

经典名方圣愈汤的UPLC指纹图谱建立及多成分定量分析

张誉晴¹, 吴安¹, 邹婷¹, 赵志峰¹, 冼少华², 相雨², 胡旭光^{1*}

(1. 广东药科大学 中药学院, 广州 510006;

2. 国药集团德众(佛山)药业有限公司, 广东 佛山 528000)

[摘要] 目的:建立圣愈汤的超高效液相色谱法(UPLC)指纹图谱及其11个成分的定量分析方法。方法:采用UPLC-二极管阵列检测器(PDA)/蒸发光散射检测器(ELSD),根据化学成分极性不同使用不同的检测器,建立2种色谱条件,指纹图谱1选择ACQUITY UPLC HSS T₃色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm),流动相乙腈(A)-0.6%甲酸水溶液(C)梯度洗脱(0~4 min, 0~4%A; 4~8 min, 4%A; 8~9 min, 4%~8%A; 9~14 min, 8%~9%A; 14~21 min, 9%~15%A; 21~26 min, 15%~17%A; 26~30 min, 17%~20%A; 30~35 min, 20%~32%A; 35~40 min, 32%~40%A; 40~50 min, 40%~80%A; 50~55 min, 80%A),柱温30℃,PDA流速设定0.3 mL·min⁻¹,检测波长280 nm和321 nm;指纹图谱2选择CORTECS C₁₈色谱柱(3.0 mm×100 mm, 2.7 μm),流动相乙腈(A)-水(D)梯度洗脱(0~11 min, 19%A; 11~16 min, 19%~25%A; 16~34 min, 25%~28%A; 34~47 min, 28%~47%A; 47~60 min, 47%~80%A),流速0.4 mL·min⁻¹,ELSD,漂移管温度95℃,载气流量2.0 L·min⁻¹,柱温30℃;建立15批圣愈汤的UPLC-PDA/ELSD指纹图谱,采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012版)进行相似度评价,并对11种指标性成分进行定量分析。结果:15批圣愈汤的UPLC-PDA/ELSD指纹图谱与对照图谱的相似度均>0.98,指纹图谱1和2的共有峰分别为27,16个,2种色谱方法的精密度、重复性、稳定性、线性关系、加样回收率结果均符合2020年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)的方法学要求。15批圣愈汤中绿原酸,阿魏酸,毛蕊异黄酮葡萄糖苷,毛蕊花糖苷,洋川芎内酯I,洋川芎内酯H,洋川芎内酯A,人参皂苷Rg₁,人参皂苷Re,人参皂苷Rb₁,黄芪甲苷的质量分数范围分别为0.063~0.193, 0.509~0.638, 0.160~0.318, 0.012~0.056, 0.394~0.519, 0.110~0.143, 0.031~0.097, 0.382~0.595, 0.292~0.505, 0.590~0.803, 0.142~0.367 mg·g⁻¹。结论:建立的检测方法符合2020年版《中国药典》的要求,可表征圣愈汤中化学成分的整体特征,可为该经典名方的质量标准研究提供实验依据。

[关键词] 经典名方; 圣愈汤; 超高效液相色谱法(UPLC); 指纹图谱; 相似度评价

[中图分类号] R22;R289;R917;R28;O657.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)08-0008-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202358

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20201019.1625.001.html>

[网络出版日期] 2020-10-20 10:47

Establishment of UPLC Fingerprint and Quantitative Analysis of Multi-components of Shengyutang

ZHANG Yu-qing¹, WU An¹, ZOU Ting¹, ZHAO Zhi-feng¹, XIAN Shao-hua², XIANG Yu², HU Xu-guang^{1*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine,

Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

2. Sinopharm Group Dezhong (Foshan) Pharmaceutical Co. Ltd., Foshan 528000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish ultra performance liquid chromatography (UPLC) fingerprint of Shengyutang and quantitative analysis method of 11 index components in this famous classical formula. **Method:** UPLC-diode array detector/evaporative light scattering detector (UPLC-PDA/ELSD) was used, two chromatographic conditions were established by different detectors according to the polarity of chemical

[收稿日期] 20200909(014)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81673620);广东省重点领域研发计划项目(2019B110209005)

[第一作者] 张誉晴,在读硕士,从事中药药效评价与临床应用研究,E-mail:1152112051@qq.com

[通信作者] * 胡旭光,博士,教授,从事中药药理与中药新药开发研究,Tel:020-34071234,E-mail:1741969133@qq.com

components. Conditions of fingerprint 1 were as follows: ACQUITY UPLC HSS T₃ column (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) with the mobile phase of acetonitrile (A)-0.6% formic acid solution (C) for gradient elution (0-4 min, 0-4%A; 4-8 min, 4%A; 8-9 min, 4%-8%A; 9-14 min, 8%-9%A; 14-21 min, 9%-15%A; 21-26 min, 15%-17%A; 26-30 min, 17%-20%A; 30-35 min, 20%-32%A; 35-40 min, 32%-40%A; 40-50 min, 40%-80%A; 50-55 min, 80%A), the flow rate of 0.3 mL·min⁻¹, PDA with detection wavelengths of 280 nm and 321 nm, the column temperature at 30 °C. Conditions of fingerprint 2 were as follows: the CORTECS C₁₈ column (3.0 mm×100 mm, 2.7 μm) with the mobile phase of acetonitrile (A)-water (D) for gradient elution (0-11 min, 19%A; 11-16 min, 19%-25%A; 16-34 min, 25%-28%A; 34-47 min, 28%-47%A; 47-60 min, 47%-80%A), the flow rate of 0.4 mL·min⁻¹, ELSD with drift tube temperature of 95 °C, the carrier gas (air) flow rate of 2.0 L·min⁻¹, and the column temperature at 30 °C. UPLC-PDA/ELSD fingerprints of 15 batches of Shengyutang were established, and the similarity was evaluated by similarity evaluation system of chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine (2012 edition) issued by the Chinese Pharmacopoeia Commission, and the contents of eleven index components in this famous classical formula were determined. **Result:** The similarities of UPLC-PDA/ELSD fingerprints of 15 batches of Shengyutang were >0.98 by comparing with the control fingerprint, 27 and 16 common peaks were identified in fingerprint 1, 2, respectively. It was tested and verified that the precision, repeatability, stability, linear relationship and other results of this method all met the requirements of the 2020 edition of *Chinese Pharmacopoeia*. The contents of chlorogenic acid, ferulic acid, calycosin glucoside, verbascoside, senkyunolide I, senkyunolide H, senkyunolide A, ginsenoside Rg₁, ginsenoside Re, ginsenoside Rb₁ and astragaloside A in 15 batches of Shengyutang were 0.063-0.193, 0.509-0.638, 0.160-0.318, 0.012-0.056, 0.394-0.519, 0.110-0.143, 0.031-0.097, 0.382-0.595, 0.292-0.505, 0.590-0.803, 0.142-0.367 mg·g⁻¹, respectively. **Conclusion:** The established detection method meets the requirements of the 2020 edition of *Chinese Pharmacopoeia*, which can characterize the overall characteristics of chemical components in Shengyutang, and provide experimental basis for the quality standard research of this famous classical formula.

