

真武汤 HPLC-ELSD 指纹图谱及 13 种成分含量测定研究

田 萍¹, 位恒超², 韩德恩^{2*}, 经天宇², 马 开^{1*}

1. 河南省中医药研究院, 河南 郑州 450004

2. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046

摘要: **目的** 建立真武汤 HPLC-ELSD 指纹图谱, 采用化学模式识别法对其进行分析和筛选出真武汤的标志性成分, 并以其为指标建立真武汤含量测定方法。 **方法** 采用 HPLC-ELSD 法建立 16 批真武汤指纹图谱, 运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, 确定共有峰及其归属, 运用聚类分析 (CA)、主成分分析 (PCA)、正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA), 筛选出真武汤的指标性成分。 **结果** 建立了真武汤指纹图谱, 确认了 38 个共有峰, 相似度均 > 0.95; CA、PCA、OPLS-DA 结果一致, 将样品分为 3 类; 不同批次真武汤样品差异贡献较大的指标成分指认了 11 个, 即苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、猪苓酸 C、茯苓酸、白术内酯 II、白术内酯 III、羟基芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷; 6-姜酚、6-姜烯酚为生姜主要活性成分, 故将以上 13 个成分作为真武汤指标性成分, 各色谱峰分离度较好, 线性关系良好, 平均加样回收率为 96.46%~99.80%, RSD≤3.15%; 16 批次样品中苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、猪苓酸 C、茯苓酸、白术内酯 II、白术内酯 III、羟基芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷、6-姜酚、6-姜烯酚的质量分数分别为 283.93~576.86、25.05~147.39、62.96~303.37、31.24~131.27、9.76~44.04、32.15~83.55、76.55~333.13、17.48~146.61、456.58~1554.14、3 322.48~5 590.01、158.21~556.50、525.85~582.92、68.52~74.73 mg/g。 **结论** 指纹图谱与 PCA、CA、OPLS-DA 相结合可全面地评价真武汤质量, 该方法稳定、可靠, 为真武汤质量评价提供参考。

关键词 真武汤; HPLC-ELSD; 指纹图谱; 化学模式识别; 相似度; 聚类分析; 主成分分析; 正交偏最小二乘法判别分析; 苯甲酰新乌头原碱; 苯甲酰乌头原碱; 苯甲酰次乌头原碱; 猪苓酸 C; 茯苓酸; 白术内酯 II; 白术内酯 III; 羟基芍药苷; 芍药内酯苷; 芍药苷; 苯甲酰芍药苷; 6-姜酚; 6-姜烯酚

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)23-5980-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.23.010

HPLC-ELSD fingerprint of Zhenwu Decoction and simultaneous determination of 13 components

TIAN Ping¹, WEI Heng-chao², HAN De-en², JING Tian-yu², MA Kai¹

1. Henan Institute of TCM Research, Zhengzhou 450004, China

2. College of Pharmacy, Henan University of TCM, Zhengzhou 450046, China

Abstract: Objective To establish HPLC-ELSD fingerprint of Zhenwu Decoction(ZWD), screen out the signature components of ZWD through chemical pattern recognition, so as to establish the content determination method of ZWD based on this index.

Methods The fingerprint of 16 batches of ZWD was established by HPLC-ELSD method. The similarity evaluation system of traditional Chinese medicine chromatographic fingerprint (2012 Version) was used for similarity evaluation to determine the common peaks and its attribution. Cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were used to select the index components of ZWD. **Results** The fingerprint of ZWD was established, 38 common peaks were confirmed, and the similarity was > 0.95. The results of CA, PCA and OPLS-DA were consistent

收稿日期: 2020-06-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81473368); 河南省中医药科学研究专项课题 (2016ZY2020); 河南省中医药科学研究专项课题 (2017ZY2036)

作者简介: 田 萍 (1982—), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事中药药效物质基础研究。Tel: (0371)66331718 E-mail: tianping082@163.com

*通信作者 韩德恩 (1980—), 男, 博士, 讲师, 主要从事药物代谢动力学和代谢组学。E-mail: handn@163.com

马 开 (1968—), 男, 副研究员, 主要从事中药质量控制研究。E-mail: zzm1968@126.com

and the samples were divided into three categories. Benzoylmesaconine, benzoylaconitine, benzoylhypaconitine, polyporenic acid C, pachymic acid, atractylenolide II, atractylenolide III, oxypaeoniflorin, albiflorin, paeoniflorin and benzoylpaeoniflorin were identified as the 11 index components with significant difference contribution in different batches of ZWD samples. 6-Gingerol and 6-shogaol were the main active components of ginger, so the above 13 components were taken as the index components of ZWD. The chromatographic peak separation degree and linear relationship were good. The average recovery rate was 96.46%—99.80%, RSD $\leq$ 3.15%. The mass fraction range of benzoylmesaconine, benzoylaconitine, benzoylhypaconitine, polyporenic acid C, pachymic acid, atractylenolide II, atractylenolide III, oxypaeoniflorin, albiflorin, paeoniflorin, benzoylpaeoniflorin, 6-gingerol, 6-shogaol in 16 batches were 283.93—576.86, 25.05—147.39, 62.96—303.37, 31.24—131.27, 9.76—44.04, 32.15—83.55, 76.55—333.13, 17.48—146.61, 456.58—1554.14, 3 322.48—5 590.01, 158.21—556.50, 525.85—582.92 and 68.52—74.73 mg/g, respectively. **Conclusion** The fingerprint combined with PCA, CA and OPLS-DA can comprehensively evaluate the quality of ZWD. This method is stable and reliable, providing reference for the quality evaluation.

Key words: Zhenwu Decoction; HPLC-ELSD; fingerprint; chemical pattern recognition; similarity; cluster analysis; principal component analysis; discriminant analysis of orthogonal partial least square method; benzoylmesaconine; benzoylaconitine; benzoylhypaconitine; polyporenic acid C; pachymic acid; atractylenolide II; atractylenolide III; oxypaeoniflorin; albiflorin; paeoniflorin; benzoylpaeoniflorin; 6-gingerol; 6-shogaol

真武汤为《伤寒论》温阳利水之经方，主治肾阳虚寒湿证^[1]，现已收录于国家中医药管理局 2018 年发布的《古代经典名方目录（第一批）》。现代药理学研究证明其具有抗自由基氧化^[2-3]、抗炎^[4]、降血脂^[5]、抗心衰^[6]等作用，还可调节水通道蛋白、纠正水液代谢平衡紊乱、改善肾功能^[7]；常用于治疗循环系统^[8]、呼吸系统^[9]、消化系统^[10]、神经系统^[11]和肾系疾病^[12-13]。

