

健脾化痰方的HPLC指纹图谱建立及8种成分含量测定^Δ

陈小凯^{1*},李 勇^{2#},谭 为^{3,4},余榕键^{3,4},黄建江⁵,刘芷欣²,林举择^{3,4},王昌俊^{3,4}[1.南方医科大学附属广东省人民医院(广东省医学科学院)药学部,广州 510080;2.广东药科大学广东省药物新剂型重点实验室和广东省局部精准药物递药制剂工程技术研究中心,广州 510006;3.南方医科大学附属广东省人民医院(广东省医学科学院)中医科,广州 510080;4.广东省老年医学研究所中医科,广州 510080;5.南方医科大学附属广东省人民医院(广东省医学科学院)病理科,广州 510080]

中图分类号 R927.1;R284.1

文献标志码 A

文章编号 1001-0408(2023)23-2874-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.23.10



摘要 目的 建立健脾化痰方的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并测定方中8种成分的含量。方法 采用Thermo Hypersil Gold C₁₈色谱柱,以甲醇-0.05%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱,流速为1.0 mL/min,柱温为30℃,进样量为5 μL,苦参碱的检测波长为211 nm,其他成分的检测波长为283 nm。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》对获得的10批健脾化痰方HPLC指纹图谱进行相似度评价。采用HPLC法测定样品中绿原酸、香草酸、对香豆酸、阿魏酸、橙皮苷、槲皮素、佛手柑内酯、苦参碱8种成分的含量。结果 建立了健脾化痰方的HPLC指纹图谱,共标定出27个共有峰,指认了8个化学成分。10批样品与对照指纹图谱的相似度为0.942~0.999。精密度、重复性、稳定性试验的RSD均小于3%(n=6)。绿原酸、香草酸、对香豆酸、阿魏酸、橙皮苷、槲皮素、佛手柑内酯、苦参碱的平均加样回收率分别为99.48%、101.32%、101.18%、100.79%、101.12%、99.19%、99.81%、102.46%,RSD分别为1.34%、0.93%、1.90%、1.84%、0.54%、1.53%、1.33%、1.01%(n=6);含量分别为0.021~0.061、0.025~0.034、0.116~0.295、0.006~0.062、0.014~0.053、0.017~0.026、0.014~0.027、14.05~24.11 mg/g。结论 所建立的指纹图谱和含量测定方法可为健脾化痰方的质量控制以及后续的制剂开发提供参考依据。

关键词 健脾化痰方;指纹图谱;含量测定;高效液相色谱法;质量标准

Establishment of HPLC fingerprint and content determination of 8 components in Jianpi huayu decoction

CHEN Xiaokai¹, LI Yong², TAN Wei^{3,4}, YU Rongjian^{3,4}, HUANG Jianjiang⁵, LIU Zhixin², LIN Junze^{3,4}, WANG Changjun^{3,4}[1. Dept. of Pharmacy, Guangdong Provincial People's Hospital (Guangdong Academy of Medical Sciences), Southern Medical University, Guangzhou 510080, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Advanced Drug Delivery and Guangdong Provincial Engineering Center of Topical Precise Drug Delivery System, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 3. Dept. of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Provincial People's Hospital (Guangdong Academy of Medical Sciences), Southern Medical University, Guangzhou 510080, China; 4. Dept. of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Institute of Geriatrics, Guangzhou 510080, China; 5. Dept. of Pathology, Guangdong Provincial People's Hospital (Guangdong Academy of Medical Sciences), Southern Medical University, Guangzhou 510080, China]

ABSTRACT **OBJECTIVE** To establish the HPLC fingerprint of Jianpi huayu decoction, and to determine the contents of 8 components. **METHODS** Thermo Hypersil Gold C₁₈ column was used with mobile phase consisted of methanol-0.05% phosphoric acid aqueous solution (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was 30℃, the injection volume was 5 μL. The detection wavelength of matrine was 211 nm, and the other components' detection wavelength was 283 nm. The similarity evaluation of HPLC fingerprints for 10 batches of Jianpi huayu decoction was performed by using the *Similarity Evaluation System of Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine* (2012 edition). The contents of chlorogenic acid, vanillic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, hesperidin, quercetin, bergapten and matrine in the samples were determined by HPLC. **RESULTS** HPLC fingerprint of Jianpi huayu decoction was established. A total of 27 common peaks were identified, and 8 components were identified. The similarity between 10 batches of samples and the control map

Δ 基金项目 广东省基础与应用基础研究基金项目(No. 2022A1515011260);广东省中医药局科研项目(No.20221004)