[Key words] famous classical formulas; Shengyutang; ultra performance liquid chromatography (UPLC); fingerprint; similarity evaluation

圣愈汤位于《古代经典名方目录(第一批)》的第48首^[1],始载于李东垣的《兰室秘藏》,原方记载为“治诸恶疮,血出多而心烦不安,不得睡眠,亡血故也,以此药主之。”方剂组成为生地黄、熟地黄、川芎、人参各三分,当归身、黄芪各五分,上咬咀,如麻豆大,都作一服。水二大盏,煎至一盏,去滓,稍热无时服。

圣愈汤组方合理,配伍精当。方中黄芪和当归是治疗虚劳的核心药物组合,黄芪味甘长于补气,气足则血生;当归味重养血又可行血,两药相伍,益气补血,是治疗气血亏损之首选^[2]。人参大补元气、生津养血,黄芪补脾肺气、补气生血;当归、川芎配伍,润燥相济,祛瘀而不伤气血,补血而不致气滞血瘀,有活血祛瘀的功效^[3];生地黄、熟地黄清热凉血、养阴生津^[4]。诸药协同配伍,补中有行,动静结合;湿润并行,刚柔并济;气血兼顾,重在补血。

圣愈汤临床应用广泛,主要包括气血亏虚所致的各类疾病,用于产后病、流产等,辅助治疗痛经、

肝血虚所致的眩晕^[5-7]等。但其药学研究方面成果较少^[8-9],且均存在一定程度的局限性,不能全面表征其质量,对圣愈汤进行全面质量控制研究势在必行。目前,经典名方虽有宏观政策的指引,但尚未出台具体的实施细则,也尚无按照注册要求研发成功的案例,开发过程中的一些关键问题还未能形成统一的标准,许多工作还处于探索阶段,因此,有必要对这些问题进行深入研究探讨。基于此,本实验拟建立圣愈汤的超高效液相色谱法(UPLC)指纹图谱,并对其指标成分进行分析,以全面控制该复方的质量,为圣愈汤及其他方剂的研发提供参考。

1 材料

ACQUITY UPLC H-Class型超高效液相色谱仪[美国沃特世公司,包括二极管阵列检测器(PDA)],6000型蒸发光散射检测器(ELSD,广州万谱仪器有限公司),SQP型1/1万电子天平和BP211D型1/10万电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],BSM5200.2型电子天平(上海

卓精电子科技有限公司), 50L15L 型液体加热器(潮州市潮安区龙光电器有限公司), 陶瓷煎药壶(深圳市一枚王有限公司, 体积 2 L), TRL-0.5 型真空冷冻干燥机(大连双瑞科技有限公司), 2-16N 型台式高速离心机(湖南恒诺仪器设备有限公司)。

绿原酸(批号 110753-201817, 纯度 96.80%), 咖啡酸(批号 110885-201703, 纯度 99.70%), 阿魏酸(批号 110773-201614, 纯度 99.00%), 毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号 111920-201606, 纯度 97.60%), 毛蕊花糖苷(批号 111530-201713, 纯度 92.50%), 藁本内酯(批号 111737-201608, 定性用), 人参皂苷 R_g₁(批号 110703-201832, 纯度 92.4%), 人参皂苷 R_e(批号 110754-201827, 纯度 93.4%), 人参皂苷 R_f(批号 111719-201806, 定性用), 人参皂苷 R_b₁(批号 110704-201827, 纯度 91.2%), 人参皂苷 R_b₂(批号 111715-201203, 纯度 93.8%), 人参皂苷 R_d(批号 111818-201603, 纯度 92.1%), 黄芪甲苷(批号 110781-201515, 纯度 93.0%)对照品均购自中国食品药品检定研究院; 洋川芎内酯 I(批号 20080304, 纯度 99.45%), 洋川芎内酯 H(批号 19021805, 纯度

99.09%), 洋川芎内酯 A(批号 17051901, 纯度 98.18%)对照品均购自成都普菲德生物技术有限公司; 人参皂苷 R_c(成都曼思特生物科技有限公司, 批号 MUST-18032302, 纯度 99.65%); 水为屈臣氏纯净水和自制超纯水, 乙腈、甲醇、甲酸均为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

川芎(产地四川), 人参(产地黑龙江、吉林、辽宁), 当归(产地甘肃、青海)药材, 生地黄(产地河南), 熟地黄(产地河南), 黄芪(产地甘肃)饮片均来自道地产区, 经广东药科大学李书渊教授鉴定, 生地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* 的新鲜或干燥块根, 熟地黄为生地黄的炮制加工品, 川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* 的干燥根茎, 人参为五加科植物人参 *Panax ginseng* 的干燥根和根茎, 当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* 的干燥根, 黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* 的干燥根, 经检验均符合 2020 年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)(一部)相关项下要求。圣愈汤 15 批样品所用饮片批号信息见表 1。

表 1 15 批圣愈汤冻干粉所用饮片的批号信息

Table 1 Batch number information of decoction pieces in 15 batches of Shengyutang lyophilized powder

