

痛经软膏的多成分综合质量评价

冉令超¹, 冯金鹰¹, 李志明², 纪康康¹

1. 山东省立第三医院药学部 (济南 250000)

2. 山东中医药大学药学院 (济南 250355)

【摘要】目的 建立痛经软膏多组分定量联合化学计量学、灰色关联度分析法综合质量评价的方法。**方法** 以姜黄素为内参物, 通过高效液相色谱一测多评 (HPLC-QAMS) 法同时检测痛经软膏中柠檬苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱、双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素、6-姜辣素、8-姜酚、10-姜酚、延胡索乙素、去氢紫堇碱和紫堇碱的含量, 结合聚类分析、主成分分析、正交最小二乘判别分析和灰色关联度分析法对其质量进行综合评价。**结果** 12 种成分在浓度范围内线性关系良好 (r 均 $\geq 0.999\ 1$); 平均加样回收率为 96.58%~100.19% (RSD 均小于 2.0%, $n=9$)。HPLC-QAMS 计算值与外标法实测值无显著差异 ($P > 0.05$)。化学计量学将其分为 3 类, 显示姜黄素、6-姜辣素、双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、柠檬苦素和延胡索乙素是影响痛经软膏产品质量的主要潜在标志物。灰色关联度分析显示相对关联度在 0.317 3~0.624 8 范围内, 痛经软膏质量存在一定的差异。**结论** 建立的方法可以全面地评价痛经软膏的质量。

【关键词】 痛经软膏; 高效液相色谱一测多评法; 化学计量学; 灰色关联度分析法; 综合评价

Multi-component comprehensive quality evaluation of Tongjing ointment

Ling-Chao RAN¹, Jin-Ying FENG¹, Zhi-Ming LI², Kang-Kang JI¹

1. Department of Pharmacy, Shandong Provincial Third Hospital, Jinan 250000, China

2. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

Corresponding author: Kang-Kang JI, Email: btjb77@163.com

【Abstract】Objective To establish a method for comprehensive quality evaluation of Tongjing ointment by multi-component quantification combined with chemometrics and grey correlation analysis (GRA). **Methods** With curcumin as the internal reference substance, HPLC-QAMS method was used to simultaneously determine the contents of limonin, evodiamine, rutaecarpine, bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin, curcumin, 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, tetrahydropalmatine, dehydrocorydalin, dorydaline in Tongjing ointment. The quality of Tongjing ointment was evaluated by cluster analysis, principal component analysis, orthogonal partial least square discriminant analysis and GRA. **Results** The determination of 12 components manifested a good linear relationship in the range of mass concentration ($r \geq 0.999\ 1$). The average recovery was between 96.58% and 100.19% ($RSD < 2.0\%$, $n=9$). There were no significant difference between the measured value of external standard method and the calculated value of HPLC-QAMS

DOI: 10.12173/j.issn.1008-049X.202305012

基金项目: 山东省中医药科技发展计划项目 (2019-0330)

通信作者: 纪康康, 主管药师, Email: btjb77@163.com

<https://zgys.whuzhmedj.com>

($P>0.05$). Tongjing ointment samples were classified into three categories by chemometrics and it showed that curcumin, 6-gingerol, bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin, limonin and tetrahydropalmatine were the main potential markers affecting the quality of Tongjing ointment. GRA showed that the relative correlation degree was in the range of 0.317 3-0.624 8, and there were some differences in the quality of Tongjing ointment. **Conclusion** The established method can comprehensively evaluate the quality of Tongjing ointment.

【Keywords】 Tongjing ointment; High performance liquid chromatography-quantitative analysis of multi-components by a single marker; Chemometrics; Grey relational analysis; Comprehensive evaluation

脐部给药始于春秋战国,属于中医“内病外治”疗法^[1],因使用方便、起效快,越来越多地应用于临床。痛经软膏属于脐部给药,具有活血散寒、调经止痛等功效,常用于痛经、下腹坠胀、腰背疼痛等症。痛经软膏由吴茱萸、姜黄、干姜和延胡索加工而成,吴茱萸具有温中散寒的功效,外用具有较好的止痛效果;延胡索是难得的止痛良药,尤其对气血凝滞造成的各种疼痛效果最佳;干姜治胃寒呕吐、脘腹冷痛;姜黄归脾、肝经,破血行气、通经止痛。痛经软膏现行质控标准 WS-11402(ZD-1402)-2002-2012Z^[2] 和相关文献^[3] 仅针对延胡索药材中的延胡索乙素进行含量测定,不能全面体现该产品的质量水平。为保障用药安全,提高质量控制手段,现对痛经软膏中4味中药材均进行分析,采用高效液相色谱-多评法(high performance liquid chromatography-quantitative analysis of multi-components by a single marker, HPLC-QAMS)^[4] 法同时测定柠檬苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱、双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素、6-姜辣素、8-姜酚、10-姜酚、延胡索乙素、去氢紫堇碱和紫堇碱的含量,并结合化学计量学^[5] 和灰色关联度分析(grey correlation analysis, GRA)^[6] 进行差异分析和质量评价,旨在为全面控制痛经软膏的质量提供依据。

1 仪器与试药

高效液相色谱仪(Primaide 1430型,日本日立公司;Agilent 1260型,美国安捷伦科技公司);色谱柱Cosmosil C₁₈柱、Agilent Eclipse Plus C₁₈柱和Prevail C₁₈柱,规格均为250 mm×4.6 mm,5 μm;PL203型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];DS-2510DTH型超声波清洗器(上海生析超声仪器公司)。

对照品柠檬苦素(批号:110800-201707,含量97.9%)、吴茱萸碱(批号:110802-202111,含量99.8%)、吴茱萸次碱(批号:110801-202109,含量99.3%)、双去甲氧基姜黄素(批号:112004-201501,含量95.0%)、去甲氧基姜黄素(批号:112003-201501,含量98.5%)、姜黄素(批号:110823-202107,含量98.1%)、6-姜辣素(批号:111833-202007,含量99.3%)、8-姜酚(批号:111993-202202,含量94.6%)、10-姜酚(批号:111994-202102,含量99.1%)和延胡索乙素(批号:110726-202020,含量99.3%)源于中国食品药品检定研究院;去氢紫堇碱(批号:PRF8062141,含量97.8%)和紫堇碱(批号:PRF15123121,含量99.2%)源于成都普瑞法科技开发有限公司。乙腈和甲醇(色谱级,德国Merck公司);磷酸(色谱级,美国Fisher公司);其余试剂为分析纯。阴性样品所用原药材及主要辅料来源:吴茱萸(批号:20220702)、姜黄(批号:20221001)源于石药(山东)中药饮片有限公司;干姜(批号:20220902)、延胡索(批号:20221002)源于山东万福堂中药饮片有限公司;甘油(批号:20220503)、聚山梨酯-80(批号:20220101)源于江西益普生药业有限公司;液状石蜡(吉林市吉化江城油脂化工有限公司,批号:220102);硬脂酸(湖南芙蓉制药有限公司,批号:220201);蜂蜡(沧州森林蜡业有限公司,批号:20220302);羟苯乙酯(广州市汉普医药有限公司,批号:20220501)。

12批痛经软膏(规格:5 g/支,批号:20200704、20200802、20200807、20200904、20210207、20210308、20210406、20210905、20220206、20220306、20220601、20220602,编号:S1~S12)源于贵州绿太阳制药有限公司。

2 方法与结果

2.1 HPLC-QAMS方法学考察

2.1.1 对照品溶液的配制

精密称取 12 个对照品, 用 75% 甲醇制成混合对照品贮备液(柠檬苦素 $0.3120 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 吴茱萸碱 $0.0980 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 吴茱萸次碱 $0.1560 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 双去甲氧基姜黄素 $1.6700 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 去甲氧基姜黄素 $2.0540 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 姜黄素 $3.7300 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 6-姜辣素 $1.8920 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 8-姜酚 $0.4680 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 10-姜酚 $0.5300 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 延胡索乙素 $0.1840 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 去氢紫堇碱 $0.2700 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和紫堇碱 $0.0720 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。精密吸取贮备液适量, 经 75% 甲醇稀释 20 倍得混合对照品溶液: 柠檬苦素 $15.60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 吴茱萸碱 $4.90 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 吴茱萸次碱 $7.80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 双去甲氧基姜黄素 $83.50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 去甲氧基姜黄素 $102.70 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 姜黄素 $186.50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 6-姜辣素 $94.60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 8-姜酚 $23.40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 10-姜酚 $26.50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 延胡索乙素 $9.20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 去氢紫堇碱 $13.50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和紫堇碱 $3.60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.1.2 供试品溶液和阴性样品溶液的配制

