

芪参颗粒的 HPLC 指纹图谱与多成分定量测定研究

苏汝彬^{1,2}, 李月婷^{1,2}, 马兆臣^{1,2}, 阳 娇^{1,2}, 李 乾⁴, 吴 浩^{1,2}, 郁映婷^{1,2}, 刘 洁^{2,3},
贾志鑫^{2,3}, 肖红斌^{2,3*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100029
2. 北京中医药大学 中药分析与转化研究中心, 北京 100029
3. 北京中医药大学北京中医药研究院, 北京 100029
4. 石河子大学药学院, 新疆 石河子 832002

摘要: 目的 建立芪参颗粒的 HPLC 指纹图谱分析方法, 并对其中的主要成分进行同时定量分析, 为芪参颗粒的质量控制提供依据。方法 采用 HPLC 法, 用 Agilent Eclipse plus C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 0.1%甲酸乙腈溶液-0.1%甲酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 254 nm, 柱温 30 ℃。建立 10 批芪参颗粒样品的 HPLC 指纹图谱, 并进行相似度评价; 通过与各组方药味的比对, 对共有峰进行归属, 通过 LC-Q TOF-MS 对所有共有峰进行鉴定, 并对通过对照品比对确认的 9 个共有峰进行定量测定。结果 10 批样品指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均大于 0.991; 对标定的 18 个共有峰进行归属和鉴定, 发现 1、2、8、14、18 号峰来自黄芪, 3~7、9~11 号峰来自金银花, 12、13、15、16 号峰来自丹参, 17、18 号峰来自甘草; 通过对照品的指认, 发现 4 号峰为绿原酸、8 号峰为毛蕊异黄酮葡萄糖苷、9 号峰为异绿原酸 B、10 号峰为异绿原酸 A、14 号峰为芒柄花苷、15 号峰为丹酚酸 B、16 号峰为丹酚酸 A、17 号峰为甘草酸及 18 号峰为芒柄花素, 并对这 9 种成分进行了定量测定, 测定结果分别为 6.676~10.213、0.628~0.963、1.018~1.886、1.082~1.972、0.477~0.790、11.327~17.788、0.519~0.908、2.000~3.638、0.010~0.016 mg/g。结论 建立的芪参颗粒 HPLC 指纹图谱和 9 个指标成分的同时定量测定方法专属性强, 简便、可靠, 重复性好, 可为芪参颗粒质量控制和评价提供参考。

关键词: 芪参颗粒; HPLC; 指纹图谱; 质量控制; 相似度; LC-Q TOF-MS; 黄芪; 金银花; 丹参; 甘草; 绿原酸; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 异绿原酸 B; 异绿原酸 A; 芒柄花苷; 丹酚酸 B; 丹酚酸 A; 甘草酸; 芒柄花素; 质量评价

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)18-4329-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.18.011

HPLC fingerprint of Qishen Granules and its multi-component quantitative analysis

SU Ru-bin^{1,2}, LI Yue-ting^{1,2}, MA Zhao-chen^{1,2}, YANG Jiao^{1,2}, LI Qian⁴, WU Hao^{1,2}, YU Ying-ting^{1,2},
LIU Jie^{2,3}, JIA Zhi-xin^{2,3}, XIAO Hong-bin^{2,3}

1. School of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
2. Research Center for Chinese Medicine Analysis and Transformation, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
3. Beijing Research Institute of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
4. School of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832002, China

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint and determine main components of Qishen Granules (QG), so as to provide a scientific basis for its quality control. **Methods** HPLC analysis was performed on an Agilent Eclipse plus C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The gradient elution was performed by the mobile phase consisting of acetonitrile-0.1% formic acid and 0.1% formic acid aqueous with the flow rate of 1.0 mL/min, the detection wavelength was set at 254 nm, and the column temperature was 30 ℃.

收稿日期: 2019-05-21

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目 (2018ZX09201008-001); 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目 (2018ZX09101002-002-004); 国家自然科学基金项目 (81573839); 国家自然科学基金项目 (81774155)

作者简介: 苏汝彬 (1994—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药化学与分析。Tel: 17810257503 E-mail: surubin1@163.com

*通信作者 肖红斌, 博士, 教授。Tel: (010)64286490 E-mail: hbxiao69@163.com

Fingerprints of ten batches of QG were determined, and the similarities among fingerprints were evaluated. Attributing analysis of the common peaks was achieved by comparing the retention times with the chromatograms of single constituent drugs, and identifications of common peaks were performed on LC-Q TOF-MS and nine components were further confirmed by the reference substances, the content of the nine compounds was subsequently analyzed by HPLC. **Results** The similarities of 10 batches of QG were all greater than 0.991. There were 18 common peaks marked in total, peaks 1, 2, 8, 14 and 18 from *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*, peaks 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 and 11 from *Lonicera japonica*, peaks 12, 13, 15 and 16 from *Salvia miltiorrhiza*, and peaks 17 and 18 from *Glycyrrhiza uralensis*. Based on the identification of the common peaks, nine components such as chlorogenic acid (peaks 4), calycosin-7-glucoside (peaks 8), isochlorogenic acid B (peaks 9), isochlorogenic acid A (peaks 10), ononin (peaks 14), salvianolic acid B (peaks 15), salvianolic acid A (peaks 16), glycyrrhizic acid (peaks 17), and formononetin (peaks 18) were identified and quantified. The content of the nine components was determined as 6.676—10.213, 0.628—0.963, 1.018—1.886, 1.082—1.972, 0.477—0.790, 11.327—17.788, 0.519—0.908, 2.000—3.638, and 0.010—0.016 mg/g, respectively. **Conclusion** The method established in this study shows good characteristics, specificity, and repeatability, which can provide scientific basis for the quality control of QG.