样品编号	批号					
	生地黄	熟地黄	川芎	人参	当归	黄芪
S1	20200606	20200201	20180205	20181303	20180908	20200511
S2	20200612	20200203	20180103	20181101	20180911	20200509
S3	20200603	20200202	20180203	20181104	20180903	20200507
S4	20200605	20200210	20180303	20181102	20180912	20200504
S5	20200613	20200208	20180305	20181205	20180905	20200514
S6	20200601	20200207	20180101	20181204	20180902	20200513
S7	20200614	20200214	20180202	20181301	20180909	20200502
S8	20200604	20200215	20180204	20181202	20180910	20200510
S9	20200608	20200206	20180304	20181203	20180907	20200501
S10	20200609	20200205	20180104	20181304	20180915	20200508
S11	20200610	20200209	20180105	20181103	20180904	20200512
S12	20200615	20200204	20180302	20181105	20180913	20200515
S13	20200602	20200212	20180201	20181302	20180906	20200503
S14	20200607	20200211	20180301	20181201	20180914	20200505
S15	20200611	20200213	20180102	20181305	20180901	20200506

注: 川芎、人参、当归药材为国药集团德众(佛山)药业有限公司研发部于 2018 年采购, 检验合格后炮制并储存于仓库中; 生地黄、熟地黄、黄芪饮片则采购于 2020 年, 因此批号间存在差异。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液 取绿原酸, 咖啡酸, 阿魏酸, 毛

蕊异黄酮葡萄糖苷, 毛蕊花糖苷, 洋川芎内酯 I, 洋川芎内酯 H, 洋川芎内酯 A, 藁本内酯对照品适量, 加 70% 甲醇制成质量浓度为 80.54, 53.22, 103.36,

52.51, 76.31, 97.86, 29.67, 49.14, 90.24 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的单一对照品贮备液;分别取各对照品贮备液适量,置于50 mL量瓶中,加70%甲醇稀释,得每1 L分别含上述各成分4.83, 5.32, 20.67, 5.25, 1.53, 9.79, 2.97, 4.91, 15.04 mg的混合对照品溶液1。取人参皂苷 Rg_1 , 人参皂苷 Re , 人参皂苷 Rf , 人参皂苷 Rb_1 , 人参皂苷 Rc , 人参皂苷 Rb_2 , 人参皂苷 Rd 对照品适量,加甲醇分别配制成质量浓度为437.43, 413.01, 262.68, 470.58, 377.52, 418.89, 307.41 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的单一对照品贮备液;分别取人参皂苷各对照品贮备液适量,置于50 mL量瓶中,加甲醇稀释,得每1 L分别含上述成分109.36, 103.25, 65.67, 117.65, 94.38, 104.72, 76.85 mg的混合对照品溶液2。取黄芪甲苷对照品适量,加甲醇配制成411.63 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对照品储备液,继续用甲醇稀释至质量浓度102.91 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.1.2 供试品溶液 结合文献及不同朝代剂量考证结果^[10],金元时期的一分折合为现代剂量约0.4 g,一盞约300 mL,一大盞约600 mL。取粗碎(过筛,控制粒径在5~8 mm)的生地黄、熟地黄、川芎、人参饮片各1.2 g,当归、黄芪饮片各2.0 g,置于2 L陶瓷煎药壶中,加水1.2 L,称定总质量,置于液体加热器上,加盖煎煮,武火500 $^{\circ}\text{C}$ 煎煮约15 min至沸腾,改用文火300 $^{\circ}\text{C}$ 保持微沸,持续220 min,至总质量减少900 g,停止加热,趁热用400目滤网过滤,得到煎液^[11],煎液置于真空冷冻干燥机中,经预冷、抽真空、一次升华、解析干燥的步骤冻干72 h,得圣愈汤冻干粉(批号20061601)。取圣愈汤冻干粉0.5 g,精密加入70%甲醇20 mL,密塞,称定质量,超声20 min,放冷,称重,用70%甲醇补足减失的质量,摇匀,离心5 min(转速12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心半径6 cm)后用0.22 μm 微孔滤膜过滤,即得供试品溶液1。取圣愈汤冻干粉2.0 g,加水25 mL,摇匀使溶解,置于125 mL分液漏斗中,加水饱和正丁醇萃取3次,每次30 mL,合并醇液,加氨试液洗2次,每次20 mL,加正丁醇饱和的水洗2次,每次20 mL,合并醇液,水浴蒸干,残渣加甲醇使溶解并定容至5 mL量瓶中,用0.22 μm 微孔滤膜过滤,即得供试品溶液2。

2.1.3 阴性供试品溶液 取2.1.2项下圣愈汤冻干粉制备过程所使用的对应批次饮片,同法制备各个药味阴性冻干粉以及缺生地黄、熟地黄和缺当归、川芎的双阴性冻干粉,分别按照供试品溶液1,2方法制备相应供试品溶液。

2.2 圣愈汤HPLC指纹图谱的建立

2.2.1 指纹图谱色谱条件 指纹图谱色谱条件1为ACQUITY UPLC HSS T_3 色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.8 μm),流动相乙腈(A)-0.6%甲酸水溶液(C)梯度洗脱(0~4 min, 0~4%A; 4~8 min, 4%A; 8~9 min, 4%~8%A; 9~14 min, 8%~9%A; 14~21 min, 9%~15%A; 21~26 min, 15%~17%A; 26~30 min, 17%~20%A; 30~35 min, 20%~32%A; 35~40 min, 32%~40%A; 40~50 min, 40%~80%A; 50~55 min, 80%A),流速0.3 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测器为PDA,检测波长280 nm和321 nm,柱温30 $^{\circ}\text{C}$,进样量2 μL 。指纹图谱色谱条件2为CORTECS C_{18} 色谱柱(3.0 mm $\times$ 100 mm, 2.7 μm),流动相选择乙腈(A)-水(D)梯度洗脱(0~11 min, 19%A; 11~16 min, 19%~25%A; 16~34 min, 25%~28%A; 34~47 min, 28%~47%A; 47~60 min, 47%~80%A),流速0.4 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测器为ELSD,漂移管温度95 $^{\circ}\text{C}$,柱温30 $^{\circ}\text{C}$,载气(空气)流量设定2.0 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$,进样量3 μL 。

