

杜仲补天素丸的HPLC指纹图谱建立、化学模式识别分析及含量测定^Δ

刘敏^{1*}, 曹国琼¹, 张仕林², 葛秋平², 刘娅², 张永萍^{1#} (1. 贵州中医药大学药学院, 贵阳 550025; 2. 贵阳德昌祥药业有限公司, 贵阳 550002)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)08-0961-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.08.11

摘要 目的: 建立杜仲补天素丸的指纹图谱并进行化学模式识别分析, 测定杜仲补天素丸中7个成分的含量, 为该制剂的质量控制提供参考。方法: 采用高效液相色谱法(HPLC), 以Pentulips BP-C₁₈ Plus为色谱柱, 以0.2%磷酸水溶液-乙腈为流动相进行梯度洗脱, 流速为1.0 mL/min, 检测波长为330 nm, 柱温为35 ℃, 进样量为20 μL。以丹皮酚为参照, 使用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012版)》建立12批杜仲补天素丸(S1~S12)的指纹图谱, 确定共有峰并进行相似度评价, 通过与对照品比对进行色谱峰指认。采用SPSS 21.0软件和SIMCA 13.0软件进行聚类分析和主成分分析, 对22个共有峰进行评价。采用上述HPLC法测定12批样品中指认成分的含量。结果: 从12批杜仲补天素丸的HPLC指纹图谱中标定共有峰22个, 相似度均不低于0.960; 共指认化学成分7个, 分别为没食子酸(峰1)、绿原酸(峰3)、甘草苷(峰6)、金丝桃苷(峰7)、毛蕊花糖苷(峰8)、淫羊藿苷(峰14)和丹皮酚(峰15)。12批样品中, S1、S3~S5、S7、S9、S11聚为一类, S2、S10、S12聚为一类, S6聚为一类, S8聚为一类; 22个共有峰被分为3个主成分, 主成分1的特征值(15.130)和方差贡献率(68.775%)最大, 其中峰3(0.305)和峰4(0.298)对应成分的得分系数最高。12批样品中, 上述7个成分的含量分别为18.196 2~31.951 3、0.000 6~0.049 4、0.234 8~0.415 9、0.039 5~0.079 1、0.053 5~0.249 3、0.000 5~0.000 8、0.646 4~1.146 9 mg/g。结论: 成功建立了杜仲补天素丸的HPLC指纹图谱。12批样品被聚类分成4类, 峰3(绿原酸)和峰4(未知)可能是造成样品差异的重要因素。7个成分中没食子酸的含量最高。

关键词 杜仲补天素丸; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 化学模式识别; 含量测定

Establishment of HPLC Fingerprint, Chemical Pattern Recognition Analysis and Content Determination of Duzhong Butiansu Pill

LIU Min¹, CAO Guoqiong¹, ZHANG Shilin², GE Qiuping², LIU Ya², ZHANG Yongping¹ (1. School of Pharmacy, Guizhou University of TCM, Guiyang 550025, China; 2. Guiyang Dechangxiang Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550002, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To establish fingerprint of Duzhong butiansu pills, analyze its chemical pattern recognition, and determine the contents of 7 components in Duzhong butiansu pills, so as to provide reference for the quality control of the preparation. **METHODS:** HPLC method was adopted. The determination was performed on Pentulips BP-C₁₈ Plus column with 0.2% phosphoric acid water-acetonitrile as mobile phase (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 330 nm, and column temperature was 35 ℃. The sample size was 20 μL. With paeonol as the reference, the HPLC fingerprints of 12 batches of Duzhong butiansu pills (S1-S12) were established with *Similarity Evaluation System for TCM Chromatographic Fingerprint* (2012 edition); common peaks were determined and the similarity was evaluated. The chromatographic peaks were identified by comparing with the reference substance. SPSS 21.0 and SIMCA 13.0 software were used for cluster analysis and principal component analysis, and 22 common peaks were evaluated. The contents of the identified components in 12 batches of samples was determined by the above HPLC method. **RESULTS:** A total of 22 common peaks were identified in the HPLC fingerprint of 12 batches of Duzhong butiansu pills, and the similarity was no less than 0.960. There were 7 chemical components identified, which were gallic acid (peak 1), chlorogenic acid (peak 3), liquiritoside (peak 6), hyperoside (peak 7), verbascoside (peak 8), icariin (peak 14) and paeonol (peak 15). Among the 12 batches of samples, S1, S3-S5, S7, S9 and S11 were classified as one category, S2, S10 and S12 were clustered into one category, S6 was one category and S8 was one category. The 22 common peaks were divided into three principal components. The characteristic value (15.130) and contribution rate (68.775%) of principal component 1 were the largest, and the score coefficients of peak 3 (0.305) and peak 4 (0.298) were the highest. Among 12 batches of samples, the contents of above 7 components were 18.196 2-

^Δ 基金项目: 贵州省科技计划项目(No.黔科合支撑[2020]4Y091号); 贵州省高层次创新型人才“百层次人才”项目(No.黔科合人才[2015]4030号); 贵州省科技平台及人才团队计划项目(No.黔科合平台人才[2017]5655)

* 硕士研究生。研究方向: 中药、民族药新制剂及新剂型。E-mail: 13984149659@163.com

通信作者: 教授, 博士生导师, 硕士。研究方向: 中药新制剂及新剂型。E-mail: 642055255@qq.com

31.951 3,0.000 6-0.049 4,0.234 8-0.415 9,0.039 5-0.079 1,0.053 5-0.249 3,0.000 5-0.000 8,0.646 4-1.146 9 mg/g, respectively.

