

补肾宁神膏的指纹图谱建立、含量测定及体外抗氧化作用的谱效关系研究^Δ

王 丽^{1,2*}, 徐文华³, 杨 洋⁴, 辛灵怡⁴, 张蓁怡^{1,2}, 杨光义^{1,2#}(1. 广州中医药大学深圳中西医结合临床医学院, 广东深圳 518104; 2. 深圳市中西医结合医院药剂科, 广东深圳 518104; 3. 深圳市中西医结合医院治未病科, 广东深圳 518104; 4. 深圳市宝安纯中医治疗医院中药临床药学重点实验室, 广东深圳 518104)

中图分类号 R284.1;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)14-1749-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.14.10



摘要 目的 建立补肾宁神膏的指纹图谱,测定其指标成分的含量,并考察其体外抗氧化活性。方法 建立10批补肾宁神膏的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并进行相似度评价和共有峰指认;同法测定其中红景天苷等10个成分的含量;以2,2'-联氨-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氢盐(ABTS)和1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除率以及铁离子还原能力(FRAP)为指标考察其抗氧化活性,采用SIMCA 14.1软件进行灰色关联度分析和偏最小二乘回归分析以建立谱效关系。结果 10批补肾宁神膏共有24个共有峰,相似度均大于0.96;指认了11个共有峰,分别为腺苷(峰1)、红景天苷(峰4)、莫诺苷(峰6)、儿茶素(峰7)、芍药苷(峰10)、斯皮诺素(峰11)、阿魏酸(峰12)、异槲皮苷(峰13)、毛蕊花糖苷(峰14)、丹皮酚(峰23)及大黄素(峰24)。含量测定结果显示,红景天苷、莫诺苷、儿茶素、芍药苷、斯皮诺素、阿魏酸、异槲皮苷、毛蕊花糖苷、丹皮酚及大黄素的平均含量分别为0.725、1.962、0.214、3.395、0.124、0.107、0.286、0.019、0.034、0.067 mg/g。10批补肾宁神膏的平均综合指数为85.08%~96.35%。谱效关系分析结果显示,24个共有峰与其抗氧化能力均呈正相关,其中17个共有峰的变量重要性投影值>1,分别为峰2、5~7、9、10、13~21、23、24。结论 本研究成功建立了补肾宁神膏的HPLC指纹图谱及含量测定方法;莫诺苷等17个共有峰代表的化合物可能是其发挥抗氧化作用的药效成分。

关键词 补肾宁神膏;指纹图谱;谱效关系;抗氧化活性;含量测定

Study on fingerprint establishment, content determination, and spectrum-effect relationship of *in vitro* antioxidant activity for Bushen ningshen ointment

WANG Li^{1,2}, XU Wenhua³, YANG Yang⁴, XIN Lingyi⁴, ZHANG Zhenyi^{1,2}, YANG Guangyi^{1,2} (1. Shenzhen Clinical College of Integrated Chinese and Western Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangdong Shenzhen 518104, China; 2. Dept. of Pharmacy, Shenzhen Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Guangdong Shenzhen 518104, China; 3. Dept. of Preventive Treatment of Disease, Shenzhen Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Guangdong Shenzhen 518104, China; 4. Key Laboratory of TCM Clinical Pharmacy, Shenzhen Bao'an Authentic TCM Therapy Hospital, Guangdong Shenzhen 518104, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To establish the fingerprint of Bushen ningshen ointment, determine the contents of its major constituents, and investigate its *in vitro* antioxidant activity. **METHODS** High performance liquid chromatography (HPLC) fingerprints of 10 batches of Bushen ningshen ointment were established. Similarity evaluation and identification of common peaks were subsequently performed. The contents of 10 components such as salidroside were determined using the same HPLC method. Using the scavenging rates against 2, 2'-azino bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) and 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radicals, as well as ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) as indicators, the anti-oxidant activity of the ointment was evaluated; grey relational analysis and partial least squares regression were conducted using SIMCA 14.1 software to establish the spectrum-effect relationship. **RESULTS** The fingerprint chromatogram of 10 batches of Bushen ningshen ointment

^Δ基金项目 广东省中医药局中医药科研项目(No.20251335);深圳市“医疗卫生三名工程”项目(No.SZZYSM202106009);深圳市宝安区中医药临床研究专项(No.2023ZYLCZX-14);深圳市中西医结合医院内科研课题(No.YJ-2023-108)