* 第一作者 主管中药师,硕士。研究方向:中药制剂研发。
E-mail:chenxiaokay2008@163.com

通信作者 助理研究员,硕士。研究方向:中药新制剂研发。电话:020-39352508。E-mail:ly598@126.com

quercetin, bergapten and matrine in the samples were determined by HPLC. **RESULTS** HPLC fingerprint of Jianpi huayu decoction was established. A total of 27 common peaks were identified, and 8 components were identified. The similarity between 10 batches of samples and the control map

ranged from 0.942-0.999. RSDs of precision, repeatability and stability tests were less than 3% ($n=6$). The average recoveries of chlorogenic acid, vanillic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, hesperidin, quercetin, bergapten and matrine were 99.48%, 101.32%, 101.18%, 100.79%, 101.12%, 99.19%, 99.81% and 102.46%, respectively; RSDs were 1.34%, 0.93%, 1.90%, 1.84%, 0.54%, 1.53%, 1.33% and 1.01%, respectively ($n=6$). The contents were 0.021-0.061, 0.025-0.034, 0.116-0.295, 0.006-0.062, 0.014-0.053, 0.017-0.026, 0.014-0.027 and 14.05-24.11 mg/g, respectively. **CONCLUSIONS** The established fingerprint and content determination method can provide a reference for the quality control and subsequent preparation development for Jianpi huayu decoction.

KEYWORDS Jianpi huayu decoction; fingerprint; content determination; HPLC; quality standard

健脾化痰方是由名老中医、上海中医药大学钱伯文教授创制,并结合广东省人民医院中医内科王昌俊教授多年临床经验和实验研究进一步调整而成,用于肝癌术后治疗的经验方剂。该方由莪术、苦参、白花蛇舌草、茯苓、白术、佛手6味药材组成,具有化痰散结、健脾理气、清热解毒化湿的功效。除了肝癌,该方还常用于胃癌、大肠癌等消化道肿瘤患者的治疗,症见脘腹疼痛、胁下痞块、口淡乏味、食欲不振、体倦乏力等。基础研究发现,健脾化痰方能有效抑制肝癌细胞的增殖,并预防手术后肝癌的复发和转移^[1]。临床研究表明,该方可明显提高患者的生活质量指数,避免肝功能恶化,改善血清肝纤维化指标,提高患者术后1、3、5年的生存率,尤其对肝癌患者术后早期生活质量有明显改善,如能明显缓解术后便秘、腹泻等症状^[2]。

鉴于中药复方制剂有效成分的多样性及复杂性,如何以更全面的方式表述制剂中的化学成分种类和数量,以确保制剂质量的相对一致,是学者们研究的重点问题。目前的研究认为,指纹图谱是一种灵敏而专一性强的质量控制方法,广泛用于中药制剂的质量控制^[3]。当前,有关健脾化痰方质量控制的研究仍显薄弱,基于此,本研究采用高效液相色谱(HPLC)法建立了该方的指纹图谱,并测定了方中绿原酸、香草酸、对香豆酸、阿魏酸、橙皮苷、槲皮素、佛手柑内酯、苦参碱的含量,从定性和定量两方面为该方的质量标准奠定基础,同时为该方后续的制剂研究提供质量标准参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究的主要仪器有 Dionex UltiMate 3000 型 HPLC 仪[配 DGP-3600SD 型泵、TCC-3000RS 型柱温箱、二极管阵列检测器、Chromeleon 色谱工作站(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)],CP225D 型十万分之一电子天平、BS224S 型万分之一电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)等。

1.2 主要药材与试剂

健脾化痰方中各单味饮片的来源信息见表1,经广东省人民医院中医内科王昌俊教授鉴定均为真品,且符合2020年版《中国药典》相关项下规定,10批健脾化痰方样品由上述饮片随机组合而成。对照品对香豆酸(批号 DSTDD005701,纯度 $\geq 98\%$)、佛手柑内酯(批号 OK20221215F,纯度 $\geq 98\%$)、橙皮苷(批号 DST220704-038,纯度 $\geq 98\%$)、阿魏酸(批号 DSTDF008102,纯度 $\geq 98\%$)、槲皮素(批号 DSTDH002802,纯度 $\geq 98\%$)、苦参碱(批号 OK20221212K,纯度 $\geq 98\%$)均购自成都德思特生物技术有限公司;绿原酸对照品(批号 Y20A11K111541,纯度 $\geq 98\%$)购自上海源叶生物科技有限公司;香草酸对照品(批号 BCBS1036V,纯度 $\geq 98\%$)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;对照药材莪术(批号 120973-202205)、白花蛇舌草(批号 121183-201605)、苦参(批号 121019-201708)、白术(批号 120925-202114)、茯苓(批号 121117-201910)、佛手(批号 120933-201706)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇为色谱纯(美国 BCR 有限公司),其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