Key words: Qishen Granules; HPLC; fingerprint; quality control; similarity; LC-Q TOF-MS; *Astragali Radix*; *Lonicerae Japonicae Flos*; *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*; *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; chlorogenic acid; calycosin-7-glucoside; isochlorogenic acid B; isochlorogenic acid A; ononin; salvianolic acid B; salvianolic acid A; glycyrrhizic acid; formononetin; quality evaluation

芪参颗粒 (Qishen Granules, QG) 是在经典名方真武汤和四妙勇安汤的基础上, 结合专家刘渡舟临床用药经验以及通过数据挖掘, 形成的以活血解毒为主要治法的固定复方^[1], 由黄芪、丹参、附子 (黑顺片)、玄参、金银花和甘草 6 味中药组成, 功效为活血解毒、温阳益气, 用于治疗缺血性心脏病和高血压导致的心衰阳虚血瘀证。近期相关的药效学和临床研究表明, QG 在治疗心力衰竭方面具有良好的效果, 对心肌缺血小型猪心脏的各种指标均具有改善作用^[1]; 其能显著减弱心衰大鼠心肌纤维化指数和减少梗死面积^[2-3]; 改善急性心肌梗死小鼠的心脏功能^[4]; 能使慢性心力衰竭患者的 N 端脑钠肽前体 (NT-pro BNP) 水平降低 30%, 同时能延长 6 min 行走距离、提高左心室射血分数、提升病人生活质量等^[5]。

QG 为临床常用固定处方, 但尚无质量控制标准等, 中药质量评价方法是传统中药制剂进入世界及被国际认可的关键所在。而中药指纹图谱结合多指标成分的含量测定是控制中药质量的有效方法, 已被业内人士认可, 具有广阔的发展空间^[6-11]。为了准确、真实、全面地控制该制剂的整体内在质量, 充分发挥复方制剂多层次、多靶点的整体调节优势, 保证临床疗效, 本研究采用 HPLC 法对 QG 进行指纹图谱及多成分的含量测定研究, 首先建立 QG 的指纹图谱, 在此基础上对其中的特征性成分进行指认, 将 QG 的指纹图谱与组方单味药材的指纹谱图进行匹配, 并利用 LC-Q TOF-MS 对其中的共有峰进行鉴定; 同时对其中的绿原酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、芒柄花苷、丹酚

酸 B、丹酚酸 A、甘草酸铵和芒柄花素 9 种指标成分含量进行测定, 为全面评价 QG 的质量提供依据。

1 仪器与材料

Agilent 1260 高效液相色谱仪、Agilent 6550 四极杆飞行时间质谱仪, 美国 Agilent 公司; KQ-500DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; NewClassic MF 分析天平, 瑞士梅特勒公司; N-1300 旋转蒸发仪、OSB-2200 水浴锅, 日本 EYELA 公司; BZF-50 真空干燥箱, 上海博讯医疗生物仪器股份有限公司。

对照品绿原酸 (批号 L-007-160504)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (批号 M-020-170926)、异绿原酸 B (批号 Y-069-161216)、异绿原酸 A (批号 Y-068-160726)、芒柄花苷 (批号 M-0130-171216)、丹酚酸 B (批号 D-012-170522)、丹酚酸 A (批号 O-011-170607)、甘草酸铵 (批号 G-003-170601)、芒柄花素 (批号 C-018-160304) 均购自成都瑞芬思生物科技有限公司, 质量分数均大于 98%。乙腈、甲醇、甲酸, 色谱纯, Thermo Fisher Scientific; 水为娃哈哈纯净水。

黄芪、丹参、金银花、玄参、甘草和附子饮片购买于北京三和药业有限公司、北京太洋树康中药材饮片厂和山东步长制药有限公司, 经北京中医药大学王学勇教授鉴定, 黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根、丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎、金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾、附子为毛茛科植物乌头 *Aconitum*

carmichaelii Debx. 的子根的加工品、玄参为玄参科植物玄参 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. 的干燥根、甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.

的干燥根和根茎, 相关检查符合《中国药典》2015 年版标准。根据批号, 将饮片随机组合用于制备 10 批次 QG 样品, 具体组方信息见表 1。

表 1 10 批 QG 药材饮片样品产地及批号

Table 1 Original places and batch numbers of herbs in ten batches of Qishen Granules

样品 编号	黄芪		丹参		附子		金银花		玄参		甘草	
	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	内蒙古	80540202	河北	70270902	四川	1801092	河南	83450501	浙江	1806038	内蒙古	1806032
S2	内蒙古	80540202	山东	1804087	四川	1801092	山东	1804118	浙江	81140201	内蒙古	1806032
S3	内蒙古	80540202	山东	1804087	四川	1801092	山东	1804118	浙江	1806038	内蒙古	70401102
S4	甘肃	1805034	河北	70270902	四川	1801092	山东	1804118	浙江	81140201	内蒙古	70401102
S5	甘肃	1805034	河北	70270902	四川	1801092	山东	1804118	浙江	1806038	内蒙古	1806032
S6	甘肃	1805034	山东	1804087	四川	1801092	河南	83450501	浙江	1806038	内蒙古	1806032
S7	内蒙古	0200918014	河北	70270902	四川	1801092	山东	1804118	浙江	81140201	内蒙古	1806032
S8	内蒙古	0200918014	河北	70270902	四川	1801092	河南	83450501	浙江	1806038	内蒙古	70401102
S9	内蒙古	0200918014	山东	1804087	四川	1801092	河南	83450501	浙江	81140201	内蒙古	1806032
S10	内蒙古	0200918014	山东	1804087	四川	1801092	山东	1804118	浙江	1806038	内蒙古	70401102