中药复方成分复杂，理化性质各异，以单一成分或几个成分含量为指标优选提取工艺涵盖面较窄，难以代表其内在质量。指纹图谱技术能获取更多的化学成分信息，具有全面性、整体性等特点，在优劣评价、真伪鉴别、活性成分识别、一致性和稳定性评价方面已成为国际公认有效方法^[14]。多指标成分含量测定与指纹图谱技术相结合可直观、全面的反映中药复方内在质量，为中药复方质量的稳定性提供保障^[15-16]。真武汤（Zhenwu Decoction, ZWD）指纹图谱和含量测定研究多采用 HPLC-UV/DAD 法^[17-19]。真武汤中茯苓所含茯苓酸^[20]、附子所含水溶性生物碱^[21-22]等成分无明显紫外吸收峰，基线噪音大，紫外检测器无法满足 HPLC 分析要求。故本实验采用 HPLC-ELSD 法建立真武汤指纹图谱，运用化学模式识别法对不同批次的样品进行分析，筛选出真武汤的指标性成分，并以其为指标建立真武汤含量测定方法，为真武汤质量控制、稳定性评价提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters ACQ Uity Arc 型高效液相色谱仪，包括

Alltech ELSD 3300HP 检测器，QSM-R 四元溶液管理器，SM FTN-R 样品管理器，Empower 色谱工作站，美国 Waters 公司；AE240 型十万分之一分析天平，瑞士 Mettler Toledo 公司；LIBROR-160DPT 型十万分之一分析天平，日本岛津公司；ULUP-IV-10T 型超纯水器，四川优普超纯科技有限公司。

1.2 试剂

对照品芍药苷（批号 110736-201640，质量分数为 94.6%）购于中国食品药品检定研究院；对照品羟基芍药苷（批号 wkq16092104）、芍药内酯苷（批号 wkq17122003）、苯甲酰芍药苷（批号 wkq16122906）、茯苓酸（批号 wkq16071903）、白术内酯 II（批号 wkq16060503）、白术内酯 III（批号 wkq17111314）、猪苓酸 C（批号 wkq17120606）均购于四川维克奇生物科技有限公司，质量分数均大于 98%；对照品苯甲酰新乌头碱（批号 MUST-18032406）、苯甲酰乌头原碱（批号 MUST-17022805）、苯甲酰次乌头原碱（批号 MUST-17022807）均购于成都曼斯特公司，质量分数均大于 99%；对照品 6-姜酚、6-姜烯酚为本实验室自制，经面积归一化法检测质量分数均大于 98%。甲醇、乙腈，色谱级，美国 Fisher 公司；甲酸，色谱纯，美国 Sigma 公司；乙酸铵，色谱级，上海阿拉丁生化科技股份有限公司；其他试剂均为分析纯。

1.3 材料

真武汤药材信息见表 1，生姜（批次 20191022）购于当地市场，经河南省中医药研究院刘杰研究员鉴定，黑顺片为毛茛科乌头属植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 子根的加工品，茯苓为多孔菌科

表 1 真武汤药材信息

Table 1 Information of ZWD

编号	购买地	黑顺片		茯苓		白芍		白术	
		批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地
S1	河南本草国药馆顺河路店	17050202	四川江油	170518	安徽六安	171205	安徽亳州	170401CP0154	浙江新华
S2	河南本草国药馆保全街店	18020305	四川江油	180602	安徽六安	181102	安徽亳州	180605CP0175	浙江新华
S3	河南大参林药店二七路店	170701	四川江油	17061701	安徽亳州	17052309	安徽亳州	17042001	安徽亳州
S4	河南大参林药店政通路店	18080201	四川江油	18072605	安徽安庆	18061906	安徽亳州	18081003	安徽亳州
S5	张仲景大药房人民路店	17010202	四川江油	170102	安徽安庆	170502	安徽亳州	170103	安徽亳州
S6	张仲景大药房商城路店	17020602	四川江油	170401	安徽六安	170602	安徽亳州	170302001	安徽亳州
S7	张仲景大药房航海东路店	17010601	四川江油	170502	安徽六安	170801	安徽亳州	170601002	安徽亳州
S8	张仲景大药房东大街店	180102	四川布拖	181101	安徽安庆	4003181103	安徽亳州	190401	浙江新华
S9	张仲景大药房紫荆店	18020509	四川布拖	180901	安徽安庆	4003180916	安徽亳州	181008	浙江绍兴
S10	张仲景大药房管城街店	18050203	四川布拖	181203	安徽安庆	4003181004	安徽亳州	190702	浙江绍兴
S11	北京同仁堂(紫荆山)	11110211	四川江油	111104015	安徽安庆	11114021	安徽亳州	11114013	浙江绍兴
S12	北京同仁堂(紫荆山)	11110504	四川江油	111105002	安徽安庆	11115055	安徽亳州	11115006	浙江新华
S13	北京同仁堂(丹尼斯)	11110609	四川江油	111108011	安徽安庆	11118027	安徽亳州	11118001	浙江新华
S14	河南省中医药研究院附属医院	1810189	陕西汉中	18110408	云南普洱	1810209	安徽亳州	18120513	安徽亳州
S15	河南省中医药研究院附属医院	1812268	陕西汉中	19030804	云南普洱	1901271	安徽亳州	19030425	安徽亳州
S16	河南省中医药研究院附属医院	1904164	陕西汉中	19050201	云南普洱	1903307	安徽亳州	19060518	安徽亳州

茯苓属真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 干燥菌核, 白术为菊科苍术属植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 干燥根茎, 白芍为毛茛科芍药属植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 干燥根, 生姜为姜科姜属植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 新鲜根茎。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-10 mmol 乙酸铵+0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0~15 min, 11%乙腈; 15~35 min, 11%~25%乙腈; 35~65 min, 25%~49%乙腈; 65~66 min, 49%~62%乙腈; 66~82 min, 62%~100%乙腈; 82~86 min, 100%~11%乙腈; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 °C; 增益 4; 载气体积流量 2.5 L/min, 漂移管温度 55 °C; 进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 取苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、猪苓酸 C、茯苓酸、白术内酯 II、白术内酯 III、羟基芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷、6-姜酚、6-姜烯酚对照品适量, 精密称定, 置于量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 制成质量浓度分别为 698.00、192.32、

360.00、156.83、53.74、99.53、398.00、182.02、1 934.00、6 268.00、674.00、760.18、99.39 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 按《伤寒论》(《方剂学》人卫出版社)真武汤的处方量, 精密称取附子(黑顺片)9 g、茯苓9 g、白术6 g、白芍9 g、生姜9 g, 置2 L圆底烧瓶中, 加20倍量水, 首次浸渍30 min, 回流提取2次, 每次30 min, 趁热100目过滤布滤过, 合并滤液, 浓缩至约40 mL, 放至室温, 加水定容至50 mL, 摇匀, 得真武汤样品。精密量取15 mL样品置于60 mL分液漏斗中, 用水饱和正丁醇振摇提取5次, 每次10 mL, 合并正丁醇液, 水浴蒸干, 加甲醇10 mL使溶解, 经0.22 μm微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得真武汤供试品溶液。