表1 10批健脾化痰方中各单味饮片的来源信息

编号	莪术		白花蛇舌草		苦参		白术		茯苓		佛手	
	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号
S1	广西	221001	湖南	220801	广西	220801	浙江	221102	安徽	221202	广东	220901
S2	广西	220601	湖南	221102	广西	220601	福建	220901	安徽	230102	广西	2112004
S3	四川	23010102	湖南	221101	河北	2212004	安徽	22120201	湖南	230402921	广东	230101
S4	广西	221201	江西	22122512	广西	HX22F01	浙江	HX23R02	浙江	221201	广东	220816
S5	广西	230101	湖南	221001	山西	230500661	浙江	230460291	湖北	YP22G01	四川	230401031
S6	广西	230303831	江苏	230408010	山西	230303981	湖南	230460071	安徽	YP22H01	浙江	YPB3D0001
S7	江西	YP22L01	江西	230401451	河南	2021061507	安徽	230301	安徽	230301	广东	2302164
S8	云南	201201	广东	YP22J01	内蒙古	220201	浙江	YP23C01	云南	230405	重庆	230301
S9	广西	220501	湖南	221201	广西	221201	云南	230501	安徽	230201	广东	220801
S10	福建	23012944	河南	230101	广西	YP22J01	安徽	20230212	安徽	GX221209	四川	221202701

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Thermo Hypersil Gold C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇(A)-0.05% 磷酸溶液(B), 梯度洗脱 (0~10 min, 5%A; 10~15 min, 5%A→12%A; 15~30 min, 12%A→29%A; 30~41 min, 29%A; 41~80 min, 29%A→88%A; 80~90 min, 88%A; 90~92 min, 88%A→5%A; 92~102 min, 5%A); 苦参碱的检测波长为 211 nm, 其他成分的检测波长为 283 nm; 流速为 1.0 mL/min; 柱温为 30 °C; 进样量为 5 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 健脾化痰方样品浓缩液的制备

健脾化痰方由白术 12 g、莪术 12 g、佛手 12 g、茯苓 20 g、苦参 20 g、白花蛇舌草 20 g 组成。按组方配比分别称取白术、莪术、佛手饮片各 6 g, 茯苓、苦参、白花蛇舌草饮片各 10 g。先用挥发油提取器提取白术、莪术、佛手的挥发油, 备用; 其药渣与上述称好的茯苓、苦参、白花蛇舌草混合, 以 1:10 的料液比加水浸泡 30 min, 提取 3 次, 每次 1.5 h, 合并提取液, 滤过、减压浓缩, 再与挥发油混合后定容至 100 mL 容量瓶中, 得健脾化痰方样品浓缩液。

2.2.2 健脾化痰方供试品溶液的制备

精密吸取健脾化痰方样品浓缩液 1.5 mL, 置 2 mL 容量瓶中, 以水定容, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

2.2.3 对照品溶液的制备

分别精密称取绿原酸、香草酸、对香豆酸、阿魏酸、橙皮苷、槲皮素、佛手柑内酯、苦参碱对照品 0.820 0、1.980 0、9.990 0、10.040 0、1.166 0、10.040 0、9.980 0、10.130 0 mg, 加甲醇溶解并定容至 10 mL 容量瓶中, 得上述 8 种成分质量浓度依次为 0.082 0、0.198 0、0.999 0、1.004 0、0.116 6、1.004 0、0.998 0、1.013 0 mg/mL 的单一对照品溶液; 分别精密移取绿原酸、香草酸、对香豆酸、阿魏酸、橙皮苷、槲皮素、佛手柑内酯单一对照品溶液适量, 用甲醇稀释并定容至同一 5 mL 容量瓶中, 得上述 7 种成分质量浓度分别为 0.020 5、0.039 6、0.059 9、0.020 1、0.023 3、0.020 1、0.020 0 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.4 对照药材溶液的制备

按处方比例, 分别称取白花蛇舌草、茯苓、苦参对照药材适量, 分别以 1:10 的料液比加水浸泡 30 min, 提取 3 次, 每次 1.5 h, 合并提取液, 滤过、减压浓缩, 并定容至 100 mL 容量瓶中, 即得对照药材浓缩液。分别精密移取上述 3 种对照药材浓缩液 1.0 mL 至 2 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得白花蛇舌草、茯苓、苦参的对照药材溶液。

