

基于 UPLC 指纹图谱结合化学模式识别的肚痛丸质量控制

尚 晓， 曾 瑚 瑚， 陈 烨， 王 英， 黄 晓 君， 范 春 林*， 叶 文 才*
(暨南大学中药及天然药物研究所, 广东省中药药效物质基础与创新药物研究重点实验室, 广东 广州 510632)

摘要: **目的** 基于 UPLC 指纹图谱结合化学模式识别对肚痛丸质量进行控制。**方法** 该药物甲醇提取液的分析采用 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 流动相水 (含 0.1% 甲酸) - 甲醇, 梯度洗脱; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 40 ℃; 检测波长 254 nm。建立 UPLC 指纹图谱, 通过主成分分析 (PCA)、正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 进行分析。**结果** 40 批样品中有 10 个共有峰, 相似度均大于 0.99, 并聚为 2 类, 芸香柚皮苷、香蜂草苷、piperonaline 为主要差异性成分。**结论** 该方法简便快速、重复性好, 可为肚痛丸质量标准的制定提供依据。

关键词: 肚痛丸; UPLC 指纹图谱; 主成分分析 (PCA); 正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA)

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)12-3450-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.12.036

肚痛丸由干姜、豆蔻 (去壳)、肉桂、枳实 (麸炒)、木香、乌药、厚朴 (姜制)、砂仁、荜茇、罂粟壳 10 味药材组成, 具有温中散寒, 理气止痛的功效, 临床上主要用于寒凝气滞所致的腹中冷痛、胸胁胀闷、呕逆吐酸等症, 其质量标准收载于《中华人民共和国卫生部药品标准》(中药成方制剂第六册), 但仅有外观、性状、水分、重量差异等丸剂项下常规检查项目^[1], 仅文献 [2] 采用 GC 法同时测定其中 6 种成分的含量。因此, 本实验建立肚痛丸 UPLC 指纹图谱, 并结合主成分分析 (PCA)、正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 进行综合分析, 以期为该制剂稳定性评价及质量标准提高提供依据^[3-11]。

1 材料

ACQUITY UPLC H-Class 超高效液相色谱仪 [沃特世科技 (上海) 有限公司]; Agilent 6540 UHD Accurate-Mass Q-TOF 高分辨四级杆-飞行时间质谱仪 (美国安捷伦公司), 配置标准电喷雾离子源 (ESI)、MassHunter Acquisition 色谱工作站、Qualitative Analysis 数据处理软件; BX8200HP 型超声仪 (上海新苗医疗器械制造有限公司); EX225DZH 型电子天平 [0.01 mg, 奥豪斯仪器 (常州) 有限公司]。色谱纯甲醇、乙腈 (山东禹王和天下新材料有限公司);

质谱纯甲醇、乙腈 (德国 Merck 公司); 质谱纯甲酸 [阿拉丁试剂 (上海) 有限公司]; 水为 Milli-Q 超纯水 (美国 Millipore 公司)。

橙皮苷 (批号 wkq19013105)、香蜂草苷 (批号 wkq19010204)、胡椒碱 (批号 wkq18050704)、和厚朴酚 (批号 wkq19022708)、厚朴酚 (批号 wkq19022605) 对照品均购于四川省维克奇生物科技有限公司; 芸香柚皮苷 (批号 181009) 对照品购于成都植标化纯生物技术有限公司, 纯度均≥98%。40 批肚痛丸来源于广州白云山中一药业有限公司, 具体信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱、质谱条件

2.1.1 色谱 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 流动相水 (含 0.1% 甲酸) (A) - 甲醇 (B), 梯度洗脱 (0~3 min, 5%~35% B; 3~12 min, 35%~53% B; 12~13 min, 53%~65% B; 13~24 min, 65%~80% B; 24~27 min, 80%~95% B; 27~35 min, 95% B); 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 40 ℃; 检测波长 254 nm; 进样量 2 μL。

2.1.2 质谱 电喷雾离子源 (ESI), 正、负离子模式, 扫

收稿日期: 2020-08-07
基金项目: 国家重点研发计划“中医药现代化研究”重点专项资助 (2017YFC1703800); 广东省医学科学技术研究基金项目 (A2017373)
作者简介: 尚 晓 (1994—), 女, 硕士生, 研究方向为中药及天然药物化学。E-mail: sx1175082385@163.com
* 通信作者: 范春林 (1979—), 男, 博士, 硕士生导师, 研究方向为中药及天然药物化学。Tel: (020) 85222653, E-mail: jnuchunlin@163.com
叶文才 (1962—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药及天然药物化学。Tel: (020) 85220004, E-mail: chywc@aliyun.com
网络出版日期: 2020-12-17
网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20201217.0949.002.html>