2.2.3 单味药供试品溶液 分别称取附子(黑顺片)9 g、茯苓9 g、白术6 g、白芍9 g、生姜9 g, 按“2.2.2”项下方法制备单味药供试品溶液。

2.2.4 阴性对照供试品溶液 分别称取复方中缺附子、茯苓、白术、白芍、生姜的其他4味药, 按“2.2.2”项下方法制备缺附子、缺茯苓、缺白术、缺白芍、缺生姜的阴性对照供试品溶液。

2.3 指纹图谱的建立

2.3.1 精密度试验 随机选取 S9 批真武汤供试品

溶液,按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次,以 25 号峰为参照峰,计算得到 38 个共有峰的相对保留时间 RSD 均 $<1.65\%$,相对峰面积 RSD 均 $<2.08\%$,表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验 随机选取 S9 批真武汤样品,按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,以 25 号峰为参照峰,计算得到 38 个共有峰的相对保留时间 RSD 均 $<2.31\%$,相对峰面积 RSD 均 $<2.86\%$,表明该方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 随机选取 S9 批真武汤供试品溶液放置 0、2、4、8、12、24 h,分别按“2.1”项下色谱条件测定,以 25 号峰为参照峰,计算得到 38 个共有峰的相对保留时间 RSD 均 $<2.11\%$,相对峰面积 RSD 均 $<2.47\%$,表明该供试品溶液在 24h 内稳定。

2.3.4 指纹图谱建立及相似度分析 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液(S1~S16),按“2.1”项下色谱条件进样检测,色谱图以 AIA 格式导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版),设定 S9 色谱图为参照图谱(中位数法),结合多点校正法对色谱峰进行自动匹配,生成真武汤 HPLC-

ELSD 对照指纹图谱(R),并进行相似度分析。结果其相似度均大于 0.95,标定了 38 个共有峰,其中 25 号色谱峰稳定、分离度较好、峰面积较大,故作为参照峰,计算得到各共有峰相对保留时间 RSD 均 $<0.57\%$,相对峰面积 RSD 为 28.36%~209.34%,结果见图 1 和表 2。

2.4 化学模式识别研究

2.4.1 聚类分析(CA) 利用 SPSS 21.0 软件,以 16 批真武汤样品指纹图谱中共有峰峰面积为变量,用组间联接法,平方 Euclidean 距离为度量标准,数值标准化(全距从 0 到 1)后进行聚类分析,结果见图 2。当分类距离为 10 时,不同批次的真武汤样品被分为 3 类,S8~S10 聚为一类,S11~S13 聚为一类,其余聚为一类。

2.4.2 主成分分析(PCA) 采用 SPSS 21.0 软件对 16 批真武汤样品中共有峰峰面积进行 PCA,选出前 4 个特征值大于 1 的成分累积方差贡献率为 84.56%,包含了色谱图的大部分信息,见表 3。依据初始因子荷载矩阵,38 个共有峰对 4 个主成分影响的得分图见图 3,以荷载的绝对值 >0.8 为对主成分贡献大^[25-26];结果显示共有峰 1~5、8、12~17、19、22~24、26 对主成分 1 贡献大,共有峰 9~11、

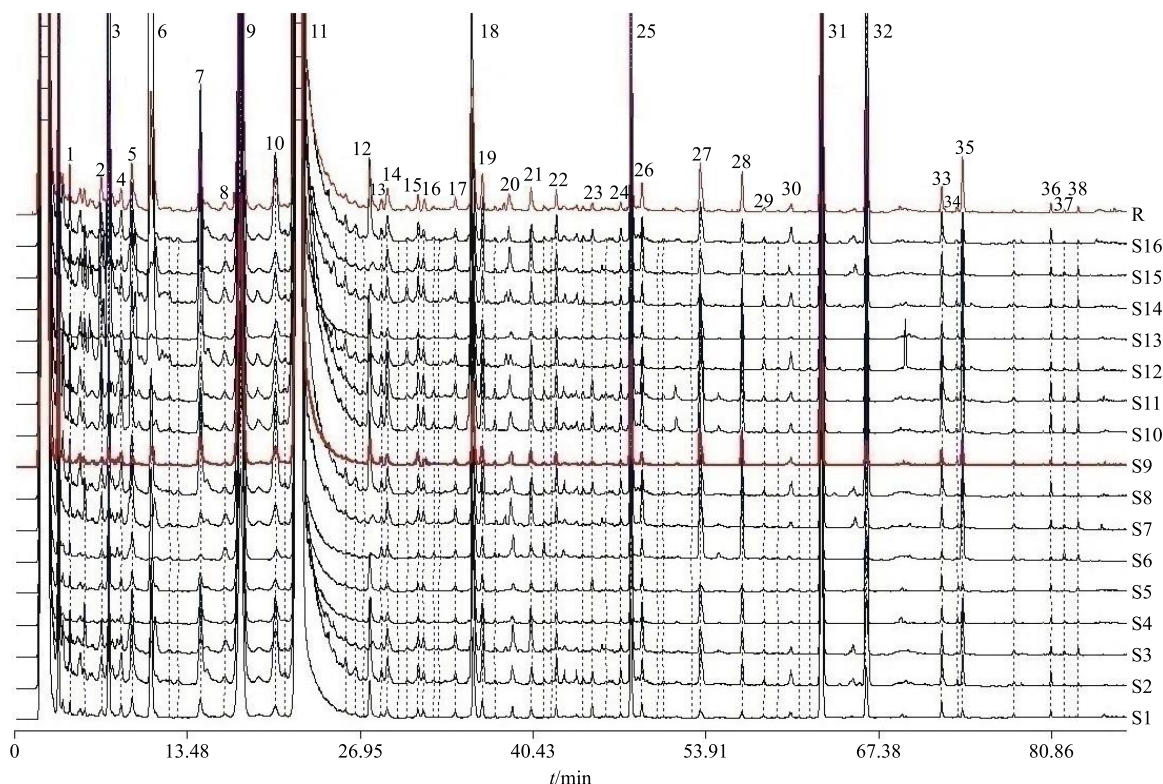


图 1 16 批真武汤 HPLC-ELSD 指纹图谱及其对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 HPLC chromatogram fingerprint of 16 batches of ZWD and its control fingerprint (R)

