

养精种玉汤的“点-线-面”质量标准分析

朱俊平¹, 魏佳明¹, 刘瑞连², 梁慧慧¹, 余格¹, 文雯¹, 毛妍¹,
周逸群¹, 刘文龙^{1,3}, 贺福元¹, 张喜利^{1*}, 李龙^{1*}

- (1. 湖南中医药大学 药学院, 中药成药性与制剂制备湖南省重点实验室,
中医药超分子机理与数理特征化实验室, 长沙 410208;
2. 湖南省中医药研究院, 长沙 410006;
3. 湖南中医药大学 附属常德医院, 湖南 常德 415000)

[摘要] 目的: 结合指纹图谱全成分分析及 2015 年版《中国药典》所载指标成分的含量测定方法, 通过莫诺苷、马钱苷、芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷的每个单一成分“点”到多成分的“线”以及指纹图谱全成分的“面”建立养精种玉汤的“点-线-面”质量标准。方法: 采用 XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm 5 μm), 流动相 0.1% 磷酸水溶液-乙腈梯度洗脱, 柱温 30 ℃, 进样量 10 μL, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长分别选择了 240, 316, 230, 334 nm。以 3 种一测多评校正方法以及外标法、回归方程法测定 5 种指标成分的含量, 同时对指纹图谱进行全成分分析及相似度评价。结果: 以阿魏酸为参照, 莫诺苷、马钱苷、芍药苷、毛蕊花糖苷的相对校正因子(*f*) (多点校正法) 分别为 0.392 1, 0.421 4, 0.261 7, 0.268 6, *f*(斜率校正法) 分别为 0.385 4, 0.419 4, 0.255 9, 0.274 0; 指纹图谱进行全成分分析了 20 个特征峰且相似度均≥0.999, 采用一测多评校正方法以及外标法、回归方程法测得的 5 个指标成分含量之间无显著性差异。结论: 建立的“点-线-面”质量标准体系在养精种玉汤中得到了验证, 可为其他经典名方的定量测定和指纹图谱质量控制提供思路和方法。

[关键词] 经典名方; 养精种玉汤; 一测多评法; 校正因子; 全成分分析; 质量标准; 指纹图谱

[中图分类号] R22; O657; R28; C37; R91 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)21-0012-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191651

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190505.0935.017.html>

[网络出版时间] 2019-05-08 8:40

Analysis on "Point-line-surface" Quality Standard of Yangjing Zhongyu Tang

ZHU Jun-ping¹, WEI Jia-ming¹, LIU Rui-lian², LIANG Hui-hui¹, YU Ge¹, WEN Wen¹,
MAO Yan¹, ZHOU Yi-qun¹, LIU Wen-long^{1,3}, HE Fu-yuan¹, ZHANG Xi-li^{1*}, LI Long^{1*}

- (1. College of Pharmacy, Hunan Provincial Key Laboratory of Druggability and Preparation Modification for Traditional Chinese Medicine (TCM), Laboratory of Supramolecular Mechanism and Mathematic-Physics Characterization for Chinese Materia Medica, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;
2. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006, China;
3. No. 1 TCM Hospital of Changde, Changde 415000, China)

[Abstract] **Objective:** Based on the analysis of the total components of fingerprint and the determination methods of the existing components in the 2015 edition of *Chinese Pharmacopoeia*, the "point-line-surface" quality

[收稿日期] 20190123(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81874344); 湖南省自然科学基金面上项目(2019JJ40220); 湖南省大学生创新创业项目(2014206); 湖南省教育厅科研优秀青年项目(15B174)

[第一作者] 朱俊平, 在读硕士, 从事中药制剂研究, E-mail: 302696724@qq.com

[通信作者] * 张喜利, 高级工程师, 从事中药制剂质量研究, E-mail: xiaoli610@126.com;

