

右归饮 HPLC 指纹图谱研究及 9 种成分定量分析

曾 杰^{1,2,3}, 肖亚平^{1,2,3}, 安 尧^{1,2,3}, 徐晓玉^{1,2,3*}

1. 西南大学药学院中医药学院, 重庆 400715

2. 重庆市高校中药新药筛选重点实验室, 重庆 400715

3. 国家中医药管理局中药药理学重点建设学科, 重庆 400715

摘要: **目的** 建立右归饮的 HPLC 指纹图谱, 并同时测定 9 种成分(京尼平苷酸、莫诺苷、绿原酸、栀子苷、马钱苷、松脂醇二葡萄糖苷、甘草苷、芦丁和甘草酸)的量, 为控制右归饮的质量提供依据。 **方法** 采用 Pursuit XRs 5 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)进行分离, 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 230 nm, 柱温 30 ℃。建立 10 批右归饮样品的 HPLC 指纹图谱, 并进行相似度评价; 通过与各组方药味及对照品的保留时间和紫外光谱图比对, 对共有峰进行归属和指认, 并测定指认出的 9 个成分的量。 **结果** 10 批样品指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均大于 0.904; 共标定 30 个共有峰, 其中 8 个来自杜仲, 8 个来自甘草, 6 个来自山茱萸, 2 个来自附子, 2 个来自熟地黄, 1 个来自肉桂, 山药及枸杞对共有峰贡献不明显, 其中 3 个共有峰不能明确其来源; 通过对共有峰进行指认, 发现 7 号峰为京尼平苷酸、9 号峰为莫诺苷、11 号峰为绿原酸、12 号峰为栀子苷、13 号峰为马钱苷、14 号峰为松脂醇二葡萄糖苷、18 号峰为甘草苷、21 号峰为芦丁及 30 号峰为甘草酸, 并对这 9 种成分进行了定量测定, 其定量测定结果分别为 87.6~119.1 μg/g、323.6~365.6 μg/g、108.3~124.1 μg/g、79.5~85.0 μg/g、171.7~188.0 μg/g、163.0~238.3 μg/g、64.5~53.3 μg/g、159.8~168.5 μg/g、72.8~83.6 μg/g。 **结论** 所建立的右归饮 HPLC 指纹图谱及定量测定方法稳定性、重复性好, 可为右归饮质量控制和评价提供参考。

关键词: 右归饮; HPLC; 指纹图谱; 相似度; 京尼平苷酸; 莫诺苷; 绿原酸; 栀子苷; 马钱苷; 松脂醇二葡萄糖苷; 甘草苷; 芦丁; 甘草酸

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)24-5143-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.24.014

Study on HPLC fingerprint of Youguiyin and its multi-component quantitative analysis

ZENG Jie^{1,2,3}, XIAO Ya-ping^{1,2,3}, AN Yao^{1,2,3}, XU Xiao-yu^{1,2,3}

1. College of Pharmaceutical Sciences, Chinese Medicine, Southwest University, Chongqing 400715, China

2. Chongqing Key Laboratory of New Drug Screening from Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400715, China

3. Pharmacology of Chinese Materia Medica-the Key Discipline Constructed by the State Administration of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400715, China

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint and determine nine components (geniposidic acid, morroniside, chlorogenic acid, geniposide, loganin, pinorensin diglucoside, liquiritin, rutin, and glycyrrhizic acid) of Youguiyin, so as to provide a scientific basis for the quality control. **Methods** HPLC analysis was performed on Pursuit XRs 5 C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The gradient elution was performed by the mobile phase consisting of acetonitrile and 0.1% formic acid aqueous with the flow rate of 1.0 mL/min, the detection wavelength was set at 230 nm, and the column temperature was 30 ℃. Fingerprints of ten batches of Youguiyin were determined, and the similarities among fingerprints were evaluated. Attributive analysis and identification of common peaks were performed by comparing the retention time and UV spectra among 10 batches of Youguiyin. The formula

收稿日期: 2017-07-08

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81473549); 国家科技重大新药创制专项(2014ZX09304-306-04); 教育部基本科研业务费专项(XDJK2017D161)

作者简介: 曾 杰(1992—), 博士研究生。Tel: 18375734779 E-mail: zj19920715@sina.com

*通信作者 徐晓玉(1958—), 教授, 博士生导师, 从事新药研发。Tel: (023)68251225 E-mail: xuxiaoyu@swu.edu.cn

