

和肤止痒方的UPLC指纹图谱建立及8种成分的含量测定[△]

刘丽娟^{1*},赵 亚¹,吴亚运¹,赵瑞芝¹,卢传坚^{2,3#}(1.广州中医药大学第二附属医院中药药性理论现代阐释创新团队,广州 510006;2.广州中医药大学第二附属医院皮肤科,广州 510120;3.广东省中医证候临床研究重点实验室,广州 510120)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)16-1982-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.16.11



摘 要 目的:建立和肤止痒方的指纹图谱并进行聚类分析,建立该方中8种成分的含量测定方法,为其质量控制提供参考。方法:采用超高效液相色谱法(UPLC)。以ACQUITY UPLC BEH C₁₈为色谱柱,以乙腈-0.1%冰醋酸溶液为流动相进行梯度洗脱,流速为0.25 mL/min,柱温为30 ℃,检测波长为236 nm,进样量为5 μL。使用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》建立10批和肤止痒方的指纹图谱,与对照品比对指认色谱峰,并进行相似度评价。使用SPSS 21.0软件对10批样品进行聚类分析。采用上述UPLC法测定10批样品中没食子酸等8种成分的含量。结果:从10批和肤止痒方的UPLC指纹图谱中标定共有峰34个,指认出峰1为没食子酸、峰10为阿魏酸、峰13为落新妇苷、峰23为丹皮酚、峰28为白鲜碱、峰31为黄柏酮、峰32为枹酮、峰34为蛇床子素,与对照指纹图谱的相似度为0.923~0.979。10批样品中,S1、S2、S5、S6、S7、S8、S10聚为一类,S3、S4、S9聚为一类。上述8种成分的平均含量分别为0.596~0.714、0.262~0.321、7.647~9.859、0.113~0.644、0.170~0.202、0.854~1.281、0.631~0.857、3.243~3.548 mg/g。结论:成功建立了和肤止痒方的UPLC指纹图谱和8种成分的含量测定方法。

关键词 和肤止痒方;超高效液相色谱法;指纹图谱;含量测定;聚类分析

Establishment of UPLC Fingerprint of Hefu Zhiyang Decoction and Content Determination of 8 Components

LIU Lijuan¹, ZHAO Ya¹, WU Yayun¹, ZHAO Ruizhi¹, LU Chuanjian^{2, 3} (1. Innovative Team for Modern Interpretation of TCM Property Theory, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510006, China; 2. Dermatological Department, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510120, China; 3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Clinical Research on Traditional Chinese Medicine Syndrome, Guangzhou 510120, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the fingerprint and conduct cluster analysis of Hefu zhiyang decoction (HFZYD), and establish the method for content determination of 8 components, so as to provide reference for the quality control of HFZYD. METHODS: UPLC method was adopted. The determination was performed on ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% glacial acetic acid solution (gradient elution) at the flow rate of 0.25 mL/min. The column temperature maintained at 30 ℃, and detection wavelength was 236 nm. The sample size was 5 μL. The fingerprint of 10 batches of HFZYD was established with *Similarity Evaluation System of TCM Chromatographic Fingerprints* (2012 edition). Compared with substance control, the common peaks were identified. The similarity evaluation was conducted. SPSS 21.0 software was used to conduct cluster analysis of 10 batches of samples. The contents of 8 components such as gallic acid in 10 batches of samples were determined by above UPLC. RESULTS: There were 34 common peaks in the UPLC fingerprint of 10 batches of HFZYD, identified as peak 1 was gallic acid, peak 10 was ferulic acid, peak 13 was astilbin, peak 23 was paeonol, peak 28 was dictamnine, peak 31 was obacunone, peak 32 was fraxinellone, and peak 34 was osthole. Its similarity with the control fingerprint was 0.923-0.979. Among 10 batches of samples, S1, S2, S5, S6, S7, S8 and S10 were clustered into one category, and S3, S4 and S9 were clustered into one category. The average contents of above 8 components were 0.596-0.714, 0.262-0.321, 7.647-9.859, 0.113-0.644, 0.170-0.202, 0.854-1.281, 0.631-0.857, 3.243-3.548 mg/g, respectively. CONCLUSIONS: UPLC fingerprint and the method for content determination of 8 components in HFZYD are established successfully.