表 1 样品信息

编号	批号	编号	批号	编号	批号	编号	批号
S1	X1701	S11	X1802	S21	Y1805	S31	W1605
S2	X1702	S12	X1803	S22	Y1806	S32	W1606
S3	X1703	S13	X1804	S23	Y1807	S33	W1607
S4	X1704	S14	X1805	S24	Y1808	S34	W1608
S5	X1705	S15	X1806	S25	Y1809	S35	W1609
S6	X1706	S16	X1807	S26	X1808	S36	W1610
S7	X1707	S17	Y1801	S27	W1601	S37	W1611
S8	X1708	S18	Y1802	S28	W1602	S38	W1612
S9	X1709	S19	Y1803	S29	W1603	S39	W1613
S10	X1801	S20	Y1804	S30	W1604	S40	W1614

注:批号 W 开头为 2016 年生产,X 开头为 2017 年生产,Y 开头为 2018 年生产。

描范围 m/z 100~1 500;干燥器体积流量 8.0 L/min,温度 325 ℃;雾化器压力 35 psi (1 psi=0.133 kPa);锥孔电压 75 V;毛细管电压 4 000 V(+)、3 500 V(-)。数据处理工作站采用 Agilent MassHunter Qualitative Analysis B.06.00。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 取芸香柚皮苷、橙皮苷、香蜂草苷、胡椒碱、和厚朴酚、厚朴酚对照品各约 10 mg,置于 10 mL 量瓶中,甲醇稀释至刻度,摇匀,得贮备液 (1 mg/mL),取 1 mL 置于 10 mL 量瓶中,甲醇稀释至刻度,摇匀,即得 (每 1 mL 含 100 μg 该成分)。

2.2.2 供试品溶液 取丸剂适量,研细,取粉末约 1.0 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,加入甲醇 50 mL,密塞,称定质量,超声 (100 Hz) 处理 60 min,冷却至常温,甲醇补足减失的质量,摇匀,静置,取上清液适量,置于 2 mL 离心管中,离心 (13 000 r/min) 20 min,即得。

2.3 参照峰确定 由于 6 号峰 (厚朴酚) 与其他色谱峰分

离度良好,保留时间、峰面积适中,故选择其作为参照峰 (S)。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取丸剂 (批号 X1708) 粉末约 1.0 g,精密称定,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.1.1”项色谱条件下进样测定 6 次,每次 2 μL,测得各共有峰相对保留时间 RSD 均小于 1%,相对峰面积 RSD 均小于 3.0%,表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取丸剂 (批号 X1708) 粉末约 1.0 g,精密称定,按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,在“2.1.1”项色谱条件下进样测定,每次 2 μL,测得各共有峰相对保留时间 RSD 均小于 1%,相对峰面积 RSD 均小于 3.0%,表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取丸剂 (批号 X1708) 粉末约 1.0 g,精密称定,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,于 0、2、4、8、12、24 h 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定,每次 2 μL,测得各共有峰相对保留时间 RSD 均小于 1%,相对峰面积 RSD 均小于 3.0%,表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5 UPLC 指纹图谱建立

2.5.1 共有峰标定 取 40 批丸剂粉末,每批 1.0 g,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.1.1”项色谱条件下进样测定,指纹图谱见图 1。将其以 CDF 格式导入“中药色谱指纹图谱相似度评级系统”(2012 版),采用中位数法,设定时间窗为 0.1,6 号峰 (厚朴酚) 为参照峰,经多点校正自动匹配后生成对照 UPLC 指纹图谱,选择图谱中峰面积较大、分离度较好的色谱峰作为共有峰,结果共标定出 10 个。

