

文章编号:1001-6880(2018)6-0936-09

指纹图谱结合多指标成分定量测定探讨川银花-玄参的不同配液方式的相关性研究

杨秀青¹,谷江华¹,石征蓉¹,袁强华²,宋英^{2*}¹成都中医药大学药学院,成都 610075; ²成都中医药大学附属医院 药剂科,成都 610072

摘要:本文采用 HPLC 法建立川银花-玄参药对的各单煎液、单煎混合液与合煎液的特征指纹图谱,考察不同配液方式的指纹图谱及指标性成分含量的变化。采用岛津 Inert Sustain C₁₈色谱柱(250 mm × 4.6 mm,5 μm),以乙腈-0.2% 磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱,体积流量 1.0 mL/min,波长 210、240、235、236、325、327、280 nm,柱温 30 ℃。分别建立 10 批川银花和玄参药材各单煎液、单煎混合液及合煎液的指纹图谱,标定共有峰,获得对照指纹图谱;对配伍后指纹图谱的共有峰进行归属分析并通过 11 种混合对照品测定指标性成分的含量。结果川银花单煎液指纹图谱中以绿原酸为参照峰,确定 24 个共有峰,玄参单煎液指纹图谱中以哈巴俄苷为参照峰,确定 11 个共有峰,川银花-玄参药对单煎混合液和合煎液指纹图谱中均以绿原酸为参照峰,均确定了 35 个共有峰,24 个来源于川银花,11 个来源于玄参;5、10、15、16、17、22、24、25、26、33、34 分别对应哈巴苷、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、安格洛苷 C、异绿原酸 A、异绿原酸 C、哈巴俄苷、肉桂酸;合煎液总峰面积降低,有 10 个峰峰面积显著降低,1 个峰消失,10 个峰峰面积显著升高;单煎混合液总峰面积升高,有 2 个峰峰面积显著降低,12 个峰峰面积显著升高,指标性成分的含量在合煎液中变化较明显,在单煎混合液变化较小。因此得出结论川银花与玄参药材的各单煎液、单煎混合液及合煎液的化学成分种类差异不大,但峰面积大小差异明显,不同的配液方式对活性成分含量影响不同。

关键词:药对;川银花;玄参;HPLC;指纹图谱;指标成分

中图分类号:R284.2;Q946.91

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.6.004

Correlation Analysis of Decoction Methods of *Lonicerae similis Flos* and *Scrophularia ningpoensis* Based on HPLC Fingerprint and Multi-components Determination

YANG Xiu-qing¹, GU Jiang-hua¹, SHI Zheng-rong¹, YUAN Qiang-hua², SONG Ying^{2*}¹ Pharmacy college, Chengdu University of TCM, Chengdu 610075, China;² The Affiliated Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China

Abstract: This study aims to establish the HPLC fingerprints of Single decoction, Single decoction mixture and combined decoctions of *Lonicerae similis* Flos and *Radix scrophulariae* crude drugs, investigating changes that the fingerprints and the content of the index constituents for the liquids mixed by different methods. The separation was performed on SHI-MADZU Inert Sustain C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm,5 μm) with mobile phase composed of acetonitrile-0.2% phosphoric acid solution (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min, The column temperature was set at 30 ℃ and the detection wavelength was set at 210,240,235,236,325,327 and 280 nm; The experiment respectively set up the fingerprints of 10 batches of Single decoction, Single decoction mixture and combined decoctions of *Lonicerae similis* Flos and *Radix scrophulariae* crude drugs, demarcate common peaks and gain reference fingerprint. Attributing analysis the common peak of the fingerprint and determining the content of index ingredients through the 11 kinds of mixed control in the liquids mixed by different methods. As a result, 24 co-existing peaks were marked in the HPLC fingerprints of single decoction of *Lonicerae similis* Flos by taking chlorogenic acid peak as the reference peak, 11 co-existing peaks were

marked in the HPLC fingerprints of single decoction of *Radix scrophulariae* by taking harpagoside peak as the reference peak, 35 common peaks were marked in the HPLC fingerprints of single decoction mixture and combined decoctions by taking chlorogenic acid peak as the reference peak; 24 peaks belong to *Lonicerae similis* Flos and 11 peaks belong to *Radix scrophulariae*; Peak 5, 10, 15, 16, 17, 22, 24, 25, 26, 33 and 34 respectively correspond to harpagide, neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, caffeic acid, iso-chlorogenic acid B, angelo glucoside C, iso-chlorogenic acid A, iso-chlorogenic acid C, harpagoside, cinnamic acid, respectively; In combined decoction, the total peak area was decreased, 10 peaks' area decreased markedly, 1 peak disappeared, and 10 peaks' area increased significantly; In single decoction mixture, 2 peaks' area decreased and 12 peaks' area increased significantly. The content of the index components changed more obviously in combined decoction, but of which changed little in single decoction mixture. Hence the type of chemical components had little difference between Single decoction, Single decoction mixture and combined decoctions of *Lonicerae similis* Flos and *Radix scrophulariae* crude drugs, but the size of the peak areas was obviously different, the different method of mixing liquid had different effect on the content of active ingredients.