KEYWORDS Hefu zhiyang decoction; UPLC; Fingerprint; Content determination; Cluster analysis

[△] 基金项目:国家中医药管理局中医药传承与创新“百千万”人才工程(岐黄工程)岐黄学者项目(No.国中医药办人教函〔2019〕62号);广东省省级科技计划项目(No.2017B030314166);广州市科技计划项目(No.201807010051)

* 助理研究员,硕士。研究方向:中药复方药效物质基础。电话:020-39318571。E-mail:18820143936@163.com

通信作者:教授,博士生导师,博士。研究方向:中西医结合治疗皮肤病。电话:020-81887233-31223。E-mail:lcj@gzucm.edu.cn

银屑病为炎症性、免疫相关性、难治性、复杂性皮肤病,一旦发病需终生服药,给患者及社会造成极大的经济负担^[1]。目前,根据疾病的不同表现,西医常采用抗炎药、抗增殖药以及免疫抑制剂、生物制剂进行治疗。常规用药虽可短期控制患者症状,但长期应用存在肝肾毒性、致畸等严重毒副作用^[2];生物制剂虽疗效确切、肝肾毒性小,但存在价格昂贵和易引发感染性疾病、肿瘤等问题^[3]。因此,现有银屑病的治疗方法难以满足临床需求,亟需新的治疗策略。

中医学在治疗银屑病方面积累了丰富的经验。“岐黄学者”卢传坚教授根据长期临床实践总结出治疗银屑病的验方——和肤止痒方,由徐长卿、白鲜皮、蛇床子、土茯苓、熟地黄、当归和石榴皮等(质量比为3:3:2:3:3:2:3)7味中药组成。该方通过药浴治疗银屑病瘙痒症数十年,疗效确切且无明显副作用,目前正处于新药开发阶段^[4]。由于中药成分复杂,所以保持质量一致性成为其新药开发中质量控制的难点。中药指纹图谱可较全面地反映中药及复方制剂中所包含的化学成分,是中药质量控制的有效手段之一^[5-6]。基于此,本研究拟通过超高效液相色谱法(UPLC)建立和肤止痒方的指纹图谱,并进行相似度评价和聚类分析,同时对指认的8种有效成分(没食子酸、阿魏酸、落新妇苷、丹皮酚、白鲜碱、黄柏酮、枳酮、蛇床子素)进行含量测定,从定性与定量两个角度对和肤止痒方进行评价,以期为其质量控制提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括 ACQUITY 型 UPLC 仪及配备的四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、光电二极管阵列(PDA)检测器、Empower 3 软件(美国 Waters 公司), BT125D 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),Centrifuge 5418R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司),Rotavapor R-100 型旋转蒸发仪(瑞士 Buchi 公司),Milli-Q 型纯水机(美国 Millipore 公司),N-EVAP24 型氮吹仪(美国 Organomation 公司)等。

1.2 主要药品与试剂

没食子酸对照品(批号 MB2707,纯度≥98%)购自大连美仑生物技术有限公司;阿魏酸对照品(批号 L03A9D55744,纯度≥98%)、落新妇苷对照品(批号 Y11O10H99801,纯度≥98%)、丹皮酚对照品(批号 L15D9D77791,纯度≥98%)、白鲜碱对照品(批号 P12J11S118162,纯度≥98%)、黄柏酮对照品(批号 Z11A8S33620,纯度≥98%)、枳酮对照品(批号 Z31A7S20284,纯度≥98%)、蛇床子素对照品(批号 T08M8B30733,纯度≥98%)均购自上海源叶生物科技

有限公司;乙腈(色谱纯)、甲醇(色谱纯)均购自德国 Merck 公司;其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

徐长卿、白鲜皮、蛇床子、土茯苓、熟地黄、当归和石榴皮饮片分别由广东省中医院提供(含批号 200605261、191003651、2005001、2008001、200403611、200501861、200800101、200601、200801、191202721、YPB0F001、191205271)或购自佛山百姓缘大药房(含批号 18Z0901、191001、18Z1201、20Z0601、20200601、20Z0501、20190901)、广州养和医药股份有限公司(含批号 181201、20010101、190901、190601、20040701、1901001、2001001)、广州柏恩医药连锁有限公司(含批号 190501、20200401、190617、200501、200201、200101-9、190601)和广州海王星辰健康药房(含批号 201806451、20200201、190501、20200501、20200601-1、200428、20170501),经广东省中医院陈文良主管中药师鉴定,分别为萝藦科植物徐长卿 *Cynanchum paniculatum* (Bge.) Kitag 的干燥根及根茎(产地:河北、安徽、辽宁),芸香科植物白鲜 *Dictamnus dasycarpus* Turcz. 的干燥根皮(产地:山东、河北),伞形科植物蛇床 *Cnidium monnieri* (L.) Cuss. 的干燥成熟果实(产地:河北、江西、广西、安徽),百合科植物光叶菝葜 *Smilax glabra* Roxb. 的干燥根茎(产地:广西),玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的块根炮制加工品(产地:河南),伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根(产地:甘肃),石榴科植物石榴 *Punica granatum* L. 的干燥果皮(产地:湖南、河南、广西);各饮片按处方比例随机组合,得 10 批和肤止痒方样品(编号 S1~S10),详见表 1。

