

清心滋肾方水煎液 HPLC 指纹图谱研究及其 15 种成分定量分析

刘 静¹, 陈 赟², 姚 倩¹, 阎咨伊¹, 陈 影¹, 张 优¹, 居文政², 卢 苏^{2*}, 许美娟^{2*}

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023

2. 南京中医药大学附属医院, 江苏省中医院, 江苏 南京 210029

摘要: 目的 建立清心滋肾方水煎液 (Qinxin Zishen Prescription Decoction, QZPD) 的 HPLC 指纹图谱, 并测定 15 种成分的含量, 为清心滋肾方 (Qinxin Zishen Prescription, QZP) 的质量控制提供依据。方法 采用 Phenomenex Kinetex C₁₈ (100 mm×4.60 mm, 2.6 μm) 色谱柱分离, 流动相为甲醇、乙腈和 0.2% 甲酸水溶液, 梯度洗脱, 检测波长为 245、280 nm, 柱温 40 ℃。建立 10 批 QZPD 的 HPLC 指纹图谱, 并进行相似度评价、对共有峰进行归属及指认, 并测定指认出的 15 个成分的含量。结果 10 批 QZPD HPLC 指纹图谱相似度在 0.923~0.998, 指认出共有峰 33 个, 其中黄连中有 7 个峰 (P11、P14~P16、P24、P29、P30), 莲子心 (P7、P19) 及酸枣仁 (P14、P21) 中各有 2 个峰, 丹参 (P4、P5、P10、P17、P18、P28、P31~P33) 及山茱萸 (P1~P3、P6、P8、P9、P12、P13、P20) 中各有 9 个峰, 其余 5 个共有峰 (P22、P23、P25~P27) 来源未明确, 而生地黄、钩藤及浮小麦对共有峰贡献不明显。通过与对照品比对, 指认出没食子酸 (P2)、5-羟甲基糠醛 (P3)、丹参素 (P4)、原儿茶醛 (P5)、莫诺苷 (P9)、咖啡酸 (P10)、马鞭草苷 (P12)、马钱苷 (P13)、木兰花碱 (P14)、黄连碱 (P24)、紫草酸 (P28)、小檗碱 (P29)、巴马汀 (P30)、丹酚酸 B (P31) 和丹酚酸 E (P33), 并对这 15 种成分进行含量测定, 定量结果分别为 158.3~248.2、233.6~321.3、45.9~166.0、24.3~38.6、800.7~1 263.6、26.6~54.9、44.5~108.2、470.4~757.3、85.6~178.6、11.1~34.2、56.2~106.4、25.9~138.9、21.0~59.2、951.6~2 244.7、38.6~92.8 μg/g。结论 所建立的 QZPD HPLC 指纹图谱及定量测定方法稳定性、重复性好, 可为 QZP 质量控制和评价提供参考。

关键词: 清心滋肾方; 指纹图谱; 含量测定; 没食子酸; 5-羟甲基糠醛; 丹参素; 原儿茶醛; 莫诺苷; 咖啡酸; 马鞭草苷; 马钱苷; 木兰花碱; 黄连碱; 紫草酸; 小檗碱; 巴马汀; 丹酚酸 B; 丹酚酸 E

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)11-2937-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.11.012

HPLC fingerprint of Qingxin Zishen Prescription and its multi-component quantitative analysis

LIU Jing¹, CHEN Yun², YAO Qian¹, YAN Zi-yi¹, CHEN Ying¹, ZHANG You¹, JU Wen-zheng², LU Su², XU Mei-juan²

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

Abstract: Objective To establish an HPLC fingerprint of Qingxin Zishen Prescription Decoction (QZPD) and determine the contents of its multiple components, so as to provide a scientific basis for quality control. **Methods** HPLC analysis was performed on a Phenomenex Kinetex C₁₈ column (100 mm × 4.60 mm, 2.6 μm) for gradient elution with the mobile phase consisting of methanol, acetonitrile and 0.2% formic acid aqueous. The detection wavelength was set at 245 nm and 280 nm, and the column temperature was 40 ℃. Fingerprints of ten batches of QZPD were determined, and the similarities among fingerprints were evaluated. Attributive analysis and identification of common peaks were performed and the contents of 15 components were determined. **Results** The fingerprint similarities of 10 batches of QZPD were ranged from 0.923 to 0.998 compared with the reference fingerprint, and 33

收稿日期: 2019-12-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81574009); 江苏省卫计委科研课题 (Q201602); 江苏省研究生科研与实践创新计划 (KYCX19_1210); 江苏省自然科学基金面上项目 (BK20181504); 江苏省高层次卫生人才“六个一工程”拔尖人才项目 (LGY2019072)

作者简介: 刘 静 (1992—), 硕士研究生。Tel: 18852099326 E-mail: jingliu-ep@outlook.com

***通信作者** 卢 苏 (1957—), 教授, 博士生导师, 从事中医妇科研究。Tel: 13951637351 E-mail: lusu0926@sina.com

许美娟 (1980—), 副研究员, 硕士生导师, 从事中药物质基础研究。Tel: (025)86587807 E-mail: windcolour11@126.com

common peaks were identified in the fingerprint. Among them, seven peaks (P11, P14—P16, P24, P29, P30) were identified from *Coptidis Rhizoma*, two peaks (P7, P19) were identified from *Nelumbinis Plumula*, two peaks (P14, P21) were identified from *Ziziphi Spinosae Semen*, nine peaks (P4, P5, P10, P17, P18, P28, P31—P33) were identified from *Salvia miltiorrhiza*, nine peaks (P1—P3, P6, P8, P9, P12, P13, P20) were identified from *Corni Fructus*, while five peaks (P22, P23, P25—P27) cannot be originated and none of the common peaks was identified from *Rehmanniae Radix*, *Uncariae Ramulus Cum Uncis* and *Triticum aestivum*. By comparing with the chemical reference, fifteen components, including gallic acid (P2), 5-hydroxymethylfurfural (P3), danshensu (P4), protocatechuic aldehyde (P5), morroniside (P9), caffeic acid (P10), cornin (P12), loganin (P13), magnoflorine (P14), coptisine (P24), lithospermic acid (P28), berberine (P29), palmatine (P30), salvianolic acid B (P31) and salvianolic acid E (P33), were identified and quantified. The contents of the fifteen components were 158.3—248.2, 233.6—321.3, 45.9—166.0, 24.3—38.6, 800.7—1 263.6, 26.6—54.9, 44.5—108.2, 470.4—757.3, 85.6—178.6, 11.1—34.2, 56.2—106.4, 25.9—138.9, 21.0—59.2, 951.6—2 244.7 and 38.6—92.8 $\mu\text{g/g}$, respectively. **Conclusion** The method established in this study is stable and highly reproducible, and can provide basis for quality control of QZPD.