*第一作者 硕士研究生。研究方向:药物分析与中药质量控制。E-mail:wli1743@163.com

#通信作者 教授,博士生导师,博士。研究方向:中药质量控制与药代动力学研究。E-mail:13971908298@163.com

contained 24 common peaks, with similarity values all exceeding 0.96. Eleven peaks were identified as adenosine (peak 1), salidroside (peak 4), morroniside (peak 6), catechin (peak 7), paeoniflorin (peak 10), spinosin (peak 11), ferulic acid (peak 12), isoquercitrin (peak 13), verbascoside (peak 14), paeonol (peak 23), and emodin (peak 24). Content determination results showed that the average contents of salidroside, morroniside, catechin, paeoniflorin,

spinosin, ferulic acid, isoquercitrin, verbascoside, paeonol, and emodin were 0.725, 1.962, 0.214, 3.395, 0.124, 0.107, 0.286, 0.019, 0.034 and 0.067 mg/g, respectively. The antioxidant potency composite index (APC) for the 10 batches ranged from 85.08% to 96.35%. Spectrum-effect relationship analysis indicated that all 24 common peaks were positively correlated with the antioxidant capacity. Seventeen peaks had variable importance in projection values >1, specifically peaks 2, 5, 6, 7, 9, 10, 13-21, 23, and 24. **CONCLUSIONS** This study successfully established the HPLC fingerprint and content determination method for Bushen ningshen ointment. The compounds represented by the 17 common peaks such as morroniside may be the active components contributing to its antioxidant effects.

KEYWORDS Bushen ningshen ointment; fingerprint; spectrum-effect relationship; antioxidant activity; content determination

补肾宁神膏根据深圳市中西医结合医院治未病科徐文华主任医师的临床经验方制备而成,该方由熟地黄、山茱萸、酒川芎、盐女贞子、炒酸枣仁、牡丹皮、首乌藤、茯神、龙齿等16味药材组成,具有滋阴补肾、养心安神的功效,临床主要用于治疗肾血不足、虚火内扰所致的失眠、多梦等症,疗效显著。

补肾宁神膏的现行质量标准仅为薄层鉴别、性状及常规检查。由于复方制剂主要通过多组分、多靶点的特性来协同实现整体疗效,因此现行质量标准难以全面反映补肾宁神膏的整体质量。该方中酒川芎中的阿魏酸、儿茶素,牡丹皮中的芍药苷、丹皮酚、异槲皮苷,盐女贞子中的毛蕊花糖苷、红景天苷,炒酸枣仁中的斯皮诺素,以及山茱萸与盐女贞子共有的腺苷等成分,均具有抗氧化、保护神经及调节心血管功能等活性^[1-3]。有研究发现,氧化应激是失眠的重要病理生理机制之一,长期失眠会导致大脑产生过量的活性氧自由基,而安神助眠的作用机制常被认为与减轻氧化应激和炎症反应有关^[4-5]。然而,现有的研究多聚焦于单一成分的体外抗氧化活性,缺乏对复方制剂整体抗氧化效应及其物质基础的系统性分析^[6]。这可能导致不同批次样品的质量波动,从而影响疗效的稳定性,甚至存在中药质量控制中“成分与药效割裂”的关键问题。

指纹图谱能在保证质量稳定性与一致性的同时,既弥补单一成分的局限性,又能为药效物质的筛选提供数据支持^[6]。中药谱效学能够系统地分析中药中多成分、多靶点的协同作用,符合中医药“整体观”理论^[7]。灰色关联度分析和偏最小二乘回归分析可识别中药化学成分与药效的相关性,分析成分对药效的综合贡献^[8]。基于此,本研究建立了补肾宁神膏的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并同法测定了补肾宁神膏中红景天苷等10个成分的含量;采用2,2'-联氨-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氢盐(ABTS)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、铁离子还原能力(FRAP)法测定其体外抗氧化活性;通过灰色关联度分析与偏最小二乘回归分析筛选其抗氧化活性成分,旨在为其质量标准提升提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有e2695型HPLC仪(美国Waters公司),BioTek Synergy HTX型多功能酶标仪(美国Agilent公司),MS105型十万分之一电子分析天平、

JS703C型万分之一电子分析天平(美国Mettler Toledo公司),DA型数控超声波清洗器(东莞市科桥超声设备有限公司)。

1.2 药品与试剂

对照品腺苷(批号J08HB173656)、莫诺苷(批号M14IB209606)、红景天苷(批号PO1A9L67130)、儿茶素(批号O13IY228437)、阿魏酸(批号G13S11L124423)、芍药苷(批号M22HB179898)、大黄素(批号YY90044)、斯皮诺素(批号A31IB224722)、异槲皮苷(批号Y24J11H119521)、毛蕊花糖苷(批号Z28S11X125952)、丹皮酚(批号N22H8201956)及维生素E(批号S13016)、2,4,6-三吡啶基三嗪溶液(TPTZ)(批号S30632)均购自上海源叶生物科技有限公司,纯度均大于98%;ABTS(批号C15283881)、DPPH(批号C15568523)、过氧化物酶(批号C15283881)、FeSO₄·7H₂O(批号MFCD00149719)、磷酸盐缓冲液(PBS)(批号P787575)、FeCl₃溶液(批号MFCD00011005)均购自上海麦克林生化科技有限公司;乙腈、甲醇均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