* 李龙, 讲师, 从事中药分析研究, E-mail: 54496373@qq.com

standard of Yangjing Zhongyu Tang was established by the "point" of each single component (morroniside , loganin , paeoniflorin , ferulic acid and verbascoside) to the "line" of multicomponent and the "face" of fingerprint of the whole component. **Method:** XB-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm , 5 μm) was used for gradient elution of 0.1% phosphoric acid aqueous solution-acetonitrile. The column temperature was 30 °C , the injection volume was 10 μL , the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹ , and the detection wavelengths were 240 , 316 , 230 , 334 nm. The contents of these five components in Yangjing Zhongyu Tang were determined by three correction methods , external standard method and regression equation method. At the same time , the fingerprint of Yangjing Zhongyu Tang were analyzed by total component analysis and similarity evaluation. **Result:** With ferulic acid as reference , the relative correction factor (*f*) of morroniside , loganin , paeoniflorin and verbascoside were 0.392 1 , 0.421 4 , 0.261 7 , 0.268 6 by multi-point correction method , and their *f* (slope correction method) were 0.385 4 , 0.419 4 , 0.255 9 , 0.274 0 , respectively. Twenty characteristic peaks of fingerprint were analyzed and the similarity was ≥ 0.999. There was no significant difference in the contents of these five components from Yangjing Zhongyu Tang determined by the quantitative assay of multi-components by single-marker (QAMS) correction method , the external standard method and the regression equation method. **Conclusion:** The comprehensive quality standard established by the total component analysis of fingerprint combined with various determination methods of existing components in the 2015 edition of *Chinese Pharmacopoeia* has been validated in famous classical formula of Yangjing Zhongyu Tang , which can provide ideas and methods for the quality control with quantitative determination and fingerprint of other famous classical formulas.

[Key words] famous classical formulas; Yangjing Zhongyu Tang; quantitative assay of multi-components by single-marker; correction factor; total component analysis; quality standards; fingerprint

养精种玉汤出自《傅青主女科·种子篇》,是清代傅氏用于治疗妇人不孕之血虚证的经典名方^[1]。方中熟地黄、当归补肾壮水,养血填精;山茱萸能固阴补精;白芍味酸,入肝、脾经,养血敛阴,补而不膩^[2-4]。经临床医家们多年的反复实践与锤炼,现已演绎成为治疗不孕症的基础方,广泛用于种子期,临床以汤剂的形式应用多年,其药效颇为肯定^[5-6]。但汤剂应用不大方便且不易携带,若能将其开发成适宜的现代中药制剂,将有利于该复方的推广与使用。

基于以上考虑,本实验拟对养精种玉汤的质量控制模式进行探讨,确立了以每味处方药材在 2015 年版《中国药典》中的有效成分为参照指标,同时创立养精种玉汤指纹图谱标准图谱的全成分质量控制模式。含测指标采用 3 种校正方法分别建立各成分之间的相对校正因子(*f*),再通过*f*计算各个成分的含量,实现一测多评;并同时采用外标法和回归方程法测定这 5 种成分的量,比较 3 种方法*f*所得计算值与实测值的差异,验证一测多评法的可行性和准确性,为更确切、更简单地评价养精种玉汤的质量提供多种含测分析模式,同时标准指纹图谱采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)进行相似度评价,得到标准指纹图谱。通过单成分的“点”到多成分的“线”以及指纹图谱全成分的

“面”,为养精种玉汤质量控制标准的建立奠定良好基础。

1 材料

1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), 1525 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), H1850R 型台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),MS205DU 型电子天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司),RE-52AA 型旋转蒸发器(上海雅荣生化设备仪器有限公司),EKUP-41-20T 型超纯水机(长沙市科临电子科技有限公司)。

熟地黄(产地河南,湖南三湘中药饮片有限公司,批号 2017110702),当归(产地甘肃,湖南中医药大学第一附属医院,批号 CK18060402),白芍(产地安徽,湖南中医药大学第一附属医院,批号 XZ18070302)和山茱萸(产地浙江,湖南中医药大学第一附属医院,批号 HQ18051701)均经湖南中医药大学石继连教授鉴定,符合 2015 年版《中国药典》(一部)的相关规定;阿魏酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110773-201012,纯度 99.6%),毛蕊花糖苷、芍药苷、莫诺苷、马钱苷对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为 Y21A9H59554, X12A8C33672, Z12O8B45504, P30M9F57637,纯度依次为 ≥ 98% , ≥ 98% , ≥ 97% , ≥ 98%) ,乙腈、

甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 HPLC 定量分析

2.1.1 色谱条件 采用 Welch Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相 0.1% 磷酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~40 min 5%~20% B;40~60 min 20%~45% B),柱温 30℃,进样量 10 μL,流速 1.0 mL·min⁻¹;检测波长分别为 240,316,230,334 nm。

2.1.2 对照品溶液的制备 分别精密称取莫诺苷、马钱苷、芍药苷对照品 13.3,7.1,18.2 mg 于 1 mL 量瓶中,阿魏酸对照品 5.1 mg 于 10 mL 量瓶中,毛蕊花糖苷对照品 5.6 mg 于 5 mL 量瓶中,加 80% 甲醇稀释并定容,得单一对照品贮备液,4℃ 冰箱保存。分别精密量取莫诺苷、马钱苷、芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷单一对照品贮备液 770,540,570,350,270 μL,置于同一 5 mL 量瓶中,加 80% 甲醇稀释并定容,摇匀,得混合对照品贮备液(莫诺苷、马钱苷、芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷质量浓度分别为 1.986 8,0.751 5,2.033 3,0.035 6,0.059 3 g·L⁻¹),分别精密量取该混合对照品贮备液(记为混合对照品溶液 L1)50,250,500,800 μL,置于 1 mL 量瓶中,加 80% 甲醇稀释并定容,摇匀,得系列混合对照品溶液(记为混合对照品溶液 L2,L3,L4,L5),4℃ 冰箱保存。