2.2.2 系统适用性试验 分别取2.1.1, 2.1.2项下混合对照品溶液、供试品溶液,按2.2.1项下2种色谱条件分别进样测定,记录色谱图。结果显示在以上2种色谱条件下,各共有峰间分离度均 >1.5 ,且其他成分对待测成分的结果无干扰。

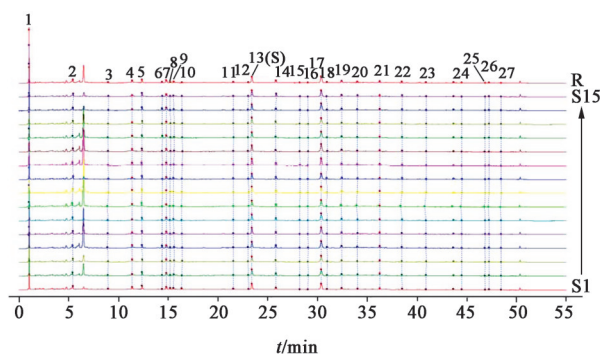
2.2.3 精密度试验 取样品20061601的供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件1,2分别连续进样6次,记录色谱图,分别得指纹图谱1,2。指纹图谱1选择出峰时间稳定、响应因子较高的阿魏酸为参照峰,计算各共有峰相对保留时间的RSD均 $<0.5\%$,相对峰面积的RSD均 $<3.4\%$ 。指纹图谱2选择出峰时间稳定、响应因子较高的人参皂苷 Rb_1 为参照峰,计算各共有峰相对保留时间的RSD均 $<0.3\%$,相对峰面积的RSD均 $<3.5\%$,表明仪器精密度良好。

2.2.4 重复性试验 取样品20061601共6份,按照2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件1,2分别依次进样,指纹图谱1选择出峰时间稳定、响应因子较高的阿魏酸为参照峰,计算各共有峰相对保留时间的RSD均 $<0.4\%$,相对峰面积的RSD均 $<3.8\%$ 。指纹图谱2选择出峰时间稳定、响应因子较高的人参皂苷 Rb_1 为参照峰,计算各共有峰相对保留时间的RSD均 $<0.3\%$,相对峰面积的RSD均 $<4.9\%$,表明该方法的重复性良好。

2.2.5 稳定性试验 取样品20061601的供试品溶液,分别在制备后0, 4, 8, 12, 20, 24 h按2.2.1项下的条件测定,记录色谱图。指纹图谱1选择出峰时间

稳定、响应因子较高的阿魏酸为参照峰,计算各共有峰相对保留时间的RSD均<0.9%,相对峰面积的RSD均<3.6%。指纹图谱2选择出峰时间稳定、响应因子较高的人参皂苷Rb₁为参照峰,计算各共有峰相对保留时间的RSD均<0.5%,相对峰面积的RSD均<4.8%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.2.6 指纹图谱的建立 采用2.1.2项下方法分别制备15批圣愈汤的供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件测定,记录色谱图。将15批圣愈汤的AIA数据依次导入国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012版),以样品S1图谱为参照图谱,采用中位数法,时间窗宽度0.10 min,对色谱峰进行多点校正,自动匹配,生成对照指纹图谱,见图1,2。结果2种指纹图谱分别标定了27,16个色谱峰。样品S1~S15色谱图1与对照指纹图谱的相似度分别为0.996,0.997,0.997,0.981,0.998,0.996,0.989,0.991,0.997,0.997,0.998,0.995,0.996,0.993,0.997,色谱图2与对照指纹图谱的相似度依次为0.993,0.993,0.993,0.985,0.977,0.987,0.998,0.996,0.996,0.994,0.989,0.996,0.995,0.998,0.992,说明2种色谱条件下15批圣愈汤冻干粉的指纹图谱与对照指纹图谱之间相似度较高。

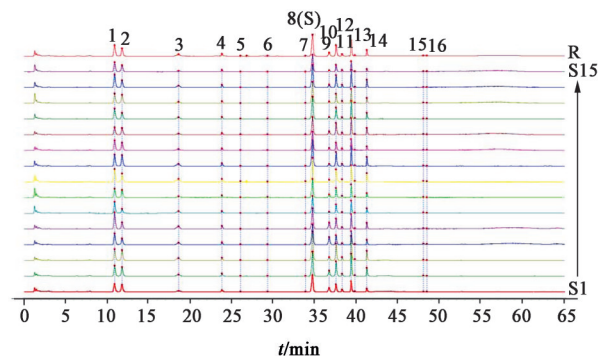


13. 阿魏酸(S); R. 对照指纹图谱(图2同)

图1 15批圣愈汤的UPLC指纹图谱1

Fig. 1 UPLC fingerprint 1 of 15 batches of Shengyutang

2.2.7 专属峰研究 分别取2.1.2, 2.1.3项下样品20061601供试品溶液、阴性供试品溶液及空白溶剂(70%甲醇),按2.2.1项下色谱条件测定,记录色谱图,见图3,4。根据2.2.6项下匹配结果对共有峰进行编号,根据对照品中色谱峰保留时间的不同,对色谱图中各个色谱峰进行归属分析。结果显示,在图3匹配的27个色谱峰中,3,12,16号峰来自地黄;5~11,13,15,17,19,22,25号峰共同来自于当归与川芎;4和24号峰来自川芎;14,21号峰来自黄芪;在图4匹配的16个色谱峰中,9号峰来自黄芪,1~8,