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Agilent Eclipse plus C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 进行分离, 流动相为 0.1%甲酸乙腈溶液(A)-0.1%甲酸水溶液(B), 梯度洗脱: 0~25 min, 5%~15% A; 25~26 min, 15%~17% A; 26~55 min, 17%~30% A; 55~56 min, 30%~38% A; 56~65 min, 38%~50% A, 65~66 min, 50%~95% A; 66~76 min, 95% A; 柱温 30 ℃; 体积流量 1.0 mL/min; 波长 254 nm; 进样量 10 μL; 理论塔板数按丹酚酸 B 峰计算不低于 6 000。

2.2 质谱条件

Dual AJS ESI 离子源, 流动相分流比 1:3, 采用电喷雾负离子模式进行全扫描; 干燥气体积流量 12 L/min, 干燥气温度 250 ℃, 雾化气压力 35 psi (1 psi=6.895 kPa); 毛细管电压 3.5 kV, 碎裂电压 380 V; 一级扫描范围 *m/z* 100~1 400, 二级扫描范围 *m/z* 50~1 400; 碰撞能量 10、20、40 eV。

2.3 溶液的制备

2.3.1 混合对照品溶液的制备 分别取绿原酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、芒柄花苷、丹酚酸 B、丹酚酸 A、甘草酸铵、芒柄花素适量, 精密称定, 加 50%甲醇配制质量浓度分别为 100、20、40、40、20、250、16、80、10 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 取黄芪 90 g、丹参 45 g、黑顺片 27 g、甘草 18 g、金银花 30 g、玄参 30 g, 经水提醇沉等过程制得 QG 制剂^[4]。取 QG 0.1 g, 精密称定, 加适量 50%甲醇溶解, 转移至 10 mL 量瓶中, 再加 50%甲醇定容, 即得。

2.3.3 单味药供试品溶液的制备 分别取 QG 中对应的各单味药材, 按其在处方中对应的处方量取样, 按 QG 制剂工艺制得相应的样品, 再按“2.3.2”项下供试品溶液的制备方法制得单味药供试品溶液。

2.4 QG 指纹图谱研究

2.4.1 精密度试验 取同一批供试品溶液 (S1), 按“2.3.2”项下方法制备, 按照“2.1”项下色谱条件连续测定 6 次, 采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 年版) 进行相似度评价, 以分离度较好且峰面积较大的丹酚酸 B 的保留时间和峰面积为参照, 计算其他共有峰的相对保留时间和峰面积, 结果显示各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 1.2%, 相对峰面积的 RSD 均小于 2.5%, 说明该方法精密度良好。

2.4.2 重复性试验 精密称取同一批样品 (S1) 6 份, 按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.1”项下色谱条件测定, 采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 年版) 进行相似度评价, 以分离度较好且峰面积较大的丹酚酸 B 的保留时间和峰面积为参照, 计算其他共有峰的相

对保留时间和峰面积,结果显示各共有峰相对保留时间的RSD均小于0.6%,相对峰面积的RSD均小于2.1%,说明本方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一批供试品溶液(S1),按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,在放置0、2、4、6、12、24 h后进样测定,采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012年版)进行相似度评价,以分离度较好且峰面积较大的丹酚酸B的保留时间和峰面积为参照,计算其他共有峰的相对保留时间和峰面积,结果显示各共有峰相对保留时间的RSD均小于3.0%,相对峰面积的RSD均小于2.7%,说明供试品溶液在制备后24 h内稳定性良好。

2.4.4 指纹图谱的建立与相似度评价 取10批次QG,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,进样测定,将所得各色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012),以S1样品图谱为参照图谱,采用中位数法,时间窗宽度为0.10 min,对色谱峰进行多点校正后,自动匹配,生成对照指纹图谱,见图1。通过对10批次QG样品指纹图谱分析,发现图中1~18号峰为所有样品溶液色谱图中有色谱峰,因此确定此18个色谱峰为QG的共有峰。10批所测供试品色谱图与对照指纹图谱相似度分别为0.999、0.996、0.998、1.000、0.998、0.997、0.991、0.997、0.995、0.996。结果表明,10批样品间相似度良好,这在一定程度上反映了QG制备工艺的稳定性。

2.4.5 共有峰归属分析及鉴定 分别精密吸取供试

品溶液(S1)和各单味药供试液10 μ L,按照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,见图2。根据“2.4.4”项下匹配结果对共有峰进行编号,再通过保留时间比对,对各共有峰进行归属分析。结果表明,在匹配的18个共有峰中,1、2、8、14号峰来自黄芪,3~7、9~11号峰来自金银花,12、13、15、16号峰来自丹参,17号峰来自甘草,18号峰来源不明确。而玄参和附子对共有峰贡献不明显,可能参与了对其他成分的助溶作用。

为了进一步明确该18个共有峰的来源,本实验利用LC-Q TOF-MS对其进行成分鉴定,总离子流图见图3。通过与对照品比对,峰4、8~10、14~18分别为绿原酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、异绿原酸B、异绿原酸A、芒柄花苷、丹酚酸B、丹酚酸A、甘草酸和芒柄花素,通过分析质谱裂解信息,结合文献报道数据,推断了其他9个化合物结构^[12-14],见表2。

经过质谱鉴定和对照品比对,发现QG指纹图谱中18号峰为芒柄花素,通过查阅文献发现黄芪和甘草中均有芒柄花素存在^[15-16]。但在黄芪和甘草单味药材按处方量比例进样后发现在相应位置上不出峰,而加大黄芪和甘草单味药材供试品质量浓度后,出现了芒柄花素的色谱峰。推断其原因可能是复方提取过程中黄芪和甘草两者的混合增大了芒柄花素的含量;另一方面有文献报道,甘草有较好的助溶作用^[17],可能使得QG中的芒柄花素的含量得到了提升,所以QG中芒柄花素的含量要比相同比例单药材的含量高。

