

黄芪-丹参煎液 HPLC 指纹图谱及多指标定量测定研究

黄诗莹^{1,2}, 陈秋谷², 王佛长^{1,2}, 胡兆流², 郑平², 刘新辉³, 张尚斌^{1,2*}, 陈剑平^{1,2*}

1. 广州中医药大学第四临床医学院, 广东 深圳 518033

2. 深圳市中医院 深圳市医院中药制剂研究重点实验室, 广东 深圳 518033

3. 深圳市中医院 肾病研究室, 广东 深圳 518033

摘要: 目的 建立黄芪丹参煎液的 HPLC 指纹图谱及多指标成分定量分析方法, 为黄芪丹参煎液质量控制提供科学依据。方法 采用 HPLC-UV 法, ODS Hypersil DIM 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 3 μm); 以乙腈-0.1%甲酸溶液为流动相, 梯度洗脱, 柱温 25 °C, 体积流量 0.8 mL/min, 进样量 20 μL, 检测波长 254 nm, 建立 HPLC 指纹图谱; 采用 LC-MS 法, 建立黄芪甲苷、黄芪皂苷 III、黄芪皂苷 II、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷、丹酚酸 B、原儿茶醛、咖啡酸、迷迭香酸、紫草酸 11 个成分含量测定方法, 并采用主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 对测定结果进行识别。结果 10 批黄芪丹参煎液的指纹图谱中有 12 个共有峰, 通过与化学对照品比对, 指认出 7 个色谱峰, 分别为 1 号峰咖啡酸、3 号峰毛蕊异黄酮葡萄糖苷、6 号峰迷迭香酸、8 号峰紫草酸、9 号峰毛蕊异黄酮、10 号峰丹酚酸 B、11 号峰芒柄花苷, 10 批样品的相似度≥0.995。黄芪甲苷、黄芪皂苷 III、黄芪皂苷 II、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷、丹酚酸 B、原儿茶醛、咖啡酸、迷迭香酸、紫草酸线性关系良好, r^2 值均大于 0.995; 回收率为 89.3%~110.9%。通过 PCA 可将 10 批黄芪丹参煎液分成 2 类, 并可看出不同产地、不同批次药材之间的质量存在差异, 进一步采用 OPLS-DA 筛选出导致质量差异的两个物质丹酚酸 B 和芒柄花苷。结论 根据黄芪丹参煎液指纹图谱的建立, 结合质谱进行定量, 能够为其质量控制提供更可靠的参考。

关键词: 黄芪丹参煎液; 指纹图谱; 多指标定量测定; 质量标准; 主成分分析; 正交偏最小二乘判别分析; 黄芪甲苷; 黄芪皂苷 III; 黄芪皂苷 II; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 毛蕊异黄酮; 芒柄花苷; 丹酚酸 B; 原儿茶醛; 咖啡酸; 迷迭香酸; 紫草酸
中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)20-4950-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.20.016

Study on HPLC fingerprint and multicomponents determination of Huangqi-Danshen Decoction

HUANG Shi-ying^{1,2}, CHEN Qiu-gu², WANG Fo-chang^{1,2}, HU Zhao-liu², ZHENG Ping², LIU Xin-hui³, ZHANG Shang-bin^{1,2}, CHEN Jian-ping^{1,2}

1. The Fourth Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen 518033, China

2. Shenzhen Key Laboratory of Hospital Chinese Medicine Preparation, Shenzhen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518033, China

3. Department of Nephrology, Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen 518033, China

Abstract: Objective To establish the Huangqi-Danshen Decoction (HDD) fingerprint and multicomponent quantitative method, and provide a scientific basis for the quality standard of HDD. **Methods** The HPLC fingerprint was performed on ODS Hypersil DIM column with acetonitrile-0.1% formic acid as mobile phase at gradient elution. The column temperature was 25 °C; The flow rate was 0.8 mL/min, the volume was 20 μL, and the detection wavelength was 254 nm. At the same time, LC-MS was used to establish content determination method for 11 constituents: astragaloside, astragaloside III, astragaloside II, calycosin 7-O-beta-D-

收稿日期: 2019-08-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81603437); 国家自然科学基金项目 (81804052); 深圳市科技计划项目 (ZDSYS201606081515458); 深圳市科技计划项目 (JCYJ20170307154652899)