补肾宁神膏(批号20240124、20230912、20240116、20240515、20240229、20231113、20240416、20231221、20231227、20240923,编号S1~S10;1g相当于饮片6.6g)由深圳市中西医结合医院中药房自制。

2 方法与结果

2.1 补肾宁神膏指纹图谱的建立

2.1.1 色谱条件

以xBridge[®] C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)为色谱柱,以乙腈(A)-0.2%磷酸溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~5 min, 5%A→10%A; 5~10 min, 10%A→13%A; 10~15 min, 13%A→15%A; 15~20 min, 15%A; 20~25 min, 15%A→20%A; 25~40 min, 20%A→28%A; 40~45 min, 28%A→30%A; 45~50 min, 30%A→50%A; 50~55 min, 50%A→65%A; 55~60 min, 65%A→95%A; 60~70 min, 95%A);流速为0.6 mL/min;柱温为30 °C;检测波长为230 nm;进样量为10 μL。

2.1.2 供试品溶液的制备

取补肾宁神膏样品0.5 g,置于干燥锥形瓶中,加入甲醇20 mL,超声30 min,冷却,用甲醇补足失重,经0.22 μm滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.1.3 混合对照品溶液的制备

精密称定红景天苷、莫诺苷、儿茶素、芍药苷、斯皮诺素、阿魏酸、异槲皮苷、毛蕊花糖苷、丹皮酚、大黄素、腺苷对照品适量,分别置于10 mL容量瓶中,加甲醇定容,制得各单一对照品贮备液。取上述各单一对照品贮备液适量,置于5 mL容量瓶中,加甲醇定容,得上述各成分质量浓度分别为73.080、164.552、40.868、97.120、21.456、16.856、31.616、24.160、8.442、16.884、27.456 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.1.4 精密度试验

取“2.1.2”项下供试品溶液(编号S1),按“2.1.1”项下色谱条件连续进样测定6次。以红景天苷为参照峰,得到各共有峰相对保留时间的RSD均小于0.34%($n=6$),相对峰面积的RSD均小于2.56%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.1.5 稳定性试验

取“2.1.2”项下供试品溶液(编号S1),分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.1.1”项下色谱条件进样测定。以红景天苷为参照峰,得到各共有峰相对保留时间的RSD均小于0.40%($n=6$),相对峰面积的RSD均小于2.92%($n=6$),表明样品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.1.6 重复性试验

取样品(编号S1)适量,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定。以红景天苷为参照峰,得到各共有峰相对保留时间的RSD均小于0.18%($n=6$),相对峰面积的RSD均小于2.62%($n=6$),表明方法重复性良好。

2.1.7 HPLC 指纹图谱的生成

取“2.1.2”项下供试品溶液(编号S1~S10),按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》对10批样品的指纹图谱进行分析。以S1为参照图谱(相似度最高),设置时间窗宽度为0.1 min,采用均值法,经多点校正后,得到HPLC叠加指纹图谱和对照指纹图谱R。结果显示,10批样品共有24个共有峰。结果见图1。