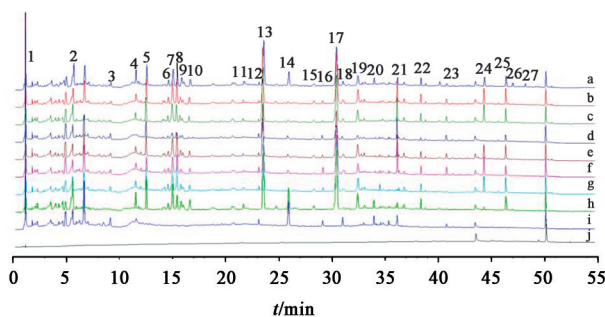


8. 人参皂苷Rb₁(S)

图2 15批圣愈汤的UPLC指纹图谱2

Fig. 2 UPLC fingerprint 2 of 15 batches of Shengyutang

10~13号峰来自人参。



a. 圣愈汤; b. 缺生地黄; c. 缺熟地黄; d. 缺川芎; e. 缺人参; f. 缺当归; g. 缺黄芪; h. 缺生地黄、熟地黄; i. 缺当归、川芎; j. 空白

图3 圣愈汤UPLC指纹图谱1的共有峰归属

Fig. 3 Attribution of common peaks in UPLC fingerprint 1 of Shengyutang

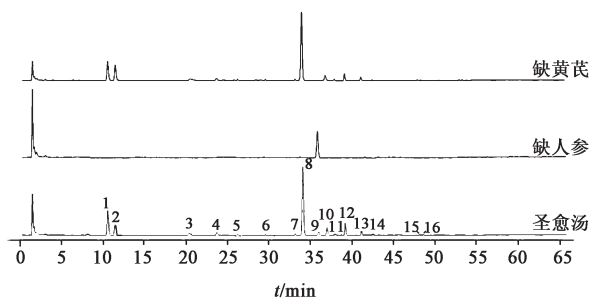


图4 圣愈汤UPLC指纹图谱2的共有峰归属

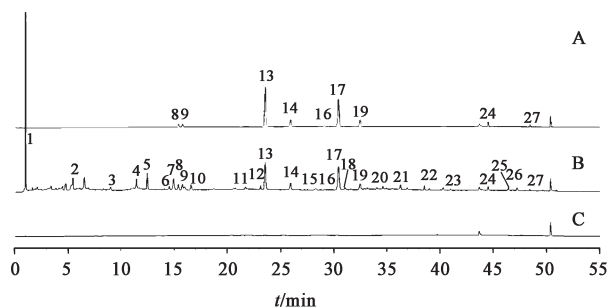
Fig. 4 Attribution of common peaks in UPLC fingerprint 2 of Shengyutang

2.3 圣愈汤化学成分的定量分析

2.3.1 色谱条件 同2.2.1项。

2.3.2 专属性考察 分别精密吸取2.1.1项下对照品溶液、样品20061601供试品溶液、空白试剂(70%甲醇)适量,按2.2.1项下色谱条件测定,记录色谱图,见图5,6。结果发现在绿原酸,咖啡酸,阿魏酸,毛蕊异黄酮葡萄糖苷,毛蕊花糖苷,洋川芎内酯I,洋川芎内酯H,洋川芎内酯A,藁本内酯,人参皂苷

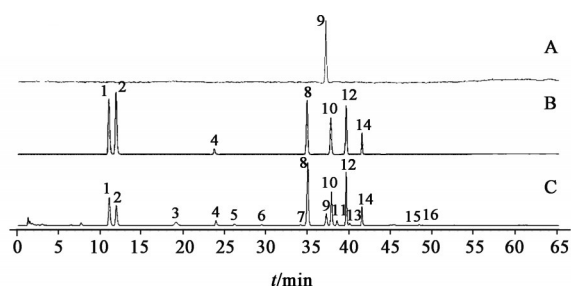
Rg₁, 人参皂苷 Re, 人参皂苷 Rf, 人参皂苷 Rb₁, 黄芪甲苷, 人参皂苷 Rc, 人参皂苷 Rb₂, 人参皂苷 Rd 对应位置上, 供试品溶液中均有相同保留时间的色谱峰出现。



A. 混合对照品 1; B. 供试品 1; C. 空白溶剂; 8. 绿原酸; 9. 咖啡酸; 13. 阿魏酸(S); 14. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 16. 毛蕊花糖苷; 17. 洋川芎内酯 I; 19. 洋川芎内酯 H; 24. 洋川芎内酯 A; 27. 藜本内酯

图5 圣愈汤含量测定的UPLC指纹图谱1

Fig. 5 UPLC fingerprint 1 for determination of Shengyutang



A. 对照品; B. 混合对照品 2; C. 供试品 2; 1. 人参皂苷 Rg₁; 2. 人参皂苷 Re; 4. 人参皂苷 Rf; 8. 人参皂苷 Rb₁(S); 9. 黄芪甲苷; 10. 人参皂苷 Rc; 12. 人参皂苷 Rb₂; 14. 人参皂苷 Rd

图6 圣愈汤含量测定的UPLC指纹图谱2

Fig. 6 UPLC fingerprint 2 for determination of Shengyutang

2.3.3 线性关系考察 分别取各对照品储备液适量, 加 70% 甲醇配制成不同质量浓度的单一对照品溶液。绿原酸质量浓度为 0.40, 0.81, 1.61, 4.03, 8.05, 16.11, 40.27 mg·L⁻¹; 阿魏酸质量浓度为 1.03, 2.07, 5.17, 10.34, 20.67, 51.68, 103.36 mg·L⁻¹; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷质量浓度为 0.53, 1.05, 2.10, 5.25, 10.50, 26.26, 52.51 mg·L⁻¹; 毛蕊花糖苷质量浓度为 0.08, 0.15, 0.38, 0.76, 1.53, 3.05, 7.63 mg·L⁻¹; 洋川芎内酯 I 质量浓度为 0.98, 1.96, 4.89, 9.79, 19.57, 48.93, 97.86 mg·L⁻¹; 洋川芎内酯 H 质量浓度为 0.30, 0.59, 1.48, 2.97, 5.93, 14.83, 29.67 mg·L⁻¹; 洋川芎内酯 A 质量浓度为 0.49, 0.98, 2.46, 4.91, 9.83, 24.57, 49.14 mg·L⁻¹; 人参皂苷 Rg₁ 质量浓度为 19.44, 29.16, 48.60, 72.91, 145.81, 292.61, 437.43 mg·L⁻¹; 人参皂苷 Re 质量浓度为 18.36, 27.53, 45.89, 68.84, 137.67, 275.34, 413.01 mg·L⁻¹; 人参皂苷 Rb₁ 质量浓