按处方比例, 分别称取白术、莪术、佛手对照药材适量, 先用挥发油提取器提取挥发油, 备用; 药渣再分别以

1:10 的料液比加水浸泡 30 min, 提取 3 次, 每次 1.5 h, 合并提取液, 滤过、减压浓缩; 将所得挥发油与相应对照药材的浓缩液混合, 并定容至 100 mL 容量瓶中, 即得对照药材浓缩液。分别精密移取上述 3 种对照药材浓缩液 1.0 mL 至 2 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得白术、莪术、佛手的对照药材溶液。

2.2.5 阴性供试品溶液的制备

按处方比例和“2.2.1”“2.2.2”项下方法, 分别制备缺白花蛇舌草及白术(不含绿原酸和香草酸), 缺白花蛇舌草、佛手及莪术(不含对香豆酸和阿魏酸), 缺佛手(不含橙皮苷), 缺白花蛇舌草、佛手及苦参(不含槲皮素和佛手柑内酯), 缺苦参(不含苦参碱)的阴性供试品溶液。

2.3 指纹图谱研究

2.3.1 精密度试验

取健脾化痰方样品浓缩液(编号 S1), 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 以 12 号对香豆酸色谱峰为参照峰(S), 计算得到各共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.01%~0.70% (n=6), 相对峰面积的 RSD 为 0.21%~2.26% (n=6), 表明该方法精密度良好。

2.3.2 重复性试验

取健脾化痰方样品浓缩液(编号 S1), 按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 以 12 号对香豆酸色谱峰为参照峰(S), 计算得到各共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.01%~0.29% (n=6), 相对峰面积的 RSD 为 0.33%~2.11% (n=6), 表明该方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验

取健脾化痰方样品浓缩液(编号 S1), 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别于制备后 0、3、6、9、12、24 h 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 以 12 号对香豆酸色谱峰为参照峰(S), 计算得到各共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.01%~0.30% (n=6), 相对峰面积的 RSD 为 0.20%~2.41% (n=6), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性较好。

2.3.4 指纹图谱的建立及相似度评价

取 10 批健脾化痰方供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 将数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》, 以编号 S1 样品的色谱图为参照图谱, 采用平均数法, 时间窗设为 0.2 min, 进行多点校正、全谱峰匹配, 建立样品(编号 S1~S10)叠加指纹图谱及对照指纹图谱(R), 共确定了 27 个共有峰, 详见图 1; 通过与混合对照品溶液色谱图(图 2)比对, 指出 7 个成分, 分别为 8 号绿原酸、9 号香草酸、12 号对香豆酸、15 号阿魏酸、19 号橙皮苷、22 号槲皮素、24 号佛手柑内酯。以《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件

(2012版)》计算相似度,可得10批样品与对照指纹图谱的相似度为0.942~0.999。此外,在211 nm检测波长下,通过苦参碱对照品溶液色谱图指出健脾化痰方中的苦参碱成分,详见图3。

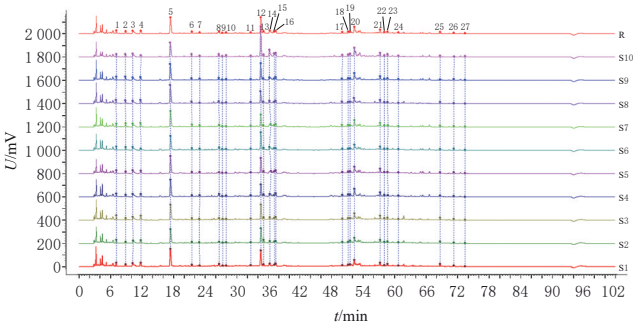
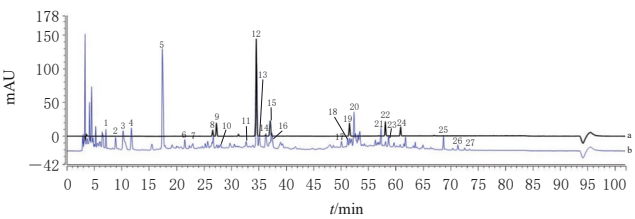