取痛经软膏约 1 g, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 经 75% 甲醇超声提取(功率: 200 W, 频率: 40 kHz) 45 min, 冷却后经溶剂定容, 摇匀, 过滤, 续滤液即为供试品溶液。按痛经软膏质量标准中处方比例, 分别制备痛经软膏阴性样品(缺吴茱萸、缺姜黄、缺干姜、缺延胡索), 并制备相应的阴性样品溶液。

2.1.3 色谱条件

采用 Cosmosil C₁₈ HPLC 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 波长切换: 215 nm (0~15 min 检测柠檬苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱)^[7-11]、425 nm (15~23 min 检测双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素)^[12-15]和 280 nm (23~65 min 检测 6-姜辣素、8-姜酚、10-姜酚、延胡索乙素、去氢紫堇碱、紫堇碱)^[16-19]; 乙腈-0.1% 磷酸^[20]为流动相, 在流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下梯度洗脱(0~10 min, 11.0% 乙腈; 10~19 min, 11.0%→25.0% 乙腈; 19~29 min, 25.0%→45.0% 乙腈; 29~42 min, 45.0%→70.0% 乙腈; 42~54 min, 70.0%→82.0% 乙腈; 54~60 min, 82.0%→11.0%

乙腈); 进样量: 10 μL, 柱温: 30℃。

精密吸取“2.1.1”项下混合对照品溶液及“2.1.2”项下 5 种溶液各 10 μL, 进样检测, 记录色谱图。痛经软膏供试品溶液在对照品溶液相同保留时间处有相应的色谱峰, 且色谱峰峰形对称, 与相邻色谱峰完全分离; 阴性样品则未出现相应的色谱峰(图 1)。

2.1.4 标准曲线与线性范围

精密吸取“2.1.1”项下混合对照品贮备液 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 和 5.0 mL, 置于 6 个 20 mL 量瓶中, 用 75% 甲醇加至刻度线, 制得系列标准曲线溶液 I~VI, 分别按“2.1.3”项下色谱条件进样 10 μL, 记录色谱图, 以对照品浓度为横坐标(X , $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归, 结果见表 1。结果表明, 12 个成分在各自浓度范围内线性关系良好。

2.1.5 精密度试验

取痛经软膏(编号: S1)供试品溶液 1 份, 在上述色谱条件下重复进样 6 次, 测定峰面积, 结果柠檬苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱、双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素、6-姜辣素、8-姜酚、10-姜酚、延胡索乙素、去氢紫堇碱和紫堇碱峰面积的 RSD 分别为 1.20%, 1.38%, 1.32%, 0.95%, 0.87%, 0.59%, 1.02%, 1.19%, 1.21%, 1.32%, 1.25%, 1.46% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验

取痛经软膏(编号: S1)适量, 按“2.1.2”项下方法平行制备供试品溶液 6 份, 测定峰面积, 用外标法(external standard method, ESM)计算得柠檬苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱、双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素、6-姜辣素、8-姜酚、10-姜酚、延胡索乙素、去氢紫堇碱和紫堇碱的含量平均值分别为 0.433 0, 0.094 0, 0.180 0, 2.365 0, 3.076 0, 5.145 0, 2.854 0, 0.517 0, 0.721 0, 0.221 0, 0.298 0, 0.078 0 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 依次为 1.47%, 1.83%, 1.72%, 1.22%, 1.18%, 0.94%, 1.47%, 1.65%, 1.58%, 1.71%, 1.63%, 1.92% ($n=6$), 表明方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验

取痛经软膏(编号: S1)样品, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 制备后室温放置, 并于制备后 0, 2, 5, 9, 14, 20, 24 h 测定峰面积,

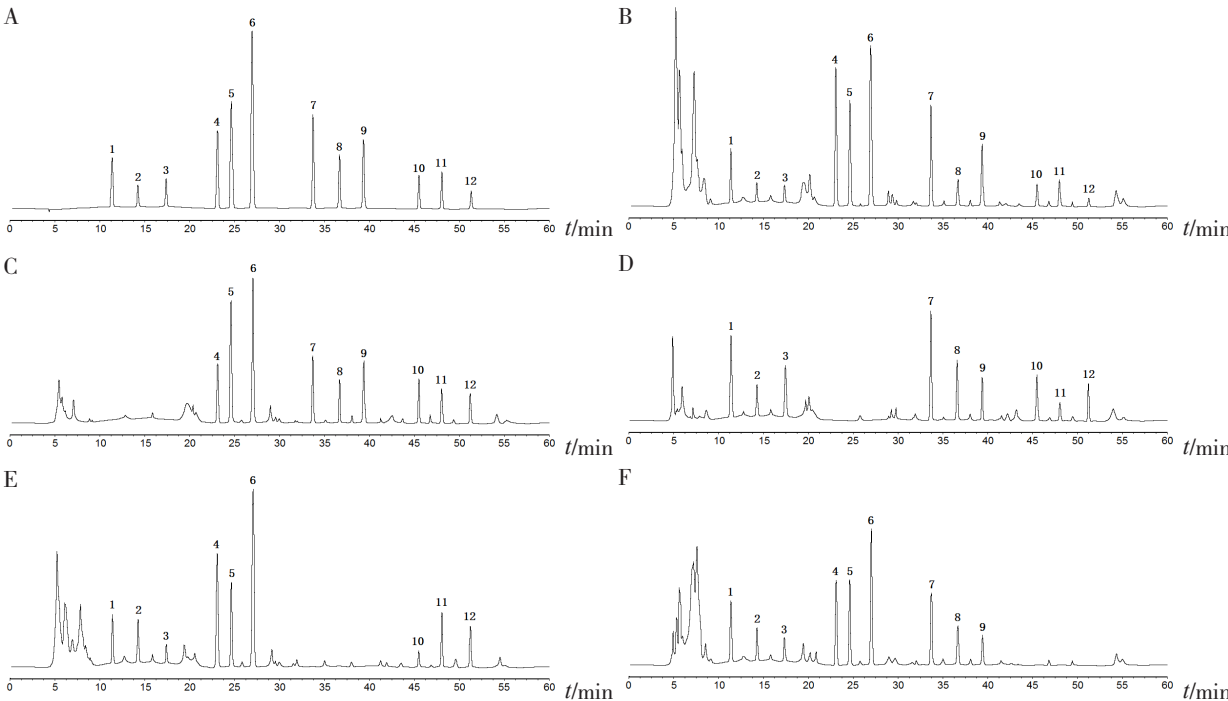


图1 混合对照品 (A)、痛经软膏供试品 (B)、缺吴茱萸阴性样品 (C)、缺姜黄阴性样品 (D)、缺干姜阴性样品 (E)、缺延胡索阴性样品 (F) 的HPLC色谱图

Figure. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), Tongjing ointment test sample (B), sample without euodiae fructus (C), sample without *curcumae longae* rhizoma (D),sample without *zingiberis rhizoma* (E) and sample without *corydalis rhizoma* (F)

注：1.柠檬苦素；2.吴茱萸碱；3.吴茱萸次碱；4.双去甲氧基姜黄素；5.去甲氧基姜黄素；6.姜黄素；7.6-姜辣素；8.8-姜酚；9.10-姜酚；10.延胡索乙素；11.去氢紫堇碱；12.紫堇碱