度为 20.92, 31.37, 52.29, 78.43, 156.86, 313.72, 470.58 mg·L⁻¹; 黄芪甲苷质量浓度为 16.47, 20.58, 41.16, 82.33, 164.65, 205.82, 411.63 mg·L⁻¹ 的一系列单独线性对照品溶液。分别按 2.2.1 项下色谱条件测定, 以对照品质量浓度为横坐标, 峰面积(绿原酸, 阿魏酸, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷, 毛蕊花糖苷, 洋川芎内酯 I, 洋川芎内酯 H, 洋川芎内酯 A) 或峰面积的对数值(人参皂苷 Rg₁, 人参皂苷 Re, 人参皂苷 Rb₁, 黄芪甲苷) 为纵坐标, 分别绘制各成分标准曲线, 得绿原酸, 阿魏酸, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷, 毛蕊花糖苷, 洋川芎内酯 I, 洋川芎内酯 H, 洋川芎内酯 A, 人参皂苷 Rg₁, 人参皂苷 Re, 人参皂苷 Rb₁, 黄芪甲苷的线性回归方程分别为 $Y=10\ 222.37X-2\ 308.84$ ($R^2=0.999$), $Y=20\ 001.76X-6\ 825.65$ ($R^2=0.999$), $Y=13\ 974.37X-267.91$ ($R^2=1.000$), $Y=12\ 432.57X-954.91$ ($R^2=0.999$), $Y=34\ 465.16X+1\ 036.52$ ($R^2=1.000$), $Y=6\ 284.86X-711.25$ ($R^2=1.000$), $Y=1.71X+2.01$ ($R^2=0.999$), $Y=1.76X+1.92$ ($R^2=0.999$), $Y=1.75X+1.99$ ($R^2=0.999$), $Y=1.72X+2.01$ ($R^2=0.999$), 上述各成分的线性范围依次为 0.40~40.27, 1.03~103.36, 0.53~52.51, 0.08~7.63, 0.98~97.86, 0.30~29.67, 0.49~49.14, 19.44~437.43, 18.36~413.01, 20.92~470.58, 16.47~411.63 mg·L⁻¹。

2.3.4 精密度试验 取圣愈汤冻干粉样品 20061601 适量, 按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录色谱图, 结果绿原酸, 阿魏酸, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷, 毛蕊花糖苷, 洋川芎内酯 I, 洋川芎内酯 H, 洋川芎内酯 A, 人参皂苷 Rg₁, 人参皂苷 Re, 人参皂苷 Rb₁, 黄芪甲苷峰面积的 RSD 分别为 1.5%, 0.5%, 0.4%, 3.1%, 0.2%, 1.4%, 1.1%, 0.8%, 2.2%, 1.2%, 1.6%, 说明仪器精密度良好。

2.3.5 重复性试验 取圣愈汤冻干粉样品 20061601 适量, 按 2.1.2 项下方法制备 6 份供试品溶液, 按 2.2.1 项下条件测定, 计算绿原酸, 阿魏酸, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷, 毛蕊花糖苷, 洋川芎内酯 I, 洋川芎内酯 H, 洋川芎内酯 A, 人参皂苷 Rg₁, 人参皂苷 Re, 人参皂苷 Rb₁, 黄芪甲苷的质量分数分别为 0.141 2, 0.503 7, 0.198 2, 0.023 7, 0.337 1, 0.096 0, 0.049 9, 0.314 7, 0.201 2, 0.397 0, 0.120 6 mg·g⁻¹, RSD 依次为 3.2%, 0.9%, 0.7%, 1.8%, 0.3%, 2.0%, 2.0%, 2.5%, 2.4%, 2.4%, 3.2%, 表明该方法重复性良好。

2.3.6 稳定性试验 取圣愈汤冻干粉样品20061601适量,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,分别于室温条件下放置0,4,8,12,16,24 h后按2.2.1项下色谱条件测定,记录色谱图。结果绿原酸,阿魏酸,毛蕊异黄酮葡萄糖苷,毛蕊花糖苷,洋川芎内酯I,洋川芎内酯H,洋川芎内酯A,人参皂苷Rg₁,人参皂苷Re,人参皂苷Rb₁,黄芪甲苷峰面积的RSD分别为1.3%,1.5%,1.0%,2.7%,0.2%,1.7%,0.8%,0.7%,2.5%,1.4%,3.6%,表明供试品溶液在室温放置24 h内稳定性良好。

2.3.7 加样回收试验 取圣愈汤冻干粉样品20061601共12份,每份质量为0.25 g或1.0 g,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,约按1:1的比例加入对照品,按2.2.1项下色谱条件测定,记录色谱图,计算绿原酸,阿魏酸,毛蕊异黄酮葡萄糖苷,毛蕊花

糖苷,洋川芎内酯I,洋川芎内酯H,洋川芎内酯A,人参皂苷Rg₁,人参皂苷Re,人参皂苷Rb₁,黄芪甲苷的平均加样回收率分别为97.91%,103.01%,97.67%,108.66%,102.71%,103.13%,106.46%,108.70%,108.04%,108.41%,104.22%。RSD依次为2.9%,1.0%,1.6%,2.0%,2.2%,2.4%,1.4%,3.9%,3.0%,1.3%,3.4%,表明该方法准确度良好。

2.3.8 样品测定 取15批圣愈汤冻干粉样品适量,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件测定,计算样品中绿原酸,阿魏酸,毛蕊异黄酮葡萄糖苷,毛蕊花糖苷,洋川芎内酯I,洋川芎内酯H,洋川芎内酯A,人参皂苷Rg₁,人参皂苷Re,人参皂苷Rb₁,黄芪甲苷的平均质量分数分别为0.104,0.560,0.245,0.030,0.455,0.130,0.064,0.489,0.407,0.682,0.221 mg·g⁻¹,见表2。