2.1.3 供试品溶液的制备 按处方比例称取养精种玉汤各药味适量,置于圆底烧瓶中,加 8 倍量水浸泡 30 min,回流提取 2 h,重复提取 2 次,过滤,合并滤液,减压浓缩至生药质量浓度为 0.5 g·mL⁻¹,得养精种玉汤浓缩液。精密量取该浓缩液 1 mL,加入乙醇 4 mL,超声(功率 300 W,频率 40 kHz)处理 20 min,于 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,取上层清液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

2.1.4 系统适用性及专属性考察 分别精密量取空白溶液、混合对照品溶液、供试品溶液各 10 μL,按 2.1.1 项下条件进样分析,结果发现莫诺苷、马钱苷、芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷与其相邻色谱峰的分离度均>1.5,各色谱峰中最小理论板数达到 45 920,且空白溶液中无干扰峰出现,说明该方法的系统适用性及专属性良好。

2.1.5 线性关系考察 分别精密量取系列混合对照品溶液 10 μL,按 2.1.1 项下条件进样分析,以峰面积积分值为纵坐标,对照品质量浓度为横坐标,进行线性回归,结果见表 1。

表 1 养精种玉汤中 5 种成分的线性关系考察

Table 1 Investigation of linear relationship of 5 components in Yangjing Zhongyu Tang

成分	回归方程	r	线性范围/g·L ⁻¹
莫诺苷	$Y = 17\ 871X + 293.40$	0.999 7	0.099 3~1.986 8
马钱苷	$Y = 19\ 444X + 66.40$	0.999 0	0.037 6~0.751 5
芍药苷	$Y = 11\ 866X + 95.27$	0.999 8	0.101 7~2.033 3
阿魏酸	$Y = 46\ 366X - 7.24$	0.999 7	0.001 8~0.035 6
毛蕊花糖苷	$Y = 12\ 702X + 4.64$	0.999 0	0.003 0~0.059 3

2.1.6 精密度试验 取同一混合对照品溶液适量,按 2.1.1 项下条件连续进样 6 次,记录各色谱峰峰面积,计算莫诺苷、马钱苷、芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷峰面积的 RSD 分别为 0.2%,0.1%,0.3%,0.5%,1.1%,表明仪器精密度良好。

2.1.7 重复性试验 按处方比例称取同一批养精种玉汤复方饮片 6 份,按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下条件测定,计算莫诺苷、马钱苷、芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷平均质量分数分别为 0.274 7%,0.101 8%,0.513 4%,0.012 9%,0.006 6%,RSD 分别为 1.4%,1.6%,0.3%,0.2%,0.3%,表明该方法重复性良好。

2.1.8 稳定性试验 取同一供试品溶液适量,分别于制备后 0,4,8,12,16,24 h 按 2.1.1 项下条件进样分析,计算莫诺苷、马钱苷、芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷峰面积的 RSD 分别为 0.9%,0.8%,2.8%,1.2%,2.4%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.9 加标回收率试验 精密吸取 2.1.3 项下养精种玉汤浓缩液 400 μL 与混合对照品溶液 L3 100 μL,置于 1 mL 量瓶中,按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,平行制备 6 份,按 2.1.1 项下条件测定,计算莫诺苷、马钱苷、芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷平均加样回收率分别为 101.41%,96.50%,97.88%,100.16%,99.47%,RSD 分别为 0.2%,0.1%,1.4%,1.4%,1.0%,表明该方法具有良好的回收率。

2.1.10 耐用性试验 分别考察流动相各梯度点比例变化±3%,磷酸水浓度变化±0.05%,柱温变化±5℃,检测波长变化±2 nm,流速变化±10%,并采用 4 根不同色谱柱[XB-C₁₈(HS),AQ-C₁₈,Apollo C₁₈,XB-C₁₈]进行测定,记录仪器色谱行为变化。检测同一批养精种玉汤样品中 5 种成分的含量及其 RSD,考察其分离度、理论板数。结果发现各条件下 5 个指标成分质量分数的 RSD 均<3.0%,说明分离效果较好。提示养精种玉汤中 5 种成分