表1 12个成分的标准曲线和线性范围
Table 1. Standard curves and linear ranges for 12 components

成分	回归方程	线性范围 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	<i>r</i>
柠檬苦素	$Y=5.714\ 6 \times 10^6 X+1324.6$	1.56~78.00	0.999 4
吴茱萸碱	$Y=2.104\ 3 \times 10^6 X+558.5$	0.49~24.50	0.999 3
吴茱萸次碱	$Y=1.928\ 6 \times 10^6 X-1\ 038.9$	0.78~39.00	0.999 6
双去甲氧基姜黄素	$Y=2.249\ 6 \times 10^6 X-735.1$	8.35~417.50	0.999 1
去甲氧基姜黄素	$Y=2.940\ 5 \times 10^6 X+1\ 662.5$	10.27~513.50	0.999 6
姜黄素	$Y=4.236\ 5 \times 10^6 X-1\ 373.8$	18.65~932.50	0.999 3
6-姜辣素	$Y=2.629\ 1 \times 10^6 X+905.7$	9.46~473.00	0.999 4
8-姜酚	$Y=5.3503\ 1 \times 10^6 X-374.8$	2.34~117.00	0.999 7
10-姜酚	$Y=5.883\ 9 \times 10^6 X+1\ 383.1$	2.65~132.50	0.999 1
延胡索乙素	$Y=3.232\ 1 \times 10^6 X-932.4$	0.92~46.00	0.999 6
去氢紫堇碱	$Y=3.520\ 6 \times 10^6 X+248.1$	1.35~67.50	0.999 4
紫堇碱	$Y=1.661\ 2 \times 10^6 X-546.3$	0.36~18.00	0.999 1

结果柠檬苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱、双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素、6-姜辣素、8-姜酚、10-姜酚、延胡索乙素、去氢紫堇碱和紫堇碱峰面积的RSD依次为1.37%，1.51%，1.53%，1.26%，1.12%，0.98%，1.34%，1.58%，1.75%，1.94%，1.81%，1.97%（*n*=7），表明痛经软膏供试品溶液24 h内稳定性良好。

2.1.8 加样回收率试验

取已知 12 个成分含量的痛经软膏（编号：S1）9 份，每份 0.5 g，精密称定后均分成 3 组，分别加入已知含量 80%，100%，120% 的混合对照品溶液（柠檬苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱、双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素、6-姜辣素、8-姜酚、10-姜酚、延胡索乙素、去氢紫堇碱和紫堇碱对照品质量浓度分别为 0.219 0，0.046 0，0.089 0，1.175 0，1.538 0，2.527 0，1.419 0，0.258 0，0.364 0，0.109 0，0.15 0，0.039 0 mg · mL⁻¹），按“2.1.2”项下方法处理后测定，计算回收率，测得 12 个成分的平均加样回收率分别为 98.15%，96.58%，97.86%，99.11%，98.32%，100.19%，98.19%，98.05%，97.92%，97.58%，98.60%，96.78%，RSD 分别为 1.14%，1.25%，1.12%，1.10%，1.13%，0.97%，1.10%，1.03%，1.26%，1.77%，1.54%，1.55%（n=9）。

2.1.9 相对校正因子计算

精密吸取“2.1.4”项下 6 个混合对照品溶液进样，测定峰面积，以姜黄素为内参物，按相对校正因子多点法计算公式 $RCF_{is} = (\rho_i \times A_s) / (\rho_s \times A_i)$ （式中 RCF_{is} 表示相对校正因子， ρ_i 表示内参物浓度， ρ_s 表示其他成分浓度， A_i 表示内参物峰面积， A_s 表示其他成分峰面积）分别计算姜黄素与其他 11 个成分的相对校正因子，结果见表 2。

2.1.10 相对校正因子重现性

精密吸取“2.1.1”项下混合对照品溶液，依法进样，测定峰面积，以姜黄素为内参物，分别计算各成分在不同检测条件下的相对校正因子，

并计算 RSD 值，结果见表 3，不同检测条件对建立的相对校正因子无明显影响（RSD < 2.0%）。

2.1.11 色谱峰定位

记录“2.1.10”项下采用高效液相色谱仪（Primaide 1430 型和 Agilent 1260 型）和色谱柱（Cosmosil C₁₈ 柱、Agilent Eclipse PlusC₁₈柱和 Prevail C₁₈ 柱）时的色谱峰保留时间，以姜黄素为内参物，采用相对保留时间值法对色谱峰进行定位，计算公式为 $t_{is} = \frac{t_s}{t_i}$ （式中 t_{is} 表示相对保留值， t_i 表示姜黄素的保留时间值， t_s 表示待测成分的保留时间值），结果见表 4。

2.2 ESM与QAMS法比较

对 12 批痛经软膏（编号：S1~S12），按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，依法进样，测定峰面积，分别运用 ESM 和 HPLC-QAMS 法计算痛经软膏中 12 个成分的含量，每批样品平行 3 份，结果见表 5。再运用统计软件 SPSS 26.0 对两种方法测得数据进行配对 t 检验，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。结果两种方法测定的含量差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ），表明 HPLC-QAMS 法适用于痛经软膏中 12 个成分的含量测定。

2.3 化学计量学对12批痛经软膏的分析

2.3.1 聚类分析

采用平均联接法，以 Euclidean 距离为测度，运用 SPSS 26.0 软件对 12 批痛经软膏中 12 个化学成分含量数据进行聚类分析（cluster analysis, CA），CA 图见图 2。结果以距离小于 10 为标准，将 12 批痛经软膏分为 3 类，S5、S7、S8 和 S6 为一类，S3、S4、S1 和 S2 为一类，S10、S11、S12 和 S9 为一类。

表2 以姜黄素为内参物的各成分的相对校正因子

Table 2. Relative correction factors of each component with curcumin as the internal reference substance

混合对照 品溶液	柠檬苦素	吴茱萸碱	吴茱萸 次碱	双去甲氧 基姜黄素	去甲氧基 姜黄素	6-姜辣素	8-姜酚	10-姜酚	延胡索 乙素	去氢紫 堇碱	紫堇碱
I	0.748 5	2.015 1	2.235 6	1.891 4	1.472 6	1.628 2	0.802 9	0.709 5	1.344 4	1.220 7	2.562 4
II	0.744 4	2.005 5	2.230 6	1.902 9	1.468 7	1.624 2	0.806 5	0.712 4	1.340 3	1.214 9	2.574 0
III	0.755 0	2.012 5	2.246 0	1.888 4	1.469 6	1.629 0	0.813 5	0.713 7	1.345 5	1.206 8	2.553 6
IV	0.739 6	2.008 9	2.219 7	1.847 9	1.457 4	1.613 3	0.805 7	0.716 2	1.325 8	1.200 1	2.503 9
V	0.735 9	2.017 4	2.152 3	1.904 5	1.408 9	1.596 8	0.770 3	0.726 9	1.279 7	1.199 8	2.580 2
VI	0.742 1	2.012 8	2.202 1	1.881 5	1.444 5	1.613 1	0.794 3	0.719 1	1.314 7	1.203 9	2.547 9
平均值	0.744 2	2.012 0	2.214 4	1.886 1	1.453 6	1.617 4	0.798 9	0.716 3	1.325 1	1.207 7	2.553 7
RSD	0.91	0.21	1.53	1.10	1.67	0.76	1.92	0.87	1.91	0.70	1.07
(%，n=6)											

表3 不同检测条件下各成分的相对校正因子
Table 3. Relative correction factors of each component under different detection conditions