ingredients and reference substance, and nine components content were determined. **Results** The similarities of fingerprints of 10 batches of Youguiyin and reference fingerprints were all greater than 0.904. There were 30 mutual peaks marked in total, which were eight mutual peaks from *Eucommia ulmoides*, eight mutual peaks from *Glycyrrhiza uralensis*, six mutual peaks from *Cornus officinalis*, six mutual peaks from *Aconitum carmichaeli*, one mutual peaks from *Cinnamomum cassia*, and none of mutual peaks were originated from *Dioscorea opposita* and *Lycium barbarum*, and three of them cannot be originated. Based on the the identification of the common peaks, nine components [geniposidic acid (peaks 7), morroniside (peaks 9), chlorogenic acid (peaks 11), gardenoside (peaks 12), loganin (peaks 13), pinoresinol diglucoside (peaks 14), liquorice glycosides (peaks 18), rutin (peaks 21), and glycyrrhizic acid (peaks 30)] were identified and quantified. The quality fraction of nine components were 87.6—119.1 $\mu\text{g/g}$, 323.6—365.6 $\mu\text{g/g}$, 108.3—124.1 $\mu\text{g/g}$, 79.5—85.0 $\mu\text{g/g}$, 171.7—188.0 $\mu\text{g/g}$, 163.0—238.3 $\mu\text{g/g}$, 64.5—53.3 $\mu\text{g/g}$, 159.8—168.5 $\mu\text{g/g}$, and 72.8—83.6 $\mu\text{g/g}$ in raw material. **Conclusion** The method established in this study is simple, accurate and highly reproducible, and can provide basis for quality control of Youguiyin.

Key words: Youguiyin; HPLC; fingerprint; similarity; geniposidic acid; morroniside; chlorogenic acid; geniposide; loganin; pinoresinol diglucoside; liquiritin; rutin; glycyrrhizic acid

右归饮出自《景岳全书》，由熟地黄、枸杞、山茱萸、山药、肉桂、附子、杜仲、甘草组成。方中以甘温之熟地黄为君药，养血滋阴、填精补髓、滋补肝肾；以甘温养血滋阴之枸杞子、山茱萸、山药为辅佐，助君药以滋养肝肾阴血、生精益髓；再添附子、肉桂、杜仲之辛甘大热，温肾壮阳、祛寒消翳；山药、甘草兼能益气健脾。纵观全方诸药合用，不纯为壮阳之方，实为自阴中求阳、滋阴壮阳、养血填精补髓、厚补肝肾精血之方。古方用于治疗年老或久病气衰神疲、畏寒肢冷、腰膝酸软、阳萎遗精或阳衰无子、饮食减少、大便不实、小便自遗、舌淡苔白、脉沉而迟的命门不足、肾精亏虚证。现代临床主要用以治疗骨质疏松、骨关节炎等骨代谢疾病^[1-4]。课题组前期研究表明右归饮还能改善肾虚大鼠脑组织神经细胞功能，促进促红细胞生成素(EPO)生成^[5-6]。但迄今为止，国内外尚未见对右归饮指纹图谱及多成分同时测定的研究报道。本实验拟采用 HPLC 法建立右归饮的指纹图谱，并对指纹图谱中的 27 个共有峰进行归属，同时还测定其中 9 种成分的量，以便有效地控制右归饮的质量。

1 仪器与试药

Agilent 1200 高效液相色谱仪，美国 Agilent 公司，包括高压二元梯度泵、自动进样器、柱温箱、DAD 检测器、Agilent 1200 色谱工作站；EL204 电子分析天平，上海梅特勒-托利多仪器有限公司；KQ5200E 超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司；RE-2000A 旋转蒸发器，上海亚荣生化仪器厂；Millipore 超纯水器，美国 Millipore 公司。

对照品京尼平苷酸(批号 150828)、莫诺苷(批号 160308)、绿原酸(批号 140902)、松脂醇二葡萄糖苷(批号 150827)、甘草苷(批号 151127)、甘草

酸(批号 160612)均购自于成都克洛玛生物技术有限公司，质量分数均大于 98%。对照品芦丁(批号 100080-200707)、栀子苷(批号 110749-200714)均购自中国食品药品检定研究院，质量分数均大于 98%。对照品马钱苷(批号 150512)购自于上海源叶生物技术有限公司，质量分数大于 98%。磷酸(批号 20100201)，购自于成都市科龙化工试剂厂；甲醇和乙腈均为色谱纯，购自于美国天地公司；水为 Milli-Q 超纯水。

熟地黄、山药、山茱萸、甘草、枸杞、肉桂、杜仲、附子饮片，购自重庆市各大医院及药房，来源见表 1。经西南大学中药研究所齐红艺教授鉴定，熟地黄为玄参科地黄属植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的干燥块根、山药为薯蓣科薯蓣属植物薯蓣 *Dioscorea opposita* Thunb. 的干燥根茎、山茱萸为山茱萸科山茱萸属植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉、甘草为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的根茎、枸杞为茄科枸杞属植物枸杞 *Lycium barbarum* L. 的干燥成熟果实、肉桂为樟科樟属植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl. 的干皮和粗枝皮、杜仲为杜仲科杜仲属植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥树皮、附子为毛茛科乌头属植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 的子根。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Pursuit XRs 5 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)进行分离，流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液，梯度洗脱：0~30 min，1%~10%乙腈；30~80 min，10%~17%乙腈；80~105 min，17%~30%乙腈；105~125 min，30%~55%乙腈，体积流量