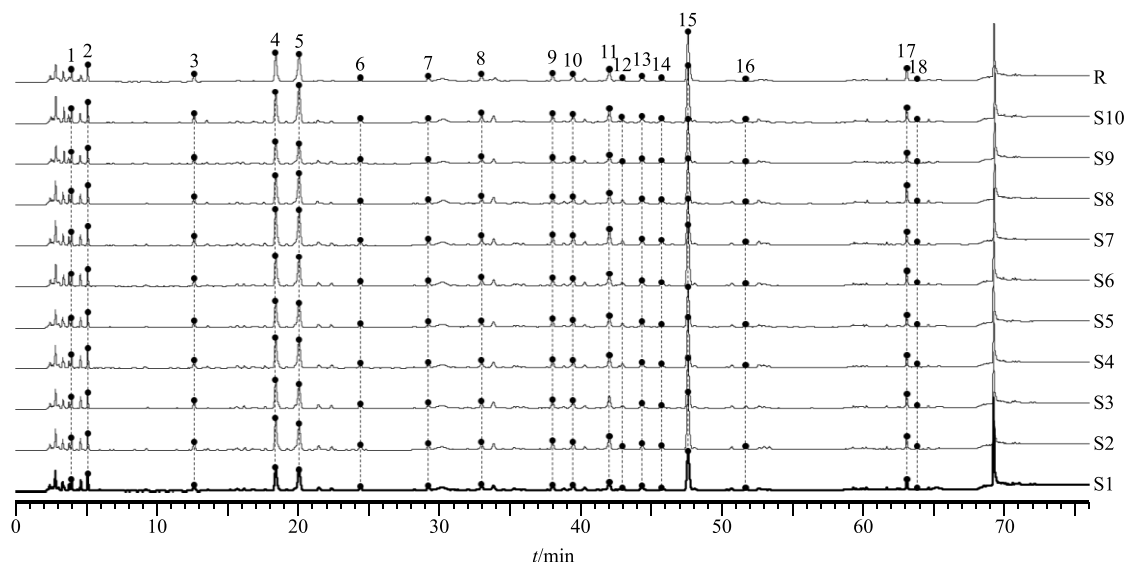


图1 10批QG指纹图谱及其对照指纹图谱(R)

Fig. 1 Fingerprints of ten batches of QG and its reference fingerprint (R)

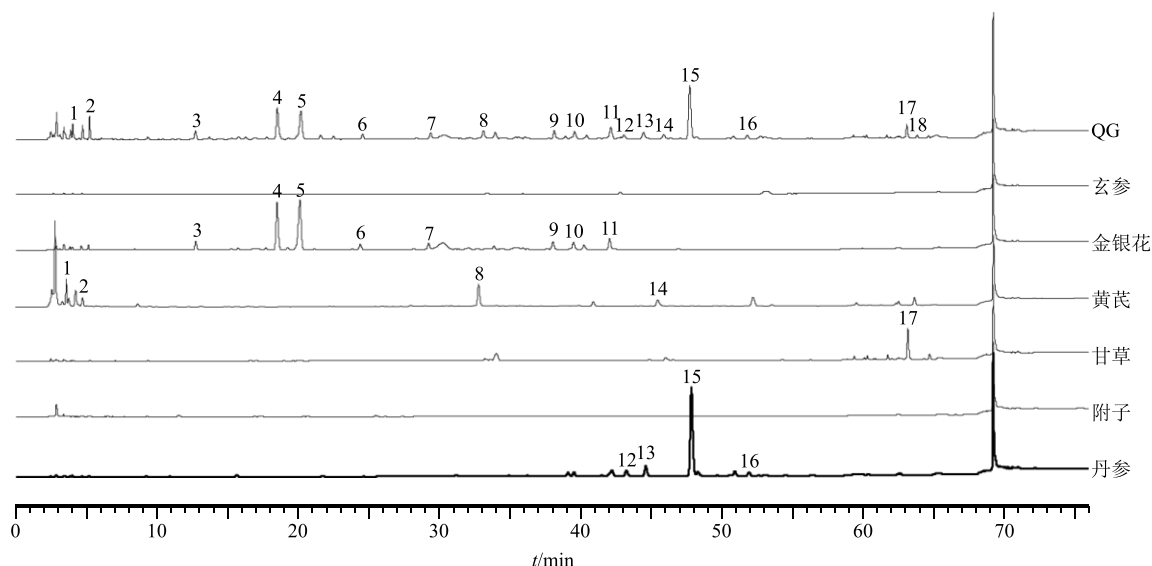


图 2 QG 共有峰归属

Fig. 2 Attributive analysis and identification of common peaks of QG

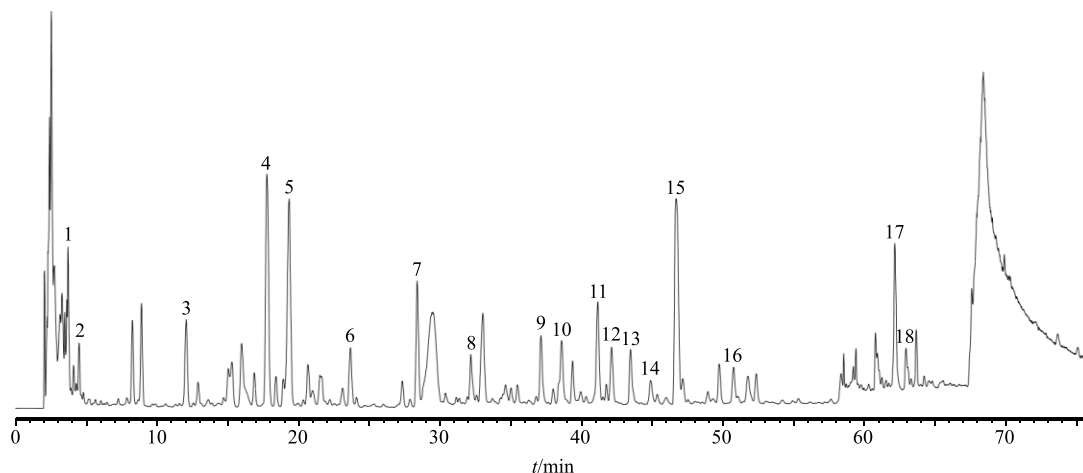


图 3 QG 总离子流图 (负离子模式)