CONCLUSIONS: HPLC fingerprint of Duzhong butiansu pills is established successfully. Twelve batches of samples are clustered into 4 category. Peak 3 (chlorogenic acid) and peak 4 (unknown) may be the important factors causing the difference of samples. The content of gallic acid is the highest among the 7 components.

KEYWORDS Duzhong butiansu pills; HPLC; Fingerprint; Chemical pattern recognition; Content determination

杜仲补天素系列制剂是由盐杜仲、制菟丝子、肉苁蓉、淫羊藿、牡丹皮等25味中药组成,具有温肾养心、壮腰安神的功效,临床主要用于治疗腰脊酸软、夜多小便、神经衰弱等症^[1]。杜仲补天素系列制剂是中药复方制剂,含多味中药且化学成分复杂,对其进行有效的质量控制是保证其临床疗效的重要基础。目前,关于杜仲补天素丸的质量控制报道主要是对芍药苷的定量分析和对部分组方药材的定性鉴别^[2-3],其药效成分尚不明确,同时缺乏有关杜仲补天素丸更为综合、全面的质量控制研究。

随着中药指纹图谱技术的发展和广泛应用,指纹图谱及多成分检测能提供丰富的指标成分或药效成分信息,可较全面地反映药材和制剂的质量,近年来已被广泛用于中药材和中成药的质量控制^[4-5]。杜仲补天素丸含25味中药,山茱萸中没食子酸具有抗氧化、抗炎以及保护心脑血管的药理作用,其同时也是地榆、拳参等中药的主要有效成分;菟丝子所含金丝桃苷能增强机体免疫功能,改善神经衰弱;肉苁蓉中主要有效成分毛蕊花糖苷具有增强免疫调节功能、保护神经系统以及补肾壮阳的作用;淫羊藿苷是淫羊藿中的黄酮类成分,也是抗骨质疏松的重要药效物质;牡丹皮的代表性成分丹皮酚具有镇静催眠、保护神经及抗炎镇痛的作用;绿原酸广泛存在于多种中药(杜仲、金银花等)中,具有抗菌、抗病毒、保肝利胆、抗肿瘤、降血压、降血脂和兴奋中枢神经系统等作用;甘草中甘草苷能有效抑制酪氨酸酶的活性,同时具有抗氧化能力和亚硝酸盐清除能力,具有保护神经和心脏的作用^[6-16]。结合杜仲补天素丸的主治病证,本研究以上述7个成分作为该制剂的有效成分,采用高效液相色谱法(HPLC)建立12批杜仲补天素丸的指纹图谱,通过与对照品对比指认这7个主要成分,采用聚类分析和主成分分析法对12批样品进行化学模式识别,并测定上述7个成分的含量,以期为该复方制剂的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括e2695-2998型HPLC仪(配备Alliance 2695型自动进样器、2998型二极管阵列检测器、Alliance 2695型四元低压混合泵,美国Waters公司)、FA1004型电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司)、AUW120D型电子天平(日本Shimadzu公司)、SK8210LHC型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司)、H2050R型台式高速大容量冷冻离心机(湖南湘

仪实验室仪器开发有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

12批杜仲补天素丸(批号11019001、11019002、11019003、11019004、11019005、11019006、11019007、11019008、11019009、11019010、11019011、11019012,编号S1~S12,规格每瓶100粒、净质量22g)均由贵阳德昌祥药业有限公司提供;没食子酸(批号6TGX-H4L9,纯度89.9%)、绿原酸(批号99U4-EAPK,纯度96.8%)、甘草苷(批号V2F6-HP3F,纯度93.7%)、金丝桃苷(批号VKT6-RALP,纯度93.3%)、毛蕊花糖苷(批号TTJY-MHVL,纯度95.2%)、淫羊藿苷(批号XYGW-CSC4,纯度94.2%)、丹皮酚(批号M7FR-KD3F,纯度99.8%)对照品均购自中国食品药品检定研究院;乙腈(色谱纯)购自国药集团化学试剂有限公司;甲醇(色谱纯)和磷酸(优级纯)均购自天津市科密欧化学试剂有限公司;其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 混合对照品溶液的制备

精密称取没食子酸、绿原酸、甘草苷、金丝桃苷、毛蕊花糖苷、淫羊藿苷、丹皮酚对照品各适量,用甲醇溶解、稀释,制得质量浓度分别为1.856、0.271、0.515、0.456、0.448、0.002、1.390 mg/mL的单一对照品溶液。精密吸取上述单一对照品溶液各适量,加甲醇定容于同一10 mL量瓶中,制得上述7个成分质量浓度分别为0.95、0.01、0.07、0.02、0.04、 0.17×10^{-3} 、0.10 mg/mL的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