测定条件较宽,耐用性良好。

2.2 相对校正因子 f 的计算

2.2.1 多点校正法^[7-8] 以多个质量浓度点计算所得的 f 取平均值作为定量用 f 。 f 计算公式为 $f = (C_s \times A_k) / (C_k \times A_s)$, 待测成分质量浓度计算公式为 $C_k' = (C_s \times A_k') / (f \times A_s)$, 式中 C_s 为参照物质量浓度, A_s 为参照物色谱峰峰面积, C_k 为其他对照组分质量浓度, A_k 为其他对照组分色谱峰峰面积, C_k' 为待测组分质量浓度, A_k' 为待测组分色谱峰峰面积。应用此法需先获得 1 个 C_s 和 A_s 。见表 2。

表 2 基于多点校正法计算养精种玉汤中 5 种成分分别作为参照物的 f ($n=7$)

Table 2 Values of f of 5 components in Yangjing Zhongyu Tang as reference substances based on multi-point correction method ($n=7$)

参照物	成分	$f(\bar{x} \pm s)$	RSD/%
莫诺苷	马钱苷	1.074 9 $\pm$ 0.025 0	2.3
	芍药苷	0.667 4 $\pm$ 0.011 1	1.7
	阿魏酸	2.551 5 $\pm$ 0.063 2	2.5
	毛蕊花糖苷	0.685 1 $\pm$ 0.013 1	1.9
芍药苷	莫诺苷	1.498 8 $\pm$ 0.024 8	1.7
	马钱苷	1.610 6 $\pm$ 0.030 5	1.9
	阿魏酸	3.823 3 $\pm$ 0.082 4	2.2
	毛蕊花糖苷	1.026 9 $\pm$ 0.029 5	2.9
毛蕊花糖苷	莫诺苷	1.460 1 $\pm$ 0.028 0	1.9
	马钱苷	1.569 2 $\pm$ 0.037 7	2.4
	芍药苷	0.974 5 $\pm$ 0.028 3	2.9
	阿魏酸	3.724 8 $\pm$ 0.097 2	2.6
马钱苷	莫诺苷	0.930 8 $\pm$ 0.021 7	2.3
	芍药苷	0.621 1 $\pm$ 0.011 7	1.9
	阿魏酸	2.374 2 $\pm$ 0.051 4	2.2
	毛蕊花糖苷	0.637 6 $\pm$ 0.015 5	2.4
阿魏酸	莫诺苷	0.392 1 $\pm$ 0.009 5	2.4
	马钱苷	0.421 4 $\pm$ 0.009 2	2.2
	芍药苷	0.261 7 $\pm$ 0.005 7	2.2
	毛蕊花糖苷	0.268 6 $\pm$ 0.006 8	2.6

2.2.2 斜率校正法 在标准曲线 $Y = aX + b$ 中, $X = (Y - b) / a = Y/a - b/a$, 其中 b 通常由误差引起, 当 $a/b > 100$ 时 b/a 可忽略不计, 此时可直接以 $X = Y/a$ 计算。再以 X 与 Y 的斜率之比 a 计算 $f(f = a_k / a_s)$ 。 $C_k' = A_k' / (a_s \times f)$, 式中 a_s 为参照物斜率, a_k 为其他对照组分斜率。应用此方法需先得到其他成分相对于 1 个参照物的 f , 见表 3。

表 3 基于斜率校正法计算养精种玉汤中 5 种成分分别作为参照物的 f ($n=2$)

Table 3 Values of f of 5 components in Yangjing Zhongyu Tang as reference substances based on slope correction method ($n=2$)

成分	f				
	相对于莫诺苷	相对于马钱苷	相对于芍药苷	相对于阿魏酸	相对于毛蕊花糖苷
莫诺苷	1.000 0	0.919 1	1.506 1	0.385 4	1.406 9
马钱苷	1.088 0	1.000 0	1.638 6	0.419 4	1.530 8
芍药苷	0.664 0	0.610 3	1.000 0	0.255 9	0.934 2
阿魏酸	2.594 5	2.384 6	3.907 5	1.000 0	3.650 3
毛蕊花糖苷	0.710 8	0.653 3	1.070 5	0.274 0	1.000 0

2.2.3 定量因子法 在公式 $C_k' = A_k' / (a_s \times f)$ 中, 当实验室、仪器、色谱条件相同时, 由于 a_s 基本一致, 且 f 是固定值, 因此可以先以 $a_k = a_s \times f$ 计算出定量因子 a_k , 直接以待测样品峰面积 A_k' 快速计算其含量 ($C_k' = A_k' / a_k$), 可见各标准曲线中斜率即为其定量因子。结果莫诺苷、马钱苷、芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷的定量因子分别为 17 871, 19 444, 11 866, 46 366, 12 702。