作者简介: 黄诗莹, 硕士在读, 从事中药质量控制和评价。E-mail: sying427@qq.com

*通信作者 陈剑平, 副主任药师, 从事中药制剂研究。E-mail: lycjp@126.com

张尚斌, 主任中药师, 从事中药新药开发。E-mail: zsb6383@163.com

glucoside, calycosin, ononin, salvianolic acid B, protocatechuic aldehyde, caffeic acid, rosmarinic acid, and lithospermic acid; The samples were identified by PCA analysis and OLPS-DA analysis. **Results** There were 12 common peaks in the fingerprints of 10 batches of HDD. By comparing with the chemical reference, seven peaks were confirmed, they were: caffeic acid (peak 1), calycosin 7-*O*-beta-*D*-glucoside (peak 3), rosmarinic acid (peak 6), lithospermic acid (peak 8), calycosin (peak 9), salvianolic acid B (peak 10), and ononin (peak 11); Ten batches of samples have a high similarity (no less than 0.995). Astragaloside, astragaloside III, astragaloside II, calycosin 7-*O*-beta-*D*-glucoside, calycosin, ononin, salvianolic acid B, protocatechuic aldehyde, caffeic acid, rosmarinic acid, and lithospermic acid had good linearity with $r^2 \geq 0.995$ and recovery was at range of 89.3%—110.9%. Through principal component analysis, 10 batches of HDD can be divided into two categories. It can be seen that there are differences in the quality between different origins and different batches of medicinal materials. Finally, OPLS-DA was used to screen out two substances that cause quality differences: salvianolic acid B and ononin. **Conclusion** According to the establishment of the fingerprint of HDD and the quantification by LC-MS, it can provide a reliable reference for its quality control.

Key words: Huangqi-Danshen Decoction; fingerprint; multicomponents determination; quality standard; principal component analysis; OLPS-DA analysis; astragaloside; astragaloside III; astragaloside II; calycosin 7-*O*-beta-*D*-glucoside; calycosin; ononin; salvianolic acid B; protocatechuic aldehyde; caffeic acid; rosmarinic acid; lithospermic acid

黄芪-丹参药对(2:1)来源于国医大师邓铁涛教授五脏相关理论指导下的临床经验方健脾益肾方^[1-2],黄芪为方中君药,具有补气升阳、益卫固表的作用^[3];丹参是活血化瘀的要药^[4],为方中使药。益气活血法作为基本方法治疗慢性肾脏病在临床中广泛运用,而黄芪丹参药对为益气活血法的代表药物,在慢性肾脏病中已经得到了广泛的应用^[5-8]。

课题组前期药理研究显示,黄芪丹参煎液(Huangqi-Danshen Decoction, HDD)可改善腺嘌呤诱导的慢性肾脏病大鼠模型的肾小管萎缩和间质纤维化,并通过调节线粒体动力学延缓慢性肾脏病进程^[9]。同时,代谢组学研究发现, HDD 改善慢性肾脏病的机制与调节甘油磷脂、糖基磷脂酰肌醇生物合成和三羧酸循环代谢途径有关^[10]。现代研究表明,黄芪中主要含有皂苷类及黄酮类成分^[11],丹参中主要含有酚酸类及丹参酮类成分^[12]。为将该药对更好地应用于临床,有必要建立 HDD 多指标、多活性成分的快速检测方法。汤剂为临床使用最为广泛的剂型^[13],由于药材的产地、批次及煎煮方式不一致,使得煎液的质量不可控^[14],进一步导致临床用药的差异。标准汤剂^[15]的提出可规范汤剂的制备工艺,以更好地标化临床用药。因此,本研究参考相关文献报道^[16-17],采用 HPLC-UV 法建立其指纹图谱^[18],并使用 LC-MS 联用技术建立 11 个成分的含量测定方法,以建立 HDD 标准化参数,为 HDD 的总体质量及标准化参数提供科学参数,推动该药对在临床更广泛的应用。

1 仪器与试药

1.1 材料

对照品黄芪皂苷 II (批号 wkq18041412, 质量

分数 $\geq 98\%$)、黄芪皂苷 III (批号 wkq18041908, 质量分数 $\geq 98\%$)、芒柄花苷 (批号 wkq18032703, 质量分数 $\geq 98\%$)、毛蕊异黄酮 (批号 wkq18022412, 质量分数 $\geq 98\%$)、紫草酸 (批号 wkq17090409, 质量分数 $\geq 98\%$), 购自四川维克奇生物科技有限公司;对照品黄芪甲苷 (批号 110781-201717, 质量分数为 96.9%)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (批号 111920-201606, 质量分数为 97.6%)、丹酚酸 B (批号 111562-201716, 质量分数为 94.1%)、原儿茶醛 (批号 110810-201608, 质量分数为 99.3%)、咖啡酸 (批号 110885-201703, 质量分数为 99.7%)、迷迭香酸 (批号 111871-201706, 质量分数为 90.5%)、大豆苷元 (批号 110503-200402)、阿魏酸 (110773-201012, 质量分数为 99.6%), 均购自中国食品药品检定研究院。黄芪和丹参药材样品来源见表 1, 均由深圳市中医院中药实验室主任陈剑平鉴定为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根及唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎。

1.2 仪器与试剂

LC-2030 型高效液相色谱仪、LCMS-2020 型质谱仪、Labsolutions 色谱工作站、AUW2200 型电子天平, 日本岛津公司; 乙腈, 色谱纯, 美国默克公司; 甲酸, 色谱纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 甲醇, 分析纯, 天津大茂化学试剂厂; 蒸馏水, 屈臣氏集团。

2 方法与结果

2.1 HPLC 指纹图谱的建立

2.1.1 色谱条件 采用 ODS Hypersil DIM 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 3 μ m); 以乙腈-0.1%甲酸水溶