Key words: drug pair; *Lonicerae similis* Flos; *Radix scrophulariae*; HPLC; fingerprint; index component

银花与玄参为临床常用解热消炎中药,常在一起作为药对配伍使用。玄参为玄参科植物玄参 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. 的干燥根,具有凉血滋阴,泻火解毒的功效^[1]。玄参中含有多种环烯醚萜和苯丙素类成分,如哈巴苷、哈巴俄苷、肉桂酸、麦角甾苷、安格洛苷 C 等^[2],药理研究表明这些成分具有镇痛、抗炎、抗菌、保肝、抗氧化、增强免疫等作用^[3,4]。川银花为忍冬科植物细毡毛忍冬 *Lonicera similis* Hemsl. 和淡红忍冬 *Lonicera acuminata* Wall. 的干燥花蕾或带初开的花,长于清热解毒,凉散风热^[1],川银花主要以多种有机酸成分为主要功效成分,药理研究表明这些成分具有抗菌、抗病毒、解热、消炎、止血等作用^[5,6]。玄参与银花配伍多见于消炎类复方制剂,如:口炎清颗粒、四妙勇安汤、银菊解毒口服液等^[7-9]。

本课题前期试验发现川银花与玄参合煎液中绿原酸含量大幅度增加,目前作者尚未见有关川银花与玄参不同配液方式其中化学成分变化研究的报道。为全面客观地反映其不同配液方式药效变化的物质基础,本实验利用高效液相色谱技术建立川银花与玄参药对水提液的指纹图谱分析方法,同时以 11 活性成分为指标,拟对川银花与玄参药对的单煎液、单煎混合液与合煎液的 HPLC 特征指纹图谱变化进行分析及指标成分含量变化研究,综合考察药对不同配液方式化学成分的变化,更全面地揭示川银花与玄参配伍规律,进一步指导临床配方应用。

1 仪器与材料

安捷伦 1260 型高效液相色谱仪(配置四元泵、DAD 检测器、在线脱气装置、OpenLAB 工作站,美国

安捷伦公司),BP211D 型电子分析天平(瑞士 METTLER 公司),98-1-C 型数字控温电热套(天津市泰斯特仪器有限公司),AS20500BD 超声清洁仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

对照品绿原酸(批号 110753-201313, 纯度 96.6%)、咖啡酸(批号 110885-200102, 纯度 100%)、哈巴苷(批号 111729-201402, 纯度 97.3%)、哈巴俄苷(批号 111730-201005, 纯度 98.8%)、肉桂酸(批号 111735-201106, 纯度 97.8%)、安格洛苷 C(批号 111514-200403, 纯度 96.4%)均购自中国食品药品检定研究院;新绿原酸(批号 140903, 纯度 99.1%)、隐绿原酸(批号 140901, 纯度 98.7%)、异绿原酸 B(批号 141006, 纯度 98.5%)、异绿原酸 A(批号 141010, 纯度 98.8%)、异绿原酸 C(批号 141003, 纯度 98.9%)购自成都瑞芬思生物科技有限公司;乙腈、甲醇(美国天地公司)为色谱纯,水为超纯水,其余试剂为分析纯。实验用 10 批川银花、玄参药材购于四川新荷花中药饮片股份有限公司(批号见表 1),经成都中医药大学附属医院药剂科副主任中药师盛蓉鉴定,10 批川银花均为细毡毛忍冬 *Lonicera similis* 的干燥花蕾,符合 2010 版《四川省中药材标准》相关规定,10 批玄参均为玄参科植物玄参 *Scutellaria baicalensis* 的干燥根,符合 2015 年版《中国药典》一部相关规定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

岛津 Inert Sustain C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);乙腈为流动相 A, 0.2% 磷酸为流动相 B, 进行梯度洗脱(0 ~ 18 min, 95% B; 18 ~ 24 min, 90% B; 24 ~ 30 min, 88% B; 30 ~ 33 min, 87% B; 33 ~

表 1 样品信息

Table 1 Sample information

| 编号 No. | 川银花批号 Batches of <i>Lonicerae similis Flos</i> | 玄参批号 Batches of <i>Radix scrophulariae</i> | 编号 No. | 川银花批号 Batches of <i>Lonicerae similis Flos</i> | 玄参批号 Batches of <i>Radix scrophulariae</i> |
|-----------|--|--|-----------|--|--|
| 1 | 20160110 | 20160101 | 6 | 20160305 | 20160319 |
| 2 | 20160112 | 20160104 | 7 | 20160406 | 20160507 |
| 3 | 20160115 | 20160110 | 8 | 20160408 | 20160509 |
| 4 | 20160302 | 20160315 | 9 | 20160410 | 20160511 |
| 5 | 20160304 | 20160317 | 10 | 20160420 | 20160513 |