表2 15批圣愈汤中指标成分的含量测定

样品	绿原酸	阿魏酸	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	毛蕊花糖苷	洋川芎内酯I	洋川芎内酯H	洋川芎内酯A	人参皂苷Rg ₁	人参皂苷Re	人参皂苷Rb ₁	黄芪甲苷
S1	0.171	0.520	0.215	0.018	0.417	0.128	0.042	0.397	0.391	0.590	0.247
S2	0.074	0.584	0.260	0.037	0.442	0.118	0.076	0.499	0.461	0.762	0.308
S3	0.173	0.524	0.209	0.014	0.460	0.139	0.089	0.484	0.484	0.803	0.225
S4	0.074	0.584	0.288	0.039	0.489	0.143	0.065	0.524	0.371	0.670	0.367
S5	0.094	0.587	0.240	0.025	0.486	0.137	0.063	0.595	0.358	0.655	0.336
S6	0.077	0.545	0.268	0.013	0.494	0.139	0.042	0.505	0.292	0.606	0.144
S7	0.104	0.534	0.239	0.034	0.452	0.133	0.068	0.437	0.409	0.633	0.223
S8	0.193	0.548	0.261	0.036	0.416	0.134	0.097	0.550	0.427	0.747	0.185
S9	0.097	0.515	0.252	0.056	0.394	0.110	0.037	0.506	0.505	0.779	0.184
S10	0.081	0.638	0.288	0.039	0.517	0.139	0.042	0.462	0.396	0.639	0.171
S11	0.078	0.561	0.190	0.039	0.519	0.143	0.082	0.382	0.382	0.609	0.223
S12	0.080	0.509	0.160	0.028	0.422	0.123	0.083	0.497	0.381	0.721	0.182
S13	0.110	0.617	0.318	0.031	0.423	0.118	0.097	0.493	0.462	0.695	0.163
S14	0.063	0.537	0.177	0.031	0.460	0.130	0.054	0.550	0.398	0.717	0.212
S15	0.087	0.605	0.308	0.012	0.439	0.120	0.031	0.460	0.390	0.601	0.142

3 讨论与总结

3.1 供试品溶液制备方法的选择 本研究在建立圣愈汤供试品处理方法1时,采用单因素试验考察了供试品质量浓度(0.01,0.025,0.05 g·mL⁻¹),提取溶剂(甲醇,70%甲醇,50%甲醇及95%乙醇),提取方式(超声法、回流法)及提取时间(10,20,30 min)对峰面积的影响,综合分析后选择提取效率最高的处理方法组合。在建立供试品处理方法2时,考虑到该方皂苷类成分组成简单,故先试用2020年版

《中国药典》当中人参与黄芪的含量测定方法,发现该方法较为复杂,处理过程中使用到了易制毒试剂,且萃取过程中极易乳化,难以分层,提取效率较低。为简化操作,提高提取效率,在萃取操作步骤之后比较了氨试液洗^[12]、正丁醇饱和的水洗、氨试液洗加正丁醇饱和的水洗及不洗4种情况下样品中待测成分的峰面积,发现氨试液洗与正丁醇饱和的水洗之后的峰面积较高,样品杂质较少,对色谱柱的损害较小且提取效率较高。

3.2 色谱条件的优化 由于中药汤剂的化学成分复杂,各成分的最佳吸收波长不太一致且互相干扰严重。故先采用PDA进行了全波长扫描,发现在280 nm处的色谱峰数目最多,色谱峰峰面积分布较均衡,可较为全面地反映圣愈汤的指纹图谱信息,并且根据信噪比(S/N)>10可定量的标准,在此波长下可同时测定绿原酸、阿魏酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、洋川芎内酯I、洋川芎内酯H及洋川芎内酯A共6种成分的含量;同时,在321 nm处基线平稳,毛蕊花糖苷色谱峰的S/N>10,可用于含量测定,因此,选定2个波长记录色谱图并进行7种指标成分的含量测定。另外,预试验对比了不同流动相(乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸、乙腈-0.1%甲酸和乙腈-0.6%甲酸),结果发现乙腈-0.6%甲酸的分离效果最好且基线较为平稳;还对同品牌不同色谱柱[ACQUITY UPLC HSS T₃(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)和ACQUITY UPLC CSH C₁₈(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)]进行了比较,结果发现ACQUITY UPLC HSS T₃(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)对上述色谱峰的分离度及峰形较好。

由于圣愈汤皂苷类成分的紫外吸收均为末端吸收,常用检测波长为203 nm,但此波长下噪音影响较大,故选用仅对不挥发成分产生信号的ELSD^[13],考察了同品牌不同色谱柱[UPLC BEH C₁₈(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm),CORTECS C₁₈(3.0 mm×100 mm, 2.7 μm),以及XBridge BEH C₁₈(3.0 mm×150 mm, 2.5 μm)],结果以CORTECS C₁₈(3.0 mm×100 mm, 2.7 μm)对皂苷类成分的分离度最好,峰形优于其他2种色谱柱。另外,还考察了不同流动相(乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.6%甲酸水溶液),不同漂移管温度(95, 105 °C)及不同载气流量(2.0, 3.0 L·min⁻¹),综合比较得出最适宜的皂苷类成分色谱条件。

3.3 定量分析指标性成分研究 现代药理研究表明,地黄中活性成分为梓醇、毛蕊花糖苷、多糖等,其中毛蕊花糖苷主要体现抗氧化活性^[14],而梓醇在熟地黄炮制过程中含量大幅降低甚至完全消失^[15],不适宜作为指标性成分。川芎中主要含有生物碱、有机酚酸和苯酞类成分。其中苯酞类代表成分有洋川芎内酯I、洋川芎内酯H、洋川芎内酯A、藁本内酯等^[16],此类成分被证明是对心脑血管起保护作用的主要成分^[17];当归、川芎均含有阿魏酸、咖啡酸等有机酸类成分,具有抗血栓形成的作用^[18]。绿原酸是一种广泛存在植物中的多酚类次生代谢产物^[19],