2.3 f 的重复性考察 考察了不同的实验室的 2 套色谱系统 (Agilent 1260 型, Waters 1525 型) 及不同色谱柱 [XB-C₁₈, AQ-C₁₈, Apollo C₁₈, XB-C₁₈ (HS)] 对各 f 的影响, 结果其他成分相对于莫诺苷 f 的 RSD 均 $< 2.4\%$, 相对于马钱苷 f 的 RSD 均 $< 2.4\%$, 相对于芍药苷 f 的 RSD 均 $< 2.7\%$, 相对于阿魏酸 f 的 RSD 均 $< 2.2\%$, 相对于毛蕊花糖苷 f 的 RSD 均 $< 2.8\%$ 。表明 f 在不同实验室、不同色谱系统和不同色谱柱下具有良好的重复性。

2.4 待测组分色谱峰的定位 利用相对保留时间进行定位, 即以各待测组分色谱峰与阿魏酸色谱峰的相对保留时间来确定。以阿魏酸为基准峰, 计算不同仪器和不同色谱柱下莫诺苷、马钱苷、芍药苷、毛蕊花糖苷相对保留时间, 见表 4。

由表 4 可知, 不同仪器和不同色谱柱条件下, 各成分的保留时间差异较大, 但各成分相对保留时间的 RSD 均 $< 3.0\%$, 说明可进行简易的定位分析。

2.5 一测多评法与外标法、回归方程法测定结果的比较 分别精密量取混合对照品溶液和 3 批供试品溶液各 10 μ L, 按 2.1.1 项下色谱条件进样分析 2 次, 分别用外标法、回归方程法及 3 种一测多评法计算各指标成分的含量, 见表 5。将 5 种方法定量结果

表 4 不同仪器和不同色谱柱条件下各指标成分的保留时间及相对保留时间(以阿魏酸为参照)($\bar{x} \pm s$ $n=2$)

Table 4 Retention time and relative retention time of each index component under different instruments and different columns with ferulic acid as reference($\bar{x} \pm s$ $n=2$)

仪器	色谱柱	保留时间/min				
		莫诺苷	马钱苷	芍药苷	阿魏酸	毛蕊花糖苷
Agilent 1260	XB-C ₁₈	17.371 ± 0.002	25.061 ± 0.009	29.806 ± 0.008	35.554 ± 0.017	40.063 ± 0.004
	AQ-C ₁₈	17.384 ± 0.004	25.074 ± 0.013	29.818 ± 0.023	35.545 ± 0.026	40.066 ± 0.035
	Apollo C ₁₈	19.949 ± 0.016	28.271 ± 0.067	32.881 ± 0.014	38.855 ± 0.225	43.352 ± 0.509
	XB-C ₁₈ (HS)	17.479 ± 0.002	25.189 ± 0.018	29.954 ± 0.012	35.755 ± 0.143	40.143 ± 0.037
Waters 1525	XB-C ₁₈	20.419 ± 0.155	28.871 ± 0.121	33.580 ± 0.148	39.994 ± 0.041	44.553 ± 0.079
	Apollo C ₁₈	20.667 ± 0.136	29.103 ± 0.074	33.963 ± 0.093	41.036 ± 0.092	44.270 ± 0.563
仪器	色谱柱	相对保留时间				
		莫诺苷	马钱苷	芍药苷	阿魏酸	毛蕊花糖苷
Agilent 1260	XB-C ₁₈	0.488 6 ± 0.000 3	0.704 9 ± 0.000 6	0.838 3 ± 0.000 6	1.126 8 ± 0.000 4	1.126 8 ± 0.000 4
	AQ-C ₁₈	0.489 1 ± 0.000 2	0.705 4 ± 0.000 1	0.838 9 ± 0.000 04	1.127 2 ± 0.000 2	1.127 2 ± 0.000 2
	Apollo C ₁₈	0.513 4 ± 0.002 6	0.727 6 ± 0.005 9	0.846 3 ± 0.004 5	1.115 7 ± 0.006 6	1.115 7 ± 0.006 6
	XB-C ₁₈ (HS)	0.488 9 ± 0.001 9	0.704 5 ± 0.003 3	0.837 8 ± 0.003 0	1.122 7 ± 0.005 5	1.122 7 ± 0.005 5
Waters 1525	XB-C ₁₈	0.510 5 ± 0.003 3	0.721 9 ± 0.002 3	0.839 6 ± 0.002 8	1.114 0 ± 0.003 1	1.114 0 ± 0.003 1
	Apollo C ₁₈	0.503 6 ± 0.002 2	0.709 2 ± 0.000 2	0.827 6 ± 0.000 4	1.078 8 ± 0.016 1	1.078 8 ± 0.016 1