检测条件	柠檬苦素	吴茱萸碱	吴茱萸次碱	双去甲氧基姜黄素	去甲氧基姜黄素	6-姜辣素	8-姜酚	10-姜酚	延胡索乙素	去氢紫堇碱	紫堇碱		
仪器及色谱柱	Primaide 1430	Cosmosil C ₁₈	0.745 1	2.012 9	2.215 0	1.889 4	1.454 1	1.618 8	0.799 3	0.715 9	1.324 3	1.206 5	2.553 1
		Agilent Eclipse Plus C ₁₈	0.759 8	2.015 8	2.229 1	1.896 1	1.457 9	1.623 4	0.802 6	0.723 1	1.329 4	1.213 8	2.561 9
	Agilent 1260	Prevail C ₁₈	0.759 5	2.029 4	2.248 2	1.901 5	1.468 7	1.628 5	0.812 5	0.726 8	1.342 8	1.220 3	2.581 6
		Cosmosil C ₁₈	0.738 9	2.008 7	2.171 3	1.849 3	1.417 3	1.600 3	0.774 2	0.709 7	1.283 6	1.201 4	2.510 1
	Agilent Eclipse Plus C ₁₈	Prevail C ₁₈	0.750 8	2.011 1	2.197 5	1.852 6	1.423 8	1.621 3	0.800 1	0.716 5	1.295 4	1.203 7	2.546 3
		Agilent Eclipse Plus C ₁₈	0.758 2	2.004 9	2.237 6	1.891 8	1.466 1	1.627 1	0.810 5	0.724 8	1.339 7	1.219 5	2.578 4
	平均值	0.752 1	2.013 8	2.216 5	1.880 1	1.448 0	1.619 9	0.799 9	0.719 5	1.319 2	1.210 9	2.555 2	
	RSD (%, n=6)	1.15	0.42	1.28	1.22	1.52	0.63	1.71	0.91	1.84	0.67	1.02	
	流速 (mL·min ⁻¹)	0.8	0.732 9	2.005 4	2.176 1	1.864 2	1.439 7	1.601 4	0.780 4	0.704 5	1.306 1	1.192 5	2.531 7
		1.0	0.743 8	2.013 1	2.215 7	1.885 5	1.453 1	1.616 3	0.798 6	0.716 2	1.324 6	1.207 2	2.552 5
1.2		0.751 6	2.032 8	2.238 9	1.897 3	1.486 5	1.629 3	0.809 3	0.723 8	1.355 1	1.213 4	2.579 1	
平均值		0.742 8	2.017 1	2.210 2	1.882 3	1.459 8	1.615 7	0.796 1	0.714 8	1.328 6	1.204 4	2.554 4	
RSD (%, n=3)		1.26	0.70	1.44	0.89	1.65	0.86	1.84	1.36	1.86	0.89	0.93	
柱温 (℃)	25	0.740 2	2.001 2	2.193 1	1.862 7	1.431 5	1.603 7	0.781 6	0.706 4	1.302 5	1.192 3	2.536 1	
	30	0.743 6	2.012 9	2.215 4	1.885 3	1.453 2	1.615 9	0.798 1	0.715 7	1.323 7	1.206 5	2.551 4	
	35	0.754 7	2.036 1	2.249 2	1.898 6	1.483 5	1.628 5	0.809 3	0.720 1	1.349 2	1.219 2	2.587 5	
	平均值	0.746 2	2.016 7	2.219 2	1.882 2	1.456 1	1.616 0	0.796 3	0.714 1	1.325 1	1.206 0	2.558 3	
	RSD (%, n=3)	1.02	0.88	1.27	0.96	1.79	0.77	1.75	0.98	1.76	1.12	1.03	

表4 仪器及色谱柱对相对保留时间的影响
Table 4. Effects of instruments and chromatographic columns on relative retention time

检测仪器	色谱柱	柠檬苦素	吴茱萸碱	吴茱萸次碱	双去甲氧基姜黄素	去甲氧基姜黄素	6-姜辣素	8-姜酚	10-姜酚	延胡索乙素	去氢紫堇碱	紫堇碱
Primaide 1430	Cosmosil C ₁₈	0.419 0	0.526 3	0.643 7	0.856 3	0.913 0	1.251 0	1.360 3	1.459 5	1.690 3	1.785 4	1.906 9
	Agilent Eclipse Plus C ₁₈	0.423 5	0.529 6	0.658 1	0.863 4	0.921 7	1.263 9	1.372 6	1.468 7	1.705 6	1.796 1	1.929 1
	Prevail C ₁₈	0.424 8	0.539 4	0.660 4	0.879 7	0.938 4	1.281 5	1.397 9	1.486 1	1.719 8	1.812 4	1.941 6
Agilent 1260	Cosmosil C ₁₈	0.405 7	0.510 3	0.631 9	0.841 5	0.901 2	1.240 3	1.351 4	1.442 3	1.681 1	1.779 6	1.884 5
	Agilent Eclipse Plus C ₁₈	0.412 3	0.519 6	0.643 7	0.859 2	0.914 6	1.257 6	1.361 5	1.453 8	1.693 7	1.792 8	1.899 4
	Prevail C ₁₈	0.418 5	0.528 4	0.651 5	0.864 9	0.923 5	1.279 5	1.389 2	1.478 5	1.709 5	1.806 2	1.926 7

续表4

检测仪器	色谱柱	柠檬苦素	吴茱萸碱	吴茱萸碱	吴茱萸次碱	双去甲氧基姜黄素	去甲氧基姜黄素	6-姜辣素	8-姜酚	10-姜酚	延胡索乙素	去氢紫堇碱	紫堇碱
平均值		0.417 3	0.525 6	0.648 2	0.860 8	0.918 7	1.262 3	1.372 2	1.464 8	1.700 0	1.795 4	1.914 7	
RSD (%, n=6)		1.72	1.87	1.64	1.45	1.36	1.28	1.32	1.11	0.83	0.69	1.12	

表5 ESM与QAMS法分别测定痛经软膏中12个成分的含量 ($\bar{x} \pm s$, $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n=3$)
Table 5. Determination of 12 components in Tongjing Ointment by ESM and QAMS ($\bar{x} \pm s$, $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n=3$)