表 1 10 批和肤止痒方样品的药材组合
Tab 1 Combination of 10 batches of HFZYF

编号	徐长卿	白鲜皮	蛇床子	土茯苓	熟地黄	当归	石榴皮
S1	200605261	2005001	200403611	200501861	200601	191202721	191205271
S2	191003651	2008001	200403611	200800101	200801	YPB0F001	20170501
S3	181201	20010101	190901	190601	20040701	1901001	2001001
S4	18Z0901	191001	190501	20Z0601	20200601	20Z0501	20190901
S5	201806451	20200401	18Z1201	20200501	20200601-1	200428	20170501
S6	191003651	20200201	190617	200501	200201	200101-9	190601
S7	18Z0901	2005001	18Z1201	200501861	200801	20Z0501	20190901
S8	201806451	191001	190617	200501	20040701	1901001	2001001
S9	181201	20010101	190901	190601	20200601-1	200428	190601
S10	200605261	2008001	190501	200800101	20200601	YPB0F001	191205271

2 方法与结果

2.1 色谱条件

以 ACQUITY UPLC BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)为色谱柱,以乙腈为流动相 A、0.1%冰醋酸溶液为流动相 B 进行梯度洗脱(0~18.5 min, 5% A→10% A; 18.5~20 min, 10% A→13% A; 20~26 min, 13% A→12% A; 26~28 min, 12% A→18% A; 28~31 min, 18% A→

14% A; 31~44 min, 14% A→33% A; 44~47 min, 33% A→42% A; 47~55 min, 42% A→50% A);流速为0.25 mL/min;柱温为30 ℃;检测波长为236 nm;进样量为5 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别取没食子酸、阿魏酸、落新妇苷、丹皮酚、白鲜碱、黄柏酮、枳酮、蛇床子素对照品适量,精密称定,加入甲醇溶解并稀释,混匀,制成质量浓度分别为0.512、0.536、0.516、0.536、0.560、0.577、0.542、0.725 mg/mL的单一对照品贮备液。精密吸取上述单一对照品贮备液各适量,以甲醇稀释制成每1 mL含没食子酸40 μg、阿魏酸10 μg、落新妇苷360 μg、丹皮酚15 μg、白鲜碱6 μg、黄柏酮3 μg、枳酮35 μg、蛇床子素80 μg等8种成分的混合对照品溶液;同法配制每1 mL含白鲜碱6 μg、黄柏酮3 μg、枳酮35 μg等3种成分的混合对照品溶液和单一对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 按处方比例分别取徐长卿、白鲜皮、蛇床子、土茯苓、当归、石榴皮的单味饮片粉末(过三号筛,下同),精密称定,置于圆底烧瓶中,加入10倍量水(mL/g)浸泡30 min,加热回流提取(以武火煮沸,后用文火煮沸1 h),趁热过滤,剩余药渣以同法煎煮后趁热过滤,合并两次滤液并浓缩,用水定容至50 mL,即得和肤止痒方样品。同法制备单味药材样品和分别缺徐长卿、白鲜皮、蛇床子、土茯苓、当归、石榴皮的阴性样品。取上述样品溶液200 μL,加入甲醇800 μL,混匀,于4 ℃下以14 000×g离心15 min,取上清液,于40 ℃水浴下以氮气流吹干,残渣加入流动相(乙腈与0.1%冰醋酸溶液体积比为1:9,下同)1 000 μL复溶,混匀,经0.22 μm微孔滤膜过滤,即得单味药材样品溶液、阴性样品溶液、和肤止痒方供试品溶液。