表 1 黄芪、丹参药材信息

Table 1 Information of *A. membranaceus* and *S. miltiorrhiza*

煎液编号	黄芪		丹参	
	批号	产地	批号	产地
HDD1	H5118311	甘肃	18040901	山东
HDD2	180501	内蒙古	180703791	江苏
HDD3	180503	内蒙古	180604631	江苏
HDD4	20180531	山西	18050901	山西
HDD5	20180630	山西	18092801	山西
HDD6	20180705	山西	18061101	山西
HDD7	180801	内蒙古	19052501	山西
HDD8	19042101	甘肃	180601	陕西
HDD9	19070701	甘肃	18030501	山东
HDD10	19043001	甘肃	180501471	山东

液为流动相，梯度洗脱：0~20 min，12%~16%乙腈；20~30 min，16%~19%乙腈；30~80 min，19%~25%乙腈；80~95 min，27%~90%乙腈；95~98 min，90%乙腈；柱温 25 ℃；进样量 20 μL；体积流量 0.8 mL/min，检测波长 254 nm。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 取各对照品适量，加甲醇溶解，制成含咖啡酸 57.3 μg/mL，迷迭香酸 79.1 μg/mL，紫草酸 49.5 μg/mL，丹酚酸 B 116.6 μg/mL，毛蕊异黄酮葡萄糖苷 55.6 μg/mL，毛蕊异黄酮 55.8 μg/mL，芒柄花苷 63.2 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取黄芪 26.5 g、丹参 14.5 g，加入 800 mL 水浸泡 30 min 后，煎煮 1 h，滤过，再加入 600 mL 水煎煮 40 min，合并滤液并浓缩至 200 mL，精密移取 1 mL 浓缩液至 5 mL 量瓶中，加水定容至刻度线，即得供试品溶液。

2.1.4 精密度试验 精密吸取同一份供试品溶液 (HDD1) 20 μL，按“2.1.1”项色谱条件连续进样 6 次，以丹酚酸 B 的保留时间和峰面积为参照，分别计算相对峰面积及相对保留时间。计算得到相对峰面积 RSD 均小于 5%，相对保留时间 RSD 均小于 1%，表明仪器精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 精密吸取同一份供试品溶液 (HDD1) 20 μL，按“2.1.1”项色谱条件于 0、4、8、12、16、20、24 h 进样，以丹酚酸 B 的保留时间和峰面积为参照，分别计算相对峰面积及相对保留时间。计算得到相对峰面积 RSD 均小于 5%，相对保留时间 RSD 均小于 1%，表明供试品溶液在室温的

条件下放置 24 h 稳定。

2.1.6 重复性试验 取 HDD1 药材按“2.1.3”项制备方法制备 6 份供试品溶液，精密吸取 20 μL，按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，以丹酚酸 B 的保留时间和峰面积为参照，分别计算相对峰面积及相对保留时间。计算得到相对峰面积 RSD 均小于 5%，相对保留时间 RSD 均小于 1%，表明方法的重复性良好。

2.1.7 指纹图谱的建立 取 10 个批次的黄芪丹参药材按“2.1.3”项的制备方法进行供试品溶液制备，并按“2.1.1”条件下进行测定，记录色谱图，并将各样品色谱图以 AIA 格式导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012A 版)，选取响应值较高的 12 个色谱峰，时间窗宽度为 0.1 min，对选定的色谱图进行多点校正，全谱匹配，建立 HDD 指纹图谱 (图 1)。10 批 HDD 样品的相似度结果分别为 1.000、0.999、0.999、1.000、0.999、0.999、0.999、0.997、0.999、0.995。

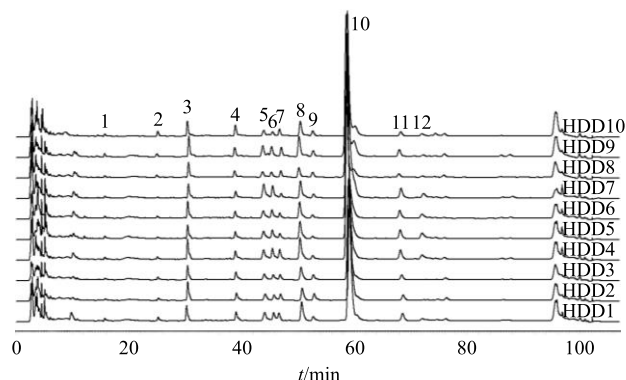


图 1 10 批黄芪丹参煎液指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of 10 batches of HDD

2.1.8 特征峰的标定 经与对照品比对，指认出 1 号峰为咖啡酸，3 号为毛蕊异黄酮葡萄糖苷，6 号为迷迭香酸，8 号为紫草酸，9 号为毛蕊异黄酮，10 号为丹酚酸 B，11 号为芒柄花苷。本实验以保留时间为 59.62 min 的丹酚酸 B 作为参照峰，其保留时间居中，响应强度大，具有合理性。色谱图见图 2。