成分	方法	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	t	p
姜黄素	ESM	5.149 ± 0.050	4.740 ± 0.018	5.260 ± 0.029	5.388 ± 0.036	4.231 ± 0.027	4.426 ± 0.022	4.099 ± 0.043	4.014 ± 0.025	5.631 ± 0.019	6.474 ± 0.033	6.730 ± 0.017	6.335 ± 0.026	-	-
柠檬苦素	ESM	0.431 ± 0.003	0.519 ± 0.009	0.433 ± 0.005	0.465 ± 0.004	0.455 ± 0.005	0.329 ± 0.003	0.421 ± 0.005	0.414 ± 0.003	0.343 ± 0.005	0.394 ± 0.005	0.365 ± 0.004	0.353 ± 0.004	0.445	0.661
	QAMS	0.423 ± 0.005	0.507 ± 0.007	0.421 ± 0.006	0.453 ± 0.007	0.443 ± 0.006	0.320 ± 0.003	0.412 ± 0.004	0.403 ± 0.002	0.334 ± 0.004	0.384 ± 0.003	0.357 ± 0.004	0.344 ± 0.004		
吴茱萸碱	ESM	0.095 ± 0.002	0.119 ± 0.002	0.109 ± 0.002	0.098 ± 0.002	0.126 ± 0.003	0.092 ± 0.002	0.087 ± 0.002	0.084 ± 0.002	0.088 ± 0.002	0.075 ± 0.002	0.064 ± 0.001	0.061 ± 0.001	0.249	0.805
	QAMS	0.093 ± 0.001	0.117 ± 0.001	0.106 ± 0.002	0.096 ± 0.001	0.123 ± 0.002	0.090 ± 0.001	0.085 ± 0.001	0.082 ± 0.001	0.086 ± 0.002	0.073 ± 0.001	0.063 ± 0.001	0.060 ± 0.001		
吴茱萸次碱	ESM	0.182 ± 0.002	0.193 ± 0.003	0.239 ± 0.004	0.251 ± 0.003	0.141 ± 0.001	0.146 ± 0.002	0.116 ± 0.002	0.127 ± 0.002	0.259 ± 0.003	0.325 ± 0.003	0.338 ± 0.006	0.289 ± 0.002	0.165	0.870
	QAMS	0.177 ± 0.001	0.188 ± 0.002	0.234 ± 0.003	0.246 ± 0.004	0.137 ± 0.002	0.142 ± 0.002	0.113 ± 0.001	0.124 ± 0.002	0.253 ± 0.004	0.317 ± 0.004	0.330 ± 0.004	0.283 ± 0.002		
双去甲氧基姜黄素	ESM	2.362 ± 0.015	2.651 ± 0.025	3.167 ± 0.019	3.513 ± 0.042	3.802 ± 0.047	3.259 ± 0.028	3.894 ± 0.045	3.412 ± 0.047	2.508 ± 0.025	1.972 ± 0.019	2.134 ± 0.017	1.917 ± 0.016	0.237	0.815
	QAMS	2.298 ± 0.022	2.586 ± 0.023	3.099 ± 0.018	3.437 ± 0.044	3.728 ± 0.039	3.176 ± 0.036	3.801 ± 0.037	3.331 ± 0.036	2.440 ± 0.022	1.922 ± 0.016	2.083 ± 0.015	1.872 ± 0.020		
去甲氧基姜黄素	ESM	3.071 ± 0.016	3.387 ± 0.019	2.954 ± 0.028	2.761 ± 0.023	2.612 ± 0.014	2.681 ± 0.020	2.427 ± 0.025	2.409 ± 0.016	3.817 ± 0.043	4.164 ± 0.040	4.052 ± 0.035	3.982 ± 0.028	0.246	0.808
	QAMS	2.987 ± 0.044	3.306 ± 0.040	2.891 ± 0.031	2.698 ± 0.035	2.541 ± 0.019	2.608 ± 0.018	2.372 ± 0.014	2.463 ± 0.021	3.740 ± 0.040	4.059 ± 0.038	3.979 ± 0.046	3.891 ± 0.026		
6-姜辣素	ESM	2.857 ± 0.029	3.115 ± 0.029	3.409 ± 0.031	3.724 ± 0.026	2.617 ± 0.020	2.934 ± 0.016	2.695 ± 0.013	2.493 ± 0.014	3.974 ± 0.028	4.568 ± 0.039	4.406 ± 0.035	4.124 ± 0.041	0.270	0.790
	QAMS	2.796 ± 0.043	3.033 ± 0.018	3.332 ± 0.036	3.650 ± 0.024	2.545 ± 0.015	2.855 ± 0.011	2.624 ± 0.016	2.438 ± 0.025	3.895 ± 0.033	4.459 ± 0.021	4.321 ± 0.032	4.012 ± 0.044		
8-姜酚	ESM	0.519 ± 0.002	0.489 ± 0.004	0.403 ± 0.003	0.374 ± 0.004	0.297 ± 0.003	0.339 ± 0.002	0.272 ± 0.002	0.311 ± 0.006	0.549 ± 0.005	0.612 ± 0.006	0.726 ± 0.009	0.667 ± 0.005	0.176	0.862
	QAMS	0.505 ± 0.005	0.476 ± 0.003	0.394 ± 0.005	0.365 ± 0.003	0.289 ± 0.003	0.331 ± 0.003	0.265 ± 0.005	0.303 ± 0.005	0.538 ± 0.007	0.598 ± 0.004	0.710 ± 0.008	0.653 ± 0.004		
10-姜酚	ESM	0.723 ± 0.013	0.657 ± 0.009	0.689 ± 0.010	0.673 ± 0.007	0.614 ± 0.006	0.627 ± 0.008	0.592 ± 0.008	0.569 ± 0.005	0.862 ± 0.013	0.947 ± 0.015	0.973 ± 0.012	0.926 ± 0.015	0.291	0.774
	QAMS	0.703 ± 0.011	0.639 ± 0.008	0.671 ± 0.009	0.656 ± 0.008	0.597 ± 0.007	0.611 ± 0.006	0.577 ± 0.008	0.554 ± 0.006	0.847 ± 0.012	0.928 ± 0.014	0.951 ± 0.013	0.908 ± 0.014		
延胡索	ESM	0.217 ± 0.002	0.253 ± 0.002	0.249 ± 0.004	0.245 ± 0.004	0.156 ± 0.001	0.153 ± 0.002	0.169 ± 0.003	0.159 ± 0.002	0.232 ± 0.003	0.184 ± 0.002	0.212 ± 0.002	0.156 ± 0.002	0.268	0.791
	QAMS	0.214 ± 0.003	0.247 ± 0.003	0.243 ± 0.004	0.239 ± 0.003	0.153 ± 0.002	0.150 ± 0.002	0.165 ± 0.003	0.156 ± 0.002	0.227 ± 0.003	0.180 ± 0.001	0.207 ± 0.003	0.152 ± 0.002		
去氢紫堇碱	ESM	0.294 ± 0.005	0.338 ± 0.004	0.325 ± 0.006	0.309 ± 0.005	0.253 ± 0.003	0.259 ± 0.003	0.244 ± 0.003	0.254 ± 0.004	0.394 ± 0.005	0.429 ± 0.006	0.481 ± 0.006	0.415 ± 0.004	0.240	0.812
	QAMS	0.286 ± 0.005	0.331 ± 0.005	0.317 ± 0.006	0.302 ± 0.004	0.246 ± 0.004	0.253 ± 0.003	0.238 ± 0.002	0.247 ± 0.002	0.387 ± 0.006	0.421 ± 0.005	0.470 ± 0.006	0.404 ± 0.005		
紫堇碱	ESM	0.076 ± 0.001	0.088 ± 0.001	0.072 ± 0.001	0.063 ± 0.001	0.041 ± 0.001	0.044 ± 0.001	0.038 ± 0.001	0.035 ± 0.001	0.103 ± 0.001	0.113 ± 0.001	0.122 ± 0.002	0.126 ± 0.002	0.123	0.903
	QAMS	0.074 ± 0.001	0.086 ± 0.001	0.070 ± 0.001	0.062 ± 0.001	0.040 ± 0.001	0.043 ± 0.001	0.039 ± 0.001	0.034 ± 0.001	0.101 ± 0.001	0.110 ± 0.001	0.119 ± 0.002	0.123 ± 0.002		

注: ESM: 外标法; QAMS: 一测多评法

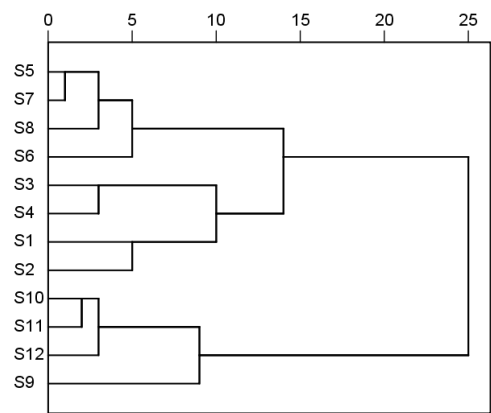


图2 12批样品CA图

Figure 2. CA dendrogram for 12 batches of samples

2.3.2 主成分分析

采用主成分分析（principal component analysis, PCA）法，以 12 批痛经软膏中 12 个化学成分含量为变量，得到 12×12 阶原始数据矩阵，导入 SPSS 26.0 软件进行分析，以特征值大于 1 为提取标准，12 批痛经软膏提取出 2 个主成分（PC₁ 和 PC₂），其中特征值分别为 8.996 和 1.826，方差贡献率分别为 74.966% 和 15.214%，累积方差贡献率达 90.180%，表明选取前 2 个主成分可代表痛经软膏中 12 个化学成分含量 90.180% 的信息量，可反映痛经软膏的综合质量（表 6）。

同时吴茱萸碱、吴茱萸次碱、双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素、6-姜辣素、8-姜酚、10-姜酚、去氢紫堇碱和紫堇碱对 PC₁ 贡献度高，柠檬苦素和延胡索乙素对 PC₂ 贡献度显著（表 7）。再以 PC₁ 和 PC₂ 建立坐标系进行投影得 12 批痛经软膏样品 PCA 得分图（图 3）。结果显示 S9~S12 位于得分图左侧，S1~S4 位于得分图右上侧，S5~S8 位于得分图右下侧，呈现一定分类趋势，与 CA 结果基本一致。