表1 10批样品饮片来源

Table 1 Origins of ten batches of Youguiyin

样品	饮片名称	产地	批号	生产企业	购买地	样品	饮片名称	产地	批号	生产企业	购买地
S1	熟地黄	山西	151101	重庆慧远药业有限公司	西南医院	S6	熟地黄	河南	160601	重庆康迪药业有限公司	万和药房
	山药	河南	151201				山药	河南	160501		
	山茱萸	河南	150801				山茱萸	河南	160701		
	枸杞	宁夏	160101				枸杞	宁夏	160902		
	肉桂	广西	160101				肉桂	广西	160501		
	杜仲	四川	151201				杜仲	四川	160501		
	炙甘草	内蒙古	151101				炙甘草	新疆	160501		
	制附子	四川	150701				制附子	四川	160401		
S2	熟地黄	河南	20160301	重庆慧远药业有限公司	和平药房	S7	熟地黄	河南	20160807	重庆慧远药业有限公司	和平药房
	山药	河南	20160301				山药	河南	20160101		
	山茱萸	河南	20160301				山茱萸	河南	20160201		
	枸杞	宁夏	2016060601				枸杞	宁夏	20160201		
	肉桂	广西	2010301				肉桂	广西	20160101		
	杜仲	四川	201606001				杜仲	四川	20160901		
	炙甘草	内蒙古	20160301				炙甘草	内蒙古	20160301		
	制附子	四川	20160301				制附子	四川	150701	绵阳神农药业有限公司	
S3	熟地黄	山西	160601	重庆慧远药业有限公司	万鑫药房	S8	熟地黄	山西	160601	重庆慈晟药业有限公司	重庆市北碚中医院
	山药	河南	160803	郑州瑞龙制药股份有限公司			山药	河南	160401		
	山茱萸	河南	160601	四川博仁药业有限责任公司			山茱萸	河南	160601361	成都康美药业生产有限公司	
	枸杞	宁夏	160508				枸杞	宁夏	160601	重庆市慈晟药业有限公司	
	肉桂	广西	160401				肉桂	广西	1510057	四川新荷花中药饮片有限公司	
	杜仲	四川	160201	重庆市帛霖药业有限公司			杜仲	四川	160801271	成都康美药业生产有限公司	
	炙甘草	内蒙古	160602	四川博仁药业有限责任公司			炙甘草	新疆	160401	重庆市慈晟药业有限公司	
	制附子	四川	160602				制附子	四川	1606063	四川新荷花	
S4	熟地黄	河南	160601	成都市吉安康药业有限公司	鑫斛药庄	S9	熟地黄	河南	1604080112	亳州市沪淮药业有限公司	重庆市第九人民医院
	山药	河南	160601	成都市都江堰春盛中药饮片股份有限公司			山药	河南	1604080126		
	山茱萸	河南	160601	郑州瑞龙制药股份有限公司			山茱萸	浙江	1512060042		
	枸杞	宁夏	160601	成都市都江堰春盛中药饮片股份有限公司			枸杞	宁夏	1510240022		
	肉桂	广西	160501				肉桂	广西	1512210472		
	杜仲	四川	160601	成都吉安康药业有限公司			杜仲	四川	1512060022		
	炙甘草	新疆	160501				炙甘草	内蒙古	1501070232		
	制附子	四川	160501				制附子	四川	1510240041		
S5	熟地黄	河南	160322	四川利民中药饮片有限责任公司	桐君阁大药房	S10	熟地黄	山西	150701	重庆市慈晟药业有限公司	重庆市大坪医院
	山药	河南	160719	成都市吉安康药业有限公司			山药	河南	20151201	四川聚云中药饮片有限公司	
	山茱萸	河南	151014				山茱萸	山西	150701		
	枸杞	宁夏	160806	太极集团四川绵阳制药有限公司			枸杞	宁夏	20160101		
	肉桂	广西	160226	重庆慧远药业有限公司			肉桂	广西	20151201		
	杜仲	四川	160401				杜仲	四川	20160101		
	炙甘草	新疆	150806				炙甘草	新疆	20160101		
	制附子	四川	130801				制附子	四川	150101	重庆京海药业有限公司	

1.0 mL/min, 检测波长 230 nm, 柱温 30 ℃, 进样量 10 μ L^[7-8]。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 取京尼平苷酸、莫诺苷、绿原酸、栀子苷、马钱苷、松脂醇二葡萄糖苷、甘草苷、芦丁、甘草酸对照品适量, 加甲醇制成含尼平苷酸 930 μ g/mL、莫诺苷 1 590 μ g/mL、绿原酸 780 μ g/mL、栀子苷 270 μ g/mL、马钱苷 1 350 μ g/mL、松脂醇二葡萄糖苷 530 μ g/mL、甘草苷 600 μ g/mL、芦丁 870 μ g/mL、甘草酸 670 μ g/mL 的混合对照品溶液, 即得。