分别经 Pearson 相关系数分析,结果 5 种方法之间以及 5 种方法与其平均值之间的相关系数均 > 0.999 9,说明 5 种方法得到的结果相似性极

高。且 5 种方法定量结果之间的 RSD 均 < 3.0%,说明一测多评法在养精种玉汤的多指标成分质量评价中准确可行。

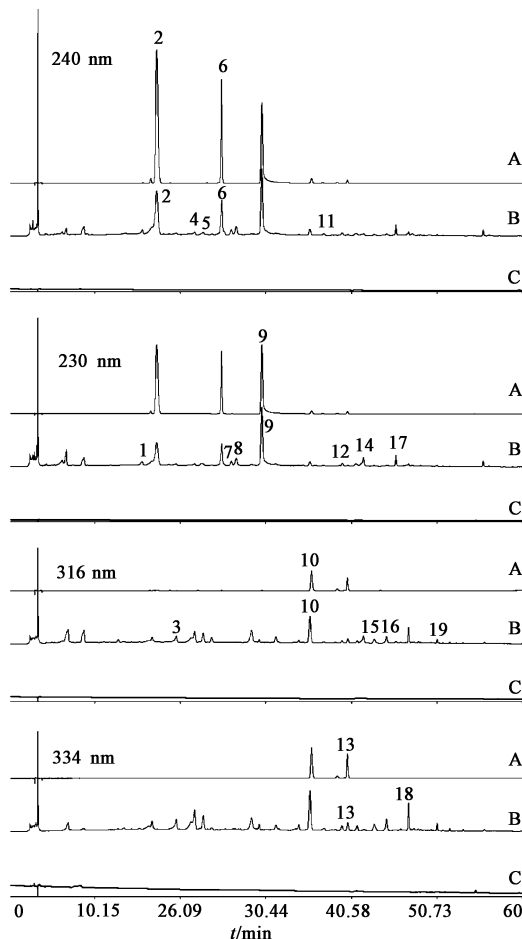
表 5 养精种玉汤中 5 种成分不同定量检测方法的比较($\bar{x} \pm s$ $n=2$)

Table 5 Comparison of different quantitative methods for determination of 5 components in Yangjing Zhongyu Tang($\bar{x} \pm s$ $n=2$)

批次	定量方法	各成分的质量分数/%				
		莫诺苷	马钱苷	芍药苷	阿魏酸	毛蕊花糖苷
1	外标法	0.283 5 ± 0.002 1	0.101 7 ± 0.000 03	0.508 8 ± 0.002 3	0.012 7 ± 0.000 02	0.006 7 ± 0.000 02
	回归方程法	0.277 6 ± 0.002 2	0.102 5 ± 0.000 03	0.513 5 ± 0.002 4	0.012 9 ± 0.000 02	0.006 6 ± 0.000 02
	多点校正法	0.289 0 ± 0.002 2	0.105 4 ± 0.000 03	0.510 1 ± 0.002 3	0.012 7 ± 0.000 02	0.007 1 ± 0.000 02
	斜率校正法	0.292 0 ± 0.002 2	0.105 4 ± 0.000 03	0.519 3 ± 0.002 4	0.012 7 ± 0.000 02	0.006 9 ± 0.000 02
	定量因子法	0.294 0 ± 0.002 2	0.105 9 ± 0.000 03	0.521 5 ± 0.002 4	0.012 7 ± 0.000 02	0.006 9 ± 0.000 02
2	外标法	0.281 9 ± 0.003 5	0.099 8 ± 0.002 8	0.508 0 ± 0.000 8	0.012 7 ± 0.000 02	0.006 7 ± 0.000 02
	回归方程法	0.275 9 ± 0.003 6	0.100 5 ± 0.002 9	0.512 8 ± 0.000 8	0.012 9 ± 0.000 02	0.006 6 ± 0.000 02
	多点校正法	0.287 4 ± 0.003 5	0.103 4 ± 0.002 9	0.509 4 ± 0.000 8	0.012 7 ± 0.000 02	0.007 1 ± 0.000 02
	斜率校正法	0.290 4 ± 0.003 6	0.103 4 ± 0.002 9	0.518 6 ± 0.000 8	0.012 7 ± 0.000 02	0.006 9 ± 0.000 02
	定量因子法	0.292 4 ± 0.003 6	0.103 9 ± 0.002 9	0.520 8 ± 0.000 8	0.012 7 ± 0.000 02	0.006 9 ± 0.000 02
3	外标法	0.276 6 ± 0.001 3	0.101 7 ± 0.000 1	0.509 0 ± 0.001 6	0.012 7 ± 0.000 04	0.006 7 ± 0.000 03
	回归方程法	0.270 4 ± 0.001 3	0.102 5 ± 0.000 1	0.513 8 ± 0.001 6	0.012 9 ± 0.000 04	0.006 6 ± 0.000 03
	多点校正法	0.282 0 ± 0.001 3	0.105 4 ± 0.000 1	0.510 3 ± 0.001 6	0.012 7 ± 0.000 04	0.007 1 ± 0.000 03
	斜率校正法	0.285 0 ± 0.001 3	0.102 5 ± 0.000 1	0.519 6 ± 0.001 6	0.012 7 ± 0.000 04	0.006 9 ± 0.000 03
	定量因子法	0.286 9 ± 0.001 3	0.105 9 ± 0.000 1	0.521 8 ± 0.001 6	0.012 7 ± 0.000 04	0.007 0 ± 0.000 03

