]. *Chin J Integr Med*, 2013, 19(2): 153-159.
- [17] 金鸣, 臧宝霞, 李金荣, 等. 羟基红花黄色素 A 热稳定性的初步研究 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28(12): 97-98.
- [18] 刘彩凤, 梁军, 钟琳瑛, 等. 正交实验法优选酒洗红花的炮制工艺 [J]. 天津中医药大学学报, 2019, 38(6): 593-597.
- [19] Mir S M, Ravuri H G, Pradhan R K, et al. Ferulic acid protects lipopolysaccharide-induced acute kidney injury by suppressing inflammatory events and upregulating antioxidant defenses in Balb/c mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 100: 304-315.
- [20] 江苏新医学院. 中药大辞典 (上) [M]. 上海: 上海人民出版社, 1977: 324.
- [21] 朱梅芬, 刘向前, 吴柱熹, 等. 地黄的炮制对梓醇和 5-羟甲基糠醛含量的影响 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(12): 1155-1157.

[责任编辑 郑礼胜]