2.2.2 供试品溶液 熟地黄 9 g、山药 6 g、山茱萸 3 g、枸杞 6 g、甘草 3 g、杜仲 6 g、肉桂 3 g、制附子 3 g, 加 400 mL 水, 煎煮(武火煮沸、文火慢煎) 2 次, 每次 0.5 h, 合并滤液。利用旋转蒸发仪浓缩至 0.98 g/mL 生药质量浓度, 即得右归饮。

取右归饮 10 mL, 加甲醇定容至 25 mL, 密闭, 超声(250 W, 40 kHz) 溶解 30 min, 放冷, 静置过夜, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 并用 0.45 μ m 滤膜滤过, 即得。

2.2.3 单味药供试品溶液 称取熟地黄 9 g、山药 6 g、山茱萸 3 g、枸杞 6 g、甘草 3 g、杜仲 6 g、肉桂 3 g、制附子 3 g, 分别按照“2.2.2”项方法操作, 即得。

2.2.4 阴性对照溶液 分别称取缺熟地黄、山药、山茱萸、甘草、枸杞、肉桂、杜仲、附子的右归饮组方药, 按照“2.2.2”项方法操作, 即得。

2.3 右归饮指纹图谱研究

2.3.1 精密度试验 取同一供试品溶液(S1), 连续进样 6 次, 记录指纹图谱, 选择出峰稳定、峰面积较大、响应值最高的马钱苷为参照峰, 各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.80%, 相对峰面积 RSD 均小于 2.9%, 表明本方法精密度良好。

2.3.2 重复性试验 分别取右归饮(S1) 6 份, 按照“2.2.2”项方法制备供试品溶液及“2.1”项色谱条件进行检测, 记录指纹图谱, 以马钱苷为参照峰, 各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.88%, 相对峰面积 RSD 均小于 2.8%, 表明方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 取同一供试品溶液(S1), 分别于 0、4、8、12、16、24 h 进行检测, 记录指纹图谱, 以马钱苷为参照峰, 各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.98%, 相对峰面积的 RSD 均小于 2.60%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.4 指纹图谱的建立 分别精密吸取 10 批右归饮供试品溶液 10 μ L, 进样测定, 将 10 批样品的指纹图谱以 AIA 格式依次导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012), 以 S10 样品图谱为参照图谱, 采用中位数法, 时间窗宽度为 0.10, 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。共标定 30 个共有峰。10 批所测供试品色谱图与对照指纹图谱相似度分别为 0.942、0.989、0.933、0.920、0.926、0.934、0.925、0.904、0.912、0.920。结果表明, 10 批样品间相似度良好。

2.3.5 共有峰归属分析及鉴定 分别精密吸取供试品溶液(S1)、各单味药供试液和对应的阴性对照供试液 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“2.3.4”项下匹配结果对共有峰进行编号, 再通过保留时间和紫外吸收光谱图比对, 对各共有峰进行归属分析和鉴定。结果表明, 在匹配的 30 个共有峰中, 7、14、15、16、17、21、22、29 号峰来自杜仲, 10、12、18、19、20、26、27、30 号峰来自甘草, 3、4、8、9、13、24 号峰来自山茱萸, 11、23 号峰来自附子, 5、6 号峰来自熟地黄, 28 号峰来自肉桂, 山药及枸杞对共有峰贡献不明显, 其中 3 个共有峰不能明确其来源。

精密吸取“2.2.1”项下的混合对照品溶液, 按照“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。经对照品比较鉴定出共有峰中 9 个特征峰, 分别为京尼平苷酸(7 号峰)、莫诺苷(9 号峰)、绿原酸(11 号峰)、栀子苷(12 号峰)、马钱苷(13 号峰)、松脂醇二葡萄糖苷(14 号峰)、甘草苷(18 号峰)、芦丁(21 号峰)、甘草酸(30 号峰)。

2.4 右归饮中 9 种成分的定量测定

2.4.1 专属性试验 精密吸取混合对照品、供试品、阴性对照品(甲醇) 10 μ L, 按照“2.1”项色谱条件分析, 结果见图 3。在与京尼平苷酸、莫诺苷、绿原酸、栀子苷、马钱苷松脂醇二葡萄糖苷、甘草苷、芦丁和甘草酸对照品相应的位置上, 均有相同保留时间的色谱峰, 而阴性对照溶液无色谱峰, 不干扰测定。

2.4.2 线性关系考察 取混合对照品溶液进行稀释, 得京尼平苷酸质量浓度为 28.9、57.8、115.6、231.3、462.5、925.0 mg/L; 莫诺苷质量浓度为 49.7、99.4、198.8、397.5、795.0、1 590.0 mg/L; 绿原酸质量浓度为 24.4、48.8、97.5、195.0、390.0、780.0 mg/L;