Fig. 3 TIC of QG (negative ion mode)

2.5 指标成分的含量测定

2.5.1 系统适应性试验 精密吸取混合对照品、供试品、空白溶剂 (50% 甲醇) 10 μ L, 按照“2.1”项色谱条件分析, 结果见图 4。供试品在与绿原酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、芒柄花苷、丹酚酸 B、丹酚酸 A、甘草酸和芒柄花素对照品相应的位置上, 均有相同保留时间的色谱峰, 而空白溶剂无色谱峰, 不干扰测定, 且分离度良好。

2.5.2 线性关系考察 分别精密吸取适量“2.3.1”项下的混合对照品溶液, 加 50% 甲醇稀释, 得绿原酸质量浓度为 15.0、30.0、60.0、75.0、90.0、120.0、150.0 μ g/mL; 毛蕊异黄酮苷质量浓度为 2.0、4.0、8.0、10.0、12.0、16.0、20.0 μ g/mL; 异绿原酸 B 质

量浓度为 3.0、6.0、12.0、15.0、18.0、24.0、30.0 μ g/mL; 异绿原酸 A 质量浓度为 3.0、6.0、12.0、15.0、18.0、24.0、30.0 μ g/mL; 芒柄花苷质量浓度为 1.5、3.0、6.0、7.5、9.0、12.0、15.0 μ g/mL; 丹酚酸 B 质量浓度为 25.0、50.0、100.0、125.0、150.0、200.0、250.0 μ g/mL; 丹酚酸 A 质量浓度为 2.0、4.0、8.0、10.0、12.0、16.0、20.0 μ g/mL; 甘草酸铵质量浓度为 6.0、12.0、24.0、30.0、36.0、48.0、60.0 μ g/mL; 芒柄花素质量浓度为 0.3、0.6、1.2、1.5、1.8、2.4、3.0 μ g/mL 的系列混合对照品溶液。取各个质量浓度的混合对照品溶液各 10 μ L 注入液相色谱仪, 按“2.1”项下色谱条件测定峰面积。以峰面积为纵坐标 (Y), 对照品质量浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 计算回归方程及相关系数 (r), 结果分别为绿原酸 $Y=$

表 2 QG 指纹图谱共有峰 LC-MS/MS 鉴定结果

Table 2 Identification of common peaks in QG fingerprint by LC-MS/MS

序号	t_R/min	分子式	离子类型	相对分子 质量 (m/z)	碎片离子 (m/z)	鉴定结果
1	3.787	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	191.020 4	173.010 1, 111.007 4, 57.034 9	枸橼酸
2	4.514	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	117.019 7	99.926 4, 73.030 0, 55.019 5	琥珀酸
3	12.045	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	353.088 4	191.056 2, 179.034 7, 135.044 8, 173.044 4, 161.023 6	新绿原酸 ^[12]
4	17.751	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	353.088 4	191.056 4, 161.023 8, 179.034 1, 173.045 1, 135.044 3	绿原酸 [#]
5	19.307	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	353.088 4	173.045 4, 179.034 7, 191.056 0, 135.044 6, 161.023 5	隐绿原酸 ^[12]
6	23.661	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_9$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	403.124 7	357.117 1, 195.065 6, 179.055 3, 177.054 2, 149.043 4, 125.023 8	当药苷 ^[13]
7	28.387	$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	403.124 5	371.097 5, 241.070 2, 223.060 1, 179.069 8, 165.054 8, 121.028 8	secoxyloganin ^[13]
8	32.175	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	491.120 7	283.061 4, 268.037 8, 135.046 2	毛蕊异黄酮葡萄糖苷 [#]
9	37.138	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	515.120 4	353.087 3, 173.044 9, 179.034 2, 335.076 4, 191.056 0, 135.044 9, 161.023 4	异绿原酸 B ^{#[14]}
10	38.597	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	515.120 0	353.088 3, 191.056 0, 179.034 3, 335.076 6, 135.044 7, 161.023 8	异绿原酸 A ^{#[14]}
11	41.137	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	515.120 2	353.087 7, 173.044 7, 179.034 2, 191.055 5, 135.044 4, 335.075 4, 161.023 3	异绿原酸 C ^[14]
12	42.116	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_8$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	359.077 4	197.045 6, 179.034 9, 135.045 1, 109.029 9	迷迭香酸
13	43.457	$\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	537.103 8	493.111 9, 383.075 1, 295.060 6	lithospermic acid
14	44.877	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_9$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	475.124 9	429.117 4, 267.066 0, 252.042 7, 224.047 6	芒柄花苷 [#]
15	46.683	$\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	717.146 3	519.092 9, 339.050 2, 321.039 9, 295.060 4	丹酚酸 B [#]
16	50.732	$\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	493.114 1	295.060 7, 109.029 3	丹酚酸 A [#]
17	62.123	$\text{C}_{42}\text{H}_{62}\text{O}_{16}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	821.397 9	645.361 6, 469.332 1, 351.056 1, 193.035 4	甘草酸 [#]
18	62.908	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	267.066 5	252.043 0, 223.045 3, 208.052 4, 135.008 5, 132.021 3	芒柄花素 [#]