具有抗炎、抗氧化等作用^[20]。人参皂苷类是人参的活性成分,具有保护心血管、保护神经系统等作用^[21-22]。黄芪中活性成分毛蕊异黄酮葡萄糖苷、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮等具有明显的抗氧化、抗病毒、抑制黑色素形成和免疫活性调节作用,在临床中用于治疗高血压、缺血性心脏病,另有研究表明部分黄芪皂苷易被碱化成黄芪甲苷^[23];黄芪与当归合煎后,当归挥发油会显著降低黄芪中黄芪甲苷、总皂苷的含量^[24],因此,对黄芪甲苷含量加以控制可以更好地表征圣愈汤整体质量。综上分析,最终选择测定当归与川芎的共有成分绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯I和洋川芎内酯H,川芎的专属成分洋川芎内酯A,黄芪专属性成分毛蕊异黄酮葡萄糖苷、黄芪甲苷,生地黄的共有成分毛蕊花糖苷以及人参的指标性成分人参皂苷Rg₁,人参皂苷Re,人参皂苷Rb₁来表征圣愈汤整体质量。

3.4 总结 本文在建立经典名方圣愈汤UPLC指纹图谱的同时对其所含的6个药味均建立了指标性成分的定量分析方法,并通过对15批样品进行检测来确定各成分的含量范围。但由于圣愈汤的煎煮时长约4 h,在此期间,热不稳定成分梓醇、挥发性成分藁本内酯等成分大量散失,导致其在冻干粉中含量极微,难以控制含量标准。另外,本文建立了生地黄的定量分析方法,但张文婷等^[25]揭示了地黄炮制过程中毛蕊花糖苷会逐渐减少,且传统的地黄炮制过程都是依靠主观的感官认知,这会影响熟地黄质量的均一性和稳定性,进而影响药效,解决以上问题将是本课题组后续研究的方向。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局. 关于发布《古代经典名方目录(第一批)》的通知[EB/OL]. (2018-04-13)[2020-07-10]. <http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2018-04-16/7107.html>.
- [2] 滕佳林. 黄芪配伍当归益气活血作用的理论与实验研究[J]. 济南:山东中医药大学,2002.
- [3] 周长征. 当归川芎药对研究概况[J]. 山东中医杂志, 2011,30(8):587-589.
- [4] 周菲,林美斯,李锐,等. 基于UPLC-Q-TOF-MS技术分析百合地黄汤的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(7):15-22.
- [5] 秦德明,汤明慧. 补肾活血法治疗人工流产后闭经37例[J]. 实用中医药杂志,2015,31(10):914.

- [6] 白慧敏,门波. 门成福治疗卵巢早衰的经验[J]. 四川中医,2019,37(2):13-15.
- [7] 李团网. 浅谈圣愈汤治疗气血虚弱型痛经[J]. 中西医结合心血管病电子杂志,2016,4(3):176-177.
- [8] 董丹华,刘玉军,李亚男,等. HPLC法测定圣愈汤冻干粉中4个指标成分的含量[J]. 中国药房,2020,31(5):576-580.
- [9] 刘倩,梁爱君,梁竹,等. HPLC法测定圣愈汤颗粒中芍药苷的含量[J]. 解放军药学学报,2012,28(6):531-532.
- [10] 傅延龄,宋佳,张林. 经方本原剂量问题研究[M]. 北京:科学出版社,2015.
- [11] 陈士林,刘安,李琦,等. 中药饮片标准汤剂研究策略[J]. 中国中药杂志,2016,41(8):1367-1375.
- [12] 单丽芳,袁彩,杨红梅,等. HPLC-ELSD同时测定参芪复方颗粒中皂苷类成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(14):102-105.
- [13] 刘璐,于双雨,刘艳华. HPLC-ELSD法测定胃康颗粒中人参皂苷Rb₁和黄芪甲苷的含量[J]. 药学实践杂志,2020,38(4):359-363.
- [14] 方江济,谭静玲,沈华旦,等. 运用在线HPLC-UV-DPPH方法评价地黄药材的抗氧化成分及质量[J]. 中国医院药学杂志,2018,38(12):1256-1260,1265.
- [15] 于文娜,张振凌,张颖,等. 地黄炮制过程中异毛蕊花糖苷含量的动态变化[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(18):22-26.
- [16] 梁乙川,伍清芳,刘素娟,等. HPLC法同时测定川芎药材中10种成分含量[J]. 中药材,2019,42(1):136-138.
- [17] 周鸿,黄含含,张静泽,等. 川芎-当归药对研究进展[J]. 中成药,2015,37(1):184-188.
- [18] 严贵亮,段建荣. HPLC法测定川芎-当归药对中酚酸类成分的含量[J]. 中国药师,2015,18(10):1718-1720.
- [19] BOUAYED J, RAMMAL H, DICKO A, et al. Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects[J]. J Neurol Sci, 2007, 262(1/2):77-84.
- [20] 孙立磊,包永睿,孟宪生,等. 一测多评法同时测定川芎中5种成分[J]. 中成药,2016,38(11):2503-2505.
- [21] 张琛,赵钢. 人参皂苷Rd的药理作用研究进展[J]. 中国新药杂志,2011,20(11):953-958.
- [22] 李文娜,肖苑,黄燮南. 人参皂苷Rg₁非心血管和神经系统药理活性研究进展[J]. 中国药理学通报,2012,28(6):751-754.
- [23] 史鑫波,唐志书,刘妍如,等. HPLC-UV-ELSD法同时测定黄芪中黄芪皂苷和黄酮类成分[J]. 天然产物研究与开发,2019,31(3):434-440,458.
- [24] 顾志荣,马天翔,祁梅,等. 黄芪-当归药对配伍前后HPLC指纹图谱及主要化学成分变化[J]. 中国现代应用药学,2020,37(3):275-281.
- [25] 张文婷,何佳,郭增喜,等. HPLC-ELSD特征图谱分析地黄炮制过程成分变化[J]. 中国中药杂志,2020,45(16):3877-3882.

[责任编辑 刘德文]