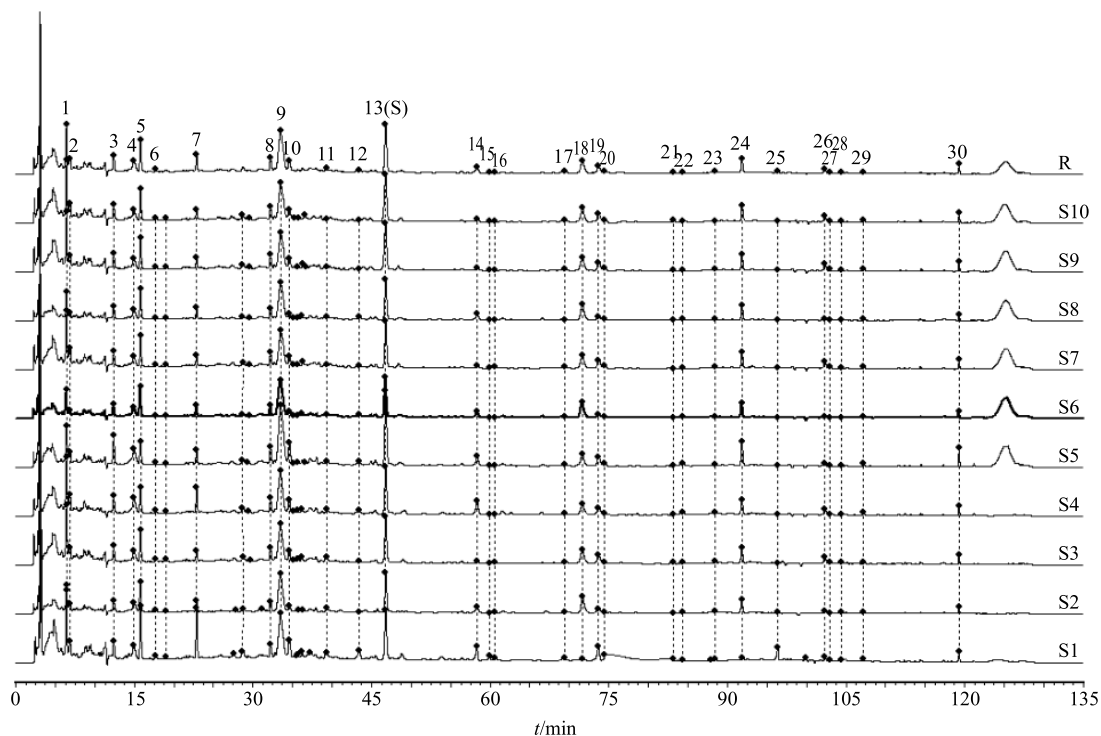


图 1 10 批右归饮指纹图谱和对照指纹图谱 (R)