图1 10批健脾化痰方的HPLC叠加指纹图谱及对照指纹图谱



8:绿原酸;9:香草酸;12:对香豆酸;15:阿魏酸;19:橙皮苷;22:槲皮素;24:佛手柑内酯;a:混合对照品溶液;b:健脾化痰方供试品溶液(编号S1)。

图2 健脾化痰方供试品溶液与混合对照品溶液的HPLC图

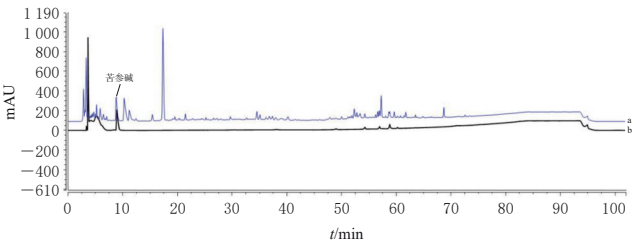


图3 健脾化痰方供试品溶液在211 nm波长下的HPLC图

2.3.5 色谱峰归属

将白术、莪术、茯苓、佛手、苦参、白花蛇舌草对照药材溶液,健脾化痰方供试品溶液(编号S1)与混合对照品溶液的HPLC图进行比对,以确定共有峰来源。结果发现,峰1、2、4、6、8、9、10、11归属于白术药材,峰7、12、15、20、21、25归属于莪术药材,峰1、27归属于茯苓药材,峰1、2、4、12、13、15、19、22、24归属于佛手药材,峰1、2、3、4、5、7、11、13、16、18、20、21、22、23、24、27归属于苦参药材,峰1、4、7、8、9、10、11、12、14、15、17、22、23、24、26归属于白花蛇舌草药材,详见图4。

分别取健脾化痰方供试品溶液(编号S1)、混合对照品溶液及各阴性供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,得绿原酸、香草酸、对香豆酸、阿魏酸、橙皮苷、槲皮素、佛手柑内酯、苦参碱的阴性对照图谱,详见图5、图6。根据图5、图6,可确定绿原酸(峰8)和香草酸(峰9)来自白花蛇舌草和白术;对香豆酸(峰12)和阿魏酸(峰15)来自白花蛇舌草、佛手和莪术;橙皮苷(峰19)来自佛手;槲皮素(峰22)和佛手柑内酯(峰24)来自白花蛇舌草、佛手和苦参;苦参碱来自苦参。

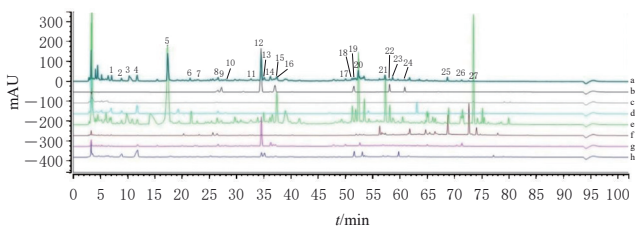


图4 健脾化痰方供试品、混合对照品及各对照药材溶液的HPLC图

皮素、佛手柑内酯、苦参碱的阴性对照图谱,详见图5、图6。根据图5、图6,可确定绿原酸(峰8)和香草酸(峰9)来自白花蛇舌草和白术;对香豆酸(峰12)和阿魏酸(峰15)来自白花蛇舌草、佛手和莪术;橙皮苷(峰19)来自佛手;槲皮素(峰22)和佛手柑内酯(峰24)来自白花蛇舌草、佛手和苦参;苦参碱来自苦参。

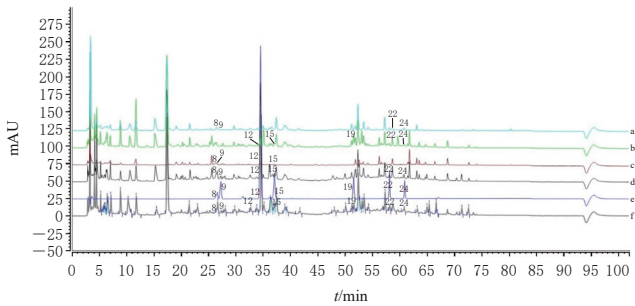


图5 健脾化痰方供试品、混合对照品及部分阴性供试品溶液的HPLC图

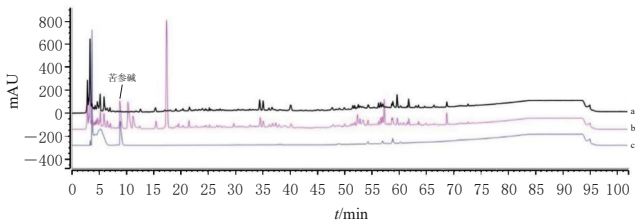


图6 健脾化痰方供试品、苦参碱对照品及缺苦参阴性供试品溶液的HPLC图

2.4 含量测定

2.4.1 线性关系考察

取“2.2.3”项下混合对照品溶液和苦参碱对照品溶液各适量,分别用甲醇稀释成系列质量浓度的溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,以对照品实际进样量(μg)为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y),进行线性回归分析,结果见表2。