2.2 11 种成分的含量测定

2.2.1 色谱条件 采用 ODS Hypersil DIM 色谱柱 (250 mm×4.6 mm，3 μm)；以乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相，梯度洗脱：0~15 min，18%~28%乙腈；15~29 min，28%~42%乙腈；29~33 min，42%~52%乙腈；33~37 min，52%~60%乙腈；37~41 min，60%~90%乙腈；柱温 30 ℃；体积流量 0.8 mL/min；进样量 10 μL。

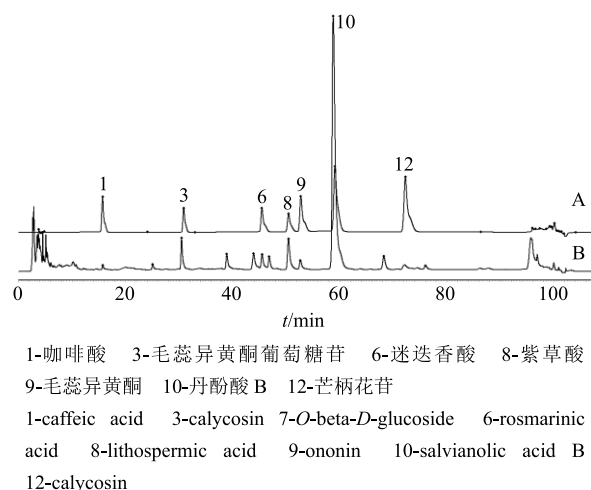


图2 混合对照品 HPLC 图 (A) 和 HDD 对照图谱 (B)

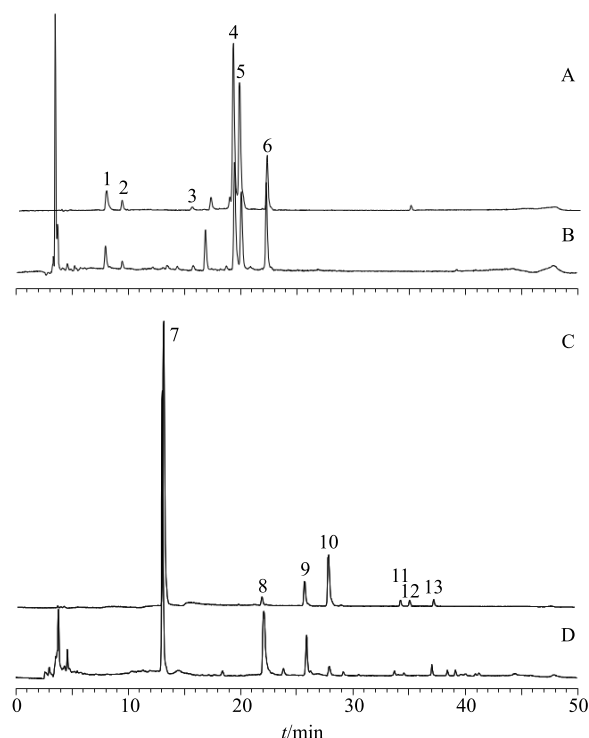
Fig. 2 HPLC of mixed reference substance (A) and control fingerprint of HDD (B)

2.2.2 质谱条件 采用电喷雾离子化源 (ESI), 检测电压 3.5 kV; 雾化器压力为 241 kPa; 载气为 N_2 , 体积流量 1.5 L/min; 离子喷雾温度为 350 $^{\circ}C$ 。同时检测正、负离子模式, 扫描方式为选择离子监测模式 (SIM); 用于定量分析检测的离子: 黄芪甲苷 m/z 785.25 $[M+H]^+$, 黄芪皂苷 III m/z 785.25 $[M+H]^+$, 黄芪皂苷 II m/z 827.25 $[M+H]^+$, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 m/z 447.00 $[M+H]^+$, 毛蕊异黄酮 m/z 285.05 $[M+H]^+$, 芒柄花苷 m/z 475.05 $[M+HCOO]^-$, 丹酚酸 B m/z 701.30 $[M-OH]^-$, 原儿茶醛 m/z 137.05 $[M-H]^-$, 咖啡酸 m/z 179.05 $[M-H]^-$, 迷迭香酸 m/z 359.50 $[M-H]^-$, 紫草酸 m/z 537.00 $[M-H]^-$, 阿魏酸 m/z 193.00 $[M-H]^-$, 大豆苷元 m/z 254.95 $[M+H]^+$ 。黄芪甲苷、黄芪皂苷 III、黄芪皂苷 II、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮以大豆苷元为内标; 芒柄花苷、丹酚酸 B、原儿茶醛、咖啡酸、迷迭香酸、紫草酸以阿魏酸为内标。色谱图见图 3。

2.2.3 供试品溶液的制备 按“2.1.3”项下制备 HDD, 取 1 mL HDD 加水定容至 10 mL, 取 800 μ L 加入 20 μ L 内标溶液, 过 0.22 μ m 微孔滤膜即得。