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

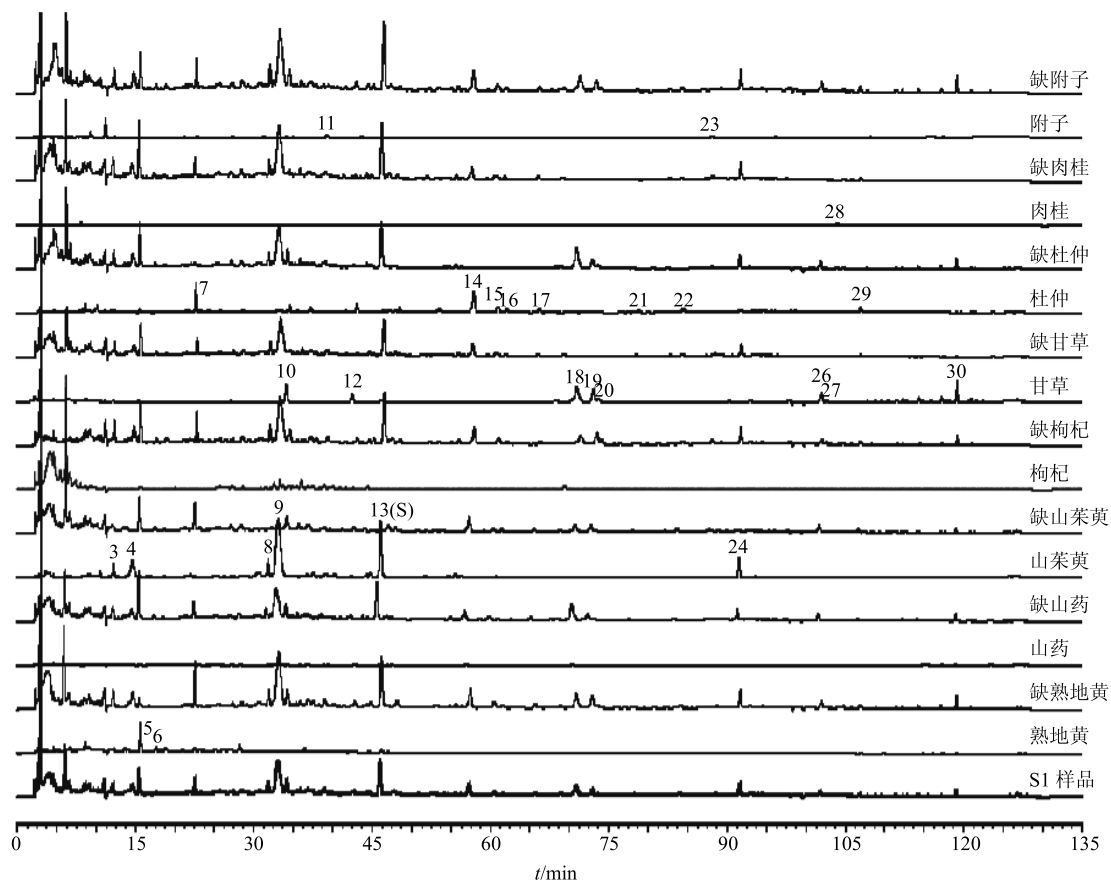
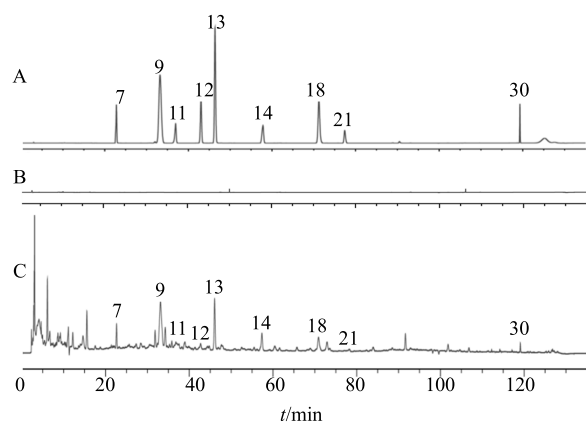


图 2 右归饮共有峰归属

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



7-京尼平苷酸 9-莫诺昔 11-绿原酸 12-栀子苷 13-马钱苷
14-松脂醇二葡萄糖苷 18-甘草苷 21-芦丁 30-甘草酸
7-geniposidic acid 9-morroniside 11-chlorogenic acid
12-geniposide 13-loganin 14-pinorensinol diglucoside 18-liquiritin
21-rutin 30-glycyrrhizic acid

图3 混合对照品 (A)、阴性对照溶液 (B) 和右归饮供试品溶液 (S1, C) HPLC 图

Fig. 3 HPLC of mixed reference substance (A), negative control solution (B), and Youguiyin sample (S1, C)

栀子苷质量浓度为 20.9、41.9、83.8、167.5、335.0、670.0 mg/L；马钱苷质量浓度为 42.2、84.4、168.8、337.5、675.0、1 350.0 mg/L；松脂醇二葡萄糖苷质量浓度为 16.6、33.1、66.3、132.5、265.0、530.0 mg/L；甘草苷质量浓度为 18.8、37.5、75.0、150.0、300.0、600.0 mg/L；芦丁质量浓度为 27.2、54.4、108.8、217.5、435.0、870.0 mg/L；甘草酸质量浓度为 20.9、41.9、83.8、167.5、335.0、670.0 mg/L 的一系列对照品混合溶液。分别按照“2.1”项下色谱条件依次进样，记录色谱峰面积，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，进行线性回归，计算回归方程及相关系数 (r)，结果分别为京尼平苷酸 $Y=24\,818\,X-7.019\,9$, $r=0.999\,7$, 线性范围 28.9~930.0 mg；莫诺昔 $Y=15\,925\,X+1\,188.8$, $r=0.999\,4$, 线性范围 49.6~1 590.0 mg；绿原酸 $Y=5\,202.8\,X+135.24$, $r=0.999\,4$, 线性范围 24.4~780.0 mg；栀子苷 $Y=12\,383\,X+309.6$, $r=0.999\,0$, 线性范围 20.9~270.0 mg；马钱苷 $Y=15\,218\,X+734.94$, $r=0.999\,3$, 线性范围 42.2~1 350.0 mg；松脂醇二葡萄糖苷 $Y=11\,476\,X+211.56$, $r=0.999\,4$, 线性范围 16.6~530.0 mg；甘草苷 $Y=19\,313\,X+429.12$, $r=0.999\,2$, 线性范围 18.8~600.0 mg；芦丁 $Y=3\,200.4\,X+99.229$, $r=0.999\,4$, 线性范围 27.2~870.0 mg；甘草酸 $Y=4\,093.5\,X+88.567$, $r=$