表 2 真武汤指纹图谱相似度结果

Table 2 HPLC chromatograms similarity evaluation results of 16 batches of ZWD

编号	相似度																
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	R
S1	1.000	0.925	0.926	0.937	0.936	0.948	0.938	0.939	0.919	0.925	0.934	0.938	0.914	0.955	0.953	0.917	0.959
S2	0.925	1.000	0.984	0.980	0.968	0.960	0.964	0.943	0.953	0.964	0.958	0.943	0.987	0.953	0.951	0.987	0.983
S3	0.926	0.984	1.000	0.961	0.959	0.952	0.969	0.931	0.940	0.957	0.946	0.939	0.967	0.943	0.947	0.964	0.974
S4	0.937	0.980	0.961	1.000	0.962	0.951	0.937	0.946	0.950	0.952	0.953	0.941	0.985	0.946	0.945	0.984	0.978
S5	0.936	0.968	0.959	0.962	1.000	0.966	0.949	0.966	0.976	0.979	0.961	0.953	0.962	0.959	0.960	0.959	0.986
S6	0.948	0.960	0.952	0.951	0.966	1.000	0.954	0.958	0.966	0.976	0.969	0.967	0.958	0.960	0.953	0.949	0.984
S7	0.938	0.964	0.969	0.937	0.949	0.954	1.000	0.939	0.935	0.948	0.941	0.931	0.937	0.942	0.940	0.935	0.967
S8	0.939	0.943	0.931	0.946	0.966	0.958	0.939	1.000	0.956	0.954	0.948	0.949	0.938	0.945	0.943	0.935	0.972
S9	0.919	0.953	0.940	0.950	0.976	0.966	0.935	0.956	1.000	0.977	0.980	0.969	0.958	0.948	0.950	0.948	0.981
S10	0.925	0.964	0.957	0.952	0.979	0.976	0.948	0.954	0.977	1.000	0.975	0.970	0.967	0.960	0.955	0.960	0.986
S11	0.934	0.958	0.946	0.953	0.961	0.969	0.941	0.948	0.980	0.975	1.000	0.980	0.964	0.967	0.967	0.958	0.985
S12	0.938	0.943	0.939	0.941	0.953	0.967	0.931	0.949	0.969	0.970	0.980	1.000	0.952	0.957	0.959	0.941	0.978
S13	0.914	0.987	0.967	0.985	0.962	0.958	0.937	0.938	0.958	0.967	0.964	0.952	1.000	0.946	0.945	0.988	0.981
S14	0.955	0.953	0.943	0.946	0.959	0.960	0.942	0.945	0.948	0.960	0.967	0.957	0.946	1.000	0.981	0.958	0.979
S15	0.953	0.951	0.947	0.945	0.960	0.953	0.940	0.943	0.950	0.955	0.967	0.959	0.945	0.981	1.000	0.950	0.978
S16	0.917	0.987	0.964	0.984	0.959	0.949	0.935	0.935	0.948	0.960	0.958	0.941	0.988	0.958	0.950	1.000	0.978
R	0.959	0.983	0.974	0.978	0.986	0.984	0.967	0.972	0.981	0.986	0.985	0.978	0.981	0.979	0.978	0.978	1.000

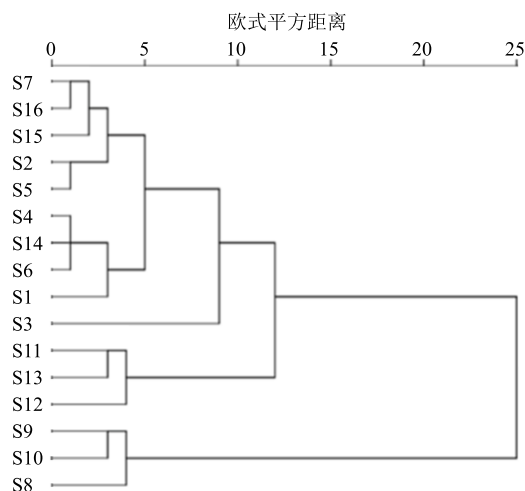


图 2 聚类分析结果图

Fig. 2 Dendrogram of cluster analysis

20~21、25、32、36、38 对主成分 2 贡献大，共有峰 34 对主成分 3 贡献大，共有峰 28 对主成分 4 贡献大。真武汤 PCA 得分图见图 4，16 批次的真武汤样品被分为 3 类，与聚类分析结果基本一致。

2.4.3 正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 用 SIMCA 14.1 软件对 16 批真武汤样品进行判别分析，根据 CA 和 PCA 得到的结果，用 OPLS-DA 进行建模分析，得分图见图 5，明显看出分为 3 类，与 CA、

表 3 4 个主成分因子的特征值和方差贡献率

Table 3 Eigenvalue and variance contribution rate of four main component factors

成分	特征值	方差的贡献率/%	累积的方差贡献率/%
1	8.137	42.824	42.824
2	4.983	26.234	69.058
3	1.554	8.181	77.239
4	1.392	7.325	84.563

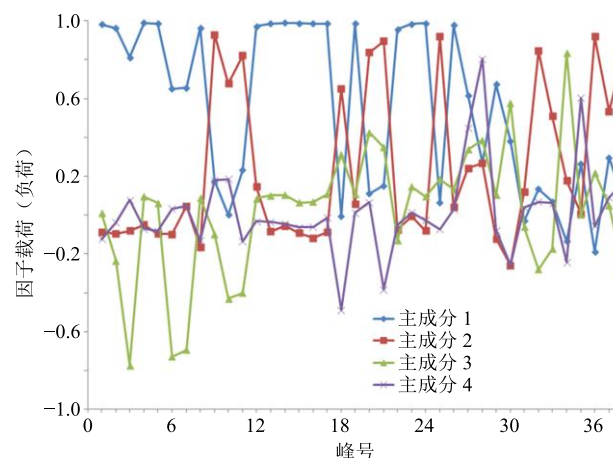


图 3 4 个主成分得分图

Fig. 3 Coordinate diagram of four principal components

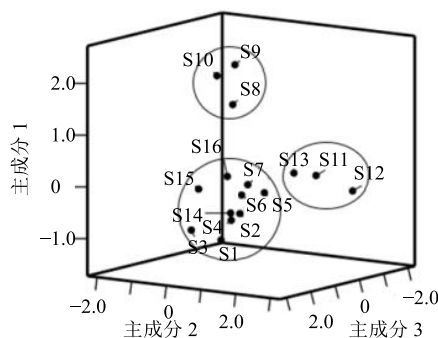


图 4 真武汤的 PCA 图

Fig. 4 PCA plots of 16 batches of ZWD

PCA 基本一致。所建立模型的 R_x^2 和 R_y^2 分别为 0.846 和 0.864, Q^2 为 0.819, 故本实验所建立的模型稳定性和预测能力达到要求 (R^2 和 Q^2 大于 0.5 代表模型有较好稳定性和预测能力), 可用于真武汤的