Key words: Qingxin Zishen Prescription; fingerprint; content determination; gallic acid; 5-hydroxymethylfurfural; danshensu; protocatechuic aldehyde; morroniside; caffeic acid; cornin; loganin; magnoflorine; coptisine; lithospermic acid; berberine; palmatine; salvianolic acid B; salvianolic acid E

清心滋肾方 (Qingxin Zishen Prescription, QZP) 是卢苏教授基于国医大师夏桂成教授的清心滋肾汤 (Qingxin Zishen Decoction, QZD) 加減而成, 源于心 (脑) - 肾 - 子宫轴这一学术理论创立的治疗绝经综合征的一张验方, 临床疗效确切, 主要用于治疗绝经期五心烦躁、失眠、烘热出汗、腰膝酸软和口干口苦等症状, 临床控制率可达 86.15%^[1-3]。该方主要由黄连、莲子心、钩藤、丹参、山茱萸、酸枣仁、生地黄和浮小麦组成。方中以莲子心、黄连和钩藤为君药, 莲子心味苦, 专清心火, 黄连善清心胃之火, 可以加强清心安神的作用, 钩藤可平肝风除心热而安神魂, 三药并用控制潮热出汗、失眠每每奏效; 辅以丹参、酸枣仁清心除烦, 滋养心肝, 安神敛汗; 浮小麦益气除热, 增强止汗作用; 山茱萸、地黄滋肾补阴, 以治肾衰癸水不足之本。全方诸药合用重在交通心肾, 燮理阴阳, 平复诸证。历代医家对于该病的治疗多从左归丸、杞菊地黄丸等滋阴类方, 或者佐以逍遥散^[2,4]。

QZP 不是单纯的局限于阴虚火旺, 而是注重心肾不交在发病中的作用, 尤其突出“心”在该病病机中的重要位置。本课题组前期研究也发现, QZP 不仅能调节围绝经期大鼠卵巢 Caspase-3、Caspase-9、Apaf-1 和 Bcl-2/Bax 的表达水平, 而且能调节大鼠脑内 β -内啡肽 (β -EP) 和 5-羟色胺 (5-HT) 的水平^[5-7]。目前, 国内外对于 QZP 指纹图谱及其多成分同时测定的研究还尚未见报道。本实验采用 HPLC 法建立清心滋肾方水煎液 (Qingxin Zishen Prescription Decoction, QZPD) 的指纹图谱, 并且对指纹图谱中的 33 个共有峰进行归属。此外,

其中 15 种成分的量也被同时测定, 以便于有效地控制 QZP 的质量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters Alliance 2695-2487 高效液相色谱仪, 美国沃特斯公司; CPA225D 电子天平, 德国 Sartorius 公司; Milli-Q Advantage A10 超纯水机, 美国 Millipore 公司; Legend Micro 17R 冷冻离心机, 美国 Thermo 公司; KH5200E 型超声波清洗器, 昆山禾创超声仪器有限公司; DK-98-II 电子万用电炉, 天津市泰斯特仪器有限公司。

1.2 试剂

1.2.1 药材与饮片 黄连 (重庆)、莲子心 (湖南)、钩藤 (湖南)、酸枣仁 (安徽)、生地黄 (河南)、酒蒸山茱萸 (河南)、丹参 (贵州) 和浮小麦 (安徽) 饮片均购自于江苏省中医院药房 (批号见表 1), 均经江苏省中医院张倩副主任中药师鉴定, 鉴定结果分别为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎、睡莲科植物莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 的成熟种子中的干燥幼叶及胚根、茜草科植物钩藤 *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil. 的干燥带钩茎枝、鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的干燥成熟种子、玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的干燥块根、山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉、唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎、禾本科小麦属植物小麦 *Triticum aestivum* L. 的干燥干瘪果实。

表 1 10 批 QZPD 样品饮片批号
Table 1 Lot numbers of ten batches of QZPD

样品	批号							
	黄连	莲子心	钩藤	丹参	山茱萸	酸枣仁	生地黄	浮小麦
S1	2018060101	181001	2018090202	2018070102	180901	181001	18061911	181003
S2	2018090102	190101	2018120101	2018080101	190101	181202	18071817	181124
S3	2018100101	190101	2019010101	2018090101	190201	190101	18110112	181205
S4	2018110101	190302	2019030101	2018120102	190301	190302	18121804	190324
S5	2019020101	190303	2019060101	2018120106	190302	190401	19011001	190514
S6	2019040101	190303	2019060201	2019050102	190303	190601	19031510	190614
S7	2019040201	190702	2019060301	2019050201	190401	190702	19051304	190722
S8	2019050101	190901	2019090101	20190601	190402	190801	19071817	190829
S9	2019070101	190901	2019100101	2019070101	190601	190903	19082311	190829
S10	2019100101	191101	2019110101	2019110102	191202	191101	19092014	190905