0.999 5, 线性范围 20.9~670.0 mg。结果表明，各对照品在各质量浓度范围内线性关系良好。

2.4.3 精密度试验 取供试品 (S1) 制备的同一份供试品溶液，按照“2.1”项下条件连续进样 6 次，分别计算峰面积。京尼平苷酸、莫诺昔、绿原酸、栀子苷、马钱苷松脂醇二葡萄糖苷、甘草苷、芦丁、甘草酸峰面积的 RSD 分别为 1.4%、1.4%、2.9%、2.7%、2.3%、2.3%、1.3%、2.4%、1.8%，表明精密度良好。

2.4.4 重复性试验 取同一供试品 (S1)，平行制备 6 份供试品溶液，按照“2.1”项下条件对 9 种成分进行测定，分别计算峰面积。京尼平苷酸、莫诺昔、绿原酸、栀子苷、马钱苷、松脂醇二葡萄糖苷、甘草苷、芦丁、甘草酸峰面积的 RSD 分别为 2.2%、1.6%、1.3%、2.7%、2.8%、2.7%、2.7%、2.8%。表明方法重复性良好。

2.4.5 稳定性试验 取供试品溶液 (S1)，室温放置，按照“2.1”项下条件分别于 0、4、8、12、16、24 h 进行测定，计算峰面积。京尼平苷酸、莫诺昔、绿原酸、栀子苷、马钱苷松脂醇二葡萄糖苷、甘草苷、芦丁、甘草酸峰面积的 RSD 分别为 2.21%、1.6%、1.3%、2.7%、2.8%、2.7%、2.9%、2.6%、2.7%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.6 回收率试验 取已测定各成分量的右归饮药材 6 份 (S1)，每份约 13 g，精密称定，分别加入 9 种混合对照品溶液 (京尼平苷酸 0.125 g/L、莫诺昔 0.446 g/L、绿原酸 0.150 g/L、栀子苷 0.108 g/L、马钱苷 0.250 g/L、松脂醇二葡萄糖苷 0.211 g/L、甘草苷 0.082 g/L、芦丁 0.210 g/L、甘草酸 0.100 g/L) 10 mL，按照“2.2.2”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 100.00%、99.22%、99.78%、102.47%、99.07%、99.84%、99.80%、103.17%、102.67%，RSD 分别为 2.26%、1.43%、1.50%、2.33%、1.76%、2.05%、2.61%、1.08%、1.81%。结果表明，方法准确度良好。

2.4.7 样品的定量测定 精密称取 10 批右归饮药材，按照“2.2.2”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 2。

可见 10 批样品中各成分量分别为京尼平苷酸 87.6~119.1 μg/g、莫诺昔 323.6~365.6 μg/g、绿原酸 108.3~124.1 μg/g、栀子苷 79.5~85.0 μg/g、马钱

表 2 右归饮样品中 9 种成分测定结果 ($n = 10$)

Table 2 Content result of nine contents ($n = 10$)

批号	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)								
	京尼平苷酸	莫诺苷	绿原酸	栀子苷	马钱苷	松脂醇二葡萄糖苷	甘草苷	芦丁	甘草酸
S1	104.6	348.7	110.0	85.0	188.0	163.0	61.0	160.0	79.1
S2	105.9	363.1	120.8	86.5	171.7	174.8	61.6	165.3	83.6
S3	111.8	365.6	115.3	81.5	187.5	168.7	59.5	163.0	79.0
S4	110.0	346.6	110.5	81.8	186.6	238.3	55.4	168.5	77.8
S5	119.1	323.6	115.9	83.2	185.7	166.7	58.0	160.8	78.3
S6	96.4	343.3	115.9	83.5	180.7	184.5	53.3	164.3	74.8
S7	96.5	353.4	124.1	84.1	181.1	172.8	64.5	165.3	77.3
S8	87.6	362.1	109.4	79.5	179.4	171.8	63.9	164.6	80.8
S9	105.4	361.1	110.9	80.5	175.2	167.7	59.2	167.2	81.0
S10	101.8	359.8	108.3	81.6	177.8	160.4	56.7	159.8	72.8

苷 171.7~188.0 $\mu\text{g/g}$ 、松脂醇二葡萄糖苷 163.0~238.3 $\mu\text{g/g}$ 、甘草苷 53.3~64.5 $\mu\text{g/g}$ 、芦丁 159.8~168.5 $\mu\text{g/g}$ 、甘草酸 72.8~83.6 $\mu\text{g/g}$ 。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

本实验考察了 2 种色谱仪器日本岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪和美国 Agilent 1200 高效液相色谱仪及 2 种色谱柱 Pursuit XR_s 5 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 和 Xterra RP₁₈ (250 mm×4.6 mm, 3.5 μm) 对右归饮 HPLC 指纹图谱的影响, 结果发现 2 种仪器对图谱分离的影响不大, 但不同的色谱柱对图谱中峰的分离有较大影响, Xterra RP₁₈ (250 mm×4.6 mm, 3.5 μm) 色谱柱出现基线不稳、压力过高的现象。综合考虑选用了美国 Agilent 1200 高效液相色谱仪及 Pursuit XR_s 5 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱。