2.3 和肤止痒方指纹图谱的建立

2.3.1 精密度试验 取和肤止痒方供试品溶液(编号S1),按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。以落新妇苷峰(对应色谱峰保留时间适中且峰面积相对较大)为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,各共有峰相对保留时间的RSD均不大于0.19% (n=6),相对峰面积的RSD均不大于2.75% (n=6),表明方法精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取和肤止痒方供试品溶液(编号S1),分别于室温下放置0、1、2、4、8、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以落新妇苷峰为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,各共有峰相对保留时间的RSD均不大于0.19% (n=7),相对峰面积的RSD均不大于2.98% (n=7),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 取同一编号和肤止痒方样品(编号S1)适量,按“2.2.2”项下方法平行制备供试品溶液6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以落新妇苷峰为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,各共有峰相对保留时间的RSD均不大于0.45% (n=6),相对峰面积的RSD均不大于2.87% (n=6),表明方法重复性良好。

2.3.4 指纹图谱的建立与色谱峰的指认 取10批和肤止痒方供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》进行图谱数据分析,以S1为参照图谱,将时间窗宽度设定为0.1 min,采用多点校正和全谱峰匹配生成叠加指纹图谱,采用中位数法生成对照指纹图谱(R)。结果,10批样品的指纹图谱中共标定共有峰34个,详见图1。通过与含8种成分的混合对照品溶液的色谱图(同法测定,见图2)进行比对,指认峰1为没食子酸、峰10为阿魏酸、峰13为落新妇苷、峰23为丹皮酚、峰28为白鲜碱、峰31为黄柏酮、峰32为枳酮、峰34为蛇床子素。

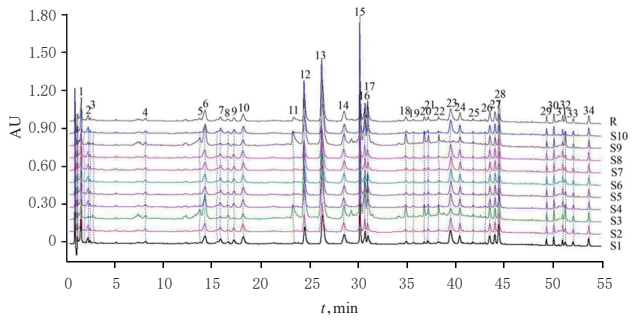
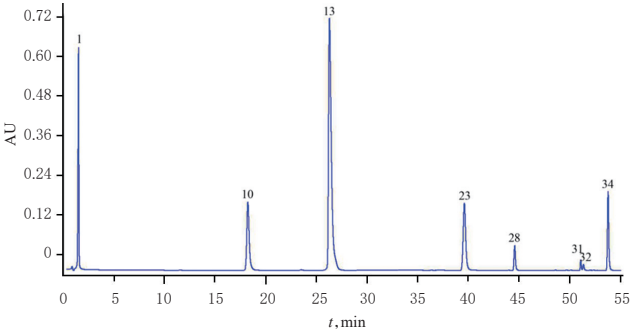


图1 10批和肤止痒方的UPLC叠加指纹图谱和对照指纹图谱

Fig 1 UPLC superimposed fingerprints and control fingerprint of 10 batches of HFZYF



注:1.没食子酸;10.阿魏酸;13.落新妇苷;23.丹皮酚;28.白鲜碱;31.黄柏酮;32.枳酮;34.蛇床子素

Note: 1. gallic acid; 10. ferulic acid; 13. astilbin; 23. paeonol; 28. dictamnine; 31. obacunone; 32. fraxinellone; 34. osthole

图2 没食子酸等8种成分混合对照品溶液的UPLC图
Fig 2 UPLC chromatogram of mixed control of 8 components as gallic acid

2.3.5 相似度评价 以对照指纹图谱为参照,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》对10批和肤止痒方的指纹图谱进行相似度评价。结果,10批样品图谱与对照指纹图谱的相似度分别为0.975、0.979、0.938、0.961、0.978、0.979、0.972、0.979、0.923、0.976,均大于0.90。