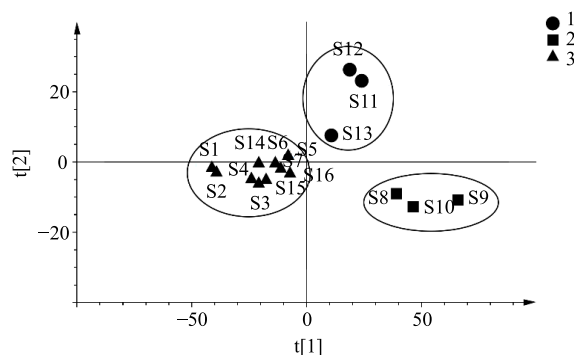


图 5 OPLS-DA 得分图

Fig. 5 OPLS-DA score plots

质量控制。以 $VIP > 1$ 为标准, 确定以 $VIP > 1$ 为标准, 确定 6、3、7、11、9、36、25、32、2、21、38、20、10、22、18、34 号色谱峰可能是导致不同批次样品之间产生差异的主要标志物, 结果见图 6。

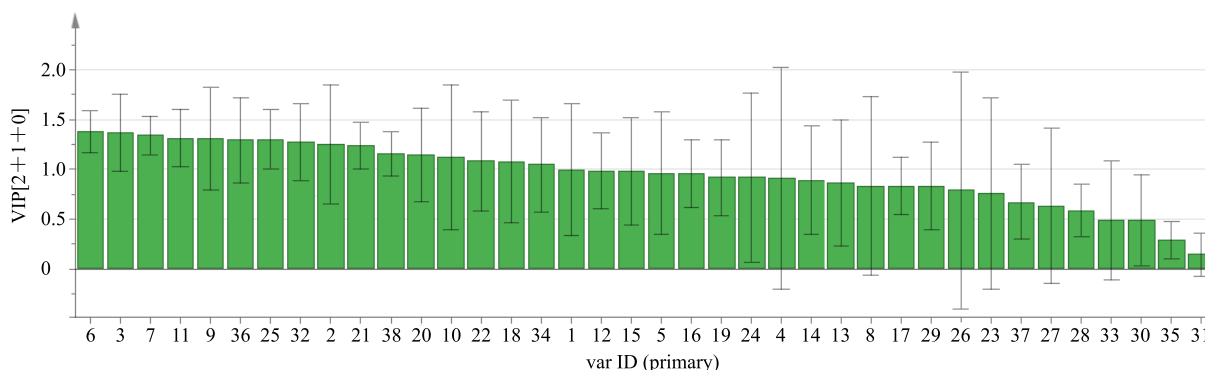


图 6 16 批真武汤样品中各活性成分的 VIP 值图

Fig. 6 VIP values of different ingredients in 16 batches of ZWD

2.5 真武汤含量测定

采用与对照品比对的方法, 指认了 OPLS-DA VIP 值 > 1 的 11 个成分, 即羟基芍药苷 (3 号峰)、芍药内酯苷 (9 号峰)、芍药苷 (11 号峰)、苯甲酰新乌头原碱 (18 号峰)、苯甲酰乌头原碱 (20 号峰)、苯甲酰次乌头原碱 (21 号峰)、苯甲酰芍药苷 (25 号峰)、白术内酯 III (32 号峰)、白术内酯 II (34 号峰)、猪苓酸 C (36 号峰)、茯苓酸 (38 号峰)。根据前期实验和文献报道^[19,23-24], 6-姜酚、6-姜烯酚为生姜的主要化学成分, 因实验选用的是同一批生姜, 其成分 VIP 值较低。故将以上 13 个成分作为真武汤指标性成分, 建立其含量测定方法, 见图 7。

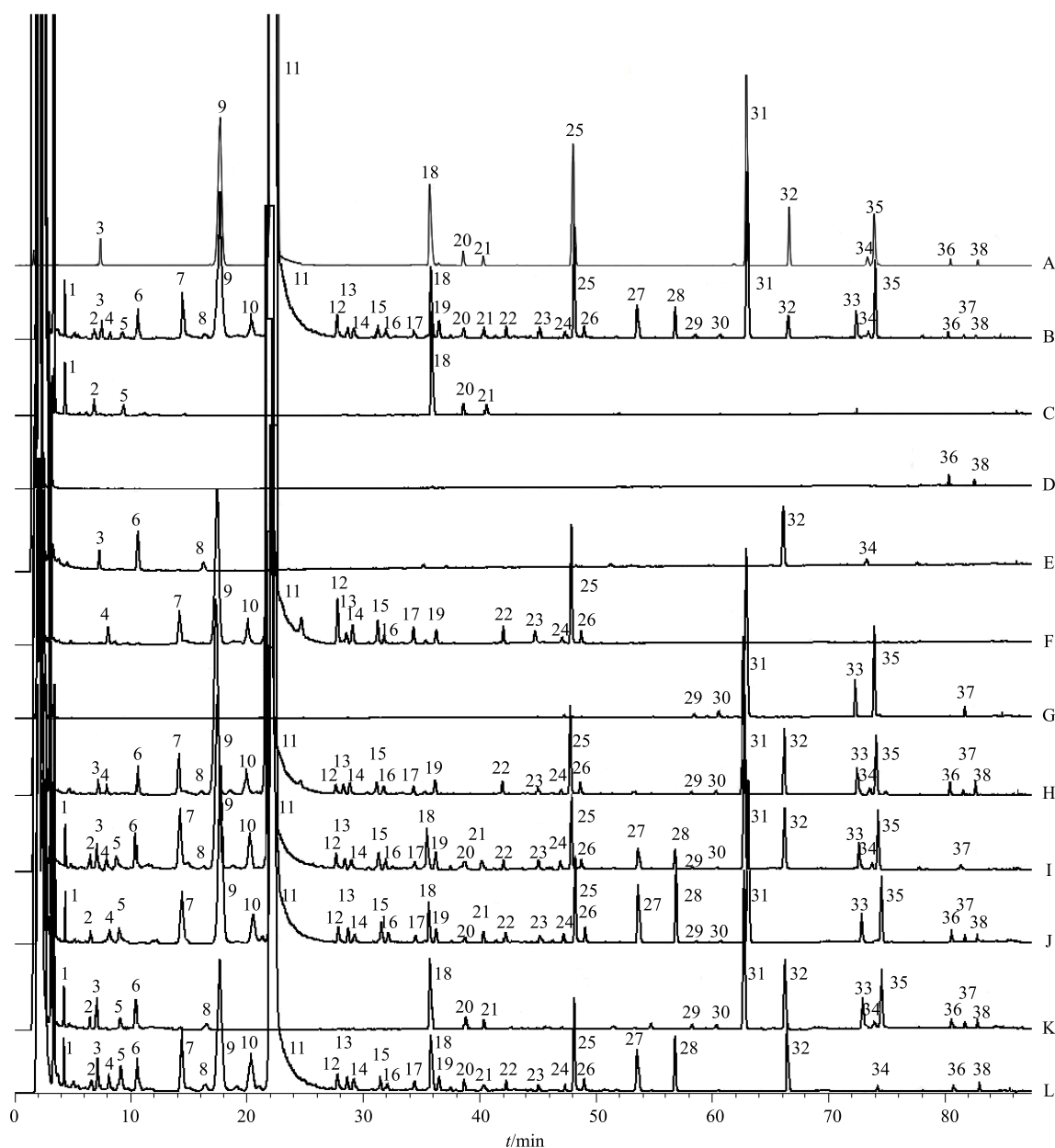
2.5.1 专属性试验 精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液、单味药溶液和阴性对照溶液各 10 μL , 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 结果各成分均能达到基线分离, 且阴性样品对测定无干扰, 各样品色谱图见图 7。