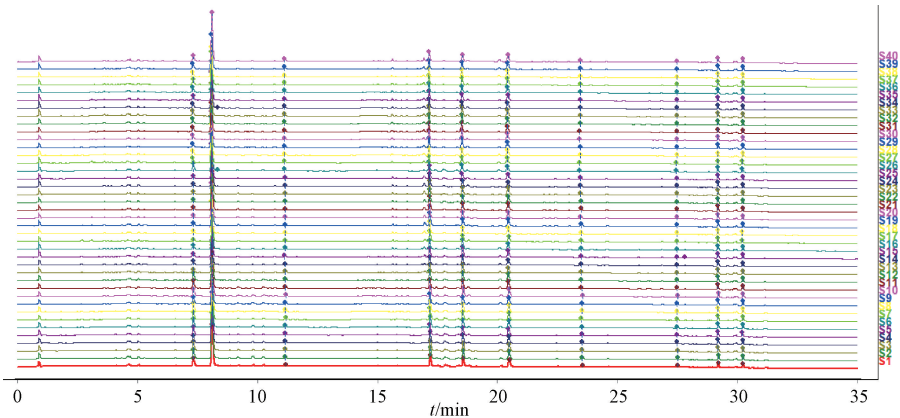


图 1 40 批样品 UPLC 指纹图谱

2.5.2 共有峰指认 在“2.1”项条件下通过 UPLC-Q-TOF-MS 技术对色谱峰进行鉴定,通过紫外吸收光谱、精确分子量信息、相关文献数据初步鉴定了 10 个共有峰,其中 1~6 号峰经对照品确认,结果见图 2~3、表 2。

2.5.3 相似度评价 以图 3 为参照,计算各批样品相似度,结果见表 3,可知均大于 0.990,表明不同样品之间的

一致性较好。以 6 号峰 (厚朴酚) 为参照峰,测得各共有峰相对保留时间 RSD 均小于 1.0%,但相对峰面积 RSD 在 13%~34%之间,其中 1、3、7 号峰相差最大 (RSD 均大于 21%),见表 4,表明各成分含量在不同批次样品中存在一定差异。