1.2.2 对照品及试剂 对照品木兰花碱（批号 DST190625-004）、莫诺苷（批号 DST190603-39）、马鞭草苷（批号 DST191011-072）、5-羟甲基糠醛（批号 DST190802-056）、马钱苷（批号 DST190627-038）、紫草酸（批号 DST180724-028）、丹参素钠（批号 DST180302-014）、丹酚酸 E（批号 DST190507-065）均购自成都德思特生物有限公司；对照品咖啡酸（批号 110885-200102）购于中国食品药品检定研究院；对照品没食子酸（批号 MUST-17022801）、黄连碱（批号 MUST-16061705）、小檗碱（批号 MUST-16031814）、巴马汀（批号 MUST-16022614）、原儿茶醛（批号 MUST-13021902）和丹酚酸 B（批号 MUST-13020104）均购于成都曼思特生物有限公司，以上对照品质量分数均 $\geq 98\%$ ；甲醇和乙腈均为色谱纯，购自于美国 Merk 公司；甲酸为色谱纯，购自 ACS 公司；水为 Milli-Q 超纯水，其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品溶液 分别精密称定没食子酸、5-羟甲基糠醛、丹参素、原儿茶醛、莫诺苷、咖啡酸、马鞭草苷、马钱苷、木兰花碱、黄连碱、紫草酸、小檗碱、巴马汀、丹酚酸 B、丹酚酸 E 对照品适量，加 50% 甲醇制成含没食子酸 2.54 mg/mL、5-羟甲基糠醛 2.00 mg/mL、丹参素 1.00 mg/mL、原儿茶醛 3.97 mg/mL、莫诺苷 6.40 mg/mL、咖啡酸 5.05 mg/mL、马鞭草苷 2.00 mg/mL、马钱苷 2.14 mg/mL、木兰花碱 3.84 mg/mL、黄连碱 1.63 mg/mL、紫草酸

3.53 mg/mL、小檗碱 1.17 mg/mL、巴马汀 920 $\mu\text{g/mL}$ 、丹酚酸 B 2.24 mg/mL 和丹酚酸 E 1.28 mg/mL 的混合对照品溶液，即得。

2.1.2 供试品溶液 取全方临床常用剂量，即钩藤 15 g、莲子心 5 g、黄连 3 g、酸枣仁 15 g、生地黄 10 g、山茱萸 9 g、丹参 10 g、浮小麦 30 g，将除钩藤以外的药物至于烧杯中，加水 800 mL 润湿，浸泡 60 min。武火煎沸后文火煎煮 30 min，在最后 5 min 加入钩藤，趁热用单层纱布滤过；滤渣再加水 600 mL，武火煎沸后文火煎煮 20 min，趁热用单层纱布滤过，合并 2 次滤液文火浓缩至 500 mL，得相当于 0.194 g/mL 生药的 QZPD。

取上述所得的 QZPD 500 μL 加入 500 μL 超纯水，振荡 1 min，置离心机中，12 000 r/min 离心 10 min，取上清液，过 0.22 μm 微孔滤膜，即得。

2.1.3 单味药供试品溶液 称取钩藤 15 g、莲子心 5 g、黄连 3 g、酸枣仁 15 g、生地黄 10 g、山茱萸 9 g、丹参 10 g、浮小麦 30 g，分别按“2.1.2”项方法处理，即得单味药供试品溶液。

2.1.4 阴性对照供试品溶液 分别称取缺钩藤、莲子心、黄连、酸枣仁、生地黄、山茱萸、丹参、浮小麦等相应药材的其他 7 味药，按“2.1.2”项方法处理，分别得到缺钩藤、缺莲子心、缺黄连、缺酸枣仁、缺生地黄、缺山茱萸、缺丹参、缺浮小麦的 8 个阴性对照供试品溶液。

2.2 指纹图谱研究

2.2.1 色谱条件 色谱柱 Phenomenex Kinetex C_{18} (100 mm $\times$ 4.60 mm, 2.6 μm)；流动相为甲醇-乙腈

混合液(甲醇-乙腈为 4:6, A)-乙腈(B)-0.2% 甲酸(C), 梯度洗脱, 洗脱程序见表 2; 检测波长 245 nm; 柱温 40 ℃; 进样量 10 μL。

表 2 梯度洗脱程序

Table 2 Gradient elution procedures

t/min	体积流量/(mL·min ⁻¹)	A/%	B/%	C/%	梯度曲线类型
0.0	0.5	0	2.0	98.0	6
5.0	0.5	0	2.0	98.0	6
15.0	0.5	0	10.0	90.0	6
21.5	0.5	0	11.0	89.0	6
27.0	0.5	15.0	0	85.0	5
40.0	0.6	20.0	0	80.0	6
50.0	0.6	24.0	0	76.0	6
63.0	0.6	27.0	0	73.0	6
64.0	0.6	0	10.0	90.0	6
65.0	0.6	0	2.0	98.0	2
72.0	0.6	0	2.0	98.0	1

2.2.2 精密度试验 取同一 QZPD 供试品溶液(S2), 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 0.35%, 相对峰面积 RSD 均小于 2.11%, 表明本方法精密度良好。

2.2.3 重复性试验 分别取 QZPD (S2) 6 份, 按照“2.1.2”项方法制备供试品溶液及“2.2.1”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 5.02%, 表明方法重复性良好。

2.2.4 稳定性试验 取同一供试品溶液(S2), 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 0.71%, 相对峰面积的 RSD 均小于 6.75%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.5 指纹图谱的建立 分别精密吸取 10 批 QZPD 供试品溶液 10 μL 进样分析, 采集色谱图, 将 10 批供试品溶液的指纹图谱以 AIA 格式依次导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012 版本”软件, 以 S10 样品图谱为参照图谱, 采用中位数法, 时间窗宽度为 0.20 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。共标定 33 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 0.923、0.976、0.998、0.994、0.982、0.980、0.980、0.992、0.987、0.978。

2.2.6 共有峰归属分析及鉴定 分别精密吸取供试品溶液(S2)、各单味药供试品溶液和对应的阴性对照供试品溶液 10 μL, 按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 见图 2。

根据“2.2.5”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和鉴定。结果表明, 在匹配的 33 个共有峰中, 11、14~16、24、29、30 号峰来自黄连, 7、19 号峰来自莲子心, 14、21 号峰来自酸枣仁, 4、5、10、17、18、28、31~33 号峰来自丹参, 1~3、6、8、9、12、