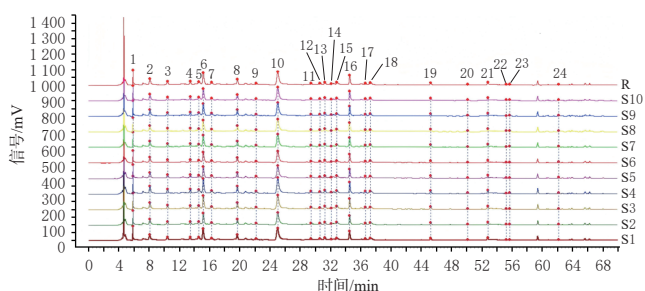


图1 10批样品的HPLC叠加指纹图谱和对照指纹图谱R

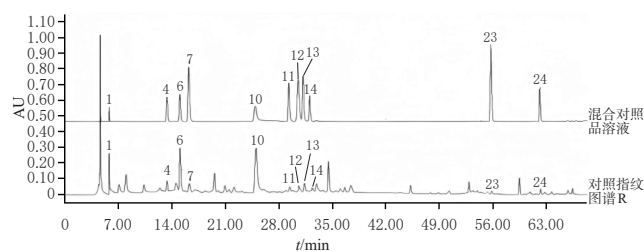
2.1.8 相似度评价

采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》对10批样品的指纹图谱进行相似度评价。结果显

示,10批样品与对照指纹图谱R的相似度为0.961~0.995,表明样品的整体质量差异较小。

2.1.9 共有峰的指认

取“2.1.3”项下混合对照品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,经与对照指纹图谱R比对,共指认出11个成分,分别为腺苷(峰1)、红景天苷(峰4)、莫诺苷(峰6)、儿茶素(峰7)、芍药苷(峰10)、斯皮诺素(峰11)、阿魏酸(峰12)、异槲皮苷(峰13)、毛蕊花糖苷(峰14)、丹皮酚(峰23)及大黄素(峰24)。结果见图2。



1:腺苷;4:红景天苷;6:莫诺苷;7:儿茶素;10:芍药苷;11:斯皮诺素;12:阿魏酸;13:异槲皮苷;14:毛蕊花糖苷;23:丹皮酚;24:大黄素。

图2 混合对照品溶液和对照指纹图谱R的HPLC图

2.2 补肾宁神膏中多指标成分的含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱条件同“2.1.1”项。

2.2.2 混合对照品溶液的制备

精密称定红景天苷、莫诺苷、儿茶素、芍药苷、斯皮诺素、阿魏酸、异槲皮苷、毛蕊花糖苷、丹皮酚、大黄素对照品适量,按“2.1.3”项下方法制备各单一对照品贮备液。取上述各单一对照品贮备液适量,置于5 mL容量瓶中,加甲醇定容,得上述各成分质量浓度分别为73.080、164.552、40.868、194.240、21.456、16.856、31.616、3.624、8.442、16.884 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备

制备方法同“2.1.2”项。

2.2.4 线性关系考察

取“2.2.2”项下混合对照品溶液,用甲醇逐级稀释,得到各成分的系列标准溶液。取上述各成分的系列标准溶液及“2.2.2”项下混合对照品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,以各成分质量浓度(x)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归。结果见表1。

表1 红景天苷等10个成分的回归方程与线性范围

待测成分	回归方程	r	线性范围($\mu\text{g/mL}$)
红景天苷	$y=10\ 601.2x-7\ 883.9$	0.9997	2.284~73.080
莫诺苷	$y=19\ 713.4x-27\ 796.4$	0.9993	5.142~164.552
儿茶素	$y=45\ 404.7x-17\ 100.4$	0.9996	1.277~40.868
芍药苷	$y=21\ 099.9x-77\ 165.4$	0.9995	6.070~194.240
斯皮诺素	$y=26\ 323.7x-5\ 928.4$	0.9997	0.671~21.456
阿魏酸	$y=47\ 396.7x-8\ 925.4$	0.9995	0.527~16.856
异槲皮苷	$y=26\ 041.3x-7\ 845.3$	0.9996	0.988~31.616
毛蕊花糖苷	$y=32\ 905.4x-3\ 254.9$	0.9998	0.113~3.624
丹皮酚	$y=65\ 933.6x-7\ 424.5$	0.9996	0.264~8.442
大黄素	$y=37\ 533.2x+15\ 537.3$	0.9997	0.528~16.884

2.2.5 精密度试验

取“2.2.3”项下供试品溶液(编号S1),按“2.2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果显示,红景天苷等10个成分峰面积的RSD均小于1.93%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验

取“2.2.3”项下供试品溶液(编号S1),分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,红景天苷等10个成分峰面积的RSD均小于2.72%($n=6$),表明样品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.2.7 重复性试验

取样品(编号S1)适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,共6份,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按标准曲线计算含量。结果显示,红景天苷等10个成分含量的RSD均小于2.44%($n=6$),表明方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验

取已知含量的样品(编号S1)约1.00 g,共6份,分别加入与各成分含量相当的单一对照品溶液(芍药苷、莫诺苷、红景天苷、异槲皮苷、儿茶素、斯皮诺素、阿魏酸、丹皮酚、毛蕊花糖苷、大黄素质量浓度分别为3.198、1.863、0.704、0.270、0.204、0.120、0.103、0.032、0.019、0.060 mg/mL),按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果显示,红景天苷等10个成分的平均加样回收率为98.57%~101.50%,RSD均小于1.98%($n=6$),表明方法准确度良好。

2.2.9 含量测定

取10批样品,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并根据标准曲线计算样品含量,每批样品测定2次,取平均值。结果见表2。

表2 10批样品中红景天苷等10个成分的含量测定结果($n=2$, mg/g)