表2 健脾化痰方中8种成分的线性关系考察结果

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ μg
绿原酸	$y=28.445x-0.572\ 7$	0.999 6	0.020~0.615
香草酸	$y=19.030x-0.181\ 7$	0.999 6	0.040~1.188
对香豆酸	$y=97.909x-0.789\ 3$	0.999 7	0.060~1.798
阿魏酸	$y=56.184x-0.419\ 2$	0.999 6	0.020~0.603
橙皮苷	$y=31.112x+0.051\ 9$	0.999 8	0.023~0.700
槲皮素	$y=34.224x-0.128\ 2$	0.999 9	0.020~0.602
佛手柑内酯	$y=20.584x+0.003\ 5$	0.999 8	0.020~0.599
苦参碱	$y=1.440x+34.216\ 0$	0.999 5	5.065~40.52

2.4.2 精密度试验

取“2.2.3”项下混合对照品溶液和苦参碱对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件分别连续进样测定6次,记录峰面积。结果显示,绿原酸、香草酸、对香豆酸、阿魏酸、橙皮苷、槲皮素、佛手柑内酯、苦参碱峰面积的RSD分别为0.85%、1.43%、1.03%、1.02%、1.08%、1.72%、0.66%、0.36%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.4.3 重复性试验

取健脾化痰方样品浓缩液(编号S1),按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以外标法计算样品含量。结果显示,绿原酸、香草酸、对香豆酸、阿魏酸、橙皮苷、槲皮素、佛手柑内酯、苦参碱的平均含量分别为0.048、0.030、0.158、0.025、0.024、0.019、0.015、14.00 mg/g,RSD分别为0.59%、0.39%、1.81%、1.36%、2.21%、2.01%、1.14%、1.18%($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.4.4 稳定性试验

取健脾化痰方样品浓缩液(编号S1),按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件分别在0、3、6、9、12、24 h进样测定,记录峰面积。结果显示,绿原酸、香草酸、对香豆酸、阿魏酸、橙皮苷、槲皮素、佛手柑内酯、苦参碱峰面积的RSD分别为0.88%、0.92%、0.50%、1.93%、0.40%、1.15%、1.17%、1.34%($n=6$),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.4.5 加样回收率试验

取已知成分含量的健脾化痰方样品浓缩液(编号S1),共6份,每份精密移取0.75 mL,按1:1(m/m)加入各单一对照品溶液,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算加样回收率。结果

显示,绿原酸、香草酸、对香豆酸、阿魏酸、橙皮苷、槲皮素、佛手柑内酯、苦参碱的平均加样回收率分别为99.48%、101.32%、101.18%、100.79%、101.12%、99.19%、99.81%、102.46%,RSD分别为1.34%、0.93%、1.90%、1.84%、0.54%、1.53%、1.33%、1.01%($n=6$),表明该方法准确度良好。

2.4.6 样品含量测定

按“2.2.1”项下方法制备10批健脾化痰方样品浓缩液,再按“2.2.2”项下方法制备健脾化痰方供试品溶液,然后按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录各成分的峰面积并按外标法计算样品中8种成分的含量。每批样品平行测定3次,取平均值,结果见表3。

3 讨论

3.1 检测波长的确定

笔者前期在选择检测波长时,取健脾化痰方样品分别在203、225、246、283、310 nm波长下进行了扫描,通过观察各波长下的色谱峰数量、峰形以及响应程度,发现样品在283 nm波长下的色谱峰形状较好、易于观察,色谱峰数量相比在其他波长下更多,且基线比较稳定,故最后确定以283 nm作为检测波长。另外,苦参是健脾化痰方治疗肝癌术后复发的起主要药效作用的中药之一,但其活性成分苦参碱在283 nm波长下的色谱峰响应低,故本研究根据相关文献报道^[4],选择211 nm作为检测波长单独对苦参碱进行了指纹图谱鉴定和含量测定。