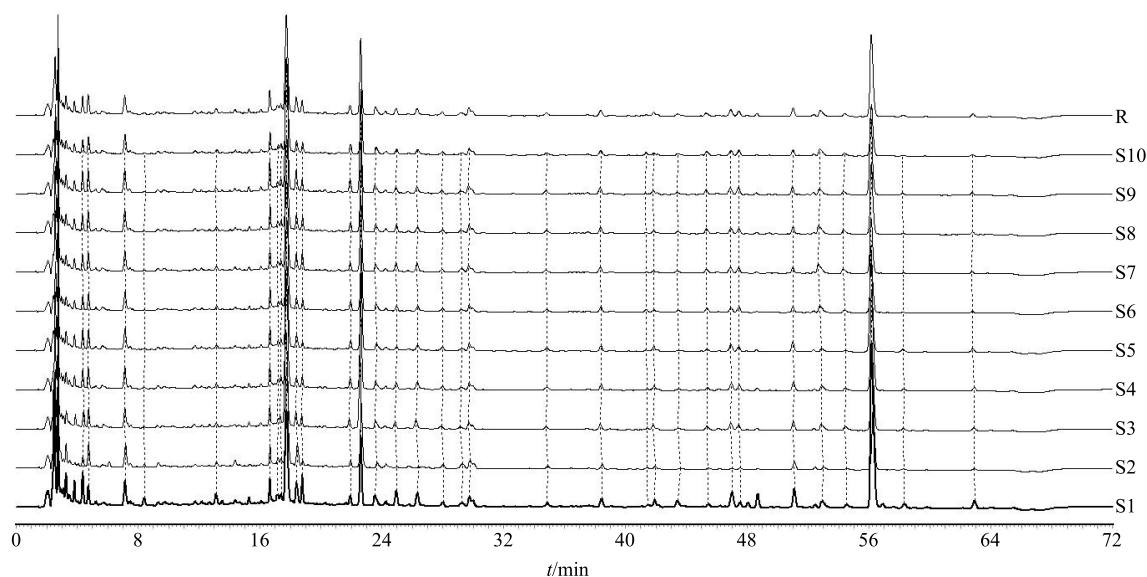


图 1 10 批 QZPD HPLC 指纹图谱和对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 HPLC fingerprints of ten batches of QZPD and reference fingerprint (R)

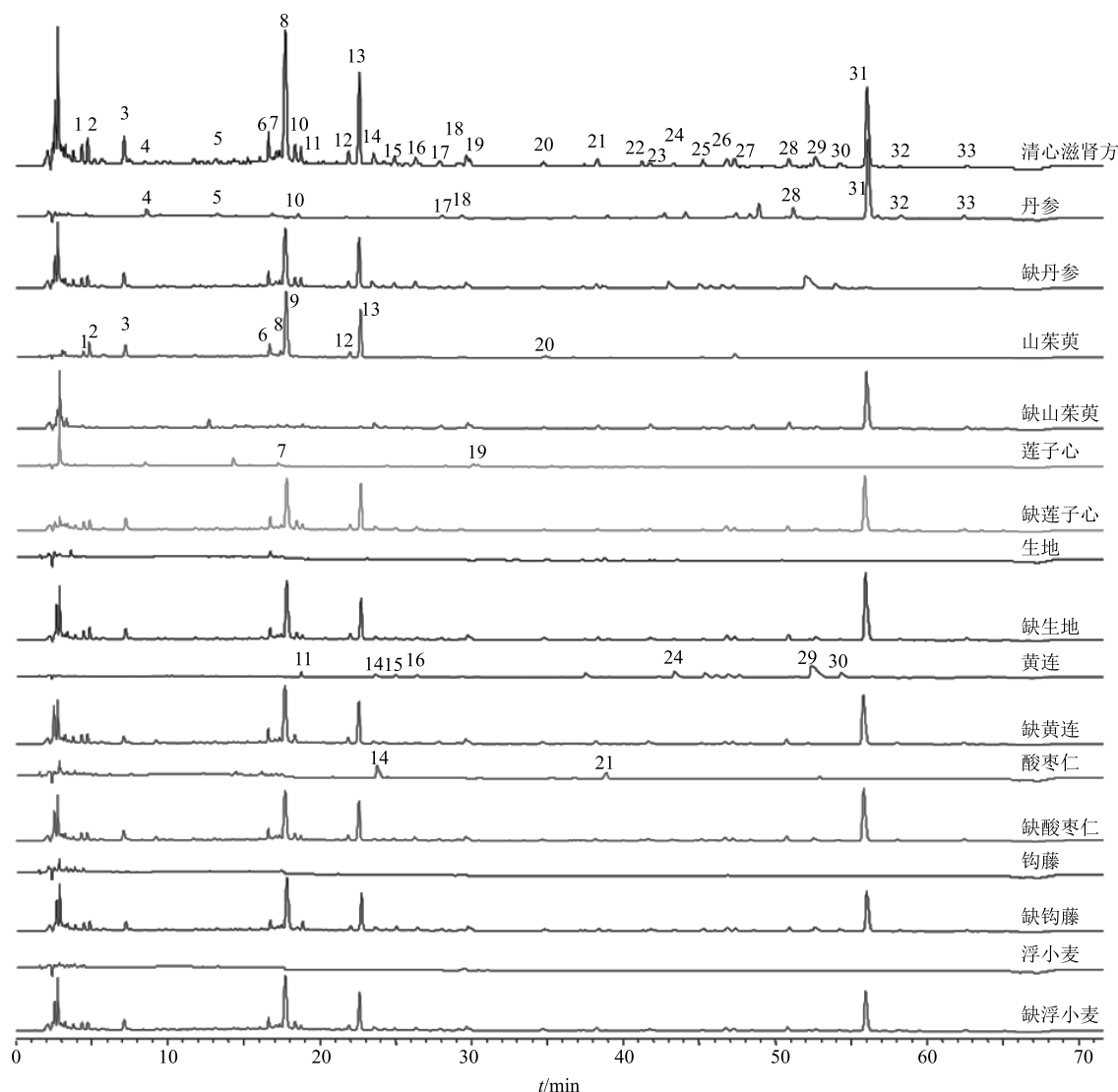


图 2 QZPD 共有峰归属

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

13、20 号峰来自山茱萸，生地黄、钩藤及浮小麦对共有峰贡献不明显。

精密吸取“2.1.1”项下的混合对照品溶液，按照“2.2.1”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 15 个特征峰，分别为没食子酸（2 号峰）、5-羟甲基糠醛（3 号峰）、丹参素（4 号峰）、原儿茶醛（5 号峰）、莫诺苷（9 号峰）、咖啡酸（10 号峰）、马鞭草苷（12 号峰）、马钱苷（13 号峰）、木兰花碱（14 号峰）、黄连碱（24 号峰）、紫草酸（28 号峰）、小檗碱（29 号峰）、巴马汀（30 号峰）、丹酚酸 B（31 号峰）、丹酚酸 E（33 号峰）。