2.2.4 内标溶液的制备 取对照品阿魏酸、大豆苷元适量, 加甲醇配制成含阿魏酸 54.81 μ g/mL、大豆苷元 19.82 μ g/mL 的内标溶液, 4 $^{\circ}C$ 保存备用。

2.2.5 线性范围的考察 将含黄芪甲苷 1.63 μ g/mL、黄芪皂苷 III 2.33 μ g/mL、黄芪皂苷 II 3.92 μ g/mL、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 10.15 μ g/mL、毛蕊异黄酮 2.96 μ g/mL、芒柄花苷 26.07 μ g/mL、丹酚酸 B



A-混合对照品负离子模式总离子流图 B-样品负离子模式总离子流图 C-混合对照品正离子模式总离子流图 D-样品正离子模式总离子流图 1-原儿茶醛 2-咖啡酸 3-阿魏酸 (内标 1, IS1) 4-迷迭香酸 5-紫草酸 6-芒柄花苷 7-毛蕊异黄酮葡萄糖苷 8-丹酚酸 B 9-大豆苷元 (内标 2, IS2) 10-毛蕊异黄酮 11-黄芪甲苷 12-黄芪皂苷 III 13-黄芪皂苷 II, 下图同

A-the negative ion mode TIC of mixed reference B-the negative ion mode TIC of sample C-the positive ion mode TIC of mixed reference D-the positive ion mode TIC of sample 1-protocatechualdehyde 2-caffeic acid 3-ferulic acid (IS1) 4-rosmarinic acid 5-lithospermic acid 6-ononin 7-calycosin 7-O-beta-D-glucoside 8-salvianolic acid B 9-daidzein (IS2) 10-calycosin 11-astragaloside IV 12-astragaloside III 13-astragaloside II, same as below

图3 HDD 及混合对照品的总离子流图

Fig. 3 TIC plot of HDD and mixed reference substances

482.16 μ g/mL、原儿茶醛 10.82 μ g/mL、咖啡酸 5.73 μ g、迷迭香酸 47.51 μ g/mL、紫草酸 76.93 μ g/mL 的混合对照品溶液稀释成为 6 个质量浓度, 按“2.2.1”项下色谱条件及“2.2.2”项下质谱条件进行测定, 采用内标法, 以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积比为纵坐标 (Y) 得到各成分的线性回归方程、相关系数和线性范围分别为黄芪甲苷 $Y=0.15 X+0.01$, $r^2=0.999 6$, 线性范围 0.04~1.63 μ g/mL; 黄芪皂苷 III $Y=0.11 X+0.01$, $r^2=0.998 9$, 线性范围 0.05~2.23 μ g/mL; 黄芪皂苷 II $Y=0.12 X+0.01$, $r^2=0.998 9$, 线性范围 0.09~3.92 μ g/mL; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 $Y=0.30 X+0.02$, $r^2=0.999 3$, 线性范围

0.32~10.15 $\mu\text{g/mL}$; 毛蕊异黄酮 $Y=1.79 X-0.03$, $r^2=0.999\ 3$, 线性范围 0.09~2.96 $\mu\text{g/mL}$; 芒柄花苷 $Y=1.56 X+0.36$, $r^2=0.999\ 4$, 线性范围 0.81~26.07 $\mu\text{g/mL}$; 丹酚酸 B $Y=0.01 X-0.08$, $r^2=0.999\ 8$, 线性范围 15.07~482.16 $\mu\text{g/mL}$; 原儿茶醛 $Y=3.50 X-0.44$, $r^2=0.995\ 5$, 线性范围 0.34~5.41 $\mu\text{g/mL}$; 咖啡酸 $Y=1.95 X+0.12$, $r^2=0.996\ 1$, 线性范围 0.18~2.87 $\mu\text{g/mL}$; 迷迭香酸 $Y=3.12 X-1.06$, $r^2=0.995\ 7$, 线性范围 1.48~47.51 $\mu\text{g/mL}$; 紫草酸 $Y=1.42 X-0.11$, $r^2=0.998\ 3$, 线性范围 2.40~76.93 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2.6 稳定性考察 取 HDD1 供试品溶液于 0、1、2、4、6、8、12、16 h 按“2.2.1”项下色谱条件及“2.2.2”项下质谱条件进行测定, 峰面积比的 RSD 分别为黄芪甲苷 3.36%, 黄芪皂苷 III 3.35%, 黄芪皂苷 II 4.83%, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 3.62%, 毛蕊异黄酮 3.01%, 芒柄花苷 4.60%, 丹酚酸 B 4.91%, 原儿茶醛 2.89%, 咖啡酸 4.58%, 紫草酸 4.74%, 迷迭香酸 4.47%, 表明供试品溶液在 16 h 内稳定。

2.2.7 精密度考察 取混合对照品溶液按“2.2.1”项下色谱条件及“2.2.2”项下质谱条件连续进样 6 次, 峰面积比的 RSD 分别为黄芪甲苷 2.99%, 黄芪皂苷 III 2.26%, 黄芪皂苷 II 3.76%, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 3.24%, 毛蕊异黄酮 3.08%, 芒柄花苷 2.91%, 丹酚酸 B 4.87%, 原儿茶醛 3.03%, 咖啡酸 3.39%, 紫草酸 2.62%, 迷迭香酸 2.39%, 表明仪器精密度良好。