3.2 流动相及洗脱条件的确定

笔者前期分别以甲醇-甲酸溶液、甲醇-0.1%磷酸溶液、甲醇-0.05%磷酸溶液作为流动相进行考察,结果显示以甲醇-0.05%磷酸溶液作为流动相进行梯度洗脱时,各色谱峰的基线更稳定、分离度更高,样品出峰数量更多。同时,通过对洗脱条件的不断优化,以调整成分出峰时间、提高色谱峰分离度,最后确定了文中的梯度洗脱条件。

3.3 指纹图谱结果分析

本研究建立了健脾化痰方的HPLC指纹图谱,通过方法学考察,可知其精密度、重复性、稳定性试验的RSD均小于3.00%,符合指纹图谱建立要求。该指纹图谱共确定了27个共有峰,指认了8个化学成分,根据相似度

表3 不同批次健脾化痰方中8种成分的含量测定结果($n=3$)

编号	绿原酸		香草酸		对香豆酸		阿魏酸		橙皮苷		槲皮素		佛手柑内酯		苦参碱	
	含量/(mg/g)	RSD/%	含量/(mg/g)	RSD/%	含量/(mg/g)	RSD/%	含量/(mg/g)	RSD/%	含量/(mg/g)	RSD/%	含量/(mg/g)	RSD/%	含量/(mg/g)	RSD/%	含量/(mg/g)	RSD/%
S1	0.046	2.17	0.030	1.95	0.156	2.25	0.025	2.43	0.023	2.19	0.019	2.89	0.014	2.17	14.05	0.71
S2	0.024	2.44	0.025	2.28	0.145	1.73	0.030	2.00	0.036	1.15	0.017	2.11	0.016	1.30	14.90	1.34
S3	0.033	1.73	0.030	1.95	0.146	2.05	0.028	1.79	0.019	2.40	0.023	1.39	0.018	1.40	18.10	2.76
S4	0.052	1.92	0.027	2.11	0.116	1.31	0.006	2.53	0.034	1.47	0.025	1.01	0.017	1.48	16.19	1.91
S5	0.021	2.71	0.028	2.04	0.150	2.75	0.029	2.47	0.029	1.72	0.023	2.28	0.023	1.09	23.19	1.12
S6	0.048	1.33	0.034	2.52	0.170	1.48	0.031	1.86	0.023	2.12	0.021	1.92	0.021	2.38	21.27	1.50
S7	0.040	2.50	0.028	1.23	0.119	0.84	0.022	1.71	0.014	1.79	0.026	1.17	0.020	2.01	23.00	0.87
S8	0.050	2.00	0.032	1.41	0.118	1.29	0.024	2.50	0.020	2.25	0.019	2.64	0.014	1.79	24.11	1.29
S9	0.047	2.13	0.028	1.61	0.164	1.53	0.027	2.78	0.022	2.05	0.024	1.05	0.027	2.78	14.90	1.34
S10	0.061	2.49	0.028	1.79	0.295	1.69	0.062	1.21	0.053	1.15	0.019	1.32	0.024	1.88	18.29	2.02

评价结果,10批样品与对照指纹图谱的相似度为0.942~0.999,表明10批健脾化痰方供试品溶液的主要化学成分具有较高的一致性;但有部分批次样品之间的相似度低于0.900,如S4与S10、S7与S10、S8与S10间的相似度分别为0.865、0.896、0.855,表明不同产地、不同批次药材间的质量存在一定的差异。

3.4 含量测定结果分析

中药的疗效与其活性成分、含量等有关。据文献报道,对香豆酸是白花蛇舌草的活性成分之一,它可通过促进肿瘤细胞凋亡、抑制其增殖与迁移以及抑制肿瘤血管生成而达到抗肿瘤的作用,并可进一步转化为绿原酸、阿魏酸^[5]。橙皮苷可以较强地抑制各种类型的肿瘤细胞,改善肝、肾损伤^[6],是佛手的指标性成分。槲皮素和佛手柑内酯为白花蛇舌草、佛手及苦参共有的有效成分,其中槲皮素可抑制肿瘤细胞生长并诱导其凋亡,从而发挥抗肝癌等作用^[7];佛手柑内酯可通过磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B信号通路诱导人肝癌细胞HepG₂和Hep3B凋亡^[8]。香草酸是一种酚酸类化合物,为白花蛇舌草和白术共有的活性成分,可通过诱导细胞自噬来缓解棕榈酸诱导的HepG₂细胞脂肪变性^[9]。苦参碱为苦参的指标性成分,临床上常用于肝癌的治疗及预防复发^[10]。上述成分的药理活性与健脾化痰方的功能主治存在相关性。因此,为保障健脾化痰方的质量和临床疗效,本研究在指纹图谱的基础上,采用HPLC法对上述化学成分进行了含量测定。结果显示,在“2.1”项下色谱条件下,供试品溶液中绿原酸、香草酸、对香豆酸、阿魏酸、橙皮苷、槲皮素、佛手柑内酯、苦参碱的色谱峰与其他组分色谱峰均能达到基线分离;其含量分别为0.021~0.061、0.025~0.034、0.116~0.295、0.006~0.062、0.014~0.053、0.017~0.026、0.014~0.027、14.05~24.11 mg/g。10批样品中化学成分的含量存在差异,可能与药材的不同产地、不同批次有关。