2.3 QZPD 中 15 种成分的定量测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱、流动相、梯度洗脱程序、柱温和进样量同“2.2.1”项；检测波长：0~17.5 min

为 280 nm，17.5~72 min 为 245 nm。

2.3.2 专属性试验 精密吸取混合对照品溶液和供试品溶液各 10 μ L，按照“2.3.1”项色谱条件分析，结果见图 3。可见在没食子酸、5-羟甲基糠醛、丹参素、原儿茶醛、莫诺苷、咖啡酸、马鞭草苷、马钱苷、木兰花碱、黄连碱、紫草酸、小檗碱、巴马汀、丹酚酸 B 和丹酚酸 E 对照品相应的位置上，供试品溶液中均有相同保留时间的色谱峰出现。

2.3.3 线性关系考察 取混合对照品溶液进行稀释，得没食子酸、紫草酸、小檗碱质量浓度为 0.94、1.88、3.75、7.50、15.00、30.00、60.00 μ g/mL；5-羟甲基糠醛质量浓度为 1.25、2.50、5.00、10.00、20.00、40.00、80.00 μ g/mL；丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、马鞭草苷、巴马汀、丹酚酸 E 质量浓度为

0.78、1.56、3.12、6.25、12.50、25.00、50.00 $\mu\text{g/mL}$ ；莫诺昔质量浓度为 2.50、5.00、10.00、20.00、40.00、80.00、160.00 $\mu\text{g/mL}$ ；马钱苷质量浓度为 2.25、4.50、9.00、18.00、36.00、72.00、144.00 $\mu\text{g/mL}$ ；木兰花碱质量浓度为 1.50、3.00、6.00、12.00、24.00、48.00、96.00 $\mu\text{g/mL}$ ；黄连碱质量浓度为 0.70、1.40、2.80、5.60、11.20、22.40、44.80 $\mu\text{g/mL}$ ；丹酚酸 B 质量浓度为 3.91、7.81、15.60、31.20、62.50、125.00、250.00 $\mu\text{g/mL}$ 的一系列对照品混合溶液。分别按照“2.3.1”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， $1/X^2$ 权重，计算回归方程及相关系数 (r)，结果分别为没食子酸 $Y=54\ 200\ X-2\ 660$ ， $r=0.999\ 9$ ， $0.94\sim 60.00\ \mu\text{g/mL}$ ；5-羟甲基糠醛 $Y=161\ 000\ X-10\ 200$ ， $r=0.999\ 9$ ， $1.25\sim 80.00\ \mu\text{g/mL}$ ；丹参素 $Y=16\ 300\ X-1\ 080$ ， $r=0.999\ 5$ ， $0.78\sim 50.00\ \mu\text{g/mL}$ ；原儿茶醛 $Y=78\ 800\ X-4\ 280$ ， $r=0.999\ 3$ ， $0.78\sim 50.00\ \mu\text{g/mL}$ ；莫诺昔 $Y=32\ 800\ X-2\ 150$ ， $r=0.999\ 9$ ， $2.50\sim 160.00\ \mu\text{g/mL}$ ；咖啡酸 $Y=82\ 900\ X-3\ 070$ ， $r=0.999\ 7$ ， $0.78\sim 50.00\ \mu\text{g/mL}$ ；马鞭草苷 $Y=25\ 900\ X-246$ ， $r=0.999\ 8$ ， $0.78\sim 50.00\ \mu\text{g/mL}$ ；马钱苷 $Y=29\ 700\ X-3\ 340$ ， $r=0.999\ 9$ ， $2.25\sim 144.00\ \mu\text{g/mL}$ ；木兰花碱 $Y=13\ 500\ X-2\ 340$ ， $r=0.999\ 6$ ， $1.50\sim 96.00\ \mu\text{g/mL}$ ；黄连碱 $Y=39\ 500\ X-12\ 000$ ， $r=0.999\ 4$ ， $0.70\sim 44.80\ \mu\text{g/mL}$ ；紫草酸 $Y=30\ 100\ X-2\ 640$ ， $r=0.999\ 3$ ， $0.94\sim 60.00\ \mu\text{g/mL}$ ；小檗碱 $Y=35\ 200\ X-21\ 500$ ， $r=0.999\ 3$ ， $0.94\sim 60.00\ \mu\text{g/mL}$ ；巴马汀 $Y=36\ 800\ X-17\ 900$ ， $r=0.999\ 5$ ， $0.78\sim 50.00\ \mu\text{g/mL}$ ；丹酚酸 B $Y=17\ 600\ X-15\ 000$ ， $r=0.999\ 5$ ， $3.91\sim 250.00\ \mu\text{g/mL}$ ；丹酚酸 E $Y=17\ 300\ X-7\ 820$ ， $r=0.999\ 6$ ， $0.78\sim 50.00\ \mu\text{g/mL}$ 。结果表明，各对照品在各自质量浓度范围内线性关系良好。

2.3.4 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 10 μL ，按“2.3.1”项下色谱条件连续进样 6 次，分别计算各成分峰面积的 RSD，结果没食子酸、5-羟甲基糠醛、丹参素、原儿茶醛、莫诺昔、咖啡酸、马鞭草苷、马钱苷、木兰花碱、黄连碱、紫草酸、小檗碱、巴马汀、丹酚酸 B、丹酚酸 E 的 RSD 分别为 0.33%、0.27%、3.05%、3.03%、0.72%、0.21%、4.41%、0.32%、1.15%、2.37%、0.67%、0.61%、3.93%、0.46%、0.54%，表明仪器的精密度良好。