42 min, 78% B; 42 ~ 57 min, 76% B; 57 ~ 63, 70% B; 63 ~ 65, 45% B), 后运行 5 min; 检测波长 210 nm(0 ~ 9 min)、325 nm(9 ~ 16.5 min)、236 nm(16.5 ~ 20 min)、235 nm(20 ~ 25 min)、327 nm(25 ~ 28 min)、240 nm(28 ~ 33 min)、327 nm(33 ~ 54 min)、280 nm(54 ~ 65 min); 柱温 25 °C; 流速 1.0 mL/min; 进样量 10 μL。

2.1 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备

精密称取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、哈巴苷、哈巴俄苷、肉桂酸、安格洛苷 C 对照品适量, 加甲醇溶解并定容至刻度, 制成浓度分别为 251.10、710.35、211.20、352.60、199.10、213.15、200.55、38.00、309.25、101.10 和 15.20 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 水提药液的制备

2.2.2.1 单煎样品的制备

分别精密称取 10 批川银花、玄参各 20.0 g, 分别置 500 mL 圆底烧瓶中, 加入 10 倍量的蒸馏水, 煎煮 3 次, 每次 1 h, 过滤合并滤液, 浓缩并定容至 500 mL。

2.2.2.2 单煎混合样品的制备

精密称取 10 批川银花、玄参各 20.0 g, 分别按照“2.2.2.1”单煎样品的制备方法项下操作, 将两者滤液合并, 浓缩并定容至 500 mL。

2.2.2.3 合煎样品的制备

精密称取 10 批川银花、玄参各 20.0 g, 混合, 置 500 mL 圆底烧瓶中, 加入 10 倍量的蒸馏水, 煎煮 3 次, 每次 1 h, 过滤合并滤液, 浓缩, 定容至 500 mL 量瓶中。

2.2.3 供试品溶液的制备

分别精密吸取上述水提药液 10 mL 置 25 mL 容量瓶中, 加 80% 甲醇定容, 得 10 批川银花单煎、玄参单煎、药对单煎混合、药对合煎供试品溶液, 分别编号为 C1 ~ C10、X1 ~ X10、H1 ~ H10、J1 ~ J10。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验

精密吸取同一供试品溶液(J1), 按“2.1”项下色谱条件, 连续进样 6 次, 6 次测定图谱 13 个主要峰保留时间的 RSD ≤ 0.77%, 峰面积的 RSD ≤ 3.27%, 仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液(J1), 按“2.1”项下色谱条件, 分别于 0、4、8、12、24、36 h 进样测定, 6 次测定图谱 13 个主要峰保留时间的 RSD ≤ 0.84%, 峰面积的 RSD ≤ 2.99%, 供试品溶液在 36 h 内各成分稳定。

2.3.3 重复性试验

精密吸取 6 份供试品溶液(J1), 按“2.1”项下色谱条件, 分别测定, 6 份样品的 13 个主要峰保留时间 RSD ≤ 0.76%, 峰面积 RSD ≤ 3.19%, 证明方法的重复性良好。

2.4 10 批川银花与玄参单煎液、单煎混合液、合煎液的指纹图谱建立及评价

取 10 批川银花与玄参单煎液、混合液、合煎液供试品溶液, 分别进样测定, 根据所得图谱, 10 批川银花单煎液标定 24 个共有峰, 其中 15 号峰为绿原酸色谱峰, 选作参照峰(S); 10 批玄参单煎液标定 11 个共有峰, 其中 33 号峰为哈巴俄苷色谱峰, 选作参照峰(S); 10 批川银花玄参合煎液标定 35 个共有峰, 其中 15 号峰为绿原酸色谱峰, 选作参照峰(S); 10 批川银花玄参单煎混合液标定 35 个共有峰, 其中绿原酸色谱峰, 选作参照峰(S), 四者均为共有峰, 峰面积占总峰面积 90% 以上。利用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012.130723 版)软件, 经过校正选峰并设定匹配模式, 将色谱峰进行自动匹配, 分别对 10 批川银花单煎液、玄参单煎液、混合液、合

煎液样品图谱进行匹配,并将10批样品生成的对照指纹图谱作为对照,进行色谱峰差异性和整体相似性评价,以中位数法计算各图谱的相似度(图1~4)。10批所测川银花单煎液、玄参单煎液、混合液、合煎液供试品色谱图与各自对照指纹图谱相似度均大于0.9,说明该药对各批次药材、药液质量稳定,方法合理稳定。

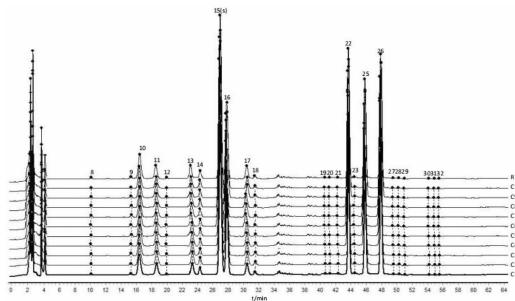


图1 10批川银花药材单煎液指纹图谱共有模式

Fig. 1 The fingerprints of 10 batches of *Lonicerae similis* Flos crude drugs decoction