2.3.3 正交偏最小二乘法-判别分析

本试验将 12 批痛经软膏中 12 个化学成分含量数据矩阵导入 SIMCA 14.1 软件，进行正交偏最小二乘法-判别分析（orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA），获得相应模型，该模型具有良好的解释程度和预测能力（ $R^2X=0.987$ ， $R^2Y=0.946$ ， $Q^2=0.848$ ），得分矩阵图见图 4，显示这 12 个成分的含量存在显著差异，且所有样品均在正常范围内分布，未出现异常点。结合模型变量重要性投影（VIP）法，以 VIP > 1 为筛选标准，进一步筛选出 6 个差异标志物（图 5），其中 $VIP_{姜黄素}=1.603\ 4$ ， $VIP_{6-姜辣素}=1.369\ 7$ ， $VIP_{双去甲氧基姜黄素}=1.334\ 3$ ， $VIP_{去甲氧基姜黄素}=1.330\ 5$ ， $VIP_{柠檬苦素}=1.168\ 9$ ， $VIP_{延胡索乙素}=1.009\ 9$ ，表明这 6 个成分是造成痛经软膏质量差异的主要原因。

表6 痛经软膏中主成分方差分析

Table 6. Analysis of variance of principal components in Tongjing Ointment

主成分	初始特征值			提取载荷平方和		
	特征值	方差贡献率（%）	累积方差贡献率（%）	特征值	方差贡献率（%）	累积方差贡献率（%）
1	8.996	74.966	74.966	8.996	74.966	74.966
2	1.826	15.214	90.180	1.826	15.214	90.180
3	0.462	3.852	94.032			
4	0.297	2.479	96.511			
5	0.250	2.081	98.591			
6	0.075	0.624	99.216			
7	0.048	0.397	99.613			
8	0.025	0.205	99.818			
9	0.016	0.137	99.955			
10	0.005	0.039	99.993			
11	0.001	0.007	100.000			
12	-6.977×10^{-17}	-5.814×10^{-16}	100.000			

表7 痛经软膏中12种成分的载荷矩阵表
Table 7. Composition matrix table of 12 components in Tongjing Ointment

成分	主成分	
	1	2
柠檬苦素	-0.445	0.776
吴茱萸碱	-0.674	0.605
吴茱萸次碱	0.946	0.173
双去甲氧基姜黄素	-0.905	-0.017
去甲氧基姜黄素	0.970	0.062
姜黄素	0.975	0.070
6-姜辣素	0.943	0.068
8-姜酚	0.967	0.053
10-姜酚	0.986	-0.083
延胡索乙素	0.207	0.881
去氢紫堇碱	0.979	0.097
紫堇碱	0.971	0.138

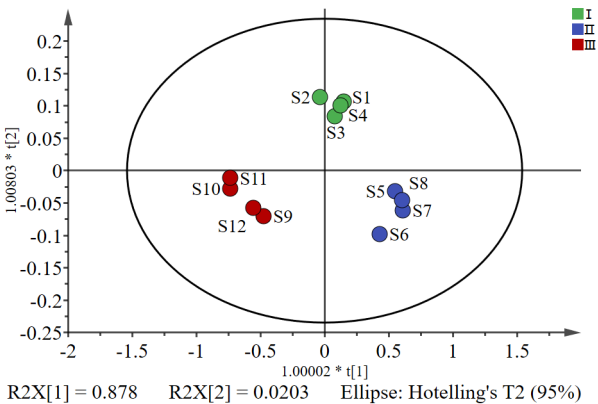


图4 12批痛经软膏样品OPLS-DA模型得分图
Figure 4. Score chart of OPLS-DA model for 12 batches of Tongjing Ointment

2.4 GRA评价体系的建立

分别以 12 批痛经软膏中 12 个化学成分含量数据为参考序列，运用 GRA 法建立相关性数理统计模型，计算关联度。

2.4.1 无量纲化处理

参考文献^[21]对 12 批痛经软膏中柠檬苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱、双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素、6-姜辣素、8-姜酚、10-姜酚、延胡索乙素、去氢紫堇碱和紫堇碱含量数据进行无量纲化处理，得均值化数列，见表 8。

2.4.2 关联系数的计算

以 12 批痛经软膏中各评价指标无量纲化处

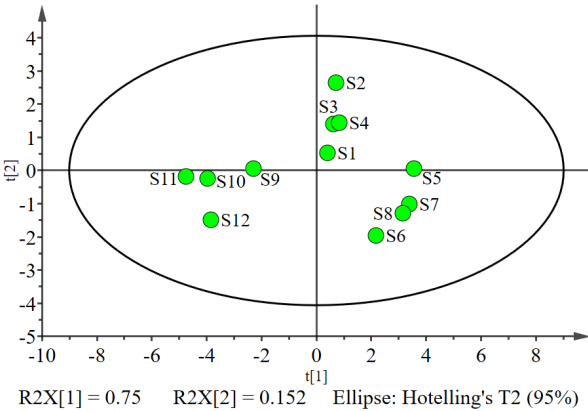


图3 12批痛经软膏的PCA得分图
Figure 3. PCA score chart for 12 batches of Tongjing Ointment

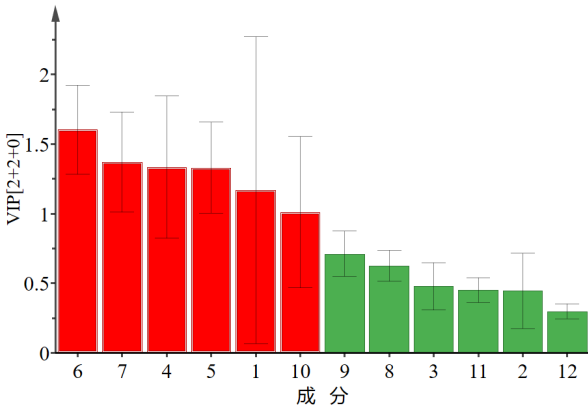


图5 12批痛经软膏样品VIP图
Figure 5. VIP images of 12 batches of Tongjing Ointment

注：1.柠檬苦素；2.吴茱萸碱；3.吴茱萸次碱；4.双去甲氧基姜黄素；5.去甲氧基姜黄素；6.姜黄素；7.6-姜辣素；8.8-姜酚；9.10-姜酚；10.延胡索乙素；11.去氢紫堇碱；12.紫堇碱

理后的最大值为最优参考序列，最小值为最差参考序列，按文献^[22]参考序列关联系数公式（1）、（2）计算各评价单元相对于最优、最差参考序列关联系数和。

$$C_{j(b)}^i = \frac{\Delta_{\min} + \rho \Delta_{\max}}{|Y_{ij} - Y_{sj}| + \rho \Delta_{\max}} \quad \text{公式（1）}$$

$$C_{j(s)}^i = \frac{\Delta'_{\min} + \rho \Delta'_{\max}}{|Y_{ij} - Y_{sj}| + \rho \Delta'_{\max}} \quad \text{公式（2）}$$

其中， $\Delta_{\min} = \min|Y_{ij} - Y_{bj}|$ 、 $\Delta_{\max} = \max|Y_{ij} - Y_{bj}|$ 、 $\Delta'_{\min} = \min|Y_{ij} - Y_{sj}|$ 、 $\Delta'_{\max} = \max|Y_{ij} - Y_{sj}|$ ， ρ 为分辨系数，取值 0.5， $C_{j(b)}^i$ 为各评价单元相对于最优参考序列关联系数， $C_{j(s)}^i$ 为各评价单元相对于最差参考序列关联系数。

2.4.3 关联度及相对关联度的计算

关联度为每批次痛经软膏样品中 12 个组分关联系数的平均值，按公式（3）、（4）计算被评价对象相对于最优、最差参考序列的关联度。再按公式（5）计算被评价对象的相对关联度 R_i 。 R_i 数值越大，样品综合质量最优，反之越差，见表 9。结果 12 批痛经软膏样品相对关联度 0.317 3~0.624 8，S11、S10、S9 和 S12 分别位于排名前 4 位，S2、S3、S4 和 S1 位于排名中间位置，S5、S7、S6

和 S8 位于排名后 4 位。

$$R_{i(b)} = \frac{1}{11} \sum_{j=1}^{11} C_{j(b)}^i$$

公式（3）

$$R_{i(s)} = \frac{1}{11} \sum_{j=1}^{11} C_{j(s)}^i$$

公式（4）

$$R_i = \frac{R_{i(b)}}{R_{i(b)} + R_{i(s)}}$$

公式（5）

其中， $R_{i(b)}$ 为最优参考序列的关联度， $R_{i(s)}$ 为最差参考序列的关联度， R_i 为被评价对象的相对关联度。

表8 痛经软膏中12个组分含量数据的均值化数列

Table 8. The mean value series of the content data of 12 components in Tongjing Ointment