2.4 聚类分析

使用SPSS 21.0软件,采用组间连接法,以平方欧氏距离为测量区间,对10批和肤止痒方样品的34个共有峰的峰面积进行聚类分析,结果见图3。

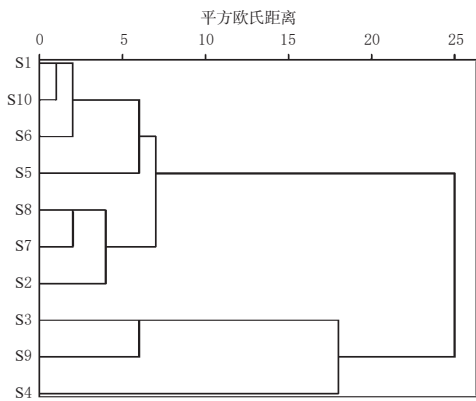


图3 10批和肤止痒方的聚类分析图

Fig 3 Cluster analysis of 10 batches of HFZYF

由图3可知,当平方欧氏距离为20时,10批样品可聚为两类,其中S1、S2、S5、S6、S7、S8、S10聚为一类,S3、S4、S9聚为一类。

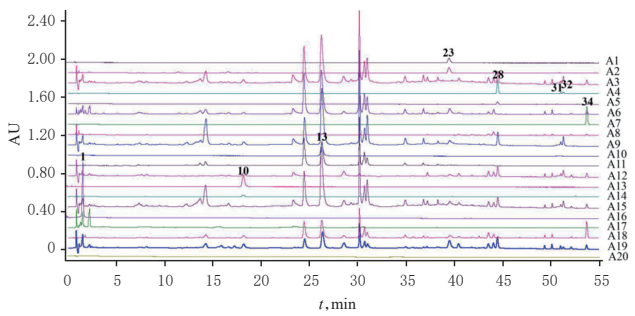
2.5 和肤止痒方有效成分的含量测定

2.5.1 专属性考察 取空白对照溶液(流动相)、单一对照品溶液和“2.2.2”项下的单味药材样品、阴性样品、和肤止痒方供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,丹皮酚、白鲜碱、黄柏酮、枳壳酮、蛇床子素、落新妇苷、阿魏酸和没食子酸色谱峰的分离度均良好,且阴性样品无干扰,详见图4。

2.5.2 线性关系考察 精密吸取“2.2.1”项下含8种成分的混合对照品溶液,用流动相逐级稀释0、2、4、8、16、32倍,得6个质量浓度的系列混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以各成分的质量浓度为横坐标($x, \mu\text{g/mL}$)、相应峰面积为纵坐标(y)进行线性回归。结果,没食子酸、阿魏酸、落新妇苷、丹皮酚、白鲜碱、黄柏酮、枳壳酮、蛇床子素等8种成分在相应质量浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系($R^2 > 0.999$),详见表2。

2.5.3 精密度试验 精密吸取“2.2.1”项下含8种成分的混合对照品溶液,用流动相稀释4倍,再按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果,没食子酸、阿魏酸、落新妇苷、丹皮酚、白鲜碱、黄柏酮、枳壳酮和蛇床子素

素峰面积的RSD分别为0.21%、0.19%、0.36%、0.84%、0.45%、0.37%、0.44%和0.27% ($n=6$),表明仪器精密度良好。



注:A1.丹皮酚对照品;A2.徐长卿样品;A3.缺徐长卿阴性样品;A4.白鲜碱、黄柏酮和枳壳酮混合对照品;A5.白鲜皮样品;A6.缺白鲜皮阴性样品;A7.蛇床子素对照品;A8.蛇床子样品;A9.缺蛇床子阴性样品;A10.落新妇苷对照品;A11.土茯苓样品;A12.缺土茯苓阴性样品;A13.阿魏酸对照品;A14.当归样品;A15.缺当归阴性样品;A16.没食子酸对照品;A17.石榴皮样品;A18.缺石榴皮阴性样品;A19.和肤止痒方(编号S1);A20.空白对照溶液;1.没食子酸;10.阿魏酸;13.落新妇苷;23.丹皮酚;28.白鲜碱;31.黄柏酮;32.枳壳酮;34.蛇床子素

Note: A1. paeonol reference; A2. *C. paniculatum* sample; A3. negative sample without *C. paniculatum*; A4. mixed control of dictamnine, obacunone and fraxinellone; A5. *D. dasycarpus* sample; A6. negative sample without *D. dasycarpus*; A7. osthole control; A8. *C. monnieri* sample; A9. negative sample without *C. monnieri*; A10. astilbin reference; A11. *S. glabra* sample; A12. negative sample without *S. glabra*; A13. ferulic acid control; A14. *A. sinensis* sample; A15. negative sample without *A. sinensis*; A16. gallic acid control; A17. *P. granatum* sample; A18. negative sample without *P. granatum*; A19. HFZYF sample (No. S1); A20. solution blank control; 1. gallic acid; 10. ferulic acid; 13. astilbin; 23. paeonol; 28. dictamnine; 31.obacunone; 32. fraxinellone; 34. osthole