编号	红景天苷	莫诺苷	儿茶素	芍药苷	斯皮诺素	阿魏酸	异槲皮苷	毛蕊花糖苷	丹皮酚	大黄素
S1	0.704	1.863	0.204	3.198	0.120	0.103	0.270	0.019	0.032	0.060
S2	0.727	1.872	0.208	3.166	0.111	0.105	0.277	0.018	0.032	0.059
S3	0.685	1.937	0.209	3.359	0.131	0.102	0.279	0.019	0.033	0.071
S4	0.683	1.943	0.210	3.366	0.132	0.104	0.280	0.020	0.033	0.071
S5	0.607	1.716	0.186	3.259	0.116	0.092	0.249	0.017	0.030	0.064
S6	0.658	1.868	0.203	3.237	0.122	0.103	0.271	0.019	0.032	0.061
S7	0.826	2.145	0.236	3.639	0.122	0.116	0.317	0.019	0.037	0.070
S8	0.712	2.001	0.216	3.469	0.134	0.107	0.289	0.020	0.034	0.073
S9	0.734	1.881	0.209	3.184	0.109	0.105	0.278	0.019	0.032	0.060
S10	0.910	2.394	0.261	4.070	0.145	0.129	0.351	0.023	0.041	0.079
平均值	0.725	1.962	0.214	3.395	0.124	0.107	0.286	0.019	0.034	0.067

2.3 补肾宁神膏的体外抗氧化活性测定

2.3.1 ABTS自由基清除率测定

精密称取维生素E 12.50 mg,加60%乙醇超声溶解并定容至10 mL(浓度为5.0 mmol/L),再用60%乙醇稀

释,得到浓度分别为0.1、0.2、0.3、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L的维生素E标准溶液。取过氧化氢和双蒸水(1:39, V/V)混匀,得溶液A。取PBS、ABTS和溶液A(152:10:8, V/V/V)混匀,得溶液B。取过氧化物酶和PBS(1:9, V/V)混匀,得溶液C。取“2.2.3”项下供试品溶液[用60%甲醇稀释至质量浓度为(25±0.5) mg/mL]10 μL、溶液B 170 μL和溶液C 20 μL,混匀,移至96微孔板中,作为实验组。取不同浓度的维生素E标准溶液10 μL至96微孔板中,加入溶液B 170 μL和溶液C 20 μL,混匀,作为标准曲线组。上述溶液均室温避光静置6 min后,采用酶标仪于414 nm波长处检测吸光度值。每组设置3个平行孔。以维生素E标准溶液浓度为横坐标(x)、吸光度为纵坐标(y)得到回归方程为 $y = -1.692 3x + 1.902 8$ ($r = 0.999 6$)。按公式计算ABTS自由基清除率:ABTS自由基清除率 = $(\Delta A_{414} - b) \div a \times f \div \frac{m}{V}$ (ΔA_{414} :样本的平均吸光度值; b :标准曲线的截距; a :标准曲线的斜率; f :样本加入检测体系之前的稀释倍数; m :质量; V :样本加入体积)。结果显示,10批样品均具有清除ABTS自由基的能力,其中S2样品清除能力最强。结果见表3。

表3 10批样品的抗氧化测定结果($n=3$, mmol/g)

编号	ABTS自由基清除率	DPPH自由基清除率	FRAP
S1	30.178±2.657	31.562±3.301	43.607±3.963
S2	34.270±6.273	29.882±6.210	43.297±2.199
S3	32.067±5.417	28.901±3.965	44.535±1.752
S4	32.342±5.442	27.501±6.699	41.136±0.755
S5	30.768±2.242	24.281±4.118	44.845±0.807
S6	28.014±3.832	26.101±3.334	47.035±5.309
S7	32.971±6.803	31.982±2.926	44.813±4.824
S8	30.847±3.305	27.921±0.642	48.366±3.235
S9	29.470±2.722	33.382±10.846	47.056±2.360
S10	31.516±0.594	33.102±10.574	47.361±1.518

2.3.2 DPPH自由基清除率测定

精密称取维生素E 31.29 mg,加60%乙醇超声溶解并定容至10 mL(浓度为12.5 mmol/L),再用无水乙醇稀释,得到浓度分别为0.025、0.050、0.062 5、0.075、0.087 5、0.100 mmol/L的维生素E标准溶液。称取DPPH 0.10 mg,置于棕色瓶中,加无水乙醇1 mL,超声溶解,再加无水乙醇11 mL,超声,得DPPH工作液。取“2.2.3”项下供试品溶液,用80%甲醇稀释,得到质量浓度为25 mg/mL的待测液。取待测液80 μL、无水乙醇100 μL,混合,作为对照组。取待测液80 μL、DPPH工作液100 μL,混匀,作为样品组。取不同浓度的维生素E标准溶液80 μL、DPPH工作液100 μL,混合,作为标准曲线组。上述溶液均室温避光静置10 min后,采用酶标仪于525 nm波长处检测吸光度值。每组设置3个平行孔。以维生素E标准溶液浓度为横坐标(x)、吸光度为纵坐标(y)得到回归方程为 $y = 0.004 6x - 0.012 4$ ($r = 0.994 2$)。按公式