编号	柠檬苦素	吴茱萸碱	吴茱萸次碱	双去甲氧基姜黄素	去甲氧基姜黄素	姜黄素	6-姜辣素	8-姜酚	10-姜酚	延胡索乙素	去氢紫堇碱	紫堇碱
S1	1.057 2	1.039 1	0.834 9	0.816 5	0.955 0	0.989 0	0.839 6	1.116 5	0.976 1	1.100 8	0.879 5	0.985 4
S2	1.267 2	1.307 3	0.886 8	0.918 8	1.056 9	0.910 4	0.910 8	1.052 4	0.887 3	1.270 6	1.017 8	1.145 1
S3	1.052 2	1.184 4	1.103 8	1.101 1	0.924 3	1.010 3	1.000 6	0.871 1	0.931 7	1.250 0	0.974 8	0.932 1
S4	1.132 2	1.072 6	1.160 4	1.221 2	0.862 6	1.034 9	1.096 1	0.807 0	0.910 9	1.229 4	0.928 7	0.825 6
S5	1.107 2	1.374 3	0.646 2	1.324 6	0.812 4	0.812 7	0.764 3	0.639 0	0.828 9	0.787 0	0.756 5	0.532 6
S6	0.799 8	1.005 6	0.669 8	1.128 5	0.833 8	0.850 1	0.857 4	0.731 8	0.848 4	0.771 6	0.778 0	0.572 6
S7	1.029 7	0.949 7	0.533 0	1.350 6	0.758 3	0.787 3	0.788 0	0.585 9	0.801 2	0.848 8	0.731 9	0.519 3
S8	1.007 2	0.916 2	0.584 9	1.183 6	0.787 4	0.771 0	0.732 1	0.669 9	0.769 2	0.802 5	0.759 5	0.452 7
S9	0.834 8	0.960 9	1.193 4	0.867 0	1.195 7	1.081 6	1.169 7	1.189 5	1.176 1	1.167 7	1.190 0	1.344 9
S10	0.959 8	0.815 6	1.495 3	0.682 9	1.297 7	1.243 5	1.339 0	1.322 1	1.288 5	0.925 9	1.294 6	1.464 7
S11	0.892 3	0.703 9	1.556 6	0.740 1	1.272 1	1.292 6	1.297 6	1.569 8	1.320 5	1.064 8	1.445 3	1.584 6
S12	0.859 8	0.670 4	1.334 9	0.665 2	1.244 0	1.216 8	1.204 8	1.443 7	1.260 8	0.781 9	1.242 3	1.637 8

表9 12批痛经软膏相对关联度排序结果

Table 9. Ranking results of relative correlation degree of 12 batches of Tongjing Ointment

编号	与最优参考序列关联度	与最差参考序列关联度	相对关联度	排序
S1	0.462 3	0.572 1	0.446 9	8
S2	0.578 5	0.514 5	0.529 3	5
S3	0.524 3	0.518 7	0.502 7	6
S4	0.532 2	0.528 7	0.501 6	7
S5	0.472 8	0.750 7	0.386 4	9
S6	0.391 4	0.770 7	0.336 8	11
S7	0.420 2	0.811 6	0.341 1	10
S8	0.387 3	0.833 3	0.317 3	12
S9	0.575 9	0.483 9	0.543 4	3
S10	0.695 8	0.478 7	0.592 4	2
S11	0.778 9	0.467 8	0.624 8	1
S12	0.635 4	0.560 9	0.531 1	4

3 讨论

对于痛经软膏供试品溶液的制备方法, 本试验考察了提取溶剂(70% 乙醇、乙醇、75% 甲醇、甲醇)、提取方式(超声、回流)、提取时间(30, 45, 60 min), 结果发现 75% 甲醇超声提取 45 min 时, 所测 12 种成分的响应值均较高, 同时色谱峰分离度与峰形均较好, 故以 75% 甲醇超声提取 45 min 为痛经软膏供试品最佳提取方式。对于流动相的选择, 本试验先后对比了柱压较低的乙腈为有机相的体系: 乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸、乙腈-0.1% 甲酸、乙腈-0.1% 冰醋酸, 结果发现当乙腈-0.1% 磷酸为流动相时, 12 个成分峰形较好, 峰面积较大, 分离度较高, 基线平稳。

痛经软膏由吴茱萸、姜黄、干姜和延胡索组方而成, 方中的吴茱萸温中散寒, 延胡索止痛, 干姜治胃寒呕吐、脘腹冷痛, 姜黄破血行气、通经止痛; 诸药合用, 共奏活血散寒、调经止痛之功效。本文选取吴茱萸活性成分柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱, 姜黄特征性成分双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素和姜黄素, 干姜主要活性成分 6-姜辣素、8-姜酚和 10-姜酚, 延胡索代表成分延胡索乙素、去氢紫堇碱和紫堇碱为目标成分, 同时姜黄素在该制剂中含量最高, 也是姜黄药材中含量最高的姜黄素类成分, 其对照品较易获得, 故本试验选择姜黄素作为内参物。

本试验以姜黄素为内参物, 采用 HPLC-QAMS 法同时检测痛经软膏中柠檬苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱、双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素、6-姜辣素、8-姜酚、10-姜酚、延胡索乙素、去氢紫堇碱和紫堇碱含量, HPLC-QAMS 计算值与 ESM 实测值差异无统计学意义($P > 0.05$), 所建立的方法操作便捷、结果准确。

化学计量学将 12 批样品聚为 3 类, 同时挖掘出姜黄素、6-姜辣素、双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、柠檬苦素和延胡索乙素对痛经软膏质量影响较大。GRA 模型综合评价结果显示 S9~S12 位于排序前 4 位, S1~S4 位于排序中间位置, S5~S8 位于排序后 4 位。化学计量学结合 GRA 综合评价模型全面可靠, 避免了人为主观性, 有助于药品生产企业结合原药材来源及制剂生产过程控制等参数挖掘各评价指标在生产过程中的

转化率, 进一步稳定原药材种属、产地等, 完善痛经软膏制剂生产过程控制参数, 最终达到痛经软膏产品质量的稳定性和疗效的一致性, 化学计量学结合 GRA 综合评价模型可作为源痛经软膏质量优劣的综合评价方法。

参考文献

- 1 张恺, 张永太, 冯年平. 中药脐部给药制剂的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(9): 1652-1658. [Zhang K, Zhang YT, Feng NP. Research progress on Chinese medicines with topical administration in umbilical region[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2017, 42(9): 1652-1658.] DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20170223.004.
- 2 国家食品药品监督管理总局标准 WS-11402(ZD-1402)-2002-2012Z[S]. 2012.
- 3 黄家宇, 李莉, 饶光玲. HPLC 测定痛经软膏中延胡索乙素的含量[J]. 华西药学杂志, 2006, 21(5): 478-479. [Huang JY, Li L, Rao GL. Determination of tetrahydropalmatine in Tongjing cream by HPLC[J]. West China Journal of Pharmaceutical Science, 2006, 21(5): 478-479.] DOI: 10.3969/j.issn.1006-0103.2006.05.026.
- 4 闫艳, 杜晨晖. 一测多评法在中药质量控制中的应用及研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(6): 2378-2387. [Yan Y, Du CH. Recent advances in quantitative analysis of multi-components by single marker on quality control of traditional Chinese medicine[J]. Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology, 2022, 24(6): 2378-2387.] DOI: 10.11842/wst.20210430005.
- 5 于洋, 李军, 李宝国. 化学计量学在中药质量控制研究中的应用[J]. 中成药, 2018, 40(5): 1139-1142. [Yu Y, Li J, Li BG. Application of chemometrics in quality control of traditional Chinese medicine[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2018, 40(5): 1139-1142.] DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2018.05.028.
- 6 李力, 潘倩雯, 刘宏. 灰色关联度分析法在中药谱效学研究中的应用[J]. 中国药房, 2018, 29(11): 1581-1584. [Li L, Pan QW, Liu H. Application of grey relational analysis in the study of spectrum-effect of traditional Chinese medicine[J]. China Pharmacy, 2018, 29(11): 1581-1584.] DOI: 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.11.33.
- 7 周劲松, 陈俊禧, 罗文英, 等. 泡吴茱萸中吴茱萸