2.6 指纹图谱

2.6.1 特征图谱匹配 对养精种玉汤的特征图谱与对照品的特征图谱进行匹配,满足各批样品共有峰对应的化学成分,标记养精种玉汤 20 个化合物成分,以阿魏酸(10 号峰)为参照的各色谱峰(1~20 号)相对保留时间分别为 0.474,0.490,0.555,0.616,0.645,0.707,0.739,0.755,0.840,1.000,1.046,1.108,1.127,1.179,1.214,1.255,1.286,1.329,1.423,1.577,各批样品之间色谱峰相对保留时间无显著差异,特征图谱见图 1。



A. 混合对照品; B. 供试品; C. 空白样品; 2. 莫诺昔; 6. 马钱苷; 9. 芍药苷; 10. 阿魏酸; 13. 毛蕊花糖苷

图 1 养精种玉汤的 HPLC 特征谱

Fig. 1 HPLC characteristic chromatograms of Yangjing Zhongyu Tang

2.6.2 指纹图谱相似度评价 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)软件进行相似度分析,将 AIA 格式数据导入软件,进行色谱峰匹配,确定 20 个共有峰作为养精种玉汤指纹图谱的特征峰,以 S1 为参照图谱(S1~S6 为同一养精种玉汤浓缩液平行制备的 6 份供试品溶液),以平均数法

生成对照指纹图谱,相似度结果见表 6,相似度图谱见图 2。

表 6 养精种玉汤 6 次分析的指纹图谱相似度比较

Table 6 Comparison of fingerprint similarity of six analyses of Yangjing Zhongyu Tang

样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6
S1	1.000	1.000	1.000	0.999	0.999	1.000
S2	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999	1.000
S3	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999	0.999
S4	0.999	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
S5	0.999	0.999	0.999	1.000	1.000	1.000
S6	1.000	1.000	0.999	1.000	1.000	1.000

注:与对照指纹图谱的相似度均为 1.000。

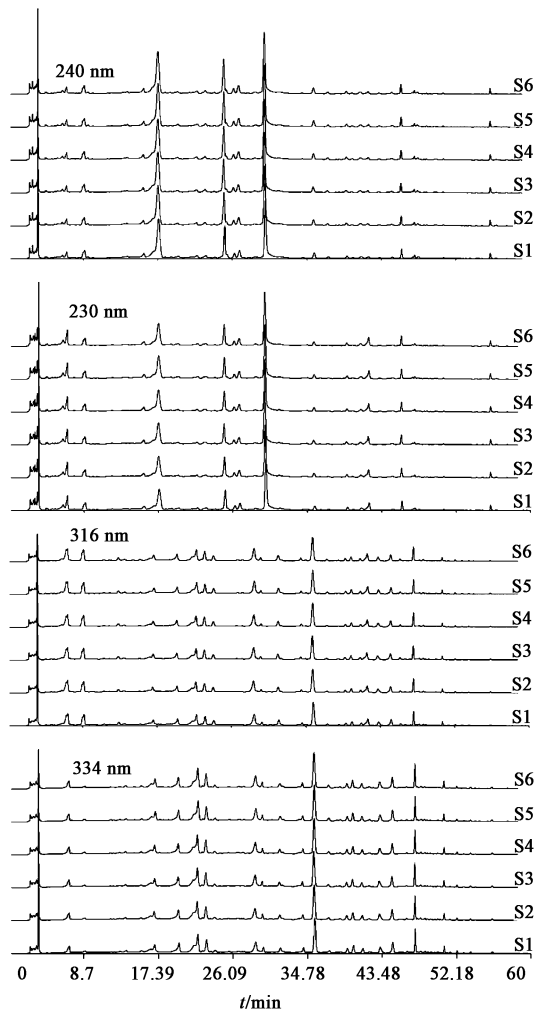


图 2 养精种玉汤在不同波长下的相似度分析指纹谱

Fig. 2 Fingerprint of similarity analysis of Yangjing Zhongyu Tang at different wavelengths