#为经过对照品比对的化合物

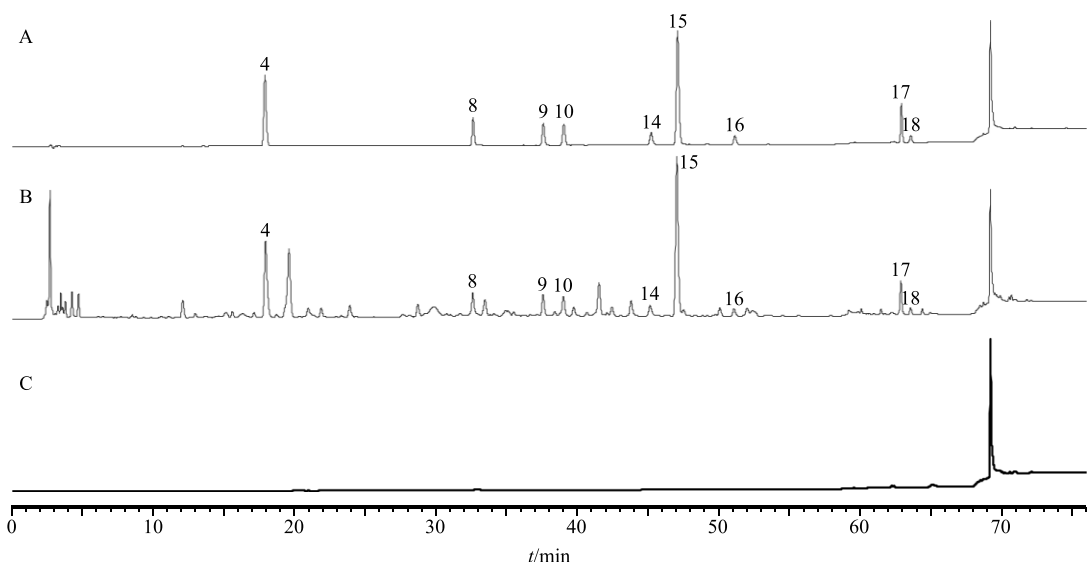
#indicates that the compounds were compared with standard substance

10.095 8 $X-4.959$ 8, $r=0.999$ 9, 线性范围 15.0~150.0 $\mu\text{g/mL}$; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 $Y=25.986$ 4 $X-3.317$ 4, $r=0.999$ 4, 线性范围 2.0~20.0 $\mu\text{g/mL}$; 异绿原酸 B $Y=14.430$ 0 $X-0.535$ 6, $r=0.999$ 9, 线性范围 3.0~30.0 $\mu\text{g/mL}$; 异绿原酸 A $Y=15.046$ 2 $X-0.988$ 7, $r=0.999$ 9, 线性范围 3.0~30.0 $\mu\text{g/mL}$; 芒柄花苷 $Y=19.869$ 8 $X-0.614$ 6, $r=0.999$ 9, 线性范围 1.5~15.0 $\mu\text{g/mL}$; 丹酚酸 B $Y=10.294$ 6 $X-12.411$ 7, $r=0.999$ 9, 线性范围 25.0~250.0 $\mu\text{g/mL}$; 丹酚酸 A $Y=11.226$ 1 $X-6.537$ 9, $r=0.999$ 5, 线性范围 2.0~20.0 $\mu\text{g/mL}$; 甘草酸铵 $Y=8.971$ 2 $X-1.014$ 2, $r=0.999$ 9, 线性范围 6.0~60.0 $\mu\text{g/mL}$; 芒柄花素 $Y=39.473$ 1 $X+1.216$ 9, $r=0.999$ 0, 线性范围 0.3~3.0 $\mu\text{g/mL}$ 。结果表明, 各对照品在各

质量浓度范围内线性关系良好。

2.5.3 精密度试验 精密吸取中等质量浓度的混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 分别计算峰面积。绿原酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、芒柄花苷、丹酚酸 B、丹酚酸 A、甘草酸铵和芒柄花素峰面积 RSD 分别为 0.05%、0.02%、0.15%、0.14%、0.46%、0.06%、0.43%、0.33%、0.32%, 表明仪器精密度良好。

2.5.4 稳定性试验 精密吸取“2.3.2”项下方法制备所得 QG (S1) 供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、12 h, 精密吸取 10 μL 供试品溶液并按“2.1”项下色谱条件进行测定, 结果绿原酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、芒柄花苷、丹酚酸 B、丹酚酸 A、甘草酸铵和芒柄花素峰面积 RSD



4-绿原酸 8-毛蕊异黄酮葡萄糖苷 9-异绿原酸 B 10-异绿原酸 A 14-芒柄花苷 15-丹酚酸 B 16-丹酚酸 A 17-甘草酸铵 18-芒柄花素
4-chlorogenic acid 8-calycosin-7-glucoside 9-isochlorogenic acid B 10-isochlorogenic acid A 14-ononin 15-salvianolic acid B
16-salvianolic acid A 17-glycyrrhizic acid ammonium salt 18-formononetin

图 4 混合对照品 (A)、QG 供试品溶液 (S1, B)、空白溶剂 (C) 的 HPLC 图

Fig. 4 HPLC of mixed reference substance (A), QG sample (S1, B), and control solution (C)

分别为 0.08%、3.10%、1.30%、1.00%、1.10%、2.30%、0.09%、0.46%，表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.5.5 重复性试验 根据“2.3.2”项下方法平行制备 6 份 QG (S1) 供试品溶液，分别精密吸取 10 μ L 供试品溶液并按“2.1”项下色谱条件进行测定，结果绿原酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、芒柄花苷、丹酚酸 B、丹酚酸 A、甘草酸铵和芒柄花素质量浓度 RSD 分别为 0.24%、0.58%、0.59%、0.33%、0.35%、0.23%、2.40%、0.30%、0.39%，表明该方法重复性良好。