2.5.2 线性关系考察 精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mL, 分别置于 2 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 混匀, 按“2.1”项下色谱条件进样测定。以对照品质量浓度的自然对数为横坐标 (X), 以峰面积的自然对数为纵坐标 (Y), 分别绘制标准曲线, 得回归方程, 结果见表 4。

2.5.3 精密度试验 取“2.2.2”项下供试品溶液 (S9) 适量, 按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积, 计算其 RSD 值。结果见表 5, 表明仪器精密度良好。

2.5.4 稳定性试验 取“2.2.2”项下供试品溶液 (S9) 适量, 分别于室温下放置 0、2、4、8、12、24 h, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果见表 5, 表明供试品溶液于室温下放置 24 h 内稳定性良好。

2.5.5 重复性试验 取样品 (S9) 适量, 按“2.2.2”



A-混合对照品 B-真武汤样品 C-附子(黑顺片) D-茯苓 E-白术 F-白芍 G-生姜 H-缺附子 I-缺茯苓 J-缺白术 K-缺白芍 L-缺生姜
3-羟苍芍药苷 9-芍药内酯苷 11-芍药苷 18-苯甲酰新乌头原碱 20-苯甲酰乌头原碱 21-苯甲酰次乌头原碱 25-苯甲酰芍药苷 31-6-姜酚 32-白术内酯III 34-白术内酯II 35-6-姜烯酚 36-猪苓酸 C 38-茯苓酸

A-reference substance B-sample of ZWD C-Aconiti Lateralis Radix Praeparata D-Poria E-Atractylodis Macrocephalae Rhizoma F-Paeoniae Radix Alba G-Zingiberis Rhizoma Recens H-negative sample without Aconiti Lateralis Radix Praeparata I-negative sample without Poria J-negative sample without Atractylodis Macrocephalae Rhizoma K-negative sample without Paeoniae Radix Alba L-negative sample without Zingiberis Rhizoma Recens
3-oxypaeoniflorin 9-albiflorin 11-paeoniflorin 18-benzoylmesaconine 20-benzoylaconitine 21-benzoylhypaconitine 25-benzoylpaeoniflorin 31-6-gingerol 32-atractylenolide III 34-atractylenolide II 35-6-shogaol 36-polyporenic acid C 38-pachymic acid

图 7 混合对照品、真武汤样品、单味药、阴性对照供试品溶液的 HPLC-ELSD 色谱图

Fig. 7 HPLC-ELSD of reference substance, sample of ZWD, single herb and negative control solution

项下方法平行制备供试品溶液 6 份,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按标准曲线计算样品中 13 个成分的含量。结果见表 5,表明本方法重复性良好。

2.5.6 加样回收率试验 精密吸取已知含量的样品

(S9) 7.5 mL 置 60 mL 分液漏斗中,共 6 份,分别精密加入 7.5 mL 水摇匀,再分别精密加入 10 mL 混合对照品水饱和正丁醇溶液(苯甲酰新乌头原碱 280.27 $\mu\text{g/mL}$ 、苯甲酰乌头原碱 62.74 $\mu\text{g/mL}$ 、苯甲酰次乌头原碱 160.54 $\mu\text{g/mL}$ 、猪苓酸 C 48.78 $\mu\text{g/mL}$ 、

表 4 线性回归方程和相关系数

Table 4 Linear regression equation and correlation coefficient

待测成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	定量限/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	检测限/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
苯甲酰新乌头原碱	$Y=1.11 X+5.98$	0.999 6	34.90~698.00	1.74	0.58
苯甲酰乌头原碱	$Y=1.52 X+5.31$	0.999 5	9.62~192.32	1.20	0.36
苯甲酰次乌头原碱	$Y=1.14 X+4.57$	0.999 2	18.00~360.00	1.50	0.40
猪苓酸 C	$Y=1.83 X+6.50$	0.999 5	7.84~156.83	0.65	0.18
茯苓酸	$Y=1.68 X+6.66$	0.999 2	2.69~53.74	0.54	0.16
白术内酯 II	$Y=1.27 X+6.19$	0.999 4	4.98~99.53	0.33	0.12
白术内酯 III	$Y=1.74 X+5.61$	0.999 7	19.90~398.00	0.98	0.25
羟基芍药苷	$Y=2.62 X+6.10$	0.999 5	9.10~182.02	1.14	0.35
芍药内酯苷	$Y=1.81 X+5.60$	0.999 9	96.70~1 934.00	1.61	0.46
芍药苷	$Y=1.06 X+6.16$	0.999 7	313.40~6 268.00	2.03	0.54
苯甲酰芍药苷	$Y=1.65 X+5.95$	0.999 3	33.70~674.00	1.32	0.40
6-姜酚	$Y=2.95 X+6.56$	0.999 9	38.01~760.18	0.50	0.15
6-姜烯酚	$Y=2.00 X+5.17$	0.999 6	4.97~99.39	0.95	0.27

表 5 含量测定精密度、稳定性、重复性、加样回收率试验结果

Table 5 Results of precision, stability, repeatability and recovery of determination

待测成分	精密度	稳定性	重复性		加样回收率	
	RSD/%	RSD/%	RSD/%	平均质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	平均值/%	RSD/%
苯甲酰新乌头原碱	1.25	1.23	1.30	445.49	99.77	0.73
苯甲酰乌头原碱	1.32	1.43	2.04	97.80	98.19	2.01
苯甲酰次乌头原碱	0.53	0.90	0.99	254.94	98.87	1.18
猪苓酸 C	1.42	1.33	1.59	77.82	97.40	1.46
茯苓酸	1.92	1.91	1.83	36.58	96.83	3.15
白术内酯 II	1.02	2.03	1.69	42.69	96.46	2.24
白术内酯 III	0.36	0.49	0.92	257.02	99.80	0.66
羟基芍药苷	0.80	1.38	1.93	62.72	97.67	1.62
芍药内酯苷	0.22	0.62	0.65	1 241.35	99.66	0.26
芍药苷	0.09	0.14	0.19	4 693.10	99.73	0.29
苯甲酰芍药苷	0.33	0.47	0.47	467.41	99.46	0.51
6-姜酚	0.34	0.33	1.47	454.32	99.57	0.40
6-姜烯酚	1.11	1.47	1.23	60.43	98.12	1.68