3 讨论

3.1 含量检测一测多评法 选择养精种玉汤中

每味处方药材在 2015 年版《中国药典》中的质量评价成分为参照指标,建立了这 5 种化合物(莫诺苷、马钱苷、芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷)在 4 个波长下的含量测定方法,并进行了系统的方法学考察。结果发现该方法便捷高效、结果准确可靠,具有良好的重复性和稳定性。对于相对校正因子 f 的计算,研究中多采用多点校正法处理后求平均值,但若有个别点有较大偏差,便会导致计算结果出现较大误差。而采用标准曲线斜率之比计算 f ,即使标准曲线所取的质量浓度点测定值出现了偏差,对标准曲线斜率的影响也不大,此外,无需逐个浓度计算 f 再求平均值,直接以标准曲线斜率计算,计算结果与多点校正无显著差异,却相对于多点校正法更加快捷且更加合理。定量因子法是在斜率校正法基础上计算所得,故其计算结果与斜率校正法一致,但由于不同仪器、不同色谱条件的定量因子不同,因此定量因子在每台仪器需单独建立。当在同一仪器、同一色谱条件下,尤其在药厂或药检所大量样品短期内检验时,以定量因子法计算成分含量最为快捷有效。本实验所建立的 HPLC 一测多评法具有较好的普适性,可根据不同实验情况选择不同的对照品作为参照,可在药材对照品紧缺的条件下实现定性定量分析,其中尤以价廉的阿魏酸为参照控制成本为佳。

3.2 标准指纹图谱法^[9-10] 所建立的指纹图谱采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)匹配标准指纹图谱共 20 个共有特征峰,以平均数法生成对照指纹图谱,结果相似度评价结果良好,所建立的养精种玉汤标准指纹图谱能综合全面地反映该复方所含化学成分群及其丰富的指纹信息,进而可对经典名方养精种玉汤及其制剂进行整体质量描述和评价。

3.3 “点-线-面”质量标准 本研究所建立的指纹图谱全成分分析结合 2015 年版《中国药典》中质量评价成分的多种含量测定方法,通过单一成分的“点”到多成分的“线”以及指纹图谱全成分的“面”

所建立的“点-线-面”质量标准体系在养精种玉汤中得到了验证,可为经典名方定量测定和指纹图谱质量控制提供较好的思路和方法。随着中药质量控制研究的深入以及物质基准研究的不断完善,该“点-线-面”质量标准体系可更加全面地反映中药的复杂性和整体性,这也非常符合中医传统理论的整体观。

[参考文献]

- [1] 傅山. 傅青主女科[M]. 太原: 山西人民出版社, 1992: 4617.
- [2] 王晓婉, 马文侠. 《傅青主女科》不孕症论治规律浅析[J]. 中医临床研究, 2015, 7(26): 50-51.
- [3] 王欣, 吴维城. 养精种玉汤治疗女性肾亏血虚型不孕的疗效机制分析[J]. 中医临床研究, 2017, 9(11): 122-123.
- [4] 侯红霞, 王金亮, 许阿妮. 王金亮应用《傅青主女科》方验案举隅[J]. 中医药临床杂志, 2017, 29(11): 1838-1839.
- [5] 刘丽琴, 于婷儿, 陈莉, 等. 养精种玉汤辅以体外受精-胚胎移植对子宫内膜容受性的影响[J]. 中医学报, 2017, 32(4): 623-626.
- [6] 丁涛, 李晶, 马红霞. 养精种玉汤对过多雄激素诱导卵泡胰岛素抵抗的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(16): 163-166.
- [7] 陈香伶, 杜洪志, 何席呈, 等. 一测多评法测定贵州产切面红色土茯苓中 3 种活性成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(15): 93-99.
- [8] 刘宏, 雷露静, 白玉琴, 等. 一测多评法同时测定蒙药三子散中 7 种指标成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(18): 58-63.
- [9] 冀艳花, 高晗, 常云凤, 等. 白鲜皮饮片-标准汤剂-配方颗粒的 HPLC 指纹图谱相关性分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(18): 81-87.
- [10] 邹静, 李琳, 任青玲, 等. 加味二妙颗粒剂与传统汤剂指纹图谱及指标成分含量的比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(12): 14-20.

[责任编辑 刘德文]