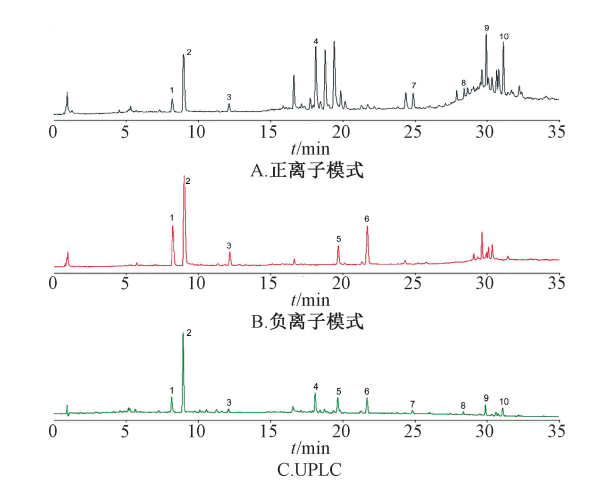


图 2 样品正、负离子 TIC 图及 UPLC 图

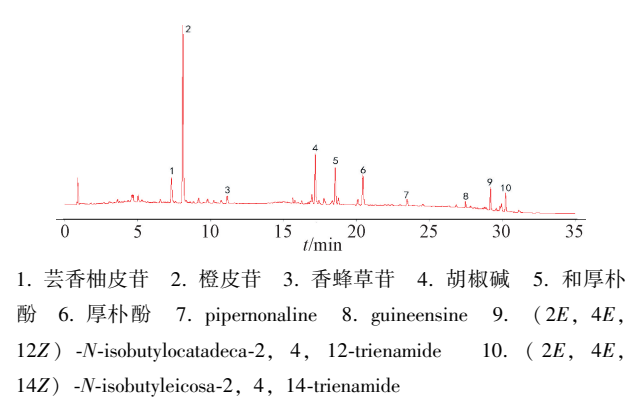


图 3 样品对照 UPLC 色谱图

2.6 化学模式识别

2.6.1 主成分分析（PCA） 将 40 批样品 10 个共有峰的

表 2 共有峰鉴定结果

峰号	t_{R}/min	成分	化学式	准分子离子	MS			定性依据
					理论值	实测值	误差 ($\times 10^{-6}$)	
1	7.361	芸香柚皮苷	$\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_{14}$	$[\text{M}+\text{H}]^{+}$	581.186 5	581.186 6	-0.2	对照品
				$[\text{M}-\text{H}]^{-}$	579.171 9	579.173 3	-2.36	
2	8.127	橙皮苷	$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_{15}$	$[\text{M}+\text{H}]^{+}$	611.197 0	611.197 4	-0.58	对照品
				$[\text{M}-\text{H}]^{-}$	609.182 5	609.183 7	-1.98	
3	11.138	香蜂草苷	$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_{14}$	$[\text{M}+\text{H}]^{+}$	595.202 1	595.202 9	-1.29	对照品
				$[\text{M}-\text{H}]^{-}$	593.187 3	593.189 0	-2.39	
4	17.112	胡椒碱	$\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_3$	$[\text{M}+\text{H}]^{+}$	286.143 8	286.144 7	-3.26	对照品
5	18.475	和厚朴酚	$\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_2$	$[\text{M}-\text{H}]^{-}$	265.123 4	265.123 8	-1.49	对照品
6	20.352	厚朴酚	$\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_2$	$[\text{M}-\text{H}]^{-}$	267.138 0	267.138 8	-3.17	对照品
7	23.403	piperonaline	$\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{NO}_3$	$[\text{M}+\text{H}]^{+}$	342.206 4	342.207 3	-2.73	[12]
8	27.453	guineensine	$\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{NO}_3$	$[\text{M}+\text{H}]^{+}$	384.253 3	384.254 0	-1.77	[13]
9	29.190	(2E,4E,12Z)-N-	$\text{C}_{22}\text{H}_{39}\text{NO}$	$[\text{M}+\text{H}]^{+}$	334.310 4	334.311 3	-2.58	[14]
10	30.236	isobutylcatadeca-2,4,12-trienamide	$\text{C}_{24}\text{H}_{43}\text{NO}$	$[\text{M}+\text{H}]^{+}$	362.341 7	362.342 8	-2.83	[15]
		(2E,4E,14Z)-N-isobutyleicosa-2,4,14-trienamide						

表 3 40 批样品相似度测定结果

批号	相似度	批号	相似度	批号	相似度	批号	相似度
S1	0.998	S11	0.997	S21	0.995	S31	0.994
S2	0.997	S12	0.998	S22	0.994	S32	0.997
S3	0.995	S13	0.997	S23	0.995	S33	0.994
S4	0.999	S14	0.991	S24	0.993	S34	0.999
S5	0.998	S15	0.990	S25	0.993	S35	0.998
S6	0.998	S16	0.996	S26	0.996	S36	0.999
S7	0.999	S17	0.995	S27	0.993	S37	0.999
S8	0.998	S18	0.994	S28	0.999	S38	0.997
S9	0.999	S19	0.995	S29	0.995	S39	0.999
S10	0.998	S20	0.995	S30	0.991	S40	0.994

峰面积进行标准化处理，得到 10 阶×40 阶数据矩阵，导入 SIMCA 13.0 软件中，得到方差贡献率。结果，第一、第二、第三主成分贡献率分别为 46.8%、31.9%、9.8%，累积贡献率达 88.5%，可反映指纹图谱共有峰的基本信息，再对其峰面积适当权重后进行 PCA 分析，结果见图 4。由

此可知，各样品可聚为 2 类，S1~S16、S26~S40 为Ⅰ类，S17~S25 为Ⅱ类，并且Ⅱ类中 1、3 号峰相对峰面积明显小于Ⅰ类，4、7 号峰相对峰面积明显大于Ⅰ类，可能是样品聚为 2 类的主要原因。