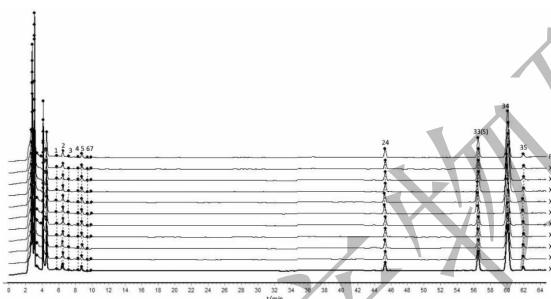


图2 10批玄参药材单煎液指纹图谱共有模式图

Fig. 2 The fingerprints of 10 batches of *S. ningpoensis* crude drugs decoction

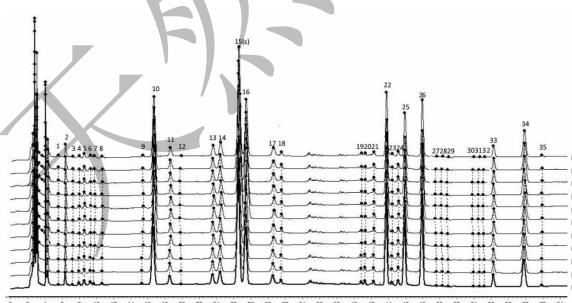


图3 0批川银花和玄参药材单煎混合液指纹图谱共有模式图

Fig. 3 The fingerprints of 10 batches of Single decoction mixture of *Lonicerae similis* Flos and *S. ningpoensis* crude drugs

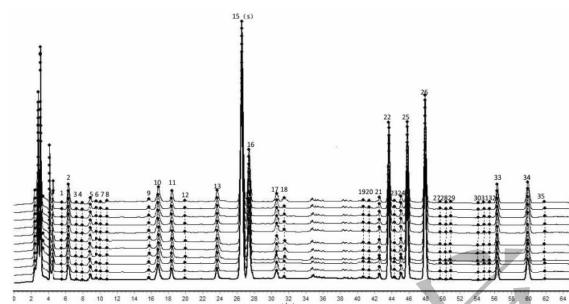


图4 10批川银花和玄参药材合煎液指纹图谱共有模式图

Fig. 4 Fingerprints of 10 batches of combined decoctions of *Lonicerae similis* Flos and *S. ningpoensis* crude drugs

2.5 10批川银花与玄参单煎液、单煎混合液、合煎液的指纹图谱的分析结果^[10,11]

2.5.1 色谱峰的归属

通过药对单煎液、单煎混合液、合煎液及混合对照品图谱对比分析,对川银花-玄参合煎液中各共有峰进行初步归属,见图5。基本确定1~7、24、33~35号峰来源于玄参,8~23、25~32号峰来源于川银花。通过保留时间结合UV光谱的对照,可以确定5号峰为哈巴苷、10号峰为新绿原酸、15号峰为绿原酸、16号峰为隐绿原酸、17号峰为咖啡酸、22号峰为异绿原酸B、24号峰为安洛昔C、25号峰为异绿原酸A、26号峰为异绿原酸C、33号峰为哈巴俄苷、34号峰为肉桂酸。

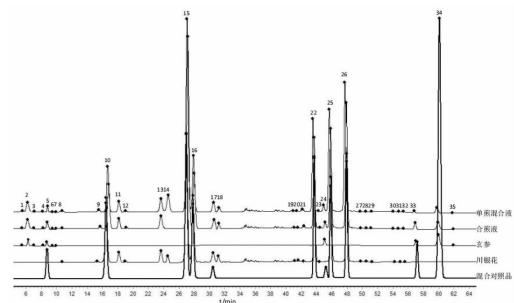


图5 川银花(C1)与玄参(X1)药材单煎液、合煎液(H1)、单煎混合溶液(J1)与混合对照品的HPLC色谱图

Fig. 5 HPLC chromatogram of *Lonicerae similis* Flos (C1), *S. ningpoensis* (X1), combined decoctions (H1), single decoction mixture (J1) and mixed control

2.5.2 配伍前后川银花-玄参单煎液、单煎混合液、合煎液指纹图谱变化分析

将药对单煎液、单煎混合液、合煎液的指纹图谱共有峰的峰面积均值作对比,由表2可知,相较于药材单煎液中的各峰峰面积,合煎液总峰面积降低,有

10个峰(8、10、13、16、17、18、22、32、33、35)峰面积显著降低,1个峰(14)消失,10个峰(2、5、6、7、9、15、19、20、26、33)峰面积显著升高,剩余的14个峰峰面积变化不大;单煎混合液总峰面积升高,有2个峰(15、23)峰面积显著降低,12个峰(2、5、6、7、8、10、12、14、16、19、20、21)峰面积显著升高,剩余的21个峰峰面积变化不大;单煎混合液与合煎液相比,单煎混合液中多1个峰(14),有7个峰(5、9、15、23、25、26、33)峰面积显著降低,14个峰(6、7、8、10、12、13、16、17、18、21、22、24、34、35)峰面积显著升高,剩余的13个峰峰面积变化不大。相较于单煎液,合煎液比混合液峰面积降低的峰数多,可能由于