取杜仲补天素丸适量,粉碎,精密称定4g,加入甲醇25 mL溶解,称定质量,超声(功率500 W,频率53 kHz)提取60 min,冷却后再次称定质量,用甲醇补足缺失的质量,以12 000 r/min离心15 min,取上清液,用0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.3 色谱条件

以Pentulips BP-C₁₈ Plus(250 mm×4.6 mm, 5 μm)为色谱柱,以0.2%磷酸水溶液(A)-乙腈(B)为流动相进行洗脱梯度(0~30 min, 5% B→17% B; 30~33 min, 17% B; 33~43 min, 17% B→21% B; 43~53 min, 21% B; 53~65 min, 21% B→28% B; 65~75 min, 28% B; 75~77 min, 28% B→31% B; 77~98 min, 31% B→42% B; 98~138 min, 42% B→79% B),平衡时间为12 min,流速为1.0 mL/min,检测波长为330 nm,柱温为35 ℃,进样量为20 μL。

2.4 指纹图谱方法学考察

2.4.1 精密度试验 精密称取杜仲补天素丸(编号S6) 4 g,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3”项下色谱条件连续进样测定6次。以15号峰丹皮酚为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,22个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD分别为0.03%~1.77%($n=6$)和0.16%~2.93%($n=6$)。

2.4.2 重复性试验 精密称取杜仲补天素丸(编号S6)6份,每份4 g,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3”项下色谱条件进样测定。以15号峰丹皮酚为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,22个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD分别为0.01%~0.19%($n=6$)和0.25%~2.75%($n=6$)。

2.4.3 稳定性试验 精密称取杜仲补天素丸(编号S6) 4 g,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,分别于室温下放置0、4、8、12、16、20、24 h时按“2.3”项下色谱条件进样测定。以15号峰丹皮酚为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,22个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD分别为0.03%~2.79%($n=7$)和0.48%~2.93%($n=7$)。

2.5 指纹图谱建立与相似度评价

2.5.1 指纹图谱建立与共有峰指认 分别取12批杜仲补天素丸样品,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。将所得12批样品的色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》进行分析,以S6(分离度最好)为参照图谱,采用中位数生成法,设置时间窗宽度为0.3 min,对色谱峰进行多点校正和全峰匹配,得到HPLC叠加指纹图谱和对照指纹图谱(R),详见图1。结果,保留时间稳定的共有峰有22个,通过与混合对照品色谱图(以“2.3”项下色谱条件分析所得,见图2)比对,指认峰1为没食子酸、峰3为绿原酸、峰6为甘草苷、峰7为金丝桃苷、峰8为毛蕊花糖苷、峰14为淫羊藿苷、峰15为丹皮酚。因峰15分离度好、峰面积较为稳定且保留时间适宜,因此确定丹皮酚为参照峰,计算22个共有峰的相对保留时间及相对峰面积,结果见表1、表2。

2.5.2 相似度评价 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》对12批杜仲补天素丸样品进行相似度分析。结果,S1~S12批样品与对照指纹图谱的相似度分别为0.976、0.998、0.998、0.998、0.999、0.960、0.998、0.995、0.998、0.980、0.998、0.997,均不低于0.960,表明这12批样品之间的化学成分基本一致,与对照指纹图谱有很高的相似度。

2.6 化学模式识别

2.6.1 聚类分析 使用SPSS 21.0软件,运用组间对比法对12批样品的共有峰峰面积数据进行聚类分析,以平方Euclidean距离计算样品相似程度。结果,12批样品可聚为4类,其中S1、S3~S5、S7、S9、S11为一类,S2、

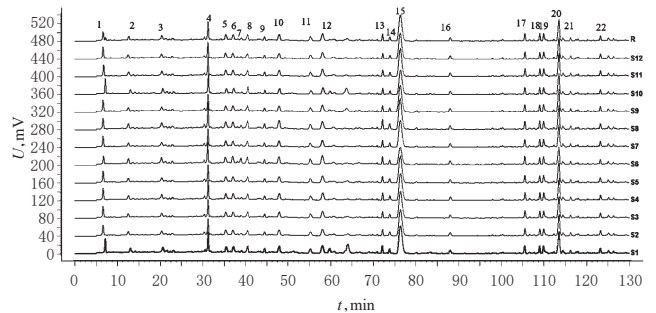
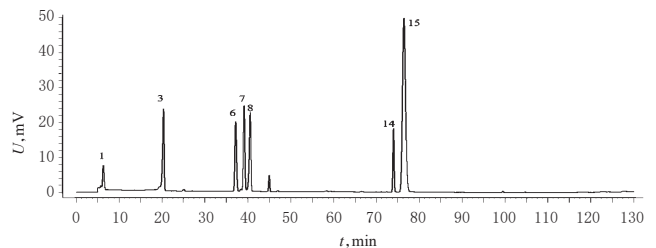


图1 12批杜仲补天素丸样品的HPLC叠加指纹图谱和对照指纹图谱

Fig 1 HPLC superimposed fingerprints and control fingerprints of 12 batches of Duzhong butiansu pills