表 4 40 批样品共有峰相对峰面积测定结果

样品	1	2	3	4	5	6(S)	7	8	9	10
S1	1.069 3	4.668 3	0.234 2	1.240 7	0.961 3	1.000 0	0.207 5	0.128 6	0.463 0	0.410 9
S2	1.109 8	5.316 3	0.243 4	1.222 6	0.928 6	1.000 0	0.202 3	0.126 9	0.439 2	0.393 7
S3	1.228 3	5.931 9	0.270 0	1.206 7	0.968 1	1.000 0	0.177 5	0.126 9	0.480 3	0.426 1
S4	0.972 3	4.594 9	0.213 7	1.239 1	0.955 3	1.000 0	0.209 3	0.131 8	0.462 6	0.407 2
S5	1.024 1	5.026 4	0.236 6	1.200 4	0.928 5	1.000 0	0.204 0	0.129 1	0.444 7	0.399 3
S6	1.094 0	5.309 8	0.243 3	1.195 8	0.947 8	1.000 0	0.176 4	0.120 8	0.469 5	0.418 8
S7	0.961 3	4.641 4	0.215 3	1.227 0	0.956 5	1.000 0	0.211 6	0.133 5	0.467 1	0.413 5
S8	1.061 6	5.261 0	0.246 7	1.214 0	0.948 3	1.000 0	0.207 4	0.130 5	0.452 6	0.409 0
S9	1.004 7	4.853 8	0.228 1	1.185 9	0.961 1	1.000 0	0.178 4	0.120 9	0.477 8	0.425 0
S10	1.004 7	4.853 8	0.228 1	1.185 9	0.961 1	1.000 0	0.178 4	0.120 9	0.477 8	0.425 0
S11	1.020 1	4.995 5	0.228 8	1.036 2	0.993 0	1.000 0	0.147 6	0.105 4	0.444 2	0.394 3
S12	0.940 1	4.469 9	0.206 7	1.001 7	0.952 2	1.000 0	0.142 3	0.101 7	0.427 0	0.380 4
S13	0.605 5	4.583 1	0.255 7	1.294 1	1.371 6	1.000 0	0.177 8	0.121 4	0.571 4	0.438 0
S14	0.693 9	3.944 8	0.209 4	1.202 4	1.436 2	1.000 0	0.167 5	0.116 1	0.575 0	0.436 9
S15	0.526 7	3.865 6	0.214 7	1.081 8	1.418 8	1.000 0	0.151 0	0.108 8	0.522 8	0.383 2
S16	0.649 3	4.739 4	0.272 6	1.258 1	1.452 3	1.000 0	0.172 0	0.118 7	0.577 6	0.430 0
S17	0.364 6	4.715 2	0.149 0	1.534 1	0.893 8	1.000 0	0.291 6	0.135 7	0.530 1	0.350 8
S18	0.390 6	4.395 8	0.151 3	1.543 7	0.860 7	1.000 0	0.276 1	0.129 7	0.505 5	0.307 0
S19	0.399 7	4.639 2	0.164 2	1.583 7	0.866 1	1.000 0	0.295 0	0.136 0	0.526 1	0.323 3
S20	0.381 8	4.668 0	0.154 2	1.576 6	0.869 5	1.000 0	0.292 8	0.138 3	0.539 5	0.331 7
S21	0.391 5	4.578 6	0.154 9	1.504 5	0.887 7	1.000 0	0.274 5	0.128 7	0.501 1	0.309 8
S22	0.380 8	4.260 7	0.146 0	1.519 6	0.855 3	1.000 0	0.277 7	0.130 1	0.508 6	0.310 0
S23	0.371 3	4.783 6	0.153 3	1.528 2	0.853 3	1.000 0	0.279 8	0.130 9	0.509 9	0.313 5
S24	0.590 7	7.352 5	0.234 1	2.164 2	1.089 7	1.000 0	0.391 7	0.186 5	0.718 7	0.438 8
S25	0.496 7	6.043 9	0.209 3	2.083 1	1.011 3	1.000 0	0.377 7	0.190 1	0.681 9	0.439 2
S26	1.398 4	6.430 8	0.326 7	1.532 9	1.128 4	1.000 0	0.212 4	0.148 9	0.639 4	0.566 6
S27	0.893 7	6.316 3	0.356 8	1.076 6	1.009 9	1.000 0	0.176 0	0.128 0	0.432 4	0.474 6
S28	0.713 7	4.640 4	0.277 1	1.036 6	0.978 3	1.000 0	0.170 0	0.129 2	0.406 3	0.442 4
S29	0.656 0	4.378 7	0.259 5	1.247 9	1.456 0	1.000 0	0.226 2	0.140 2	0.552 8	0.446 8
S30	0.707 4	3.757 8	0.259 5	1.222 3	1.346 0	1.000 0	0.217 1	0.134 3	0.504 0	0.417 2
S31	0.760 8	4.359 2	0.296 1	1.219 3	1.474 7	1.000 0	0.219 7	0.127 2	0.512 9	0.408 6
S32	0.852 4	4.884 6	0.336 4	1.248 0	1.491 2	1.000 0	0.226 8	0.133 5	0.539 1	0.439 8
S33	0.804 3	4.417 4	0.312 2	1.318 9	1.485 8	1.000 0	0.236 0	0.139 6	0.549 4	0.449 1
S34	0.843 5	5.393 9	0.308 3	1.361 7	0.993 0	1.000 0	0.249 8	0.150 2	0.514 4	0.468 1
S35	0.746 0	4.090 4	0.288 4	1.282 4	0.934 0	1.000 0	0.225 5	0.140 8	0.500 4	0.458 5
S36	0.830 6	4.466 8	0.313 0	1.300 5	0.936 4	1.000 0	0.234 6	0.131 8	0.511 4	0.461 4
S37	0.728 2	4.224 2	0.292 0	1.174 1	0.940 1	1.000 0	0.197 3	0.115 3	0.470 6	0.412 5
S38	0.646 9	3.559 8	0.251 8	0.987 2	0.935 9	1.000 0	0.138 9	0.113 2	0.419 3	0.372 1
S39	0.741 2	4.139 8	0.284 0	1.016 5	0.901 7	1.000 0	0.143 3	0.105 1	0.439 2	0.386 8
S40	0.783 3	6.225 4	0.363 8	1.146 3	0.934 5	1.000 0	0.161 4	0.108 4	0.474 7	0.433 2
平均值	0.771 0	4.844 5	0.244 7	1.305 0	1.056 9	1.000 0	0.217 6	0.129 8	0.506 0	0.409 3
RSD/%	33.99	16.33	23.86	19.34	20.40	0	27.21	13.61	13.26	12.96