通过二极管阵列检测器(DAD)在 190~600 nm 波长下对样品进行全波长扫描, 发现在 230 nm 波长下, 图谱基线较平稳、色谱峰较多、峰形较好, 且对指认出的 9 个特征峰有较好吸收。最后选择 230 nm 作为右归饮指纹图谱的吸收波长。

本实验考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.05%醋酸水溶液、乙腈-0.05%磷酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液及乙腈-0.3%磷酸水溶液 6 种流动相系统。甲醇-水作为流动相出现拖尾峰及出峰时间过长; 乙腈-水、乙腈-0.05%醋酸水溶液、乙腈-0.05%磷酸水溶液作为流动相也出现拖尾峰; 乙腈-0.1%磷酸水溶液和乙腈-0.3%磷酸水溶液出峰情况和峰形无明显

差异, 考虑保护仪器及色谱柱, 最后选择出峰较多, 峰形较好, 基线较平稳的乙腈-0.1%磷酸水溶液作为流动相^[9]。

3.2 多成分指纹图谱建立的思考

本实验在建立右归饮的指纹图谱时, 仅采用了单一的提取制备方法、检测波长及流动相, 研究发现此单一的条件, 难以全面控制和评价复方的质量。如本实验中熟地黄中有效成分梓醇在末端吸收 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的贡献。故以后在右归饮的质量控制中可考虑在多波长条件下建立指纹图谱、增加附子的质量控制或可以考虑做成不同萃取部位的指纹图谱综合鉴定^[10-11]。

右归饮指纹图谱研究结果显示, 所测样品中 30 个主要成分中 27 个已确认药材归属, 9 个为已知成分, 并进行了定量测定, 表明本实验初步建立的该复方质量控制体系保证了该药的质量稳定。对于复方中其余各成分的结构确定, 还需结合 HPLC-MS-MS、UPLC-Q-TOF/MS 及 UPLC-Q-TOF-MS/MS 等手段进行深入研究^[12-15]。

参考文献

- [1] 宋才渊, 沈兴潮, 吕帅杰, 等. 右归饮对激素性股骨头坏死大鼠血液骨矿物质盐及骨密度的影响 [J]. 中医杂志, 2015, 56(14): 1239-1242.
- [2] 汤小康. 右归饮对牵张应力环境中成骨细胞碱性磷酸酶分泌的影响及其机制的实验研究 [D]. 杭州: 浙江

- 中医药大学, 2014.
- [3] 杜文喜, 黄杰烽, 陈俊杰, 等. 右归饮抑制大鼠破骨细胞作用的分子机制研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(7): 557-559.
- [4] 齐晓宇, 赵磊, 毕冬冬, 等. 右归饮对去势雌性小鼠骨质疏松的治疗作用 [J]. 现代药物与临床, 2017, 32(11): 2072-2076.
- [5] 李燕君. EPO 与肾虚大鼠脑组织神经细胞的关系及右归饮的保护作用研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2015.
- [6] Li X, Chen Y, Shao S, *et al.* Oxidative stress induces the decline of brain EPO expression in aging rats [J]. *Exp Gerontol*, 2016, 83: 89-93.
- [7] 邢婧, 张琳, 汪轩, 等. HPLC-DAD 法同时测定右归丸中6种成分 [J]. 中成药, 2016, 38(8): 1736-1740.
- [8] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [9] 赵洪芝, 孟宪生, 叶挺祥, 等. 双波长融合 HPLC 测定六味地黄丸中马钱苷、丹皮酚的含量 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(19): 2182-2184.
- [10] 任培培, 孙国祥, 孙丽娜. 附子理中丸多波长融合 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(3): 411-415.
- [11] 钱俊, 尹莲. 加味四妙丸有效部位群 HPLC 指纹图谱归属分析及谱效关系研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2007, 9(1): 40-45.
- [12] 秦建平, 郎悦, 李家春, 等. 基于指纹图谱分析和多成分同时定量的双鱼颗粒质量评价研究 [J]. 中草药, 2016, 47(19): 3426-3431.
- [13] 付娟, 张海弢, 王伟, 等. 芪白平肺颗粒 HPLC 指纹图谱研究及其多指标成分定量分析 [J]. 中草药, 2017, 48(5): 918-923.
- [14] 杨秀青, 石征蓉, 谷江华, 等. 银菊解毒口服液指纹图谱结合多指标成分定量测定的质量控制方法研究 [J]. 中草药, 2017, 48(13): 2645-2652.
- [15] 林夏, 崔培超, 徐桂红, 等. 基于 UPLC 的注射用活血通络指纹图谱研究及多成分定量测定 [J]. 中草药, 2016, 47(2): 262-266.