2.3.5 稳定性试验 取同一供试品溶液 (S2)，按

“2.3.1”项下色谱条件分别于 0、4、8、12、24 h 进样检测峰面积，结果没食子酸、5-羟甲基糠醛、丹参素、原儿茶醛、莫诺昔、咖啡酸、马鞭草苷、马钱苷、木兰花碱、黄连碱、紫草酸、小檗碱、巴马汀、丹酚酸 B、丹酚酸 E 的 RSD 分别为 0.68%、0.19%、2.13%、3.79%、1.32%、0.18%、3.31%、0.34%、3.07%、2.00%、3.31%、1.72%、2.39%、0.73%、1.10%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

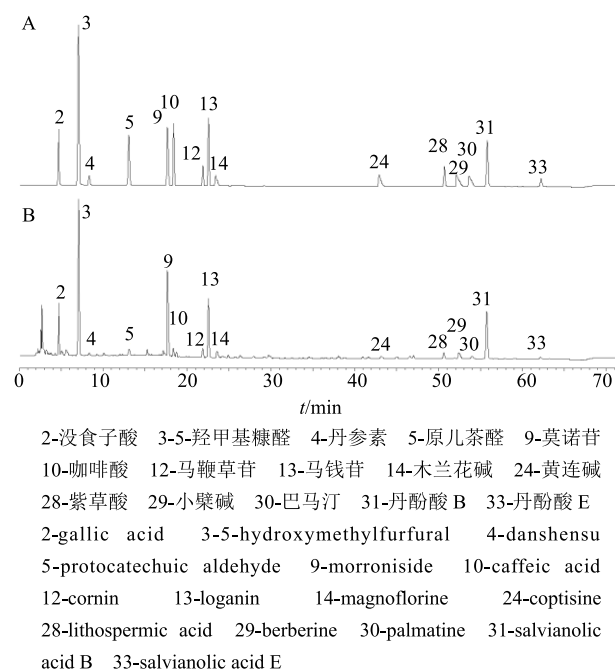


图 3 混合对照品 (A) 和 QZPD 供试品溶液 (S2, B) 的 HPLC 图

Fig. 3 HPLC chromatogram of mixed reference substance (A) and QZPD sample (S2, B)

2.3.6 重复性试验 分别取供试品溶液 (S2) 6 份，按“2.3.1”项色谱条件进行测定，结果没食子酸、5-羟甲基糠醛、丹参素、原儿茶醛、莫诺昔、咖啡酸、马鞭草苷、马钱苷、木兰花碱、黄连碱、紫草酸、小檗碱、巴马汀、丹酚酸 B、丹酚酸 E 的 RSD 分别为 1.85%、1.89%、3.21%、1.87%、2.14%、2.52%、2.33%、2.03%、2.83%、4.84%、2.61%、4.76%、3.45%、3.42%、4.25%，表明该方法重复性良好。

2.3.7 加样回收率试验 取已测定各分量的 QZPD 供试品溶液 6 份 (S2)，每份 250 μL ，加入等体积的 15 种混合对照品溶液 (没食子酸 17.87 $\mu\text{g/mL}$ 、5-羟甲基糠醛 28.17 $\mu\text{g/mL}$ 、丹参素 5.774 $\mu\text{g/mL}$ 、原儿茶醛 2.451 $\mu\text{g/mL}$ 、莫诺昔 99.79 $\mu\text{g/mL}$ 、咖啡酸 3.308 $\mu\text{g/mL}$ 、马鞭草苷 9.969 $\mu\text{g/mL}$ 、马钱苷 51.66 $\mu\text{g/mL}$ 、木兰花碱 16.49 $\mu\text{g/mL}$ 、黄连碱 2.709

μg/mL、紫草酸 7.929 μg/mL、小檗碱 9.760 μg/mL、巴马汀 3.842 μg/mL、丹酚酸 B 100.5 μg/mL、丹酚酸 E 4.044 μg/mL), 按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.3.1”项色谱条件下进行测定, 计算各成分的平均加样回收率和 RSD 值, 结果平均加样回收率分别为 99.4%、104.0%、98.8%、99.8%、100.2%、99.7%、100.4%、100.0%、100.8%、99.8%、99.1%、101.3%、100.2%、100.7%、100.4%, RSD 分别为 1.18%、4.42%、3.88%、1.11%、2.94%、1.42%、0.59%、4.69%、1.84%、1.07%、0.80%、1.16%、1.16%、0.98%、0.99%。结果表明, 方法准确度良好。

2.3.8 样品含量测定 精密称取 10 批 QZPD 组方

药材, 按照“2.1.2”项方法制备供试品溶液, 按照“2.3.1”项下色谱条件进样分析, 测定 15 种成分的质量分数, 结果见表 3。结果表明, 10 批样品中各成分质量分数(以生药总量计算)分别为没食子酸 158.3~248.2 μg/g、5-羟甲基糠醛 233.6~321.3 μg/g、丹参素 45.9~166.0 μg/g、原儿茶醛 24.3~38.6 μg/g、莫诺苷 800.7~1 263.6 μg/g、咖啡酸 26.6~54.9 μg/g、马鞭草苷 44.5~108.2 μg/g、马钱苷 470.4~757.3 μg/g、木兰花碱 85.6~178.6 μg/g、黄连碱 11.1~34.2 μg/g、紫草酸 56.2~106.4 μg/g、小檗碱 25.9~138.9 μg/g、巴马汀 21.0~59.2 μg/g、丹酚酸 B 951.6~2 244.7 μg/g、丹酚酸 E 38.6~92.8 μg/g。

表 3 QZPD 中 15 种成分测定结果

Table 3 Content results of 15 components in QZPD

样品	质量分数/(μg·g ⁻¹)							
	没食子酸	5-羟甲基糠醛	丹参素	原儿茶醛	莫诺苷	咖啡酸	马鞭草苷	马钱苷
S1	223.7	233.6	166.0	27.4	820.4	54.9	44.5	503.8
S2	159.7	250.0	63.5	28.6	804.5	30.2	81.2	470.4
S3	180.1	244.9	98.1	30.3	842.4	33.1	82.8	499.9
S4	220.2	304.9	120.8	36.6	1 040.9	26.6	95.3	699.7
S5	211.0	309.6	97.2	34.5	834.6	38.4	79.4	642.9
S6	189.6	280.2	71.3	31.3	901.6	32.3	89.0	525.4
S7	195.9	264.6	105.5	36.0	843.6	39.5	81.9	562.8
S8	245.8	321.3	84.3	34.0	908.7	42.6	89.9	723.9
S9	248.2	291.3	116.2	38.6	1 263.6	50.7	108.2	757.3
S10	158.3	249.9	45.9	24.3	800.7	30.4	78.9	473.6