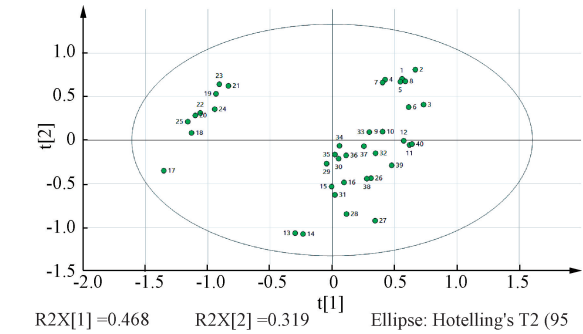


图 4 40 批样品 PCA 得分图

2.6.2 差异性成分筛选 根据“2.6.1”项下结果,将 40 批样品分成 A、B 两组,进一步通过 OPLS-DA 进行分析,结果

见图 5。由此可知。 R^2X_{cum} (反映 X 矩阵解释率)= 0.863, R^2Y_{cum} (反映模型稳定性)= 0.973, Q^2 (反映模型预测性)= 0.968,均大于 0.5 并接近 1,表明模型稳定可靠。

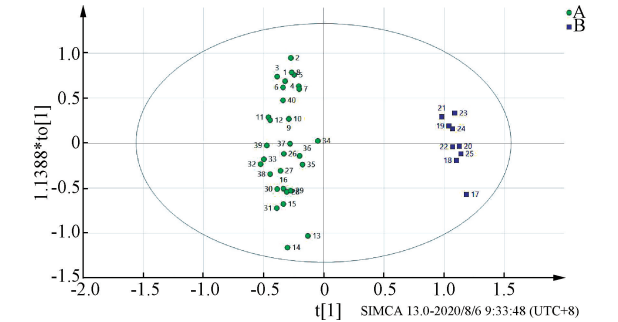


图 5 40 批样品 OPLS-DA 得分图

再根据变量权重的重要性排序（VIP）值对共有峰进行筛选，结果见图 6，VIP 值越大，对分组区分的贡献率越大，差异越明显^[16-17]。本实验以 VIP 值>1.2 为标准，筛选

出物芸香柚皮苷（1 号峰，来源于枳实）、香蜂草苷（3 号峰，来源于枳实）、piperonaline（7 号峰，来源于荜茇）为主要差异性成分，与表 4 一致。

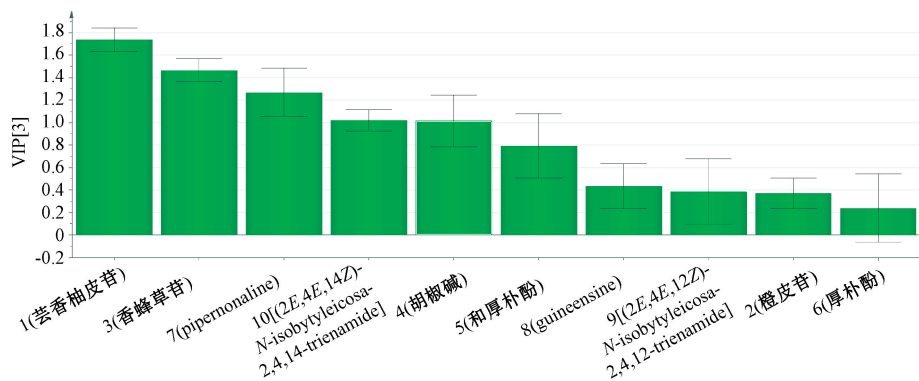


图 6 10 个共有峰 VIP 值

3 讨论

本实验对不同提取方法（冷浸、超声、加热回流）、提取溶剂（30% 甲醇、70% 甲醇、甲醇、95% 乙醇）、提取时间（30、60、90 min）、料液比（1：30、1：50、1：70）、流动相（甲醇-水，甲醇-酸水，乙腈-水，乙腈-酸水）、检测波长（210、254、280、330 nm）、色谱柱 [ACQUITY UPLC HSS T3（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）、Agilent Eclipse XDB-C₁₈（3.0 mm×100 mm，1.8 μm）、Agilent Eclipse Plus C₁₈ RRHD（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）]、柱温（30、35、40、45℃）、体积流量（0.25、0.30、0.35、0.40 mL/min）进行考察，最终确定为“2.1.1”项下色谱条件。