综上所述,本研究所建立的指纹图谱和含量测定方法可为健脾化痰方的质量控制以及后续的制剂开发提供参考依据。

参考文献

[1] 谭为,赵优雅,黄旭晖,等.健脾化痰方对肝细胞癌术后患者早期生活质量的影响[J].现代医院,2017,17(7):1050-1052,1056.
TAN W, ZHAO Y Y, HUANG X H, et al. Clinical observation on the effect of Jianpi huayu decoction on early life quality of postoperative hepatocellular carcinoma patients [J]. Mod Hosp, 2017, 17(7): 1050-1052, 1056.
[2] XIE Y J, ZHANG Y, WEI X H, et al. Jianpi huayu decoction attenuates the immunosuppressive status of H₂₂ hepatocellular carcinoma-bearing mice: by targeting myeloid-derived suppressor cells[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 16.
[3] 郎天琼,封云倩,简进珍,等.复方胃痛胶囊HPLC指纹

图谱建立及5种成分含量测定[J].中药材,2023,46(3):682-686.

LANG T Q, FENG Y Q, JIAN J Z, et al. Establishment of HPLC fingerprint of compound Weitong capsule and determination of five components[J]. J Chin Med Mater, 2023, 46(3): 682-686.

[4] 王鹏飞,王京辉,段秀梅,等. HPLC法同时测定复方苦参注射液7个成分含量及指纹图谱研究[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(7): 1101-1109.

WANG P F, WANG J H, DUAN X M, et al. Determination of seven components in compound Kushen injection by HPLC and fingerprint study[J]. Chin J Pharm Anal, 2022, 42(7): 1101-1109.

[5] 管西芹,毛近隆,唐迎雪,等. 对香豆酸的药理作用研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(17): 4162-4170.

GUAN X Q, MAO J L, TANG Y X, et al. Research progress on pharmacological effects of p-coumaric acid[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2018, 49(17): 4162-4170.

[6] 魏静,宋若兰,陈翔,等. 新甲基橙皮苷二氢查耳酮及合成前体药理作用研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(23): 436-449.

WEI J, SONG R L, CHEN X, et al. Research progress on pharmacological activities of neohesperidin dihydrochalcone and its synthetic precursors[J]. Sci Technol Food Ind, 2022, 43(23): 436-449.

[7] 杨颖,王芸芸,蒋琦辰. 槲皮素药理作用的研究进展[J]. 特种经济动植物, 2020, 23(5): 24-28.

YANG Y, WANG Y Y, JIANG Q C. Research progress on pharmacological effects of quercetin[J]. Spec Econ Anim Plant, 2020, 23(5): 24-28.

[8] 赵丽萍,王超,田男,等. 佛手柑内酯通过PI3K/Akt信号通路诱导人肝癌细胞HepG₂和Hep3B凋亡的机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(6): 73-78.

ZHAO L P, WANG C, TIAN N, et al. Effect of bergapten on apoptosis of HepG₂ and Hep3B cells through PI3K/Akt pathway[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2020, 26(6): 73-78.

[9] 陈倩,伊力亚斯·艾萨,雷秀英,等. 香草酸通过诱导自噬缓解HepG₂细胞脂肪变性[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(19): 2622-2626.

CHEN Q, Yiliyasi·Aisa, LEI X Y, et al. Vanillic acid attenuates steatosis in cultured hepatic cells by inducing autophagy[J]. Chin J Clin Pharmacol, 2021, 37(19): 2622-2626.

[10] 张明发,沈雅琴. 苦参碱抗肝癌药理作用及临床应用的研究进展[J]. 药物评价研究, 2020, 43(1): 157-165.

ZHANG M F, SHEN Y Q. Research advances in pharmacological effects and clinical application of matrine against hepatoma[J]. Drug Eval Res, 2020, 43(1): 157-165.

(收稿日期:2023-08-02 修回日期:2023-11-16)

(编辑:胡晓霖)