注:1.没食子酸;3.绿原酸;6.甘草苷;7.金丝桃苷;8.毛蕊花糖苷;14.淫羊藿苷;15.丹皮酚

Note: 1. gallic acid; 3. chlorogenic acid; 6. licorice glycoside; 7. hyperoside; 8. verbascoside; 14. icariin; 15. paeonol

图2 混合对照品溶液的高效液相色谱图

表1 12批杜仲补天素丸样品HPLC指纹图谱共有峰的相对保留时间

Tab 1 Relative retention time of common peaks in HPLC fingerprints of 12 batches of Duzhong butiansu pills

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
1	0.093 5	0.087 1	0.087 3	0.086 2	0.088 6	0.087 5	0.086 1	0.086 0	0.086 0	0.091 7	0.089 1	0.086 0
2	0.170 9	0.164 1	0.164 1	0.164 4	0.164 3	0.164 7	0.164 4	0.164 4	0.164 4	0.170 3	0.165 5	0.163 9
3	0.269 9	0.265 9	0.265 9	0.266 1	0.266 1	0.265 5	0.266 2	0.266 2	0.266 2	0.269 7	0.266 7	0.265 6
4	0.409 2	0.408 4	0.408 5	0.408 5	0.407 3	0.408 4	0.408 6	0.408 6	0.409 1	0.408 5	0.408 5	0.408 2
5	0.464 7	0.462 7	0.462 8	0.462 9	0.463 0	0.462 0	0.462 9	0.463 0	0.462 9	0.464 9	0.463 0	0.462 4
6	0.486 7	0.485 3	0.485 5	0.485 5	0.485 6	0.484 8	0.485 3	0.485 6	0.485 5	0.487 3	0.485 6	0.485 2
7	0.511 0	0.509 2	0.510 4	0.510 4	0.510 4	0.510 0	0.510 1	0.510 5	0.510 5	0.511 8	0.510 5	0.510 1
8	0.530 5	0.530 2	0.530 3	0.530 3	0.530 3	0.529 7	0.529 8	0.530 4	0.530 3	0.530 8	0.530 4	0.530 0
9	0.582 1	0.581 9	0.581 9	0.582 0	0.582 0	0.581 7	0.581 7	0.582 1	0.582 1	0.582 9	0.582 2	0.582 0
10	0.627 7	0.627 4	0.627 5	0.627 6	0.627 5	0.627 2	0.627 3	0.627 8	0.627 6	0.628 7	0.628 0	0.627 8
11	0.722 8	0.723 0	0.723 0	0.723 4	0.723 2	0.722 9	0.722 8	0.723 2	0.723 1	0.724 4	0.723 4	0.723 5
12	0.759 7	0.759 8	0.759 8	0.760 2	0.760 0	0.759 9	0.759 8	0.760 0	0.759 9	0.761 2	0.760 3	0.760 3
13	0.944 0	0.944 7	0.944 6	0.944 7	0.944 7	0.945 1	0.945 0	0.945 2	0.945 2	0.944 9	0.945 9	0.946 0
14	0.966 2	0.967 0	0.967 0	0.967 0	0.966 9	0.967 4	0.967 3	0.967 5	0.967 4	0.967 3	0.968 2	0.968 4
15	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0
16	1.152 4	1.153 0	1.153 2	1.153 0	1.153 2	1.153 7	1.153 5	1.153 5	1.153 4	1.152 8	1.153 7	1.153 8
17	1.381 8	1.382 6	1.382 4	1.382 3	1.382 5	1.383 0	1.382 8	1.383 2	1.382 8	1.381 6	1.383 4	1.383 4
18	1.427 8	1.428 7	1.428 5	1.428 3	1.428 6	1.429 2	1.428 9	1.429 4	1.429 0	1.427 7	1.429 5	1.429 5
19	1.439 8	1.440 7	1.440 4	1.440 3	1.440 6	1.441 1	1.440 9	1.441 4	1.441 0	1.439 6	1.441 5	1.441 5
20	1.487 2	1.488 2	1.487 6	1.487 6	1.487 9	1.488 4	1.488 2	1.488 7	1.488 3	1.486 8	1.488 7	1.488 7
21	1.522 7	1.523 7	1.523 1	1.523 1	1.523 5	1.524 2	1.523 9	1.524 6	1.524 0	1.522 5	1.524 4	1.524 6
22	1.614 6	1.615 7	1.615 1	1.615 0	1.615 2	1.616 1	1.615 8	1.616 6	1.616 1	1.614 3	1.616 4	1.616 5

S10、S12为一类，S6为一类，S8为一类，其聚类分析树状图见图3。

表2 12批杜仲补天素丸样品HPLC指纹图谱共有峰的相对峰面积

Tab 2 Relative peak area of common peaks in HPLC fingerprints of 12 batches of Duzhong butiansu pills