计算DPPH自由基清除率: DPPH自由基清除率 = $\frac{1}{a} \times (\Delta A_{525} - b) \div \frac{V}{m}$ (ΔA_{525} :样本的平均吸光度值; b :标准曲

线的截距; a :标准曲线的斜率; m :质量; V :样本加入体积)。结果显示,10批样品均具有清除DPPH自由基的能力,其中S9样品清除能力最强。结果见表3。

2.3.3 FRAP的测定

精密称取 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27.80 mg,加双蒸水溶解并定容至10 mL(浓度为100 mmol/L),再用双蒸水稀释,得到浓度分别为0.3、0.6、0.9、1.2、1.8、2.1、2.5 mmol/L的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 标准溶液。取PBS、TPTZ溶液和 FeCl_3 溶液(10:1:1, $V/V/V$),混匀,得FRAP工作液。取“2.2.3”项下供试品溶液,加0.01 mmol/L PBS稀释,得质量浓度为25 mg/mL的待测液。取待测液5 μL 、FRAP工作液180 μL ,混合,作为样品组。取不同浓度的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 标准溶液5 μL 、FRAP工作液180 μL ,混合,作为标准曲线组。各组溶液分别加入96微孔板中,于37 $^\circ\text{C}$ 孵育5 min,采用酶标仪于593 nm波长处检测吸光度值。每组设置3个平行孔。以 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 标准溶液浓度为横坐标(x)、吸光度为纵坐标(y)得到回归方程为 $y=0.303\ 04x+0.001$ ($r=0.999\ 3$)。按公式计算FRAP: $\text{FRAP}=(\Delta A_{593}-b) \div a \times f \div c_{pr}$ (ΔA_{593} :样本的平均吸光度值; b :标准曲线的截距; a :标准曲线的斜率; f :样本加入检测体系之前的稀释倍数; c_{pr} :待测样本蛋白浓度)。结果显示,10批样品均具有FRAP,其中S8样品的抗氧化能力最强。结果见表3。

2.3.4 抗氧化活性综合指数分析

因不同体外抗氧化模型体系反映不同的抗氧化机制,单一的指标难以综合评价样品的抗氧化能力,故本研究参考文献[9],根据表3中的测定结果,以抗氧化活性综合指数(antioxidant potency composite index, APC)评估补肾宁神膏的抗氧化能力,计算公式为: $\text{APC}=\frac{\text{该方法测定值}}{\text{该方法测定最大值}} \times 100\%$,平均综合指数 $=\frac{(\text{ABTS-APC}+\text{DPPH-APC}+\text{FRAP-APC})}{3}$,以平均综合指数 $>70\%$ 表示抗氧化能力较强^[10]。结果(表4)显示,10批样品的平均综合指数为85.08%~96.35%,表明10批样品均具有较强的抗氧化能力。

表4 10批样品的APC(%)

编号	ABTS-APC	DPPH-APC	FRAP-APC	平均综合指数
S1	88.06	94.55	90.16	90.92
S2	100.00	89.52	89.52	93.01
S3	93.57	86.58	92.08	90.74
S4	94.37	82.38	85.05	87.27
S5	89.78	72.74	92.72	85.08
S6	81.74	78.19	97.25	85.73
S7	96.21	95.81	92.65	94.89
S8	90.01	83.64	100	91.22
S9	85.99	100	97.29	94.43
S10	91.96	99.16	97.92	96.35

2.4 谱效关系研究

2.4.1 灰色关联度分析

将10批补肾宁神膏的APC作为母序列,24个共有峰峰面积作为子序列,采用初值化变换法对数据进行标准化处理,采用SPSS pro软件进行灰色关联度分析。结

果(表5)显示,24个共有峰与APC的关联度均不小于0.661,表明共有峰与APC存在关联性,补肾宁神膏通过多成分共同发挥抗氧化作用。

表5 10批补肾宁神膏共有峰与APC的关联度及排名

峰号	关联度	排名	峰号	关联度	排名
1	0.668	22	13	0.775	4
2	0.764	6	14	0.662	23
3	0.734	17	15	0.705	18
4	0.789	2	16	0.763	9
5	0.741	14	17	0.699	19
6	0.764	6	18	0.742	13
7	0.780	3	19	0.764	6
8	0.661	24	20	0.682	20
9	0.767	5	21	0.741	14
10	0.753	11	22	0.748	12
11	0.673	21	23	0.762	10
12	0.803	1	24	0.740	16