图4 和肤止痒方中8种成分专属性试验的色谱图
Fig 4 Chromatograms of specificity tests of 8 components in HFZYF

表2 没食子酸等8种成分的线性关系考察结果
Tab 2 Linear relationships of 8 components as gallic acid

成分	回归方程	R^2	线性范围, $\mu\text{g/mL}$
没食子酸	$y=35\ 344x-3\ 207$	0.999 8	1.25~40
阿魏酸	$y=130\ 146x-6\ 213$	0.999 8	0.31~10
落新妇苷	$y=62\ 730x-52\ 135$	0.999 9	11.25~360
丹皮酚	$y=31\ 201x-7\ 045$	0.999 0	0.47~15
白鲜碱	$y=295\ 329x-6\ 167$	0.999 9	0.19~6
黄柏酮	$y=8\ 047x-263$	0.999 7	0.09~3
枳壳酮	$y=53\ 176x+1\ 271$	0.999 9	1.09~35
蛇床子素	$y=26\ 707x+13\ 224$	0.999 6	2.5~80

2.5.4 稳定性试验 精密吸取同一和肤止痒方供试品溶液(编号S1),分别于室温下放置0、2、4、6、8、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,供试品溶液中没食子酸、阿魏酸、落新妇苷、丹皮酚、白鲜碱、黄柏酮、枳壳酮和蛇床子素峰面积的RSD分别为

1.03%、0.87%、0.32%、0.39%、1.07%、0.30%、0.90%和0.87% ($n=7$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定。

2.5.5 重复性试验 取同一批和肤止痒方样品(编号S1)6份,精密称定,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并代入回归方程计算含量。结果,供试品溶液中没食子酸、阿魏酸、落新妇苷、丹皮酚、白鲜碱、黄柏酮、枞酮和蛇床子素含量的RSD分别为2.45%、1.31%、1.43%、1.98%、1.90%、2.53%、2.65%和2.18% ($n=6$),表明方法重复性较好。

2.5.6 加样回收率试验 取已知含量的和肤止痒方样品(编号S1),分别精密加入与样品中各成分等量的单一对照品溶液(以甲醇为溶剂),按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。每样品平行操作6份。结果,供试品溶液中没食子酸、阿魏酸、落新妇苷、丹皮酚、白鲜碱、黄柏酮、枞酮和蛇床子素的平均加样回收率分别为102.33%、102.29%、100.83%、103.29%、99.53%、103.22%、100.86%和102.87%,RSD分别为1.80%、1.54%、1.75%、1.70%、0.86%、1.09%、2.13%和1.31% ($n=6$)。

2.5.7 样品含量测定 取10批和肤止痒方,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并代入回归方程计算8种成分的含量。每样品平行操作3份,结果见表3。

3 讨论

3.1 和肤止痒方方解

和肤止痒方中徐长卿和白鲜皮为君药,蛇床子和土茯苓为臣药,熟地黄和当归为佐药,石榴皮为使药。其中,徐长卿善祛风湿、通经络,其性温而不燥、祛邪而不伤正、滋补而不碍邪,白鲜皮利湿热、兼祛风,一温一寒,辛温能祛风湿,苦寒能降湿热,既可止痒又可扶正;蛇床子善止痒,能温肾阳而祛风湿,土茯苓入经络解湿毒,配

合君药可加强化湿解毒作用;熟地黄和当归为“润燥二味”,熟地黄色黑入肾水,滋肾阴,配以活血补血的当归,阴血双补且补中有通,佐以君臣药发挥润燥止痒之功;石榴皮取“以皮走皮”之意,引药力走于皮肤;诸药合用,共奏扶正和肤润燥、健脾祛湿止痒之功。

3.2 和肤止痒方指纹图谱及聚类分析

落新妇苷是臣药土茯苓的主要有效成分,且落新妇苷色谱峰响应值相对较高,出峰时间稳定、适中,因此选择其为参照。本研究建立了10批和肤止痒方的指纹图谱,与对照指纹图谱的相似度为0.923~0.979,说明10批样品质量稳定。聚类分析结果显示,10批样品可聚为两类,S1、S2、S5、S6、S7、S8、S10聚为一类,S3、S4、S9聚为一类。