2.5.6 加样回收率试验 取 6 份已测定各成分量的 QG (S1) 样品 0.05 g，精密称定，另外分别取绿原酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、芒柄花苷、丹酚酸 B、丹酚酸 A、甘草酸铵和芒柄花素适量，分别加 50% 甲醇配制成质量浓度分别 1.0、0.1、1.0、1.0、0.1、1.0、1.0、1.0、0.1 mg/mL，分别加入绿原酸溶液 485.0 μ L、毛蕊异黄酮葡萄糖苷溶液 540 μ L、异绿原酸 B 溶液 74.5 μ L、异绿原酸 A 溶液 77.5 μ L、芒柄花苷溶液 359.0 μ L、丹酚酸 B 溶液 930.0 μ L、丹酚酸 A 溶液 42.0 μ L、甘草酸铵溶液 134.0 μ L、芒柄花素溶液 80 μ L，按“2.3.2”项下方法制备样品溶液，在“2.1”项下色谱条件下进行测定，计算各成分的平均回收率和 RSD 值，结果平均回收率分别为 104.86%、95.04%、104.91%、97.18%、100.96%、104.73%、101.14%、

95.30%、102.79%，RSD 分别为 2.49%、1.81%、1.78%、1.75%、1.18%、1.43%、3.11%、1.56%、2.08%。结果表明，该方法准确度良好。

2.5.7 10 批次样品的含量测定结果 取 10 批 QG 样品，按照“2.3.2”项方法制备供试品溶液，按照“2.1”项下色谱条件进样分析，测定 9 种成分的量，结果见表 3 (甘草酸质量=甘草酸铵质量/1.020 7)。10 批样品中各成分质量分数分别为绿原酸 6.676~10.213 mg/g，毛蕊异黄酮葡萄糖苷 0.628~0.963 mg/g，异绿原酸 B 1.018~1.886 mg/g，异绿原酸 A 1.082~1.972 mg/g，芒柄花苷 0.477~0.790 mg/g，丹酚酸 B 11.327~17.788 mg/g，丹酚酸 A 0.519~0.908 mg/g，甘草酸 2.000~3.638 mg/g，芒柄花素 0.010~0.016 mg/g。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

本实验考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1% 甲酸水溶液、乙腈-0.1% 甲酸水溶液等流动相体系。发现甲醇-水、甲醇-0.1% 甲酸水溶液作为流动相出现拖尾峰及出峰时间过长；乙腈-水作为流动相基线出现漂移；乙腈-0.1% 甲酸水溶液作为流动相部分成分保留时间不稳定，最终选择了 0.1% 甲酸乙腈溶液-0.1% 甲酸水溶液作为流动相进行分析。另外对 210、235、254、270、286、327、350 nm 等波长进行比较，发现 254 nm 处出峰信息较多，各峰分离良好

表 3 10 批 QG 样品中 9 种指标成分含量测定结果
Table 3 Content of nine characteristic compounds in ten batches of QG

批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)								
	绿原酸	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	异绿原酸 B	异绿原酸 A	芒柄花苷	丹酚酸 B	丹酚酸 A	甘草酸	芒柄花素
S1	6.676	0.740	1.038	1.152	0.524	11.327	0.746	2.096	0.012
S2	8.924	0.824	1.611	1.654	0.720	16.830	0.854	2.590	0.012
S3	8.564	0.739	1.550	1.624	0.641	14.383	0.740	2.851	0.014
S4	8.873	0.750	1.528	1.601	0.599	14.654	0.795	2.441	0.015
S5	7.494	0.628	1.336	1.418	0.477	11.603	0.742	2.295	0.011
S6	8.964	0.930	1.425	1.592	0.721	17.788	0.811	2.826	0.016
S7	10.213	0.963	1.886	1.972	0.790	13.478	0.908	2.550	0.015
S8	8.140	0.839	1.292	1.451	0.749	13.427	0.845	3.638	0.015
S9	6.416	0.706	1.018	1.082	0.561	12.966	0.519	2.000	0.010
S10	8.350	0.947	1.630	1.707	0.715	16.422	0.885	2.875	0.014

且峰高比例协调, 且对指认出的 9 个特征峰有较好吸收, 故选择 254 nm 作为检测波长。

3.2 指纹图谱建立的思考

本实验在建立 QG 的指纹图谱时, 仅采用了单一的提取制备方法、检测波长及流动相, 发现此单一的条件, 难以全面控制和评价复方的质量。如本实验中玄参中哈巴昔等有效成分在末端吸收 210 nm 下响应较好, 在本实验波长下较难出峰; 附子中乌头碱类生物碱所需流动相与样品中其他成分所需流动相差异较大, 在兼顾复方各类成分分析时, 没能体现该类成分对复方指纹图谱共有峰的贡献。故以后在 QG 的质量控制中可考虑在多波长条件下建立指纹图谱、增加玄参和附子质量控制的方法。

3.3 指标成分的选择

在选择指标成分时, 考虑到成分应具备相关的心血管保护活性, 通过查找相关文献发现, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素^[18]、芒柄花苷^[19]、丹酚酸 B 和丹酚酸 A^[20-22]、绿原酸和异绿原酸 A^[23-24]、甘草酸^[25]均具有一定的心血管保护活性。

3.4 测定结果分析

本研究首次建立了 QG 指纹图谱及 9 种指标成分含量测定的方法, 该方法方便简便, 重复性好, 为 QG 质量综合评价提供了科学依据。由结果可知, 尽管 10 批 QG 由不同产地、不同批次的药材制备, 其总体化学成分可能具有一定的差异, 但通过本研究建立的指纹图谱进行相似性分析, 发现 10 批样品的相似度较好, 所选的 18 个共有峰相似度达 0.99 以上, 可以发现 QG 制备工艺具有较好的稳定性,