2.4.2 偏最小二乘回归分析

以10批补肾宁神膏的APC为因变量,24个共有峰峰面积为自变量,采用SIMCA 14.1软件进行偏最小二乘回归分析。标准化回归系数的正负分别表示各共有峰与抗氧化活性呈正相关或负相关。以变量重要性投影(variable importance in projection, VIP)值 >1 表明该共有峰对补肾宁神膏抗氧化活性有显著贡献^[11]。图3A结果显示,10批补肾宁神膏的24个共有峰与APC的标准化回归系数均大于0,均呈正相关。图3B结果显示,17个共有峰(峰2、5~7、9、10、13~21、23、24)的VIP值 >1 ,通过与对照品比对,指出其中7个,分别为莫诺昔(峰6)、儿茶素(峰7)、芍药苷(峰10)、异槲皮苷(峰13)、毛蕊花糖苷(峰14)、丹皮酚(峰23)及大黄素(峰24)。

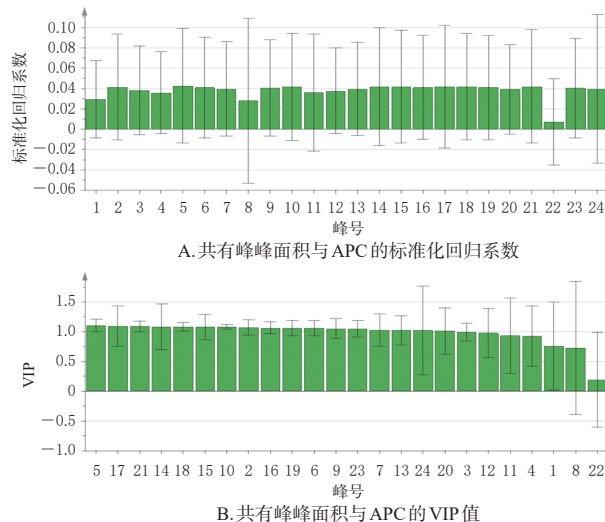


图3 共有峰与APC的标准化回归系数及VIP值

3 讨论

3.1 指标成分的选择

酒川芎中的阿魏酸和儿茶素具有抗氧化、改善心脑血管功能等作用^[12];牡丹皮中的芍药苷、丹皮酚和异槲皮苷具有较强的清除自由基活性,可调节心血管功

能^[13];毛蕊花糖苷是盐女贞子的活性成分之一,具有神经保护作用^[14];炒酸枣仁中的斯皮诺素具有安神作用^[11];腺苷是山茱萸及盐女贞子的共有成分,具有抗氧化、安神的作用^[2];盐女贞子、山茱萸、首乌藤分别含有的红景天苷、莫诺苷和大黄素成分,均具有抗氧化功效^[3,15-16]。因熟地黄中的主要成分易受炮制影响^[17],茯神及龙齿的分析难度大^[18],故未对熟地黄、茯神和龙齿的有效成分进行分析。此外,由于腺苷在色谱图中的峰形相对较差,故也未对其进行定量分析。综上,本研究选择红景天苷、莫诺苷、儿茶素、芍药苷、斯皮诺素、阿魏酸、异槲皮苷、毛蕊花糖苷、丹皮酚及大黄素作为含量测定的指标成分。

3.2 样品前处理及色谱条件的选择

本研究分别对不同提取溶剂(甲醇、85%甲醇、50%甲醇)、不同提取时间(20、45、60 min)进行了考察。结果发现,以甲醇为提取溶剂时,各色谱峰的峰面积大、峰形好。对补肾宁神膏进行200~400 nm全波长扫描的结果显示,当检测波长为230 nm时,色谱峰数目最多,能够全面反映该制剂的指纹图谱特征。对不同流动相体系(乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.2%磷酸溶液、甲醇-水、甲醇-0.2%磷酸溶液)的考察结果显示,以乙腈-0.2%磷酸溶液为流动相时的分离效果最佳,色谱峰峰形良好。

3.3 指纹图谱、含量测定及谱效关系分析

本研究共有24个共有峰,指出11个共有峰,且相似度>0.96。结合含量测定结果可知,10批样品中的红景天苷、异槲皮苷、丹皮酚含量差异显著,其原因可能为药材原料存在差异(如产地、采收季节等)。已有研究表明,不同产地女贞子可能存在品质差异,其质量标志物红景天苷的含量亦呈明显的地域性波动^[19];异槲皮苷易光解,在贮存过程中易发生降解^[20];丹皮酚在干燥及贮存过程中易挥发^[21]。谱效关系研究结果显示,24个共有峰与APC均呈正相关,有17个共有峰(峰2、5~7、9、10、13~21、23、24)的VIP值>1,表明这17个共有峰代表的化合物可能是补肾宁神膏发挥抗氧化作用的药效成分。