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
1	0.158 3	0.142 7	0.151 7	0.151 1	0.152 7	0.159 3	0.142 0	0.126 7	0.152 7	0.175 5	0.141 6	0.161 9
2	0.077 4	0.062 4	0.063 8	0.068 5	0.064 2	0.160 0	0.063 0	0.078 9	0.064 2	0.076 2	0.067 6	0.064 9
3	0.088 4	0.073 2	0.077 0	0.083 3	0.077 0	0.177 3	0.077 7	0.111 4	0.078 8	0.101 8	0.082 1	0.080 5
4	0.218 5	0.194 2	0.206 3	0.221 3	0.207 8	0.412 1	0.206 5	0.259 1	0.200 1	0.260 9	0.205 4	0.194 5
5	0.101 3	0.102 7	0.114 9	0.116 8	0.109 5	0.233 4	0.111 3	0.121 3	0.110 7	0.115 2	0.114 5	0.112 7
6	0.115 7	0.103 0	0.121 6	0.117 8	0.112 7	0.254 9	0.111 8	0.124 0	0.115 0	0.121 7	0.116 1	0.112 8
7	0.028 4	0.022 6	0.033 6	0.028 1	0.024 4	0.159 1	0.024 8	0.049 5	0.024 7	0.027 8	0.027 7	0.024 9
8	0.107 7	0.084 6	0.103 9	0.096 4	0.088 8	0.197 5	0.091 5	0.133 9	0.090 9	0.109 5	0.093 9	0.087 3
9	0.053 9	0.046 7	0.049 9	0.051 9	0.048 5	0.092 5	0.050 1	0.059 8	0.048 3	0.050 5	0.049 3	0.046 7
10	0.136 1	0.121 0	0.126 3	0.137 6	0.122 7	0.259 2	0.127 8	0.160 5	0.122 8	0.124 8	0.125 2	0.116 9
11	0.091 8	0.081 7	0.085 6	0.090 7	0.084 0	0.175 4	0.084 8	0.090 7	0.084 2	0.086 9	0.084 5	0.082 3
12	0.196 4	0.166 5	0.173 9	0.184 2	0.186 9	0.365 6	0.171 7	0.171 3	0.185 3	0.189 9	0.174 2	0.173 0
13	0.094 6	0.078 0	0.080 5	0.086 0	0.079 3	0.154 7	0.080 8	0.104 7	0.079 2	0.083 6	0.077 9	0.071 8
14	0.059 1	0.056 5	0.058 9	0.061 8	0.057 9	0.100 1	0.059 0	0.070 0	0.056 1	0.055 6	0.057 0	0.054 3
15	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0
16	0.059 1	0.058 1	0.058 9	0.063 4	0.058 7	0.119 2	0.058 5	0.058 3	0.060 8	0.060 3	0.061 5	0.059 4
17	0.106 5	0.104 8	0.107 1	0.109 2	0.107 1	0.183 2	0.107 9	0.100 5	0.106 5	0.109 9	0.106 1	0.108 1
18	0.089 2	0.087 6	0.090 8	0.091 9	0.090 2	0.141 1	0.092 1	0.090 1	0.087 9	0.087 6	0.087 0	0.087 2
19	0.094 1	0.095 6	0.096 5	0.097 8	0.097 8	0.202 3	0.098 2	0.092 5	0.097 1	0.099 9	0.097 9	0.101 0
20	0.420 5	0.438 5	0.436 3	0.431 0	0.435 6	0.549 0	0.433 8	0.401 2	0.439 2	0.449 8	0.441 4	0.451 9
21	0.037 1	0.037 4	0.037 6	0.037 6	0.036 9	0.058 6	0.037 6	0.034 2	0.037 0	0.037 5	0.036 8	0.038 0
22	0.069 5	0.069 3	0.070 1	0.070 0	0.070 2	0.101 2	0.070 4	0.065 8	0.070 3	0.069 3	0.068 6	0.070 2

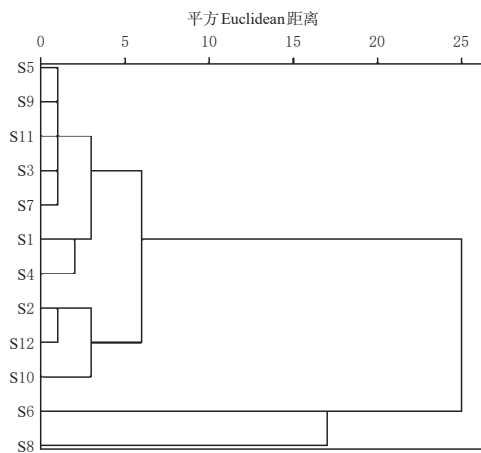


图3 12批杜仲补天素丸样品的聚类分析树状图

Fig 3 Cluster analysis dendrogram of 12 batches of Duzhong butiansu pills

2.6.2 主成分分析 使用SPSS 21.0软件和SIMCA 13.0软件对12批样品的共有峰峰面积数据进行主成分分析。结果,22个共有峰被分成3个主成分,主成分1~3的特征值分别为15.130、4.944、1.122,方差贡献率分别为68.775%、22.472%、5.099%,累计方差贡献率为96.346%,表明其能够概括样品数据的绝大部分信息,主成分1的特征值最大,所涵盖信息最多。主成分1主要反映了峰2~4、8~11、13~14的信息,主成分2主要反