2.2.8 重复性考察 按“2.2.3”项方法制备 6 份 HDD1 供试品溶液, 并按“2.2.1”项下色谱条件及

“2.2.2”项下质谱条件进行测定, 峰面积比的 RSD 分别为黄芪甲苷 4.22%, 黄芪皂苷 III 3.58%, 黄芪皂苷 II 4.55%, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 4.02%, 毛蕊异黄酮 3.01%, 芒柄花苷 4.61%, 丹酚酸 B 4.50%, 原儿茶醛 4.37%, 咖啡酸 4.56%, 紫草酸 4.69%, 迷迭香酸 3.70%, 表明方法的重复性良好。

2.2.9 回收率考察 取 800 μL 供试品溶液加入 200 μL 、400 μL 、600 μL 含有黄芪甲苷 0.38 μg , 黄芪皂苷 III 0.42 μg , 黄芪皂苷 II 2 μg , 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 4.3 μg , 毛蕊异黄酮 4.92 μg , 芒柄花苷 14.68 μg , 丹酚酸 B 247 μg , 原儿茶醛 3.7 μg , 咖啡酸 1.96 μg , 紫草酸 37 μg , 迷迭香酸 22.8 μg 的混合对照品溶液, 分别配制成低、中、高质量浓度样品, 混合均匀, 取 800 μL 加入 20 μL 内标混匀, 按“2.2.1”项下色谱条件及“2.2.2”项下质谱条件进行测定。测得回收率分别为黄芪甲苷 90.1%, 黄芪皂苷 III 110.1%, 黄芪皂苷 II 107.8%, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 89.3%, 毛蕊异黄酮 109.3%, 芒柄花苷 110.9%, 丹酚酸 B 106.7%, 原儿茶醛 89.3%, 咖啡酸 109.1%, 紫草酸 107.2%, 迷迭香酸 110.3%, RSD 分别为 5.68%、5.67%、4.98%、2.96%、4.91%、5.50%、4.47%、5.07%、5.21%、5.14%、5.33%。

2.2.10 样品含量测定 称取 10 份不同批次的黄芪、丹参药材, 按“2.2.3”项供试品溶液制备方法制备, 并按“2.2.1”“2.2.2”下条件进行测定, 结果见表 2。结果表明, 各成分含量在不同批次的 HDD 中存在一定差异。

2.3 计量学分析

2.3.1 主成分分析 (PCA) PCA 利用降维的思想

表 2 10 批 HDD 煎液含量测定结果

Table 2 Determination of 10 batches of HDD

编号	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)										
	黄芪甲苷	黄芪皂苷 III	黄芪皂苷 II	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	毛蕊异黄酮	芒柄花苷	丹酚酸 B	原儿茶醛	咖啡酸	迷迭香酸	紫草酸
HDD1	16.93	14.60	56.85	433.40	66.33	414.28	9 818.40	66.53	136.95	594.43	1 407.90
HDD2	16.28	13.40	60.68	359.73	16.35	532.58	6 577.70	51.18	52.33	431.63	860.35
HDD3	7.50	9.03	38.23	356.40	15.13	486.65	6 012.08	48.65	51.10	390.30	724.60
HDD4	15.13	14.68	45.25	415.00	110.88	240.05	11 716.65	92.30	101.55	817.50	1 385.15
HDD5	34.53	8.38	49.48	258.38	119.63	128.00	10 444.65	68.20	120.58	632.85	1 112.43
HDD6	47.75	14.23	70.00	377.33	110.13	211.15	9 678.85	67.30	99.55	574.20	1 088.45
HDD7	9.78	11.28	41.38	330.38	102.38	246.90	13 255.55	93.88	67.73	720.58	891.75
HDD8	19.98	13.65	55.08	407.60	33.10	479.88	5 090.48	85.38	61.13	333.55	608.58
HDD9	24.30	17.20	54.05	502.25	41.25	495.45	7 759.40	80.35	110.10	449.30	1 270.95
HDD10	11.60	10.45	39.55	309.13	67.65	316.65	6 756.45	19.43	14.03	368.18	1 046.85

将多个指标转化成少数几个具有代表性的指标,且能代表多个样品的整体信息。本实验使用 SIMCA14 软件,以 11 个成分含量作为变量,建立 10×11 的矩阵,对 10 批 HDD 的含量测定结果进行 PCA。第 1 主成分的贡献率为 40.49%,第 2 主成分的贡献率为 26.58%,第 3 主成分的贡献率为 13.25%,累积贡献率为 80.30%,说明所提取的 3 个主成分能较好地反映样品的整体信息。结果如图 4 所示 ($R_X^2=0.849$, $Q^2=0.381$),10 批 HDD 分为 2 大类,HDD2、HDD3、HDD8、HDD10 为第 1 类,HDD1、HDD4、HDD5、HDD6、HDD7、HDD9 为第 2 类。从分类结果可看出,不同批次的 HDD 主要成分的含量具有较大的差异,因此,建立黄芪丹参标准煎液质量控制方法具有重要的意义。