川银花和玄参煎煮过程中活性成分溶出竞争,相互抑制导致^[12];合煎液中14号峰消失,可能由于在加热的环境下14号峰发生化学反应转化为其他存在峰;合煎液与混合液中多数峰的峰面积增加,可能由于另一味药材的加入创造了适宜的PH环境导致溶出增加^[13];混合液与合煎液的大多数峰峰面积不一致,说明加热煎煮对成分溶出影响较大。由此说明药对单煎、合煎与单煎混合效应不一致,为进一步探究不同不同配液方式的指标性成分的总溶出量较单味药有无差异,本实验选用11种指标性成分的混合对照品对川银花、玄参单煎液、单煎混合液及合煎液进行定量分析。

表2 川银花-玄参单煎液、单煎混合液、合煎液图谱各共有峰平均峰面积比较

Table 2 The peak areas of common peaks of joint solution and single decoction mixed solution and single decoction solution of *Lonicerae similis* Flos and *S. ningpoensis* crude drugs

| 峰号 Peak | RT (min) | 名称 Name | 峰归属 Peak assignment | 川银花单煎液 Single decoction of <i>Lonicerae similis</i> Flos | 玄参单煎液 Single decoction of <i>Radix scrophulariae</i> | 合煎液 Combined decoctions | 单煎混合液 Single decoction mixture |
|------------|-------------|------------------------------|-----------------------------------|--|---|-------------------------------|---|
| 1 | 5.52 | | 玄参 <i>Radix scrophulariae</i> | 37.3 | 37.4 | 39.8 | |
| 2 | 6.43 | | 玄参 <i>Radix scrophulariae</i> | 116.5 | 302.1↑ | 301.4↑ | |
| 3 | 7.24 | | 玄参 <i>Radix scrophulariae</i> | 26.8 | 26.9 | 27.2 | |
| 4 | 7.89 | | 玄参 <i>Radix scrophulariae</i> | 30.7 | 29.9 | 32.8 | |
| 5 | 8.83 | 哈巴苷 harpagide | 玄参 <i>Radix scrophulariae</i> | 96.9 | 160.9↑ | 123.8↑ | |
| 6 | 9.48 | | 玄参 <i>Radix scrophulariae</i> | 23.7 | 57.5↑ | 79.8↑ | |
| 7 | 9.93 | | 玄参 <i>Radix scrophulariae</i> | 16.2 | 49.3↑ | 81↑ | |
| 8 | 10.53 | | 川银花 <i>Lonicerae similis</i> Flos | 53 | 29.4↓ | 90.2↑ | |
| 9 | 15.29 | | 川银花 <i>Lonicerae similis</i> Flos | 88.2 | 117.4↑ | 98.2 | |
| 10 | 16.48 | 新绿原酸 neochlorogenic acid | 川银花 <i>Lonicerae similis</i> Flos | 3038.6 | 780.1↓ | 3355.8↑ | |
| 11 | 18.52 | | 川银花 <i>Lonicerae similis</i> Flos | 523.4 | 528.7 | 529.6 | |
| 12 | 20.16 | | 川银花 <i>Lonicerae similis</i> Flos | 64.5 | 65.8 | 80.6↑ | |
| 13 | 23.89 | | 川银花 <i>Lonicerae similis</i> Flos | 567.3 | 493.2↓ | 566.8 | |
| 14 | 24.44 | | 川银花 <i>Lonicerae similis</i> Flos | 227.2 | 0 | 822.4↑ | |
| 15 | 26.99 | 绿原酸 chlorogenic acid | 川银花 <i>Lonicerae similis</i> Flos | 7124.8 | 9285.8↑ | 6535↓ | |
| 16 | 27.85 | 隐绿原酸 cryptochlorogenic acid | 川银花 <i>Lonicerae similis</i> Flos | 3430.9 | 2471.6↓ | 3631↑ | |
| 17 | 30.47 | 咖啡酸 caffeic acid | 川银花 <i>Lonicerae similis</i> Flos | 651.5 | 517.9↓ | 655 | |
| 18 | 30.95 | | 川银花 <i>Lonicerae similis</i> Flos | 184.3 | 154.8↓ | 181 | |
| 19 | 41.14 | | 川银花 <i>Lonicerae similis</i> Flos | 150.7 | 174.9↑ | 184.6↑ | |
| 20 | 42.29 | | 川银花 <i>Lonicerae similis</i> Flos | 39.5 | 63.1↑ | 67↑ | |
| 21 | 42.68 | | 川银花 <i>Lonicerae similis</i> Flos | 174 | 179.6 | 247.4↑ | |
| 22 | 43.73 | 异绿原酸B, isochlorogenic acid B | 川银花 <i>Lonicerae similis</i> Flos | 4365.1 | 3242.1↓ | 4118.4 | |
| 23 | 44.38 | | 川银花 <i>Lonicerae similis</i> Flos | 130.5 | 132.4 | 46.2↓ | |