映了峰5~7、12、16、19的信息,主成分3主要反映了峰1、15、17~18、20~22的信息。主成分1中得分系数较大的共有峰有峰1~4、8~9、13,其中最大的为峰3,其次为峰4,说明峰3(绿原酸)和峰4(未知)可能是影响样品差异的重要因素,详见表3。12批杜仲补天素丸物质基准样品被分为4类,S1、S3~S5、S7、S9、S11为一类,S2、S10、S12为一类,S6为一类,S8为一类,与聚类分析结果一致,详见图4。

表3 12批杜仲补天素丸中22个成分的得分系数矩阵
Tab 3 Score coefficient matrix of 22 components in 12 batches of Duzhong butiansu pills

峰号	主成分1	主成分2	主成分3
1	0.148	-0.220	-0.062
2	0.141	0.004	-0.093
3	0.305	-0.132	-0.207
4	0.298	-0.140	-0.189
5	0.025	0.073	0.013
6	0.037	0.074	-0.005
7	0.030	0.104	-0.04
8	0.252	-0.123	-0.131
9	0.123	-0.055	0.004
10	0.090	-0.016	0.017
11	-0.003	0.075	0.062
12	-0.034	0.111	0.056
13	0.152	-0.079	-0.019
14	0.076	-0.052	0.064
15	0.066	-0.184	0.081
16	-0.094	0.152	0.113
17	-0.123	0.121	0.196
18	-0.069	0.012	0.208
19	-0.102	0.180	0.085
20	-0.003	-0.142	0.139
21	-0.215	0.108	0.324
22	-0.117	-0.014	0.268

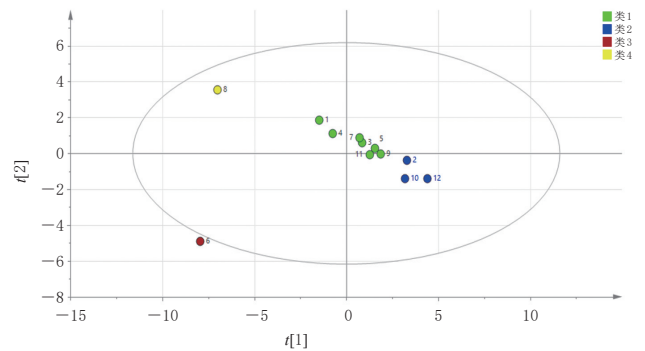


图4 12批杜仲补天素丸的主成分得分图

Fig 4 Principal component score chart of 12 batches of Duzhong butiansu pills

2.7 杜仲补天素丸中7个成分的含量测定

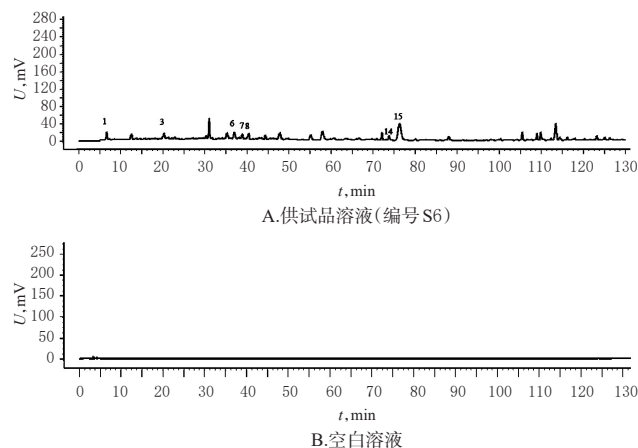
2.7.1 对照品溶液的制备 同“2.1”项。

2.7.2 供试品溶液的制备 同“2.2”项。

2.7.3 色谱条件 同“2.3”项。

2.7.4 专属性试验 取混合对照品溶液、供试品溶液(编号S6)和空白溶液(甲醇),按“2.7.3”项下色谱条件进

样测定,记录色谱图。结果,供试品溶液在与混合对照品溶液峰相同的位置均出峰,空白溶液对测定无干扰,详见图2、图5。



注:1.没食子酸;3.绿原酸;6.甘草苷;7.金丝桃苷;8.毛蕊花糖苷;14.淫羊藿苷;15.丹皮酚

Note: 1. gallic acid; 3. chlorogenic acid; 6. liquiritoside; 7. hyperoside; 8. verbascoside; 14. icariin; 15. paeonol

图5 杜仲补天素丸中7个成分的专属性试验色谱图
Fig 5 Specific experimental chromatograms of 7 components in Duzhong butiansu pills

2.7.5 线性关系考察 取“2.7.1”项下混合对照品溶液,按“2.7.3”项下色谱条件依次进样10、15、20、25、30 μL ,记录峰面积。以待测成分的质量($x, \mu\text{g}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标,进行回归分析。结果,7个成分在相应质量范围内线性关系良好(r 均大于0.999),详见表4。

表4 杜仲补天素丸中7个成分的线性关系考察结果
Tab 4 Linear relation investigation results of 7 components in Duzhong butiansu pills

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg
没食子酸	$y=4\ 527.3x+59\ 906$	0.999 2	9.500~28.500
绿原酸	$y=1\ 000\ 000x+246\ 372$	0.999 5	0.136~0.407
甘草苷	$y=348\ 423x+53\ 898$	0.999 0	0.721~2.163
金丝桃苷	$y=2\ 000\ 000x-183\ 254$	0.999 1	0.228~0.684
毛蕊花糖苷	$y=372\ 799x+189\ 054$	0.999 1	0.448~1.344
淫羊藿苷	$y=100\ 000\ 000x-4\ 599$	0.999 9	0.002~0.051
丹皮酚	$y=1\ 000\ 000x-37\ 480$	0.999 8	0.973~2.919