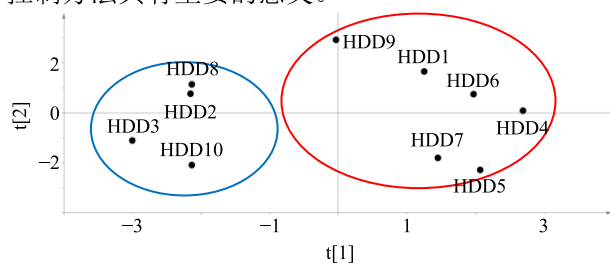


图 4 10 批黄芪丹参煎液 PCA 图

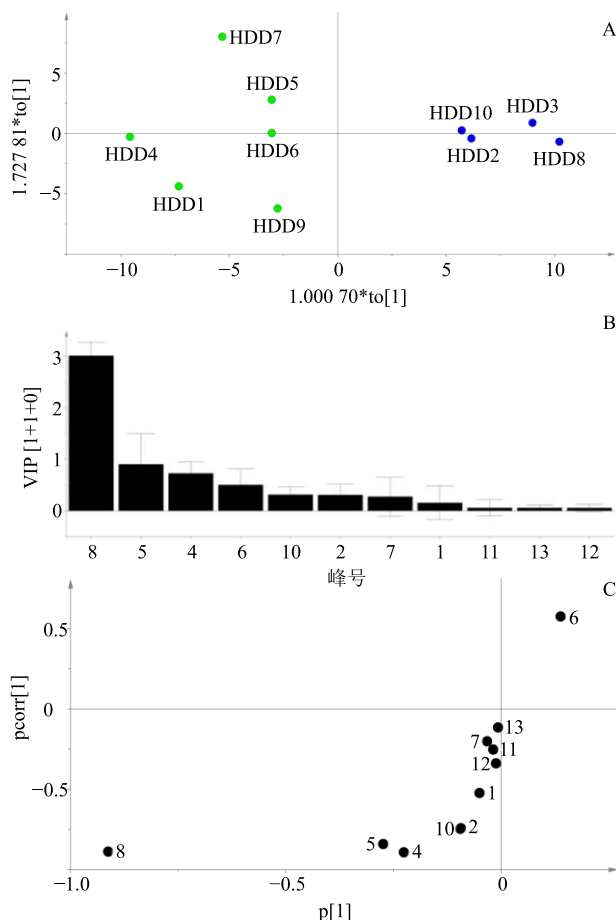
Fig. 4 PCA plot of ten batches of HDD

2.3.2 正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 为了更好地分析 10 批 HDD 之间的差异,本实验采用 OPLS-DA 模型进行分析,结果如图 5-A 所示,数据矩阵模型参数 $R_Y^2=0.883$,模型预测参数 $Q^2=0.798$,表明所建立的模型较为稳定,具有预测能力。本实验运用变量重要性投影值 (variable importance in project, VIP) >1.0 筛选对 10 批 HDD 样本分类贡献较大的成分。在 VIP 图及 S-plot 图中发现丹酚酸 B 及芒柄花苷这 2 个化合物是造成 HDD 样品分类出现差异的主要成分,指出 HDD 质量控制中应重视质量指标成分,为 HDD 的制备提供更可靠更合理的质量控制依据。

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

本实验考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸水溶液作为色谱条件流动相,结果显示,乙腈-0.1%甲酸色谱峰型最佳,且分离效果优于其他流动相,故选用乙腈-0.1%甲酸作为流动相。本实验采用二极管阵列 (PDA) 在不同波长下进行检测,结果表明,254 nm 波长下,基线稳定,各个峰的分离度较好,响应值较高,故选用 254 nm 作为检测波长。



A-OPLS-DA 散点得分图 B-VIP 图 C-S-plot 图

A-scatter scores of OLPS-DA B-VIP plot C-S-plot

图 5 10 批 HDD 化学识别模式分析

Fig. 5 Pattern recognition analysis of 10 batches of HDD

本实验考察了 25、30、35 $^{\circ}\text{C}$ 下柱温对色谱峰分离的影响,结果显示,25 $^{\circ}\text{C}$ 下色谱峰的分离效果优于 30 $^{\circ}\text{C}$ 及 35 $^{\circ}\text{C}$,故采取 25 $^{\circ}\text{C}$ 作为柱温箱温度。黄芪的主要成分为皂苷类及黄酮类,采取乙腈-0.1%甲酸,检测波长 254 nm,柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ 作为 HPLC-UV 色谱条件。不足的是,黄芪中含有的皂苷类成分无法在紫外的条件下进行测定,故本研究在指纹图谱的基础上使用质谱对 HDD 指纹图谱中的成分及部分黄芪皂苷类成分进行含量测定,对 HPLC 的指纹图谱做了一定的补充,但尚不能整体反映出 HDD 中黄芪皂苷类成分,应补充蒸发光检测器的检测方法,以完善 HDD 的 HPLC 指纹图谱。