续表2(Continued Tab. 2)

| 峰号 Peak | RT (min) | 名称 Name | 峰归属 Peak assignment | 川银花单煎液 Single decocotion of <i>Lonicerae similis</i> Flos | 玄参单煎液 Single decocotion of <i>Radix scrophulariae</i> | 合煎液 Combined decocotions | 单煎混合液 Single decocotion mixture |
|------------|-------------|-------------------------------|-----------------------------------|---|--|--------------------------------|--|
| | | | | | | | |
| 24 | 45.31 | 安格洛昔 Cangelo glucoside C | 玄参 <i>Radix scrophulariae</i> | | 220.7 | 223.5 | 241.8 |
| 25 | 45.88 | 异绿原酸 A ,isochlorogenic acid A | 川银花 <i>Lonicerae similis</i> Flos | 3269.9 | | 3490.5 | 3309 |
| 26 | 47.95 | 异绿原酸 Cisochlorogenic acid C | 川银花 <i>Lonicerae similis</i> Flos | 4418.8 | | 4777.8 ↑ | 4341.4 |
| 27 | 49.17 | | 川银花 <i>Lonicerae similis</i> Flos | 37.9 | | 39.1 | 44.6 |
| 28 | 50.34 | | 川银花 <i>Lonicerae similis</i> Flos | 41.8 | | 42.9 | 39.6 |
| 29 | 50.95 | | 川银花 <i>Lonicerae similis</i> Flos | 38.3 | | 37.7 | 35.6 |
| 30 | 54.2 | | 川银花 <i>Lonicerae similis</i> Flos | 17.6 | | 20.1 | 18.3 |
| 31 | 54.9 | | 川银花 <i>Lonicerae similis</i> Flos | 38.1 | | 39.2 | 38.7 |
| 32 | 55.7 | | 川银花 <i>Lonicerae similis</i> Flos | 82.3 | | 21.1 ↓ | 22.2 ↓ |
| 33 | 56.61 | 哈巴俄昔 harpagoside | 玄参 <i>Radix scrophulariae</i> | | 613.1 | 828.5 ↑ | 616.4 |
| 34 | 60.09 | 肉桂酸 cinnamic acid | 玄参 <i>Radix scrophulariae</i> | | 1945.7 | 1254.1 ↓ | 1927 |
| 35 | 61.98 | | 玄参 <i>Radix scrophulariae</i> | | 91.1 | 31.9 ↓ | 93.6 |

注:↑、↓分别表示合煎液、单煎混合液平均峰面积较单煎液的增高、降低。

Note: ↑、↓ indicated that the average peak area of the combined decoction and the single decoction mixture was higher and lower than that of the single decoction.

2.6 指标成分含量变化研究

2.6.1 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 5、5、3、2、1、1 mL, 分别依次置 5、10、10、10、10、25 mL 量瓶

中, 加甲醇定容至刻度, 摆匀, 按“2.1”项下色谱条

件进样分析, 以峰面积积分值为 Y 轴, 进样浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 为 X 轴绘制标准曲线, 各成分的回归方程、线性范围见表 4, 结果表明 11 个化合物线性关系良好。

表 3 11 个活性成分的回归方程和线性范围

Table 3 Regression equations and linear ranges of 11 active components

| 成分 Component | 回归方程 Regression equation | r 值 r value | 线性范围 Linear range ($\mu\text{g}/\text{mL}$) |
|------------------------------|-----------------------------|----------------|---|
| 新绿原酸 Neochlorogenic acid | $Y = 31.618X - 21.654$ | 0.9998 | $10.044 \sim 2.511 \times 10^2$ |
| 绿原酸 Chlorogenic acid | $Y = 30.52X - 72.048$ | 0.9999 | $28.414 \sim 7.103 \times 10^2$ |
| 隐绿原酸 Cryptochlorogenic acid | $Y = 32.024X + 52.782$ | 0.9996 | $8.448 \sim 2.112 \times 10^2$ |
| 咖啡酸 Caffeic acid | $Y = 17.666X + 0.3146$ | 1.0000 | $14.104 \sim 3.526 \times 10^2$ |
| 异绿原酸 Bisochlorogenic acid B | $Y = 29.803X - 7.2121$ | 0.9999 | $8.364 \sim 1.991 \times 10^2$ |
| 异绿原酸 A isochlorogenic acid A | $Y = 30.079X - 16.177$ | 0.9999 | $8.526 \sim 2.132 \times 10^2$ |
| 异绿原酸 Cisochlorogenic acid C | $Y = 30.938X + 1.3791$ | 0.9999 | $8.022 \sim 2.006 \times 10^2$ |
| 哈巴昔 Harpagide | $Y = 101.73X + 14.15$ | 0.9999 | $1.520 \sim 0.380 \times 10^2$ |
| 哈巴俄昔 Harpagoside | $Y = 12.395X - 2.0392$ | 1.0000 | $12.37 \sim 3.093 \times 10^2$ |
| 肉桂酸 Cinnamic acid | $Y = 73.054X - 40.566$ | 0.9997 | $4.044 \sim 1.011 \times 10^2$ |
| 安格洛昔 Cangelo glucoside C | $Y = 354.6X + 64.669$ | 0.9997 | $0.608 \sim 0.152 \times 10^2$ |