茯苓酸 23.31 $\mu\text{g/mL}$ 、白术内酯 II 26.51 $\mu\text{g/mL}$ 、白术内酯 III 161.77 $\mu\text{g/mL}$ 、羟基芍药苷 40.04 $\mu\text{g/mL}$ 、芍药内酯苷 783.15 $\mu\text{g/mL}$ 、芍药苷 2 958.24 $\mu\text{g/mL}$ 、苯甲酰芍药苷 294.50 $\mu\text{g/mL}$ 、6-姜酚 286.11 $\mu\text{g/mL}$ 、6-姜烯酚 38.28 $\mu\text{g/mL}$ ，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，再按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积并计算加样回收率，结果见表 5。

2.5.7 样品含量测定 按“2.2.2”项下方法制备 16 批真武汤供试品溶液，再按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积并用外标法对数方程计算 16

批真武汤供试品中 13 个成分的含量，结果见表 6。

3 讨论

蒸发光散射检测器为质量型检测器，适用于紫外末端吸收成分的定性定量分析。真武汤君药附子水溶性生物碱（胺醇型生物碱）和佐药茯苓三萜类成分（茯苓酸）无紫外吸收基团^[20-22]，对 ELSD 专属性较强。虽然采用 HPLC-ELSD 法测定白术内酯类、白芍苷类、单胺类生物碱和姜辣素等成分含量的文献报道较少，本实验方法学验证结果显示 ELSD 检测器可满足真武汤定性定量研究的要求。

表 6 16 批真武汤含量测定结果
Table 6 Determination results of 16 batches of ZWD

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)													
	苯甲酰新 乌头原碱	苯甲酰乌 头原碱	苯甲酰次 乌头原碱	猪苓酸 C	茯苓酸	白术内酯 II	白术内酯 III	羟基芍 药苷	芍药内 酯苷	芍药苷	苯甲酰 芍药苷	6-姜酚	6-姜烯酚	
S1	322.24	45.86	74.64	35.26	9.76	33.93	94.18	19.37	506.00	3 322.48	175.27	539.50	68.52	
S2	290.63	62.42	99.23	31.24	16.75	39.19	76.55	17.48	456.58	3 401.44	207.38	525.85	74.73	
S3	576.86	25.05	80.79	46.75	11.77	46.81	142.05	30.71	786.71	3 707.68	183.27	582.92	69.93	
S4	383.38	35.43	62.96	33.65	14.68	40.95	163.48	21.30	983.21	3 429.81	221.68	563.60	71.11	
S5	358.10	50.14	133.65	74.65	15.12	47.70	228.23	24.25	910.04	4 000.85	187.18	530.36	72.40	
S6	333.24	87.40	92.19	73.71	19.86	44.32	206.37	40.63	991.51	3 717.13	178.21	567.39	70.36	
S7	299.49	58.12	151.74	67.05	22.80	32.15	188.15	24.19	1 001.70	3 804.81	199.38	540.94	71.67	
S8	414.79	105.49	232.90	98.17	40.15	57.50	263.93	48.67	1 554.14	4 783.21	403.58	548.51	68.90	
S9	529.58	118.58	303.37	92.18	44.04	50.08	305.68	75.64	1 479.88	5 590.01	556.50	540.63	72.32	
S10	473.57	147.39	277.93	131.27	38.89	38.27	283.93	88.27	1 307.55	5 056.23	506.43	576.25	72.62	
S11	283.93	59.87	76.62	91.25	22.71	69.44	202.98	125.67	1 100.26	4 995.29	194.18	546.18	68.81	
S12	320.74	31.60	68.20	53.20	10.87	46.05	333.13	146.61	1 083.69	4 780.37	158.21	564.11	74.29	
S13	396.36	76.61	159.24	56.37	17.48	63.42	240.65	129.44	1 031.76	4 409.67	248.82	546.55	71.36	
S14	414.38	59.06	132.75	60.67	12.94	83.55	197.50	21.40	564.81	3 838.39	188.51	561.36	69.81	
S15	457.30	87.20	168.69	101.74	15.23	41.58	127.46	22.80	534.39	3 982.88	171.01	557.89	73.14	
S16	392.62	102.54	190.35	66.57	18.46	58.98	181.62	27.39	715.37	4 121.31	222.55	543.89	71.67	

本实验采取液液萃取法对真武汤样品进行处理,考察了不同萃取溶剂(氯仿、醋酸乙酯、正丁醇),结果显示,水饱和正丁醇极性适中,既能萃取出药液中的有效成分,又能减少杂质,使图谱基线平稳。真武汤中部分成分极性较低,乙腈比甲醇洗脱力强,故选择乙腈为有机相,对比乙腈与 0.1%甲酸溶液、5 mmol/L 乙酸铵水溶液、10 mmol/L 乙酸铵+0.1%甲酸水溶液之间的组合,最终选择乙腈与 10 mmol 乙酸铵+0.1%甲酸水溶液组合作为流动相;考察了色谱柱(Waters Symmetry C₁₈、Agela Venusil ASB C₁₈、Thermo Hypersil GOLD C₁₈)、柱温(30、35、40 ℃),最终确定“2.1”项下色谱条件最为合适。通过耐用性试验,结果显示当柱温为 30~40 ℃,甲酸溶液体积分数为 0.07%~0.13%,乙酸铵为 8~12 mmol/L,体积流量为 0.8~1.2 mL/min 时,样品含量的 RSD<3%,能满足含量测定实验的要求。

本实验建立真武汤 HPLC-ELSD 指纹图谱,确定了 38 个共有峰,色谱峰 1、2、5、18、20、21 属于附子(黑顺片),色谱峰 36、38 属于茯苓,色谱峰 3、6、8、32、34 属于白术,色谱峰 4、7、9、10~17、19、22~28 属于白芍,色谱峰 29~31、33、

35、37 属于生姜,结果表明各单味药材与复方样品之间存在较好的相关性;色谱峰 27、28 在缺附子、缺白芍阴性对照色谱图中未检出,但在其余阴性对照色谱图中可检出,故推测这 2 个色谱峰可能为白芍和附子在煎煮过程中相互作用的生成物,有待进一步研究。