样品	质量分数/(μg·g ⁻¹)						
	木兰花碱	黄连碱	紫草酸	小檗碱	巴马汀	丹酚酸 B	丹酚酸 E
S1	85.6	11.1	83.9	37.9	23.7	1 086.7	38.6
S2	149.8	26.8	72.0	93.5	41.0	986.2	41.9
S3	170.6	31.7	95.1	97.7	58.9	1 887.2	78.9
S4	177.9	21.6	101.5	66.8	43.3	2 244.7	92.8
S5	137.1	13.2	106.4	25.9	21.0	2 132.6	84.5
S6	165.5	28.0	80.8	96.2	42.3	1 120.4	45.8
S7	163.0	34.2	69.4	138.9	59.2	1 117.9	49.9
S8	178.6	31.8	87.5	129.3	58.8	1 477.4	65.2
S9	170.0	26.2	92.7	83.4	53.9	1 587.8	64.0
S10	156.0	24.4	56.2	92.7	37.5	951.6	38.8

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

本实验前期使用了含量测定常用的色谱柱 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (250 mm×4.60 mm, 5 μm)

进行分离。虽然经过条件优化后能得到色谱峰形尚可的指纹图谱, 但是分析时间较长 (>120 min)。因此, 改用了 Phenomenex Kinetex C₁₈ (100 mm×4.60 mm, 2.6 μm) 色谱柱, 不仅缩短了分析时间,

而且大多数色谱峰的峰形佳, 分离度好。

在考察流动相时, 发现单用甲醇或者单用乙腈, 指纹图谱前半部分的色谱峰的峰形和分离度均较差, 但用甲醇和乙腈的混合物(4:6)时能得到较好的分离效果。而指纹图谱后半部分, 单用乙腈的效果好, 因此, 在梯度洗脱时, 前半部分有机相是甲醇和乙腈的混合物, 而后半部分单用乙腈。此外, 水相中甲酸的体积分数对后半部分化合物的保留时间也有影响。当用 0.1% 甲酸时, 紫草酸、小檗碱、巴马汀、丹酚酸 B 和丹酚酸 E 的保留时间不稳定, 但是当水相中甲酸的体积分数达 0.2% 时, 这些化合物的保留时间稳定。

文献显示, QZP 中 8 味中药中主要成分的最大吸收波长在 205、245、280、345 nm 左右^[8-16], 通过比较这几个波长的色谱图, 发现在 245 nm 时, 指纹图谱的色谱峰多、分离度好、各峰的吸收强度也较大, 因此, 进行指纹图谱研究时, 选用了 245 nm 波长。但是含量测定时, 极性较大的几个化合物没食子酸、5-羟甲基糠醛和丹参素在 245 nm 时的吸收远小于 280 nm, 因此, 在含量测定时采用了波长切换的方法, 即先用 280 nm 波长检测, 然后再用 245 nm 波长检测。

3.2 指纹图谱及含量测定

在 245 nm 波长处, 10 批 QZPD 有共有峰 33 个, 各批次色谱峰整体外观基本一致, 相对保留时间 RSD 小于 1%, 说明建立的 HPLC 指纹图谱方法稳定可靠。但是各批次成分含量 RSD 大于 10%, 特别是黄连和丹参部分成分含量的 RSD 大于 30%, 提示不同批次之间成分的含量差异还是较大的。本研究所用的各中药饮片来自同一产地, 批号不同。各个成分含量的差异可能是由于不同批号药材之间的成分含量差异导致, 也可能是由取样不均造成, 但这却反映了临床实际使用时可能存在的真实情况。由此可见, 采用指纹图谱和含量测定的方法来共同控制中药方剂的质量十分必要。

在测定单味药材和缺味药材的指纹图谱进行色谱峰归属时, 发现 14 号峰(木兰花碱)共同来源于黄连和酸枣仁, 这与文献报道该 2 种中药中均能检测到木兰花碱一致^[16-17]。此外, 在 20~28 号峰之间, 丹参单味药材的谱图出现了 7 个峰、黄连出现了 6 个峰, 但在全方色谱图中这些峰并未全部出现, 提示在全方煎煮过程中, 这 2 味药材的部分成分可能发生了共沉淀, 或者两者配伍抑制了某些成分的溶

出^[18]。

黄连中的黄连碱、小檗碱、巴马汀以及黄连和酸枣仁的共有成分木兰花碱为生物碱类成分, 可通过血脑屏障, 发挥多种中枢神经系统作用^[19-23]; 山茱萸中的没食子酸及环烯醚萜苷类成分如莫诺苷、马鞭草苷、马钱苷具有神经系统保护、兴奋子宫和拟雌激素样作用^[24-25], 5-羟甲基糠醛为山茱萸炮制后产生, 可用于控制酒蒸山茱萸饮片的质量^[26]; 丹参中的酚酸类成分如丹参素、原儿茶酸、紫草酸和丹酚酸 B 等具有多种心脑血管保护作用, 是丹参发挥清心、除烦、安神的物质基础^[27-28]。《中国药典》2015 年版中, 黄连、莲子心、酸枣仁、丹参、山茱萸和生地黄饮片的含量测定指标分别为小檗碱、莲心碱、酸枣仁皂苷 A、丹酚酸 B、莫诺苷/马钱苷和梓醇, 钩藤没有含量测定的指标成分, 浮小麦没有收录。

在建立含量测定方法时, 也检测了莲心碱、酸枣仁皂苷 A、梓醇和钩藤碱, 但全方和单味药样品中均未检测到这些化合物明显的色谱峰。可能因为《中国药典》中这些含量测定指标成分一般都是样品用有机溶剂(如甲醇)提取后进行检测, 而本方模拟临床实际用法——水提, 导致这些成分含量较低。因此, 本研究最终选用水煎液中具有较好水溶性且响应值较大的 15 个成分作为定量指标。有机溶剂提取液与水提取液所代表的质量信息有天壤之别。刘昌孝院士和陈士林教授共同提出应对中药饮片标准汤剂进行研究^[29], 相比于传统的中药饮片通过提取后进行个别成分的含量测定来控制质量的方法, 中药饮片标准汤剂研究可能对中药复方水煎液的质量控制更有指导意义。