2.7.6 精密度试验 精密称取杜仲补天素丸(编号S6)4 g,按“2.7.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.7.3”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果,没食子酸、绿原酸、甘草苷、金丝桃苷、毛蕊花糖苷、淫羊藿苷、丹皮酚峰面积的RSD分别为2.84%、2.85%、0.40%、2.58%、2.67%、2.70%、1.60% ($n=6$),表明方法精密度良好。

2.7.7 重复性试验 精密称取杜仲补天素丸(编号S6)6份,每份4 g,按“2.7.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.7.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,代入回归方程计算含量。结果,没食子酸、绿原酸、甘草苷、金丝

桃苷、毛蕊花糖苷、淫羊藿苷、丹皮酚含量的RSD分别为2.40%、2.20%、1.77%、0.80%、2.17%、1.27%、0.39% ($n=6$),表明方法重复性良好。

2.7.8 稳定性试验 精密称取杜仲补天素丸(编号S6)4 g,按“2.7.2”项下方法制备供试品溶液,分别于室温放置0、4、8、12、16、20、24 h时按“2.7.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,没食子酸、绿原酸、甘草苷、金丝桃苷、毛蕊花糖苷、淫羊藿苷、丹皮酚峰面积的RSD分别为2.86%、2.97%、2.65%、2.65%、2.48%、2.75%、0.77% ($n=7$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.7.9 加样回收率试验 精密称取杜仲补天素丸(编号S6)4 g,按“2.7.2”项下方法制备供试品溶液6份,分别加入与样品中待测成分含量相当的单一对照品溶液,再按“2.7.3”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,没食子酸、绿原酸、甘草苷、金丝桃苷、毛蕊花糖苷、淫羊藿苷、丹皮酚的平均加样回收率分别为96.97%、102.28%、98.58%、104.43%、104.59%、100.71%、100.47%,RSD分别为2.86%、2.98%、1.89%、1.21%、2.87%、1.29%、0.37% ($n=6$)。

2.7.10 含量测定 取12批杜仲补天素丸各4 g,按“2.7.2”项下方法制备供试品溶液,再用甲醇稀释至线性范围内,按“2.7.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,代入回归方程计算含量。每样品重复测定3次,取平均值,结果见表5。

表5 12批杜仲补天素丸中7个成分含量的测定结果 ($n=3, \text{mg/g}$)

Tab 5 Results of content determination of 7 components in 12 batches of Duzhong butiansu pills ($n=3, \text{mg/g}$)

批次	没食子酸	绿原酸	甘草苷	金丝桃苷	毛蕊花糖苷	淫羊藿苷	丹皮酚
S1	31.951 3	0.014 3	0.294 5	0.043 3	0.139 7	0.000 6	1.043 9
S2	26.057 3	0.005 6	0.234 8	0.039 5	0.058 7	0.000 6	0.969 4
S3	28.907 2	0.011 4	0.295 9	0.045 2	0.116 5	0.000 6	0.998 1
S4	29.344 2	0.006 6	0.290 8	0.042 7	0.100 9	0.000 6	1.015 0
S5	28.963 0	0.011 1	0.269 2	0.040 6	0.075 4	0.000 6	0.993 2
S6	18.196 2	0.035 5	0.415 9	0.079 1	0.177 7	0.000 6	0.646 4
S7	27.202 6	0.000 6	0.272 1	0.041 0	0.086 8	0.000 6	1.010 6
S8	27.644 0	0.049 4	0.355 6	0.056 7	0.249 3	0.000 8	1.146 9
S9	28.680 4	0.012 2	0.272 8	0.040 6	0.078 8	0.000 6	0.984 4
S10	30.171 3	0.013 1	0.260 8	0.040 9	0.101 6	0.000 5	0.896 7
S11	26.592 6	0.003 6	0.279 1	0.042 2	0.088 9	0.000 6	0.994 0
S12	28.211 6	0.008 3	0.244 6	0.039 9	0.053 5	0.000 5	0.916 5

3 讨论

3.1 提取方法的考察

本课题组前期分别考察了以70%甲醇、甲醇和水为提取溶剂对杜仲补天素丸有效成分提取率的影响,结果,各提取溶剂的有效成分提取率由高到低为甲醇>70%甲醇>水,故选择甲醇作为提取溶剂,且提取液易于滤过。此外,本课题组还对超声时间(20、40、60 min)

进行了考察,结果显示,超声 60 min 的有效成分提取率最高,故选择 60 min 作为超声时间。

3.2 色谱条件的考察

通过查阅文献[17-21],找出杜仲补天素丸中各味中药所含主要成分的检测波长,在此基础上考察了检测波长分别为 210、230、237、240、277、320、330、360 nm 时各色谱峰的出峰情况。结果,在 330 nm 波长下各峰的峰形较好且响应较强。本课题组前期分别考察了以 0.1% 磷酸水溶液-乙腈和 0.2% 磷酸水溶液-乙腈为流动相对各色谱峰分离效果的影响,结果显示,当以 0.2% 磷酸水溶液-乙腈作为流动相时,各色谱峰之间的分离度较好,故选择 0.2% 磷酸水溶液-乙腈作为流动相。