3.3 定量指标的选择

本研究通过与对照品色谱图进行比对,指认了10批和肤止痒方中的8个共有峰,其中包括君药徐长卿、白鲜皮的主要有效成分丹皮酚、枞酮、黄柏酮、白鲜碱,臣药蛇床子、土茯苓的蛇床子素和落新妇苷,佐药当归的阿魏酸,使药石榴皮的没食子酸;上述成分大多为2020年版《中国药典》(一部)中单味药项下规定的指标性成分^[7]。丹皮酚是徐长卿的主要活性成分,具有抗炎、抑制酪氨酸酶、保护神经和抗病毒等作用,是徐长卿祛风止痒的物质基础^[8-9]。枞酮、黄柏酮、白鲜碱具有抗菌、抗炎、抗虫、抗过敏、抗氧化等活性,是白鲜皮发挥清热燥湿、祛风解毒作用的活性成分^[10]。另有报道指出,白鲜皮可引起药物性肝损伤^[11-12],枞酮是其引起肝毒性的物质基础,且与细胞色素P₄₅₀3A4酶相关^[13-14]。因此,对和肤止痒方中白鲜皮的质量进行控制至关重要。蛇床子素有抗炎、抗过敏、抗氧化以及类激素样等作用,是蛇床子杀虫止痒、燥湿祛风的功效基础^[15-17]。落新妇苷具有抗炎、抗氧化和选择性免疫抑制、神经保护等基于清热解毒功效的药理作用^[18]。阿魏酸有抗炎、镇痛、抗氧化、提高人体免疫功能、降低血液黏度等基于补血活血功效的药理活性^[19-20]。没食子酸具有抗氧化、抗菌、抗病毒、

表3 10批和肤止痒方中8种成分含量的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3, \text{mg/g}$)

Tab 3 Results of content determination of 8 compounds in 10 batches of HFZYF($\bar{x} \pm s, n=3, \text{mg/g}$)

编号	没食子酸	阿魏酸	落新妇苷	丹皮酚	白鲜碱	黄柏酮	枞酮	蛇床子素
S1	0.658±0.019	0.317±0.008	7.998±0.229	0.644±0.012	0.180±0.003	1.200±0.023	0.643±0.014	3.536±0.044
S2	0.657±0.024	0.321±0.008	7.893±0.205	0.642±0.010	0.175±0.002	1.249±0.005	0.648±0.011	3.542±0.034
S3	0.690±0.031	0.265±0.007	9.859±0.194	0.280±0.004	0.202±0.003	0.887±0.011	0.857±0.026	3.243±0.021
S4	0.623±0.031	0.308±0.007	7.788±0.141	0.625±0.013	0.176±0.004	1.203±0.024	0.647±0.018	3.481±0.033
S5	0.672±0.035	0.314±0.004	7.803±0.089	0.634±0.014	0.171±0.001	1.281±0.017	0.648±0.010	3.513±0.024
S6	0.615±0.027	0.307±0.010	7.697±0.142	0.643±0.012	0.179±0.002	1.166±0.001	0.681±0.008	3.539±0.026
S7	0.656±0.019	0.313±0.010	7.791±0.094	0.615±0.011	0.181±0.003	1.197±0.012	0.631±0.009	3.548±0.024
S8	0.714±0.013	0.262±0.005	7.647±0.212	0.642±0.023	0.180±0.002	1.178±0.023	0.659±0.012	3.512±0.039
S9	0.596±0.039	0.315±0.010	9.829±0.273	0.113±0.003	0.197±0.002	0.854±0.011	0.826±0.021	3.249±0.052
S10	0.659±0.048	0.318±0.010	7.706±0.159	0.636±0.010	0.170±0.002	1.240±0.013	0.664±0.013	3.524±0.022
RSD, %	5.37	7.15	10.63	34.57	5.78	13.03	11.74	3.43