可用于 QG 的质量控制; 此外利用该方法同时测定了 QG 中 9 种指标成分的含量, 发现丹酚酸 B 含量最高, 其次是绿原酸类化合物和甘草酸, 绿原酸类化合物特征性较差, 因此不适宜定为质控指标, 而丹酚酸 B 和甘草酸则有较好的特征性, 且文献报道其有心功能保护等相关作用^[22,25], 因此可考虑作为 QG 的质控指标成分。综上, 本研究成果为制定 QG 的质量标准, 尤其是确定指标成分及其含量范围提供借鉴。

参考文献

- [1] Guo S Z, Li P, Wang W, *et al.* Systems-biology dissection of mechanisms and chemical basis of herbal formula in treating chronic myocardial ischemia [J]. *Pharmacol Res*, 2016, 114: 196-208.
- [2] Chang H, Li C, Wang W, *et al.* QSKL protects against myocardial apoptosis on heart failure via PI3K/Akt-p53 signaling pathway [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 16986-16998.
- [3] Lu L H, Li C, Wang W, *et al.* Cardioprotective effects of Qishen Granule on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ handling in heart failure rats [J]. *Chin J Integr Med*, 2017, 23(7): 510-517.
- [4] Li C, Wang J, Wang W, *et al.* Qishen Granules inhibit myocardial inflammation injury through regulating arachidonic acid metabolism [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 36949-36961.
- [5] Wang J P, Shi J, Wang W, *et al.* Safety and efficacy of Qishen Granules in patients with chronic heart failure: Study protocol for a randomized controlled trial [J]. *Trials*, 2017, 18(1): 468-474.
- [6] 曾 杰, 肖亚平, 徐晓玉, 等. 右归饮 HPLC 指纹图谱

- 研究及 9 种成分定量分析 [J]. 中草药, 2017, 48(24): 5143-5150.
- [7] 鞠爱春, 罗瑞芝, 苏小琴, 等. 注射用益气复脉 (冻干) 化学成分及质量控制研究进展 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(3): 365-371.
- [8] Gao S M, Liu J S, Wang M, *et al.* Quantitative and HPLC fingerprint analysis combined with chemometrics for quality evaluation of *Codonopsis Radix* processed with different methods [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(2): 160-168.
- [9] 侯文, 刘宏胜, 张雅敏, 等. 基于 HPLC 指纹图谱和多成分同时测定的护肝剂质量评价研究 [J]. 中草药, 2018, 49(24): 5830-5835.
- [10] 范兴, 安昌, 黄德福, 等. 肝宝胶囊 HPLC 指纹图谱建立及 5 种成分同时测定 [J]. 中成药, 2019, 41(4): 752-756.
- [11] 沈晨, 魏婷婷, 宋兆辉, 等. 止动颗粒 UPLC 指纹图谱建立及 3 种成分测定 [J]. 中草药, 2019, 50(2): 388-395.
- [12] Li Z H, Guo X M, Yang P, *et al.* New MS network analysis pattern for the rapid identification of constituents from traditional Chinese medicine prescription Lishukang Capsules *in vitro* and *in vivo* based on UHPLC/Q-TOF-MS [J]. *Talanta*, 2018, 189: 606-621.
- [13] Zhang F X, Li M, Shen X Y, *et al.* A target and nontarget strategy for identification or characterization of the chemical ingredients in Chinese herb preparation Shuang-Huang-Lian oral liquid by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Biomed Chromatogr*, 2018, 32(3): 4110-4128.
- [14] Sun X G, Zhang Y F, Ma B P, *et al.* Qualitative and quantitative analysis of furofuran lignans, iridoid glycosides, and phenolic acids in *Radix Dipsaci* by UHPLC-Q-TOF/MS and UHPLC-PDA [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 154: 40-47.
- [15] 李延勋, 栗章彭, 苏艳芳, 等. 膜荚黄芪化学成分研究 [J]. 中草药, 2017, 48(13): 2601-2607.
- [16] 孙鹏. 甘草化学成分研究 [J]. 中国医药指南, 2010, 8(30): 226-227.
- [17] 陶叶琴, 唐闻汉, 贺福元, 等. 基于超分子“印迹模板”理论的甘草增溶特征研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(10): 1849-1854.
- [18] 李秀丽, 宋瑞霞, 白锋, 等. 四种黄芪黄酮类化合物单体对血管内皮细胞功能的保护作用 [J]. 兰州大学学报: 医学版, 2011, 37(4): 1-5.
- [19] Dong L, Yin L, Lu J C, *et al.* Anti-inflammatory effects of ononin on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells [J]. *Mol Immunol*, 2017, 83: 46-51.
- [20] 杜娟, 杨小敏, 毕跃峰, 等. 丹参中各活性部位对心肌保护作用的对比评价 [J]. 中国药理学杂志, 2018, 53(9): 690-694.
- [21] 王木兰, 潘永明, 陈民利, 等. 丹酚酸 A 对心肌缺血再灌注损伤大鼠心率变异性及心肌损伤的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(11): 24-30.
- [22] 刘培, 付君秋, 安胜军, 等. 丹酚酸 B 和丹参酮 II_A 对大鼠胸主动脉外膜成纤维细胞增殖的影响 [J]. 中国药理学通报, 2017, 33(7): 991-996.
- [23] 张骏, 杨小利, 王红勇. 绿原酸对心肌缺血-再灌注损伤的防护作用基础研究 [J]. 中国药业, 2015, 24(17): 3-5.
- [24] 李春雨, 孟宪丽, 张艺, 等. 灯盏细辛药效物质基础 3,5-二咖啡酰奎宁酸对大鼠局灶性脑缺血-再灌注损伤的保护作用 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(6): 473-476.
- [25] 郑磊, 付帮泽, 王伟, 等. 甘草酸和甘草次酸对 H9c2 鼠心肌细胞活性氧水平的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(1): 21-25.