3.2 提取条件的确定

根据标准汤剂制备的工艺参数,确定浸泡时间 30 min;黄芪、丹参为根茎类药材,确定加水量为头煎 8 倍,二煎 7 倍;黄芪、丹参均为滋补类药材,因此确定提取时间为头煎 60 min,二煎 40 min;浓

缩温度不超过 60 ℃, 因此, 采取减压浓缩的方式进行浓缩至饮片质量的 5 倍。

3.3 评价方法

本研究建立了 HDD 的指纹图谱, 指认了 7 个特征峰, 同时借助液质联用技术测定了 HDD 中 11 个成分, 方法简洁可行。此外, 本研究采用 PCA 及 OPLA-DA 的方法, 比较各样品之间的差异, 并筛选出导致分类差异的 2 个主要成分。结果显示, 不同批次、不同产地的药材之间存在差异, 并将 10 批 HDD 样品分成 2 类, 第 1 类 HDD 样品的芒柄花苷的含量相对较高, 第 2 类 HDD 样品的丹酚酸 B 含量较高, 提示在质量控制中, 应注意对丹酚酸 B 及芒柄花苷的含量进行控制, 并制定这 2 个成分含量的标准, 以保证 HDD 的质量及疗效。本研究通过指纹图谱的建立及多指标的含量测定, 为黄芪丹参煎液的质量控制提供了科学依据。

参考文献

- [1] Liu X, Chen J, Liu X, *et al.* Jian-Pi-Yi-Shen Formula ameliorates chronic kidney disease: Involvement of mitochondrial quality control network [J]. *BMC Compl Altern Med*, 2018, 18(1): 340.
- [2] 陈剑平, 陈秋谷, 胡兆流, 等. 基于药效筛选和正交试验优化健脾益肾丸的制备工艺 [J]. *中草药*, 2018, 49(24): 5817-5822.
- [3] Liu P, Zhao H, Luo Y. Anti-aging implications of *Astragalus membranaceus* (Huangqi): A well-known chinese tonic [J]. *Aging Dis*, 2017, 8(6): 868-886.
- [4] Mahmood Q, Wang G F, Wu G, *et al.* Salvianolic acid A inhibits calpain activation and eNOS uncoupling during focal cerebral ischemia in mice [J]. *Phytomedicine*, 2017, 25: 8-14.
- [5] Huang K, Su Y, Sun M, *et al.* Chinese herbal medicine improves the long-term survival rate of patients with chronic kidney disease in Taiwan: A nationwide retrospective population-based cohort study [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1117.
- [6] Chen Z J, Ma F, Sun X M, *et al.* Renoprotective effect of a Chinese herbal formula, Qidan Dihuang Decoction, on streptozotocin-induced diabetes in rat [J]. *Evid-Based Compl Altern Med*, 2018, 2018: 1-12.
- [7] Han C, Jiang Y, Li W, *et al.* Study on the antihypertensive mechanism of *Astragalus membranaceus* and *Salvia miltiorrhiza* based on intestinal flora-host metabolism [J]. *Evid-Based Compl Altern Med*, 2019, 2019: 1-16.
- [8] Liu X, Chen H, Su G, *et al.* An animal research and a chemical composition analysis of a Chinese prescription for pulmonary fibrosis: Yangfei Huoxue Decoction [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 245: 112-126.
- [9] Liu X, Huang S, Wang F, *et al.* Huangqi-Danshen Decoction ameliorates adenine-induced chronic kidney disease by modulating mitochondrial dynamics [J]. *Evid-Based Compl Altern Med*, 2019, 2019: 1-8.
- [10] Liu X, Zhang B, Huang S, *et al.* Metabolomics analysis reveals the protection mechanism of Huangqi-Danshen Decoction on adenine-induced chronic kidney disease in rats [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 992.
- [11] 吴 娇, 王 聪. 黄芪的化学成分及药理作用研究进展 [J]. *新乡医学院学报*, 2018, 35(9): 755-760.
- [12] 代晓光, 苏长兰. 丹参化学成分及药理研究进展 [J]. *中医药信息*, 2018, 35(4): 126-129.
- [13] 殷 佳, 潘 晔, 蔡雪朦, 等. 中药传统汤剂、浸膏剂和配方颗粒剂的比较 [J]. *中草药*, 2017, 48(18): 3871-3875.
- [14] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. *中草药*, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [15] 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.
- [16] 董 青, 於化桃, 代云桃, 等. 以标准汤剂为基准建立丹参的质量评价方法 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(5): 817-822.
- [17] 王东博, 赵漫佳, 代云桃, 等. 黄芪分析方法的优化和黄芪标准汤剂的质量评价 [J/OL]. *中国中药杂志*, 1-7. 2019-08-29. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcm.20190630.302>.
- [18] 高俊冬, 赵洪岭, 李津明. 高效液相色谱技术在中药复方中的应用 [J]. *临床医药文献电子杂志*, 2019, 6(4): 198.