16 批真武汤指纹图谱的相似度均大于 0.95,表明其整体化学成分组相对稳定。为更好的辨识真武汤样品之间的质量,本实验用化学模式识别法对共有峰峰面积进行分析,PCA、CA、OPLS-DA 结果基本一致,将 16 批样品分为 3 类。指认了真武汤样品间含量差异的 11 个指标成分(OPLS-DA VIP 值>1),分别为单胺类生物碱(苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱)、茯苓三萜(猪苓酸 C、茯苓酸)、白术内酯(白术内酯 II、白术内酯 III)、白芍苷(羟基芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷),是附子、茯苓、白术、白芍的主要活性成分^[17,19];因本实验选用的是同一批生姜,其成分 VIP 值较低,故上述分析结果指认的指标成分未包含生姜中所含化学成分,因 6-姜酚、6-姜烯酚为生姜的主要活性成分且在 HPLC 含量测定中稳定可重现^[19,23-24],故将二者也作为真武汤的指

标性成分。

随着人们用药安全意识的提高,加强中药复方质量控制显得极为重要^[27]。指纹图谱与多成分含量测定相结合,以多个活性成分为指标建立质量控制标准,严格把控成分复杂的中药复方在制备过程中的质量,能保证临床用药安全有效^[15-16]。本实验通过建立真武汤 HPLC-ELSD 指纹图谱,用化学模式识别法对其进行分析和筛选出真武汤的标志性成分,进而对真武汤进行质量控制,不仅为真武汤及其制剂质量标准的制定提供实验依据,也为中药复方质量控制指标的选择提供一种思路和方法。

参考文献

- [1] 张仲景. 伤寒论 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.
- [2] Liu B H, He Y, Lu R R, *et al.* Zhen-wu-tang protects against podocyte injury in rats with IgA nephropathy via PPAR γ /NF- κ B pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 101:635-647.
- [3] Liang C L, Wu J B, Lai J M, *et al.* Protection effect of Zhen-Wu-Tang on adriamycin-induced nephrotic syndrome via inhibiting oxidative lesions and inflammation damage [J]. *Evid-Based Compl Alt*, 2014, 131604: 1-11.
- [4] Liu B H, Lu R R, Li H L, *et al.* Zhen-wu-tang ameliorates membranous nephropathy rats through inhibiting NF- κ B pathway and NLRP3 inflammasome [J]. *Phytomedicine*, 2019, 59(152913): 1-12.
- [5] 吴剑纯, 林宗粤, 吴漪彤, 等. 真武汤对脾肾阳虚型 TPOAb 阳性甲状腺功能减退症疗效及对细胞因子、血脂水平的影响 [J]. 世界中西医结合杂志, 2020, 15(3): 478-483.
- [6] 洪莉丽, 张盛, 汪倩, 等. 基于 RAAS/NF- κ B/炎症因子级联反应探究真武汤对慢性心力衰竭大鼠治疗作用 [J]. 中草药, 2020, 51(3): 1279-1285.
- [7] Liang C L, Zhang P C, Wu J B, *et al.* Zhen-wu-tang attenuates adriamycin-induced nephropathy via regulating AQP2 and miR-92b [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 1296-1305.
- [8] 王健, 李芳, 周晓露, 等. 加味真武汤辨治慢性心力衰竭阳气亏虚证心肌纤维化的临床观察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(11): 173-178.
- [9] 张丹芳. 真武汤加味治疗慢性阻塞性肺疾病脾肾阳虚证 31 例 [J]. 河南中医, 2015, 35(12): 2904-2905.
- [10] 郭庆祺, 李丹凤. 真武汤合六君子汤加减治疗脾肾阳虚型慢性结肠炎的临床价值 [J]. 中医临床研究, 2018, 10(11): 48-49.
- [11] 翠达康, 胡玉英. 从肾论治帕金森病的中医药研究进展 [J]. 湖南中医杂志, 2018, 34(9): 189-191.
- [12] 滕玉霞, 于思明. 真武汤对肾病综合征模型大鼠 HMGB1/Beclin-1 信号通路影响及机制研究 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2020, 21(5): 388-391.
- [13] 毛妍, 梁慧慧, 朱俊平. 真武汤的方证解析与现代研究概况 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(1): 217-225.
- [14] 展浩, 言方荣, 陆涛. 中药指纹图谱数据分析方法研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2017, 45(16): 203-205.
- [15] 成颜芬, 江华娟, 王琳, 等. 经典名方桃红四物汤化学指纹图谱及 9 种成分含量测定研究 [J]. 中草药, 2020, 51(3): 653-660.
- [16] 王彦帅, 丁浩强, 郑鑫杰, 等. 经典名方泻白散物质基准 HPLC 指纹图谱的建立及 3 种指标成分含量测定 [J]. 中草药, 2020, 51(11): 2946-2953.
- [17] 吴俊标, 贺雨, 梁春玲, 等. 真武汤水提液 HPLC 特征图谱研究及指标成分的测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(18): 45-49.
- [18] 罗国安, 付婵, 李莎莎, 等. 真武汤的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(5): 892-895.
- [19] 田萍, 马开, 张薇, 等. HPLC 法同时测定真武汤中 11 种活性成分的含量 [J]. 中国药房, 2019, 30(18): 2491-2496.
- [20] 咎俊峰, 徐斌, 刘军锋, 等. 20 个产地茯苓三萜成分 RP-HPLC-ELSD 指纹图谱 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(21): 65-68.
- [21] 罗春梅, 易凡力, 黄志芳, 等. HPLC-ELSD 法测定附子水溶性生物碱提取物和蒸附片中 5 种生物碱的含量 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38(6): 935-941.
- [22] 罗春梅, 夏燕莉, 黄志芳, 等. 附子水溶性生物碱含量测定与道地性相关分析 [J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31: 1704-1711.
- [23] 马开, 田萍, 张迪文, 等. 生姜 HPLC-DAD 指纹图谱的优化研究 [J]. 时珍国医国药, 2017(9): 2051-2054.
- [24] 杨淑. 生姜、干姜、炮姜姜辣素部位温中作用及组织分布与归经的相关性研究 [D]. 郑州: 河南中医药大学, 2018.
- [25] 袁海建, 李卫, 祝一飞, 等. 枳实薤白桂枝汤 HPLC 指纹图谱及 10 种指标成分含量测定研究 [J]. 中草药, 2020, 51(10): 2448-2459.
- [26] 邱俊娜, 张榆, 张双, 等. 基于 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别及定量测定的夏枯草质量控制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(10): 2842-2850.
- [27] 杨玉莹, 张丹丹, 罗心遥, 等. 指纹图谱及多成分定量结合化学模式识别法评价不同产地青钱柳质量 [J]. 中草药, 2020, 51(4): 1082-1088.