2.6.2 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液, 按

“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 测定峰面积。结果表明, 11 种成分的峰面积 RSD 均在 3% 以内,

表明仪器精密度良好。

2.6.3 稳定性试验

经指纹图谱方法学“2.3.2”测定,供试品溶液在24 h内稳定性良好,此处不再赘述。

2.6.4 重复性试验

经指纹图谱方法学“2.3.3”测定,该方法重复性良好,此处不再赘述。

2.6.5 加样回收率试验

精密吸取1 mL已知含量的川银花-玄参药对供试品溶液6份(J1~J6),分别置25 mL量瓶中,精密

加入混合对照品储备液适量(与样品中各待测成分的含量相当),加50%甲醇定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,作为加样回收供试品溶液。按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算加样回收率。结果表明11个成分的平均加样回收率均在99%~102%之间,RSD均小于3%。

2.6.6 样品含量测定

取“2.2”项下供试品和对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,以外标法计算样品中的11个活性成分的平均含量,结果见表5。

表4 配伍前后多指标定量测定结果(mg/g)

Table 4 The results of multi-index quantitative analysis (mg/g)

| 成分 Component | 川银花单煎(C1) Single decoction of <i>Lonicerae similis Flos</i> | 玄参单煎(X1) Single decoction of <i>Radix scrophulariae</i> | 合煎液(J1) Combined decoctions | 单煎混合液(H1) Single decoction mixture |
|------------------------------|---|---|-----------------------------------|--|
| 新绿原酸 Neochlorogenic acid | 5.941 | - | 1.525 | 6.501 |
| 绿原酸 Chlorogenic acid | 14.141 | - | 18.431 | 12.971 |
| 隐绿原酸 Cryptochlorogenic acid | 6.558 | - | 4.724 | 6.941 |
| 咖啡酸 Caffeic acid | 0.023 | - | 0.018 | 0.023 |
| 异绿原酸 Bisochlorogenic acid B | 9.028 | - | 6.705 | 8.518 |
| 异绿原酸 A Isochlorogenic acid A | 6.728 | - | 7.182 | 6.809 |
| 异绿原酸 Cisochlorogenic acid C | 8.826 | - | 9.544 | 8.672 |
| 哈巴苷 Harpagide | - | 0.055 | 0.091 | 0.070 |
| 哈巴俄苷 Harpagoside | - | 3.092 | 4.178 | 3.108 |
| 肉桂酸 Cinnamic acid | - | 10.788 | 6.954 | 10.685 |
| 安格洛苷 Cangelo glucoside C | - | 0.181 | 0.184 | 0.198 |

2.6.7 指标性成分含量变化分析

实验结果表明,相较于药材单煎液,混合液的指标成分含量无较大的变化,而在合煎液中绿原酸含量大幅度增加,新绿原酸与隐绿原酸、咖啡酸含量有所降低,原因可能由于绿原酸类成分是一种由奎尼酸和咖啡酸缩合而成的多酚类化合物,具有多种异构体,其中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸互为同分异构体,它们的结构母核相同,存在酯键、不饱和双键和多元酚,新绿原酸是与隐绿原酸、咖啡酸成分在加热的条件下转化为绿原酸;异绿原酸A、C含量增加量约等于异绿原酸B降低的含量,原因是异绿原酸B、A、C互为同分异构体,三者共煎受热过程中,受温度、PH等影响发生异构化^[14];哈巴苷、哈巴俄苷含量明显增加,二者为环烯醚萜苷类成分,含有多个酚羟基、酮基和氧苷键,环烯醚萜苷对酸很敏感,其苷键极易被酸水解,使其溶出增加,生成的苷元很不

稳定,易发生聚合反应,受温度、PH等影响使其重新聚合为苷类^[15];哈巴俄苷易代谢产物为肉桂酸与哈巴苷,肉桂酸为有机酸,在配伍合煎过程在受绿原酸类成分的抑制,致其溶出降低,哈巴俄苷代谢降低^[16]。

3 讨论与结论

汤剂为我国传统中药剂型,是将处方中除特殊药味外,其余的各味药材一起煎煮,然后去渣所得的药液,是从古至今长期医疗实践的结果。本实验合煎液中部分有效成分含量的增加证明了其的合理性,但也存在部分成分含量的减低。近年来,中药配方颗粒迅猛发展,自应用以来受到了广泛的关注与好评,是将处方中各味药分别煎煮制粒,服用时再混合,本实验单煎混合液也证明了其的可信度,但也存在部分活性成分含量明显低于合煎液。因此,处方药味的配液方式应以所需化学成分的性质而定,不