结果显示，40 批肚痛丸（S1~S40）的相似度均大于 0.99，表明其质量在整体水平上具有较好的一致性；UPLC 指纹图谱中以 6 号峰为参照峰，共标定 10 个共有峰；各批样品分为 2 类，S17~S25 聚为Ⅱ类，其余聚为Ⅰ类；3 种差异性成分来自枳实（芸香柚皮苷、香蜂草苷）、荜茇（piperonaline），与峰面积分析结果一致，这也是造成样品分为 2 类的主要原因，而且 2 类样品中三者含量有差异，其原因可能为①Ⅱ类样品在生产投料时，枳实中芸香柚皮苷（峰 1）、香蜂草苷（峰 3）含量较低，而荜茇中 piperonaline（峰 7）含量较高；②样品经过长期贮存后，荜茇中 piperonaline 发生降解，故Ⅰ类样品（较Ⅱ类样品生产早 1~2 年）中其含量有所下降，同时芸香柚皮苷、香蜂草苷、piperonaline 峰面积较小，也是 40 批样品潜在的差异性成分，但三者在指纹图谱中的贡献较小。

综上所述，UPLC 指纹图谱结合化学模式识别可快速、准确地评价不同批次肚痛丸的质量差异和重点成分，从而为全面控制和整体评价该制剂质量提供科学依据。

参考文献：

[1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准（中药成方制剂第六册）[S]. 1992：73.
[2] 张小龙，孙 晓，姚晨旭，等. GC 法同时测定肚痛丸中 6 种有效成分的含量[J]. 中国药师，2018，21(3)：518-520.

[3] 赵秋龙，卞晓坤，钱大玮，等. 基于 UPLC 指纹图谱及化学计量学的不同产地白芍差异比较研究[J]. 中国中药杂志，2019，44(15)：3316-3322.
[4] 周 霖，孙 志，薛文华，等. 基于 UPLC 指纹图谱结合化学模式识别的丹竹通脑胶囊质量控制研究[J]. 中国中药杂志，2018，43(16)：3279-3284.
[5] 田 香，丁瑞雪，巴根那，等. 蒙药地格达-4 味汤指纹图谱及多指标成分定量分析研究[J]. 中国中药杂志，2018，43(19)：3962-3969.
[6] 康黄紫炎，沈钱能，李 平，等. 不同产地葛根饮片的 UPLC 指纹图谱结合多成分含量测定研究[J]. 中国中药杂志，2019，44(10)：2051-2058.
[7] 王 琪，李晓琦，黄萌萌，等. 基于指纹图谱及多成分含量的化学模式识别法评价不同产地栀子药材的质量[J]. 中草药，2019，50(11)：2690-2699.
[8] 褚 莉，段树卿，宋 佳，等. 复方石韦片 HPLC 指纹图谱的建立及其在制剂过程中的应用[J]. 中草药，2019，50(2)：396-401.
[9] 徐 男，孙 蓉，李元媛，等. 基于 HPLC 指纹图谱、多成分定量结合化学计量学方法评价不同产地三棱药材的质量[J]. 中草药，2019，50(7)：1682-1689.
[10] 杨 琳，李廷利. 基于 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别的护肝片质量控制研究[J]. 中草药，2019，50(14)：3351-3356.
[11] 曹虹虹，严维花，郭 爽，等. 基于多成分测定及指纹图谱评价不同产地栀子质量[J]. 中国中药杂志，2019，44(18)：4026-4033.
[12] Wu S H, Sun C R, Pei S F, et al. Preparative isolation and purification of amides from the fruits of *Piper longum* L. by upright counter-current chromatography and reversed-phase liquid chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1040(2)：193-204.
[13] 李 丹，杨异卉，赖睿智，等. 荜茇化学成分和药理活性研究现状[J]. 中国临床药理学杂志，2017，33(6)：565-569.
[14] Sun C R, Pei S F, Pan Y J, et al. Rapid structural

determination of amides in *Piper longum* by high-performance liquid chromatography combined with ion trap mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass SP*, 2007, 21(9): 1497-1503.

[15] Li K Y, Zhu W Y, Fu Q, *et al.* Purification of amide alkaloids from *Piper longum* L. using preparative two-dimensional normal-phase liquid chromatography × reversed-phase liquid chromatography [J]. *Analyst (Lond)*, 2013, 138 (11) : 3313-3320.