综上所述,本研究成功建立了补肾宁神膏的HPLC指纹图谱及含量测定方法;莫诺苷等17个共有峰代表的化合物可能是其发挥抗氧化作用的药效成分。

参考文献

[1] 柴青,张宏斌,吴立东,等.基于¹H NMR代谢组学与网络药理学的复方宁神精油抗失眠组方物质基础及作用机制研究[J].药科学报,2024,59(8):2313-2325.
[2] 张群群.滋肾安神口服液的研制及初步药理学研究[D].济南:山东中医药大学,2020.
[3] 向权,杨榛,施树德,等.红景天苷对低氧诱导大鼠心肌细胞凋亡及氧化应激损伤、炎症反应的影响[J].甘肃中医药大学学报,2025,42(1):1-7.
[4] 张淑萍,王亚军,胡春荣,等.刺五加提取物对睡眠剥夺小鼠抗氧化抗疲劳的研究[J].黑龙江医药科学,2015,38

(6):1-3.

[5] 杨俊杰,栗梦凡,张霖,等.基于数据挖掘和网络药理学分析治疗失眠的用药规律及其药理机制[J].中国现代医生,2024,62(36):76-81.
[6] 尹东阁,杜豫吉,廖诗朗,等.中药制剂整体质量控制方法及中药对照提取物研究进展[J].中华中医药杂志,2025,40(1):337-342.
[7] 刘晓燕,蒋益萍,张嘉宝,等.啤酒花的HPLC指纹图谱建立及其抗氧化作用谱效关系研究[J].中国药房,2020,31(2):138-143.
[8] 梁慧,陶晨璐,刘艳梅,等.基于多指标含量测定结合化学计量学评价的石见穿质量研究[J].广东药科大学学报,2023,39(1):51-60.
[9] 李晓飞,杨炜琪,黄琦,等.拳参高效液相色谱指纹图谱与抗氧化活性的谱效关系研究[J].广东药科大学学报,2024,40(4):9-17.
[10] WU M Y, SI J Y, LIU Y H, et al. Association between composite dietary antioxidant index and hypertension: insights from NHANES[J]. Clin Exp Hypertens, 2023, 45(1):2233712.
[11] 黄政皖,唐毓萍,彭振刚.麦角硫因与7种抗氧化剂组合的抗氧化作用[J].香料香精化妆品,2025(1):109-114.
[12] 钟晨晨,何冬晴,林创伟,等.川芎提取物抗炎抗氧化和抗衰活性研究[J].轻工科技,2025,41(2):43-49.
[13] 谢炎福,押辉远,李月佳,等.超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱法检测牡丹根皮中抗氧化活性成分及其抗氧化能力[J].理化检验-化学分册,2024,60(7):660-667.
[14] 苏泽海,秦玲,郝泉水.毛蕊花糖苷对大强度运动大鼠骨骼肌耗氧量、线粒体酶活性的影响[J].中国临床药理学杂志,2024,40(14):2098-2102.
[15] 邓小兰,那丽莎,于雪,等.莫诺苷调控糖尿病周围神经病变大鼠坐骨神经氧化应激损伤的机制[J].中国当代医药,2024,31(18):4-8.
[16] 龙淳,毕红英,杨昌珍,等.大黄素上调Sirt2减轻脂多糖致RAW_{264.7}细胞的氧化应激反应[J].实用医学杂志,2024,40(13):1785-1790.
[17] 刘岩,刘佳萌,李丹,等.经典名方百合地黄汤的研究进展及质量标志物预测[J].中国实验方剂学杂志,2024,30(18):235-242.
[18] 苟小军,黄颖,李雯洁,等.经典名方大秦芎汤的HPLC指纹图谱研究及多指标成分定量分析[J].中国医院药学杂志,2023,43(5):486-493.
[19] 张柏生,李斌,李茜,等.不同产地酒女贞子红景天苷、特女贞苷含量测定及聚类分析[J].世界中医药,2021,16(3):426-429.
[20] 张蕾.DPP-IV抑制剂:异槲皮苷促进2型糖尿病模型小鼠胰岛素分泌及降糖作用的研究[D].长春:吉林大学,2013.
[21] 何红.丹皮酚分散片制备工艺试验研究[D].南昌:南昌大学,2017.

(收稿日期:2025-03-02 修回日期:2025-06-18)

(编辑:陈宏)