能一味的做汤剂或者配方颗粒。

配伍是中药复方用药的特色和优势所在,药对是中药复方配伍中最简单、基本和常见的形式,是在临床运用中得出的药物组合,但其并非两种药效的单纯累积相加,而是各药味中的有效成分相互作用的结果,外界的环境、PH、温度均会对其产生影响。与一些药味较多的中药复方相比,药对组成简单且具备中药配伍基本特点,药对中两味药作用关系的研究较为简单,容易得出明确的结论,通过定性定量地认识药对配伍,了解其成分与功效相关性,有助于进一步理解中药复方配伍规律。

指纹图谱偏于定性,虽然其模糊性能反映药材整体成分信息,但具体是什么,含量多少均无法明确。而多指标成分检测,必需有足够的化学对照品,不能整体上把握药对的成分变化,二者皆有不足。本试验将两者相结合,更全面科学揭示药对药效物质基础配伍变化,为其以后质量控制及配伍规律等研究提供重要参考依据。

参考《中国药典》2015年版^[1]及相关文献^[17-19],在色谱条件优化的过程中,流动相的选择分别比较了乙腈-水、甲酸-乙腈、乙腈-甲酸-水、甲醇-四氢呋喃-水、乙腈-乙酸-水、乙腈-磷酸-水等溶剂系统,以不同梯度进行实验。最终选择了乙腈-磷酸-水溶液体系,该溶剂系统基线漂移小,分离最好。波长的选择:分别考察了210、240、235、236、325、327、280 nm全波长扫描和波长切换扫描,结果显示采用波长切换法检测到的峰最多,基线漂浮不大,获得信息全面稳定,效果明显好于全波长扫描。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015:225-226.
- 2 Zhang XM(张雪梅), Wang R(王瑞), An R(安睿), et al. Simultaneous determination of five constituents in Scrophularia ningpoensis by HPLC[J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2011, 36:709-711.
- 3 Hu YY(胡瑛瑛), Huang Z(黄真). Advances in research of chemical constituents and pharmacological effects of *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. [J]. *J Zhejiang Coll Tradit Chin Med*(浙江中医药大学学报), 2008, 32:268-270.
- 4 Liu B(刘宾), Liang C(梁晨), Xu SS(徐思恩), et al. Content determination of harpagide and hapagoside in the Radix Scrophulariae pieces from different areas by HPLC [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2014, 25:555-556.
- 5 Song YL(宋亚玲), Wang HM(王红梅), Ni FY(倪付勇), et al. Study on anti-inflammatory activities of phenolic acids from *Lonicerae japonicae Flos* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2015, 46:490-495.
- 6 Wang YD(王亚丹), Yang JB(杨建波), Dai Z(戴忠), et al. Research progress on *Lonicerae japonicae Flos* [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2014, 34:1928-1935.
- 7 Wang XQ(王秀芹), Lv WS(吕渭升), Lin T(林彤). Improvement in the quality standard for Kouyanqing granules [J]. *Chin Tradit Pat Mde*(中成药), 2016, 38:1526-1530.
- 8 Zhong J(钟君), Liu J(刘洁), Liu YY(刘燕云). Research progress on mechanism of Simiao Yong'an decoction [J]. *World Lat Med Inf*(世界最新医学信息文摘), 2017, 17(32):25-26.
- 9 Yang XQ(杨秀青), Shi ZR(石征蓉), Gu JH(谷江华), et al. Quality assessment of Yinju Jiedu oral liquid based on HPLC fingerprint and multi-components simultaneous determination[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2017, 48: 2645-2652.
- 10 Gao JY(高家荣), Wu X(吴溪), Han YQ(韩燕全), et al. Effect of decoction methods on UPLC fingerprint of *Schisandra chinensis* Fructus and *Ziziphi spinosae* Semen[J]. *Chin Tradit Pat Mde*(中成药), 2013, 35:1001-1005.
- 11 Shi ZR(石征蓉), Gu JH(谷江华), Yang XQ(杨秀青), et al. Studies on fingerprints change and multi-index constituents quantitative analysis in *Lonicerae similis* Flos-*Scutellariae Radix* herb couple before and after compatibility[J]. *Chin J Exp Tradit Med Formul*(中国实验方剂学杂志), 2017, 23(18):1-6.
- 12 Cao M(曹敏), Wu B(武斌), Liu SM(刘树民). Study of variation on fingerprint chromatogram of compatibility extract derived from *Fructus Xanthii* and *Radix Astragali* by HPLC-DAD[J]. *Chin J Basic Med Tradit Chin Med*(中国中医基础医学杂志), 2012, 19(2):55-57.
- 13 Chen K(陈凯), Li H(李慧), Wang JQ(王佳奇), et al. Study on dissolution of four alkaloid contents in compatibility of *Coptidis Rhizoma* and *Rheui Radix et Rhizoma* based on compatibility ratio and pH value environment by quantitative analysis of multi-components by single marker[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2016, 47:1709-1713.
- 14 Liu Y(刘颖), Guo MY(郭明晔), Bai GB(白根本). Research progress of chlorogenic acid[J]. *J Chin Med Mater*(中药材), 2012, 35:1180-1180.

(下转第967页)