参考文献

- [1] 卢 苏, 柳 静, 陈 赟, 等. 多中心、随机、盲法、平行对照 364 例绝经综合征临床研究 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25(4): 876-878.
- [2] 胡荣魁, 谈 勇. 从清心滋肾汤浅析夏桂成治疗更年期综合征的临床经验 [J]. 南京中医药大学学报, 2014, 30(4): 373-375.
- [3] 徐 梅, 卢 苏. 清心滋肾汤治疗围绝经期综合征 30 例 [J]. 吉林中医药, 2011, 31(12): 1199-1200.
- [4] 刘秋鸣, 张 帆. 从肾论治绝经期综合征 [J]. 实用妇科内分泌电子杂志, 2019, 6(24): 199-200.
- [5] 雷 雯, 缪婷玉, 陈 赟, 等. 滋肾清心汤对围绝经期大鼠卵巢 bcl-2 和 bax 表达影响的实验研究 [J]. 江苏中医药, 2014, 46(9): 71-72.

- [6] 缪婷玉, 雷 雯, 陈 赟, 等. 清心滋肾汤对围绝经期大鼠卵巢 Caspase-3 Caspase-9 及 Apaf-1 的影响 [J]. 四川中医, 2014, 32(6): 62-65.
- [7] 杨亚茹, 陈 赟, 卢 苏, 清心滋肾汤对绝经期大鼠下丘脑 β -EP 和 5-HT 的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(2): 409-411.
- [8] 高 丽, 刘 暖, 毛秉豫, 等. RP-HPLC 法同时测定裕丹参中 8 种活性成分的含量 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(10): 2352-2354.
- [9] 韩根利, 刘宏胜, 王树森, 等. RP-HPLC 法同时测定山茱萸萜类制剂中莫诺昔、马钱昔、山茱萸新昔、齐墩果酸及熊果酸 [J]. 中草药, 2017, 48(24): 5168-5173.
- [10] 熊巨良. 高效液相色谱法测定五味黄连丸中表小檗碱、黄连碱、巴马汀和小檗碱的含量 [J]. 湖南中医杂志, 2014, 30(9): 152-154.
- [11] 杨 晖, 素 娜, 李 杰, 等. HPLC 法测定山茱萸果核中 5 种有机酸的含量 [J]. 河南科技大学学报: 医学版, 2015, 33(3): 161-163.
- [12] 蔡洪鲲, 蒋范任, 钟胜佳, 等. 一测多评法同时测定钩藤中 4 种生物碱的含量 [J]. 中南药学, 2019, 17(11): 1937-1940.
- [13] 高明菊, 毕 丹, 孟 霜, 等. HPLC 法同时测定浮小麦中 5-二十一烷基间苯二酚和亚油酸的含量 [J]. 中国药房, 2013, 24(3): 244-246.
- [14] 盛秋双, 杜润宝, 卢 娜, 等. 地黄 HPLC 指纹图谱及梓醇含量测定的研究 [J]. 中草药, 2019, 50(20): 5060-5063.
- [15] 隋 月, 贺晓双, 王嗣岑. 莲子心中 3 种主要生物碱含量测定及提取优化 [J]. 中国药理学杂志, 2018, 53(22): 1901-1907.
- [16] 张 敏, 杜晨晖, 马 敏, 等. 酸枣仁饮片汤剂质量评价研究 [J]. 中草药, 2018, 49(19): 4520-4527.
- [17] 杨丽宏, 袁子文, 纪 鹏, 等. 黄连解毒汤中 13 种活性成分的 HPLC 检测及其有效部位的筛选 [J]. 中草药, 2019, 50(16): 3794-3801.
- [18] 田学浩, 张 昊, 李 桐, 等. 中药配伍理论科学内涵的外在表象——复方水煎自沉淀 [J]. 中草药, 2017, 48(22): 4778-4783.
- [19] 毕肖林, 王 亚, 池玉梅, 等. 液-质联用研究黄连生物碱类成分在大鼠体内的组织分布 [J]. 中药材, 2016, 39(8): 1849-1853.
- [20] 王 影, 刘文娟, 崔 瑛. 黄连现代研究进展 [J]. 中医学报, 2014, 29(11): 1642-1645.
- [21] 李绍烁, 赵京涛, 何昌强, 等. 山茱萸总甙干预骨质疏松模型大鼠骨代谢: TRPV6、TRPV5 通路的变化 [J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(11): 1749-1754.
- [22] 王 静, 张艳军, 常亮堂. 小檗碱对 $A\beta_{25-35}$ 损伤大鼠皮层神经元的保护作用 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 728-733.
- [23] 蔡 悦, 袁 捷, 刘晓龙, 等. 小檗碱对神经元保护作用机制的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(8): 2154-2158.
- [24] 郑雪花, 杨 君, 杨跃辉. 没食子酸药理作用的研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(1): 94-98.
- [25] 周迎春, 张廉洁, 张燕丽. 山茱萸化学成分及药理作用研究新进展 [J]. 中医药信息, 2020, 37(1): 114-120.
- [26] 杜伟锋, 蔡 皓, 丁 霞, 等. RP-HPLC 法测定山茱萸生品和酒制品中没食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺昔和马钱素 [J]. 中草药, 2008, 39(12): 1813-1815.
- [27] 任 越, 霍梦琪, 马 婧, 等. 基于系统中药学的丹参组分功效研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, doi: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20200210.401.
- [28] 夏 杨, 张惠军, 聂亚莉. 丹酚酸 B 预处理对心肌缺血/再灌注损伤能量代谢的影响 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(12): 2210-2213.
- [29] 陈士林, 刘昌孝, 张铁军, 等. 基于中药质量标志物 and 传统用法的中药饮片标准汤剂传承发展研究思路与建议 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4519-4528.