抗真菌等多种药理活性^[21-23]。基于此,本研究选择丹皮酚、梣酮、黄柏酮、白鲜碱、蛇床子素、落新妇苷、阿魏酸和没食子酸作为和肤止痒方的质量控制指标。

综上所述,本研究成功建立了和肤止痒方的UPLC指纹图谱和8种主要成分的含量测定方法,可用于该方的质量控制。

参考文献

- [1] GLOBE D, BAYLISS M S, HARRISON D J. The impact of itch symptoms in psoriasis: results from physician interviews and patient focus groups[J]. *Health Qual Life Outcomes*, 2009, 7: 62.
- [2] MUNERA-CAMPOS M, VILAR-ALEJO J, RIVERA R, et al. The risk of hepatic adverse events of systemic medications for psoriasis: a prospective cohort study using the BIOBADADERM registry[J/OL]. *J Dermatolog Treat*, 2021[2021-04-20]. <http://doi.org/10.1080/09546634.2021.1922572>.
- [3] KIM H J, LEBWOHL M G. Biologics and psoriasis: the beat goes on[J]. *Dermatol Clin*, 2019, 37(1): 29-36.
- [4] CHEN L, CHEN H, LU Y, et al. Decoding active components in a formulation of multiple herbs for treatment of psoriasis based on three cell lines fishing and liquid chromatography-mass spectrometry analysis[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 186: 113331.
- [5] HE L, SHI X, SETO S W, et al. Using 3D-UPLC-DAD and a new method-verification by adding mixture standard compounds to determine the fingerprint and eight active components of Naoluoxintong decoction[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 169: 60-69.
- [6] 成焕波, 胡辉, 李清安, 等. 保元汤物质基准 UPLC-PDA 指纹图谱的建立及化学成分指认[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(7): 16-23.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2020 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 19, 114-115, 139, 298, 328-329.
- [8] ADKI K M, KULKARNI Y A. Chemistry, pharmacokinetics, pharmacology and recent novel drug delivery systems of paeonol[J]. *Life Sci*, 2020, 250: 117544.
- [9] 刘阳欣, 赵锋, 康秉涛, 等. 丹皮酚药理学研究进展[J]. *陕西中医*, 2020, 41(4): 550-552.
- [10] 刘雷, 郭丽娜, 于春磊, 等. 白鲜皮化学成分及药理活性研究进展[J]. *中成药*, 2016, 38(12): 2657-2665.
- [11] 葛斐林, 牛明, 韩紫欣, 等. 白鲜皮制剂相关肝损伤的药物流行病学特征分析[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(5): 1048-1052.
- [12] 石伟, 高源, 郭玉明, 等. 基于免疫应激的白鲜皮致特异质

肝损伤评价研究[J]. *药学学报*, 2019, 54(4): 678-686.

- [13] ZHOU H, LIU Q, ZHANG J, et al. Cytochrome P₄₅₀-mediated bioactivation: implication for the liver injury induced by fraxinellone, a bioactive constituent from dictamni cortex[J]. *Chem Res Toxicol*, 2020, 33(7): 1960-1968.
- [14] LANG X, ZHANG X, WANG D, et al. In vitro and in vivo metabolic activation of obacunone, a bioactive and potentially hepatotoxic constituent of dictamni cortex[J]. *Planta Med*, 2020, 86(10): 686-695.
- [15] SUN Y, YANG A, LENON G B. Phytochemistry, ethnopharmacology, pharmacokinetics and toxicology of *Cnidium monnieri* (L.) cusson[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 1006.
- [16] ZAFAR S, SARFRAZ I, RASUL A, et al. Osthole: a multifunctional natural compound with potential anticancer, antioxidant and anti-inflammatory activities[J/OL]. *Mini Rev Med Chem*, 2020[2021-04-20]. <http://doi.org/10.2174/1389557520666200709175948>.
- [17] YANG N N, SHI H, YU G, et al. Osthole inhibits histamine-dependent itch via modulating TRPV1 activity[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 25657.
- [18] SHARMA A, GUPTA S, CHAUHAN S, et al. Astilbin: a promising unexplored compound with multidimensional medicinal and health benefits[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 158: 104894.
- [19] LU C, LIU M, SHANG W, et al. Knowledge mapping of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels (danggui) research: a scientometric study[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 294.
- [20] 王华, 孙娜. 当归的有效化学成分及药理作用研究进展分析[J]. *山东化工*, 2017, 46(18): 59-60.
- [21] ZHANG J, LI X, WEI J, et al. Gallic acid inhibits the expression of keratin 16 and keratin 17 through Nrf2 in psoriasis-like skin disease[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 65: 84-95.
- [22] AL Z N, EL-SHISHTAWY R M, ASIRI A M. Recent developments of gallic acid derivatives and their hybrids in medicinal chemistry: a review[J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 204: 112609.
- [23] SINGH B, SINGH J P, KAUR A, et al. Phenolic compounds as beneficial phytochemicals in pomegranate (*Punica granatum* L.) peel: a review[J]. *Food Chem*, 2018, 261: 75-86.

(收稿日期: 2021-04-06 修回日期: 2021-07-23)

(编辑: 邹丽娟)