3.3 化学模式识别结果分析

本研究对 12 批杜仲补天素丸进行聚类分析,结果可分为 4 类, S1、S3~S5、S7、S9、S11 为一类, S2、S10、S12 为一类, S6 为一类, S8 为一类。主成分分析结果表明,共有峰峰 1~4、8~9、13 可能在杜仲补天素丸的质量控制中起着较重要的作用,其中峰 3(绿原酸)和峰 4(未知)是造成样品差异的重要因素。同时,主成分得分图分类信息与聚类分析树状图分类信息均显示将 12 批杜仲补天素丸分为 4 类,结果一致。

3.4 含量测定结果分析

本研究结果显示,没食子酸等 7 个有效成分为不同批次杜仲补天素丸的共有成分,但各批次样品中上述有效成分的含量存在较大差异。因此,建议将这 7 个有效成分含量纳入杜仲补天素丸的质量标准,以提高其整体质量。

综上所述,本研究成功建立了杜仲补天素丸的 HPLC 指纹图谱。12 批样品被聚类分成 4 类,峰 3(绿原酸)和峰 4(未知)可能是造成样品差异的重要因素。7 个成分中没食子酸的含量最高。

参考文献

[1] 赵罗娜,刘明,张永萍,等.杜仲补天素片对雄性动物促生育作用的研究[J].中草药,2017,48(16):3419-3424.

[2] 李惠珍,罗君,周兰,等.RP-HPLC法测定杜仲补天素片中芍药苷的含量[J].中国民族民间医药,2011,20(7):45-46.

[3] 李云静,何忠梅.HPLC法同时测定杜仲补天素片中6种成分的含量[J].中国药房,2017,28(3):401-404.

[4] 胡婷,邹成梅,江吉周.苦丁茶主物质提取及其HPLC指纹图谱分析[J].华中师范大学学报(自然科学版),2021,55(1):61-71.

[5] 牛晓静,鲁静,孙广科,等.淫羊藿总黄酮提取物的HPLC指纹图谱建立及其中8种成分的含量测定[J].中国药房,

2018,29(24):3376-3380.

[6] 高雅,李骅,王四旺,等.没食子酸的药理作用及其药物代谢动力学研究进展[J].西北药学杂志,2014,29(4):435-438.

[7] 张嘉嘉,黄晓萱,马驰,等.HPLC法同时测定赤芍中五种化学成分的含量[J].江西中医药,2020,51(10):63-65.

[8] 林萍,易宏伟,张斐.金丝桃苷药理作用研究进展[J].中国现代中药,2012,14(10):23-26.

[9] 耿淼,王建华,陈红艳,等.金丝桃苷对鸭乙型肝炎病毒cccDNA清除及免疫调节作用探讨[J].药科学报,2009,44(12):1440-1444.

[10] 唐永富.车前子毛蕊花苷类对树突状细胞表型和功能的影响[D].南昌:南昌大学,2007.

[11] HE J, HU X P, ZENG Y, et al. Advanced research on acteoside for chemistry and bioactivities[J]. J Asian Nat Prod Res, 2011, 13(5):449-464.

[12] 马晶晶,赵帆,孙云.类叶升麻苷对肾虚小鼠补肾壮阳作用的研究[J].扬州大学学报(农业与生命科学版),2009,30(1):22-25.

[13] 蒋俊,崔莉,孙娥,等.基于淫羊藿黄酮类化合物的体内代谢阐述其抗骨质疏松药效物质基础[J].中草药,2014,45(5):721-729.

[14] 耿帅,赵育林,曾凯,等.丹皮酚的研究进展[J].中国新药与临床杂志,2016,35(5):310-313.

[15] 董怡.光果甘草叶黄酮的分离纯化、活性研究及应用[D].广州:华南理工大学,2016.

[16] 苏国林,刘刚,刘育辰,等.甘草苷的提取纯化方法和药理作用研究进展[J].中国现代中药,2011,13(10):48-51.

[17] 刘美,张娟,肖炯昌,等.HPLC测定女贞子中特女贞苷的含量及指纹图谱的建立[J].中国现代中药,2019,21(12):1647-1652.

[18] 杨国宁,毕天琛,全桂平,等.HPLC法同时测定肉苁蓉饮片中8种成分的含量[J].中国药师,2020,23(7):1442-1445.

[19] 王文君,向灿辉,霍靖,等.杜仲皮和叶中黄酮的含量与抗氧化活性比较[J].遵义医学院学报,2012,35(6):469-472.

[20] 潘亚磊.杜仲有效组分预防废用性骨质疏松作用及机制研究[D].西安:西北工业大学,2014.

[21] 于文娜,张振凌,张颖,等.地黄炮制过程中异毛蕊花糖苷含量的动态变化[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(18):22-26.

(收稿日期:2021-01-25 修回日期:2021-03-02)

(编辑:邹丽娟)