[16] 阿基业. 代谢组学数据处理方法——主成分分析[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2010, 15 (5) : 481-489.

[17] 阿基业, 何 骏, 孙润彬. 代谢组学数据处理——主成分分析十个要点问题 [J]. 药学学报, 2018, 53 (6) : 929-937.

左归丸对卵巢切除骨质疏松症模型小鼠骨代谢的机制

李 微¹, 徐红丹², 宋 肖¹, 张 博³, 赵文豪¹, 邵 帅³, 黄树明^{3*}
(1. 湖北文理学院医学院, 湖北 襄阳 441053; 2. 黑龙江中医药大学佳木斯学院, 黑龙江 佳木斯 154007; 3. 黑龙江中医药大学中医药研究院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: **目的** 探究左归丸对雌激素剥夺诱导的骨质疏松症模型小鼠骨代谢的机制。**方法** 通过卵巢摘除剥夺雌激素的方法建立骨质疏松症小鼠模型, 成膜后采用左归丸干预治疗。采用免疫组织化学法测定各组小鼠胫骨近心端 ERα、ERβ 的表达, Western blot 法测定小鼠股骨中 ERα、ERβ 的蛋白表达情况。并通过雌激素受体阻断剂 ICI182780 验证左归丸通过增加雌激素受体表达调节骨代谢。**结果** 免疫组化实验显示, 与模型组比较, 左归丸高、中剂量组的小鼠 ERα 表达均升高 ($P<0.05$), 左归丸高剂量组小鼠 ERβ 的表达升高 ($P<0.01$)。Western blot 实验显示, 与模型组比较, 左归丸高、中、低剂量组均可使 ERα 表达量升高 ($P<0.05$, $P<0.01$); 左归丸各剂量组对 ERβ 的影响均没有显著差异 ($P>0.05$); ICI182780 可阻断左归丸对骨代谢的影响。**结论** 左归丸不能增加骨质疏松症模型小鼠体内的雌激素水平, 但能通过增加雌激素受体的表达进而影响骨代谢。

关键词: 左归丸; 骨质疏松症; 骨代谢; ER

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)12-3455-05
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.12.037

骨质疏松症是一种常见的全身系统性的骨骼退行性疾病, 多发生在老年群体, 尤其是绝经后的老年女性^[1]。随着老龄人口的增多, 骨质疏松症的发病率出现了逐年攀升的趋势, 引起了社会和医学领域的广泛关注。骨质疏松症的产生有多方因素, 包括性激素的减少、钙离子的流失、身体各器官机能的减退、内分泌的失调以及其他疾病和药物诱导等因素。该病严重影响着中老年人甚至年轻人的身体健康与生活质量, 给社会造成极大的负担。因此, 急需找到预防和治疗这类疾病的有效措施。

补肾法是根据传统中医理论制定的临床预防和治疗骨

病的基本治则, 中医学认为“肾在体为骨, 骨乃肾所主”, 故“肾主骨”理论是研究人员选则用药的主要理论依据^[2-3]。本课题选用补肾古方左归丸, 该方是由熟地、山药、山茱萸、枸杞、菟丝子、川牛膝、龟板胶、鹿角胶、八味中药组成, 其功效为滋阴补肾, 填精益髓, 且诸多实验研究证实, 其对骨质疏松症, 生殖、内分泌、免疫系统、神经系统等均有保护作用^[4-5]。本研究采用雌激素剥夺的方法建立绝经后骨质疏松小鼠模型^[6], 探究左归丸通过雌激素/雌激素受体途径影响骨代谢的机制, 为临床上采用补肾法治疗骨质疏松症提供实验依据, 同时也为骨质疏松症的治疗提供新的思路和方向。

收稿日期: 2020-11-04

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81873108); 国家自然科学基金青年项目 (82003975); 湖北省教育厅科研计划项目 (B2020137); 湖北省襄阳市科技局项目 (2020ZD22); 湖北省博士科研启动经费资助项目 (2059041); 湖北文理学院科研能力培育基金项目 (2020kypfy014); 湖北文理学院学科开放基金项目 (xk2020059); 湖北文理学院大学生创新创业项目 (S202010509022, X202010519006, X202010519041, X202110519084)

作者简介: 李 微 (1988—), 女, 博士, 讲师, 从事中医基础理论-肾主骨研究。Tel: 15971156901, E-mail: Liweihljzy2015@126.com

*** 通信作者:** 黄树明 (1958—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中医基础理论研究。Tel: (0451) 87266816, E-mail: Huangsm1958@126.com