- 碱·吴茱萸次碱和柠檬苦素含量测定方法研究[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(16): 188–191. [Zhou JS, Chen JX, Luo WY, et al. Determination of evodiamine, rutaecarpin and limonin in *Evodia rutaecarpa*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2020, 48(16): 188–191.] DOI: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.16.053.
- 8 张媛媛, 彭智祥, 陈超, 等. 基于中医药配伍理论吴茱萸有效成分含量测定及配比关系研究[J]. 实用中西医结合临床, 2022, 22(13): 122–128. [Zhang YY, Peng ZX, Chen C, et al. Study on the content determination and proportioning relationship of effective components in *Evodia rutaecarpa* based on the compatibility theory of traditional Chinese medicine[J]. Practical Clinical Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2022, 22(13): 122–128.] DOI: 10.13638/j.issn.1671-4040.2022.13.034.
- 9 伍秀珠, 罗丽, 蔡鑫坤, 等. 广东乐昌地区栽培吴茱萸质量及其影响因素研究[J]. 中药材, 2021, 44(1): 59–63. [Wu XZ, Luo L, Cai XK, et al. Study on the quality of cultivated *Evodia rutaecarpa* and its influencing factors in Lechang, Guangdong[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2021, 44(1): 59–63.] DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2021.01.011.
- 10 芮梦珏, 俞桂新. 一标多测法测定橘核中五种柠檬苦素类成分的含量[J]. 上海中医药大学学报, 2020, 34(4): 87–92. [Rui MJ, Chou GX. Content determination of five limonoids in *Citri Reticulatae* Semen by quantitative analysis of multi-components with single marker[J]. Academic Journal of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 2020, 34(4): 87–92.] DOI: 10.16306/j.1008-861x.2020.04.015.
- 11 温英丽, 李捷, 范天慈, 等. 基于指纹图谱及含量测定的吴茱萸“陈久者良”实验研究[J]. 中药材, 2021, 44(4): 842–847. [Wen YL, Li J, Fan TC, et al. Experimental study on *Fructus Evodiae* “Chenjiuzheliang” based on fingerprint and content determination[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2021, 44(4): 842–847.] DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2021.04.013.
- 12 孔文茹, 李菲菲, 尤钰琳, 等. HPLC 同时测定姜黄醒酒饮料中 3 种姜黄素含量[J]. 食品与药品, 2022, 24(6): 523–526. [Kong WR, Li FF, You YL, et al. Simultaneous determination of three curcumins in Turmeric sobering beverage by HPLC[J]. Food and Drug, 2022, 24(6): 523–526.] DOI: 10.3969/j.issn.1672-979X.2022.06.009.
- 13 吴妙鸿, 方灵, 司瑞茹, 等. 5 种市售姜黄素产品功能成分含量及抗氧化活性分析[J]. 福建农业科技, 2022, 53(8): 61–67. [Wu MH, Fang L, Si RR, et al. Analysis of functional components and antioxidant activity of five kinds of commercial Curcumin products[J]. Fujian Agricultural Science and Technology, 2022, 53(8): 61–67.] DOI: 10.13651/j.cnki.fjnykj.2022.08.010.
- 14 谢元昊, 罗冰, 李青苗, 等. 一测多评法测定姜黄中 3 种姜黄素类成分的含量[J]. 四川中医, 2021, 39(7): 27–31. [Xie YH, Luo B, Li QM, et al. Simultaneous quantitative determination of three compositions of curcuminoids in *Curcuma longa* L. by QAMS[J]. Journal of Sichuan of Traditional Chinese Medicine, 2021, 39(7): 27–31.] <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/ChlQZXJpb2RpY2FsQ0hJTmV3UzIwMjMwNDI2Eg1zY3p5MjAyMTA3MDEwGgh5emhsdmZrYg%3D%3D>.
- 15 贾锬镒, 刘文清, 马丽婷, 等. 多波长 HPLC 内标法同时测定姜黄油树脂中 5 种成分的含量[J]. 化学研究与应用, 2022, 34(11): 2765–2770. [Jia SS, Liu WQ, Ma LT, et al. Simultaneous determination of five components in Turmeric oleoresin by multi-wavelength HPLC internal standard method[J]. Chemical Research and Application, 2022, 34(11): 2765–2770.] DOI: 10.3969/j.issn.1004-1656.2022.11.022.
- 16 余永红, 杨德泉. HPLC 法测定煨姜中 6-姜辣素的含量[J]. 药品评价, 2021, 18(22): 1378–1381. [She YH, Yang DQ. Determination of 6-gingerol in Stewed Ginger by HPLC[J]. Drug Evaluation, 2021, 18(22): 1378–1381.] DOI: 10.19939/j.cnki.1672-2809.2021.22.10.
- 17 易徐航, 张钰祺, 杨恢检, 等. HPLC 法测定妇康乐颗粒中延胡索乙素的含量[J]. 药品评价, 2022, 19(11): 644–647. [Yi XH, Zhang YQ, Yang HJ, et al. Contents determination of tetrahydropalmatine in Fukangle Granules by HPLC[J]. Drug Evaluation, 2022, 19(11): 644–647.] DOI: 10.19939/j.cnki.1672-2809.2022.11.02.
- 18 张桐, 李凯, 曹晓燕, 等. 不同气候因素对延胡索中 8 种生物碱含量的影响[J]. 陕西农业科学, 2022, 68(5): 46–50, 72. [Zhang T, Li K, Cao XY, et al. Effects of different climate factors on contents of eight alkaloids in *Corydalis Rhizoma*[J]. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences, 2022, 68(5): 46–50, 72.] DOI: 10.3969/j.issn.0488-5368.2022.05.010.

- 19 崔秋兵, 张楠, 由耀辉, 等. 泡姜中 5 种姜辣素的 HPLC 含量测定 [J]. 食品发酵与科技, 2022, 58(4): 144–147. [Cui QB, Zhang N, You YH, et al. Content determination of five gingerols in Pickled Ginger by HPLC[J]. Food and Fermentation Science & Technology, 2022, 58(4): 144–147.] DOI: 10.3969/j.issn.1674–506X.2022.04–025.
- 20 涂勋良, 张利, 秦帆, 等. HPLC 法测定不同产地和品种柠檬果皮中柠檬苦素和诺米林含量 [J]. 广西植物, 2020, 40(5): 744–750. [Tu XL, Zhang L, Qin F, et al. Determination of limomin and nomilin of different varieties of lemon peel from different areas by HPLC[J]. Guihaia, 2020, 40(5): 744–750.] DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201901020.
- 21 黄广伟, 陈淮臣, 刘渝, 等. 基于灰色关联度和偏最小二乘回归分析的芩苏胶囊抑菌谱效关系研究 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(6): 1060–1069. [Huang GW, Chen HC, Liu Y, et al. Research on spectrum–effect relationship of bacteriostasis in Qinsu Capsule based on grey correlation degree and partial least squares regression analysis[J]. Drug Evaluation Research, 2022, 45(6): 1060–1069.] DOI: 10.7501/j.issn.1674–6376.2022.06.007.
- 22 范耀耀, 罗宇琴, 李国卫, 等. 基于灰色关联度分析与 TOPSIS 模型的不同产地射干标准汤剂质量评价 [J]. 中药材, 2022, 45(3): 659–663. [Fan YY, Luo YQ, Li GW, et al. Quality evaluation of Shegan standard decoction from different producing areas based on grey correlation analysis and TOPSIS model[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2022, 45(3): 659–663.] DOI: 10.13863/j.issn1001–4454.2022.03.024.

收稿时间: 2023 年 05 月 06 日 修回时间: 2023 年 09 月 08 日

本文编辑: 周璐敏 钟巧妮